

**Untersuchungen zum peroxisomalen Import  
von Isocitrat-Lyasen  
in *Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sonja Meyer zu Berstenhorst**

aus Münster/Westf.

Jülich

2005

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann  
1. Korreferent: Prof. Dr. Hermann Sahm  
2. Korreferent: Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2005

## ABSTRACT

### Studies on the peroxisomal import of isocitrate lyases in *S.cerevisiae*

Peroxisomes play a central role in the metabolism of fatty acids and the detoxication of reactive oxygen species, e.g.  $H_2O_2$ , emerging from oxidation processes. Peroxisomal disorders cause diseases, often due to an import defect of certain enzymes. The two major import pathways of peroxisomal matrix proteins are based on conserved signal sequences. The most common signal is the so-called PTS1, a tripeptide at the end of the C-terminus. More rarely an N-terminal nonapeptide (PTS2) occurs. Moreover some proteins contain an additional signal and/or use a hitherto unknown import pathway. For instance only some peroxisomal isocitrate lyases have a PTS1 signal.

Isocitrate lyase (ICL) is a key enzyme of the glyoxylate pathway and thus essential for growth on non-fermentable carbon sources. Eukaryotic ICLs are usually localized in the peroxisomes, with the exception of the cytosolic ICL of the baker's yeast *S.cerevisiae*. In contrast to this cytosolic *Sc* ICL the peroxisomal *Ashbya gossypii* -ICL contains a PTS1 signal. Therefore the question arose, whether this signal was sufficient to mediate the peroxisomal ICL-import or whether an additional signal was necessary.

By fusion of the PTS1-tripeptide AKL or exchange of the C-terminus with that of *Ag* ICL an import of 3 - 4% of the modified *Sc* ICL was achieved. In the course of this the peroxisomal localization was independently shown by sucrose density centrifugation as well as immuno electron microscopy. Interestingly, the import of heterologously expressed *Ag* ICL was far more efficient with approx. 20%. This difference pointed to an additional peroxisomal signal of the *Ag* ICL compared with the *Sc* ICL. The thesis was supported by muteins without a functional PTS1, which were imported to 20% (*Ag* ICL extended by 39 amino acids) or 9% (PTS1 deleted). The signal needed for this import was assumed within the region of the structural domain II of the *Ag* ICL and researched with a hybrid protein of the *E.coli*-ICL. The ICL structural domain II is an internal region of about 100 amino acids, which is missing in prokaryotes. Thus the hybrid protein *Ec* ICL*Ag* DII was made by insertion of the *Ag* ICL structural domain II (*Ag* DII). Differential centrifugations displayed a significant peroxisomal localization of this hybrid protein. While - according to activity assays - only 0.7% of the wild type *Ec* ICL located in the yeast organelles, the proportion of the hybrid protein was 33%. The result was confirmed by Western blots presenting a clear band of *Ec* ICL*Ag* DII within the organellar pellet. Thereby the functionality of an ICL structural domain II sequence as an organellar signal was shown for the first time.

In castor bean ICL the PTS1 region is also dispensable for peroxisomal import, which nevertheless requires the PTS1 receptor PEX5 (Parkes *et al*, 2003). To check whether this relationship also exists for the PTS1-less *Ag* ICL and the hybrid *Ec* ICL*Ag* DII, a PEX5 disruption mutant was cloned. The unaltered subcellular distribution of both ICL muteins in this strain background contradicted a dependency of the import on PEX5. Enzyme assays demonstrated 8% of the PTS1-less *Ag* ICL or 34% of the hybrid *Ec* ICL*Ag* DII within the organellar pellet. The localization of the ICLs within the organelles as well as the mislocalization of the PEX5-dependent catalase A were confirmed by Western blots. Immuno-detection within the fractions of sucrose density gradients showed the co-localization of both ICL muteins with thiolase, a PTS2 peroxisomal marker. Hence the *Ag* ICL contained a novel, PEX5-independent peroxisomal signal within the region of its structural domain II.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren .....</b>	<b>V</b>
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1. <b>Peroxisomen und peroxisomaler Import .....</b>	<b>1</b>
2. <b>Die Isocitrat-Lyase, ein Schlüsselenzym des Glyoxylatwegs .....</b>	<b>4</b>
3. <b>Delokalisierung als Ansatz zur Isolierung eines Metabolit-Carriers.....</b>	<b>6</b>
4. <b>Ziele dieser Arbeit .....</b>	<b>8</b>
<b>II. Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
1. <b>Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>9</b>
2. <b>Stämme .....</b>	<b>11</b>
3. <b>Plasmide und Primer .....</b>	<b>12</b>
4. <b>Antiseren .....</b>	<b>16</b>
5. <b>Medien und Kulturbedingungen.....</b>	<b>16</b>
6. <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>17</b>
6.1.    Transformationstechniken.....	17
6.2.    Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	18
6.3.    Präparation von Gesamt-DNA aus <i>S.cerevisiae</i> .....	18
6.4.    DNA-Restriktion.....	19
6.5.    DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	19
6.6.    DNA-Amplifikation per PCR .....	20
6.7.    DNA-Aufreinigung, -Anreicherung und -Konzentrationsbestimmung .....	20
6.8.    Ligation .....	20
6.9.    Kassettenmutagenese.....	20
6.10.    Gerichtete Mutagenese von Plasmiden.....	21
6.11.    Sequenzierung .....	21
6.12.    Southern Blot .....	22
7. <b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>23</b>
7.1.    Biomassebestimmung .....	23
7.2.    Herstellung von <i>S.cerevisiae</i> -Rohextrakt .....	24
7.3.    Messung von Enzymaktivitäten.....	24
7.4.    Proteinbestimmung .....	25
7.5.    Differenzielle Zentrifugation.....	26
7.6.    Saccharose-Dichtegradienten .....	27
7.7.    Proteinauftrennung und immunologischer Nachweis .....	28
7.8.    Immuno-Goldmarkierung und Elektronenmikroskopie .....	29
8. <b>Angaben zur Umrechnung der Zentrifugendrehzahlen.....</b>	<b>30</b>

<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
1. <b>Wachstumsversuche zur Rolle der Isocitrat-Lyase (ICL) bei <i>A.gossypii</i> und <i>S.cerevisiae</i></b> .....	<b>31</b>
1.1.  Biomassebildung und spezifische ICL-Aktivität .....	31
1.2.  Auswahl einer Signalsequenz zur Erzeugung eines peroxisomalen <i>Sc</i> ICL-Muteins.....	33
2. <b>Die Hefemutante <i>Sc</i> ICL+AKL mit künstlichem PTS1-Signal</b> .....	<b>34</b>
2.1.  Erzeugung und molekulare Verifizierung chromosomaler Hefemutanten .....	34
2.2.  Wachstums- und Komplementationsversuche .....	36
2.3.  Untersuchungen zum peroxisomalen Import von <i>Sc</i> ICL+AKL.....	39
2.4.  Erzeugung eines Hybridproteins mit Ashbya -ICL C-Terminus .....	44
3. <b>Parameteruntersuchung zur Effizienz des PTS1-abhängigen Imports</b> .....	<b>45</b>
3.1.  Kohlenstoffquelle und Kulturmedium.....	47
3.2.  Stammhintergrund.....	47
3.3.  Einfluss eines zusätzlichen Signals .....	48
4. <b>Strukturvergleiche verschiedener ICLs</b> .....	<b>50</b>
5. <b>Peroxisomaler Import heterologer und modifizierter Isocitrat-Lyasen in <i>S.cerevisiae</i></b> .....	<b>56</b>
5.1.  Plasmidkonstruktionen zur Untersuchung weiterer ICL-Varianten.....	56
5.2.  Wachstumsversuche zur Funktionalität der ICLs .....	57
5.3.  Subzelluläre Lokalisation von <i>Ag</i> ICL mit verändertem C-Terminus.....	59
5.4.  Subzelluläre Lokalisation von <i>Ec</i> ICL ohne und mit Ashbya -Domäne II .....	63
6. <b>Abhängigkeit des peroxisomalen Imports vom PTS1-Rezeptor PEX5</b> .....	<b>65</b>
6.1.  Erzeugung einer <i>Sc</i> $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5-Doppelmutante.....	65
6.2.  Subzelluläre Lokalisation von <i>Ag</i> ICL8K-6 in <i>Sc</i> $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5.....	66
6.3.  Subzelluläre Lokalisation von <i>Ec</i> ICL $_{Ag}$ DII in <i>Sc</i> $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5 .....	69
<b>IV. Diskussion</b> .....	<b>73</b>
1. <b>Die Effizienz peroxisomaler Signalsequenzen</b> .....	<b>73</b>
2. <b>Die <i>Ag</i> ICL Strukturdomäne II: ein neuartiges PTS</b> .....	<b>77</b>
3. <b>PEX5 und der Import von Proteinen ohne PTS1 oder PTS2</b> .....	<b>81</b>
4. <b>Lokalisation und Regulation des Glyoxylatwegs am Beispiel der ICL</b> .....	<b>83</b>
5. <b>Ausblick</b> .....	<b>86</b>
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>VI. Anhang</b> .....	<b>88</b>
Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ICL-Mutanten.....	88
Schemata zur Plasmidkonstruktion .....	89
<b>VII. Literatur</b> .....	<b>91</b>

**ABKÜRZUNGEN**

$\alpha$ -CTA, $\alpha$ -ICL, $\alpha$ -...	Antiseren gegen die entsprechenden Proteine
Abb.	Abbildung
<i>Ag I A.gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz: $\beta$ -Lactamase-Gen
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
chr.	chromosomal
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
CTA	Cta1p, peroxisomale Katalase A [EC 1.11.1.6]
<i>CTA1</i>	Gen der peroxisomalen Katalase A
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
<i>Ec I E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verstärkte ( <i>enhanced</i> ) Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> : und andere (Coautoren)
EUROSCARF	<i>European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis</i>
g	Gramm (bzgl. Massen) <u>oder</u> Erdbeschleunigung (bzgl. Zentrifugalkraft)
GB	Genbank
<i>GFP</i>	<i>green fluorescent protein</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICL	Icl1p, Isocitrat-Lyase [EC 4.1.3.1]
<i>ICL1</i>	Gen der Isocitrat-Lyase 1
inkl.	inklusive
Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz, wirkt auch gegen Geneticin
<i>kanMX4</i>	Kanamycinresistenzkassette nach Güldener <i>et al.</i> (1996)
kb, kDa	Kilobasen, Kilodalton ( $10^3$ )

---

MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
Min.	Minute
MLS	Mls1p, Malatsynthase [EC 2.3.3.9]
<i>MLS1</i>	Gen der Malatsynthase 1
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
nt	Nukleotid(e)
OD <sub>nm</sub>	optische Dichte, Extinktion bei entsprechender Wellenlänge
Org.	Organell
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Perox.	Peroxisom
PEX5	Pex5p, PTS1-Rezeptor
PNS	<i>post nuclear supernatant</i> , zellfreies Homogenat
PTS	<i>peroxisomal targeting sequence</i>
Ref.	Referenz
rel.	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
<i>Sc</i> / <i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [Bäckerhefe]
SDS	Natriumdodecylsulfat
spezif.	spezifisch
Std.	Stunde
TCA	Trichloressigsäure
Thio, Thiolase	3-Ketoacyl-Thiolase [EC 2.3.1.16]
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween80	Polyoxyethylensorbitan-Monooleat
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg Protein})$ ]
Ü25000g	Überstand der Zentrifugation bei 25000g
<i>URA3</i>	Gen der Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase in <i>S.cerevisiae</i>
UTR	untranslatierte Region der DNA; 3' = nach einem Gen
v/v	Volumen pro Volumen: Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen: Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> : Hefe-Stickstoffbasis [Mediumzusatz]
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

---

**EIN-BUCHSTABEN-CODE DER AMINOSÄUREN**

Tab. 1: Der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

<b>Ein-Buchstaben-Code</b>	<b>Drei-Buchstaben-Code</b>	<b>Aminosäure</b>
<b>A</b>	Ala	Alanin
<b>C</b>	Cys	Cystein
<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure
<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin
<b>G</b>	Gly	Glycin
<b>H</b>	His	Histidin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin
<b>K</b>	Lys	Lysin
<b>L</b>	Leu	Leucin
<b>M</b>	Met	Methionin
<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>S</b>	Ser	Serin
<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>V</b>	Val	Valin
<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>X</b>	X	(beliebiger Platzhalter)
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin

---



## EINLEITUNG

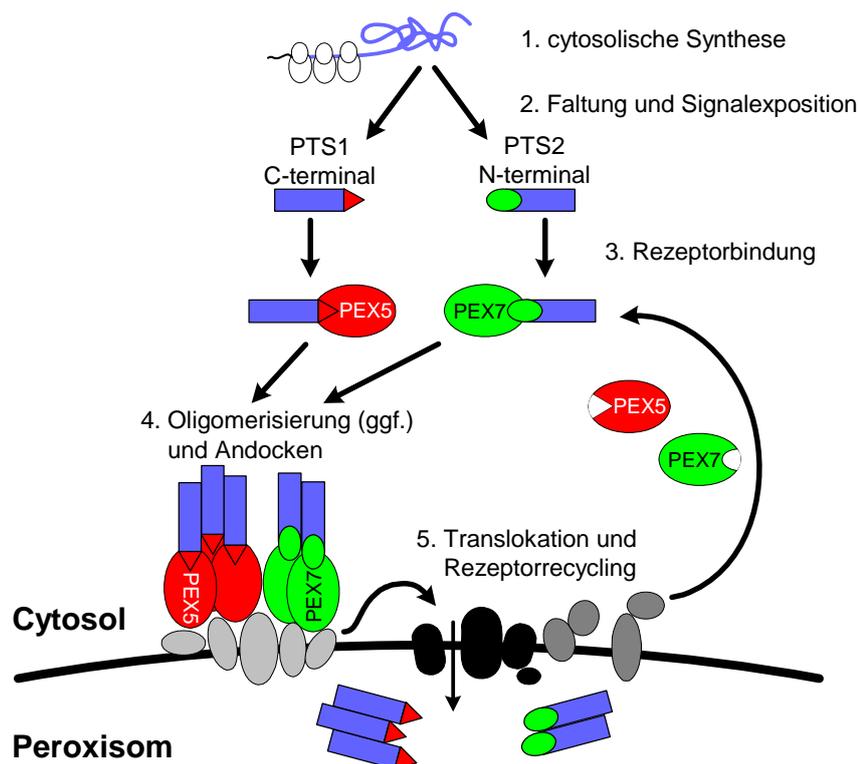
### 1. Peroxisomen und peroxisomaler Import

Ein charakteristisches Merkmal eukaryotischer Zellen ist die Kompartimentierung. Die Aufteilung von Stoffwechselreaktionen auf verschiedene Organellen war ein Evolutionsvorteil. So ermöglichte die räumliche Trennung unter anderem parallele konkurrierende oder gegenläufige Reaktionen. Zu den am spätesten entdeckten Zellorganellen gehören die Peroxisomen, die ubiquitär bei Eukaryoten vorkommen. Die Untersuchung der in den 1950er Jahren zunächst als „sphärische und ovale *Microbodies*“ (Rhodin, 1954) beschriebenen Kompartimente ging einher mit Fortschritten in der Elektronenmikroskopie und der behutsamen Dichtegradientenzentrifugation. Peroxisomen erhielten ihren Namen 1966 von De Duve und Baudhuin als eine durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierende Oxidasen und Katalase charakterisierte Organellfraktion. Heute ist bekannt, dass die Peroxisomen eine funktionell sehr heterogene Gruppe verwandter Zellorganellen bilden, deren gemeinsame Kennzeichen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stoffwechsel und ein spezifisches  $\beta$ -Oxidationssystem sind (Parsons *et al.*, 2001).

Peroxisomen sind je nach Organismus, Zelltyp und Umweltbedingungen sehr variabel hinsichtlich ihrer Morphologie, Anzahl, Proteinzusammensetzung und biochemischen Funktion (zusammengefasst in: Titorenko & Rachubinski, 2001). Typischerweise bilden sie jedoch sphärische Körper von 0,2 - 1  $\mu$ m Durchmesser, die von einer einfachen Lipid-Doppelschicht umschlossen sind. Die Peroxisomenmatrix besteht aus Elektronen-dichtem, feingranulärem Material und kann parakristalline Strukturen enthalten. Die Stoffwechselkapazität umfasst sowohl Abbaupfade, z.B. für Fettsäuren (alle Eukaryoten), Aminosäuren und Purine (Säugetiere), als auch Biosynthesen, z.B. von Penicillin (einige Pilze), Cholesterin und Gallensäuren (Säugetiere). Dennoch wurden Peroxisomen lange als „fossile Organellen“ unterschätzt und erst in der Mitte der 1980er Jahre als Ort lebenswichtiger Stoffwechselreaktionen identifiziert.

Das wissenschaftliche Interesse an Peroxisomen beruht nicht zuletzt darauf, dass Störungen ihrer Struktur und/oder ihrer Funktion zu schwerwiegenden, meist tödlich verlaufenden Erkrankungen beim Menschen führen. Ein Prototyp dieser als „*peroxisomal disorders*“ bezeichneten rezessiven Erbkrankheiten ist das Zellweger-Syndrom, eine seit 1964 bekannte cerebro-hepato-renale Funktionsstörung (Bowen *et al.*, 1964). Mittlerweile sind 17 verschiedene Krankheiten beschrieben, die in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1.) peroxisomale Biogenese-Störungen (PBDs, *peroxisomal biogenesis disorders*) und 2.) peroxisomale Einzel-Enzymausfälle (Wanders, 2004; Wanders & Waterham, 2005). Das Zellweger-Syndrom gehört zu den Biogenese-Störungen, bei denen durch die Beeinträchtigung des gesamten Peroxisoms gleichzeitig mehrere peroxisomale Stoffwechselwege betroffen sind. Die an der Peroxisomenbiogenese beteiligten Proteine werden Peroxine genannt und sind durch die *PEX*-Gene codiert. Derzeit wurden in den unterschiedlichen Organismen insgesamt 32 Peroxine und ein relevantes Chaperon (Djp1p; Hetteema *et al.*, 1998) identifiziert (Wanders & Waterham, 2005). Mutationen in 11 dieser Peroxine verursachen die vier bekannten Biogenese-Krankheiten, die sich wiederum in verschiedene Komplementationsgruppen untergliedern. Weniger komplex ist die Situation bei den peroxisomalen Einzel-Enzymausfällen, da jeweils nur ein einzelnes peroxisomales Protein betroffen und nur ein einzelner Stoffwechselweg gestört ist. Ein interessantes Beispiel dieser Gruppe von Krankheiten ist die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie, die zur Entdeckung des ersten peroxisomalen Metabolit-Transporters führte (Mosser *et al.*, 1993 & 1994).

Peroxisomen besitzen weder eine eigene DNA noch eine Maschinerie zur Proteinbiosynthese. Deshalb müssen sowohl Metabolite als auch Cofaktoren und alle peroxisomalen Matrixproteine über die Barriere der Peroxisomenmembran importiert werden. Die meisten der beschriebenen Peroxine sind am peroxisomalen Proteinimport beteiligt (Gould & Collins, 2002), die komplexen Zusammenhänge sind jedoch nicht relevant im Rahmen dieser Doktorarbeit. Die **Abb. 1** zeigt deshalb ein sehr vereinfachtes Schema zum Import peroxisomaler Matrixproteine über die beiden am besten untersuchten Importwege. Darüber hinaus existieren mehrere atypische Importmechanismen für Matrixproteine mit anderen Signalsequenzen, die sich bisher keinem allgemeinen Schema zuordnen lassen.



**Abb. 1: Vereinfachtes Schema zum peroxisomalen Matrixprotein-Import**

Blaue Rechtecke entsprechen Monomeren der transportierten Proteine, jeweils versehen mit einem Peroxisomensignal (PTS) in der Farbe des beteiligten Rezeptors (PEX5 oder PEX7). Im Bereich der Peroxisomenmembran sind drei Gruppen von Peroxinen relevant: der „*Docking* Komplex“ (hellgrau), die Translokationsmaschinerie (schwarz) und die Peroxine zum Rezeptor-Recycling (dunkelgrau). Die räumliche Anordnung der Peroxin-Komplexe ist unbekannt, es könnte sich auch um einen einzigen, dynamischen Komplex handeln.

Sämtliche peroxisomalen Proteine sind im Zellkern codiert und werden nach einer cytosolischen Synthese an freien Ribosomen posttranslational in die Peroxisomen importiert. Ein besonderes Kennzeichen des peroxisomalen Imports ist, dass im Gegensatz zu anderen Organellen gefaltete Proteine aufgenommen werden können. Die Proteine können als Monomer oder Oligomer vorliegen und werden sogar in stabilisierter Form importiert. Die peroxisomalen *Target*-Sequenzen (PTS) vermitteln die Bindung an spezifische Rezeptoren, die über spezielle Bindeproteine (den sogenannten „*Docking* Komplex“) den Kontakt zur peroxisomalen Membran herstellen. Bei einigen Proteinen erfolgt bereits im Cytosol eine Oligomerisierung, wobei unklar ist, ob die Oligomere zur Erhöhung der Importeffizienz nicht doch als Monomere die Peroxisomen-

membran passieren und sich anschließend wieder verbinden. Nach dem „*extended Shuttle*“-Modell wird das Protein zusammen mit dem jeweiligen Rezeptor über eine Translokationsmaschinerie in die Peroxisomenmatrix gebracht. Alternativ wird nur das zu importierende Protein transportiert („*simple Shuttle*“) (Smith & Schnell, 2001). Bei beiden Modellen wird der Rezeptor nach der Dissoziation von seiner Fracht ins Cytosol zurückgeführt und steht für weitere Importrunden zur Verfügung.

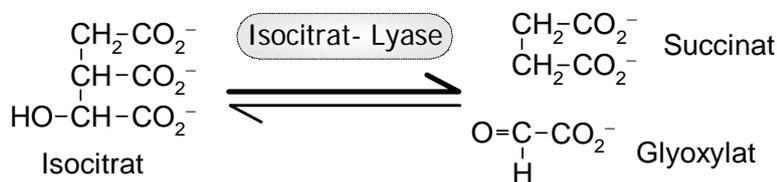
Die beiden Importwege der **Abb. 1** unterscheiden sich vor allem in der Signalsequenz und dem dazugehörigen Rezeptor. Mehr als 90% aller peroxisomalen Matrixproteine verwenden das Importsignal PTS1, ein endständiges, C-terminales Tripeptid, das mit dem Rezeptor PEX5 interagiert (Maynard *et al.*, 2004). Seit der Entdeckung der Aminosäure-Sequenz Serin-Lysin-Leucin (Ein-Buchstaben-Code: SKL, siehe Tab. 1) als Peroxisomensignal bei dem Glühwürmchenprotein Luciferase (Gould *et al.*, 1987) erfolgten viele Untersuchungen zur Eingrenzung einer Konsensus-Sequenz. Nach der aktuellen Definition sind mindestens die letzten 12 Aminosäuren peroxisomaler Proteine an der PTS1-Signalfunktion beteiligt (Neuberger *et al.*, 2003a). Neben einer Verbindungsregion (*linker*) zur Signalpräsentation und einem Bereich zur Interaktion mit dem Rezeptor PEX5 ist vor allem das charakteristische Tripeptid wichtig. Dieses Tripeptid zeigt Taxon- und Protein-spezifische Variationen, entspricht aber meistens dem Konsensus (S/A/C) (K/R/H) (L/M). Zusätzlich zum PTS1-Importweg besitzen alle bisher untersuchten Eukaryoten außer dem Wurm *Caenorhabditis elegans* auch ein PTS2-Importsystem. Das PTS2-Signal ist ein N-terminales Nonapeptid im vorderen Fünftel des Proteins, dessen Konsensus aktuell als R (L/V/I/Q) X X (L/V/I/H) (L/S/G/A) X (H/Q) (L/A) beschrieben wird (Petriv *et al.*, 2004). PTS2-Proteine werden über den Rezeptor PEX7 importiert, wobei die Signalsequenz in manchen Fällen innerhalb des Peroxisoms abgespalten wird. Obwohl bisher nur wenige PTS2-Proteine entdeckt wurden (zusammengefasst in: Petriv *et al.*, 2004), ist der Importweg sehr wichtig, denn ein PEX7-Defekt führt zu der peroxisomalen Biogenese-Krankheit Rhizomelische Chondrodysplasia Punctata Typ 1. Ohne PEX7 wird das typische PTS2-Protein 3-Ketoacyl-Thiolase, das dritte Enzym der  $\beta$ -Oxidation, nicht importiert, was zur Folge hat, dass der peroxisomale Fettstoffwechsel nicht funktioniert.

Ein Großteil des heutigen Wissens über Peroxisomen und peroxisomale Importprozesse wurde durch die molekularbiologische Untersuchung von Modellorganismen gewonnen. Dabei werden häufig Hefen verwendet, weil sie im Gegensatz zu den Säugetieren kein mitochondrielles  $\beta$ -Oxidationssystem besitzen und der Abbau von Fettsäuren somit ausschließlich in den Peroxisomen stattfindet. So benötigt auch die Bäckerhefe *S.cerevisiae* funktionelle Peroxisomen zum Wachstum auf Fettsäuren als einziger Kohlenstoffquelle. Viele Peroxine wurden daher mit Hilfe von Hefemutanten isoliert, die auf Ölsäuremedium nicht wachsen konnten. Durch eine Ölsäurezugabe können eine massive Vermehrung (Proliferation) der *S.cerevisiae*-Peroxisomen sowie eine starke Induktion vieler peroxisomaler Proteine erreicht werden. Zwar ist die Teilungsrate auf der ungünstigen Kohlenstoffquelle verlangsamt, bei entsprechender Zellanzucht können nach gut etablierten Vorschriften dennoch Peroxisomen isoliert werden. *S.cerevisiae* ist der bevorzugte Modellorganismus zur Untersuchung peroxisomaler Importmechanismen, da aufgrund der frei verfügbaren, kompletten Genomsequenz und der guten gentechnischen Manipulierbarkeit relativ einfach Deletionsmutanten eines zu untersuchenden Gens hergestellt werden können. Darüber hinaus akzeptiert die peroxisomale Importmaschinerie der Bäckerhefe viele heterologe Proteine (De Hoop & Ab, 1992).

## 2. Die Isocitrat-Lyase, ein Schlüsselenzym des Glyoxylatwegs

Trotz der allgemein anerkannten Funktion als Modellorganismus ist *S.cerevisiae* hinsichtlich des Enzyms Isocitrat-Lyase (ICL) ein interessanter Ausnahmefall unter den Eukaryoten. Die ICL ist bei allen bisher untersuchten Eukaryoten peroxisomal und nur bei der Bäckerhefe cytosolisch. Diese subzelluläre Lokalisation war lange Zeit umstritten. Zwar gab es schon in den 1960er Jahren Hinweise für eine ausschließlich cytosolische Lokalisation der *S.cerevisiae*-ICL (Duntze *et al.*, 1969), der Nachweis gelang jedoch erst in den 1990er Jahren (Taylor *et al.*, 1996; Chaves *et al.*, 1997).

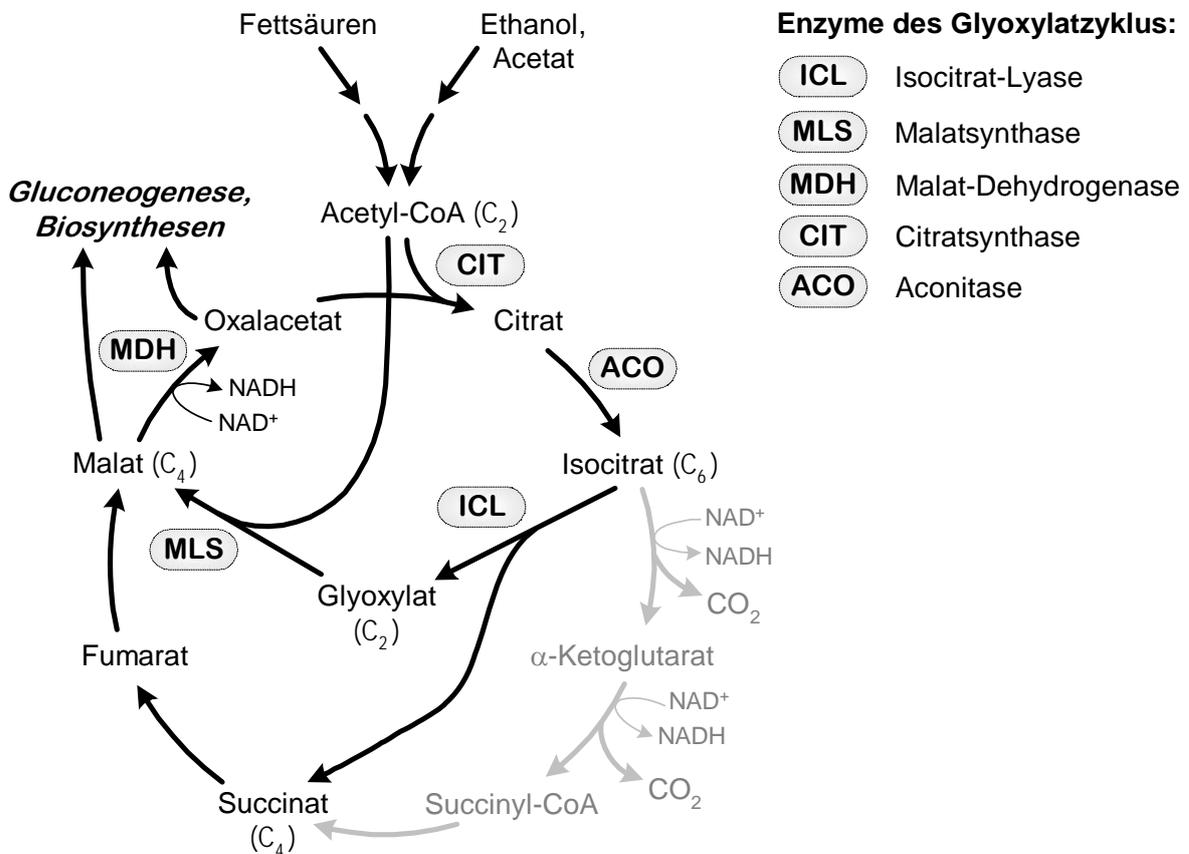
Die ICL katalysiert die Spaltung des C<sub>6</sub>-Körpers Isocitrat in Succinat (C<sub>4</sub>) und Glyoxylat (C<sub>2</sub>) (**Abb. 2**). Diese Reaktion ist charakteristisch für den nach ihrem Reaktionsprodukt benannten Glyoxylatweg. Unter physiologischen Bedingungen findet die Rückreaktion, d.h. die Bildung von Isocitrat aus Succinat und Glyoxylat, nicht statt (Vanni *et al.*, 1990).



**Abb. 2: Chemische Reaktion der Isocitrat-Lyase**

Wie **Abb. 3** veranschaulicht, ist der Glyoxylatweg eine modifizierte Form des Citratzyklus. Durch die Umgehung der Decarboxylierungsschritte des Citratzyklus wird der Kohlenstoffverlust vermieden und die Netto-Synthese von Zellbestandteilen aus C<sub>2</sub>-Vorstufen ermöglicht (Kornberg & Krebs, 1957). Die beiden Schlüsselenzyme des Glyoxylatwegs sind die Isocitrat-Lyase und die Malatsynthase (MLS). Das aus der ICL-Reaktion stammende Glyoxylat wird mit Acetyl-CoA durch die MLS zu Malat kondensiert. Anschließend erfolgt durch die Malat-Dehydrogenase eine Umwandlung in Oxalacetat, den Akzeptor zur Aufnahme eines weiteren Acetyl-CoAs bei der Bildung von Citrat durch die Citratsynthase. Der Kreis schließt sich durch die Isomerisierung des Citrats zum Isocitrat mit Hilfe der Aconitase. Der Glyoxylatweg besteht jedoch nicht nur aus diesem Zyklus, denn neben Glyoxylat entsteht auch Succinat bei der ICL-Reaktion. Das Succinat wird dem mitochondrialen Citratzyklus zugeführt, da im Gegensatz zu den zyklischen Reaktionen keine Glyoxylatweg-spezifischen Isoenzyme für die Succinatumwandlung existieren. Bei jeder Runde des Glyoxylatwegs werden also zwei C<sub>2</sub>-Körper Acetyl-CoA aufgenommen und der Citratzyklus mit dem freiwerdenden C<sub>4</sub>-Körper Succinat aufgefüllt. Der Glyoxylatweg wird deswegen auch als „anaplerotische Reaktion“ bezeichnet, nach dem griechischen Wort für „auffüllen“. Über das freiwerdende Succinat und die daraus gebildeten Citratzyklus-Intermediate ermöglicht der Glyoxylatweg die Bereitstellung von Vorstufen für Biosynthesen und die Gluconeogenese beim Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Dabei werden vor allem Malat und Oxalacetat zur Bildung von Phosphoenolpyruvat abgezweigt. Nicht-fermentierbare C-Quellen, wie z.B. Acetat, Ethanol und Fettsäuren, liefern ausschließlich C<sub>2</sub>-Vorstufen, die in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Der Glyoxylatweg ist deshalb wichtig für Keimlinge von Ölfrüchten, die auf die Fettreserven des Samenkorns angewiesen sind, bis ein Photosyntheseapparat zur Energiegewinnung vorliegt (Eastmond & Graham, 2001). Darüber hinaus ermöglicht der Glyoxylatweg das Wachstum vieler Mikroorganismen. Bei Säugetieren sind normalerweise fermentierbare Kohlenstoffquellen (z.B. Zucker) in ausreichender Menge vorhanden, so dass der Glyoxylatweg nur in Sondersituationen, wie z.B. direkt nach der Geburt

oder bei längerem Nahrungsmangel, aktiviert wird (Morgunov *et al.*, 2005; Kokavec & Crowe, 2002; Popov *et al.*, 1996).



**Abb. 3: Der Glyoxylatweg: ein modifizierter Citratzyklus**

Der äußere Ring der Abbildung entspricht dem Citratzyklus. Die drei grauen Schritte werden durch den Glyoxylatweg überbrückt, so dass der als Acetyl-CoA aufgenommene Kohlenstoff nicht als  $\text{CO}_2$  verloren geht. Beim Glyoxylatweg erfolgt die Bildung eines  $\text{C}_4$ -Körpers aus zwei Molekülen Acetyl-CoA. Die markierten Enzyme sind spezifisch für den Glyoxylatzyklus, während die Succinatumsetzung mit Enzymen des Citratzyklus erfolgt. Beide Stoffwechselwege existieren daher zeitgleich in einer Zelle.

Die Regulation des Glyoxylatwegs erfolgt in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle, um unnötige Energieverluste durch die teilweise Überbrückung des Citratzyklus zu vermeiden. Die ICL konkurriert dabei mit mehreren Isocitrat-Dehydrogenasen (ICDHs) um das Intermediat Isocitrat. Die vielfach höhere Affinität der ICDH des Citratzyklus zum gemeinsamen Substrat wird durch C-Quellen-abhängige Regulationsmechanismen ausgeglichen, die z.B. zu einer Inaktivierung der ICDH durch Phosphorylierung führen (LaPorte, 1993). Parallel wird die ICL durch nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen induziert. Bei Bakterien ist zusätzlich zur Transkriptionskontrolle eine Aktivierung durch Phosphorylierung der ICL möglich (Hoyt *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu führen ICL-Phosphorylierungen bei *S.cerevisiae* zur Inaktivierung des Enzyms. Weitere ICL-Regulationsmöglichkeiten umfassen eine Katabolit-Repression, verschiedene Katabolit-Inaktivierungen und Änderungen der spezifischen Aktivität aufgrund der Wechselwirkung mit physiologischen Inhibitoren, wie z.B. Phosphoenolpyruvat. Die Bandbreite und die Effektivität der ICL-Regulationsmechanismen sind Spezies-spezifisch.

Abgesehen von den Unterschieden in der Regulation bilden die Isocitrat-Lyasen eine hochkonservierte Enzymfamilie (Vanni *et al.*, 1990; Grimm *et al.*, 2003). Die Aminosäure-Sequenzen eukaryotischer ICLs sind zu mindestens 69% identisch, bei Pflanzen zum Teil sogar zu 95%. Obwohl mit Ausnahme der *S.cerevisiae*-ICL alle bisher untersuchten eukaryotischen ICLs peroxisomal sind, ist der verwendete Importmechanismus unterschiedlich. Häufig liegt ein PTS1-Signal vor, besonders bei Pflanzen. Dagegen ist die ICL der methylothropen Hefe *Hansenula polymorpha* eventuell ein PTS2-Protein (Berardi *et al.*, 2003) und einige filamentöse Pilze benutzen ein bisher nicht eingegrenztes, internes Signal (Gainey *et al.*, 1992). Die internen Signale zum peroxisomalen Import sind besonders interessant, da eukaryotische ICLs einen internen Bereich von etwa 100 Aminosäuren besitzen, der bei prokaryotischen ICLs fehlt. Schon seit den 1980er Jahren wird deshalb vermutet, dass ein Zusammenhang besteht zwischen dieser eukaryoten-spezifischen Sequenz und der Lokalisation in einem Zellorganell (Matsuoka & McFadden, 1988). Die These wurde dadurch unterstützt, dass der angesprochene Bereich eine eigenständige Strukturdomäne eukaryotischer ICLs bildet: die Domäne II (Britton *et al.*, 2000). Dennoch wurden bisher nur wenige praktische Versuche zur Eingrenzung eines für den peroxisomalen ICL-Import relevanten internen Signals unternommen. Problematisch dabei waren einerseits der Aktivitätsverlust heterolog exprimierter ICL-Muteine (Taylor *et al.*, 1996) und andererseits eine Tendenz zur Bildung von Proteinaggregaten (Kamasawa *et al.*, 1996). Darüber hinaus besitzen nicht alle eukaryotischen ICLs ein internes Peroxisomensignal, da die *S.cerevisiae*-ICL cytosolisch ist und die Raps-ICL ausschließlich aufgrund ihres PTS1-Signals importiert wird (Olsen *et al.*, 1993).

### 3. Delokalisierung als Ansatz zur Isolierung eines Metabolit-Carriers

Die Manipulation im Bereich eines potentiellen PTS1-Signals ist eine häufig angewandte Methode zur Unterscheidung zwischen PTS1-abhängigen und PTS1-unabhängigen Proteinen. So ist die Raps-ICL PTS1-abhängig (Olsen *et al.*, 1993), die Rizinus-ICL dagegen nicht (Gao *et al.*, 1996). Die Funktionalität einer PTS1-Sequenz als Peroxisomensignal lässt sich aufgrund der endständigen, C-terminalen Position gut durch das Anhängen an ein Reporterprotein untersuchen. Vor allem das Tripeptid SKL wurde schon oft als erfolgreicher Vermittler eingesetzt und ermöglichte den peroxisomalen Import von verschiedensten bakteriellen und cytosolischen Proteinen, Fluoreszenzfarbstoffen (*GFP*-SKL) und sogar SKL-Peptid-beschichteten Goldkörnern (McNew & Goodman, 1996).

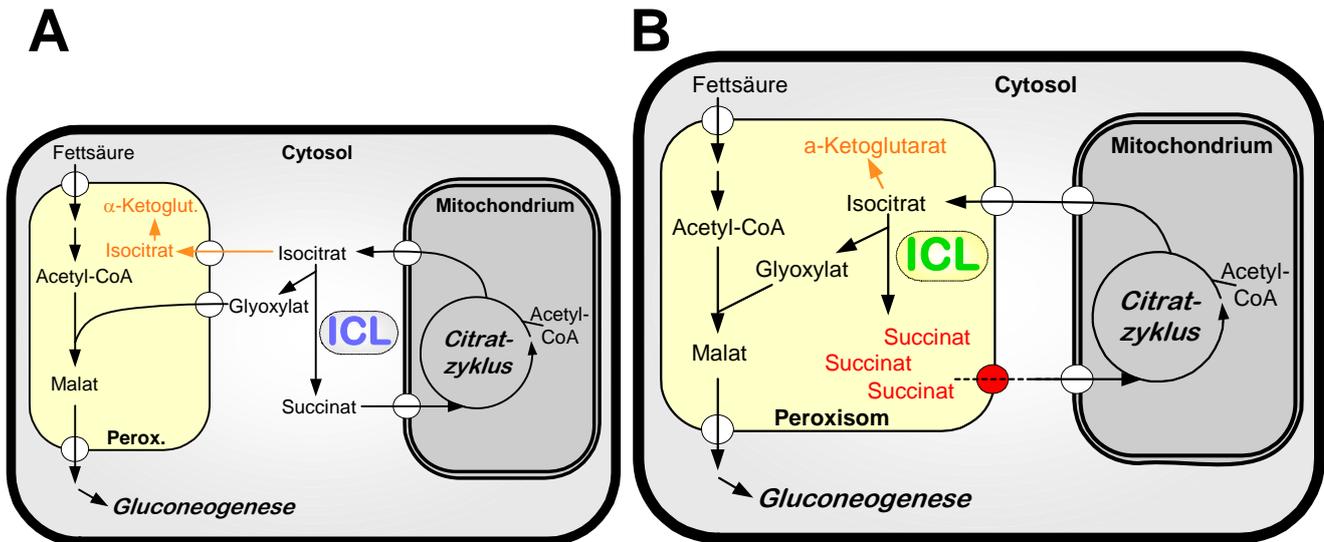
Es war deshalb wahrscheinlich, dass auch die cytosolische *S.cerevisiae*-ICL durch das Anhängen eines PTS1-Signals in die Peroxisomen verschoben werden konnte. Diese Delokalisierung wirkt sich zugleich auf den Stoffwechsel aus (**Abb. 4**, Seite 8). So entstehen Glyoxylat und Succinat, die Produkte der ICL-Reaktion, beim Wildtyp im Cytosol, bei einer Mutante mit peroxisomaler ICL aber im Peroxisom. Der Unterschied ist wichtig, wenn man die peroxisomale Membran als Barriere für Stoffwechselmetabolite betrachtet.

Die Permeabilität der peroxisomalen Membran wird seit mehr als 40 Jahren kontrovers diskutiert. Modelle zum peroxisomalen Import basieren vor allem auf Poren, Endocytosemechanismen, Carriern oder Diffusionseffekten. Der pH-Wert der Peroxisomenmatrix unterscheidet sich um 1,1 bis 1,3 Einheiten vom Cytosol (Borst, 1989), wobei die Peroxisomen je nach Nachweismethode als "sauer" oder "basisch" gelten (Lasorsa *et al.*, 2004; van Roermund *et al.*, 2004). Da Peroxisomen nur eine einzige, dünne Membran besitzen, sind sie sehr zerbrechlich. An

präparierten Peroxisomen gemessene *in vitro* Membranpermeabilitäten müssen deshalb kritisch hinterfragt werden. Deshalb ist auch eine aktuelle Veröffentlichung zur Unterstützung der "Porentheorie" fraglich (Antonenkov *et al.*, 2004). Stattdessen sprechen viele Argumente dafür, dass die peroxisomale Membran *in vivo* eine Barriere sowohl für große Cofaktoren (z.B. NADH, Acetyl-CoA) als auch für kleine Metabolite (z.B. Oxalacetat) darstellt (van Roermund *et al.*, 1995; Visser *et al.*, 2005). Die effektiven Stoffkreisläufe zwischen den Peroxisomen, dem Cytosol und den Mitochondrien (z.B. der Glyoxylatweg) sind mit den geringen Diffusionsraten der Metabolite nicht vereinbar und der pH-Unterschied spricht gegen Poren. Deshalb müssen peroxisomale Carrier existieren. Tatsächlich konnten bisher zwei Carrier isoliert werden: ein Fettsäure-Transporter (*S.cerevisiae* Pat1p/Pat2p; Hettema *et al.*, 1996) und ein ATP-Transporter (*S.cerevisiae* Ant1p; Palmieri *et al.*, 2001; van Roermund *et al.*, 2001). Außerdem gibt es Hinweise auf ein Monocarboxylat-*Shuttle*-System (McClelland *et al.*, 2003) und einen peroxisomalen Phosphat-Transporter (Visser *et al.*, 2005).

Peroxisomale Carrier sind schwer zu finden, da bisher kein definierter "Merkmalskatalog" für peroxisomale Membranproteine existiert. So sind zwar einige für den Membranprotein-Import relevante mPTS-Sequenzen bekannt (Dyer *et al.*, 1996; Elgersma *et al.*, 1997), aber sie ergeben keinen klaren Konsensus (Eckert & Erdmann, 2003). Außerdem stoßen *in silico*-Datenbanksuchen schon bei der Identifizierung der gut charakterisierten peroxisomalen Matrixproteine an ihre Grenzen (Kal *et al.*, 2000; Emanuelsson *et al.*, 2003). Ein alternativer, revers genetischer Ansatz (Erdmann & Blobel, 1995), der auf der Datenbankzuordnung isolierter Peroxisomenproteine basiert, birgt die Schwierigkeiten der Membranprotein-Präparation sowie der parallelen Detektion vieler Proteine (Yi *et al.*, 2002).

Ein neuer, molekularbiologischer Ansatz zur Isolierung eines peroxisomalen Metabolit-Carriers könnte auf einer *S.cerevisiae*-Mutante mit peroxisomaler ICL aufbauen: Die ICL-Reaktion ist als Schlüsselreaktion des Glyoxylatwegs essentiell zum Wachstum auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Dabei wird das Reaktionsprodukt Glyoxylat für die peroxisomalen Schritte des Glyoxylatwegs gebraucht, während das entstandene Succinat über bekannte mitochondrielle Succinat-Transporter in den Citratzyklus einfließt (**Abb. 4**). Bei einer cytosolischen ICL-Reaktion wird deshalb ein peroxisomaler Glyoxylat-Import-Carrier benötigt (**Abb. 4A**). Alternativ erfordert die peroxisomale ICL-Reaktion einen peroxisomalen Succinat-Export-Carrier sowie peroxisomales Isocitrat (**Abb. 4B**). Das Isocitrat liegt als Substrat einer Isocitrat-Dehydrogenase in den Peroxisomen vor (Contreras-Shanon & McAllister-Henn, 2004). Da jedoch beim *S.cerevisiae* Wildtyp kein Succinat in den Peroxisomen entsteht (**Abb. 4A**), gibt es keinen Grund, warum *S.cerevisiae* einen peroxisomalen Succinat-Carrier haben sollte. Das Fehlen dieses Carriers würde bei einer *S.cerevisiae*-Mutante mit peroxisomaler ICL einen Succinat-Stau im Peroxisom verursachen (**Abb. 4B**), der höchstwahrscheinlich zu einem Wachstumsdefekt führt. Da alle anderen bisher untersuchten Eukaryoten eine peroxisomale ICL besitzen, sollte sich der fehlende peroxisomale Succinat-Carrier durch eine Komplementation mit einer Genbank isolieren lassen.



**Abb. 4: Subzelluläre Lokalisation von Stoffwechselprozessen im Zusammenhang mit dem Glyoxylatweg. A:** *S.cerevisiae* Wildtyp mit cytosolischer ICL. **B:** *S.cerevisiae*-Mutante mit peroxisomaler ICL und Succinat-Stau. Orange Schrift entspricht der peroxisomalen Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion, aufgrund derer peroxisomales Isocitrat vorliegen muss. Metabolit-Transporter sind durch Kreise markiert, der gesuchte Succinat-Carrier in rot.

Ein zur Komplementation geeigneter Eukaryot mit peroxisomaler ICL (Maeting *et al.*, 1999) ist der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii* (Ashby & Nowell, 1926). Dieser Baumwoll-Parasit ist als natürlicher Produzent des Vitamins B2 (Riboflavin) industriell relevant. *A.gossypii* und *S.cerevisiae* sind sehr nahe verwandt: 95% der Gene sind identisch (Brachat *et al.*, 2003). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die Komplementation von *S.cerevisiae*-Mutanten mit einer *A.gossypii*-Genbank gut funktioniert und schon mehrfach zur erfolgreichen Isolation von *A.gossypii*-Genen führte. Auch das Gen für die *A.gossypii*-ICL wurde durch die Komplementation einer *S.cerevisiae*-Mutante entdeckt (Maeting *et al.*, 1999). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung einer *Ashbya*-Genbank ist die komplette Sequenzierung, Annotierung und freie Verfügbarkeit des *A.gossypii*-Genoms (Dietrich *et al.*, 2004). Im Falle der Isolation mehrerer Genbankplasmide auf der Suche nach dem peroxisomalen Succinat-Carrier könnten interessante Sequenzen daher bereits durch Ansequenzieren und Restriktionsanalysen der Genbankplasmide eingegrenzt werden.

#### 4. Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie der peroxisomale Import der ICL vermittelt wird. Dazu sollten die ICLs der Pilze *S.cerevisiae* und *A.gossypii* sowie des Bakteriums *E.coli* im Modellorganismus *S.cerevisiae* untersucht werden. Da einige ICLs aufgrund eines PTS1-Signals peroxisomal sind, sollte die normalerweise cytosolische *Sc* ICL durch ein PTS1-Signal in die Peroxisomen delokalisiert werden. Dabei war die Eignung der Delokalisierung zur Isolierung eines peroxisomalen *A.gossypii* Succinat-Carriers zu überprüfen. Darüber hinaus war die bisher offene Frage zu klären, ob der Import der peroxisomalen *Ag* ICL auf dem putativen PTS1-Signal am C-Terminus basierte (Maeting *et al.*, 1999) und/oder ob ein zusätzliches PTS-Signal beteiligt war. Im Falle eines PTS1-unabhängigen *Ag* ICL-Imports sollten die Funktionalität der eukaryotischen ICL-Strukturdomäne II als Peroxisomensignal sowie eine mögliche Abhängigkeit des Imports vom Rezeptor PEX5 überprüft werden.

## MATERIAL UND METHODEN

### 1. Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in **Tab. 2**, die speziellen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in **Tab. 3** zusammengefasst. Allgemeine Laborchemikalien wurden in Mikrobiologie- oder Analysequalität bezogen von folgenden Firmen: Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma (Steinheim, D). Alle Lösungen wurden mit Milli-Q H<sub>2</sub>O (Millipore academic Filtersystem Elix10 + Q-Gard2) angesetzt und - sofern nicht anders angegeben - durch Autoklavieren sterilisiert.

**Tab. 2: Verwendete Geräte**

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Inkubator	Tischschüttler Certomat R	B. Braun, Melsungen, D
	Kühner Pilot Shake IRC-1 T (Truhe)	B. Braun, Melsungen, D
	Inkubatorschrank ISF-4-W	Kühner, Birsfelden, CH
	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D
	Tischkühlzentrifuge 2K15	Sigma, Osterode am Harz, D
	Heraeus Multifuge 3S-R	Kendro, Hanau, D
	Avanti J-25 (Rotor JA-10, JA-20)	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
	Ultrazentrifuge L8.M (Rotor SW28)	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Speedvac BA-VC-300	Bachhofer, Reutlingen, D	
Abbildungseinheit	ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
	Fuji X-Ray RGII inkl. Chemikalien	Fuji, Sint-Niklaas, B
	Kodak X-Omat AR Film XAR-5	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Photometer	Ultrospec3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, D
	NanoDrop ND-1000	Kisker, Steinfurt, D
Refraktometer	manuelles ABBE-Refraktometer	A. Krüss Optronic, Hamburg, D
PCR-Maschine	MJ Research PTC-100 und PTC-200	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Sequenzierer	ABIprism 3100-Avant + Software mit 50cm Kapillare und Polymer POP6	Applied Biosystems, Darmstadt, D
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Kugelmühle	Schwingmühle MM2	Retsch, Haan, D
French Press	French Pressure Cell Press (Miniatur-Zelle FA-003)	Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA
Potter	Homgen <sup>Plus</sup> ; 15ml Glas mit Teflonpistil	Schütt, Göttingen, D

Tab. 3: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Kategorie	Chemikalie / Verbrauchsmaterial	Hersteller
Medienzusätze	Ölsäure, ca. 99% Difco Yeast Nitrogen Base w/o AA	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D BD (über KMF, St. Augustin, D)
Zellfixierung	Cacodylat (Dimethylarsensäure), ca. 98% Glutaraldehyd, 25%, EM-Grade	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D Electron Microscopy Sciences, Science Services, München, D
Enzyme	seltene Restriktionsenzyme Standard-Restriktionsenzyme; T <sub>4</sub> -Ligase; alkalische Phosphatase (Kalb / Shrimps); Polynukleotid-Kinase; Complete <sup>®</sup> Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; Lytikase ( <i>A.luteus</i> ), crude	New England Biolabs, Frankfurt, D Roche Diagnostics, Mannheim, D  Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
PCR-Kits	dNTP-Mix; Expand Long Template; High Fidelity; <i>Taq</i> - & <i>Pwo</i> - Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Größen- standards	Felix 500bp Leiter; Raoul High Range 100bp Leiter; DIG DNA-Marker II und VII; Premixed low-range Protein Marker Prestained SDS Protein Marker 7B	Q-Biogene, Heidelberg, D Roche Diagnostics, Mannheim, D  Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
DNA-Isolation & Aufreinigung	Roti-Phenol/Chloroform Easy Pure DNA-Purification Kit QIAprep Spin Miniprep; HiSpeed Plasmid Midi; DNeasy Plant Maxi; QIAquick Gel Extraction; QIAquick Nucleotide Removal und DyeEx 2.0 Spin Kit	Roth, Karlsruhe, D Biozym, Hessisch Oldendorf, D Qiagen, Hilden, D
DNA- Modifizierung	QuickChange site-directed Mutagenesis Rapid Ligation Kit; DIG DNA Labelling Kit pGEM-T Vektor System I	Stratagene, Amsterdam, NL Boehringer, Mannheim, D Promega, Mannheim, D
Sequenzierung	BigDye Terminator v3.1; Hi-Di Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Mikroküvetten	Einmal ½ Mikro, PS, 340-900nm Plastibrand UV-Küvetten	VWR, Langenfeld, D Brand (über VWR, Langenfeld, D)
Filter / Filterpapier	Acrodisc 25mm, 0,22µm Poren Steritop / Stericup, 0,22µm Poren HA Membranfilter, 0,45µm Poren Schwarzband 589 <sup>1</sup> , aschefrei Whatman 3MM Chromatographie	Pall, Ann Arbor, USA Millipore, Schwalbach, D Millipore, Schwalbach, D Schleicher & Schuell, Dassel, D Whatman, Maidstone, GB
Membranen	Nytran N (Nylon), 0,45µm Poren Immobilon-P (PVDF), 0,45µm Poren	Schleicher & Schuell, Dassel, D Millipore, Schwalbach, D
PAGE/Western	NuPAGE <sup>®</sup> 4 - 12% Bis-Tris Gele; 4x LDS- Ladepuffer; Antioxidant Magermilchpulver 1% Fett ECL Western Blotting Analysis System	Invitrogen, Karlsruhe, D  Saliter, Obergünzburg, D Amersham, Freiburg, D

## 2. Stämme

Die verwendeten Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* sowie der Pilze *Saccharomyces cerevisiae* und *Ashbya gossypii* sind in **Tab. 4** angegeben.

**Tab. 4: Verwendete Stämme**

Stamm	relevanter Geno-/Phänotyp	Referenz
<b><i>E.coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 gyrA96 hsdR17 <math>\Delta</math>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>recA1 relA1 supE44 thi-1</i>	Hanahan (1983)
<b><i>A.gossypii</i></b>		
ATCC 10895	Wildtyp	ATCC
<b><i>S.cerevisiae</i></b>		
Y00000 ( $\cong$ BY4741)	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
<i>Sc</i> $\Delta$ ICL ( $\cong$ Y00202)	wie Y00000, <i>YER065c::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>Sc</i> $\Delta$ PEX5 ( $\cong$ Y03603)	wie Y00000, <i>YDR244w::kanMX</i>	EUROSCARF
<i>Sc</i> ICL Referenz	wie Y00000, 504bp <i>ICL1</i> 3' UTR:: <i>kanMX4</i>	diese Arbeit
<i>Sc</i> ICL+AKL	wie Referenz, Stop <i>ICL1</i> verschoben um die Codons der Aminosäuren AKL (PTS1-Signal)	diese Arbeit
<i>Sc</i> ICLAg PTS	wie Referenz, <i>ICL1</i> letzte 14 Codons ersetzt durch C-Terminus <i>Ag ICL1</i> (15 Codons)	diese Arbeit
<i>Sc</i> $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5	wie Y00202, <i>YDR244w::LEU2</i>	diese Arbeit
BJ1991	MAT $\alpha$ <i>gal2 leu2 pep4-3 prb1-1122 trp1 ura3-52</i>	Jones (1991)
BJ MLS $\Delta$ SKL ( $\cong$ KM13)	wie BJ1991, <i>MLS1</i> $\Delta$ SKL	Kunze <i>et al.</i> (2002)
BJ ICLAg PTS	wie BJ1991, <i>ICL1</i> letzte 14 Codons ersetzt durch C-Terminus <i>Ag ICL1</i> (15 Codons)	diese Arbeit

Abkürzungen: EUROSCARF: *European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis* ;  
ATCC: *American type culture collection*

### 3. Plasmide und Primer

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit relevanten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in **Tab. 5** zusammengestellt. **Tab. 6** enthält eine Übersicht der relevanten Oligonukleotide, gegliedert nach der Art ihrer Verwendung.

**Tab. 5: Verwendete Plasmide und deren Eigenschaften**

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
<b>nur mit <i>E.coli</i>-Replikationsursprung (<i>ori</i>)</b>		
pGEM-T	Vektor zur direkten Ligation mit PCR-Produkten mit A-Überhang. Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	Promega
pUG6	Matrizen-Plasmid <i>kanMX4</i> -Kassette mit <i>loxP</i> zur Gendisruption. Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Güldener <i>et al.</i> (1996)
pGEM- <i>Ag</i> ICL+39	pGEM; 3,4kb Insert <i>NcoI</i> - <i>Sall</i> aus p <i>Ag</i> ICL+39	diese Arbeit
pGEM- <i>Ag</i> ICL	pGEM- <i>Ag</i> ICL+39; mit Stopcodon <i>Ag</i> ICL	diese Arbeit
pGEM- <i>Ag</i> ICL8K-6	pGEM- <i>Ag</i> ICL+39; neues Stopcodon und G <sub>553</sub> K bei <i>Ag</i> ICL	diese Arbeit
pGEM- <i>Ag</i> ICL DII	pGEM- <i>Ag</i> ICL8K-6; <i>XhoI</i> & <i>BbrPI</i> eingeführt bei A <sub>269</sub> bzw. P <sub>378</sub> der <i>Ag</i> ICL (bei Domäne II)	diese Arbeit
pGEM- <i>ScICL1</i>	pGEM; 2,1kb PCR-Produkt P_ <i>ScICL</i> -Bgl2-f & 3'_ <i>ScICL</i> - <i>Sal1</i> -r aus chr. DNA Y00000	diese Arbeit
pGEM- <i>ScICL1</i> -Seq2	pGEM; 840bp PCR-Produkt <i>ScICL</i> -Seq2 aus chromosomaler DNA Y00000	diese Arbeit
pINT45bpWT+ <i>kanMX</i>	pGEM; 600bp PCR-Produkt <i>ScICL</i> wt-pUG6 von pUG6	diese Arbeit
pINT45bpAKL+ <i>kanMX</i>	pGEM; 600bp PCR-Produkt <i>ScICL</i> -pUG6 von pUG6	diese Arbeit
pINT110vWT+ <i>kanMX</i>	pGEM; 1,8kb Stufen-PCR-Produkt <i>ScICL</i> -Seq1-fwd & <i>ScICL</i> -korr-rev und <i>ScICL</i> -pUG6-rev2 von chr. DNA Y00000 und pINT45bpWT+ <i>kanMX</i>	diese Arbeit
pINT' <i>ScICL1</i> +AKL	pGEM- <i>ScICL1</i> -Seq2 ( <i>AgeI</i> , <i>SapI</i> Partialverdau); 1,7kb Insert <i>AgeI</i> - <i>SapI</i> pINT45bpAKL+ <i>kanMX</i>	diese Arbeit
pINT-Referenz	pINT' <i>ScICL1</i> +AKL; 1053bp Insert <i>AgeI</i> - <i>HindIII</i> aus pINT110vWT+ <i>kanMX</i>	diese Arbeit
pINT' <i>ScICL1</i> Ag PTS	pINT-Referenz; Kassette <i>AgeI</i> - <i>XmnI</i> mit 15 C-terminalen Codons der <i>Ag</i> ICL	diese Arbeit
pUC18- <i>aceA</i>	pUC18 mit 1,3kb <i>BamHI</i> - <i>HindIII</i> -Insert <i>E.coli</i> <i>aceA</i> (= ICL) ohne Promotor. Amp <sup>R</sup>	T. Gerharz & M. Bott, unveröffentlicht
pUC19-PEX5:: <i>LEU2</i>	Matrizen-Plasmid Disruptionsmodul PEX5 Codons 123-420:: <i>LEU2</i> . Amp <sup>R</sup>	Van der Leij <i>et al.</i> (1993)

- Fortsetzung folgt -

Tab. 5: Verwendete Plasmide und deren Eigenschaften -Fortsetzung-

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
<b>Shuttle mit <i>E.coli</i>- und Hefe-Replikationsursprung (<i>ori</i> und <math>2\mu</math>)</b>		
pAG100	Dreifach Shuttlevektor <i>E.coli</i> , <i>S.cerevisiae</i> , <i>A.gossypii</i> . Amp <sup>R</sup> , URA3, Kan <sup>R</sup>	Steiner & Philippsen (1994)
pAGK100	pAG100 ohne Kan <sup>R</sup> ( <i>Sall</i> -Religation)	diese Arbeit
pAg ICL	pAGK100; 3,4kb Insert <i>NcoI</i> - <i>Sall</i> aus pGEM-Ag ICL	diese Arbeit
pAg ICL+39	pAG100; 2kb <i>BamHI</i> -Insert nach PCR mit AgICL5-Bam & AgICL6-Bam von GB:Ag ICL	P. Stahmann, unveröffentlicht
pAg ICL8K-6	pAGK100; 3,4kb Insert <i>NcoI</i> - <i>Sall</i> aus pGEM-Ag ICL8K-6	diese Arbeit
YEp352	pUC18-basiert. Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> , URA3	Hill <i>et al.</i> (1986)
YEp-Ag Genbank	YEp352 mit <i>SauIII</i> A-Fragmenten (> 8kb) von genomischer <i>A.gossypii</i> -DNA ligiert bei <i>BamHI</i> . Amp <sup>R</sup> , URA3	P. Stahmann
GB:Ag ICL	YEp-Ag Genbank mit 8,2kb Insert um <i>AgICL1</i>	Maeting <i>et al.</i> (1999)
p-P <i>Ec</i> ICL	YEp352 mit 1,3kb <i>BamHI</i> - <i>HindIII</i> -Insert aus pUC18- <i>aceA</i> , kein Promotor	diese Arbeit
p <i>Ec</i> ICL	p-P <i>Ec</i> ICL mit 390bp Promotor <i>ScICL1</i>	diese Arbeit
p <i>Ec</i> ICL DII	p <i>Ec</i> ICL; <i>XhoI</i> & <i>BbrPI</i> eingeführt mit Y <sub>249</sub> P bzw. E <sub>256</sub> P und T <sub>258</sub> A der <i>Ec</i> ICL	diese Arbeit
p <i>Ec</i> ICLAg DII	p <i>Ec</i> ICL DII; 330bp Insert <i>XhoI</i> - <i>BbrPI</i> aus pGEM-Ag ICL DII	diese Arbeit

Tab. 6: Sequenzen und Verwendung der relevanten Oligonukleotide

Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, veränderte Basen durch Fettdruck hervorgehoben. Die Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg, D) oder Operon (Köln, D) bezogen, ab einer Länge von 35 Basen in HPLC-Qualität.

Primer	Sequenz 5' → 3'	verwendet für:
<b>Sequenzierprimer / Überprüfungs-PCR chromosomale Integration</b>		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pGEM Insert forward
M13 uni (-43)	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	pGEM Insert forward YEp352 Insert reverse
M13 rev (-49)	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	pGEM Insert reverse
M13 pUC rev	TTGTGTGGAATTGTGAGCGG	YEp352 Insert forward
RV primer 4	GACGATAGTCATGCCCCGCG	pAG100; 50 nach <i>Sall</i> ; Insert in <i>BamHI</i> reverse

- Fortsetzung folgt -

Tab. 6: Sequenzen und Verwendung der Oligonukleotide -Fortsetzung-

Primer	Sequenz 5' → 3'	verwendet für:
<b>Sequenzierprimer / Überprüfungs-PCR chromosomale Integration</b>		
pAG-Seq	GACTACGCGATCATGGCGAC	pAG100; 20 vor <i>Bam</i> HI; Insert in <i>Bam</i> HI forward
AgICL1	CGAATACCCATCTTCCGTAATGG	<i>AgICL1</i> ; 170 nach Start
AgICL2	GGTATCCACATGGAGGACCAG	<i>AgICL1</i> ; 610 nach Start
AgICL3	GAGAGGGCTTGTACCGCTAC	<i>AgICL1</i> ; 1140 nach Start
EcICL2	CGAAGATCAGCTGGCGTCAG	<i>Ec aceA</i> ; 580 nach Start
ScICL-Seq3 fwd	TTCTCTCGTGACTTTGCCAA	<i>ScICL1</i> ; 1450 nach Start
ScICL-Seq3 rev	GAGCGCCCAGAAAAAGAA	3' UTR; 695 nach Stop
ScPEX5-f	AACATCGATTGGTCTTGCCA	5' UTR; 300 vor Start
ScPEX5-r	GGTGCGGAATCAAAGATAACT	3' UTR; 300 nach Stop
<b>Plasmidkonstruktion</b>		
ScICL-pUG6-rev2	CAGAAAAAAAAACGCCTTTTGCTCTTGAGAAGAGC GGCAAAATTGCATAGGCCACTAGTGGATCT	pINT45bpAKL+ <i>kanMX</i> ( <i>Sc ICL</i> +AKL) bzw.
ScICL-pUG6-fwd	ACCGGTGTCACAGAAGATCAATTCAAAGAAAATGG CGTAAAGAAAGCCAACTATGATTTCGTACGCTGCA GGTCGAC	pINT45bpWT+ <i>kanMX</i>
ScICLwt-pUG6-fwd	GGTGTACACAGAAGATCAATTCAAAGAAAATGGCGT AAAGAAATAGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	
ScICL-Seq1-fwd	GCGGAGTACATCGATGGGT	pINT110vWT+ <i>kanMX</i>
ScICL-Seq2-fwd	ATGTTTCAGCAGAGGAAATGG	pGEM- <i>ScICL1</i> -Seq2
ScICL-Seq2-rev	CGATTACATTATGAGGTGGCA	
AgICL5-Bam	TTTAGT <u>GGATCC</u> TTTTGCCGCTGATTCATCGC	p <i>Ag ICL</i> +39
AgICL6-Bam	GAGATG <u>GGATCC</u> TAGTTTGGCACCGTTTGAGG	
P_ScICL-Bam-r	GGCAT <u>GGATCC</u> TTGACTTTTTG	p <i>Ec ICL</i> , pGEM- <i>ScICL1</i>
P_ScICL-Bgl2-f	CCGAG <u>AGATC</u> TCTTATCTG	
3'_ScICL-Sal1-r	GAAATGTC <u>GAC</u> AGTTCTA ATG	
<b>Kassettenmutagenese</b>		
Ag3'ICL-ds-fwd	<b>CCGGTGTAAACCGAAGAGCAGTTCGGCTCCTCAA</b> <b>CGGTGCCAACTATGAAAT</b>	pINT' <i>ScICL1</i> Ag PTS
Ag3'ICL-ds-rev	<b>ATTCATAGTTTGGCACCGTTTGGAGAGCCGAACT</b> <b>GCTCTTCGGTTACA</b>	

- Fortsetzung folgt -

Tab. 6: Sequenzen und Verwendung der Oligonukleotide -Fortsetzung II-

Primer	Sequenz 5' → 3'	verwendet für:
<b>Gerichtete Mutagenese</b>		
ScICL-korr-fwd	CCGGTGTACAGAAGATCAATTCAAAGAAAATGGC GTAAAGAAA	pINT' <i>ScICL1</i> + <i>kanMX</i> (Korrektur Synthesefehler Primer ScICL-pUG6-fwd und ScICLwt-pUG6-fwd)
ScICL-korr-rev	TTTCTTTACGCCATTTTCTTTGAATTGATCTTCTGT GACA	
pAG-Icl-Stop-fwd	ACGGTGCCAAACTATGATCCTCTACGCCGG	pGEM- <i>Ag</i> ICL
pAG-Icl-Stop-rev	CCGGCGTAGAGGATCATAGTTTGGCACCGT	
AgICL8K-6 fwd	GGTGTAAACCGAAGAGCAGTTC <b>AAG</b> TCCT <b>AAA</b> ACG GTGCCAAACTAGGA	pGEM- <i>Ag</i> ICL8K-6
AgICL8K-6 rev	TCCTAGTTTGGCACCGTTTT <b>TAGGACTT</b> GAACTGCT CTTCGGTTACACC	
AgICL-D2v-Xho-f	AGCTCGAACATTGACGCT <b>TCGAG</b> ATCATTACTACAT TGTCG	pGEM- <i>Ag</i> ICL DII
AgICL-D2v-Xho-r	CGACAATGTAGTAATGAT <b>TCGAG</b> CGTCAATGTTC GAGCT	
AgICL-D2h-Bbr-f	CTGGGACCTGCC <b>ACGTG</b> CTAGAGAGGGC	
AgICL-D2h-Bbr-r	GCCCTCTCTAGC <b>ACGTG</b> GCAGGTCCCAG	
EcICL-D2v-Xho-f	CACCTCCGATTGCGACC <b>TCGAG</b> ACAGCGAATTT ATTACCGG	p <i>Ec</i> ICL DII
EcICL-D2v-Xho-r	CCGGTAATAAATTCGCTGT <b>TCGAG</b> GGTTCGCAAT CGGAGGTG	
EcICL-D2h-Bbr-f	CAGCGAATTTATTACCGGCC <b>ACGTG</b> CAGTGAA GGCTTCTTCC	
EcICL-D2h-Bbr-r	GGAAGAAGCCTTCACTGG <b>ACGTG</b> GGCCGGTAAT AAATTCGCTG	
ScICL-D2v-Xho-f	TGATTAGCTCAACCATCGATA <b>TCGAG</b> ATCATTAT TTCATTGTCGG	pGEM- <i>Sc</i> ICLDII (Probleme mit <i>XhoI</i> !)
ScICL-D2v-Xho-r	CCGACAATGAAATAATGAT <b>TCGAG</b> TATCGATGGT TGAGCTAATCA	
ScICL-D2h-Bbr-f	TGGGAGCTACC <b>ACGTG</b> TAAGGGAAGGGTTG	
ScICL-D2h-Bbr-r	CAACCCTTCCCTTAC <b>ACGTG</b> GTAGCTCCCA	

#### 4. Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Kaninchen-Antiseren sowie die anfängliche Verdünnungsstufe in PBSTXS (vgl. Kapitel 7.7.3.) sind in **Tab. 7** aufgeführt. Mit Ausnahme des Anti-ICL-Serums wurden die verdünnten Antikörperlösungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und mehrfach verwendet, ggf. nach Auffrischung durch Zugabe von 1/10000 bis 1/5000 Vol. frischem Antikörper.

**Tab. 7: Verwendete Antiseren**

Name	gerichtet gegen	Verdünnung	Referenz
$\alpha$ -ICL	<i>Ag</i> ICL (Isocitrat-Lyase)	1:10000	Schmidt <i>et al.</i> (1996b)
$\alpha$ -CTA	<i>Sc</i> CTA (peroxisomale Katalase A)	1: 5000	Klein <i>et al.</i> (2002)
$\alpha$ -MLS	<i>Sc</i> MLS (Malatsynthase 1)	1: 1000	Kunze <i>et al.</i> (2002)
$\alpha$ -Thio	<i>Sc</i> Fox3p (3-Ketoacyl-CoA Thiolase)	1:10000	Erdmann & Kunau (1994), Klein <i>et al.</i> (2002)
$\alpha$ -P32	<i>Sc</i> Mir1p (mitochondrieller Phosphatcarrier)	1:10000	Pain <i>et al.</i> (1990)
$\alpha$ -PCS60	<i>Sc</i> Fat2p (peroxisomales AMP-Bindeprotein)	1:10000	Blobel & Erdmann (1996)

#### 5. Medien und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden die nachfolgend aufgeführten Medien zur Kultivierung von *A.gossypii*, *E.coli* und *S.cerevisiae* verwendet. Vollmedien wurden mit deionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt. Festmedien enthielten 20g/l Agar. Zur Selektion erfolgte die Zugabe einer steril filtrierten Antibiotikastammlösung nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums auf unter  $50^{\circ}\text{C}$ . Die Endkonzentration betrug  $100\mu\text{g/ml}$  Ampicillin-Na-Salz für *E.coli* bzw.  $300\mu\text{g/ml}$  G418-Sulfat (Geneticin) für *S.cerevisiae*. Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten mit Voll- oder Minimalmedium für ca. einen Monat bei  $4^{\circ}\text{C}$  oder als Glycerinkultur (Endkonzentration ca. 15% Glycerin) bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

##### LB-Vollmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

10g/l Trypton / Pepton  
10g/l NaCl  
5g/l Hefeextrakt

##### YP-Vollmedium

10g/l Hefeextrakt  
20g/l Pepton aus Casein  
ggf. Kohlenstoffquelle (Glucose, Acetat,  
Ethanol, Ölsäure)

pH 6,25, bei Acetat mit Essigsäure

##### YPD-Vollmedium

wie YP  
20g/l Glucose  $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$

##### HA-Vollmedium (Stahmann *et al.*, 1994)

10g/l Hefeextrakt  
10g/l Glucose  $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$  oder Sojaöl  
3g/l Glycin

##### SD-Minimalmedium

6,7g/l YNB ohne Aminosäuren, inkl.  $\text{NH}_4^+$   
20g/l Glucose  $\cdot$   $\text{H}_2\text{O}$  (oder andere  
Kohlenstoffquelle, z.T. weniger)  
10ml/l **100x Supplemente** (gelagert  $-20^{\circ}\text{C}$ )  
je 4g/l Tryptophan, Adenin  
je 2g/l Histidin, Methionin  
6g/l Leucin  
3g/l Lysin  
ggf. 2g/l Uracil

pH 6 mit KOH; alles zusammen autoklaviert

*E.coli* wurde in LB-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert, das HA-Medium diente zur Stammhaltung von *A.gossypii* und die restlichen Medien wurden bei  $30^{\circ}\text{C}$  für *S.cerevisiae* und *A.gossypii* verwen-

det. Flüssigkulturen erfolgten in 3 - 5ml Medium im Reagenzglas bei 170rpm oder in Erlenmeyerkolben mit maximal  $\frac{1}{5}$  Vol. Medium bei 120rpm (mit zwei Schikanen) oder 170rpm (ohne Schikane). Bei starker Flockenbildung wurde das Myzel von *A.gossypii* vor dem Animpfen von Subkulturen durch Schütteln mit sterilen Glasperlen ( $\varnothing$  3mm) zerkleinert.

## 6. Molekularbiologische Methoden

### 6.1. Transformationstechniken

#### 6.1.1. Transformation von *E.coli* (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 100ml einer (Sub-)Kultur in LB-Medium bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 durch Zentrifugation geerntet (10 Min., 1850g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 30ml eiskaltem TFB I aufgenommen und mindestens 15 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendieren in 4ml TFB II wurden 200µl Aliquots abgefüllt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

##### TFB I

100mM	RbCl
50mM	MnCl <sub>2</sub>
30mM	Kaliumacetat
10mM	CaCl <sub>2</sub>
15%(v/v)	Glyzerin

pH 5,8 mit Essigsäure/Acetat; sterilfiltriert

##### TFB II

75mM	CaCl <sub>2</sub>
10mM	MOPS
10mM	RbCl
15%(v/v)	Glyzerin
pH 7,5 - 8; autoklaviert	

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, je 100 - 200µl Zellsuspension mit maximal  $\frac{1}{4}$  Vol. DNA-Lösung (z.B. Ligationsansatz) versetzt und 20 - 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach 90 Sek. Hitzeschock bei 42°C folgte eine Abkühlung auf Eis für 2 Min. vor der Zugabe von 4 Vol. LB-Medium und der Regeneration der Zellen für 50 Min. bei 37°C unter ständigem Schütteln. Vor dem Ausplattieren des gesamten Transformationsansatzes auf LB-Medium + Ampicillin wurden die Zellen aufkonzentriert durch Zentrifugieren (4 Min., 1350g), Abnahme eines Teils des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets im verringerten Restvolumen. Eine Blau-weiß Selektion (Test auf  $\beta$ -Galactosidase) erfolgte durch Überschichten der Platten vor der Zellzugabe mit je 40µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, 20mg/ml Dimethylformamid) und IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactosid, 20mg/ml H<sub>2</sub>O). Die Platten wurden bei 37°C inkubiert, meist für 1 - 2 Tage.

#### 6.1.2. Transformation von *S.cerevisiae* (modifiziert nach Dohmen *et al.*, 1991)

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden 50ml einer (Sub-)Kultur in YPD-Medium bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,7 durch 10 Min. Zentrifugation bei 814g geerntet, das Pellet mit 25ml Lösung A gewaschen und in 1ml dieser Lösung resuspendiert. 200µl Aliquots dieser Zellsuspension wurden für mindestens 2 Std. bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden 0,1 - 5µg zu übertragende DNA und 50µg Heringssperma-DNA (Sigma) zur Erhöhung der Transformationseffizienz zugegeben. Nach 5 Min. Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln erfolgten die Zugabe von 1ml Lösung B und eine Regenerationsphase für 1 Std. bei 30°C. Die Zellen wurden pelletiert (5 Min., 750g), mit 1ml Lösung C gewaschen und anschließend in 100µl dieser Lösung aufgenommen. Bei kritischen Transformationen fand eine zweite Regenerationsphase in 5ml YPD-Medium für 6 Std. statt, die eine bis zu zehnfache Erhöhung der Transforma-

tionseffizienz bewirkte. Der gesamte Ansatz wurde auf Selektionsmedium mit Geneticin oder ohne Uracil ausplattiert und für mindestens 2 Tage bei 30°C inkubiert.

**Lösung A**

1M Sorbit  
10mM Bicin/NaOH pH 8,35  
3%(w/v) Polyethylenglycol 1000

**Lösung B**

200mM Bicin/NaOH pH 8,35  
40%(w/v) Polyethylenglycol 1000

**Lösung C**

150mM NaCl  
10mM Bicin/NaOH pH 8,35

**6.2. Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*****6.2.1. Plasmid-Mini-Präparation**

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse aus 3 - 5ml einer mindestens zehnstündigen Kultur (LB-Medium + Ampicillin), geerntet durch 2 Min. Zentrifugation bei RT und 14000g. Für nachfolgende Sequenzierungen wurde der QIAprep Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) verwendet. Zur DNA-Aufreinigung wird dabei die Absorption an eine Silicagel-Membran ausgenutzt. Alternativ wurde das Zellpellet in 100µl Lösung A vollständig resuspendiert und 5 Min. stark geschüttelt. Nach der Zugabe von 200µl frischer Lösung B (1 Min. Schütteln, 5 Min. Eisbad) zur Lyse der Zellen erfolgte die Proteinfällung mittels 150µl Lösung C (1 Min. Schütteln, 5 Min. Eisbad). Der durch 10 Min. Zentrifugation bei 15500g und 4°C abgetrennte Überstand wurde ggf. mit 450µl Roti-Phenol/Chloroform extrahiert (5 Min. Schütteln, 5 Min. Zentrifugation 14000g, RT) und die obere Phase mit 800µl Ethanol vermischt zur Fällung der Plasmid-DNA für mindestens 2 Min. bei RT. Zentrifugation für 5 Min. bei 14000g ermöglichte das Pelletieren der DNA, die anschließend zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen wurde. Nach Lufttrocknung bei RT bis 37°C wurde das DNA-Pellet innerhalb von mindestens 1 Std. in 50µl TE-Puffer inklusive 20µg/ml RNase A resuspendiert. Die DNA-Konzentration der Mini-Präparationen lag bei etwa 100ng/µl.

**TE-Puffer**

10mM Tris/HCl pH 8,0  
1mM EDTA

**Lösung A**

50mM Glucose · H<sub>2</sub>O  
25mM Tris/HCl pH 8,0  
10mM EDTA

**Lösung B (frisch ansetzen!)**

0,2M NaOH  
1%(w/v) SDS

**Lösung C**

3M Kaliumacetat  
1,8M Essigsäure

**6.2.2. Plasmid-Midi-Präparationen**

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen erfolgte mittels alkalischer Lyse und einer Anionenaustauschermatrix aus 50 - 100ml einer Übernachtskultur (LB-Medium + Ampicillin) mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Midi Kits nach den Angaben des Herstellers (Qiagen). Die erreichte DNA-Konzentration betrug 200 bis 400µg/ml.

**6.3. Präparation von Gesamt-DNA aus *S.cerevisiae***

Mit den nachfolgenden Methoden wurden sowohl chromosomale DNA als auch frei replizierende Plasmide aus der Bäckerhefe isoliert.

### 6.3.1. Mini-Präparation

Die Zellen wurden als Kugel per Impföse von einer Agarplatte abgekratzt und in 200µl Lösung A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels steriler Glasperlen ( $\varnothing$  0,5mm) durch 2 Min. Vortexen bei RT. Nach Zugabe von weiteren 100µl Lösung A wurde die Lösung abgenommen und die DNA aufgereinigt durch Extraktion mit Roti-Phenol/Chloroform (zweimal; je 300µl) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; 250µl). Die Fällung der DNA geschah mit 0,1 Vol. 3M Natriumacetat (pH 5,0) und 2,5 Vol. absolutem Ethanol (kalt) für mindestens 1 Std. bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nach Abtrennung durch Zentrifugation (15 Min., 21500g,  $4^{\circ}\text{C}$ ), Waschen mit 1ml kaltem 70%igen Ethanol und Trocknung bei RT wurde das DNA-Pellet in 20µl RNase-Lösung gelöst.

#### Lösung A

100mM	NaCl	
10mM	Tris/HCl	pH 8,0
1mM	EDTA	pH 8,0
0,1%(w/v)	SDS	

#### RNase-Lösung

100µl	steriles H <sub>2</sub> O oder TE-Puffer
20µl	RNase A-Stammlösung 2mg/ml

### 6.3.2. Maxi-Präparation

Größere Mengen genomische DNA wurden per DNeasy Plant Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert. Nach der Zellernte von 1g Biofeuchtmasse durch Filtration (HA, Millipore) erfolgte der Zellaufschluss durch Mörsern in Flüssigstickstoff und Verwendung eines  $65^{\circ}\text{C}$  warmen Aufschlusspuffers. Die DNA-Ausbeute betrug ca. 200 bis 450ng/ml.

### 6.4. DNA-Restriktion

Zur Charakterisierung und Klonierung wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Inkubationspuffer und Reaktionstemperaturen entsprachen den Herstellerangaben (Roche oder New England Biolabs). Analytische Standardansätze von 10 - 20µl enthielten 100 - 200ng DNA, 0,1 Vol. 10-fach Reaktionspuffer und 10 *Units* Restriktionsenzym(e). Nach mindestens zweistündiger Inkubation wurde 6-fach konzentrierter Ladepuffer zugegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte per Agarose-Gelelektrophorese (TAE-Puffersystem, Gele 0,5 - 2% Agarose), die Anfärbung mit 0,00025%iger Ethidiumbromidlösung innerhalb von 15 bis 30 Min.

#### DNA-Ladepuffer (6-fach)

0,25%(w/v)	Bromphenolblau
30%(v/v)	Glyzerin

#### TAE-Puffer

40mM	Tris/HCl	pH 8,0
10mM	Natriumacetat	
1mM	EDTA	

### 6.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und per QIAquick Gel Extraction (Qiagen) oder Easy Pure Kit (Biozym) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Beide Methoden nutzen die DNA-Bindung an eine Glasmilch-Matrix nach Auflösen der Agarose bei  $55^{\circ}\text{C}$  aus. Beim Biozym-Kit wird die Glasmilchmenge der zu extrahierenden DNA-Menge angepasst, so dass durch Elution in nur 10 - 20µl H<sub>2</sub>O oder Puffer eine stärkere Konzentrierung der DNA möglich ist als bei dem Qiagen Säulchenverfahren.

### **6.6. DNA-Amplifikation per PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde sowohl zur gezielten Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente als auch zur Einführung von Restriktionsschnittstellen (an den Amplifikatenden) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte per PCR-System von Roche nach Herstellerangaben. Ein 50µl Standardansatz enthielt 1 - 5ng zu amplifizierende DNA (bei genomischer DNA evtl. verdaut), 0,1 Vol. 10-fach PCR-Puffer, 0,02 Vol. dNTP-Mix (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 20pmol Primer fwd und rev sowie 1,5 *Units* Polymerase. Die PCR-Bedingungen wurden angepasst an die Annealingtemperatur der Primer sowie die Länge der zu amplifizierenden DNA. Die *Taq*-Polymerase erzeugt Enden mit Adenin-Überhang zur direkten Klonierung mit dem Vektorsystem pGEM-T (Promega), während die *Pwo*-Polymerase-Reaktion glatte Enden liefert.

### **6.7. DNA-Aufreinigung, -Anreicherung und -Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Aufreinigung nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase sowie die Entfernung von Enzymen, kleinen Restriktionsfragmenten und Oligonukleotiden erfolgten mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die DNA-Fällung mit 0,1 Vol. 3M Natriumacetat (pH 5) und 2,5 Vol. absolutem Ethanol (kalt) für mindestens 30 Min. bei -20°C, gefolgt von 15 Min. Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit (21500g, 4°C) und einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol, erlaubt eine parallele Aufreinigung und Anreicherung der DNA. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch als  $1/_{50}$  Verdünnung per Ultrospec3100 (Amersham) oder mit 1µl unverdünnter DNA-Lösung per NanoDrop (Kisker).

### **6.8. Ligation**

DNA-Fragmente und linearisierte Vektoren wurden mit Hilfe von  $T_4$ -DNA-Ligase (Roche) verbunden, zum Teil nach dem Verfahren des Rapid Ligation Kits (Boehringer). Falls nur ein Restriktionsenzym verwendet wurde, diente die Behandlung des linearisierten Vektors mit alkalischer Phosphatase (Roche) zur Minimierung der Plasmid-Religation. Ein 20µl Ligationsansatz enthielt 25 - 100ng linearisierte Vektor-DNA, Insert-DNA im 3- bis 5-fachen Überschuss, 0,1 Vol. 10-fach Ligationspuffer sowie 1 *Unit*  $T_4$ -Ligase. Nach einer Inkubation für 2 Std. bei RT und/oder über Nacht bei 16°C wurde der gesamte Ligationsansatz direkt zur Transformation von *E.coli* eingesetzt.

### **6.9. Kassettenmutagenese** (modifiziert nach Gassen & Schimpf, 1999)

Die Kassettenmutagenese ermöglicht den Austausch eines kleinen Plasmidfragments gegen eine Kasette aus zwei *in vitro* hybridisierten Oligonukleotiden, die zum Vektorfragment kompatible Enden enthält. Zur Herstellung der Mutagenesekasette wurden je 24pmol beider Oligos in Einzelansätzen á 25µl mit je 100pmol ATP, 0,1 Vol. 10-fach Kinase-Puffer und 10 *Units*  $T_4$ -Polynukleotid-Kinase (Roche) am 5' Ende phosphoryliert. Zur Hybridisierung wurden die Ansätze vereinigt, per Speedvac getrocknet und die Oligomischung über Nacht in 12µl 1x Ligasepuffer aufgenommen. Die doppelsträngige Kasette entstand nach 5 Min. Denaturierung bei 95°C durch 20 Min. Inkubation bei der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligos sowie 2 Std. bei  $T_m - 5^\circ\text{C}$ , gefolgt von langsamen Abkühlen auf RT innerhalb von 6 Std. Das Vektorfragment wurde nach der Restriktion des Plasmids per Gelelution aufgereinigt und mit Shrimps alkalischer Phosphatase (Roche) dephosphoryliert (1 Std. 37°C plus 15 - 20 Min. Hitze-Inaktivierung bei 65°C). Zur Ligation mit 1 *Unit*  $T_4$ -Ligase wurden 2pmol phosphorylierte Mutagenesekasette (= 1µl Hybrid-

sierungsansatz) mit 0,02pmol dephosphorylierten Vektorfragment und 0,1 Vol. 10-fach Ligasepuffer vermischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz diente zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen. Da die Mutagenesekassette z.T. mehrfach integriert, ist neben der Restriktionsanalyse eine Sequenzierung der neuen Plasmidkonstrukte ratsam. Das Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Erzeugung der Mutante *Sc ICLAgPTS* angewandt.

### **6.10. Gerichtete Mutagenese von Plasmiden**

Die gerichtete Mutagenese dient zur gezielten Veränderung von bis zu 5 Basenpaaren eines bis zu 7kb großen Plasmids, so dass Restriktionsschnittstellen und/oder Aminosäurecodons modifiziert werden. Bei einem zu großen Ausgangsplasmid ist eine Subklonierung des zu verändernden DNA-Bereiches notwendig. Die Reaktion beruht auf der Methode der zirkulären Mutagenese (Weiner *et al.*, 1994) und nutzt aus, dass das Restriktionsenzym *DpnI* nur methylierte DNA schneidet und daher nur die Matrize und nicht die *in vitro* erzeugten Amplifikate hydrolysiert. Die Mutagenese erfolgte per Stratagene Quik Change Kit nach einem modifizierten Herstellerprotokoll unter Verwendung von mit dem Internetprogramm <http://labtools.stratagene.com/QC> optimierten Primerpaaren. Ein Standardansatz (50µl) enthielt 0,5µl DNA-Matrize (Minipräparation), je 125pmol Primer fwd und rev, 0,02 Vol. dNTP-Mix, 0,1 Vol. 10-fach Puffer und 2,5 *Units Pfu*-Polymerase. Nach 1 Min. Denaturierung bei 95°C folgten 18 Zyklen mit je 45 Sekunden Denaturierung (95°C), 1 Min. Primeranlagerung (55°C) und maximal 7 Min. Synthese (68°C) sowie eine 68°C-Endsynthesephase für 10 Min. Zur Restriktion des Ausgangsplasmides wurden 5 *Units DpnI* zugegeben und nach 1 Std. Inkubation bei 37°C mindestens 10µl des Ansatzes zur Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen verwendet. Mehrfachinsertionen des Primeranlagerungsbereiches sind häufig, sollten durch Sequenzierung überprüft werden und sind meist durch Restriktion und Religation an der neu eingeführten Restriktionsschnittstelle entfernbar. Die gerichtete Mutagenese wurde in dieser Arbeit eingesetzt zur Korrektur von Primerfehlern, zur Erzeugung der Plasmide *pAg ICL* und *pAg ICL8K-6* sowie zur Einführung der neuen Schnittstellen *XhoI* und *BbrPI* bei den Sequenzen der *Ag ICL* und der *Ec ICL* für die Umklonierung der Domäne II.

### **6.11. Sequenzierung**

Zur Sequenzierung von chromosomaler DNA wurde der entsprechende Bereich per PCR amplifiziert, fünf PCR-Reaktionen vereinigt, mit Natriumacetat + Ethanol gefällt und über Nacht in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Sequenzierreaktion wurde unter mehrfacher Optimierung der Parameter als „*Advantage Read*“ (bis 800 Basen) durchgeführt von SeqLab (Göttingen, D). Plasmidsequenzierungen erfolgten zu Beginn der Doktorarbeit und bei fehlenden Standardprimern als „*Value Read*“-Service bei MWG (Ebersberg, D) oder als „*Hot Shot*“ (bis 300 Basen) bei SeqLab. Für weitere Plasmidsequenzierungen wurde ein Kapillarsequencer (ABIprism 3100-Avant, Applied Biosystems) verwendet. Die Herstellung und Fluoreszenzmarkierung der Sequenzfragmente erfolgte anhand des BigDye Terminator Kits (Applied Biosystems) mit 200ng DNA-Matrize gemäß Herstellerangaben. Zur Aufreinigung diente der DyeEx Kit (Qiagen) mit einer leichten Modifikation: die Gelfiltrationsmatrix wurde vor der Zugabe des Sequenzieransatzes dreimal mit je 20µl HPLC-Wasser gewaschen und so eine signifikante Verbesserung der Leseweite und Signalintensität der Sequenzierung erzielt. 10µl des Eluates wurden mit 10µl Hi-Di-Formamidlösung (Applied Biosystems) versetzt, 2 Min. denaturiert bei 96°C, kurz auf Eis

abgekühlt und zentrifugiert. Nach dem Befüllen der Mikrotiterplatte mit den Proben wurde das Sequenzierprogramm StdSeq50\_POP6\_V3.1 ausgeführt. Die Analyse der Elektropherogramme und automatisch detektierten Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme Chromas, Edit Sequence, CloneManager und MultAlign.

## **6.12. Southern Blot**

DNA:DNA-Hybridisierungen nach Southern (1975) dienen der Kontrolle der Einfach-Insertion chromosomaler Integrationen bei Hefemutanten. Nach der Restriktion und der Gelelektrophorese der genomischen DNA erfolgten der Transfer und die Immobilisierung auf eine Nylonmembran sowie die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde. Die DNA:DNA-Hybride waren per Farbreaktion nachweisbar.

### **6.12.1. Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden**

Die Sonden-Markierung erfolgte anhand des DIG DNA Labelling and Detection Kit (Boehringer) nach Herstellerangaben. Gemäß der „*random-primed*“ Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) entstand die Sonde durch den Einbau von immunoreaktivem Digoxigenin-desoxy-11-uridin-triphosphat bei der Amplifikation der Ziel-DNA. Zusätzlich zur denaturierten (5 Min. 95°C), auf Eis abgekühlten DNA-Matrize (0,1 - 3µg) enthielt der Standardansatz (20µl) 2 *Units* Klenow-Enzym, einen Hexanucleotid-Mix und einen dNTP-Markierungsmix (je 0,1mM dATP, dCTP, dGTP + 0,065mM dTTP und 0,035mM DIG-dUTP). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 Vol. 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt und die DNA mit 2,5 Vol. Ethanol in Gegenwart von 0,1 Vol. 5 M LiCl in 2 h bei -20°C gefällt. Das pelletierte (10 Min., 21500g, 4°C) Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 50µl TE-Puffer über Nacht resuspendiert.

### **6.12.2. Vakuumunterstützter Transfer genomischer DNA (nach Gross *et al.*, 1988)**

Die DNA-Fragmente wurden durch vakuumunterstützte Diffusion mittels VacuGen Blotting System (Amersham Pharmacia Biotech) aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Nytran N) übertragen. Dazu wurde das Gel nacheinander für je 20 Min. mit Depurinations- und Denaturierungslösung sowie 5 Min. mit Neutralisierungslösung behandelt. Nach dem DNA-Transfer mit 20x SSC innerhalb von 40 Min. wurde die Membran kurz zwischen Whatman 3MM Filterpapier getrocknet und dann die DNA mit UV-Licht (120mJoule/cm<sup>2</sup>; Stratalinker 1800) fixiert.

#### **Depurinationslösung**

0,25M HCl

#### **Denaturierungslösung**

1,5M NaCl  
0,5M NaOH

#### **Neutralisierungslösung**

2M NaCl  
1M Tris/HCl           pH 5,0

#### **20x SSC-Lösung**

3M NaCl  
0,3M Natriumcitrat/HCl           pH7,0

### **6.12.3. Hybridisierung von genomischer DNA und markierter Sonde**

Die Membran wurde für die nachfolgenden Schritte in ein Glasröhrchen überführt und durch Drehen im Hybridisierungssofen eine gleichmäßige Benetzung der Oberfläche gewährleistet. Bei der Hybridisierung bindet die einzelsträngige DNA-Sonde an homologe DNA-Fragmente auf der Membran. Zur Verminderung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Prähybridisierung für

6 Std. bei 68°C vor der Inkubation mit 20ml Hybridisierungslösung mit DIG-markierter Sonde (10 Min. bei 95°C denaturiert und kurz eisgekühlt) bei 68°C über Nacht. Unspezifisch gebundene DNA wurde anschließend durch je zweimaliges Waschen mit je 100ml Waschlösung I bei RT und Waschlösung II bei 68°C entfernt.

**Hybridisierungslösung**

1%(w/v) Blockier-Reagenz (Kit)  
 0,1%(w/v) Natrium-Lauroylsarcosin  
 0,02%(w/v) SDS  
 in 5x SSC-Lösung  
 auch zur Prähybridisierung angewandt (ohne Sonde)

**Waschlösung I**

0,1%(w/v) SDS  
 in 2x SSC-Lösung

**Waschlösung II**

0,1%(w/v) SDS  
 in 0,1x SSC-Lösung

**6.12.4. Detektion von DNA:DNA-Hybriden**

Die Hybridisierungsbanden wurden nach den Angaben des DIG DNA Labelling and Detection Kits (Boehringer) bei RT nachgewiesen. Nach 1 Min. Waschen in Puffer A wurde die Membran 30 Min. mit Puffer B blockiert, gefolgt von erneutem kurzen Waschen mit Puffer A. Die Inkubation mit 150mU Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat in 25ml Puffer A dauerte 30 Min. Nach zweifachem 15 Min. Waschen mit je 100ml Puffer A und Äquibrierung für 2 Min. in Puffer C erfolgte die Farbdetektion durch Inkubation mit 10ml Färbelösung im Dunkeln. Die Phosphatase-Reaktion führte zur Bildung eines lila Präzipitates und wurde durch TE-Puffer abgestoppt.

**Puffer A**

150mM NaCl  
 100mM Tris/HCl pH 7,5

**Puffer B**

0,5%(w/v) Blockier-Reagenz (Kit)  
 in Puffer A

**Puffer C**

100mM NaCl  
 100mM Tris/HCl pH 9,5  
 50mM MgCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O

**Färbelösung**

10ml Puffer C  
 45µl 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (75mg/ml  
 in Dimethylformamid)  
 35µl 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat  
 (50mg/ml in Dimethylformamid)

**7. Biochemische Methoden****7.1. Biomassebestimmung**

Im Gegensatz zu *S.cerevisiae* ist *A.gossypii* ein filamentöser Pilz, der bei der Kultivierung in Flüssigmedium keine homogene Kulturbrühe sondern Myzelflocken bildet. Für vergleichende Wachstumsversuche auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden daher die Biomassenzunahmen untersucht, bei *S.cerevisiae* parallel zur Messung der OD<sub>600</sub>. Zur ausreichenden Versorgung mit Spurenelementen wurde mit Leitungswasser angesetztes YP-Vollmedium verwendet. Die Parallelkulturen mit je 100ml erfolgten in 500ml Erlenmeyerkolben mit 2 Schikanen bei 30°C und 120rpm. Die Starterkultur mit 2% Glucose wurde direkt von Stammhaltungsplatten beimpft, bei *A.gossypii* nach Zerkleinern des Myzels in 0,9% NaCl-Lösung mit Glasperlen (Ø 3mm). Nach 7 - 10 Std. Wachstum wurde die zweite Vorkultur (0,3% Glucose) auf OD<sub>600</sub> ca. 0,05 angeimpft und über Nacht inkubiert. Die YP-Hauptkulturen enthielten folgende Kohlenstoffquellen: keine Zugabe, 2% Kaliumacetat, 2%(v/v) Ethanol, 2% Glucose oder 0,1%(v/v) Ölsäure + 0,02%(v/v) Tween80 (zugegeben als einzeln autoklavierte Emulsion). Alle Hauptkulturen wurden als Doppelansatz angeimpft auf ca. OD<sub>600</sub> 0,1 bei *S.cerevisiae* bzw. mit

1ml (= 1/100 Vol.) mit Glaskugeln zerkleinerter *Ashbya*-Myzelbrühe. Zur Biomassebestimmung wurden 50ml Hauptkultur über vorher bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Filter geerntet: Schwarzband Rundfilter für *A.gossypii* und HA Membranfilter für *S.cerevisiae*. Aufgrund der großen Anzahl paralleler Proben erfolgte z.T. eine kurze Lagerung auf Eis vor der Zellernte. Die Filter wurden 1 - 2 Tage bei 105°C getrocknet. Zur Ermittlung der Biomassenzunahme dienten Proben sofort nach dem Animpfen (0 Std.) und nach 30 Std. Kulturdauer (stationäre Phase).

## **7.2. Herstellung von *S.cerevisiae* -Rohextrakt**

### **7.2.1. Zellaufschluss per Kugelmühle**

Das Zellpellet von 50ml einer durch Zentrifugation (5 Min., 1850g, 4°C) geernteten Flüssigkultur wurde in 200µl ICL-Aufschlusspuffer resuspendiert und  $\frac{3}{4}$  Vol. sterile Glasperlen ( $\varnothing$  0,5mm) zugegeben. Nach dem Zellaufschluss per Kugelmühle (Retsch) für 10 Min. bei maximaler Intensität in vorgekühlten (-20°C) Probenhaltern wurden Zelltrümmer und Glasperlen durch 10 Min. Zentrifugation bei 21500g und 4°C sedimentiert. Der bis knapp oberhalb der Phasengrenze abgenommene Überstand entsprach dem zellfreien Rohextrakt, der - ggf. nach einer weiteren Zentrifugation zur Trümmer-Entfernung - auf Eis gekühlt wurde. Aufgrund des Glycerinanteils im Aufschlusspuffer konnten bei kurzzeitiger (maximal 3 Wochen) Lagerung bei -20°C mit Ausnahme der ICL viele Enzymaktivitäten ohne signifikante Verluste gemessen werden.

**ICL Aufschlusspuffer** (Schmidt *et al.*, 1996a, modifiziert)

50mM	Imidazol
5mM	MgCl <sub>2</sub>
5mM	DTT
1mM	EDTA
25%(v/v)	Glyzerin
	pH 7,5 mit HCl
1-fach	Complete <sup>®</sup> Protease-Inhibitor (aus 25-fach Stammlösung)

inkl. Complete Lagerung maximal 1 Woche 4°C

### **7.2.2. Zellaufschluss per French Press**

50ml einer Flüssigkultur wurden geerntet (*S.cerevisiae*: 15 Min., 3000g, 4°C; *A.gossypii*: Filtration über Schwarzbandfilter), die Biomasse ggf. in ein Falcon-Gefäß überführt und nach Schockgefrieren in Flüssigstickstoff bei -20°C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die gefrorenen Zellen mit 2ml Aufschlusspuffer A+ (vgl. Kapitel 7.5.2.) versetzt, bei RT aufgetaut, dann eisgekühlt und zwei Passagen per French Press Miniature-Zelle (Einstellung Medium: 138000kPa) (Thermo Spectronic) durchgeführt. Nach der mikroskopischen Kontrolle des Homogenats erfolgte die Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 Min. bei 13000g und 4°C. Der Überstand entsprach dem zellfreien Rohextrakt, wurde auf Eis gekühlt und unmittelbar zur Messung der ICL-Enzymaktivität verwendet.

## **7.3. Messung von Enzymaktivitäten**

Die Aktivitäten der ICL und subzellulärer Markerenzyme wurden photometrisch (Ultrospec3100) mit kontinuierlichen Enzymtests bestimmt. Zur Messung bei 240nm wurden UV-geeignete Kunststoff-Mikroküvetten verwendet (Brand). Aufgrund der unterschiedlichen Stabilitäten der verschiedenen Isocitrat-Lyasen wurde der ICL-Test immer mit frischen, nur auf Eis gekühlten

Proben durchgeführt, während die anderen Enzymaktivitäten ohne signifikante Verluste z.T. erst nach bis zu 3 Wochen Lagerung bei -20°C gemessen wurden.

**Tab. 8: Testansätze und Messbedingungen der photometrischen oder colorimetrischen Enzymtests** Die Messung erfolgte jeweils in 1ml Mikroküvetten für 1 bis 2 Min., mit Ausnahme der ICL beginnend 1 Min. nach Substratzugabe und kurzem Mischen durch Vortexen.

Enzym	Testansatz	Substrat, Temperatur	Wellenlänge, $\epsilon$	Referenz
Isocitrat-Lyase (EC 4.1.3.1)	33,3mM Imidazol 6,7mM MgCl <sub>2</sub> 1,3mM EDTA 6,7mM DTT 5,3mM Phenylhydrazin pH 7,0	4mM Isocitrat 30°C Anlaufphase 6 Min.	324nm 14,63mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Schmidt <i>et al.</i> (1996a), modifiziert
Katalase (EC 1.11.1.6)	50mM Kaliumphosphat 0,1% Triton X-100 pH 7,5	10mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30°C	240nm 0,04mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Bergmeyer (1974), modifiziert
Fumarase (EC 4.2.1.2)	50mM Kaliumphosphat 0,1% Triton X-100 pH 7,4	4mM L-Malat 30°C	240nm 2,44mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Bergmeyer (1974), modifiziert
Cytochrom c-Oxidase (EC 1.9.3.1)	50mM Kaliumphosphat pH 7,2	0,038mM Cytochrom c (reduziert mit Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> ) 30°C	550nm 21,1mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Smith (1955), modifiziert
Hexokinase (EC 2.7.1.1)	50mM Tris/HCl 30mM MgCl <sub>2</sub> 2,5mM NADP 5mM ATP 0,35U Glc-6P-DH pH 7,5	50mM Glucose 30°C	340nm 6,3mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Easterby & Quadri (1982), modifiziert

Abkürzungen:  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient, Glc-6P-DH: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

#### **7.4. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung aller Proben erfolgte photometrisch nach Bradford (1976) im Vergleich zu einer Kalibrierreihe (0, 20, 40, 60, 80 und 100µg Protein/ml) mit Rinderserumalbumin (BSA). 100µl der in H<sub>2</sub>O oder Aufschlusspuffer A+ (vgl. 7.5.2.) verdünnten Probe wurden mit 1ml Bradford-Reagenz vermischt, 5 Min. bei RT inkubiert und die Absorption bei 595nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde automatisch anhand der mit der Kalibrierreihe ermittelten Ausgleichsgerade berechnet.

##### **Bradford-Reagenz (100ml)**

- 85ml H<sub>2</sub>O
- 10ml ortho-Phosphorsäure, 85%
- 10mg Coomassie Brilliant Blue G 250,  
gelöst in 5ml Ethanol

per Faltenfilter (Schleicher & Schuell) ungelöste Partikel entfernen, Lagerung dunkel bei RT

## **7.5. Differentielle Zentrifugation**

### **7.5.1. Zellanzucht und Induktion**

Nach einer von der Agarplatte beimpften Start-Vorkultur mit 2% Glucose wurden zwei weitere Vorkulturen mit je 0,3% Glucose durchgeführt mit einer Animpf-OD<sub>600</sub> von 0,05 bis 0,1. Der Zelltransfer erfolgte jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase. Je nach Versuchsreihe wurde YP Vollmedium oder SD Minimalmedium verwendet. Die Hauptkultur erfolgte in vier bis sechs parallelen 2l-Kolben ohne Schikanen mit je 300 bis 400ml Medium mit 0,3% Glucose, kultiviert ab ca. OD<sub>600</sub> 0,07 bis 0,08 bei 30°C und 170rpm. Bei schlecht wachsenden Zellen fand vor dem Animpfen der Hauptkultur auf ca. OD<sub>600</sub> 0,125 eine weitere Subkultur (200ml Medium mit 0,3% Glucose in 1l-Kolben) für maximal 4 Std. statt. Glyoxylatweg und ggf. Peroxisomenbildung (durch Ölsäure) wurden 13 Std. induziert nach Zugabe von 30 bzw. 40ml 10-fach konzentriertem Induktionsmedium zur Hauptkultur bei OD<sub>600</sub> 1,2 bis 1,8. Die meisten Versuche erfolgten mit YNO-Induktion in YP-Medium.

#### **10x YN-Induktion**

33,5g/l YNB inkl. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>  
5g/l Hefeextrakt  
50ml/l 100x Supplemente  
pH 6 mit KOH

#### **10x YNA**

wie 10x YN-Induktion  
200g/l Kaliumacetat  
falls Acetat ausflockt, Vol. erhöhen und entsprechend mehr zur Induktion verwenden

#### **10x YNO**

wie 10x YN-Induktion  
10ml/l Ölsäure  
2ml/l Tween80 | als Emulsion mitautoklaviert  
stark Rühren beim Abkühlen!

#### **10x YNE**

wie 10x YN-Induktion, geringeres Vol.  
20%(v/v) absoluter Ethanol, p.a.  
Ethanolzugabe ohne Filtration nach dem Autoklavieren und Abkühlen

### **7.5.2. Herstellung von zellfreiem Homogenat und differentielle Zentrifugation**

Nach einer schrittweisen Zellernte durch je 7 Min. Zentrifugation bei 2700g und 4°C wurden die Zellpellets vereinigt, dreimal mit je 150ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und zur Bestimmung der Biofeuchtmasse der Rest-Überstand abgesaugt. Die Zellwand wurde durch Zugabe von 50ml (bzw. mindestens 5 Vol. Frischgewicht) DTT-Puffer und 15 Min. Inkubation bei 30°C und 100rpm destabilisiert. Zentrifugation (5 Min., 2700g, 4°C) und Waschen mit 150ml 1,2M Sorbitpuffer dienen zur Entfernung des DTT. Das Pellet wurde durch Schwenken und ggf. mit Hilfe einer 5ml Pipette gelöst in leicht erwärmten 1,2M Sorbitpuffer (7-faches Vol. der Zellmasse), je nach Stamm 650 - 980 *Units* Lytikase/g Zellmasse zugegeben und die Protoplastenbildung während der Inkubation bei 30°C und 75rpm mikroskopisch verfolgt. Nach der Entfernung der Lytikase durch 5 Min. Zentrifugation bei 1000g und 4°C sowie zweifachem Waschen mit je 100ml kaltem Sorbitpuffer wurde das Pellet aufgenommen in 10 - 12ml Aufschlusspuffer A+. Der Zellaufschluss erfolgte durch sehr langsames Pottern (1 Passage pro 3 Min.) in ca. 10ml Aliquots, dreimal bei 500rpm + zweimal bei 800rpm im Eisbad per Homgen<sup>plus</sup> (Schütt). Nicht aufgeschlossene Zellen, Zell- und Membrantrümmer sowie der Nucleus wurden entfernt durch 5- bis 6-fache Zentrifugation bei 700g und 4°C für je 10 Min., so dass maximal ein hauchdünnes Pellet sichtbar war. Das erhaltene zellfreie Homogenat wird „PNS“ (*post nuclear supernatant*) genannt und war die Basis aller differentiellen Zentrifugationen. Nach Abnahme einer Probe für Enzymnachweise wurde der PNS unterschichtet mit 4ml 0,4M Saccharosekissen und durch 30 Min. Zentrifugation bei 25000g und 4°C aufgetrennt in eine Organellfraktion (Pellet) und

einen (cytosolischen) Überstand, je nach Kohlenstoffquelle inklusive einer schmierigen Schicht aus Lipidkomplexen. Überstand und ggf. Lipidschmier wurden abgenommen und das Organell-pellet je nach Größe per 1ml Pipette in 0,5 - 1ml Aufschlusspuffer A+ resuspendiert. Ein Großteil dieses Pipettenaufschlusses wurde auf Eis gelagert und ggf. für einen Gradienten verwendet. Proben für Enzymnachweise wurden zusätzlich durch Vortexen resuspendiert. Zur Bestimmung der relativen Verteilung der gemessenen Enzymaktivitäten wurden die Volumina aller Fraktionen (eingesetzter PNS, Organellpellet und Überstand 25000g) notiert.

**DTT-Puffer** (frisch ansetzen!)

10mM DTT  
100mM Tris/HCl           pH 9,4

**1,2M Sorbitpuffer**

1,2M Sorbit  
20mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

**0,4M Saccharosekissen**

0,4M Saccharose  
in Gradientenpuffer Berlin (vgl.  
192H7.6.)

**Aufschlusspuffer A**

5mM MES   pH 6,0 (mit KOH)  
0,6M Sorbit  
0,5mM EDTA  
1mM KCl

**Aufschlusspuffer A+** (frisch ansetzen!)

50ml Aufschlusspuffer A  
1 Tablette Complete® Protease-Inhibitoren  
0,5ml PMSF 2% in Ethanol

**7.6. Saccharose-Dichtegradienten****Gradientenpuffer Berlin**

5mM MES/KOH   pH 6,0  
1mM EDTA  
1mM KCl  
0,1%(v/v) Ethanol

**Gradientenpuffer Jülich**

7,5mM MES/KOH   pH 6,0  
1mM EDTA  
10mM KCl  
0,1%(v/v) Ethanol  
1mM MgCl<sub>2</sub>

Alle Saccharoselösungen wurden in Gradientenpuffer angesetzt, in Berlin ausgehend von einer Stammlösung mit 85%(w/v) = 65%(w/w) Saccharose. Die Messung des Brechungsindex  $\eta$  per Refraktometer ermöglicht die Berechnung der Dichte  $\rho$  (g/cm<sup>3</sup>) der Fraktionsproben bei 25°C nach folgender Formel:  $\rho = 2,7329 \cdot \eta - 2,6425$ .

**7.6.1. Kontinuierlicher Saccharosegradient**

Zwei kontinuierliche Gradienten wurden zum Erlernen der Technik unter Anleitung von K. Nau (AG Erdmann) an der FU Berlin durchgeführt. 2ml eines 60%(w/w) Saccharosekissens wurden überschichtet per AutoDensi-Flow (Labconco, Kansas City, USA) mit einem kontinuierlichen Gradienten aus je 12,5ml 54%(w/w) und 32%(w/w) Saccharose. Das Organellpellet einer differentiellen Zentrifugation wurde mit Aufschlusspuffer A+ auf 5ml aufgefüllt, vorsichtig auf den Gradienten geladen und 3 Std. zentrifugiert bei ca. 19000rpm (Sorvall SV-288) und 4 bis 10°C (Zentrifuge etwas defekt) mit langsamem Start und Ausschwingen ohne Bremse. Die Gradientenernte erfolgte von unten in 31 bis 32 Fraktionen mit je ca. 1ml. 500µl jeder Fraktion wurden per TCA gefällt zur Durchführung von Western Blots, die restliche Lösung verblieb bis zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und des Brechungsindex auf Eis.

### 7.6.2. Diskontinuierlicher Saccharosegradient (modifiziert nach Parkes *et al.*, 2003)

Da in Jülich keine Apparatur zum Gießen reproduzierbarer kontinuierlicher Gradienten vorlag, wurden stattdessen gestaffelte Gradienten verwendet, die sich bei langer Zentrifugation nivellieren. Die Saccharoselösungen wurden als %(w/v) eingewogen und sterilfiltriert. Nacheinander wurden überschichtet 4ml 77% (entspricht ca. 60%(w/w)) Kissen, 5ml 62%, 9,5 - 10ml 55%, 9ml 47%, 5ml 40% und 4ml 35,5% (entspricht ca. 32%(w/w)). Nach vorsichtigem Beladen mit einem Großteil des Organellpellets einer differentiellen Zentrifugation und ggf. Gewichtsausgleich durch Aufschlusspuffer A+ erfolgte die Zentrifugation mit langsamem Start und ohne Bremse für insgesamt 15 Std. bei 25000rpm (Schwingrotor SW28, leicht defekt) und 4°C. Es waren drei deutlich getrennte Banden sichtbar: Peroxisomen (unteres Drittel), Mitochondrien (Mitte) und defekte Organelle („Durchbruch“) (oberes Drittel), gefolgt von einer milchigen Zone mit Lipidkomplexen. Die Gradientenernte erfolgte von unten in 37 bis 39 Fraktionen mit je ca. 1ml, nachfolgend untersucht auf Enzymaktivitäten, Enzymverteilungen (per Western Blot nach TCA-Fällung) und Brechungsindex.

## 7.7. Proteinauftrennung und immunologischer Nachweis

### 7.7.1. Probenvorbereitung

Die Proteine jeweils gleicher Volumenanteile einer differentiellen Zentrifugation bzw. eines Saccharosegradienten wurden in einem Mindestvolumen von 200µl (ggf. aufgefüllt mit Aufschlusspuffer A+) durch Zugabe von ½ Vol. 50%(w/v) Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Nach Inkubation über Nacht bei -70°C, Auftauen bei RT und 30 Min. Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit (21500g, 4°C) wurde das Präzipitat ohne Resuspendieren mit 500µl 0,5%(w/v) TCA gewaschen und anschließend bei RT bis 37°C getrocknet. Die Pellets der Berlin-Proben wurden unter Vortexen und Ultraschall in 100µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. In Jülich erfolgte das Resuspendieren in 100µl LDS-Probenpuffer zunächst ohne β-Mercaptoethanol durch 15 Min. Erhitzen auf 95°C unter starkem Schütteln und ggf. Vortexen. Nach Abkühlen auf Eis und ggf. Mercaptoethanolzugabe (in Jülich) wurden alle Proben sowie die Proteinstandards 15 Min. bei 95°C denaturiert, kurz eisgekühlt und auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Beim NuPAGE® LDS-Puffer (Invitrogen) ist die Löslichkeit der abgekühlten Proben aufgrund des Lithiumions im Vergleich zum Natriumion (*Sodium*) erhöht. Disulfidbrücken wurden durch Mercaptoethanol oder DTT reduziert.

#### SDS-Probenpuffer Berlin (100µl)

35µl	0,5M Tris-Base in 12,5% SDS-Lösung
40µl	50% Glycerin
22,5µl	1M DTT
2,5µl	0,1% Bromphenolblau

#### LDS-Probenpuffer Jülich (100µl)

25µl	NuPAGE® LDS-Puffer (gekauft)
30µl	Harnstoffpuffer pH 7
37,5µl	H <sub>2</sub> O
7,5µl	β-Mercaptoethanol

#### NuPAGE® LDS-Puffer (4-fach) (10ml)

4g	Glycerin
0,682g	Tris-Base
0,666g	Tris-HCl
0,8g	LDS (Lithiumdodecylsulfat)
0,006g	EDTA
0,075%	Serva Blau G250
0,025%	Phenolrot

#### Harnstoffpuffer

8M	Harnstoff
0,1M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,01M	Tris

### 7.7.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der denaturierten Proteinproben nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe von diskontinuierlichen (4 - 12%) NuPAGE® Bis-Tris Minigelen im elektrischen Feld einer XCell SureLock Minizelle nach Herstellervorschrift (Invitrogen). Die Elektrophorese wurde bei 140 Volt innerhalb von 2 - 2 ½ Std. im Kühlraum durchgeführt. Alle Gele wurden zur Analyse per Western Blot verwendet.

#### MOPS-Laufpuffer

50mM MOPS  
50mM Tris  
0,5%(w/v) SDS  
1,025mM EDTA

ergibt pH 7,7; sterilfiltriert; Lagerung 4°C

#### NuPAGE Antioxidant (gekauft)

0,5M DTT, stabilisiert

#### Oberer Laufpuffer

500µl Antioxidant in 200ml MOPS-Puffer

### 7.7.3. Immunologischer Proteinnachweis (Western Blot)

Der Transfer der per PAGE aufgetrennten Proteine auf eine immobilisierende Trägermembran ermöglicht sowohl die Anfärbung aller Proteine als auch eine proteinspezifische Immunodetektion über Antikörperreaktionen. Nach Benetzen der hydrophoben PVDF-Membran (Immobilon P) mit einer Mischung aus Methanol und Ethanol wurden Membran, Filterpapiere (Whatman 3MM) und Schwämmchen mindestens 10 Min. in Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte als „*wet blot*“ per NuPAGE® XCell II Blotmodul (Invitrogen) im elektrischen Feld (33V, 2,5 Std. für 2 Minigele) im Kühlraum. Zur Proteinfixierung, Transferkontrolle und Markierung der Molekulargewichtsstandards wurde die Membran anschließend mit Ponceau-S-Lösung (Roth) gefärbt. Nach Entfärben mit H<sub>2</sub>O und mindestens 1 Std. Schwenken in Blockierlösung (einmal gewechselt) erfolgte die Inkubation mit in PBSTXS verdünntem primärem Kaninchen-Antiserum über Nacht bei 4°C. Vor und nach der Zugabe von 1:10000 in PBSTXS verdünntem Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-*Horseradish* Peroxidase-Konjugat, ECL Kit) wurde die Membran jeweils mindestens 1 Std. mit mehrfach gewechseltem PBSTXS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels ECL Western Blotting Analysis System (Amersham) und Röntgenfilmen.

#### Transferpuffer

3,03g/l Tris  
14,4g/l Glycin  
0,2%(v/v) Ethanol  
ergibt pH ~ 8,4; ohne Ethanol autoklaviert

#### 20x PBS

62,5g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
6,8g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O  
175g/l NaCl  
pH 7,5; autoklaviert

#### Blockierlösung

5%(w/v) Magermilchpulver  
in 1x PBS

#### PBSTXS Waschpuffer

0,1%(w/v) Triton X-100  
0,02%(w/v) SDS  
in 1x PBS

## 7.8. Immuno-Goldmarkierung und Elektronenmikroskopie

Der Nachweis eines Enzyms per Elektronenmikroskopie und Immuno-Goldmarkierung von Ultradünnschnitten fixierter Zellen zeigt die subzelluläre Lokalisation *in situ*. Im Gegensatz zur Fluoreszenzmarkierung können sowohl cytosolische Proteinaggregate als auch geringe Anreicherungen bei partiellem Organellimport detektiert werden. Die Zellanzucht und Fixierung erfolgten in Jülich, die restlichen Schritte gemäß Waterham *et al.* (1994) an der Universität Groningen (NL), Abteilung für Eukaryotische Mikrobiologie. Die Zellen wurden wie in Kapitel

7.5.1. kultiviert mit 3 Vorkulturen und einer 200ml Hauptkultur (1l-Kolben), gefolgt von 13 Std. Induktion nach Zugabe von 20ml 10x YNO. Mindestens 200mg Zellen wurden in einem 50ml Falconröhrchen geerntet (6 Min., 2500g, RT; ggf. mehrfach) und zweimal mit je 5ml Waschpuffer gewaschen. Die Fixierung erfolgte nach Überführen der Zellen in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 3 bis 4 Pellet-Vol. Fixierpuffer innerhalb von 2 Std. auf Eis. Die Zellen wurden kurz sedimentiert (*Short Run*), nach sanftem Resuspendieren durch Anschnippfen einmal mit Waschpuffer gewaschen und erneut kurz zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde möglichst luftblasenfrei mit Waschpuffer überschichtet, etwas resuspendiert und per Expressdienst auf Eis nach Groningen geschickt. Fixierte Zellen können vor der Einbettung in Kunstharz bei kontinuierlicher Kühlung bis zu eine Woche gelagert werden.

**Waschpuffer**

0,1M Cacodylat pH 7,2

**Fixierpuffer**0,1M Cacodylat pH 7,2  
3%(v/v) Glutaraldehyd, aus 25%, frisch**8. Angaben zur Umrechnung der Zentrifugendrehzahlen**

In diesem Methodenteil wurden alle Beschleunigungen als x-fache Erdbeschleunigung [g] angegeben, da dieser Wert unabhängig ist von der verwendeten Zentrifuge. Die nachfolgende Formel sowie die Rotorradien ermöglichen die Umrechnung in die gebräuchlichere Einheit rpm.

Der Zusammenhang ist: 
$$\text{Drehzahl [rpm]} = 1000 \times \sqrt{\frac{\text{Beschleunigung [g]}}{1,12 \times \text{Radius [mm]}}}$$

Der zur Berechnung benötigte Rotorradius der verwendeten Tischzentrifugen war:  
Eppendorf 5415C: 74,4mm; Heraeus 3S-R: 181,7mm und Sigma 2K15: 81,85mm.

## ERGEBNISSE

### 1. Wachstumsversuche zur Rolle der Isocitrat-Lyase (ICL) bei *Ashbya gossypii* und *Saccharomyces cerevisiae*

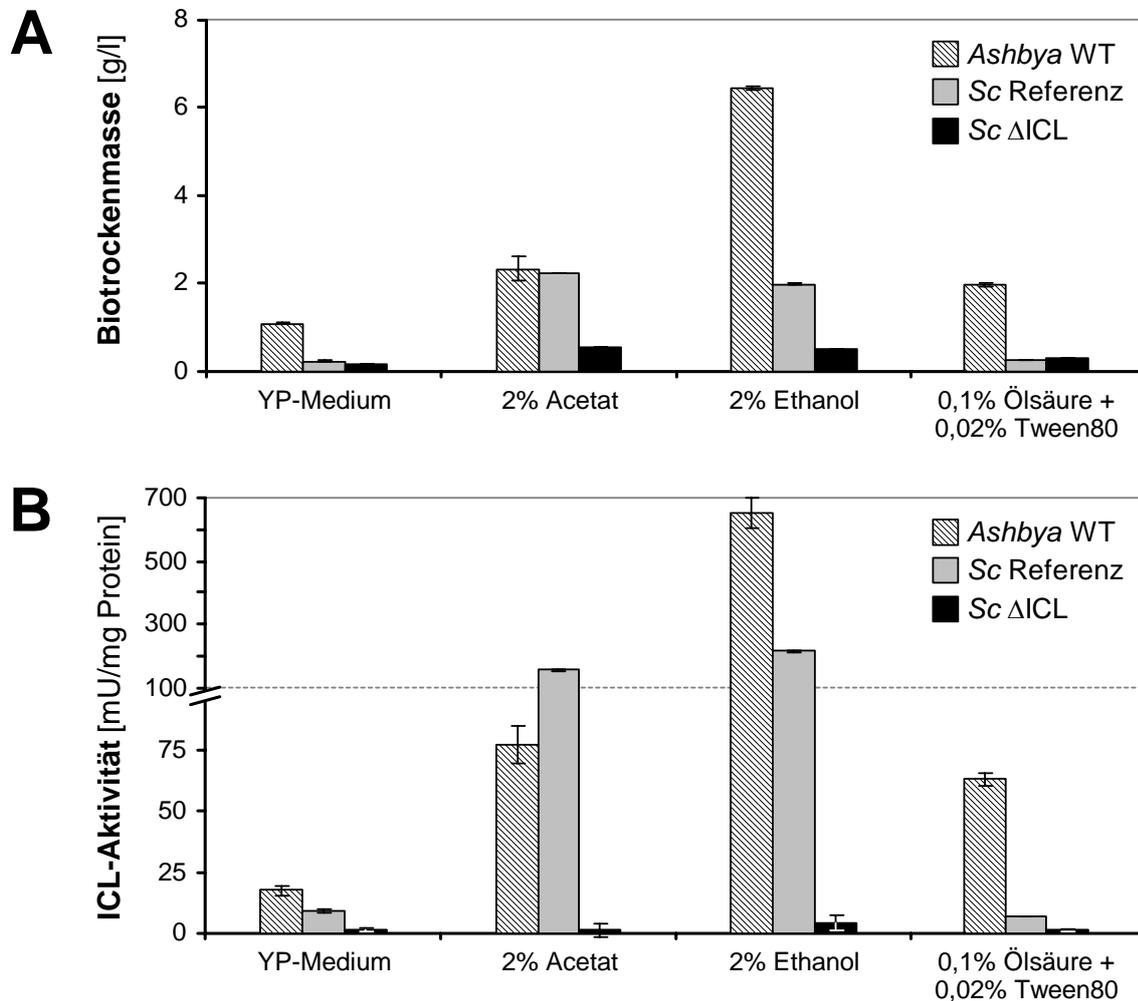
#### 1.1. Biomassebildung und spezifische ICL-Aktivität

Die Untersuchung des industriell relevanten Zusammenhangs zwischen der Riboflavinbildung und der Isocitrat-Lyase-Aktivität bei *A.gossypii* (Schmidt *et al.*, 1996b) führte zur Isolation und Charakterisierung des *AgICL1* Gens (Maeting *et al.*, 1999). Dabei wurde eine *S.cerevisiae* Deletionsmutante komplementiert, die auf Ethanol nicht wachsen konnte. Trotz der nahen Verwandtschaft der beiden Pilze sowie der hohen Konservierung der ICL-Loci (Proteinsequenz und Genanordnung) war das Wachstum der *AgICL1*-Transformante signifikant schwächer gegenüber dem Hefe-Wildtyp. Außerdem bestanden auffällige Unterschiede in der Regulation und der subzellulären Lokalisation der ICLs. Da die *Ashbya*-ICL (*Ag* ICL) im Wildtyp peroxisomal ist (Maeting *et al.*, 1999), die *S.cerevisiae*-ICL (*Sc* ICL) dagegen cytosolisch (Taylor *et al.*, 1996; Chaves *et al.*, 1997), sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche ICL-Lokalisation das Wachstumsverhalten der nahe verwandten Pilze beeinflusst.

Dazu wurden parallele Schüttelkolbenversuche durchgeführt (**Abb. 5**). Da *A.gossypii* keine homogene Flüssigkultur sondern Myzelflocken bildet, wurde das Wachstum nicht als Zeitverlauf der optischen Dichte, sondern anhand der nach 30 Std. gebildeten Biotrockenmasse verglichen. Alle Stämme befanden sich zu diesem Zeitpunkt scheinbar in der stationären Phase (nicht gezeigt). Zusätzlich wurden die ICL-Aktivitäten nach 6 und 30 Std. Wachstum gemessen.

Von *S.cerevisiae* wurden ein kanamycinresistenter Wildtyp (Referenz) sowie eine ICL-Deletionsmutante ( $\Delta$ ICL) untersucht. Erwartungsgemäß konnten bei der *Sc*  $\Delta$ ICL-Mutante keine ICL-Aktivitäten gemessen werden. Da die ICL essentiell ist zur Nutzung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen für den Aufbaustoffwechsel, führte die Zugabe von Acetat oder Ethanol bei der *Sc*  $\Delta$ ICL nur zu einer geringen Zunahme der Biomasse verglichen mit dem Basismedium. Diese Zunahme war mit der Nutzung der zusätzlichen C-Quellen für den Energiestoffwechsel (Citratzyklus) erklärbar. Anders war die Situation beim Referenz-Stamm, der durch die starke ICL-Induktion auf Ethanol bzw. Acetat eine 4-fach höhere Biomasse verglichen mit der *Sc*  $\Delta$ ICL erreichte. Die gebildete Biomasse entsprach dabei dem Wert einer Glucosekultur (nicht gezeigt), d.h. die Stoffwechselkapazität wurde optimal ausgenutzt. Im Gegensatz dazu fungierte die Ölsäure nicht als zusätzliche C-Quelle der *S.cerevisiae*-Stämme, erkennbar an den zum Basismedium identischen Biomassen und ICL-Aktivitäten. Wahrscheinlich wurde die Ölsäurenutzung vor allem durch die Kultivierungsdauer limitiert, da Ölsäuremedium eine Verringerung der *S.cerevisiae*-Teilungsrates auf ca. 20 Std. bewirkt (Dyer *et al.*, 2002). Dieser Effekt ist bei *A.gossypii* nicht bekannt. Dementsprechend konnte *A.gossypii* die Ölsäure auch innerhalb der 30 Std. als C-Quelle verwenden, wie die erhöhte ICL-Aktivität und die Verdopplung der Biomasse gegenüber dem Basismedium zeigten. Allerdings konnte *A.gossypii* nicht nur auf Ölsäure, sondern auch auf dem Basismedium und mit Ethanol deutlich besser wachsen als der *S.cerevisiae* Wildtyp. Vor allem die Ergebnisse des Basismediums sprachen für einen effizienteren Stoffwechsel von *A.gossypii*, da gegenüber der *Sc* Referenz mit einer nur doppelt so hohen ICL-Aktivität die 5-fache Biomasse erreicht wurde. Ein möglicher Grund dafür war die Benachteiligung des Hefestamms durch vier Auxotrophien. Darüber hinaus korrelierte die höhere ICL-Aktivität generell mit einer höheren Biomassebildung. Nur auf Acetat war die nach 30 Std.

erreichte Biomasse beider Pilze identisch, trotz der doppelt so hohen ICL-Aktivität von *S.cerevisiae*. Da jedoch die *Ag* ICL bereits nach 6 Std. stark induziert war (190mU/mg Protein), die *Sc* ICL aber nicht (4mU/mg Protein), war die vergleichbare Biomasse mit einer ähnlichen ICL-Gesamtaktivität im Kulturzeitraum bis 30 Std. erklärbar.



**Abb. 5: Wachstum von *A.gossypii* und *S.cerevisiae* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen**

Die Bestimmung von Biotrockenmasse (**A**) und spezifischer ICL-Aktivität (**B**) erfolgte in unabhängigen Versuchsreihen nach 30 Std. Kulturdauer in YP-Medium mit ggf. zusätzlicher Kohlenstoffquelle. Die ICL-Aktivitäten wurden sofort nach dem French Press-Zellaufschluss gemessen.

Dennoch war das Wachstum nicht nur abhängig von der ICL-Aktivität. Dafür sprachen z.B. die unterschiedlichen Verhältnisse zwischen den *Sc* Referenz- und den *Ashbya*-Messwerten bei verschiedenen Medien. So waren bei 30 Std. Kulturdauer die Biomasse und die ICL-Aktivität von *Ashbya* auf Ethanol 3-fach höher, auf Ölsäure aber 9-fach höher verglichen mit dem *S.cerevisiae* Wildtyp. Auch bei einer Berücksichtigung der ICL-Gesamtaktivitäten bis 30 Std. schien die C-Quelle eine Rolle zu spielen. Messungen in der exponentiellen Phase (nicht gezeigt) und bei 30 Std. (**Abb. 5B**) zeigten, dass die *Ag* ICL-Aktivität auf Acetat sowie die *Sc* ICL-Aktivitäten auf Acetat oder Ethanol im Kulturverlauf signifikant höher waren als bei der *Ag* ICL auf Ölsäuremedium. Die ICL-Induktion durch Ölsäure war nicht nur schwächer, sondern auch langsamer verglichen mit den anderen Medien, was durch eine *lag*-Phasenverlängerung vieler Mikro-

organismen durch Fettsäuren erklärbar war (Stratford & Anslow, 1996). Obwohl der *Ashbya* Ölsäurekultur damit insgesamt weniger ICL zur Verfügung gestanden hatte, stimmte die bei 30 Std. erreichte Biomasse mit *A.gossypii* auf Acetat sowie *S.cerevisiae* auf Acetat oder Ethanol überein. Der *Ashbya* ICL-Stoffwechsel als Basis des Zellwachstums war daher bei Ölsäure besonders effizient. Ölsäure induziert nicht nur die Peroxisomenbildung und die zur Gluconeogenese relevanten peroxisomalen Enzyme, sondern liefert auch peroxisomales Acetyl-CoA. Daher erschien ein peroxisomaler Glyoxylatweg auf Ölsäuremedium vorteilhaft (siehe auch Kunze *et al.*, 2002).

Insgesamt ergaben sich damit verschiedene Erklärungsansätze zum geringeren Wachstum von *S.cerevisiae* verglichen mit *A.gossypii*. Neben der unterschiedlichen Enzymaktivität sowie der bekannten unterschiedlichen Regulation der ICLs (Schmidt, 1996; Maeting *et al.*, 1999) war zusätzlich/alternativ die peroxisomale Lokalisation der *Ag* ICL als Ursache denkbar, da sie die effiziente Bündelung des Glyoxylatwegs in den Peroxisomen ermöglichte. Im Gegensatz zu den nicht greifbaren komplexen Auswirkungen der regulierten ICL-Aktivität auf den Stoffwechsel und das Wachstum war die ICL-Lokalisation ein gut zu untersuchender Ansatzpunkt. Da die cytosolische *Sc* ICL die peroxisomale Bündelung des Glyoxylatwegs verhinderte, sollte eine Bäckerhefe-Mutante mit peroxisomaler ICL erzeugt werden.

## **1.2. Auswahl einer Signalsequenz zur Erzeugung eines peroxisomalen *Sc* ICL-Muteins**

Der peroxisomale Proteinimport erfolgt nach der cytosolischen Synthese meist aufgrund eines konservierten C-terminalen Importsignals (PTS1). Angehängte PTS1-Signale können den peroxisomalen Import heterologer Proteine oder sogar von Goldkörnern vermitteln (McNew & Goodman, 1996). Dabei sind nach einer Vergleichsanalyse mindestens die letzten 12 Aminosäuren peroxisomaler Proteine am PTS1-Signal beteiligt (Neuberger *et al.*, 2003a). Der von Neuberger *et al.* (2003b) entwickelte „*PTS1-Predictor*“-Algorithmus fasst die Anforderungen zusammen und ermöglicht so die Abschätzung des peroxisomalen Imports eines Proteins anhand der Aminosäure-Sequenz.

Die Idee zur Erzeugung einer peroxisomalen *Sc* ICL durch Anhängen eines PTS1-Tripeptids wurde unterstützt durch den erfolgreichen peroxisomalen Import von bakterieller Chloramphenicol-Transferase nach Anhängen von AKL (Alanin-Lysin-Leucin) und Expression in *S.cerevisiae* (McNew & Goodman, 1994). Das ausgewählte Tripeptid AKL stimmte mit dem C-Terminus der peroxisomalen *Ashbya* -ICL sowie der taxonspezifischen PTS1-Präferenz von Pilzen überein (Neuberger *et al.*, 2003a). Die Sequenzen der Wildtyp *Sc* ICL sowie des AKL-Fusionsproteins wurden mit dem *PTS1-Predictor* für Pilze analysiert (**Tab. 9**). Der deutliche Unterschied in der Endwertung wies auf ein funktionales PTS1-Signal bei ICL+AKL hin, im Gegensatz zum Ausgangsprotein. Nachfolgend wurde daher eine chromosomale Mutante durch die Insertion der Codons für das Tripeptid erzeugt.

**Tab. 9: *PTS1-Predictor* Untersuchung zur Funktion der C-Termini als PTS1-Signal**

Das Profil bewertet die Konservierung der Aminosäuren verglichen mit peroxisomalen Proteinen. Bei der Endwertung ist auch die Zugänglichkeit berücksichtigt. Generell ist die Endwertung bei peroxisomalen Proteinen  $> 0$  und bei nicht-peroxisomalen  $< -10$ . Die Wahrscheinlichkeit  $P$  eines falschpositiven Ergebnisses basiert auf den Wertungen von 8391 PTS1-losen, nicht-peroxisomal annotierten Pilzproteinen.

	PTS1-Analyse „Fungi“	
	<i>Sc</i> ICL	<i>Sc</i> ICL+AKL
<b>C-Terminus</b>	tedqfkengvkk	qfkengvkkAKL
<b>Profil</b>	-22,640	8,721
<b><math>P</math> (Falschpositiv)</b>	7,95%	0,03%
<b>Endwertung</b>	-24,128	8,004
<b>Klassifizierung</b>	<i>not targeted</i>	<i>targeted</i>

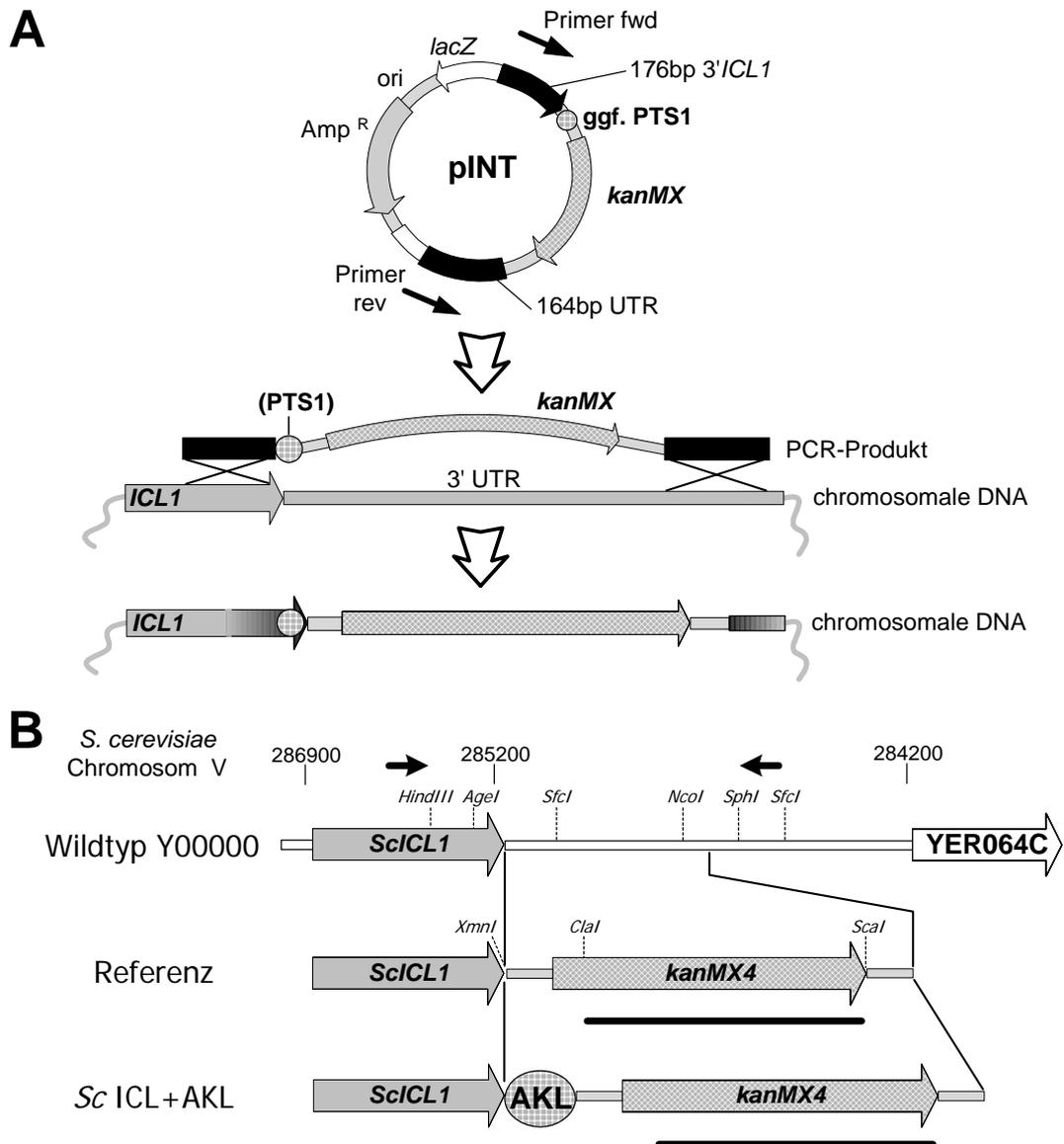
## 2. Die Hefemutante *Sc* ICL+AKL mit künstlichem PTS1-Signal

### 2.1. Erzeugung und molekulare Verifizierung chromosomaler Hefemutanten

Die Konstruktion einer chromosomalen ICL+AKL direkt am ICL-Locus diente der Modifizierung des Gens der cytosolischen ICL. Dadurch sollte ohne eine Veränderung der Regulation und Kopienzahl nur noch peroxisomal-orientierte ICL vorliegen. Es wurde eine Austauschmutagenese gemäß **Abb. 6A** durchgeführt, bei der 500 Basenpaare der untranslatierten Region nach dem *ICL1* Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurden. Dieser Austausch ermöglichte die Selektion der Transformanten auf Geneticinmedium. Die Resistenzkassette stammte aus pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) und wurde bereits zur Erzeugung vieler *S.cerevisiae* Deletionsmutanten verwendet. Nach der publizierten Methode sollte ein pUG6-PCR-Amplifikat mit je 40 Basen flankierender Hefesequenz des zu disruptierenden Bereiches für einen Austausch durch homologe Integration ausreichen.

Bei der *Sc* ICL+AKL-Mutante wurde *kanMX* nur als Selektionsmarker verwendet. Statt einer Gendeletion sollten die Codons des PTS1-Signals mit Hilfe des vorderen PCR-Primers eingeführt werden. Mit 45 Basen langen Hefe-Homologiesequenzen wurden nur ektopische, d.h. ungerichtete, Integrationen erhalten. Zusätzlich enthielt der vordere PCR-Primer (*Sc*ICL-pUG6-fwd) Synthesefehler aufgrund seiner Länge (77mer). Daher wurde die Plasmidserie pINT als eine durch Sequenzierung überprüfbare Matrize für Integrationsamplifikate mit verlängerten flankierenden Hefesequenzen konstruiert. Erst nach schrittweiser Verlängerung der Hefe-Homologiesequenzen auf 176 Basen am Ende von *ICL1* bzw. 164 Basen in der 3' untranslatierten Region (3' UTR) wurden Transformanten mit korrekt integriertem PCR-Produkt erhalten.

Die Insertion der 1,7kb Integrationskassette erfolgte durch ein Doppelcrossover im Austausch gegen 500bp 3' UTR. Trotz eines normalerweise ausreichenden Abstandes von weiteren 500bp vor dem Startcodon eines nicht charakterisierten Gens (YER064C) konnte der Verlust regulativer Elemente nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich könnte die Expression der Kanamycinresistenz den Stoffwechsel der Mutante beeinträchtigen. Beide putativen Effekte wurden durch die Erzeugung eines Referenz-Stammes nivelliert, der sich von *Sc* ICL+AKL nur durch das Fehlen des PTS1-Signals unterschied (**Abb. 6B**).

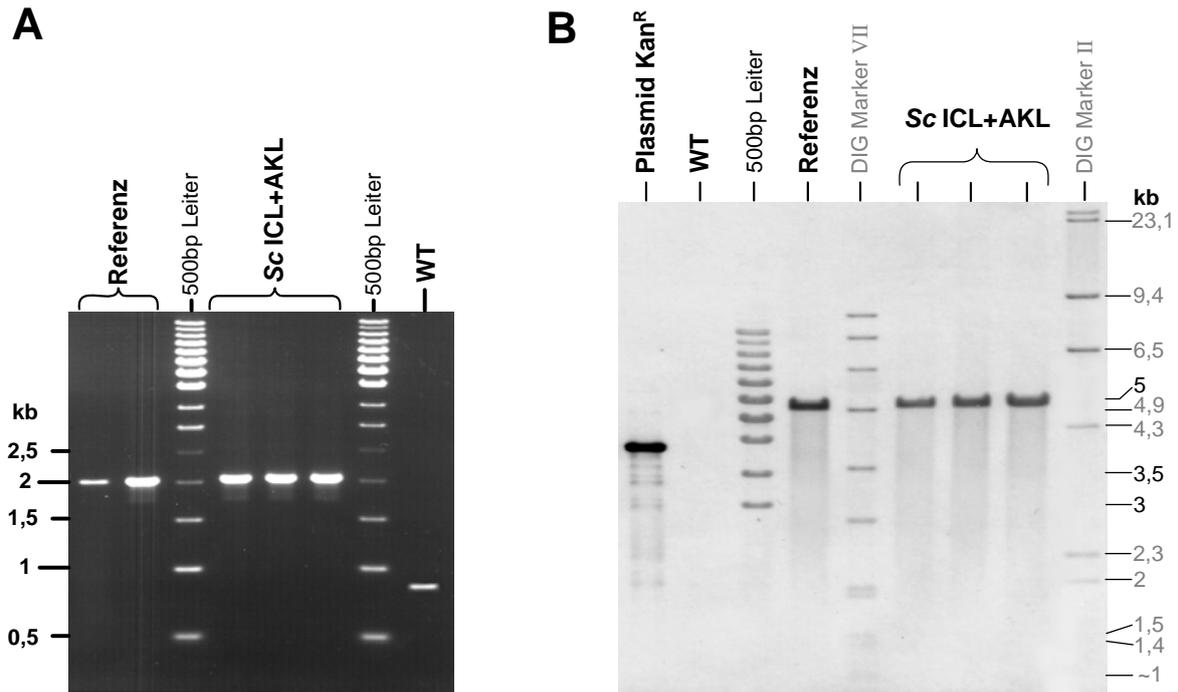


**Abb. 6: Konstruktion chromosomaler Mutanten durch homologe Rekombination**

**A:** Allgemeines Schema. Ein PCR-Amplifikat des Integrationskonstruktes dient zur Transformation von *S.cerevisiae*. Homologe Rekombination im Bereich der flankierenden Hefesequenzen führt zur Austauschmutagenese von einem Teil der untranslatierten Region (UTR) gegen die *kanMX*-Kassette. **B:** ICL-Locus von Referenz-Stamm und Mutante *Sc ICL+AKL* ohne bzw. mit PTS1-Signal. Die schwarzen Pfeile und Balken markieren die Positionen der Primer bzw. der DNA-Sonde zur Überprüfung der Integrationen per PCR und Southern Blot (siehe Abb. 7).

Bei beiden Stämmen wurden jeweils mehrere unabhängige Transformanten erhalten und nachfolgend per PCR (**Abb. 7A**), Southern Blot (**Abb. 7B**) und Sequenzierung überprüft.

Die PCR erfolgte mit den Primern *ScICL-Seq3-fwd* und *-rev*, die gemäß **Abb. 6B** jeweils ca. 30 Basen links oder rechts des Integrationsbereiches hybridisierten. Die erhaltenen Signale entsprachen den Berechnungen von 0,9kb beim Wildtyp (Ausgangsstamm) sowie 2kb bei erfolgreicher Austauschmutagenese bei den chromosomalen Mutanten.



**Abb. 7: Molekulare Verifizierung der chromosomalen Mutanten**

Gezeigt sind unabhängige Transformanten. **A:** PCR-Amplifikate des Integrationsbereichs mit den in Abb. 6 markierten Primern. Die Insertion der *kanMX*-Kassette bewirkt eine Vergrößerung des PCR-Produkts bzgl. Wildtyp. **B:** Southern Blot mit *kanMX*-Sonde nach *AvaII* + *BamHI*-Restriktion der genomischen DNAs (je 40µg). Das linearisierte Plasmid pUG6 diente als Positivkontrolle. Es sind nur einige Größen der Molekulargewichtsstandards angegeben. Die 500bp Leiter ist nicht Digoxigenin (DIG)-markiert und erst ab 3kb sichtbar.

Der Southern Blot diente zum Ausschluss zusätzlicher ungerichteter Integrationen der Mutagenesekassette außerhalb des *ICL1*-Locus. Genomische DNA vom WT und einigen Transformanten wurde mit den Restriktionsenzymen *AvaII* und *BamHI* geschnitten und gegen eine DIG-markierte, 700bp große *ClaI*-*Scal*-Sonde des *kanMX*-Moduls aus pUG6 hybridisiert. Nach Abb. 6B sollte die Sonde bei den chromosomalen Mutanten ein 4,96kb Fragment des *ICL1*-Locus markieren, beim WT dagegen kein Signal liefern. Da der Southern Blot (**Abb. 7B**) nur die erwarteten Signale enthielt, wurde die Einfachintegration der *kanMX*-Kassette am Ziel-Locus bestätigt. Das Vorhandensein bzw. Fehlen der Codons für das PTS1-Signal AKL sowie die korrekte homologe Integration ohne Erzeugung eines *Frameshifts* wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte aus Abb. 7A nachgewiesen.

## **2.2. Wachstums- und Komplementationsversuche**

Die PTS1-Mutante *Sc ICL+AKL* wurde erzeugt zur Untersuchung, ob die peroxisomale Lokalisation des Enzyms das Wachstum und die ICL-Aktivität auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen und speziell bei Peroxisomen-induzierenden Bedingungen (Ölsäure) verbessert. Die Ergebnisse der zu Kapitel III.196H1.1 analogen Wachstumsversuche und Enzymtests sind in **Tab. 10** zusammengefasst.

**Tab. 10: Biomassebildung und spezifische ICL-Aktivität auf verschiedenen C-Quellen**

Die Datenermittlung erfolgte anhand unabhängiger Versuchsreihen nach 30 Std. Kultivierung in YP-Medium mit ggf. zusätzlicher Kohlenstoffquelle, analog zu Abb. 5. Die Standardabweichungen ( $\pm$ ) der Biomassen waren  $\leq 0,04\text{g/l}$ .

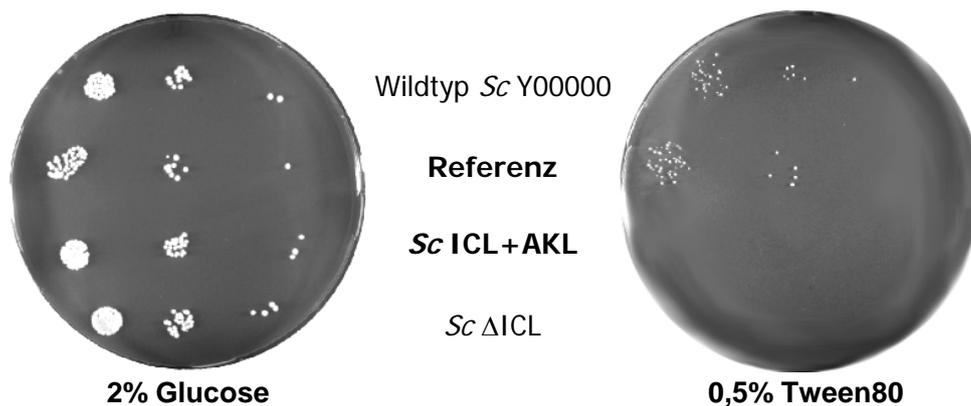
C-Quelle	Wachstumsparameter			
	Biotrockenmasse [g/l]		spezifische ICL-Aktivität [mU/mg Protein]	
	Referenz	Sc ICL+AKL	Referenz	Sc ICL+AKL
2% Glucose	1,8	1,7	34 $\pm$ 0	33 $\pm$ 6
YP-Medium	0,2	0,5	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 3
2% Acetat	2,2	2,3	152 $\pm$ 1	49 $\pm$ 13
2% Ethanol	2,0	2,3	216 $\pm$ 4	113 $\pm$ 15
0,1% Ölsäure + 0,02% Tween80	0,2	0,5	7 $\pm$ 0	9 $\pm$ 3

Bei der Biomassebildung von *Sc ICL+AKL* war im Vergleich zum Referenz-Stamm kein signifikanter Unterschied erkennbar. Die geringfügige Steigerung um 0,3g/l mit Ethanol oder Ölsäure trat auch beim Basismedium (YP) auf und war deshalb kein Effekt der ICL-Aktivität. Dafür sprach auch, dass die  $\Delta$ ICL-Mutante auf dem Basismedium genauso wuchs wie der Wildtyp (vgl. Abb. 5).

Die ICL-Aktivität zeigte bei beiden Stämmen der **Tab. 10** die erwartete C-Quellen-abhängige Regulation, d.h. eine Induktion durch die Verwertung der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen Ethanol und Acetat. Die im Vergleich zum Basismedium erhöhte Aktivität auf Glucose ließ sich durch die Bildung von ICL-induzierendem Ethanol während der 30-stündigen Kultivierung erklären. Die Katabolit-Repression der ICL entfällt bei Glucose-Konzentrationen unterhalb von 0,3% und war deshalb bei 30 Std. nicht mehr relevant. Auf Acetat oder Ethanol war die ICL-Aktivität von *Sc ICL+AKL* zwar geringer als beim Wildtyp, jedoch ohne einen Einfluss auf die Biomassebildung. Der Unterschied basierte wahrscheinlich auf einer verschiedenen langen *lag*-Phase der Stämme und wurde dadurch verstärkt, dass die ICL-Aktivität im Kulturverlauf eine Optimumkurve zeigte mit einem Maximum zu Beginn der stationären Phase (Schmidt, 1996), d.h. bei ca. 28 Std. bzgl. des Referenz-Stamms.

Da die PTS1-Mutante auf dem Vollmedium keinen Wachstumsphänotyp gegenüber der Referenz zeigte, wurde ein *Screening* auf Minimalmedium durchgeführt, das entweder definierte Supplemente oder einen geringen Hefeextraktanteil enthielt. Wie bereits in der Einleitung (Kapitel I.3) erläutert, könnte die ICL-Delokalisierung bei der PTS1-Mutante aufgrund eines bei *S.cerevisiae* fehlenden peroxisomalen Succinat-Carriers zu einer Succinatanhäufung in den Peroxisomen und damit zu einem Wachstumsphänotyp führen. Zur Isolierung dieses Carriers wurde ein Screenmedium mit einem signifikanten, komplementierbaren Wachstumsunterschied der Hefestämme benötigt. Dazu wurden die Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Pyruvat, Acetat, Ethanol und Ölsäure bei verschiedenen pH-Werten untersucht, z.T. als Kombination mit Ölsäure. Zur Emulgierung der Ölsäure wurde Tween80 (Polyoxyethylen-sorbitan-Monooleat) verwendet, das als extrazellulär zu spaltender Fettsäureester eine sehr schwache Kohlenstoffquelle für *S.cerevisiae* darstellt (Gurvitz *et al.*, 1998).

Neben einem geringen Wachstumsunterschied auf einigen Acetatmedien, der zu schwach war für Komplementationsversuche, war bei den anderen C-Quellen kein Wachstumsphänotyp erkennbar, mit einer Ausnahme: Ein ursprünglich als Negativkontrolle für den Emulgatorzusatz gedachtes Minimalmedium mit Tween80 als einziger C-Quelle zeigte nach langer Inkubation ein geringes Wachstum der Wildtypen Y00000 und Referenz, während *Sc* ICL+AKL und *Sc*  $\Delta$ ICL nicht wuchsen (**Abb. 8**). Die geringe Koloniegröße und lange Inkubationsdauer konnten weder durch Veränderung der Tweenmenge noch durch pH-Änderung verbessert werden. Aufgrund des eindeutigen Wachstumsdefektes von *Sc* ICL+AKL wurde das Tweenmedium dennoch für Komplementationsversuche verwendet.



**Abb. 8: Wachstum auf Tween80 als einziger Kohlenstoffquelle**

Nach Auszählung per Thomakammer wurden je 10  $\mu$ l Zellsuspension mit ca. 1000, 100 und 10 Zellen auf Agarplatten SD Minimal + Uracil mit Glucose oder Tween80 (pH 7) als einziger Kohlenstoffquelle aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 3 (Glucose) oder 20 Tage (Tween80). Im Gegensatz zu Glucose ist zum Wachstum auf dem Ölsäureester Tween80 der Glyoxylatweg essentiell. *Sc*  $\Delta$ ICL dient daher als Negativkontrolle.

Die *Ashbya*-Genbank besteht aus 34 Fraktionen mit je ca. 100 Plasmiden, die in drei unabhängigen Ansätzen jeweils zur Transformation von *Sc* ICL+AKL eingesetzt wurden. Die Selektion erfolgte in zwei Stufen zunächst auf Uracil-Prototrophie durch Plasmidaufnahme (je 1500 bis über 5000 Transformanten pro Fraktion), gefolgt von einer Replikaplattierung auf Tweenmedium. Nach 20 bis 40 Tagen Inkubation traten bei 10 Genbankfraktionen insgesamt 150 Transformanten mit Referenz-ähnlicher Koloniegröße auf sowie winzige Mikrokolonien in fast allen Fraktionen. Das Wachstum auf Tween wurde in Tüpfeltests analog zu Abb. 8 für sieben der ausgewählten 20 Transformanten bestätigt. Aus 55 *E.coli*-Transformanten der Hefe-Gesamt-DNAs wurden gemäß Restriktionsanalysen 13 verschiedene Genbankplasmide isoliert, die jedoch nach Retransformation von *Sc* ICL+AKL kein Wachstum auf dem Tweenmedium vermitteln konnten. Kurierungsversuche durch mehrfache Passagen in Vollmedium (YPD) ergaben die Unabhängigkeit der Tweenverwertung von der Plasmidaufnahme bei allen untersuchten Genbanktransformanten. Die Entstehung derartiger Suppressormutanten war durch das langsame Wachstum auf dem Tweenmedium erklärbar. Von der Charakterisierung der Hefemutanten wurde aufgrund der Vielzahl möglicher Zielgene absehen. Denkbar wären zum Beispiel Lipasen oder Permeasen zur verbesserten Nutzung der C-Quelle Tween, veränderte (Neben-)Aktivitäten peroxisomaler Carrier zum Succinattransport oder eine Aufhebung der ICL-Delokalisierung durch Defekte der Peroxisomenbiogenese oder des

peroxisomalen Imports. Da weitere Versuche zur Entwicklung eines weniger stringenten Screenmediums scheiterten, wurden die Komplementationsversuche zur Carrierisolation zurückgestellt und stattdessen der Aspekt des peroxisomalen Imports der ICL aufgegriffen.

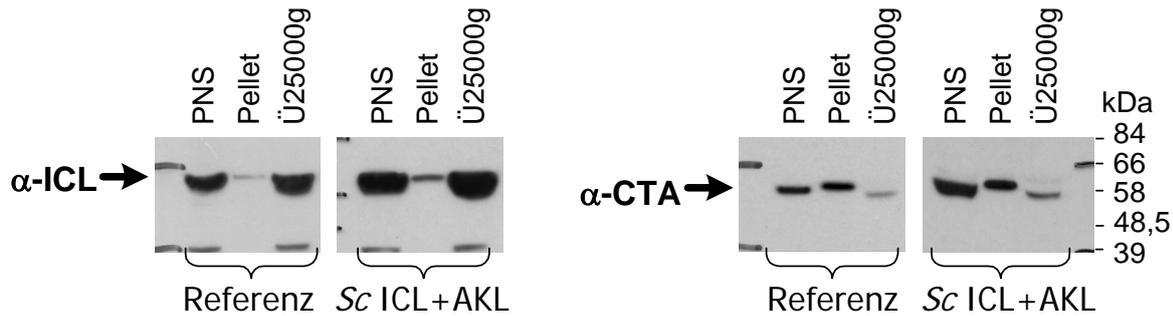
### **2.3. Untersuchungen zum peroxisomalen Import von *Sc* ICL+AKL**

Bei den Wachstumsversuchen war auffällig, dass die PTS1-Mutante nur bei dem sehr limitierenden Tweenmedium einen deutlichen Wachstumsphänotyp zeigte, nicht aber auf Ölsäure oder Ethanol. Als mögliche Erklärung dafür kam eine unvollständige peroxisomale Lokalisation der Isocitrat-Lyase in Frage. Trotz einer Wachstumshemmung durch die vermutete peroxisomale Succinatakkumulation bei der schlechten Kohlenstoffquelle Tween, könnte bei einer reichhaltigen C-Quelle die Succinatbildung im Cytosol durch nicht delokalisierte ICL ausreichen für Wildtyp-ähnliches Wachstum. So genügten *Yarrowia lipolytica* 20% der Wildtyp-ICL-Aktivität zum Wachstum auf Acetat (Barth & Weber, 1987; Barth & Scheuber, 1993).

Um die subzelluläre Verteilung der ICL zu untersuchen, wurden differentielle Zentrifugationen durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein zellfreies Homogenat, der sogenannte „*post nuclear supernatant*“ (PNS), hergestellt und bei 25000g in ein Organellpellet (Pellet) und einen cytosolischen Überstand (Ü25000g) aufgetrennt. Die Qualität der Präparation kann anhand von Markerenzymen mit Enzymtests und Western Blots überprüft werden.

Bei den Enzymtests wird dazu die Gesamtaktivität jeder Fraktion ausgerechnet ( $U_{\text{gesamt}} = U/\text{ml} \cdot \text{Fraktionsvolumen [ml]}$ ) und auf den PNS als Basis der Zentrifugation bezogen. Der Überstand, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten differentiellen Zentrifugationen, enthielt 95 - 98% des cytosolischen Markerenzym Hexokinase. Dagegen umfasste das Organellpellet 85 - 95% bzw. 75 - 90% der Gesamtaktivität der Markerenzyme Cytochrom c-Oxidase (Mitochondrienmembran) und Fumarase (Mitochondrienmatrix). Eine Freisetzung von bis zu 20% der Enzymaktivität im Überstand durch Zerschneiden der Organellen beim Homogenisieren und/oder Zentrifugieren wird allgemein als gute Präparation betrachtet. Im Gegensatz zu den Mitochondrien erwies sich die Abschätzung der Peroxisomenintaktheit als schwierig. Versuche zur Etablierung von Enzymtests für die Markerenzyme Thiolase und Malatsynthase scheiterten an den geringen Aktivitäten. Das typische Markerenzym Katalase hat in *S.cerevisiae* eine cytosolische, zeitgleich aktive Isoform und war außerdem im Organellpellet so stark angereichert, dass die Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung durch Schaumbildung behindert wurde. Anstelle von Enzymtests dienten daher Western Blots der Markerenzyme Katalase A und Thiolase (beide Peroxisomenmatrix) sowie PCS60 (Peroxisomenmembran) zur Abschätzung der Peroxisomenpräparation. Zur Beurteilung der Verteilung erfolgte die Auftragung gleicher Volumenanteile der Fraktionen, entgegen der üblichen Verwendung gleicher Proteinmengen.

Ein repräsentatives Ergebnis zur Analyse der subzellulären ICL-Verteilung durch differentielle Zentrifugation ist in **Abb. 9** und **Tab. 11** dargestellt. Die Katalase A (CTA) Western Blots (**Abb. 9**) entsprachen guten Peroxisomenpräparationen mit einer vergleichbaren starken Anreicherung des Peroxisomenmarkers im Organellpellet von Referenz und *Sc* ICL+AKL. Im Gegensatz dazu konnte per Enzymtests (**Tab. 11**) und korrelierenden Western Blots (**Abb. 9**) nur ein sehr geringer Anteil an ICL in der Organellfraktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von 1% der ICL-Gesamtaktivität bzw. einem hauchdünnen Western Blot-Signal beim Referenz-Stamm stimmten mit der publizierten cytosolischen ICL-Lokalisation überein.



**Abb. 9: Subzelluläre Lokalisation von ICL im Vergleich zu Katalase A nach differentieller Zentrifugation** Zellanzucht in YP + YNO + Uracil. Western Blots zur Verteilung der ICL sowie zur Überprüfung der Peroxisomenpräparation anhand von Katalase A (CTA). Aufgetragen wurde beim Referenz-Stamm je 1/4000, bei der PTS-Mutante je 1/3000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (jeweils PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): Referenz: 30, 3, 30 $\mu$ g; Sc ICL+AKL: 30, 4, 30 $\mu$ g. Die Größen aller Molekulargewichtsstandards (kDa) sind rechts markiert.

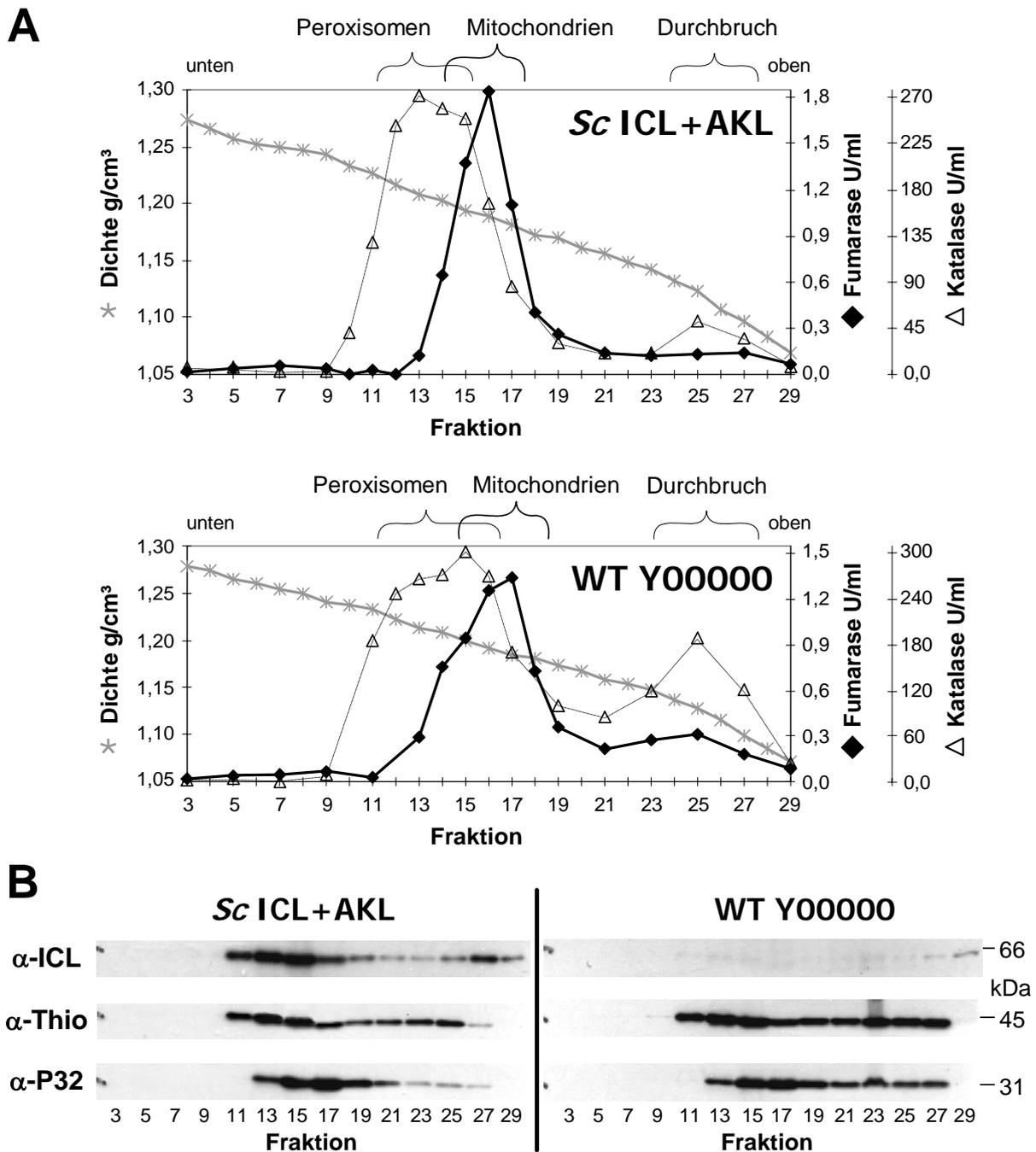
**Tab. 11: Subzelluläre Verteilung der ICL-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 9 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml  $\cdot$  Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

Stamm	ICL-Aktivität		
	relative Gesamtaktivität [%]		
	PNS	Pellet	Ü25000g
Referenz	100	1	104
Sc ICL+AKL	100	5	97

Bei *Sc ICL+AKL* sollte aufgrund des anhängenden PTS1-Signals nur peroxisomal-orientierte ICL vorliegen, entgegen der gemessenen Verteilung mit nur 5% Organellanteil. Gegenüber der Referenz lag dennoch eine leichte Anreicherung der ICL+AKL in der Organellfraktion vor, so dass die peroxisomale Lokalisation des Muteins mit Hilfe von Dichtegradienten überprüft wurde.

Das zusätzliche Verfahren war notwendig, weil die differentielle Zentrifugation aufgrund der Ausnutzung der unterschiedlichen Sedimentationskonstanten nur eine Unterscheidung zwischen dem Cytosol und einer Organellfraktion aus Peroxisomen, Mitochondrien und Lysosomen ermöglicht. Da diese Organellen verschiedene Dichten besitzen, sollten sie sich bei einer Dichtegradientenzentrifugation in der Gradientenzone ihrer eigenen Dichte anordnen. Zur Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien werden meistens Saccharose-Gradienten verwendet, so auch für die Proben in **Abb. 10**. Die Auftrennung der Organellpellets erfolgte innerhalb von 3 Std. mit kontinuierlichen Gradienten und wurde durch Enzymtests (**Abb. 10A**) und Western Blots (**Abb. 10B**) von Markerenzymen bestätigt.



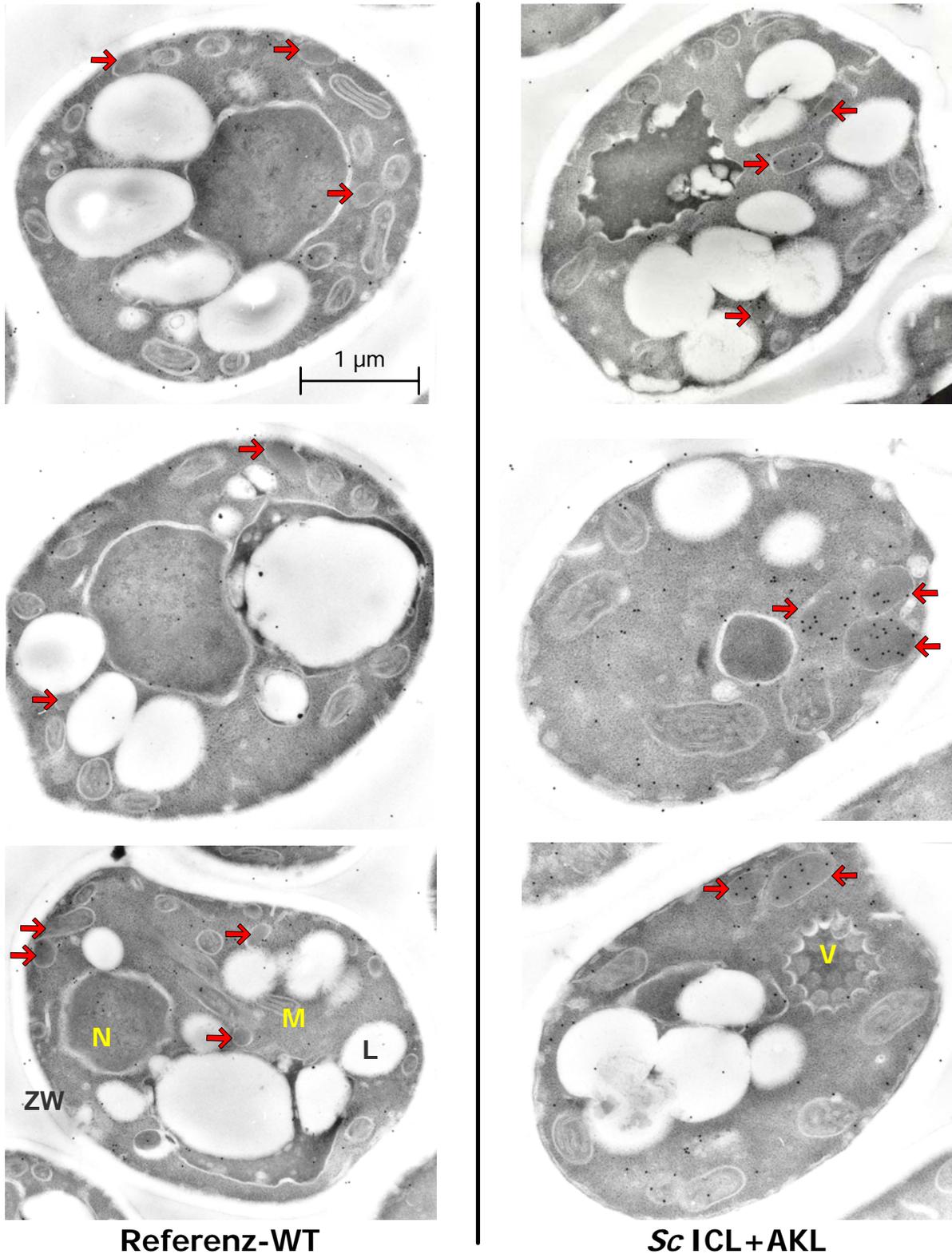
**Abb. 10: Lokalisation der ICL im Vergleich zu Markerenzymen nach Organellpräparation per Dichtegradient** Die Versuche wurden an der FU Berlin durchgeführt. Je 96% des Organellpellets einer differentiellen Zentrifugation (Zellanzucht in SD Minimal + YNO + Uracil) wurden per kontinuierlichem 32 - 54%(w/w) Saccharosegradient aufgetrennt. Beide Gradienten sind überladen. Der hohe Proteinanteil im Durchbruch (= Fraktionen defekter Organelle) beim WT resultiert aus zu starkem Zellaufschluss beim Protoplastieren und Potttern. **A:** Dichteverlauf (\*) nach Brechungsindex sowie Aktivitäten der Markerenzyme Fumarase (◆) und Katalase (△). **B:** Gegenüberstellung der Western Blots von PTS1-Mutante *Sc ICL+AKL* und Wildtyp zur subzellulären Verteilung von ICL, peroxisomaler Thiolase (Thio) und Mitochondrienprotein P32. Aufgetragen wurden je 2,5 Vol.-% (*Sc ICL+AKL*) bzw. 1 Vol.-% (WT) der Gradientenfraktionen.

Die Peroxisomen, charakterisiert durch die Markerenzyme Katalase A und Thiolase, waren vor allem in den Fraktionen 13 bis 15 angereichert. Der Hauptanteil der Mitochondrien befand sich in Fraktion 17, nachgewiesen durch Fumarase und den mitochondriellen Phosphattransporter P32. Die ICL-Detektion ergab beim Wildtyp nur ein schwaches Signal in der obersten Gradientenfraktion, übereinstimmend mit cytosolischer ICL. Die *Sc* ICL+AKL-Mutante zeigte eine deutliche ICL-Co-Lokalisation mit Thiolase sowie eine Markierung der obersten Fraktionen. Damit wurde eine parallele peroxisomale und cytosolische Lokalisation der ICL+AKL gezeigt.

Vor allem bei der vorliegenden bimodalen Verteilung des untersuchten Enzyms ist eine Kombination verschiedener Methoden nötig. Während die differentielle Zentrifugation die Quantifizierung der subzellulären Verteilung ermöglicht, kann auch ein geringer peroxisomaler Import noch per Immuno-Goldmarkierung nachgewiesen werden. De Hoop & Ab (1992) konnten so zeigen, dass die *Hansenula polymorpha*-Aminoxidase in *S.cerevisiae* nur cytosolisch lokalisierte und erst nach der Fusion eines PTS1-Signals eine geringe Aufnahme in die Peroxisomen stattfand.

Die ausschließlich cytosolische ICL des Referenz-Stammes sowie die signifikant peroxisomale Lokalisation bei *Sc* ICL+AKL wurden daher auch per Immuno-Goldmarkierung überprüft (**Abb. 11**). Die Hintergrundmarkierung (z.B. Zellkern und Mitochondrien) war ein Artefakt des nicht affinitätsgereinigten *Ashbya*-ICL-Antiserums. Beim Wildtyp enthielten die neun als elektronendichtere, Cristae-freie Strukturen erkennbaren Peroxisomen nur 3% der insgesamt 150 Goldkörner und die restliche Goldverteilung war diffus. Dies stimmte überein mit der cytosolischen Lokalisation der ICL. Bei *Sc* ICL+AKL dagegen lagen 34% der 180 Goldpartikel in den acht Peroxisomen. Der so gezeigte peroxisomale ICL+AKL-Import schien mit einer Vergrößerung der Peroxisomen zu korrelieren, erklärbar durch die Proteinaufnahme.

Obwohl alle drei Methoden (differentielle Zentrifugation, Dichtegradient und Immuno-Goldmarkierung) die Funktionalität des PTS1-Signals AKL zur Vermittlung des peroxisomalen Imports der normalerweise cytosolischen *Sc* ICL bestätigten, blieb die Frage nach der Ursache für die geringe Delokalisierungseffizienz offen.



**Abb. 11: Subzelluläre Lokalisation der ICL anhand von Immuno-Goldmarkierung**

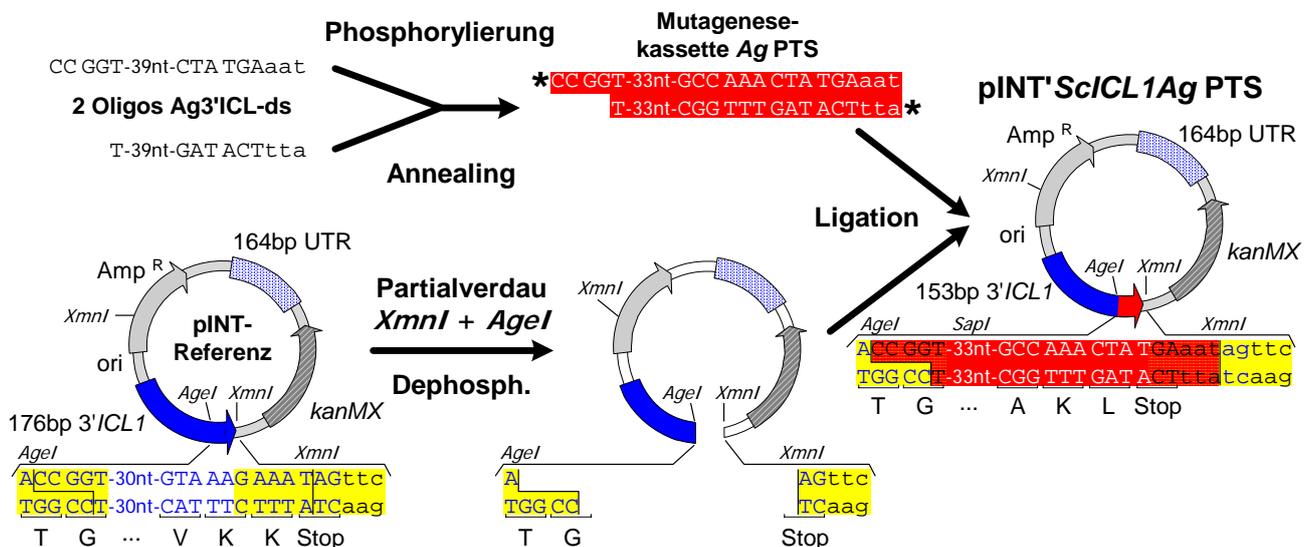
Die Zellanzucht erfolgte in SD Minimal + YNO + Uracil. Einbettung, Immunomarkierung und Elektronenmikroskopie der Ultradünnschnitte durch Klaas Sjollema, Uni Groningen (NL). Die Goldpartikel repräsentieren durch Anti-*Ag* ICL-Serum detektierte Proteine. Peroxisomen sind durch Pfeile markiert. Weitere Zellorganelle: L Lipidkörper, M Mitochondrium (mit Cristae), N Nucleus, V Vakuole, ZW Zellwand. Die diffuse Goldverteilung mit nur 3% Peroxisomenanteil beim WT entspricht einer cytosolischen ICL. Die PTS1-Mutante *Sc ICL+AKL* zeichnet sich durch vergrößerte und signifikant stärker (34%) markierte Peroxisomen aus.

## 2.4. Erzeugung eines Hybridproteins mit *Ashbya*-ICL C-Terminus

Mögliche Erklärungen für den unvollständigen ICL+AKL-Import waren sowohl die Signalexposition als auch der Kontext zur Wechselwirkung mit dem PTS1-Rezeptor. Behinderungen der Signalerkennung durch Protein(fehl)faltung oder physikalische Eigenschaften, wie z.B. Ladungen der Aminosäuren, sind nicht per *PTS1-Predictor*-Analyse abschätzbar. So könnten die positiven Ladungen der vielen C-terminalen Lysinreste der ICL+AKL die berechnete Funktionalität der PTS1-Region beeinträchtigen. Außerdem zeigte ein Vergleich der ansonsten sehr homologen Sequenzen der peroxisomalen *A.gossypii*-ICL (Maeting *et al.*, 1999) mit der Wildtyp *Sc* ICL Unterschiede bei 6 der 12 Aminosäuren der PTS1-Region. Bei der ICL+AKL stimmte nur das PTS1-Tripeptid mit der *Ag* ICL überein.

Die *Ag* ICL enthielt einen auffälligen Einschub eines als potentieller Helixbrecher bekannten Glycins. Dementsprechend ergab die *PTS1-Predictor*-Analyse der *Ag* ICL im Gegensatz zur *Sc* ICL+AKL keine Abzüge für die Signalzugänglichkeit und eine etwas höhere Endwertung für ein funktionales PTS1 (nicht gezeigt). Da somit der Kontext des PTS1-Signals bei der *Ag* ICL geeigneter erschien, war die Konstruktion einer Hybridmutante *Sc* ICL*Ag* PTS mit durch Kassettenmutagenese ausgetauschtem C-Terminus sinnvoll.

Ausgehend vom Plasmid für den Referenz-Stamm und zwei *in vitro* verbundenen Oligonukleotiden wurde gemäß **Abb. 12** das Plasmid pINT'*Sc*ICL1*Ag* PTS erzeugt und zur chromosomalen Austauschmutagenese nach Abb. 6 eingesetzt. Die molekulare Verifizierung erhaltener chromosomaler Mutanten erfolgte per PCR, Southern Blot und Sequenzierung.



**Abb. 12: Konstruktion des Plasmids zur Erzeugung der Mutante *Sc* ICL*Ag* PTS**

Farbig markierte DNA-Bereiche entsprechen *S.cerevisiae* (blau), *A.gossypii* (rot) oder der Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme *AgeI* und *XmnI* (gelb). Die Mutagenesekassette besteht aus *in vitro* verbundenen Oligonukleotiden. Die kompatiblen Enden ermöglichen den gerichteten Austausch des *Sc* ICL C-Terminus durch 15 Codons der *Ag* ICL PTS1-Region. Da nur ein kleines Plasmidfragment kloniert wurde, führte Dephosphorylierung des Vektors und Phosphorylierung (\*) der Mutagenesekassette zur Verbesserung der Effizienz.

Zusätzlich zum Kontext des C-Terminus wirkt sich auch die heterologe Expression auf die peroxisomale Importeffizienz aus, da nach Elgersma *et al.* (1996) die Toleranz bei PTS1-Regionen endogener Proteine deutlich erhöht ist. So war die Übereinstimmung mit einem homologen

PTS1-Signal des Expressionsorganismus zum Teil nicht ausreichend zum Import heterologer Proteine. Ähnliches ist für interne Signale denkbar, die vor allem bei filamentösen Pilzen die ICL-Aufnahme in die Peroxisomen vermitteln (Gainey *et al.*, 1992). Zur Beurteilung der Effizienz des *Ashbya*-PTS1 bei der Expression in *S.cerevisiae* sollte deshalb der Import von *Sc* ICL $\Delta$ PTS mit heterolog exprimierter *Ashbya*-ICL verglichen werden. Die *Ag* ICL sollte dabei nicht nur die maximale peroxisomale Importkapazität dieses heterologen Proteins in der Bäckerhefe zeigen, sondern auch Rückschlüsse bezüglich eines internen Signals ermöglichen. Denkbar war, dass die *Ag* ICL ein zusätzliches Signal zur Verstärkung der Signalwirkung des PTS1-Signals enthielt, analog zur *Sc* Katalase A (Kragler *et al.*, 1993). Für den Kontrollversuch wurde plasmidcodierte *Ag* ICL in Form des bei der Isolierung des Gens identifizierten *Ashbya*-Genbankplasmids GB:*Ag* ICL verwendet (Maeting *et al.*, 1999). Als Expressionsstamm diente *Sc*  $\Delta$ ICL. Die Transformation mit GB:*Ag* ICL war erkennbar durch Uracil-Prototrophie und die Komplementation des Wachstumsdefektes auf Ethanol- sowie Acetat+Ölsäure+Tween80-Festmedium.

### 3. Parameteruntersuchung zur Effizienz des PTS1-abhängigen Imports

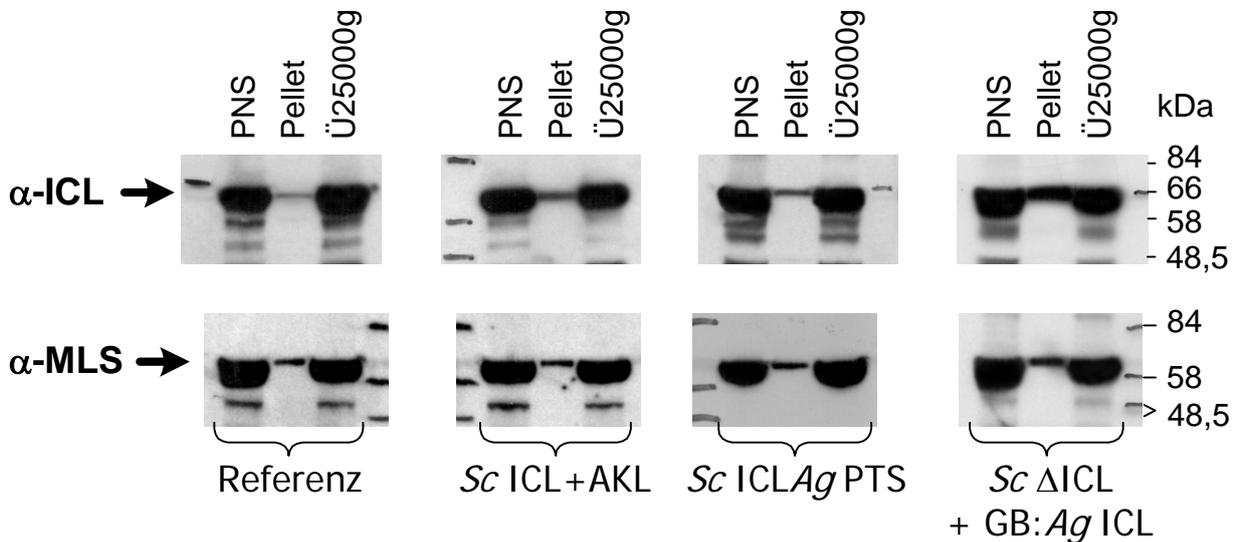
Bei allen vier bisher beschriebenen Stämmen wurde die subzelluläre ICL-Verteilung in parallelen differentiellen Zentrifugationen untersucht (**Tab. 12** und **Abb. 13**).

Gemäß Fumarase Enzymtests sowie Katalase A Western Blots waren alle Organanellpräparationen vergleichbar gut (nicht gezeigt). Die Ergebnisse von Referenz-Stamm und *Sc* ICL+AKL waren identisch zu den bereits gezeigten differentiellen Zentrifugationen (vgl. Tab. 11 und Abb. 9), d.h. das Anhängen des PTS1-Tripeptids bewirkte einen peroxisomalen Import von 4% der im Wildtyp cytosolischen ICL. Bei der Hybridmutante *Sc* ICL $\Delta$ PTS lagen 3% der ICL-Gesamtaktivität im Organellpellet vor (**Tab. 12**), bestätigt durch ein dünnes Western Blot Signal (**Abb. 13**). Die Verteilung stimmte also mit *Sc* ICL+AKL überein. Die Effizienz der Delokalisierung durch das PTS1-Signal AKL war daher unabhängig vom Kontext des *Ashbya*-ICL C-Terminus. Als Kontrast zum geringen PTS1-vermittelten Import der *Sc* ICL-Muteine zeigte die *Ag* ICL eine deutliche Anreicherung im Organellpellet (18% der Gesamtaktivität bzw. deutliche Western Blot Bande). Dieser signifikante Unterschied der Importeffizienz des *Ag* PTS-Muteins und des Gesamtproteins *Ag* ICL wies auf ein zusätzliches peroxisomales Signal des *Ashbya*-Proteins hin.

**Tab. 12: Subzelluläre Verteilung der ICL-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 13 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml · Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

Stamm	ICL-Aktivität relative Gesamtaktivität [%]		
	PNS	Pellet	Ü25000g
Referenz	100	1	108
<i>Sc</i> ICL+AKL	100	4	106
<i>Sc</i> ICLAg PTS	100	3	100
<i>Sc</i> ΔICL + GB:Ag ICL	100	18	84



**Abb. 13: Lokalisation von Wildtyp MLS sowie ICL-Muteinen aus *S.cerevisiae* oder *A.gossypii* nach differentieller Zentrifugation** Die Zellanzucht von Referenz und *Sc* ICL+AKL erfolgte in SD Minimal + YNO + Uracil, die Kultur der beiden anderen Stämme in YP + YNO + Uracil. Die Western Blots zeigen die subzelluläre Verteilung von ICL und Malatsynthase 1 (MLS). Aufgetragen wurde je 1/4000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (jeweils PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): Referenz: 30, 2, 30 $\mu$ g; *Sc* ICL+AKL: 25, 1, 20 $\mu$ g; *Sc* ICLAg PTS: 30, 4, 45 $\mu$ g; *Sc* ΔICL + GB:Ag ICL: 40, 3, 60 $\mu$ g. Alle Molekulargewichtsstandards (kDa) sind rechts angegeben.

Ein weiterer interessanter Aspekt ergab sich aus der subzellulären Verteilung der Malatsynthase 1 (MLS). Dieses zweite Schlüsselenzym des Glyoxylatwegs sollte bei *S.cerevisiae* überwiegend peroxisomal lokalisiert sein. Im Vergleich zum über 80%igen Anteil der peroxisomalen Katalase A (analog zu Abb. 9, nicht gezeigt) enthielt die Organellfraktion aller Stämme gemäß Western Blots (**Abb. 13**) jedoch nur ca. 10% des MLS-Gesamtproteins.

Nach Kunze *et al.* (2002) war der peroxisomale MLS-Import abhängig vom PTS1-Signal SKL und der Kohlenstoffquelle. Dabei lag nur mit Ölsäure eine ausgeprägte MLS-Anreicherung im Organellpellet vor und Ethanolinduktion führte zu einer ausschließlich cytosolischen MLS. Im Gegensatz dazu zeigten die in dieser Doktorarbeit bestimmten MLS-Verteilungen der **Abb. 13**

trotz der Ölsäureinduktion eine überwiegend cytosolische Lokalisation. Die Bedingungen zum peroxisomalen Import schienen daher optimierbar zu sein.

### **3.1. Kohlenstoffquelle und Kulturmedium**

Zunächst wurde untersucht, ob die beschriebene Regulation der peroxisomalen Importeffizienz durch die Kohlenstoffquelle für die MLS und die ICL der Hefestämme dieser Arbeit zutraf. Effekte durch im YP-Vollmedium vorhandene C-Quellen wurden durch Parallelversuche mit SD Minimalmedium überprüft. Die Induktion der Hauptkulturen (anfangs 0,3% Glucose) erfolgte nach mindestens 6 Std. Wachstum durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Vol. des entsprechenden 10-fachen Induktionsmediums. 10x YN-Induktion enthielt neben Supplementen nur eine geringe Menge Hefeextrakt und diente daher als C-Quellen-arme Kontrolle. Als ICL- und ggf. Peroxisomen-induzierende Kohlenstoffquellen wurden Acetat (10x YNA), Ethanol (10x YNE) und Ölsäure (10x YNO) verwendet. Ethanol und Ölsäure wurden bei allen Stämmen zur Kultivierung eingesetzt, nur Supplemente und Acetat bei der Referenz und *Sc* ICL+AKL. Sowohl der Medienhintergrund als auch die C-Quelle wirkten sich etwas auf die spezifischen ICL-Aktivitäten im Homogenat (PNS) aus: Minimalmedium führte ungefähr zur Halbierung, Ethanol- oder Acetatzugabe maximal zur Verdopplung der ICL-Aktivität bzgl. YP + Ölsäure. Dennoch wurde die subzelluläre Verteilung der MLS und ICL nicht signifikant beeinflusst. Beide Enzyme waren bei allen untersuchten Medien überwiegend cytosolisch lokalisiert. Die von Kunze *et al.* (2002) beschriebene C-Quellenabhängigkeit des MLS-Imports konnte daher nicht bestätigt werden.

### **3.2. Stammhintergrund**

Die im Widerspruch zur Abb. 13 stehende, überwiegend peroxisomale MLS-Lokalisation (Kunze *et al.*, 2002) wurde mit Ölsäure-induzierten Zellen des Hefestamms BJ1991 ermittelt. Dieser Stamm wird von vielen Arbeitsgruppen für Peroxisomenpräparationen verwendet, da er sich durch eine verringerte Anzahl an intrazellulären Proteasen sowie eine sehr gute Ölsäureverwertung und Peroxisomeninduktion auszeichnet. Dennoch wurde in dieser Arbeit mit dem Hefestamm Y00000 gearbeitet, der die Vorteile der freien Verfügbarkeit der genomischen DNA-Sequenz sowie einer Deletionsmutantenbibliothek (EUROSCARF) bot.

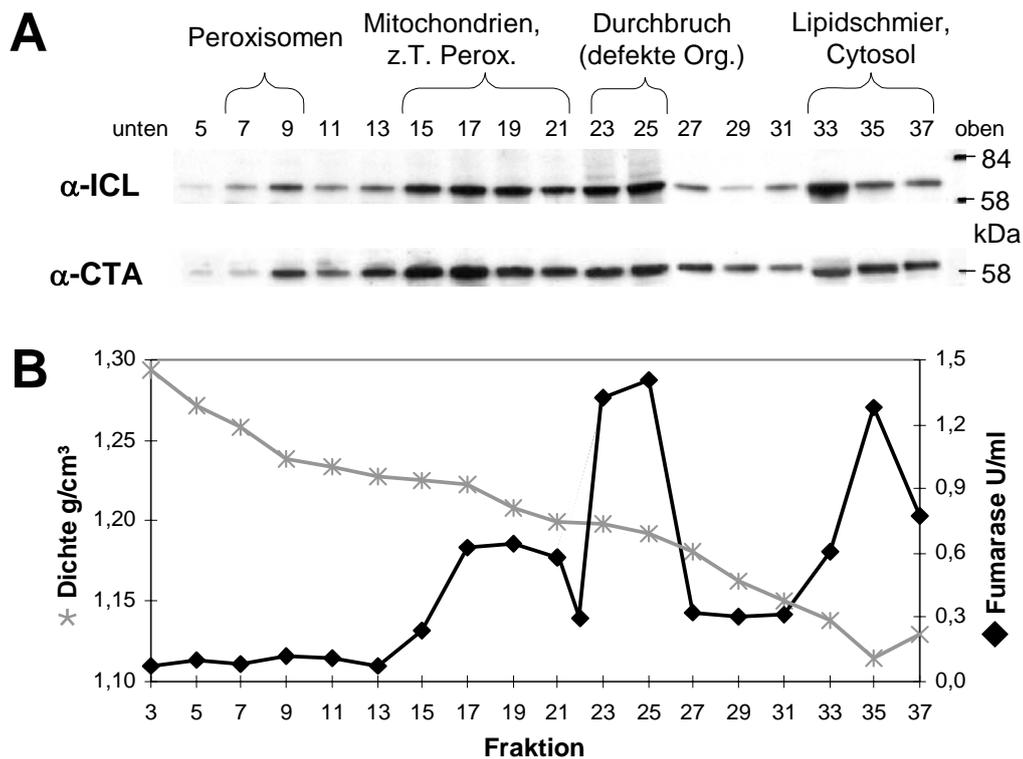
Es war daher denkbar, dass die unterschiedliche MLS-Verteilung auf dem unterschiedlichen Stammhintergrund basierte. Deshalb wurden zusätzlich zu den Y00000-Mutanten die Stämme BJ1991 und BJ MLS $\Delta$ SKL (chromosomale Deletion des PTS1-Tripeptids) sowie eine analog zu *Sc* ICL $\Delta$ gPTS konstruierte Mutante BJ ICL $\Delta$ gPTS untersucht. Gegenüber Y00000 wies die geerntete Biofeuchtmasse auf ein besseres Wachstum der BJ-Stämme während der Ölsäureinduktion hin. Allerdings waren die BJ Peroxisomen gemäß Katalase A-Verteilung fragiler. Die cytosolische MLS der MLS $\Delta$ SKL-Mutante wurde bestätigt. Die subzelluläre MLS-Verteilung der anderen BJ-Stämme entsprach aber nicht der Publikation, sondern zeigte nur eine geringe, nicht signifikante MLS-Importverbesserung im Vergleich zu Abb. 13. Dabei war die ICL bei BJ1991 und BJ MLS $\Delta$ SKL cytosolisch mit 1 - 2% des Gesamtproteins im Organellpellet. Demgegenüber enthielt die PTS1-Mutante BJ ICL $\Delta$ gPTS 5% der Gesamt-ICL in der Organellfraktion. Die Ergebnisse der BJ-Stämme stimmten daher mit denen der Y00000-Mutanten überein.

### **3.3. Einfluss eines zusätzlichen Signals**

Insgesamt zeigten weder die C-Quelle, noch die Kulturbedingungen (Variationen der Kultur- und Induktionsdauer, nicht gezeigt), noch der Stammhintergrund einen signifikanten Effekt auf die subzelluläre MLS- und ICL-Verteilung. Der Import peroxisomal-orientierter ICL-Varianten sowie nicht-modifizierter MLS war stets unvollständig. Allerdings wies der signifikant höhere Organellanteil der *Ag* ICL verglichen mit dem *Ag* PTS1-haltigen Hefehybrid auf ein zusätzliches peroxisomales Signal hin. Da die *Candida tropicalis*-ICL ein schwaches mitochondrielles *Target*-Signal (MTS) enthielt (Kamasawa *et al.*, 1996), könnte alternativ eine partielle Lokalisation in den Mitochondrien vorliegen. Die subzelluläre Verteilung der *Ag* ICL innerhalb der Organellfraktion wurde daher per Dichtegradient überprüft (**Abb. 14**).

Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Gradienten (siehe Abb. 10) entstand die kontinuierliche Schichtung erst während der Zentrifugation, die deshalb 15 statt 3 Std. dauerte. Nachteile dieses Verfahrens ergeben sich aus der osmotischen Wirkung der Saccharose. Bei langer Zentrifugation sowie paralleler Gradientenbildung und Probenauftrennung zerbrechen viele Organellen aufgrund der unphysiologischen Osmolarität der Gradientenlösung. Da die Trennung von Mitochondrien und Peroxisomen zum Teil auf der Erhöhung der Peroxisomendichte durch Saccharoseaufnahme beruht, Mitochondrien bei längerer Zentrifugationszeit aber ebenfalls Saccharose aufnehmen, verschlechtert sich die Trennleistung (Tolbert, 1974). Der Bereich schwerer Mitochondrien überlappt oft mit den Fraktionen leichter Peroxisomen, so dass die Signale peroxisomaler Markerenzyme "verschmieren". Die beschriebenen Effekte treten nach Antonenkov *et al.* (2004) auch bei Verwendung von Nycodenz (821Da) anstelle von Saccharose (342Da) auf und können nur durch kontinuierliche Gradienten mit geringer Zentrifugationsdauer vermindert werden (Tolbert, 1974). Diese Voraussetzungen waren in Jülich nicht gegeben.

Der Vergleich der Markerenzyme Katalase A und Fumarase in **Abb. 14** zeigte, dass der diskontinuierliche Gradient zur Bestimmung der peroxisomalen Lokalisation geeignet war. Allerdings war eine parallele Mitochondrienlokalisation nicht ausschließbar. So ergab die Verteilung des Peroxisomenmarkers Katalase A Anreicherungsspitzen in den Fraktionen 9 (Peroxisomen), 17 (Mischfraktion mit Mitochondrien), 25 (Durchbruch) und 33 (Cytosol) (**Abb. 14A**). Die *Ag* ICL zeigte dasselbe Muster. Diese deutliche Co-Lokalisation mit Katalase A ohne eine zusätzliche Signalverstärkung in Fraktion 19 (Mitochondrien-*Peak* der Fumarase, **Abb. 14B**) sprach für eine peroxisomale *Ag* ICL-Lokalisation ohne Mitochondrienanteil im Organellpellet. Der hohe parallele Anteil der *Ag* ICL im Cytosol führte zu einem stärkeren Signal in Fraktion 33 verglichen mit dem Peroxisomenmarker.



**Abb. 14: Subzelluläre Lokalisation von *Ashbya*-ICL in *Sc* ΔICL per Dichtegradient**

82% des mit etwas Überstand und Lipiden verunreinigten Organellpellets einer differentiellen Zentrifugation (Kultur in YP + YNO + Uracil) wurden per 35,5 - 77%(w/v) Saccharosegradient aufgetrennt. **A:** Western Blots zur Co-Lokalisation der ICL mit dem peroxisomalen Markerenzym Katalase A (CTA). Aufgetragen wurden je 0,75 Vol.-% der Gradientenfaktionen. **B:** Dichteverlauf (\*) gemäß Brechungsindex sowie Aktivität der mitochondrialen Fumarase (◆).

Das schwache Mitochondrien-*Target*-Signal der *Candida tropicalis*-ICL wurde erst wirksam nach der Deletion interner Sequenzbereiche mit peroxisomaler Signalfunktion. Parallel bildeten sich große ICL-Proteinaggregate im Cytosol (Kamasawa *et al.*, 1996). Auch vor diesem Hintergrund war es unwahrscheinlich, dass die gegenüber den *Sc* ICL PTS1-Muteinen erhöhte Anreicherung der *Ag* ICL in der Organellfraktion auf einer Parallellokalisierung in den Peroxisomen und den Mitochondrien beruhte. Die *Ag* ICL besaß damit vermutlich ein zusätzliches Signal außerhalb der PTS1-Region. Diese These wurde unterstützt durch die peroxisomale Lokalisation der ICLs von *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* (Gainey *et al.*, 1992), deren C-Termini keinerlei Ähnlichkeit mit einer PTS1-Region zeigten (Endwertungen per *PTS1-Predictor*: -26 bzw. -61). Zur Eingrenzung einer internen Region mit möglicher peroxisomaler Signalwirkung wurde deshalb ein Sequenzvergleich verschiedener ICLs durchgeführt.

#### 4. Strukturvergleiche verschiedener ICLs

Die SWISS-Prot Aminosäure-Sequenzen der Isocitrat-Lyasen von sechs Pilzen, zwei Pflanzen und zwei Bakterien wurden mittels MultAlign verglichen und Konservierungen mit Hilfe des Programms Boxshade hervorgehoben (**Abb. 15**). Spezies-übergreifend zeigte sich ein hoher Grad an Homologie, auch außerhalb der Regionen mit katalytischer Funktion. Die auffälligste Ausnahme bildete ein interner Bereich von etwa 100 Aminosäuren, der bei Prokaryoten fehlt. Bereits bei der Isolierung und Sequenzierung der *E.coli*-ICL (Matsuoka & McFadden, 1988) wurde vermutet, dass dieser Unterschied die peroxisomale bzw. glyoxysomale Lokalisation eukaryotischer ICLs bedingen könnte. Die Tatsache, dass einige Pilze und alle Pflanzen ein (potentielles) C-terminales PTS1-Signal besitzen, schloss die Bedeutung einer internen Region für den peroxisomalen Import nicht aus. So war die PTS1-Region der Raps-ICL (BRANA) zwar essentiell für den Import (Olsen *et al.*, 1993), Rizinus-ICL (RICCO) wurde aber trotz einer Deletion der 19 C-terminalen Aminosäuren in die Peroxisomen von Pflanzen und *S.cerevisiae* aufgenommen (Gao *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996). Obwohl die ICL-Sequenzen dieser beiden Pflanzen zu 85% identisch sind, zeigte sich eine signifikante Anhäufung von Unterschieden in der eukaryoten-spezifischen Region. Auch im Gesamtvergleich erschien dieser Bereich deutlich geringer konserviert, vor allem ca. 15 Aminosäuren vor bis 9 nach der markierten *S.cerevisiae* Phosphorylierungsstelle bei Position 343. Die ansonsten sehr häufigen Blöcke identischer Aminosäuren waren hier allenfalls durch kurze Abschnitte konservierter Austauschere ersetzt. Da mit *S.cerevisiae* (cytosolische ICL) und Raps (PTS1 essentiell) mindestens zwei der verglichenen acht eukaryotischen ICL-Sequenzen kein internes Peroxisomensignal enthielten, wurde ein solches Signal nicht in einer hochkonservierten Region vermutet. Stattdessen kam eine Übereinstimmung mit internen Signalbereichen anderer peroxisomaler Proteine in Betracht. So enthielten die PTS1-losen ICL-Sequenzen von *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa* im eukaryoten-spezifischen Bereich zwei partielle Aminosäure-Sequenz-Wiederholungen, die mit Ausnahme von *S.cerevisiae* auch bei anderen eukaryotischen ICLs vorkamen und große Ähnlichkeit zu Sequenzen der peroxisomalen Malatsynthase (MLS) zeigten (Gainey *et al.*, 1992). Auch für die *S.cerevisiae*-Katalase A wird ein zusätzliches peroxisomales *Target*-Signal vermutet, möglicherweise zwischen Position 126 und 140 (Kragler *et al.*, 1993). Ein Sequenzvergleich dieses Bereiches mit Pilz-ICLs führte trotz geringer Homologie zu einer Zuordnung am Ende der eukaryoten-spezifischen ICL-Region (nicht gezeigt).

EMENI 1 .....MSYIEEEDQRYWDEVAAVKNWVKDSRWRVYTKRPF~~TAEQIVAKRGNLK.IEYPSNVQAKKLV~~  
 NEUCR 1 MAANNMVPNPAVDPALEDELFAKEVEEVKKNWSDSRWRQTKRPF~~TAEQIVSKRGNLK.IEYASNAQAKKLV~~  
 YARLI 1 .....MSEQQRFNNEVEEIKKWWSSPRWKHTKRVVSPEDIA~~SRRGTIK.VPQASSQADKLF~~  
 CANTR 1 ....MAYTKIDINQEEADFQKEVAEIKKWWSEPRWRKTKRIY~~SAEDIAK KRGTLLK.IAYPSSQSDKLF~~  
 YEAST 1 .MPIPVGNTKNDFAALQAKLDADAAEIEKWWSDSRWS~~KTKRNYARDIAVRRGT~~FPPIEYPSVSMARKLF  
 ASHGO 1 .MSPSVRDARNDLASLQQQAAAAEAEDIRRWWSQPRWAG~~TKRVVYTAEDIVKRRGT~~FPVVEYPSVSMADKLV  
 RICCO 1 ..MAASFSGSPSMIMEEEGRFEAEVAEVQAWWNSERFKL~~TRRPYTARDVVALRGNLK.QSYASNELAKKLV~~  
 BRANA 1 ..MAASFSVSPSMIMEEEGRFEAEVAEVQTWSSERFKL~~TRRPYTARDVVALRHLK.QGYASNEMAKKLV~~  
 ECOLI 1 .....MKTRTQQIEELQKEW.TQPRWEGITRPPY~~SAEDVVKLRGSVNPECTLAQLGAAKMV~~  
 MYCTU 1 .....MSVVGTPKSAEQIQEWDNTNPRWKDVTRTY~~SAEDVVALQGSVVEEHTLARRCAEVLW~~

# ### #

EMENI 61 GILERNFNK.EASFTYGC~~LDPTMVTOMAKYLDIVVSWGQSSSTASSTDEPS~~PD~~LADYPMNTPVNKVNHL~~  
 NEUCR 70 KILED~~RFAKR~~DAS~~YTYGC~~LEPTMVTOMAKYLDIVVSWGQSSSTAS~~SSDEPG~~PD~~LADYPTV~~PNKVGHL  
 YARLI 57 KLLQE~~HDAEK~~SVSFT~~FGALDP~~VQVTOMAKYLDIVVSWGQSSSTAS~~TSNEPS~~PD~~LADYPM~~TPNKVEHL  
 CANTR 65 KLL~~EKHDAEK~~SVSFT~~FGALDP~~VIHVAQMAKYLDIVVSWGQSSSTAS~~TSNEPS~~PD~~LADYPM~~TPNKVEHL  
 YEAST 70 KVLE~~KHHNEG~~TVSKT~~FGALDP~~VQVTSQMAKYLDITTYT~~SWGQSSSTAS~~T~~SNEP~~GP~~DLADYPM~~TPNKVEHL  
 ASHGO 70 ET~~LARHSR~~NGTVSQT~~FGVLD~~VPVQMTOMV~~KYLDITTY~~SWGQSSATAS~~TSNEP~~GP~~DLADYPM~~TPNKVEHL  
 RICCO 68 RT~~LKTHQ~~ANGTAS~~RTFGALDP~~VQVTMMAKHLDIVVSWGQSSST~~HTTTNEP~~GP~~DLADY~~PD~~TPNKVEHL~~  
 BRANA 68 RT~~LKSHQ~~ANGTAS~~RTFGALDP~~VQVTMMAKHLDITTYVSWGQSS~~THTSTNEP~~GP~~DLADY~~PD~~TPNKVEHL~~  
 ECOLI 55 RL~~LHG~~ESKGYINSLGALTGGQALQOAKAGTEAVYL~~SWGQVAADAN~~LAASMPDQSLY~~PAN~~SVPAV~~VERI~~  
 MYCTU 58 EQ~~LHDL~~E...WVNALGALTGNMAVQVRAGLKA~~TYL~~SWGQVAGDANL~~SGHTY~~PDQSLY~~PAN~~SVPAV~~VERI~~

# #

EMENI 130 WMAQLF~~HDRKQ~~REERMT.TPKDQRHKVAN.VDYLRPII~~ADADTGHGGLTAVM~~KLTKLF~~VERGAAC~~HIED  
 NEUCR 140 FMAQLF~~HDRKQ~~RQERLS.VPKDQREKLAN.IDYLRPII~~VADADTGHGGLTAVM~~KLTKLF~~IEKGAAC~~HIED  
 YARLI 127 WFAQLF~~HDRKQ~~NEERLS.LPESERSKLPAPVDYLRPII~~ADADTGHGGLTAVV~~KLTKM~~FIERGAAC~~HIED  
 CANTR 135 WFAQLF~~HDRKQ~~REERLN.MTKEERANTPY.IDFLRPII~~ADADTGHGGITAI~~KLTKLF~~FIERGAAC~~HIED  
 YEAST 140 FKAQLF~~HDRKQ~~LEARSKAKSQEELDEMGAPIDYLRPII~~VADADAGHGGLTAVF~~KLTKM~~FIERGAAC~~HMED  
 ASHGO 140 FMAQLF~~HDRKQ~~REARLSCTTQRELDQLGPEIDYLRPII~~VADADTGHGGLTAVF~~KLTKM~~FIERGAAC~~HMED  
 RICCO 138 FFAQQY~~HDRKQ~~REARMS.MSREERARTPY.VDYLRPII~~ADGDTGFGGTTATV~~KLCKL~~FVERGAAC~~VHIED  
 BRANA 138 FFAQQY~~HDRKQ~~REARMS.MSREERAKTPF.VDYLRPII~~ADGDTGFGGTTATV~~KLCKL~~FVERGAAC~~VHIED  
 ECOLI 125 .....NNTFR~~ADQLQ~~WSAGIEPGDP~~RY~~.VDYFLPII~~VADAEAG~~FGGVLN~~AFELM~~KAMIEA~~GAAV~~H~~FED~~  
 MYCTU 125 .....NNALQ~~RADQL~~...AKIE.GDTSV.ENW~~LAP~~I~~VADGEAG~~FGGALN~~VYELQ~~KALIA~~AGVAC~~SH~~WED~~

# ### #

EMENI 198 QAPGT~~KKCGHM~~MAGKLVPISEHINRLVAIRAQADIMGTD~~LALARTD~~SE~~AATLI~~TSTID~~RDRH~~PFII~~IGST~~  
 NEUCR 208 QAPGT~~KKCGHM~~MAGKLVPIQEHINRLVAIRAQADIMGSD~~LALARTDAE~~AATLI~~TTTID~~PRDHAFI~~LIGCT~~  
 YARLI 196 QAPGT~~KKCGHM~~MAGKLVPIQEHINRLVAIRASADIFGSD~~LALARTD~~SE~~AATLI~~TSSID~~YRDH~~YFI~~AGAT~~  
 CANTR 203 QAPGT~~KKCGHM~~MAGKLVVPQEHINRLVAIRASADIFGSN~~LAVARTD~~SE~~AATLI~~TSTID~~RDRH~~YFI~~IGAT~~  
 YEAST 210 QTSTN~~KKCGHM~~AGRCV~~IPVQ~~EHVNRLVTIRMCADIMHSD~~LIVVARTD~~SE~~AATLI~~SSTID~~TRDH~~YFI~~VGAT~~  
 ASHGO 210 QSSSN~~KKCGHM~~AGRCV~~IPVQ~~EHSRLVTVRMCADVMHSN~~LVLVARTD~~SE~~AATLI~~SSNID~~ARDH~~YFI~~VGAS~~  
 RICCO 206 QSSVT~~KKCGHM~~MAGKLVVAISEHINRLVAARLQFDVMG~~VETLLVARTDAE~~AANLIQ~~SNVD~~TRDHQ~~FILGVT~~  
 BRANA 206 QSSVT~~KKCGHM~~MAGKLVVAISEHINRLVAARLQFDVMG~~TETLLVARTDAVA~~AATLIQ~~SNID~~SRDHQ~~FILGVT~~  
 ECOLI 188 QLASV~~KKCGHM~~GKVLVPTQEAIQKLVAARLAADV~~TGPVTLVARTDADA~~ADLI~~SDCD~~PYDSE~~FITG~~..  
 MYCTU 184 QLASE~~KKCGHL~~GKVLVPTQOHIRTLTSARLAADV~~VPTVVVARTDAE~~AATLI~~SDVDER~~DQPFITG..

EMENI 268 NPD~~I.Q~~.PLNDLMVMAEQAGKNGAELQAEI~~DEWLAKAGL~~KLFND~~AVDA~~ANN.S.PLPN~~KKAAI~~E~~KYL~~TQ  
 NEUCR 278 NPD~~L.E~~.PLADLMMKAEAE~~GKTGAQLQAEI~~EDDWLAKADL~~KRFDEAVL~~DVIAK.G.KFS~~NAKDLA~~A~~AKY~~QAA  
 YARLI 266 NKDA.G.HLVDVMVAEELE~~GKQGAALQAVE~~DEWNRKAGV~~KLFHEAF~~AD~~VNA~~.G.SYS~~NKAE~~LI~~A~~E~~EN~~KK  
 CANTR 273 NPES.G.DLAALMAEAEAKGIY~~GDE~~LARIETEW~~TKKAGL~~KLFHEA~~VIDE~~IKA.G.NYS~~NKEAL~~I~~KKFT~~DK  
 YEAST 280 NPNI.E.PFAEVLNDAIMSGASGQ~~ELADIEQ~~KWCRDAGL~~KLFHEA~~VIDEIER.S.ALS~~NKQEL~~I~~KKFT~~SK  
 ASHGO 280 NPEV.TVPLIEVL~~DAAQQAGASG~~DRLAQLEEDW~~CCKAKL~~R~~LRFHEA~~FAD~~VNA~~.SPS~~IKDKAG~~VI~~AKFNS~~Q  
 RICCO 276 NP~~NLRGK~~SLATLLATGMANG~~KTGAELQ~~ATEDN~~WLAMAQL~~KTFPE~~CVMDA~~IK~~NMNAGE~~DEK~~RRRM~~N~~EWMNH~~  
 BRANA 276 NP~~SLRGK~~SLSSLLAEGMA~~VGNNGPALQAEI~~DQWLLSARL~~MTFS~~DAV~~VEAL~~K~~RMNL~~SE~~NEK~~SRRV~~N~~E~~WL~~NH  
 ECOLI 256 .....  
 MYCTU 252 .....

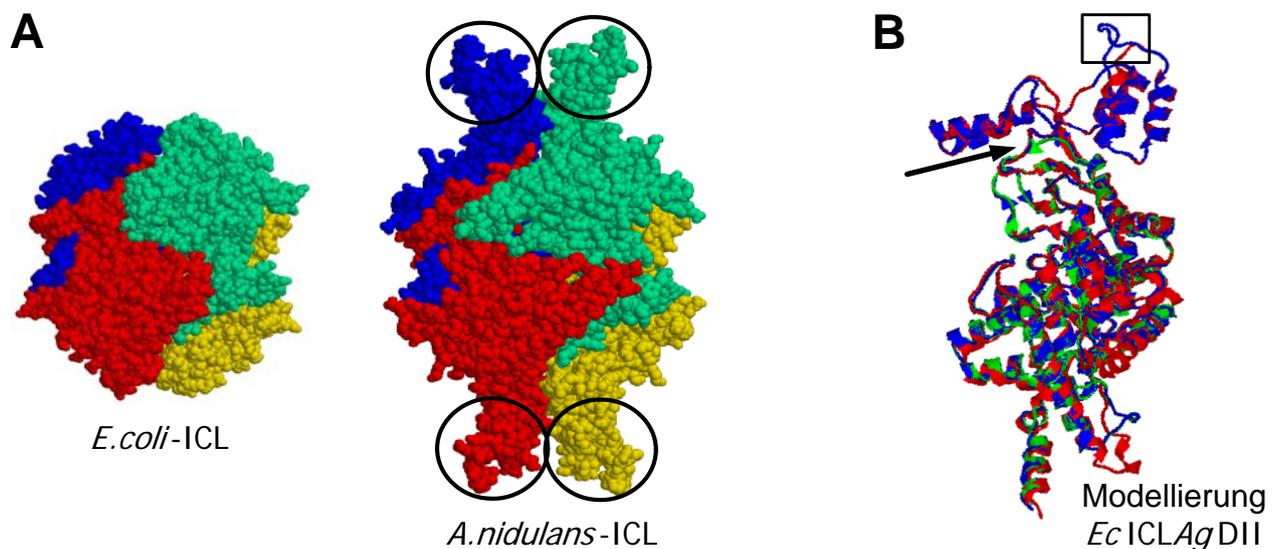
- Fortsetzung -

EMENI	334	SKG.K..SNLEARAI	AKETIAGTDIYFDWE	APRTREGYYRYQGGTQCAI	NRVAVYAPFADLIWME	SKLPDY	# #	
NEUCR	344	VKG.KQISNREARAI	ARQLLGQEIFFDWE	SPRTREGYYRLKGGCDCS	INRAISYAPYCDAIWME	SKLPDY		
YARLI	332	VTPLSNTPALEARALA	ARLLGKDIYFNWEAARV	REGYYRYQGGTQCAVNR	GIAYAPYADLIWME	SKLPDY		
CANTR	339	VNPLSHTSHKEAKKLA	KELTGKDIYFNWDVARA	REGYYRYQGGTQCAVMR	GRAFAPYADLIWME	SALPDY		
YEAST	346	VGPLTETSHREAKKLA	KEILGHEIFFDWELPRV	REGLYRYRGGTQCSIMR	ARAFAPYADLVWME	SNYPDF		
ASHGO	348	IGPQTGASIREMRKLG	RELLGQDVYFDWDLPR	AREGLYRYKGGTQCAIMR	ARAFAPYADLVWFE	SNFPDF		
RICCO	346	TSYDKCLSYEQGREI	ADRMGLKNLFDWDLPR	TREGFYRFKGSVMAAVR	GRAFAPHADLIWME	TAKPDF		
BRANA	346	ARYENCLSNEQGRELA	AKLGVTDLFDWDLPR	TREGFYRFQGSVTAAVR	GWAFQIADLIWME	TASPDL		
ECOLI	256	.....	ERTSEGF	FRTHAGIEQAISRGLA	YAPYADLVWCET	STPDL		
MYCTU	252	.....	ERTREGFYR	TKNGIEPCITARAKA	YAPFADLIWME	TGTPDL		
			# # #		# #			
EMENI	401	KQAKEFADGVHAVWPEQK	LAYNLSPSFNWKKAMP	RDEQ.ETYIKRLGALGYA	WQFITLACLHTTALIS	SDT		
NEUCR	413	AQAEFFAKGVHAVWPEQK	LAYNLSPSFNWKTAMGR	DDQ.ETYIRRLAKLGYC	WQFITLACLHTTALIS	SDQ		
YARLI	402	AQAKEFAEGVKNAPPHQ	WLAYNLSPSFNWTTAMP	SEDQ.ETYISRLAKLGY	WQFITLACLHTNALIS	SDK		
CANTR	409	NQAKEFADGVKAAVDPD	QWLAYNLSPSFNWPKAMP	ADEQ.ETYIKRLGQLG	YVWQFITLACLHTTAL	AVDD		
YEAST	416	QQAKEFAEGVKEKFPDQ	WLAYNLSPSFNWPKAM	SVDEQ.HTFIQRLGDL	GYVWQFITLACLHTN	ALAVHN		
ASHGO	418	QQAKEFAQGVREKFPN	KWMAYNLSPSFNWPKAMP	PKEQ.ENYIQRLGEI	GYVWQFITLACLHTN	ALIDN		
RICCO	416	AECTAFAEGVKSMHPEI	MLAYNLSPSFNWDASGM	TDEQMRDFIPRIARL	GCWQFITLACGFHAD	ALVIDT		
BRANA	416	NECTQFAEGVKSKTPEV	MLAYNLSPSFNWDASGM	TDQMMEFIPRIARL	GCWQFITLACGFHAD	ALVVD		
ECOLI	296	ELARRFAQAIHAKYPG	KLLAYNCSPSFNWQKN	LD.DKTIASFQQQLSD	MGYKQFITLAGIHS	MWFNMF		
MYCTU	292	EAARQFSEAVKAEYDP	QMLAYNCSPSFNWKK	HLD.DATIAKFQKEL	AMGKQFITLAGFHAL	NYSMFD		
EMENI	470	FAKAYAK.QGMRAYGELV	QEPPEM...ANGVDVV	THQKWSGANYVDNML	KMITGGVSSTAAMGK	GVTE	QF	
NEUCR	482	FAKAYSK.IGMRAYGELV	QEPPEI...DNGVDVV	KHOKWSGATYVDEL	QKMTGGVSSTAAMGK	GVTE	QF	
YARLI	471	FAKAYSE.RGMKAYGGEI	QQPEI...DQCEVV	KHOKWSGAEYIDGIL	RMVTGGITSTAAMG	AGVTE	QF	
CANTR	478	FANQYSQ.IGMRAYGQT	VQQPEI...EKCEVV	KHOKWSGANYIDGL	LRMVS GGVI	STAAMG	AGVTE	QF
YEAST	485	FSRDFAK.DGMKAYAQN	VQQREM...DDGVDV	LKHOKWSGAEYIDGL	LKLAQGGVS	SATAAMG	AGVTE	QF
ASHGO	487	FSRDFSR.FGMRAYAQ	GIQQREM...DEGVDV	LKHOKWAGA EYVDS	ILKLAQGGVS	SSTASMG	AGVTE	EQF
RICCO	486	FAKDYAR.RGMLAYVERI	QREER...KNCVDT	LAKHOKWSGANYID	RYLKTVQGGIS	SSTAAMG	AGVTE	EQF
BRANA	486	FAKDYAR.RGMLAYVERI	QREER...SNCVDT	LAKHOKWSGANYID	RYLKTVQGGIS	SSTAAMG	AGVTE	EQF
ECOLI	365	LANAYAQQEGMKHYV	EKVQQPEFAAAKDCY	TFVSHQQEVGTGY	FDKVTIIQGGT	SSVTAL	TGST	EQF
MYCTU	361	LAYGYAQNQ.MSAYVE	.LQEREFAAEERCY	TATKHQREVGAGY	FDRIATTVDPN	.SSTAL	TGST	EQF
EMENI	536	.KS.....						
NEUCR	548	.H.....						
YARLI	537	.K <b>SKL</b> .....						
CANTR	544	.KETK <b>AKV</b> .....						
YEAST	551	.KENGVKK.....						
ASHGO	553	GS SNG <b>AKL</b> .....						
RICCO	552	.KETWTRPGAMEMGS	SAGSEVVAK <b>ARM</b>					
BRANA	552	.KETWTRPGAAGMGE	TSLTVVAK <b>SRM</b>					
ECOLI	435	.....						
MYCTU	428	H.....						

**Abb. 15: Vergleich abgeleiteter Isocitrat-Lyase-Sequenzen aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien** Dargestellt sind die SWISS-Prot Sequenzen von sechs Pilzen (EMENI: *Aspergillus nidulans*, NEUCR: *Neurospora crassa*, YARLI: *Yarrowia lipolytica*, CANTR: *Candida tropicalis*, YEAST: *S.cerevisiae*, ASHGO: *A.gossypii*), zwei Pflanzen (RICCO: Rizinus, BRANA: Raps) und zwei Bakterien (ECOLI: *E.coli*, MYCTU: *Mycobacterium tuberculosis*). Mit Hilfe der Programme MultAlign und Boxshade wurden Bereiche mit 80% Identität schwarz unterlegt, konservierte Austausche grau (Blossom62: Henikoff & Henikoff, 1992). Auffällig ist die bei Prokaryoten fehlende Region der Strukturdomäne II (gelb). # kennzeichnet Positionen der Wechselwirkung mit Mg<sup>2+</sup>, Succinat und Glyoxylat (Grimm *et al.*, 2003). Rot unterlegt sind das zur Oligomerisierung notwendige Histidin sowie die ICL-Signatur (KKCGHM). Am C-Terminus sind PTS1-Tripeptide rot hervorgehoben. Boxen markieren Phosphorylierungsstellen in *S.cerevisiae* zur irreversiblen (gestrichelt) oder reversiblen Inaktivierung (geschlossen).

Zusätzlich zu den Hinweisen aus den Aminosäure-Sequenzen deutete auch ein Vergleich der ICL-Tertiärstrukturen von *E.coli* und *Aspergillus nidulans* (Britton *et al.*, 2000 & 2001) eine Funktion der bei Prokaryoten fehlenden Sequenz als PTS an. Die in **Abb. 16A** dargestellten Kalottenmodelle der tetrameren ICLs zeigen eine eingekreiste "Köpfchendomäne" jeder Untereinheit, die nur beim eukaryotischen Enzym vorkommt und aus der ansonsten kugeligen Gesamtstruktur herausragt. Diese Strukturdomäne II entsprach den ca. 100 eukaryoten-spezifischen Aminosäuren (Britton *et al.*, 2001). Die Strukturaufklärung konnte zwar keine Signalregionen liefern, aber eine wichtige Voraussetzung absichern: Ein peroxisomales Signal sollte frei zugänglich sein. Die Lage der PTS1-Region im ICL-Tetramer blieb bisher unbekannt, da die Proteinkristalle in diesem Bereich zu instabil waren. Allerdings sprach die hohe Flexibilität für eine gute Zugänglichkeit des C-Terminus. Ob die Region im endogenen Kontext der peroxisomalen *Ashbya*-ICL tatsächlich Signalcharakter besaß, sollte anhand von C-terminal veränderten *Ag* ICLs untersucht werden.

Darüber hinaus kam die Strukturdomäne II als mögliches internes PTS der *Ag* ICL in Frage. Zur Überprüfung war ein *E.coli*-ICL Mutein mit einer Insertion der *Ag* ICL Strukturdomäne II denkbar. Die **Abb. 16B** veranschaulicht anhand einer SWISS-Model Computer-Modellierung, wie ein Monomer eines solchen *Ec* ICL $Ag$ DII Hybrids aussehen könnte. Die Modellierung zeigt die Anpassung an die publizierten ICL-Strukturen von *E.coli* und *A.nidulans*. Im oberen Viertel des Monomers befindet sich die Strukturdomäne II aus fünf Helices, die bei der *E.coli*-ICL durch ein durchgehendes  $\beta$ -Faltblatt überbrückt wird.



**Abb. 16: Strukturabbildungen verschiedener ICLs**

**A:** Kalottenmodelle der ICL-Tetramere von *E.coli* und *A.nidulans* mit Hervorhebung der Monomere sowie der eukaryoten-spezifischen Domäne II (Kreise). Koordinaten gemäß *Protein Data Bank* (PDB) 1IGW und 1DQU. **B:** SWISS-Model Modellierung eines Monomers des Hybrids *Ec* ICL $Ag$ DII (blau) als Überlagerung der definierten Strukturen der *Ec* ICL (grün) und der *A.nidulans*-ICL (rot). Das theoretische Modell entspricht der Energieoptimierung, aber nicht zwangsläufig der tatsächlichen Proteinfaltung. Dargestellt ist das grüne Monomer aus A, ca. 110° im Uhrzeigersinn rotiert um die y-Achse. Anstelle der helixreichen Domäne II besitzt die *Ec* ICL ein  $\beta$ -Faltblatt (Pfeil). Der Kasten markiert einen mutmaßlichen strukturellen Unterschied im Bereich zwischen den definierten Sekundärstrukturelementen der Domäne II. Alle Bilder wurden erstellt mit dem Programm RASMOL.

Die Strukturmodellierung kann nur theoretische Modelle liefern, die zudem zum Erkennen einzelner Strukturunterschiede zu komplex sind. Aus diesem Grund wurde ein strukturbasierter Sequenzvergleich aus SWISS-Model Modellierungen zusammengestellt (**Abb. 17**). Die Sekundärstrukturvorhersagen berücksichtigten die Koordinatensätze von *Ec* ICL (*Protein Data Bank*: 1IGW), *A.nidulans* -ICL (1DQU) und *Mycobacterium tuberculosis* -ICL (1F8M, nicht gezeigt).

Die meisten katalytisch aktiven Aminosäuren befanden sich innerhalb des „TIM-Barrels“, einer  $\beta$ -Faltblattanordnung, die für die Proteinsuperfamilie der Triosephosphat-Isomerasen typisch ist. Unter Berücksichtigung der ausgewählten Freiheitsgrade des Modellierungsprogramms war neben den  $\beta$ -Faltblättern auch die Anordnung der  $\alpha$ -Helices konserviert. Die Modellierung der Sekundärstrukturelemente mit einem anderen Computerprogramm lieferte ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt). Bei allen drei modellierten Sequenzen der **Abb. 17** wies der bei Prokaryoten fehlende Bereich der Strukturdomäne II fünf konservierte Helices auf und war eingerahmt durch kurze  $\beta$ -Faltblätter. Die freie Zugänglichkeit der Strukturregion konnte damit nicht garantiert werden, war aber aufgrund der Homologie zur *A.nidulans*-ICL wahrscheinlich. Mit der bei Modellierungen angebrachten Vorsicht enthielten daher sowohl die *Ag* ICL (peroxisomal) als auch die *Sc* ICL (cytosolisch) und das *Ec* ICL*Ag* DII-Hybrid die exponierte „Köpfchenregion“.

Das Vorkommen und die mutmaßliche Konservierung der Sekundärstrukturelemente der Domäne II sogar bei der cytosolischen *Sc* ICL wiesen darauf hin, dass die vermutete Signalfunktion auf einzelnen Sequenzabschnitten oder gar einzelnen Aminosäuren basierte. So verdeutlichte die Strukturmodellierung in **Abb. 16B** am Beispiel des markierten Ausschnitts der Domäne II, dass schon kurze Bereiche zwischen den definierten Sekundärstrukturelementen eine unterschiedliche Faltung aufweisen können. Die Unterschiede solcher Zwischenbereiche der Sekundärstrukturvorhersagen der *Ag* ICL und der *Sc* ICL wurden nicht untersucht. Hinsichtlich der Aminosäure-Sequenz bestand neben dem bereits erwähnten, auffällig geringer konservierten Bereich um die *S.cerevisiae* Phosphorylierungsstelle bei Position 343 ein Unterschied bei einer konservierten Aminosäure: an Position 286 enthielt nur die *S.cerevisiae* Sequenz ein Phenylalanin anstelle von Leucin (vgl. Abb. 15).

Vor einer weiteren Eingrenzung der möglicherweise relevanten Bereiche oder Aminosäuren der Strukturdomäne II musste zunächst die Signalwirkung dieser Region untersucht werden. Dazu wurden C-terminal modifizierte *Ag* ICLs sowie das Hybridmolekül *Ec* ICL*Ag* DII konstruiert.

EMENI	1	.....MSYIEEEDQRYWDEVAAVKNWVKDSRWRYTKRPFTAEOIVAKRGNLK.IEYPSNVQAKKLW
YEAST	1	MPIPVGNTKNDFAALQAKLDADAEEIEKWWSDSRWSKTKRNYSDARDIAVRRTGTFPPIEYPSVSMARKLF
ASHGO	1	MSPSVRDARNDLASELQQQAAAEAEDIRRWWSQPRWAGTKRVYTAEDIVKRRTGTFPVVEYPSVSMADKLV
EcAgDII	1	.....MKT <u>RTQQIEELQKEW</u> TQPRWEGITRPYS <u>AEDVVKLR</u> RGSVNPECT <u>TLAQLGAAKMW</u>
ECOLI	1	.....MKT <u>RTQQIEELQKEW</u> TQPRWEGITRPYS <u>AEDVVKLR</u> GSVNPECT <u>TLAQLGAAKMW</u>
		# ### #
EMENI	61	GILERNFNK.EASFTYGCLEPTMVTQMAKYLDTVYVSGWQSSSTASSTDEPSPLADYPMNTVPNKVNH
YEAST	70	KVLEKHHNEGTVSKTFGALDPVQISQMAKYLDTIYISGWQSSSTASTSNEPGPDLADYPMNTVPNKVEHL
ASHGO	70	ETLARHSRNGTVSQTFGVLDPVQMTQMVKYLDTIYVSGWQCSATASTSNEPGPDLADYPMNTVPNKVEHL
EcAgDII	55	RL LHGESKKGYNLSLGALTGGQALQQAKAGIEAVYLSGWQVAADANLAASMPDQSLYPANSVPAVVERI
ECOLI	55	RL LHGESKKGYNLSLGALTGGQALQQAKAGIEAVYLSGWQVAADANLAASMPDQSLYPANSVPAVVERI
		# #
EMENI	130	WMAQLFHDRKQREERM..TTPKDQRHKVANVDYLRLPIADADTGHGGLTAVMKLTKLFFVERGAAGIHIED
YEAST	140	FKAQLFHDRKQLEARSKAKSQEELDEMGAPIDYLTPIVADADAGHGGLTAVFKLTKMFIERGAAGIHMED
ASHGO	140	FMAQLFHDRKQREARLSCTTQRELDQLGPEIDYLRPIVADADTGHGGLTAVFKLTKMFIERGAAGIHMED
EcAgDII	125	NNTFRRADQIQWSAGIEPGDPR.....YVDYFLPIVADAEAGFGGVLNLFELMKAMIEAGAAVHFED
ECOLI	125	NNTFRRADQIQWSAGIEPGDPR.....YVDYFLPIVADAEAGFGGVLNLFELMKAMIEAGAAVHFED
		# ### #
EMENI	198	QAPGTTKCGHMAGKVLVPISEHINRLVATRAQADIMGTDLLAIARTDSEATLITSTIDHRDHPFIIGST
YEAST	210	QTSTNKKCGHMAGRCVIPVQEHVNRLVTIRMCADIMHSDLIVVARTDSEATLISSTIDTRDHYFIVGAT
ASHGO	210	QSSSNKKCGHMAGRCVIPVQEHISRLVTVRMCADVMHSNLVLVARTDSEATLLSSNIDARDHYIIVGAS
EcAgDII	188	QLASVKKCGHMGGKVLVPTQEAIQKLVAARLAADVTVGPTLLVARTDADAADLITSDCDPRDHYIIVGAS
ECOLI	188	QLASVKKCGHMGGKVLVPTQEAIQKLVAARLAADVTVGPTLLVARTDADAADLITSDCDPYDSEFITGE.
		# #
EMENI	268	NPDIQ.PLNDLMVMAEQAGKNGAELQAI EDEWLAKAGLKLFNDAVVDAIINNSP.LPNKKAATIEKYLTQ..
YEAST	280	NPNIE.PFAEVLNDAIMSGASGQELADIEQKWCRDAGLKLFEHAVIDEIERS.ALSNKOELIKKFTSKVG
ASHGO	280	NPEVTVPLIEVLDAQQAGASGDRLAQLEEDWCKKAKLRLFEAFADQVNASPSIKDKAGVIKFNSSQIG
EcAgDII	258	NPEVTVPLIEVLDAQQAGASGDRLAQLEEDWCKKAKLRLFEAFADQVNASPSIKDKAGVIKFNSSQIG
ECOLI	257	.....
		# #
EMENI	334	.SKGKS <u>NLEARIAKEIA</u> GTDIYFDWEAPRTREGYRYRQGGTQCAINRAVAYAPFADLIWMEKLPDYKQ
YEAST	348	PLTETSHREAKKLAKELIGHEIFFDWELPRVREGLYRYRGGTQCSIMRARAFAPYADLVWMESNYPDFQQ
ASHGO	350	PQTGASIREMRKLGRELLGQDVYFDWDLPRAREGLYRYKGGTQCAIMRARAFAPYADLVWFESNFPDFQQ
EcAgDII	328	PQTGASIREMRKLGRELLGQDVYFDWDLPRASEGFFRTHAGIEQAI SRGLAYAPYADLVWCETSTPDLEL
ECOLI	257	.....RTSEGFFRTHAGIEQAI SRGLAYAPYADLVWCETSTPDLEL
		# # # #
EMENI	403	AKEFADGVHAWPEQKLAYNLSPSFNWKKAMPDEQETTYIKRGLGALGYAWQFITLAGLHTTALISDTFAK
YEAST	418	AKEFAEGVKEKFPDQWLAYNLSPSFNWPKAMSVDEQHTFIQRLGDLGYIWQFITLAGLHTNALAVHNF SR
ASHGO	420	AKEFAQGVREKFPNKWMAYNLSPSFNWPKAMPKEQENYIQRLGEI GYVWQFITLAGLHTNALAIDNFSR
EcAgDII	398	ARRFAQAIHAKYPGKLLAYNCSPSFNWQKNLDDKTIASFQQQLSDMGYKQFITLAGIHSMWFMNFDLAN
ECOLI	298	ARRFAQAIHAKYPGKLLAYNCSPSFNWQKNLDDKTIASFQQQLSDMGYKQFITLAGIHSMWFMNFDLAN
		# # # #
EMENI	473	AYAK.QGMRAYGELVQEPEMA...NGVDVVTHQKWSGANVVDNMLKMITGGVSSSTAAMGKGVTEDEQFKS.
YEAST	488	DFAK.DGMKAYAQNQQREMD...DGVVDLKHQKWSGAEYIDGLLKLQGGVSATAAMGTGVTEDEQFK.E
ASHGO	490	EF SR.FGMRAYAQGIQQREMD...EGVDVLKHQKWSGAEYVDSILKLQGGVSSSTASMGGKGVTEEQFGSS
EcAgDII	468	AYAQQEGMKHYVEKVOQPEFAAAKDGYTFVSHQQEVEGTGYFDKVTIIIQGGTSSVTALTGSTEEESQF...
ECOLI	368	AYAQQEGMKHYVEKVOQPEFAAAKDGYTFVSHQQEVEGTGYFDKVTIIIQGGTSSVTALTGSTEEESQF...
		# # # #
EMENI	538	.....
YEAST	553	NGVKK
ASHGO	556	NGAKL
EcAgDII	535	.....
ECOLI	435	.....

Abb. 17: Strukturbasierter Vergleich abgeleiteter ICL-Sequenzen gemäß SWISS-Model Vorhersagen Basis (Fettdruck) der ICL-Modellierung von *S.cerevisiae* (YEAST) und *A.gossypii* (ASHGO) sowie eines *E.coli*-*Ashbya* Domäne II-Hybrids (EcAgDII) waren die Kristallstrukturen von *A.nidulans* (EMENI), *E.coli* (ECOLI) und *Mycobacterium tuberculosis* (nicht gezeigt). Die bei Prokaryoten fehlende Strukturdomäne II ist gelb markiert, Aminosäuren mit katalytischer Funktion per #. Farbige unterlegte Sekundärstrukturelemente entsprechen  $\alpha$ -Helices (rot) oder  $\beta$ -Faltblättern (hellblau). Bereiche, in denen die Kristallanordnungen zu instabil waren für Strukturzuordnungen, sind unterstrichen.

## 5. Peroxisomaler Import heterologer und modifizierter Isocitrat- Lyasen in *S.cerevisiae*

### 5.1. Plasmidkonstruktionen zur Untersuchung weiterer ICL-Varianten

Das bisher verwendete Genbankplasmid GB: *Ag* ICL enthielt neben dem *AgICL1* Gen (ADL066C) mit dem Gen-eigenen Promotor zusätzlich die Sequenzen einer t-RNA sowie zweier nicht charakterisierter offener Leserahmen (ORF). Einer davon war synthenisch homolog zu einem Transkriptionsregulator. Restriktionsanalysen ergaben, dass insgesamt der Bereich zwischen den jeweils vorderen Dritteln der ORFs ADL067C und ADL063W auf Chromosom IV abgedeckt wurde. Nebeneffekte dieser flankierenden Sequenzen sollten durch eine Subklonierung von *AgICL1* in den Shuttlevektor pAG100 vermieden werden. Dazu wurde ein per PCR erzeugtes Amplifikat der codierenden Region mit 350bp Promotorsequenz in die *Bam*HI -Schnittstelle von pAG100 eingefügt (Stahmann, 2004). Das resultierende Plasmid p*Ag* ICL+39 codierte für ein ICL-Mutein mit 39 zusätzlichen Aminosäuren aus der Vektorsequenz. Diese Verlängerung entstand, weil die eingeführte *Bam*HI -Schnittstelle genau auf dem Stopcodon von *AgICL1* lag. Die abgeleitete Proteinsequenz endete auf -SGS und ähnelte damit keinem bekannten PTS1-Signal.

Für das Plasmid p*Ag* ICL mit Wildtyp *Ashbya* -ICL wurde das zerstörte Stopcodon durch gerichtete Mutagenese wiederhergestellt (siehe Anhang, Abb. 31A). Dabei erwies sich die *Nco*I -*Sal*I -Zwischenklonierung in den Vektor pGEM als notwendig für eine ausreichende Mutagenese-effizienz. Das Zwischenkonstrukt pGEM-*Ag* ICL+39 (6,35kb) diente nicht nur der Konstruktion von pGEM-*Ag* ICL sondern auch zur Erzeugung einer *Ashbya* -ICL ohne PTS1-Signal, deren C-Terminus an die PTS1-lose *Aspergillus nidulans* -ICL angeglichen wurde (siehe Anhang, Abb. 31B). Die dafür durch gerichtete Mutagenese ausgetauschten 4bp ersetzten das Codon für Glycin553, achtletzte Aminosäure der *Ag* ICL, durch ein Lysincodon und führten anstelle der sechstletzten Aminosäure Serin ein Stopcodon ein. Das ICL-Mutein *Ag* ICL8K-6 endete daher auf -FKS und enthielt kein PTS1-Signal. Die Umklonierung der *Nco*I -*Sal*I -Fragmente aus pGEM-*Ag* ICL und pGEM-*Ag* ICL8K-6 in pAGK100 (= pAG100 ohne Kan<sup>R</sup>) ermöglichte die Replikation und Selektion der resultierenden Plasmide in *S.cerevisiae*.

Die Plasmidkonstruktionen zur Expression der *E.coli* -ICL in *S.cerevisiae* basierten auf einem pUC18-Derivat mit der codierenden Sequenz von *E.coli aceA* (Gerharz, 2004). Die *Bam*HI -*Hind*III -Umklonierung in den Hefe-Shuttlevektor YEp352 führte zu Plasmid p-P *Ec* ICL ohne Promotorsequenz. Ausgehend von chromosomaler Hefe-DNA (Y00000) wurden 390bp des *ScICL1*-Promotors per *Pwo*-PCR amplifiziert und nach 3' *Bam*HI -Restriktion gerichtet über *Sma*I (blunt) und *Bam*HI in p-P *Ec* ICL kloniert. Das resultierende Plasmid p*Ec* ICL enthielt die unveränderte *aceA* -Sequenz in *Frame* nach dem *ScICL1* -Promotor.

Zur Prüfung der vermuteten peroxisomalen Signalfunktion der Strukturdomäne II sollte die entsprechende *Ag* ICL Aminosäure-Sequenz passend in die *Ec* ICL eingefügt werden. Ein Austausch der Domäne II-Region von *Ag* ICL und *Sc* ICL erschien ebenfalls sinnvoll, da die *Sc* ICL cytosolisch ist und demnach kein Signal enthalten sollte. Anhand von Restriktionskarten wurde unter Berücksichtigung des degenerierten Aminosäure-Codes eine Klonierungsstrategie entwickelt. Dabei wurde der Austausch der Domäne II-Sequenzen von *E.coli*, *A.gossypii* und *S.cerevisiae* ohne eine Verschiebung der Leserahmen geplant. Für die gerichtete Umklonierung sollten zwei neue Restriktionsschnittstellen eingeführt werden, möglichst ohne eine Veränderung der Aminosäure-Sequenz. Außerdem sollten die verwendeten Plasmide keine oder kaum Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsenzyme enthalten. Die Schnitt-

stellen für *XhoI* neun Positionen vor der Domäne II-Sequenz und für *BbrPI* eine Position nach der Region erfüllten die Voraussetzungen. Bei den Sequenzen der *Ag* ICL und der *Sc* ICL war die theoretische Einführung beider Schnittstellen in Form stiller Mutationen möglich. Dennoch wurde trotz mehrerer Versuche mit verschiedenen Primerkombinationen kein *Sc* ICL-Plasmid mit *XhoI*-Site erhalten. Bei der *Ec* ICL führte die neue *XhoI*-Site zum Austausch von Tyrosin<sup>249</sup> gegen das bei anderen Organismen hochkonservierte Arginin (vgl. Abb. 15). Im Rahmen der *BbrPI*-Site wurde Glutaminsäure<sup>256</sup> durch das bei vielen Eukaryoten vorkommende Prolin ersetzt und Threonin<sup>258</sup> durch Alanin. Die Insertion des *AgICL1 XhoI-BbrPI*-Fragmentes in die Sequenz der *Ec* ICL verursachte den Austausch von vier weiteren Aminosäure-Codons kurz vor der Strukturdomäne II. Da aber insgesamt nur eine Annäherung der *E.coli*-Sequenz an die *Ag* ICL-Sequenz stattfand, sollten sich die Austausche nicht negativ auf die Funktion der Domäne II auswirken.

Die Abb. 32 im Anhang fasst die Schritte der Plasmidkonstruktion für das Hybridprotein *Ec* ICL*Ag* DII zusammen. Die neuen Schnittstellen für *XhoI* und *BbrPI* wurden nacheinander durch gerichtete Mutagenese in die DNA-Sequenzen der *Ec* ICL und der *Ag* ICL8K-6 eingeführt. Das Shuttleplasmid p*Ec* ICL war dabei mit 6,8kb gerade noch ohne Zwischenklonierung modifizierbar. Nach der *XhoI*-*BbrPI*-Restriktion von p*Ag* ICL DII (Insert) und p*Ec* ICL (Vektor) führte die Ligation zu Plasmid p*Ec* ICL*Ag* DII.

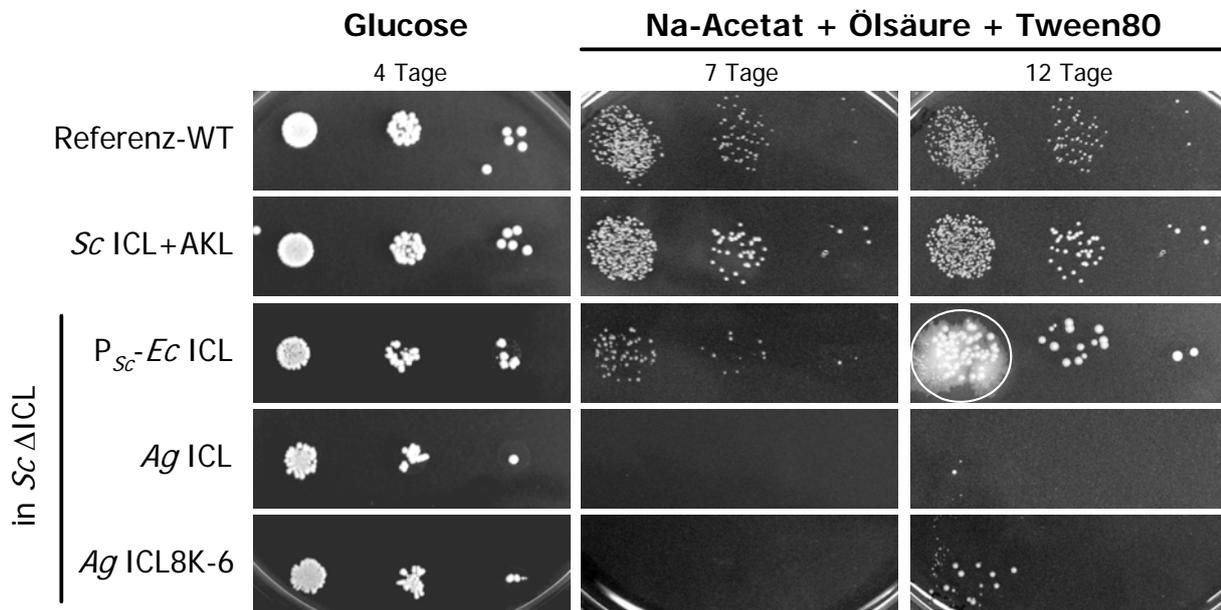
Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen sowie Sequenzierung der mutagenisierten bzw. umklonierten Bereiche überprüft. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten ICL-Mutanten ist in Abb. 30 im Anhang gegeben.

## **5.2. Wachstumsversuche zur Funktionalität der ICLs**

Zur Überprüfung der Funktionalität der heterologen und modifizierten ICLs in *S.cerevisiae* wurde das Wachstum der *Sc*  $\Delta$ ICL-Transformanten und der chromosomalen Mutanten untersucht. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit ca. 1000, 100 und 10 Zellen parallel auf Glucose oder Acetat+Ölsäure+Tween80 als C-Quelle(n) aufgetragen (**Abb. 18**). Nicht alle Ergebnisse sind abgebildet, aber in **Tab. 13** zusammengefasst. Alle Stämme wuchsen sehr gut auf Glucose, der ICL-unabhängigen Positivkontrolle. Die Notwendigkeit einer funktionalen ICL für das Wachstum auf dem Selektivmedium wurde bestätigt durch den Wachstumsdefekt von Leervektor-Transformanten. Der Vergleich der restlichen Transformanten erlaubte nur qualitative Aussagen, da neben chromosomalen ICL-Mutanten zwei verschiedene Plasmidserien (pAG100 und YEp352) verwendet wurden und Effekte unterschiedlicher Kopienzahlen nicht ausgeschlossen werden konnten. Außerdem enthielten die *Ag* ICL-Konstrukte den *Ashbya* Promotor, während die *Sc* ICL- und *Ec* ICL-Varianten unter der Kontrolle des *S.cerevisiae* Promotors standen.

Das Wachstum von Ausgangsstamm und chromosomalen Mutanten entsprach den Beobachtungen der Biomasseversuche (vgl. Abb. 5, Tab. 10): Die Kanamycinresistenz war nicht relevant und die Veränderung der ICL durch ein PTS1-Signal bewirkte allenfalls eine schwache Wachstumsverbesserung auf Induktionsmedium (**Abb. 18**). Signifikant stärkeres Wachstum lag dagegen nach 12 Tagen bei der mit nativer *E.coli*-ICL erfolgreich komplementierten *Sc*  $\Delta$ ICL-Mutante vor, allerdings nur unter der Kontrolle des Hefepromotors. Die nach 7 Tagen noch etwas geringeren Koloniegrößen gegenüber den chromosomalen Mutanten könnten auf dem Stammhintergrund beruhen. Eventuell war der Stoffwechsel der Deletionsmutante *Sc*  $\Delta$ ICL auch

bei der Vorkultur mit Glucose beeinträchtigt und musste erst „in Schwung“ kommen. Im Gegensatz zur *Ec* ICL konnte das Hybrid *Ec* ICL $Ag$ DII die *Sc*  $\Delta$ ICL-Mutante nicht komplementieren (**Tab. 13**), erklärbar durch eine stark verringerte ICL-Aktivität (später bestätigt in Tab. 16).



**Abb. 18: Wachstum ausgewählter ICL-Mutanten**

Nach Auszählung per Thomakammer wurden je 10  $\mu$ l Suspension mit ca. 1000, 100 und 10 Zellen parallel aufgetragen. Die Platten enthielten SD Minimal + Uracil mit den Kohlenstoffquellen 2% Glucose oder 0,23% Natriumacetat + 0,01% Ölsäure + 0,5% Tween80. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 4 Tage (Glucose) oder 7 und 12 Tage (ICL-Induktionsmedium). Der eingekreiste Bereich enthält eine Kontamination. Plasmidcodierte Isocitrat-Lyasen wurden anhand von Transformanten der Deletionsmutante *Sc*  $\Delta$ ICL untersucht. *Ashbya*-Konstrukte (*Ag*) im Plasmidhintergrund pAG(K)100 besitzen den *Ag* ICL-Promotor, das *E.coli*-Konstrukt (*Ec* ICL) in YEp352 den *Sc* ICL-Promotor ( $P_{Sc}$ ).

Die *Ag* ICL-Konstrukte führten erst nach 12 Tagen zu einer schwachen Komplementation der *Sc*  $\Delta$ ICL, erkennbar an der Koloniebildung nur bei der höchsten Zellzahl (**Abb. 18**). Verglichen mit der *Ag* ICL und der C-terminal verlängerten *Ag* ICL+39 wies die Koloniezahl auf ein besseres Wachstum mit der *Ag* ICL8K-6 hin. Eine mögliche Erklärung dafür bot die cytosolische Lokalisation der Wildtyp *S.cerevisiae*-ICL, obwohl Effekte wie Kopienzahl, Promotorregulation und unterschiedliche spezifische ICL-Aktivitäten nicht auszuschließen waren. Es wurde vermutet, dass die Komplementationeffizienz abhängig war vom Anteil an cytosolischer ICL. Diese Hypothese wurde unterstützt durch das gute Wachstum von *Sc*  $\Delta$ ICL komplementiert mit der mutmaßlich cytosolischen *E.coli*-ICL. Aufgrund der Deletion des PTS1-Signals könnte auch das bessere Wachstum mit der *Ag* ICL8K-6 innerhalb der *Ag* ICL-Serie auf einer Erhöhung des cytosolischen ICL-Anteils basieren. Analog kam für das identische Wachstum der mit der *Ag* ICL oder der *Ag* ICL+39 komplementierten *Sc*  $\Delta$ ICL eine nahezu identische subzelluläre ICL-Verteilung in Frage. Die subzelluläre Verteilung und Lokalisation aller heterolog exprimierten ICLs wurde daher nachfolgend mit differentiellen Zentrifugationen und Dichtegradienten überprüft.

**Tab. 13: Zusammenfassung der Wachstumsanalyse aller verwendeten Stämme auf ICL-Induktionsmedium** Die Wachstumsanalysen wurden wie in Abb. 18 durchgeführt. Nicht sichtbares Wachstum auf Acetat + Ölsäure + Tween80 ist per — markiert, die Anzahl an + zeigt die Wachstumsstärke (Koloniegröße und bewachsene Verdünnungsstufen). Alle Stämme wuchsen sehr gut auf dem Kontrollmedium mit 2% Glucose als C-Quelle (+++++, nicht gezeigt). Die ICL ist essentiell zum Wachstum auf dem Selektivmedium, bestätigt durch die Negativkontrollen.

Kategorie	Stamm	Plasmid	Wachstum	
			7 Tage	12 Tage
<i>Sc</i> ICL Wildtyp	WT Y00000	-/-	+++	++++
	Referenz	-/-	+++	++++
Negativkontrollen	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	-/-	—	—
	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	YEp352 (Leervektor)	—	—
	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	pAG100 (Leervektor)	—	—
<i>Sc</i> ICL mit PTS1	<i>Sc</i> ICL+AKL	-/-	+++	++++
	<i>Sc</i> ICLAg PTS	-/-	+++	++++
<i>Ec</i> ICL-Konstrukte (YEp352-basiert)	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	p-P <i>Ec</i> ICL (kein Promotor)	—	—
	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	p <i>Ec</i> ICL (Promotor <i>Sc</i> ICL)	++	+++++
	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	p <i>Ec</i> ICLAg DII	—	—
<i>Ag</i> ICL-Konstrukte (pAG100-basiert)	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	p <i>Ag</i> ICL	—	+
	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	p <i>Ag</i> ICL+39	—	+
	<i>Sc</i> $\Delta$ ICL	p <i>Ag</i> ICL8K-6 (ohne PTS1)	—	++

### 5.3. Subzelluläre Lokalisation von *Ag* ICL mit verändertem C-Terminus

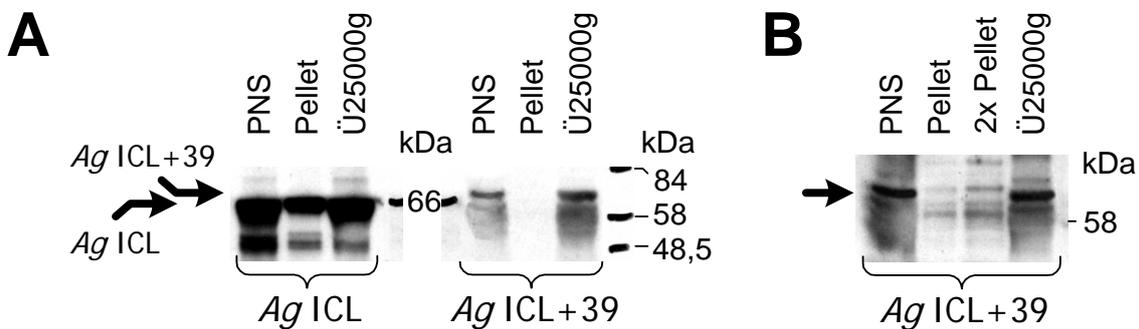
#### 5.3.1. Das Mutein *Ag* ICL+39

ICL-Enzymtests der Fraktionen mehrerer differentieller Zentrifugationen ergaben für die *Ag* ICL und die *Ag* ICL+39 Verteilungen mit meist 18 - 20% der ICL-Gesamtaktivität (bzgl. PNS) im Organellpellet. Damit wurde die bei den Komplementationsversuchen aufgestellte These des identischen Wachstums aufgrund der identischen subzellulären Verteilung unterstützt. Die Ergebnisse einer repräsentativen parallelen differentiellen Zentrifugation sind in **Tab. 14** und **Abb. 19** dargestellt. Im Gegensatz zu bisherigen Versuchen enthält die Tabelle nicht nur die relativen Werte der Gesamtaktivitäten [%], sondern auch die spezifischen ICL-Aktivitäten [mU/mg Gesamtprotein]. Die Gegenüberstellung zeigt, dass trotz der Übereinstimmung der subzellulären Verteilungen ein signifikanter Unterschied beider Proteine bestand: Die spezifische Aktivität der Wildtyp *Ag* ICL war eine Größenordnung höher verglichen mit der *Ag* ICL+39. Weitere Differenzen wurden anhand von Western Blots deutlich. In **Abb. 19A** schienen auf den ersten Blick die ICL-Signale der *Ag* ICL+39 zu fehlen, obwohl bei allen Fraktionen etwas mehr Gesamtprotein aufgetragen wurde als bei der *Ag* ICL. Anstelle der üblichen ICL-Bande knapp unterhalb von 66kDa trat eine Markierung knapp oberhalb dieses Proteinstandards auf. Berechnungen der Proteingröße anhand der Aminosäure-Sequenz mit Hilfe des Programms PROTPARAM ergaben 62,6kDa für die *Ag* ICL und 66,3kDa für die *Ag* ICL+39. Die detektierten Signale stimmten also gut mit den Berechnungen überein und bestätigten daher die Verlängerung der *Ag* ICL+39 gegenüber der *Ag* ICL.

**Tab. 14: Subzelluläre Verteilung der ICL-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 19 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten (mU/mg Gesamtprotein) sowie die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml · Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

gemessene ICL in <i>Sc ΔICL</i>	ICL-Aktivität					
	spezif. Aktivität [mU/mg Protein]			rel. Gesamtaktivität [%]		
	PNS	Pellet	Ü25000g	PNS	Pellet	Ü25000g
<i>Ag ICL</i>	8	47	6	100	23	69
<i>Ag ICL+39</i>	0,7	1,5	0,3	100	19	69

**Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von *Ag ICL* oder *Ag ICL+39* in der Deletionsmutante *Sc ΔICL***

Die differentiellen Zentrifugationen erfolgten nach Kultivierung in YP + YNO + Uracil. **A:** Western Blot zur subzellulären ICL-Verteilung mittels Anti-*Ag ICL*-Serum. Aufgetragen wurde je 1/1000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (jeweils PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): *Ag ICL*: 60, 2, 55µg; *Ag ICL+39*: 70, 5, 85µg. **B:** Wiederholung des ICL-Western Blots der *Ag ICL+39* mit geringerer Stringenz und je 1/835 Fraktionsvolumen. Proteinmengen PNS 80µg, Pellet 6µg und Ü25000g 100µg. Das *Ag ICL+39* Mutein ist per Anti-*Ag ICL*-Serum nur im PNS und Überstand eindeutig nachweisbar.

Die mit Hilfe des Anti-*Ag ICL*-Serums detektierte ICL-Bande war bei der *Ag ICL+39* nur im PNS und Überstand sichtbar und signifikant schwächer verglichen mit der Wildtyp *Ag ICL*-Markierung in allen drei Fraktionen. Während beim Wildtyp-Protein die Verhältnisse der Bandenintensitäten die per Enzymtests ermittelte subzelluläre Verteilung bestätigten, scheiterte dieser Vergleich bei der *Ag ICL+39* an der schwachen Western Blot-Signalintensität und dem fehlenden Signal des Organellpellets. Der *Ag ICL+39* Western Blot wurde deshalb mit geringerer Stringenz und der maximal noch per SDS-PAGE auftrennbaren Proteinmenge bezüglich des Überstands wiederholt (**Abb. 19B**). Dennoch zeigte das Organellpellet nur unspezifischen Hintergrund ohne ein eindeutiges ICL-Signal. Der Western Blot war somit nicht sensitiv genug zum Nachweis der *Ag ICL+39* in der Organellfraktion. Da zudem die ICL-Menge der Gradientenfraktionen zu gering war für Enzymtests, erschien die Überprüfung der peroxisomalen Lokalisation per Dichtegradient nicht sinnvoll. Aufgrund der Enzymtests und in Analogie zur *Ag ICL* (siehe Abb. 14) war die partielle peroxisomale Lokalisation der *Ag ICL+39* dennoch wahrscheinlich.

Die Anreicherung der *Ag ICL+39* in der Organellfraktion widersprach den Beobachtungen von Gould *et al.* (1988), nach denen das Anhängen von Aminosäuren die Signalwirkung einer PTS1-Region aufhebt. Die Ergebnisse der *Ag ICL+39* wiesen deshalb auf einen PTS1-unabhän-

gigen Import der *Ag* ICL in die Organellfraktion hin. Die Beteiligung der PTS1-Region an der Signalfunktion wurde daher mit einem Deletionskonstrukt überprüft.

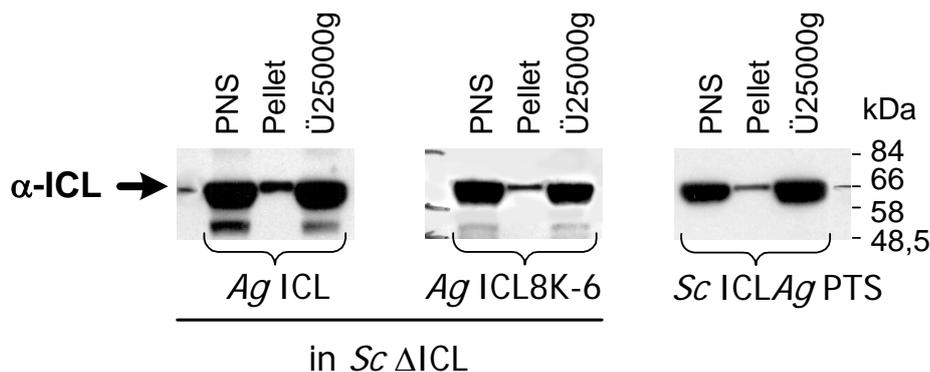
### 5.3.2. Das Mutein *Ag* ICL8K-6

Das PTS1-Deletionsmutein *Ag* ICL8K-6 wurde verglichen mit der Wildtyp *Ag* ICL und der chromosomalen PTS1-Insertionsmutante *Sc* ICL $\Delta$ PTS. Die **Tab. 15** enthält die Enzymtest-Ergebnisse einer repräsentativen differentiellen Zentrifugation. Die spezifischen ICL-Aktivitäten im zellfreien Homogenat (PNS) waren bei den plasmidcodierten *Ag* ICL-Varianten identisch und um eine Größenordnung geringer als bei *Sc* ICL $\Delta$ PTS. Dieser Unterschied war konsistent mit der geringen *Sc*  $\Delta$ ICL-Komplementation durch die *Ag* ICL-Plasmide (vgl. Tab. 13).

**Tab. 15: Subzelluläre Verteilung der ICL-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 20 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten (mU/mg Gesamtprotein) sowie die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml  $\cdot$  Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

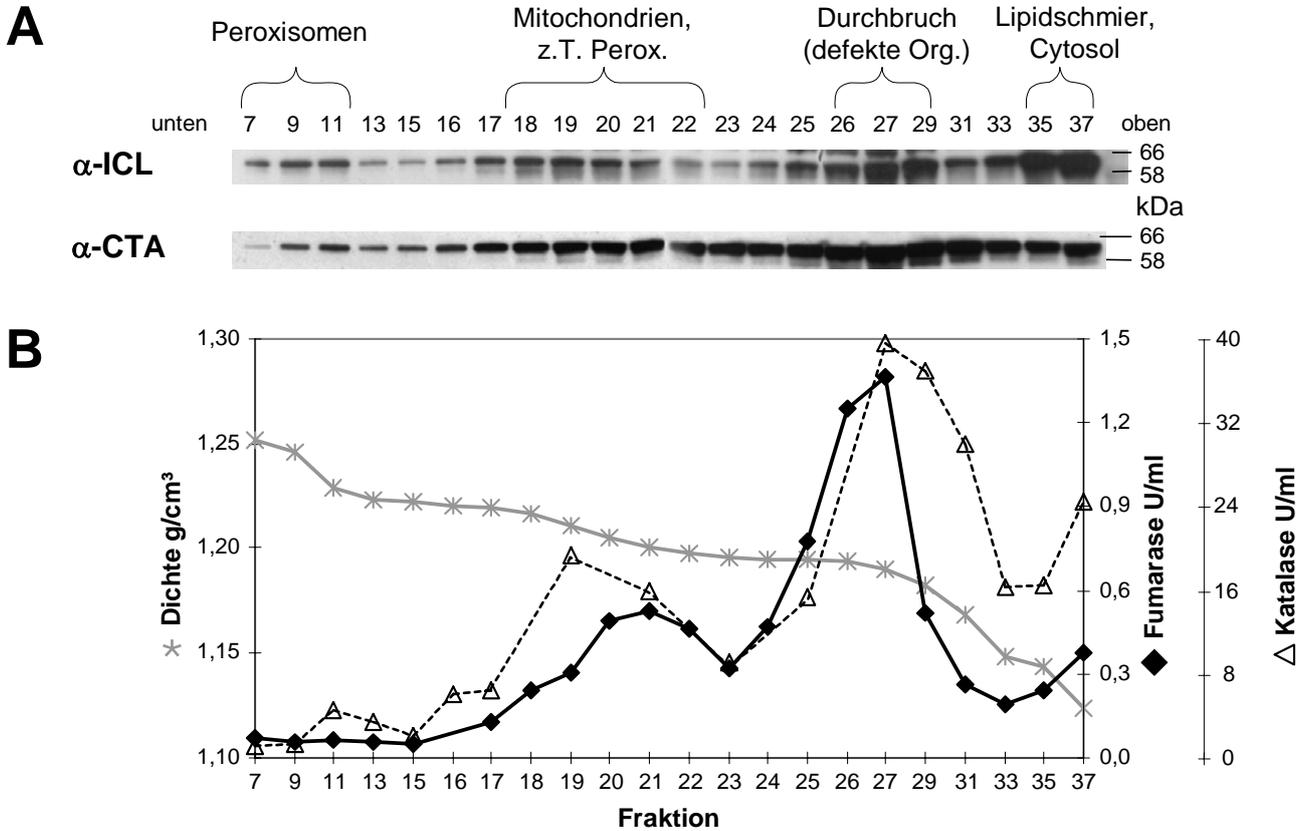
gemessene ICL	ICL-Aktivität					
	spezif. Aktivität [mU/mg Protein]			rel. Gesamtaktivität [%]		
	PNS	Pellet	Ü25000g	PNS	Pellet	Ü25000g
<i>Ag</i> ICL	8	30	6	100	17	82
<i>Ag</i> ICL8K-6	8	17	7	100	9	97
<i>Sc</i> ICL $\Delta$ PTS	89	37	91	100	4	105



**Abb. 20: Subzelluläre Lokalisation von *Ag* ICL oder *Ag* ICL8K-6 in der Deletionsmutante *Sc*  $\Delta$ ICL** Western Blots differentieller Zentrifugationen nach Zellanzucht in YP + YNO + Uracil. Aufgetragen wurde bei *Sc* ICL $\Delta$ PTS je 1/4000, bei den komplementierten Stämmen je 1/8000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (jeweils PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): *Ag* ICL: 45, 2, 60 $\mu$ g; *Ag* ICL8K-6: 25, 1, 30 $\mu$ g; *Sc* ICL $\Delta$ PTS: 40, 4, 35 $\mu$ g.

Die Idee der Komplementationsversuche, dass das gegenüber der *Ag* ICL bessere Wachstum mit der *Ag* ICL8K-6 auf einer Erhöhung des cytosolischen ICL-Anteils beruhen könnte, wurde durch die Analyse der subzellulären Verteilung gefestigt. Sowohl die relativen ICL-Gesamtaktivitäten (**Tab. 15**) als auch die Western Blot-Signale (**Abb. 20**) zeigten für die *Ag* ICL8K-6

eine Verringerung des ICL-Anteils im Organellpellet verglichen mit Wildtyp *Ag* ICL. Da die *Ag* ICL8K-6 gut per Anti-*Ag* ICL-Serum nachzuweisen war, wurde die Lokalisation des verkürzten Proteins innerhalb des Organellpellets per Dichtegradient überprüft (**Abb. 21**).



**Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation der *Ag* ICL8K-6 in *Sc*  $\Delta$ ICL gemäß Dichtegradient**

83% des Organellpellets der differentiellen Zentrifugation aus Abb. 20 wurden per 35,5 - 77%(w/v) Saccharosegradient aufgetrennt. Zur Verdeutlichung der Auftrennung sind in Bereichen hoher Proteinkonzentrationen sowohl die Daten der ungeraden als auch der geraden Fraktionen dargestellt. **A**: Western Blots zur Co-Lokalisation der ICL mit dem peroxisomalen Markerenzym Katalase A (CTA). Aufgetragen wurden je 3,25 Vol.-% der Gradientenfraktionen. **B**: Dichteverlauf (\*) gemäß Brechungsindex sowie Enzymaktivitäten von Fumarase (◆) und Katalase (△).

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Osmose- und Zentrifugationszeit-Problematik des diskontinuierlichen Saccharosegradienten zeigte die Katalase-Aktivität eine spezifische Anreicherung der Peroxisomen in Fraktion 11. Gemäß der Fumarase-Aktivität befanden sich die mit Peroxisomen verunreinigten Mitochondrien vor allem in Fraktion 20 bis 22 (**Abb. 21B**). Die Western Blots (**Abb. 21A**) ergaben eine Co-Lokalisation von *Ag* ICL8K-6 und Katalase A sowie eine Abnahme der ICL-Signalintensität in den mitochondriellen Fraktionen 21 und 22. Das bei der differentiellen Zentrifugation nachgewiesene Signal im Organellpellet entsprach daher einer peroxisomalen, höchstwahrscheinlich Mitochondrien-freien Lokalisation der PTS1-deletierten *Ag* ICL8K-6. Der peroxisomale Import übertraf mit 9% ICL-Anteil den der *Sc* ICL $\Delta$ Ag PTS (4%), war aber nur halb so effektiv wie von *Ag* ICL (siehe Tab. 15). Obwohl die Deletierbarkeit des PTS1-Tripeptides ohne Verhinderung des peroxisomalen Importes erneut auf ein internes PTS der *Ag* ICL hinwies, schien der C-Terminus an der Signalbildung beteiligt zu sein. Dafür sprach

auch, dass die Importeffizienz der *Ag* ICL größer war als die Summe des Imports bei dem Hefemutein mit *Ag* PTS (*Sc* ICL*Ag* PTS) und dem *Ag*-Mutein ohne PTS (*Ag* ICL8K-6).

#### **5.4. Subzelluläre Lokalisation von *Ec* ICL ohne und mit *Ag* ICL Strukturdomäne II**

Die prokaryotische *E.coli*-ICL diente als Reporterprotein zur Überprüfung der vermuteten peroxisomalen Signalfunktion der eukaryotischen ICL-Strukturdomäne II. Gegenüber dem Wildtyp-Enzym enthielt die *Ec* ICL*Ag* DII eine Insertion aus 112 Aminosäuren der *Ag* ICL Strukturdomäne II zwischen Prolin248 und Serin259 der *Ec* ICL-Sequenz. Die Ergebnisse repräsentativer differentieller Zentrifugationen mit der *Ec* ICL bzw. der *Ec* ICL*Ag* DII sind in **Tab. 16** und **Abb. 22** dargestellt. Entsprechend dem Unvermögen der *Ec* ICL*Ag* DII zur Komplementation von *Sc*  $\Delta$ ICL (siehe Tab. 13) war die Zellanzucht mit dem Hybridprotein erschwert durch langsames und geringeres Wachstum. Eine Ursache dafür war die Verringerung der spezifischen ICL-Aktivität im zellfreien Homogenat (PNS) auf knapp  $1/60$  der Wildtyp *Ec* ICL (**Tab. 16**). Zusätzlich kam erneut der cytosolische ICL-Anteil für den Wachstumsunterschied in Frage. So sprachen die ICL-Gesamtaktivitäten der *Ec* ICL für eine ausschließlich cytosolische Lokalisation mit nur 0,7% ICL-Anteil im Organellpellet. Im Gegensatz dazu enthielt die Organellfraktion beim Hybridprotein  $1/3$  der aufgetrennten ICL-Aktivität. Der entsprechend verringerte cytosolische ICL-Anteil und das schlechtere Wachstum mit der *Ec* ICL*Ag* DII unterstützten die bei den Komplementationsversuchen aufgestellte These, dass die Komplementation der *Sc*  $\Delta$ ICL je besser ist, desto mehr cytosolische ICL vorliegt.

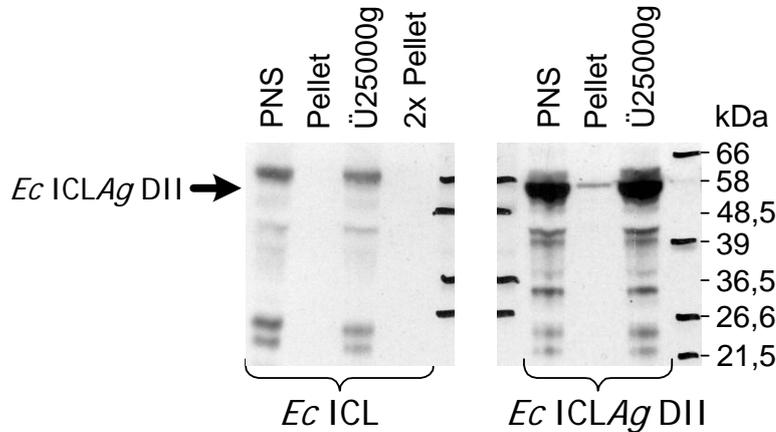
**Tab. 16: Subzelluläre Verteilung der ICL-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 22 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten (mU/mg Gesamtprotein) sowie die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml  $\cdot$  Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

gemessene ICL	ICL-Aktivität					
	spezif. Aktivität [mU/mg Protein]			rel. Gesamtaktivität [%]		
in <i>Sc</i> $\Delta$ ICL	PNS	Pellet	Ü25000g	PNS	Pellet	Ü25000g
<i>Ec</i> ICL	35	14	32	100	0,7	104
<i>Ec</i> ICL <i>Ag</i> DII	0,6	3	0,5	100	34	70

Die Western Blots mit Anti-*Ag* ICL-Serum (**Abb. 22**) ergaben für die *Ec* ICL kein spezifisches Signal bei der mit PROTPARAM berechneten Molekülgröße von 47,5kDa. Erst die Insertion der *Ag* ICL-Strukturdomäne II ermöglichte die Detektion des Hybridproteins mit Anti-*Ag* ICL-Serum in allen drei Fraktionen der differentiellen Zentrifugation. Diese Bande entsprach fast der PROTPARAM-Berechnung von 58,5kDa. Da bei der *Ec* ICL keine Kreuzreaktion auftrat, wurde die *Ec* ICL*Ag* DII nur anhand der *Ashbya*-Insertion nachgewiesen, die lediglich 20% des Gesamt-moleküls ausmachte. Verglichen mit der vollständig immuno-reaktiven *Ag* ICL und *Sc* ICL war daher die Hintergrundmarkierung höher und die Übereinstimmung der Ergebnisse der Enzymtests mit den Western Blots geringer. Die geringere Antikörperspezifität für die *Ec* ICL*Ag* DII wirkte sich dabei nur auf die Western Blot Bande im Organellpellet aus, da die ICL-Konzentration im PNS und Überstand den proportionalen Bereich der Nachweisreaktion überschritt, wie Auftragungen geringerer Gesamtproteinmengen ergaben (nicht gezeigt). Auch

wenn deshalb die Bandenintensitäten des Western Blots nicht der per Enzymtests gemessenen subzellulären ICL-Verteilung entsprachen, wurde zumindest die teilweise Lokalisation der *Ec* ICLAg DII in der Organellfraktion bestätigt.



**Abb. 22: Subzelluläre Lokalisation von *Ec* ICL oder *Ec* ICLAg DII in der Deletionsmutante *Sc*  $\Delta$ ICL** Western Blots differentieller Zentrifugationen (Zellanzucht in YP + YNO + Uracil) zum Nachweis der ICL-Verteilung mit Anti-*Ag* ICL-Serum. Aufgetragen wurde bei *Ec* ICL je 1/3000, bei *Ec* ICLAg DII je 1/4000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (jeweils PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): *Ec* ICL: 40, 1, 50 $\mu$ g; *Ec* ICLAg DII: 40, 3, 40 $\mu$ g. Die Größen aller Molekulargewichtsstandards (kDa) sind rechts markiert. Im Gegensatz zur *Ec* ICLAg DII (berechnete Größe: 58,5kDa) war die *Ec* ICL (47,5kDa) nicht detektierbar.

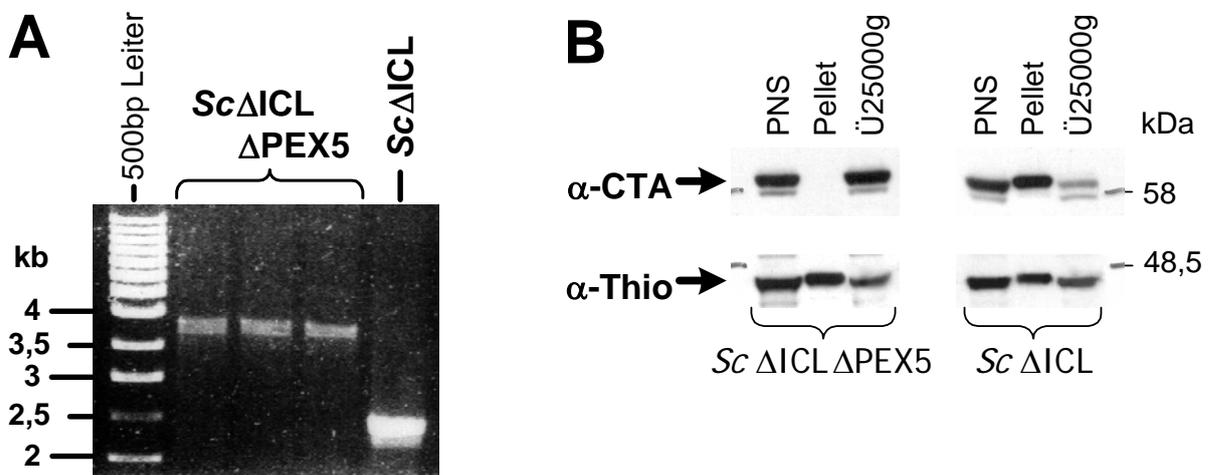
Aufgrund der niedrigen spezifischen ICL-Aktivität des Hybridproteins wurde ein Großteil des Organellpellets für Enzymtests benötigt und kein Dichtegradient durchgeführt. Allerdings konnte bei einem anderen Hefestamm unter Verwendung von mehr Biomasse die peroxisomale Lokalisation der *Ec* ICLAg DII im Dichtegradient gezeigt werden (siehe Abb. 28). Im Organellpellet der *Sc*  $\Delta$ ICL-Transformante wiesen die Anreicherung der spezifischen ICL-Aktivität, die Verteilung der Gesamtaktivität und das signifikante Western Blot-Signal auf eine Signalwirkung der *Ashbya*-ICL Strukturdomäne II hin. Der Epitop-Charakter dieser eukaryoten-spezifischen Domäne ermöglichte die Western Blot-Detektion des *E.coli*-Hybridproteins und sprach daher für eine gute Zugänglichkeit der putativen Signalregion im endogenen *Ag* ICL-Kontext.

Insgesamt stützten die Ergebnisse aller Versuche dieses Kapitels die vermutete Existenz einer internen Signalsequenz bei der *Ag* ICL und der *Ec* ICLAg DII. Die peroxisomale Lokalisation der *Ag* ICL8K-6 trotz der Deletion der sechs C-terminalen Aminosäuren zeigte, dass das PTS1-Signal nicht essentiell war für die Aufnahme in die Organellen. Ein PTS1-unabhängiger Import einer heterolog in *S.cerevisiae* exprimierten ICL war bereits von der Rizinus-ICL bekannt (Taylor *et al.*, 1996) und benötigte den PTS1-Rezeptor PEX5 (Parkes *et al.*, 2003). Daher erschien es sinnvoll, die mögliche PEX5-Abhängigkeit des peroxisomalen Imports der PTS1-losen ICL-Varianten dieser Doktorarbeit zu untersuchen.

## 6. Abhängigkeit des peroxisomalen Imports vom PTS1-Rezeptor PEX5

### 6.1. Erzeugung einer *Sc* $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5-Doppelmutante

Zur Analyse des PEX5-abhängigen peroxisomalen Imports bei plasmidcodierten ICL-Varianten musste eine *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5-Doppelmutante erzeugt werden. Die von EUROSCARF zur Verfügung gestellten Einzeldisruptanten trugen dieselbe Resistenzkassette (*kanMX*). Daher wurde die Doppelmutante analog zu Abb. 6 durch homologe Rekombination mit einem anderen Selektionsmarker erzielt. *Sc*  $\Delta$ ICL wurde dazu mit einem *PstI*-*SacI*-Fragment des PEX5-Disruptionsplasmids pUC19-PEX5::*LEU2* (van der Leij *et al.*, 1993) transformiert. Die Austauschmutagenese sollte die Codons 123 bis 420 von PEX5 durch ein *LEU2*-Gen ersetzen. Erhaltene Transformanten waren Leucin-prototroph sowie aufgrund der *ICL1*-Deletion per *kanMX* Geneticin-resistent und unfähig zum Wachstum auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle.



**Abb. 23: Molekulare und biochemische Verifizierung der Mutante *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5**

**A:** PCR-Amplifikate genomischer DNA unabhängiger Transformanten. Die ScPEX5-Primer binden 300 Basen vor bzw. nach der codierenden Region von PEX5. Das insertierte *LEU2*-Disruptionsmodul bewirkt eine Vergrößerung des PCR-Produkts bzgl. Ausgangsstamm *Sc*  $\Delta$ ICL.

**B:** Western Blots zur subzellulären Verteilung der peroxisomalen Markerenzyme CTA und Thiolase. Es wurden jeweils gleiche Anteile der Fraktionen differentieller Zentrifugationen aufgetragen. Die PEX5-Disruption verhindert den PEX5-abhängigen peroxisomalen Import der CTA ohne Beeinträchtigung des PEX7-abhängigen Imports der Thiolase.

Die erwünschte Integration der im Vergleich zur Ausgangssequenz größeren Disruptionskassette wurde per PCR mit den 300 Basen vor bzw. nach dem *PEX5* Gen bindenden ScPEX5-Primern bestätigt (**Abb. 23A**). Außerdem wurde der  $\Delta$ PEX5-typische Phänotyp der Delokalisierung eines peroxisomalen Matrixproteins per Western Blot gezeigt (**Abb. 23B**). Dabei war die subzelluläre Verteilung des PTS2-Proteins Thiolase durch die PEX5-Disruption erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt, da der PTS2-vermittelte Import den Rezeptor PEX7 verwendet. Im Gegensatz dazu wird Katalase A über PEX5 in die Peroxisomen aufgenommen. Dementsprechend zeigte die Doppelmutante *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5 die erwartete Delokalisierung der Katalase A im Cytosol als Unterschied zur typischen, überwiegend peroxisomalen Verteilung in *Sc*  $\Delta$ ICL (**Abb. 23B**). In

*Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5 konnte eine hauchdünne Katalase A-Organellbande erst bei einer Auftragung der 5- bis 10-fachen Menge an Gesamtprotein detektiert werden (nicht gezeigt).

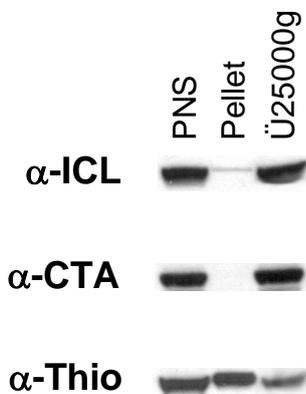
## 6.2. Subzelluläre Lokalisation von *Ag* ICL8K-6 in *Sc* $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5

Wie aus **Tab. 17** und **Abb. 24** hervorgeht, ergaben differentielle Zentrifugationen von *Ag* ICL8K-6 im  $\Delta$ PEX5-Stammhintergrund mit 8% eine deutliche ICL-Lokalisation im Organellpellet. Die Intaktheit der Peroxisomen wurde durch die Thiolase-Anreicherung im Pellet bestätigt, die PEX5-Disruption durch die Katalase A-Delokalisierung im Überstand. Abgesehen von leicht verringerten spezifischen Aktivitäten (5,5mU/mg Protein statt 8mU/mg Protein im PNS) entsprach die ICL-Verteilung den Werten in *Sc*  $\Delta$ ICL (vgl. Tab. 15). Damit war gezeigt, dass das Vorkommen der *Ag* ICL8K-6 im Organellpellet PEX5-unabhängig war. Die Überprüfung der peroxisomalen Lokalisation erfolgte anhand von Dichtegradienten.

**Tab. 17: Subzelluläre Verteilung der *Ag* ICL8K-6-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

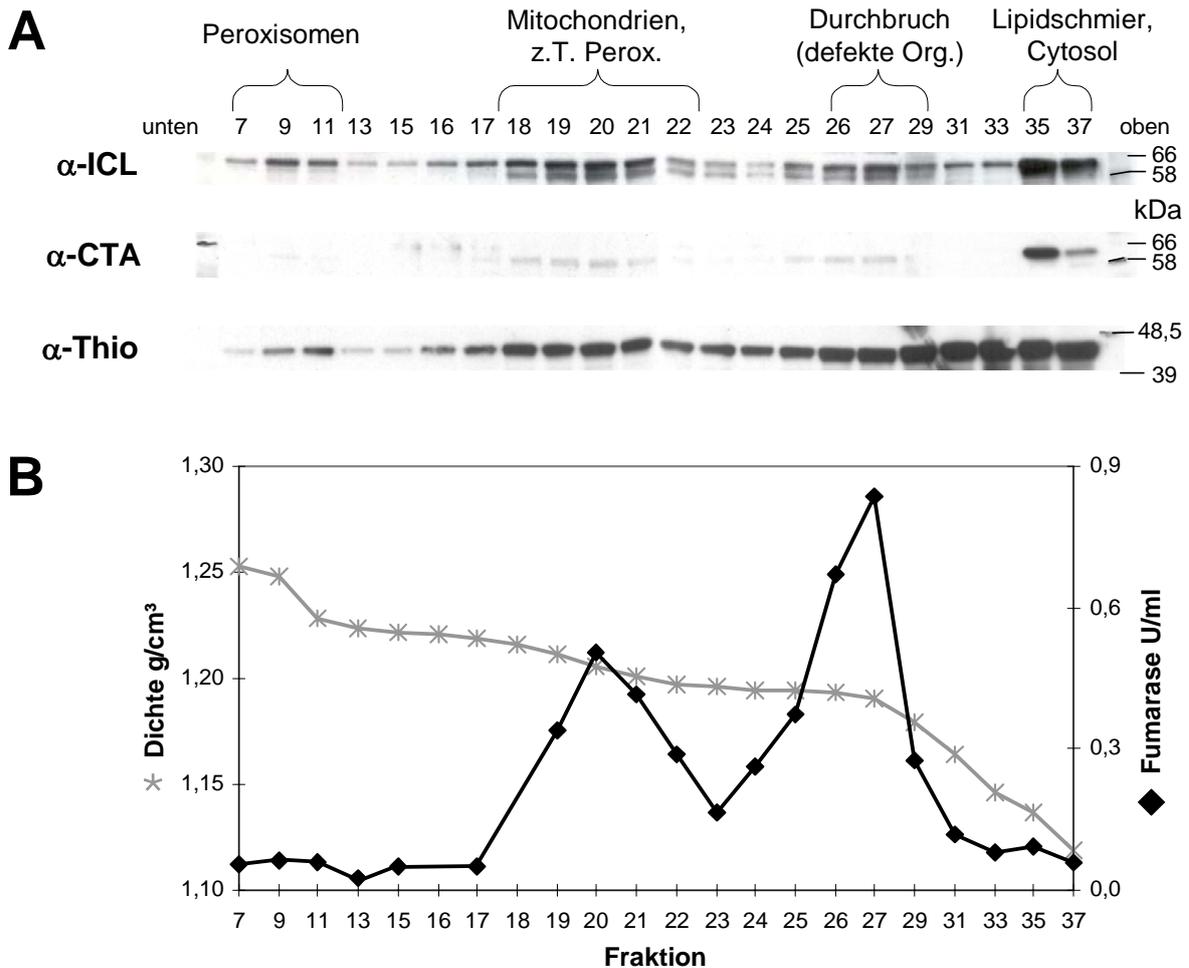
Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 24 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten (mU/mg Protein) sowie die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml  $\cdot$  Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

gemessene ICL in <i>Sc</i>	ICL-Aktivität					
	spezif. Aktivität [mU/mg Protein]			rel. Gesamtaktivität [%]		
$\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5	PNS	Pellet	Ü25000g	PNS	Pellet	Ü25000g
<i>Ag</i> ICL8K-6	5,5	13	5,3	100	8	99



**Abb. 24: Subzelluläre Lokalisation der *Ag* ICL8K-6 in der Doppeldisruptante *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5** Western Blots zur Verteilung von ICL, delokalisierte Katalase A (CTA) und peroxisomale Thiolase. Zellanzucht der differentiellen Zentrifugation in YP + YNO + Uracil. Aufgetragen wurde je 1/8000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): 20, 1, 20 $\mu$ g.

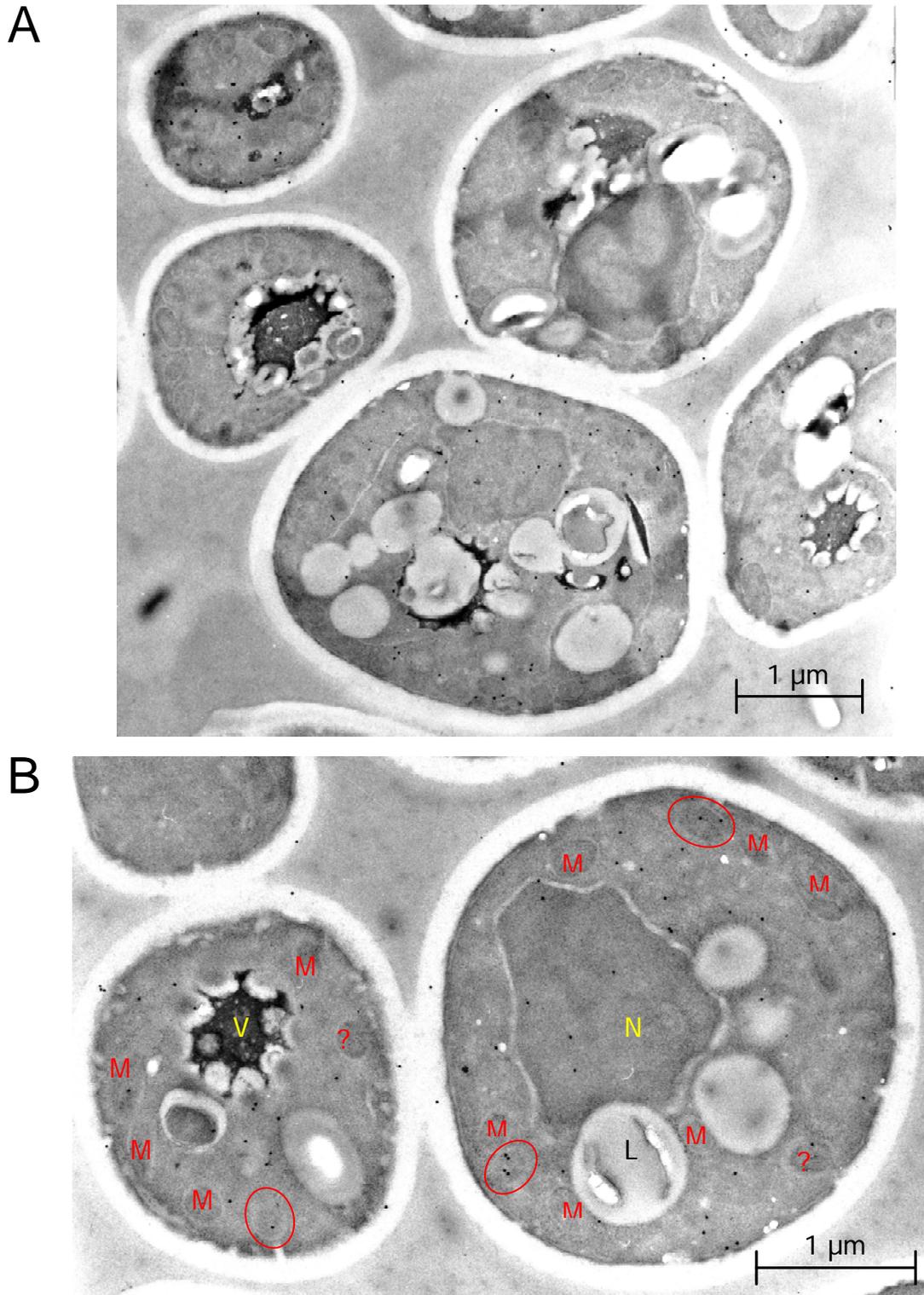
Der diskontinuierliche Saccharosegradient in **Abb. 25** zeigte anhand der Verteilung der Fumarase-Aktivität (**B**) die Fraktionen der Mitochondrienanreicherung (Maximum in Fraktion 20) sowie den Durchbruch defekter Organelle (vor allem Fraktion 26/27). Das Verhältnis der beiden *Peaks* sprach für einen höheren Anteil intakter Organelle verglichen mit vorherigen diskontinuierlichen Gradienten. Aufgrund der PEX5-Disruption konnte die Katalase A nur in den obersten, cytosolischen Gradientenfraktionen nachgewiesen werden (**Abb. 25A**) und war deshalb als peroxisomaler Marker unbrauchbar. Stattdessen ermöglichten Antikörper gegen das PTS2-Protein Thiolase die spezifische Peroxisomendetektion in den Fraktionen 9 bis 11, in Übereinstimmung mit der publizierten Peroxisomendichte von ca. 1,24g/cm<sup>3</sup> (Tolbert, 1974). Die Co-Lokalisation der *Ag* ICL8K-6 mit der Thiolase zeigte die peroxisomale Lokalisation innerhalb des Organellpellets.



**Abb. 25: Subzelluläre Lokalisation von *Ag ICL8K-6* in *Sc ΔICL ΔPEX5* per Dichtegradient**

83% des Organellpellets der differentiellen Zentrifugation aus Abb. 24 wurden per 35,5 - 77% (w/v) Saccharosegradient aufgetrennt. Zur Verdeutlichung der Auftrennung sind in Bereichen hoher Proteinkonzentrationen sowohl die Daten der ungeraden als auch der geraden Fraktionen dargestellt. **A:** Western Blots zur Co-Lokalisation der ICL mit den peroxisomalen Markerenzymen Katalase A (CTA) und Thiolase (Thio). Aufgetragen wurden je 3,25 Vol.-% der Gradientenfraktionen. **B:** Dichteverlauf (\*) gemäß Brechungsindex sowie Aktivitäten des mitochondrialen Markerenzym Fumarase (◆).

Eine Gefahr bei der Untersuchung verkürzter Proteine oder von Fusionskonstrukten ist die Bildung von Proteinaggregaten, vor allem bei der Verwendung eines starken Promotors (Kamada *et al.*, 1992; Kamasawa *et al.*, 1996 & 1999). Ebenso führte die *high copy*-Plasmid Überexpression peroxisomaler Katalase A-Muteine mit dem Gen-eigenen *CTA1*-Promotor zur Aggregation in *S.cerevisiae* (Hartig *et al.*, 1990; Binder *et al.*, 1991). Da auch die *Ag ICL8K-6* plasmidcodiert in der *S.cerevisiae*-Mutante exprimiert wurde, erschien eine Überprüfung möglicher Proteinaggregate angebracht. Dafür wurden die als am sichersten geltenden Methoden zum Nachweis von Aggregaten angewandt: Elektronenmikroskopie und Immuno-Goldmarkierung (**Abb. 26**).



**Abb. 26: Immuno-Goldmarkierung zur subzellulären Lokalisation der *Ag* ICL8K-6 in *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5** Die Zellanzucht erfolgte in YP + YNO + Uracil. Einbettung, Immunomarkierung und Elektronenmikroskopie der Ultradünnschnitte durch Klaas Sjollema, Uni Groningen (NL). Die Goldkörner wurden an Anti-*Ag* ICL-Serum gekoppelt. **A:** Übersichtspräparat. Die Zellen zeigen keine Proteinaggregate. **B:** Detail mit Markierung der Zellorganelle: eingekreiste Peroxisomen, ? evtl. Peroxisom, L Lipidkörper, M Mitochondrium (mit Cristae), N Nucleus, V Vakuole. Die Markierung ist schwach und unspezifisch, dennoch sind eher Peroxisomen markiert als Mitochondrien.

Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse von über 60 analysierten Zellen. Es wurden keine Proteinaggregate gefunden, die als große, membranlose Partikel von unregelmäßiger Form und Oberfläche gut erkennbar sind (Kamasawa *et al.*, 1999). Trotz der Verwendung des polyklonalen Anti-*Ag* ICL-Serums, das beim Western Blot gut zur Detektion der *Ag* ICL8K-6 funktionierte, war die Markierung der Ultradünnschnitte schwach und unspezifisch, wie die Goldkörner im Zellkern zeigen. Zwar sind in **Abb. 26B** einige Peroxisomen mit ein bis vier Goldpartikeln erkennbar, eine signifikante Markierung wurde aber nicht erreicht. Die Mitochondrien enthielten meist kein und selten ein Goldkorn. Höchstwahrscheinlich lag insgesamt zu wenig immuno-reaktives Protein vor. So war die ICL-Aktivität im Homogenat (PNS) erfolgreich goldmarkierter chromosomaler *Sc* ICL-Mutanten 2,5- bis mehr als 10-fach höher verglichen mit *Ag* ICL8K-6. Obwohl die Immuno-Goldmarkierung somit nicht sensitiv genug war zum Nachweis der peroxisomalen Lokalisation der *Ag* ICL8K-6, wurden eher Peroxisomen als Mitochondrien markiert. Das Fehlen von Proteinaggregaten war konsistent mit der gut messbaren ICL-Aktivität, da aggregierte Proteine meist inaktiv sind. Insgesamt bedeuteten die Ergebnisse der **Abb. 26** deshalb keinen Widerspruch zur Aussage des Dichtegradienten. Aufgrund der Co-Lokalisation mit Thiolase (vgl. Abb. 25) enthielt die *Ag* ICL8K-6 also ein PEX5-unabhängiges Peroxisomensignal.

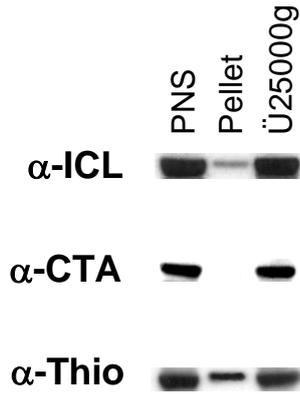
### **6.3. Subzelluläre Lokalisation von *Ec* ICL*Ag* DII in *Sc* $\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5**

Auch die Lokalisation des Hybridproteins *Ec* ICL*Ag* DII im  $\Delta$ PEX5-Stammhintergrund wurde anhand differentieller Zentrifugationen (**Tab. 18, Abb. 27**) sowie eines Dichtegradienten (**Abb. 28**) überprüft. Analog zu den Ergebnissen der *Ag* ICL8K-6 entsprach die subzelluläre Verteilung der Situation ohne PEX5-Disruption (vgl. Tab. 16) mit einem ICL-Anteil von 34% der Gesamtaktivität im Organellpellet. Der ICL-Western Blot (**Abb. 27**) zeigte ebenfalls ein signifikantes Pelletsignal, das höchstwahrscheinlich aufgrund des geringen immuno-reaktiven Proteinanteils (nur *Ag* Domäne II) zu schwach ausfiel. Das Sensitivitätsproblem trat in PNS und Überstand aufgrund der dort größeren ICL-Konzentration nicht auf, da die Nachweisreaktion in diesen Fraktionen den proportionalen Bereich überschritt. Parallele Blots zur Verteilung von Katalase A und Thiolase bestätigten die PEX5-Disruption, die oft mit einer leichten Delokalisierung von PTS2-Proteinen einherging (van der Leij *et al.*, 1993). Deshalb war die Peroxisomenpräparation trotz des schwächeren Thiolasesignals im Organellpellet verglichen mit PNS und Überstand ausreichend gut.

**Tab. 18: Subzelluläre Verteilung der ICL-Aktivität nach differentieller Zentrifugation**

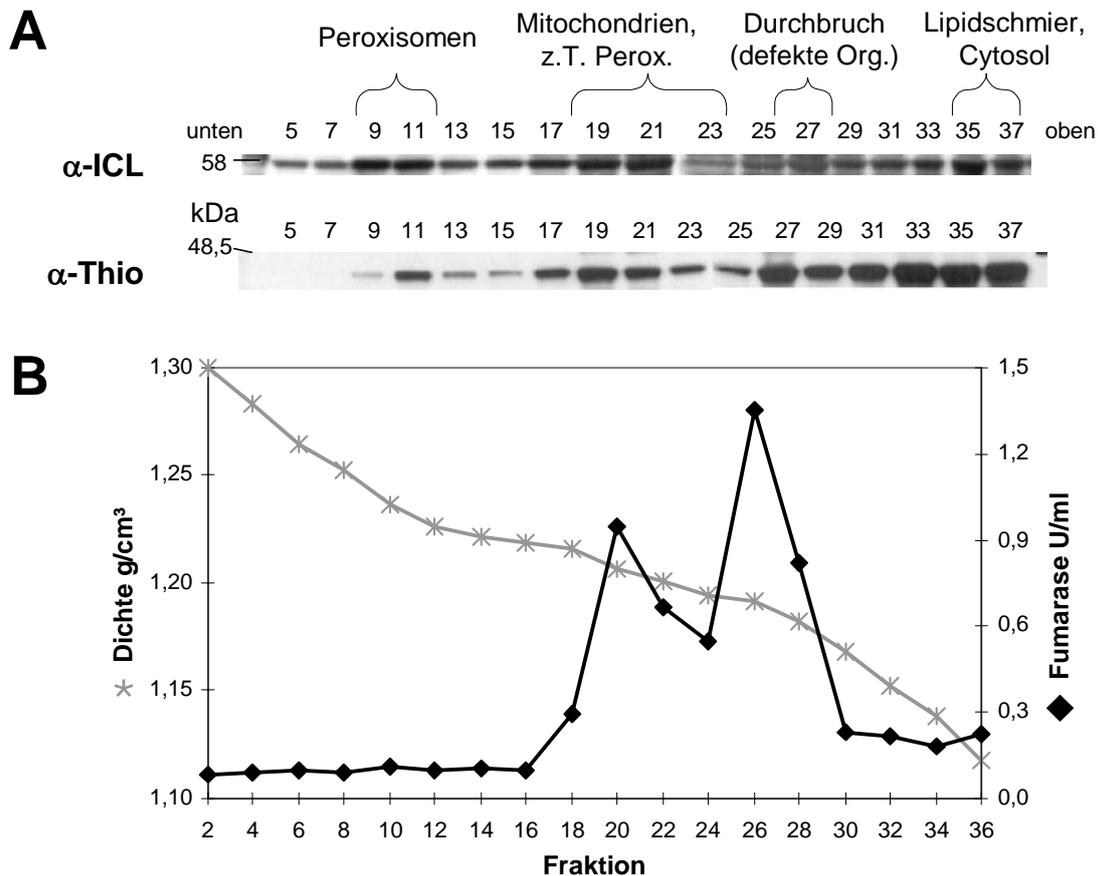
Die Enzymtests erfolgten vor der Proteinfällung für die in Abb. 27 gezeigten Western Blots. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten (mU/mg Protein) sowie die relativen Gesamtaktivitäten (U/ml  $\cdot$  Fraktionsvolumen) bezogen auf den PNS als Basis der Zentrifugation.

gemessene ICL in <i>Sc</i>	ICL-Aktivität					
	spezif. Aktivität [mU/mg Protein]			rel. Gesamtaktivität [%]		
$\Delta$ ICL $\Delta$ PEX5	PNS	Pellet	Ü25000g	PNS	Pellet	Ü25000g
<i>Ec</i> ICL <i>Ag</i> DII	0,7	6	0,3	100	34	63



**Abb. 27: Subzelluläre Lokalisation der *Ec ICLAgDII* in der Doppel-Deletionsmutante *Sc ΔICL ΔPEX5*** Western Blots zur Verteilung von ICL, delokalisierte Katalase A (CTA) und peroxisomaler Thiolase. Differentielle Zentrifugation aus 14g Biofeuchtmasse nach Kultivierung in YP + YNO + Uracil. Aufgetragen wurde je 1/15000 Fraktionsvolumen. Proteinmengen (PNS, Organellpellet, Überstand 25000g): 20, 1, 30 $\mu$ g.

Aufgrund der geringen Antikörperspezifität des Anti-*Ag ICL*-Serums gegenüber der *Ec ICLAgDII* wurde für den Dichtegradienten der **Abb. 28** ein konzentrierteres Organellpellet aus 14g Biofeuchtmasse verwendet.

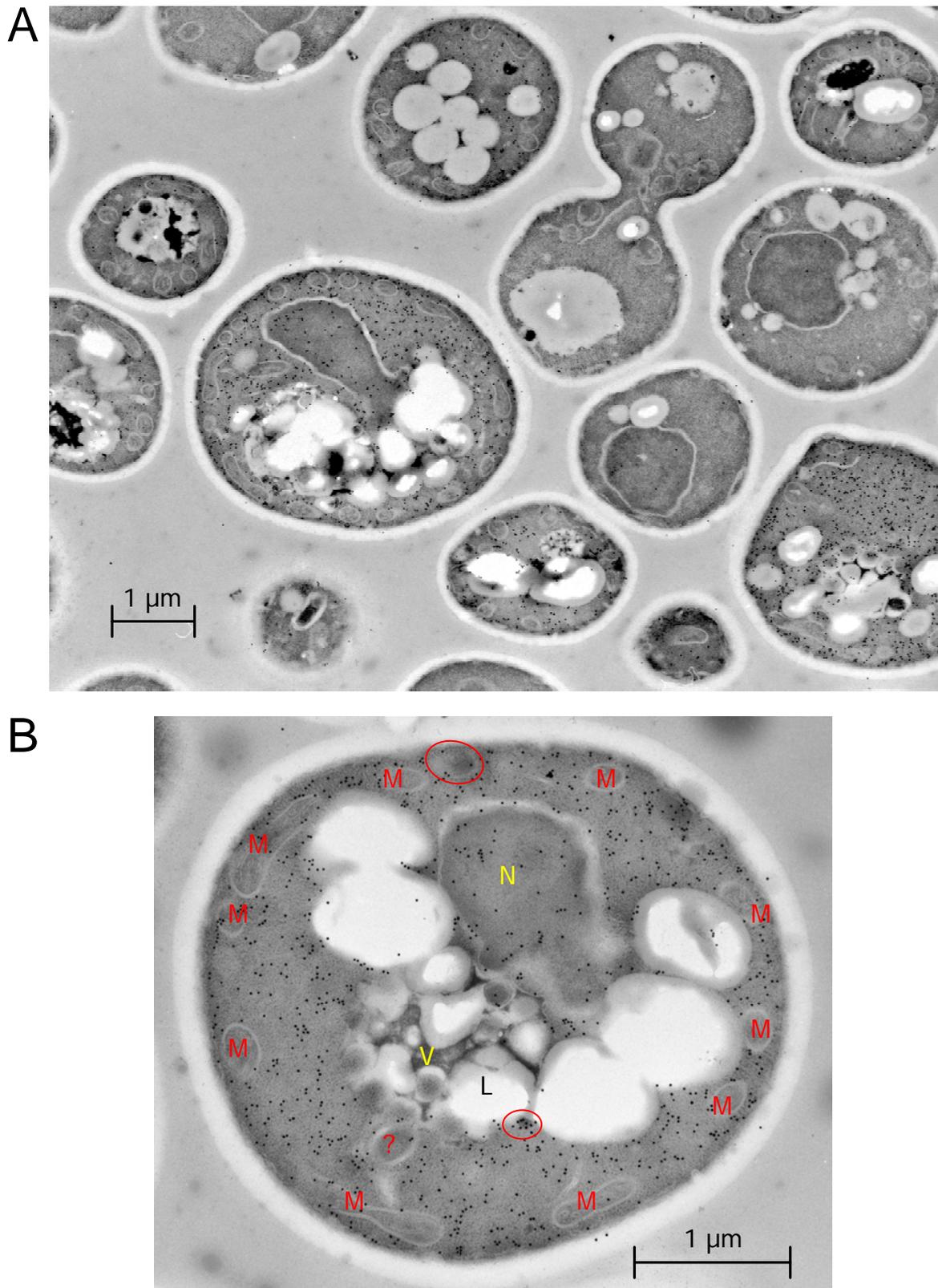


**Abb. 28: Subzelluläre Lokalisation der *Ec ICLAgDII* in *Sc ΔICL ΔPEX5* per Dichtegradient**

83% des Organellpellets der differentiellen Zentrifugation aus **Abb. 27** wurden per 35,5 - 77%(w/v) Saccharosegradient aufgetrennt. Wegen der Fällung der kompletten ungeraden Fraktionen für Western Blots wurden die geraden Fraktionen zur Ermittlung der Dichte und Enzymaktivität verwendet. **A:** Western Blots zur Co-Lokalisation der ICL mit dem peroxisomalen Markerenzym Thiolase (Thio). Aufgetragen wurden je 4 Vol.-% der Gradientenfraktionen. **B:** Dichteverlauf (\*) gemäß Brechungsindex sowie Aktivität der mitochondrialen Fumarase (♦).

Bei dem Gradienten markierten die Fumarase-Enzymtests (**Abb. 28B**) die Lage der Mitochondrien um Fraktion 20 sowie den Durchbruch defekter Organellen bei Fraktion 26. Die Verteilungsmaxima der peroxisomalen Thiolase (**Abb. 28A**) lagen in Fraktion 11 (Peroxisomen), Fraktion 17 bis 21 (verschleppte Peroxisomen-Mitochondrien-Mischpopulation), Fraktion 27 (Durchbruch) und in den obersten Gradientenfraktionen (Cytosol bzw. Lipidkörper-Assoziate). Dasselbe Muster wurde für die *Ec* ICLAg DII mittels Anti-*Ag* ICL-Serum nachgewiesen. Die deutliche Co-Lokalisation entsprach einer peroxisomalen Verteilung des Hybridproteins innerhalb der Organellfraktion. Um fehlinterpretierte Proteinaggregate auszuschließen, wurden die Zellen per Immuno-Goldmarkierung und Elektronenmikroskopie überprüft (**Abb. 29**).

Die Abbildungen zeigen einen Querschnitt aus über 100 genauer betrachteten Zellen, die alle keine Proteinaggregate aufwiesen. Dabei war die sehr variable Markierungseffizienz auffällig: manche Zellen enthielten nur 10 bis 20 Goldkörner, andere waren vollständig bedeckt (**Abb. 29A**). Die Varianz sowie die z.T. sehr hohe Hintergrundmarkierung (z.B. im Zellkern) beruhten auf der geringen Spezifität des Anti-*Ag* ICL-Serums für das Hybridprotein. So trat bereits beim Western Blot eine signifikante Hintergrundreaktion auf (siehe Abb. 22). Da die niedrige ICL-Aktivität im Homogenat (PNS) für eine geringe Konzentration des schwach immuno-reaktiven Proteins (nur *Ag* ICL Domäne II) sprach, waren auch cytosolische Markierungen überwiegend als Hintergrund zu betrachten. Die Zellen enthielten nur wenige Peroxisomen, die allerdings manchmal im Vergleich zur Umgebung eine etwas erhöhte Anzahl an Goldkörnern aufwiesen. Ein Beispiel ist das kleine Peroxisom zwischen den Lipidkörpern der **Abb. 29B**. Dagegen war die Matrix der Mitochondrien nur selten markiert. Analog zur Goldmarkierung der *Ag* ICL8K-6 war die subzelluläre Lokalisation der *Ec* ICLAg DII wegen der Sensitivitätsprobleme nicht zuzuordnen. Es ergab sich aber kein Widerspruch zu den Ergebnissen der Dichtegradientenzentrifugation. Das Fehlen von Proteinaggregaten, die gut messbare ICL-Aktivität im Organellpellet und die Co-Lokalisation der *Ec* ICLAg DII mit Thiolase im Dichtegradienten zeigten daher, dass die *Ag* ICL Strukturdomäne II ein PEX5-unabhängiges Peroxisomensignal enthielt. Damit wurde nicht nur die Region eines internen Signals eingegrenzt, sondern auch ein Unterschied zum PEX5-abhängigen Import der Rizinus-ICL-Mutante gezeigt.



**Abb. 29: Immuno-Goldmarkierung zur subzellulären Lokalisation der *Ec* ICLAgDII in *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5** Die Zellanzucht erfolgte in YP + YNO + Uracil. Einbettung, Immunomarkierung und Elektronenmikroskopie der Ultradünnschnitte durch Klaas Sjollema, Uni Groningen (NL). Die Goldkörner wurden an Anti-*Ag* ICL-Serum gekoppelt. **A:** Übersichtspräparat. Die Zellen zeigen keine Proteinaggregate. **B:** Detail mit Markierung der Zellorganelle wie in Abb. 26, d.h. Peroxisomen sind eingekreist. Die Markierung ist sehr unspezifisch.

## DISKUSSION

### 1. Die Effizienz peroxisomaler Signalsequenzen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Veränderung der Lokalisation der *S.cerevisiae*-ICL. Mit Hilfe eines PTS-Signals sollte eine Delokalisierung vom Cytosol in die Peroxisomen erreicht werden. Viele Argumente sprachen dabei für die Verwendung eines PTS1-Tripeptids, zumal PTS1-Peptide den Import verschiedenster Substrate (z.B. Proteine, Farbstoffe oder Goldkörner) vermitteln können (McNew & Goodman, 1996). Die Lage am Ende des C-Terminus ermöglichte das Anhängen einer PTS1-Sequenz ohne große Eingriffe in die Proteinstruktur, analog zu einem „Tag“ für die Proteinaufreinigung. Weitere Vorteile waren die publizierte Pilz-PTS1-Präferenz sowie die Möglichkeit der theoretischen Funktionalitätsüberprüfung der PTS1-Muteine per *PTS1-Predictor* (Neuberger *et al.*, 2003a/b). Bisher wurde vor allem das Tripeptid SKL sehr erfolgreich als Peroxisomensignal verschiedenster heterolog exprimierter Fusionsproteine eingesetzt und es gibt kaum Ausnahmen, bei denen die SKL-Fusion als PTS versagte (Bongcam *et al.*, 2000; Distel *et al.*, 1992). Da das Tripeptid AKL bei peroxisomalen Pilz-Proteinen etwas häufiger vorkam als SKL (Neuberger *et al.*, 2003a) und beide PTS1-Signale die Import von bakterieller Chloramphenicol-Transferase in *S.cerevisiae* Peroxisomen vermitteln konnten (McNew & Goodman, 1994) wurde AKL (Alanin-Lysin-Leucin) als künstliches PTS der normalerweise cytosolischen *Sc* ICL ausgewählt. Laut *PTS1-Predictor*-Analyse war das Mutein ICL+AKL eindeutig peroxisomal orientiert.

Tatsächlich besaß die Hefemutante *Sc* ICL+AKL gemäß Dichtegradient und Immuno-Goldmarkierung eine peroxisomale ICL. Differentielle Zentrifugationen ergaben, dass der peroxisomale Import zwar signifikant, aber nur sehr ineffizient war. So enthielt das Organellpellet mit nur 4% der ICL-Gesamtaktivität einen wesentlich geringeren ICL-Anteil als erwartet. Da die Hefemutante durch die chromosomale Insertion der Codons für das PTS1-Signal am ICL-Locus erzeugt wurde, lag anstelle des Gens für die Wildtyp ICL die codierende Sequenz für das Mutein ICL+AKL vor, weshalb jede ICL der Mutante das PTS1-Tripeptid besitzen sollte. Biochemische Hinweise sprechen dafür, dass das PTS1-Signal nicht abgespalten wird während des peroxisomalen Imports (De Hoop & Ab, 1992). So war auch bei der Analyse der PTS1-Region keine konservierte Erkennungssequenz für eine Signalpeptidase auffällig (Neuberger *et al.*, 2003a). Im Gegensatz dazu ist bei den Importmechanismen anderer Zellkompartimente (z.B. Endoplasmatisches Retikulum) die Prozessierung des transportierten Proteins notwendig zum Abschluss des Importvorgangs. Zwar werden einige PTS2-Proteine nach der Aufnahme in die Peroxisomen prozessiert, die Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz ist aber nicht obligatorisch und findet außerdem bei *S.cerevisiae* nicht statt (Borst, 1986; Swinkels *et al.*, 1991). Da somit für den peroxisomalen Import keine Signalprozessierung notwendig war, ließ sich die geringe Importeffizienz der ICL+AKL nicht mit einem Steckenbleiben in der Importmaschinerie erklären. Darüber hinaus wurde mit der *Sc* ICL ein homologes Protein modifiziert, dessen Expression und Proteinfaltung in *S.cerevisiae* optimal sein sollten. Trotzdem war ein ungünstiger Kontext als Ursache des geringen peroxisomalen Imports des Muteins denkbar. Dafür sprach, dass zur PTS1-Signalfunktion mindestens die letzten 12 Aminosäuren relevant sind (Neuberger *et al.*, 2003a) und sich der C-Terminus der peroxisomalen *Ashbya*-ICL in 6 dieser 12 Positionen von der ansonsten hochkonservierten Sequenz der *Sc* ICL unterschied. Anhand der Hefemutante *Sc* ICL $\Delta$ gPTS, bei der die letzten 15 Aminosäuren von der *Ag* ICL stammten, wurde gezeigt, dass die Importeffizienz des Signals AKL nicht vom Kontext der

PTS1-Region eines peroxisomalen Proteins abhängig war. So wurden trotz der C-terminalen Anpassung bei der *Sc ICLAg* PTS ebenfalls nur 4% der ICL-Aktivität im Organellpellet nachgewiesen.

Umso erstaunlicher war es, dass mit der heterolog exprimierten *Ag* ICL ein peroxisomaler Import von ~20% erreicht wurde. Dieser Unterschied in der Importeffizienz war mit einem zusätzlichen internen PTS der *Ag* ICL erklärbar. Versuche mit den Muteinen *Ag* ICL8K-6 (PTS1-Deletion) und *Ec ICLAg* DII (Insertion der *Ag* Domäne II die in *E.coli*-ICL) ergaben die Beteiligung von PTS1 und Strukturdomäne II an der Peroxisomensignalbildung der *Ag* ICL. Dabei blieb die Frage offen, warum der Import der *Ec ICLAg* DII mit 34% mehr als 10% effektiver gegenüber der *Ag* ICL war, obwohl das PTS des Hybrids in der *Ag* ICL Domäne II lag.

Eine einfache Erklärung war, dass die *Ec* ICL trotz ihrer cytosolischen Lokalisation die Voraussetzung zur Bildung eines Peroxisomensignals enthielt. So waren bei der *Candida*-ICL drei interne Regionen essentiell für den peroxisomalen Import (Kamasawa *et al.*, 1996). Die ICL-Muteine waren nicht mehr peroxisomal, sobald eine Region fehlte, zum Beispiel die Aminosäuren 237 - 340. Diese Region überlappt zu 70% mit dem Bereich der Strukturdomäne II, der bei prokaryotischen ICLs fehlt. Die Insertion der *Ag* Strukturdomäne II in die cytosolische *Ec* ICL könnte deshalb das fehlende Puzzlestück für ein aus mehreren internen Regionen bestehendes strukturelles Peroxisomensignal liefern. Als Ursache der erhöhten Importeffizienz der *Ec ICLAg* DII kam deshalb ein weiteres, zusätzliches PTS in Frage. Allerdings war es unwahrscheinlich, dass die Domäne II-Region als zweifaches Peroxisomensignal wirkte. Deshalb wurde für eine alternative Erklärung ein möglicher Zusammenhang zwischen der peroxisomalen Lokalisation und der ICL-Aktivität analysiert.

Die peroxisomale Importeffizienz der untersuchten ICL-Muteine ließ sich wie folgt ordnen: *Ec ICLAg* DII (34%) > *Ag* ICL+39, *Ag* ICL (beide ~20%) > *Ag* ICL8K-6 (~10%) > *Sc ICLAg* PTS, *Sc* ICL+AKL (beide ~4%). Die Mittelwerte der spezifischen ICL-Aktivitäten im zellfreien Homogenat (PNS) ergaben eine ähnliche Rangfolge, allerdings mit umgekehrter Gewichtung: *Ec ICLAg* DII, *Ag* ICL+39 (beide ~0,7mU/mg Protein) < *Ag* ICL, *Ag* ICL8K-6 (beide ~8mU/mg Protein) < *Sc ICLAg* PTS, *Sc* ICL+AKL (beide ~80mU/mg Protein).

Die spezifische Aktivität im PNS kann als Maßstab für die ICL-Konzentration innerhalb der Zelle dienen, da das Homogenat aus Cytosol, Mitochondrien, Peroxisomen und Lysosomen alle ICL-haltigen Kompartimente abdeckt. Die obigen Rangfolgen konnten deshalb auf einen kurzen Nenner gebracht werden: je niedriger die ICL-Konzentration, desto höher die Importeffizienz. Zu dem selben Ergebnis kamen auch Crookes & Olsen (1998) bei peroxisomalen ICL-Importversuchen in einem pflanzlichen *in vitro* System. Dabei lag keine Überforderung oder Substrathemmung der peroxisomalen Importmaschinerie vor. Stattdessen beeinflussten Chaperone und die Quartärstruktur die Effizienz des ICL-Imports. Chaperone sind auch beim Menschen und bei *S.cerevisiae* am peroxisomalen Import beteiligt (Terlecky *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2003; Hetteema *et al.*, 1998). Obwohl peroxisomale Proteine als Oligomer aufgenommen werden können, war die Importeffizienz höher für Monomere oder für mit Chaperonen assoziierte Proteine. So korrelierte die Tetramerbildung der ICL *in vitro* mit einer Abnahme der peroxisomalen Importeffizienz (Crookes & Olsen, 1998). Diese Korrelation war auch *in vivo* denkbar als Erklärung für den effizienteren Import der *Ec ICLAg* DII gegenüber der *Ag* ICL. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *A.gossypii* und *S.cerevisiae* könnte die cytosolische Oligomerisierung der *Ag* ICL durch Chaperone der cytosolischen *Sc* ICL unterstützt

werden. Dagegen war die Tetramerbildung des artifiziellen Hybrids *Ec ICLAg DII* unwahrscheinlicher.

Allerdings ist die Beantwortung der Frage, ob und wie effektiv eine Proteinsequenz als PTS funktioniert, auch ohne die Berücksichtigung von Chaperonen und der Proteinfaltung schon sehr kompliziert. Beispielweise gibt es Spezies-spezifische Unterschiede bei der Bevorzugung bestimmter PTS1-Tripeptide sowie der Bandbreite akzeptierter PTS1-Varianten (Aitchison *et al.*, 1991; Swinkels *et al.*, 1992; Mullen *et al.*, 1997; Neuberger *et al.*, 2003a), erklärbar mit den unterschiedlichen Substratspezifitäten der PEX5-Rezeptoren (Lametschwandtner *et al.*, 1998). Außerdem können der homologe Kontext der PTS1-Importmaschinerie sowie Hilfssequenzen den durch ungewöhnliche PTS1-Varianten vermittelten Import unterstützen (Elgersma *et al.*, 1996), wobei eventuell ein Schwellenwert für die Bindungsenergie des Rezeptors zum PTS1-Liganden überschritten wird (Gatto *et al.*, 2003). Darüber hinaus gibt es Fälle von getarnten PTS-Signalen, z.B. bei bakteriellen oder mitochondriellen Proteinen (Neuberger *et al.*, 2004). Eine vergleichbare Komplexität der Einflussgrößen ist auch für den durch atypische PTS-Signale vermittelten Import denkbar. Vor diesem Hintergrund war es nicht verwunderlich, dass alle ICL-Muteine dieser Arbeit eine unvollständige peroxisomale Lokalisation zeigten. Dennoch stellte sich die Frage, wie der erreichte Import im Vergleich zu Literaturdaten einzuordnen war.

Unvollständiger Import modifizierter Proteine ist ein häufiges Phänomen (z.B. McNew & Goodman, 1994) und teilweise abhängig von der Wahl des Reporterproteins (Elgersma *et al.*, 1996). Außerdem ist bei vielen experimentell als peroxisomal klassifizierten Proteinen aufgrund der angewandten Methode keine Aussage über die im Cytosol verbliebene Restmenge möglich. So bewirkt die Anreicherung des importierten Proteins in den nur 1,5% des Zellvolumens ausmachenden Peroxisomen (Berkaloff *et al.*, 1990) einen Konzentrationsunterschied, der bei der gut zu handhabenden Fluoreszenzdetektion zum Überstrahlen des Hintergrunds führt. Ähnlich wird bei der Immuno-Goldmarkierung die cytosolische Hintergrundmarkierung unterbewertet, da anstelle des gesamten Zellenquerschnitts nur peroxisomenreiche Ausschnitte ausgewertet werden. Beispielsweise wiesen in den Zellschnitten dieser Arbeit 34% der Goldkörner die peroxisomale *Sc ICL+AKL* nach, obwohl sich nur 4% der ICL im Organellpellet befanden. Zellpermeabilisierungen und Dichtegradienten liefern ebenfalls keine Verhältnisse der subzellulären Verteilung zwischen Cytosol und Organellpellet. Die Importeffizienz kann deshalb eigentlich nur per differentieller Zentrifugation beurteilt werden. Da das Verfahren selten angewandt wird, existieren nur wenige Literaturdaten zur Effizienz des peroxisomalen ICL-Imports.

Die subzelluläre Verteilung der *Ag ICL* in *A.gossypii* wurde nie näher untersucht. Allerdings lagen bei Immuno-Goldmarkierungen einige Goldpartikel im Cytosol (Maeting *et al.*, 1999) und Saccharose-Dichtegradienten präparierter Organelle zeigten eine ICL-Aktivität im Bereich der cytosolischen Fraktionen (Schmidt, 1996). Es ist daher wahrscheinlich, dass die *Ag ICL* auch in *Ashbya* teilweise im Cytosol vorliegt und somit in *S.cerevisiae* kein effizienter Import zu erwarten war. Andererseits wurde bei einem *Yarrowia lipolytica* Wildtyp 80% der ICL-Signalintensität im Organellpellet differentieller Zentrifugationen nachgewiesen (Eitzen *et al.*, 1997). Die Peroxisomenintaktheit dieser Versuche betrug etwa 90%. Die peroxisomale ICL wurde daher unter Wildtyp-Bedingungen hocheffizient importiert. Dieser Vergleichswert wurde bei den ICL-Importversuchen dieser Arbeit deutlich unterschritten. Allerdings bestand weder eine Wildtyp-Situation, noch wurde mit *Yarrowia* gearbeitet.

Bei *S.cerevisiae* war aufgrund der cytosolischen ICL kein Vergleich der peroxisomalen Importeffizienzen heterologer Muteine mit der Aufnahme der homologen *Sc* ICL möglich. Es gab aber mehrere Beispiele zum unvollständigen peroxisomalen Import anderer ICLs. Bimodale Verteilungen im Cytosol und den Peroxisomen wurden gezeigt für die Rizinus-ICL und die *Candida*-ICL in *S.cerevisiae* (Taylor *et al.*, 1996; Kamada *et al.*, 1992; Kamasawa *et al.*, 1996) sowie für die Raps-ICL in *Arabidopsis thaliana* (Olsen *et al.*, 1993). ICL-Importversuche in einem pflanzlichen *in vitro* System ergaben eine peroxisomale Importeffizienz von etwa 20%, die durch optimale Bedingungen (ATP-Zugabe, Chaperon-Induktion, geringe ICL-Konzentration) auf bis zu 50% gesteigert werden konnte (Behari & Baker, 1993; Gao *et al.*, 1996; Crookes & Olsen, 1998). Diese Werte stimmten gut mit den in *S.cerevisiae* gemessenen Importraten von 20% bei der *Ag* ICL und 34% bei der *Ec* ICL *Ag* DII überein. Der PTS1-vermittelte Import der *Sc* ICL-Muteine war mit 4% zwar gering, aber vergleichbar mit dem Literaturwert von 6% für den peroxisomalen Import der *Candida*-ICL in *S.cerevisiae* (Kamada *et al.*, 1992).

Der erzielte Import der ICL-Muteine war damit vergleichsweise gut, aber dennoch unvollständig. Dazu kam, dass auch die Wildtyp-Malatsynthase (MLS) überwiegend im Cytosol vorlag. Die beobachtete MLS-Verteilung stimmte mit dem Literaturwert einer 13 - 15%igen peroxisomalen MLS-Lokalisation überein (McCammon *et al.*, 1990). Verglichen mit der zu mehr als 80% peroxisomalen *Yarrowia*-MLS (Eitzen *et al.*, 1997) stellte sich daher die Frage nach dem Sinn des geringen ICL- und MLS-Imports in *S.cerevisiae*.

Ineffizienter Import führt auch unter Wildtyp-Bedingungen zu einer parallelen Lokalisation einiger Peroxisomenproteine in den Peroxisomen, den Mitochondrien und im Cytosol. Dabei wird oft eine Signalkombination aus einem Mitochondrien-*Target*-Signal (MTS) und einem ineffizienten PTS1 verwendet. Der Anteil an peroxisomalem Protein ist transkriptional regulierbar, indem entweder lange, MTS-haltige oder kürzere, MTS-lose Transkripte vorliegen. Da das N-terminale MTS bereits während der Proteinsynthese präsentiert wird, ist es normalerweise dem C-terminalen PTS1 übergeordnet, d.h. nur die kürzeren Transkripte ergeben ein peroxisomales Protein. Beispiele für diesen Mechanismus sind die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase von *Aspergillus niger* und die Alanin:Glyoxylat Aminotransferase der Säugetiere (Szewczyk *et al.*, 2001; Birdsey *et al.*, 2004). Analog wird bei *S.cerevisiae* die bimodale Lokalisation von Carnitin-Acetyltransferase und peroxisomaler Citrat-Synthase (Cit2p) durch PTS-haltige Peptide mit oder ohne MTS verursacht, deren Bildung auf translationaler Ebene reguliert wird (Elgersma *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000). Eine andere Variante zeigt der *bona fide* Peroxisomenmarker Katalase, dessen Lokalisation bei Säugetieren zu mehr als 90% ins Cytosol verschoben sein kann (Holmes & Masters, 1972): Die geringe Affinität des atypischen PTS1-Signals zum Importrezeptor PEX5 ist verantwortlich für die parallele cytosolische und peroxisomale Verteilung der Katalase (Horiguchi *et al.*, 2001). Insgesamt bietet der unvollständige peroxisomale Import den Vorteil der Mehrfach-Kompartimentierung eines einzelnen Enzyms als Antwort auf veränderte Stoffwechselanforderungen, z.B. bei der Entgiftung von cytosolischem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch eine delokalisierte Katalase.

Da das für den Glyoxylatweg benötigte Acetyl-CoA in *S.cerevisiae* je nach Kohlenstoffquelle in den Peroxisomen oder im Cytosol entsteht, ermöglicht der unvollständige peroxisomale Import der beiden Schlüsselenzyme ICL und MLS die Reaktion am Ort der Acetyl-CoA Bildung. Der partielle Import erhöht dabei die Flexibilität in der Lokalisation und stellt eine Alternative zu Isoenzymen dar. So kommen z.B. mit den NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen auch

andere Isocitrat-umsetzende Enzyme in den Mitochondrien, den Peroxisomen oder im Cytosol vor (Henke *et al.*, 1998; Contreras-Shannon & McAlister-Henn, 2004), bei denen sich allerdings ebenfalls die Frage stellt, ob partiell oder vollständig transportiert wird.

## 2. Die *Ag* ICL Strukturdomäne II: ein neuartiges PTS

In dieser Arbeit wurde mit der ICL von *A.gossypii* gearbeitet, deren peroxisomale Lokalisation bereits bekannt war (Maeting *et al.*, 1999). Es sollte die noch offene Frage geklärt werden, wie der peroxisomale Import der *Ag* ICL vermittelt wird.

Für den Import peroxisomaler Matrixproteine gibt es mindestens drei Transportwege, die auf verschiedenen Signalsequenzen (PTS) beruhen (Zhang *et al.*, 1993). Mehr als 90% der bekannten Matrixproteine besitzen ein dem Konsensus (S/A/C) (K/R/H) (L/M) entsprechendes PTS1-Tripeptid am C-terminalen Ende (Maynard *et al.*, 2004). Auch der C-Terminus der *Ag* ICL entspricht mit AKL (Alanin-Lysin-Leucin) dem PTS1-Konsensus. Dennoch konnte anhand von *Ag* ICL-Muteinen mit verändertem C-Terminus gezeigt werden, dass die peroxisomale Lokalisation der *Ag* ICL nicht nur PTS1-abhängig war. Es wurden ein PTS1-Deletionsmutein (*Ag* ICL8K-6) und ein um 39 Aminosäuren verlängertes Mutein (*Ag* ICL+39) untersucht, die beide kein funktionales PTS1-Signal besitzen sollten, da die Signalwirkung des PTS1-Tripeptids von der freien Carboxylgruppe am letzten Aminosäurerest des C-Terminus abhängig ist (Gould *et al.*, 1988 & 1989; Miura *et al.*, 1992). Die Halbierung der Importeffizienz von 20% auf 9% beim PTS1-Deletionsmutein wies dennoch auf eine Beteiligung des C-Terminus an der Signalbildung hin. Denkbar war die Verminderung einer Rezeptor-Interaktion, analog zur Relevanz der C-Terminuslänge für den peroxisomalen Import von Rizinus ICL-Muteinen in *S.cerevisiae* (Parkes *et al.*, 2003). Zusätzlich spielt der C-Terminus auch für katalytische Wechselwirkungen und/oder die strukturelle Enzymstabilität eine Rolle (Vanni *et al.*, 1990). Die Verringerung der spezifischen ICL-Aktivität im zellfreien Homogenat (PNS) auf  $1/10$  bei der *Ag* ICL+39 war deshalb durch eine Beeinträchtigung der Enzymstabilität erklärbar. Insgesamt hatte die PTS1-Region der *Ag* ICL damit unterstützende Funktionen für die Enzymaktivität und den peroxisomalen Import, war aber nicht zwingend notwendig, weshalb ein zusätzliches Signal vorlag. Diese These wurde unterstützt durch den 5-fach höheren Import des *Ag* ICL-Gesamtproteins im Vergleich zu einem *Sc* ICL-Mutein mit der PTS1-Region der *Ag* ICL (*Sc* ICL<sub>Ag</sub> PTS).

Die *Ag* ICL war daher einer Gruppe von peroxisomalen Matrixproteinen zuzuordnen, die weder PTS1 noch PTS2 ausschließlich nutzen (Subramani, 1998). Die Importmechanismen solcher Matrixproteine basieren auf internen Signalsequenzen (Klein *et al.*, 2002), PTS1 + PTS2 (Waterham *et al.*, 1994), einer Kombination aus PTS1/2 und einem zusätzlichen Signal (Kragler *et al.*, 1993; Elgersma *et al.* 1995; Karpichev & Small, 2000) oder einem Huckepack-Import (*piggyback*) mit einem anderen peroxisomalen Protein (Yang *et al.*, 2001) oder einem signaltragenden Monomer (Lee *et al.*, 1997).

Interessanterweise ist der Importweg innerhalb einer Enzymfamilie nicht konserviert. So vermittelt eine interne Region den Import der Acyl-CoA Oxidase von *S.cerevisiae*, *Candida* und *Yarrowia*, während der peroxisomale Import der Pendants von *Pichia* und Säugetieren PTS1-abhängig ist (Klein *et al.*, 2002; Koller *et al.*, 1999).

Auch innerhalb der hochkonservierten Enzymfamilie der Isocitrat-Lyase gibt es Vertreter mit und ohne PTS1. Prokaryotische ICLs unterscheiden sich von eukaryotischen durch das Fehlen einer ca. 100 Aminosäuren umfassenden Strukturdomäne II. Mit Ausnahme dieser Region sind

sie aber ebenfalls stark konserviert, sowohl bzgl. der Aminosäure-Sequenz (siehe Abb. 11) und der Sekundärstrukturelemente (siehe Abb. 13) als auch hinsichtlich des katalytischen Mechanismus und möglicher Inhibitoren (Hoyt *et al.*, 1988; Vanni *et al.*, 1990). Seit der Isolierung und Sequenzierung der *E.coli*-ICL (Matsuoka & McFadden, 1988) wurde deshalb über eine Funktion der eukaryoten-spezifischen Insertion für den peroxisomalen Import spekuliert. Die Hypothese war interessant als Ansatzpunkt für die Suche nach dem zusätzlichen PTS der *Ag* ICL. Zunächst wurde deshalb die bisher stillschweigend angenommene Grundvoraussetzung überprüft, dass die peroxisomale Lokalisation nur für eukaryotische ICLs zutrifft. So wurde die cytosolische Lokalisation einer aktiven prokaryotischen ICL in einem Eukaryoten erstmals im Rahmen dieser Arbeit anhand der *Ec* ICL in *S.cerevisiae*  $\Delta$ ICL gezeigt. Die Voraussetzung für einen möglichen Zusammenhang zwischen dem peroxisomalen Import und der Strukturdomäne II war damit erfüllt, zumal weitere Hinweise ebenfalls dafür sprachen.

So ergab die Strukturaufklärung von *Aspergillus nidulans*-ICL die für ein mögliches Signal essentielle Exposition der eukaryoten-spezifischen Domäne II im ICL-Tetramer (Britton *et al.*, 2000). Zusätzlich lieferten Aminosäure-Sequenzvergleiche von Proteinen mit atypischen Importmechanismen interessante Parallelen: Eine bei drei peroxisomalen Pflanzenproteinen gefundene Homologiesequenz wies signifikante Ähnlichkeiten zu einer putativen internen *Target*-Sequenz der *Candida*-Acyl-CoA Oxidase und dem Anfang der Rizinus-ICL Domäne II auf (Beeching, 1989). Außerdem wurde die Aminosäure-Sequenz (126 - 140) eines zusätzlichen PTS der *Sc* Katalase A (Kragler *et al.*, 1993) beim MultAlign-Sequenzvergleich mit Pilz-ICLs dem Ende der Strukturdomäne II zugeordnet (diese Arbeit). Nicht zuletzt enthielt die Mitte des Strukturdomäne II- Bereiches der PTS1-losen ICL-Sequenzen von *Aspergillus* und *Neurospora* zwei von drei partiellen Aminosäure-Sequenz-Wiederholungen, die große Ähnlichkeit zu anderen eukaryotischen ICLs und peroxisomalen Malatsynthasen (MLS) zeigten (Gainey *et al.*, 1992). Dabei wurde interessanterweise für *S.cerevisiae* nur eine Übereinstimmung bei der peroxisomalen MLS, nicht aber bei der cytosolischen ICL gefunden.

Weder die cytosolische ICL noch ausschließlich PTS1-abhängige peroxisomale ICLs sollten das mutmaßliche interne Peroxisomensignal enthalten. Daher ermöglichte auch der in Abb. 11 präsentierte Sequenzvergleich der PTS1-haltigen und PTS1-losen ICLs eine Eingrenzung der Signalregion. Die hohe Konservierung pflanzlicher ICLs war dabei besonders hilfreich. So ist der Import der ICLs von Raps und Baumwolle PTS1-abhängig (Olsen *et al.*, 1993; Trelease *et al.*, 1994), während die Rizinus-ICL trotz der hohen Konservierung (85% Identität der Aminosäure-Sequenzen zur Raps-ICL bzw. 90% zur Baumwolle-ICL) ein zusätzliches Signal besitzt (Behari & Baker, 1993). Dieses zusätzliche Signal wurde deshalb in einem Bereich mit signifikant geringerer Sequenzkonservierung vermutet, so dass vor allem das dritte Viertel der Domäne II-Sequenz als Signalregion in Frage kam.

Insgesamt wiesen somit sowohl die Literaturdaten als auch die Sequenzvergleiche dieser Arbeit auf eine mögliche Funktion der ICL-Strukturdomäne II als PTS hin. Da die peroxisomale *Ag* ICL ein zusätzliches Signal enthielt, konnte sie zur Überprüfung der These verwendet werden. Darüber hinaus stand mit der *Ec* ICL ein geeignetes Reporterprotein zur Verfügung, das aufgrund der cytosolischen Lokalisation sowie der hohen Konservierung die direkte Insertion möglicher ICL-Signalsequenzen erlaubte. So gute Voraussetzungen sind selten, weshalb die genaue Definition interner PTS-Signale meist am Kontext der Fusionsproteine scheitert oder nur als indirekte Eingrenzung anhand der Lokalisation verschieden langer

Deletionskonstrukte erfolgt. Verglichen mit anderen Import-Analysen modifizierter ICLs ergab sich ein weiterer Vorteil: in der vorliegenden Arbeit blieb die Aktivität aller ICL-Muteine messbar, sogar beim Hybrid *Ec ICLAg DII*. Die subzelluläre Lokalisation konnte deshalb mit zwei Methoden abgesichert werden: Enzymtests und Western Blots. Die übliche Untersuchung der peroxisomalen Importeffizienz nur anhand von Western Blots birgt das Risiko einer Unterschätzung, verursacht durch eine Verringerung der Antikörperspezifität für Fusionsproteine oder Muteine. So zeigte das in dieser Arbeit verwendete Anti-*Ag* ICL-Serum keine Kreuzreaktion mit der *Ec* ICL und detektierte deshalb nur den *Ag* ICL-Anteil des Hybrids, der lediglich 20% der Proteinsequenz ausmachte. Die Western Blot Signalintensität im Organellpellet lag dementsprechend deutlich unter dem per Enzymtest gemessenen ICL-Anteil. Das Sensitivitätsproblem trat beim PNS und Überstand nicht auf, da die dort vorliegenden ICL-Konzentrationen zu maximalen Western Blot Signalen führten. Sowohl die Enzymtests als auch die Western Blots wiesen einen signifikanten Anteil der *Ec ICLAg DII* im Organellpellet nach. Darüber hinaus stufte die Co-Lokalisation im Dichtegradienten das Hybrid als partiell peroxisomal und unabhängig vom PTS1-Rezeptor PEX5 ein.

Die Hypothesen zur Beteiligung der Strukturdomäne II am peroxisomalen Import eukaryotischer ICLs wurden damit am Beispiel der *Ag* ICL untermauert. Dabei blieb die Frage offen, ob die Signalwirkung auf einzelnen Sequenzbereichen oder der gebildeten Tertiärstruktur basierte. Eine zusammengesetzte strukturelle Signalkombination wurde beispielsweise für die *Candida*-ICL postuliert aufgrund von drei für den peroxisomalen Import essentiellen Sequenzregionen (Kamasawa *et al.*, 1996). Darüber hinaus könnte die *Ag* ICL anstelle eines "echten" PTS auch eine Interaktion zum Huckepack-Import nutzen. Ein Hinweis darauf war die starke Assoziation vieler eukaryotischer ICLs mit Katalase (Vanni *et al.*, 1990), die auch die Aufreinigung der *Ag* ICL aus *A.gossypii* erschwerte (Schmidt, 1996). Die direkte physikalische Interaktion der beiden Peroxisomenproteine wurde aktuell mit verschiedensten Methoden gezeigt und als Schutzfunktion gegen eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inaktivierung der ICL interpretiert (Yanik & Donaldson, 2005). Nach Yang *et al.* (2001) genügte für den Huckepack-Import das Peroxisomensignal eines Interaktionspartners. Da Katalase das typische Peroxisomen-Markerenzym ist, wurde die peroxisomale Lokalisation der meisten eukaryotischen ICLs anhand der Katalase Co-Lokalisation nachgewiesen. Für die cytosolische *Sc* ICL war eine Interaktion mit der als Sonderfall vorkommenden cytosolischen Katalase T denkbar. Aber bei den anderen ICLs bestand theoretisch die Möglichkeit eines Huckepack-Imports mit der peroxisomalen Katalase. Allerdings sprachen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Importversuche in *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5 eindeutig gegen einen Katalase-vermittelten Huckepack-Import, zumindest für die *Ag* ICL. So war aufgrund der PEX5-Disruption die peroxisomale Katalase A im Cytosol delokalisiert, während sowohl die *Ag* ICL8K-6 als auch die *Ec ICLAg DII* zu signifikanten Anteilen in der Organellfraktion nachgewiesen wurden. Dieser Import war neu vor dem Hintergrund, dass bisher nur PEX5 als Rezeptor bei alternativem peroxisomalen Matrixproteinimport beschrieben wurde (Sparkes & Baker, 2002). Daher war es wichtig, eine Fehlinterpretation des ICL-Imports in andere Zellstrukturen mit Peroxisomen-ähnlichen Sedimentationsmerkmalen auszuschließen.

Eine solche Zellstruktur könnten Proteinaggregate sein, die seit 1987 (Distel *et al.*) mehrfach bei Importanalysen verkürzter peroxisomaler Proteine oder Fusionskonstrukte beobachtet wurden. So unterschieden sich in *S.cerevisiae* untersuchte Katalase A-Fusionsproteine weder

im Saccharose- noch im NycoDenz-Dichtegradienten von peroxisomalen Markerenzymen, obwohl per Elektronenmikroskopie und Immuno-Goldmarkierung keine peroxisomale Lokalisation gezeigt werden konnte (Hartig *et al.*, 1990). Stattdessen befanden sich die Fusionsproteine außerhalb von Organellen im Cytosol und bildeten große Aggregate. Bei in *S.cerevisiae* exprimierten *Candida tropicalis* ICL-Muteinen wurde eine nur partielle peroxisomale Lokalisation und parallele ICL-Aggregatbildung beobachtet (Kamada *et al.*, 1992; Kamasawa *et al.*, 1996 & 1999). Die Aggregatbildungen waren als Überforderung der peroxisomalen Importmaschinerie erklärbar, entweder aufgrund einer starken Plasmid-Überexpression (20 - 50 Kopien der Katalase A-Plasmide) (Binder *et al.*, 1991) oder durch die Verwendung eines starken Promotors (die *Candida* ICL-Muteine machten bis zu 30% des löslichen *S.cerevisiae* Proteins aus) (Atomi *et al.*, 1996). Zusätzlich könnte auch die heterologe Expression die Aggregation begünstigt haben, falls die zur korrekten Faltung des fremden Proteins benötigten Bedingungen nicht vorlagen (Mitraki & King, 1989).

Da die ICL-Muteine der vorliegenden Arbeit ebenfalls heterolog und plasmidcodiert exprimiert wurden, stellte sich die Frage, ob der vermeintliche PEX5-unabhängige peroxisomale Import eine fehlinterpretierte Proteinaggregation war. Zur Überprüfung wurden Dünnschnitte ganzer Hefezellen per Elektronenmikroskopie und Immuno-Goldmarkierung untersucht. Diese Methodenkombination gilt als die sicherste zum Nachweis von Proteinaggregaten (Binder *et al.*, 1991). Im Stammhintergrund *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5 wurden weder bei der *Ag* ICL8K-6 noch bei der *Ec* ICLAg DII ICL-Aggregate gefunden. Dabei wurde mit dem Anti-*Ag* ICL-Serum keine eindeutige Peroxisomendetektion erreicht sondern nur eine diffuse Hintergrundmarkierung, die bei der *Ec* ICLAg DII stärker war als bei der *Ag* ICL8K-6. Dieser Markierungsunterschied stimmte mit dem stark erhöhten Hintergrund der *Ec* ICLAg DII-Detektion in Western Blots überein. Da die Immuno-Goldmarkierung zum Teil sehr schwach ausfiel, fehlten wahrscheinlich auch bei der *Ag* ICL8K-6 wichtige Epitope für die Detektion. Tatsächlich führt der zur Zellfixierung verwendete Glutaraldehyd zu einer Vernetzung und Maskierung der Aminosäuregruppen der Zellproteine und vermindert dadurch den Epitop-Charakter sowie die Sensitivität. Dazu kam die geringe spezifische Aktivität der heterologen ICL-Varianten im zellfreien Homogenat (PNS), die auf eine geringe Menge an immuno-reaktivem Protein innerhalb der Zelle hinwies. Damit könnten weder die ICL-Menge noch die Antikörperspezifität ausreichend gewesen sein für den Nachweis der peroxisomalen Lokalisation per Immuno-Goldmarkierung. Diese Sensitivitätsprobleme sollten sich allerdings nicht auf das Erkennen möglicher Proteinaggregate auswirken, denn die beschriebenen Aggregate waren normalerweise eindeutig per Elektronenmikroskopie sichtbar als membranlose, große Partikel von unregelmäßiger Form und Oberfläche (Kamasawa *et al.*, 1999). Trotz gezielter Suche konnte der Elektronenmikroskopie-Partner (Arbeitsgruppe Veenhuis, Groningen) keine solchen Einschlüsse bei den ICL-Mutanten finden. Fünf weitere Argumente sprachen ebenfalls für eine peroxisomale Lokalisation und gegen fehlinterpretierte Aggregate:

- 1.) Die Hintergrundmarkierung war diffus und variabel innerhalb der Zellpopulation. Es war keine Interpretation als „cytosolisch“ oder „nicht-peroxisomal“ möglich.
- 2.) Die beschriebenen Aggregatbildungen wurden durch Überexpression und Überforderung der peroxisomalen Importkapazität verursacht. Die Übersättigung mit *Ag* ICL8K-6 oder *Ec* ICLAg DII war unwahrscheinlich wegen des peroxisomalen Imports ohne Aggregation bei *Sc* ICL+AKL trotz der signifikant höheren spezifischen ICL-Aktivität dieser chromosomalen Mutante. Außer-

dem sollte die Verwendung des *Ag* ICL- bzw. *Sc* ICL-Promoters die Überexpression vermeiden. Dafür sprachen auch die auf Ölsäure gemessenen geringen Enzymaktivitäten im Vergleich zu Ethanol.

3.) Nach Hartig *et al.* (1990) enthielten die Einschlüsse neben den 1 - 2% des Gesamtzellproteins ausmachenden, hochexprimierten Fusionsproteinen Chaperone oder Hitzeschockproteine, die die Aggregate auf bis zu 25% des Zellvolumens vergrößerten. Diese Assoziation verhinderte die korrekte Faltung und/oder Oligomerisierung. Dadurch waren die aggregierten Muteine trotz vorhandener Oligomerisierungsdomänen nicht enzymatisch aktiv. Dagegen blieb die Enzymaktivität der Muteine messbar bei einer ausschließlich cytosolischen Lokalisation ohne Aggregatbildung (Hartig *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1992). Die ICL-Aktivität der Muteine *Ag* ICL8K-6 und *Ec* ICLAg DII konnte gut gemessen werden. Dabei widersprach vor allem die aktive ICL der Organellfraktion einem cytosolischen Aggregat aus mit Chaperonen assoziierten, inaktiven Monomeren.

4.) Die die peroxisomale Co-Lokalisation zeigenden Dichtegradienten wurden mit Organellpellets beladen. Da diese Pellets von kurzen differentiellen Zentrifugationen stammten, müssten mögliche enthaltene Aggregate eine hohe Dichte und/oder eine gewisse Größe aufweisen. Gegen eine hohe Dichte sprach die gut messbare ICL-Aktivität, da hochangereicherte Einschlusspartikel meist komplett inaktiv sind. Große Aggregate dagegen sollten per Elektronenmikroskopie in den Ultradünnschnitten deutlich sichtbar sein, was nicht der Fall war.

5.) Die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ist meistens ausreichend zur Unterscheidung zwischen Peroxisomen und Proteinaggregaten. In *Pichia pastoris* konnten mit dieser Methode sogar zwei Peroxisomenpopulationen getrennt werden (Kalish *et al.*, 1996). Die nicht abtrennbaren Katalase A-Fusionspartikel (Hartig *et al.*, 1990) waren deshalb ein Sonderfall verglichen mit anderen Einschlüssen. So co-fraktionierten die Aggregate aus modifizierter *Candida*-ICL bereits mit den Nuclei und waren daher weder im PNS noch im daraus abgetrennten Organellpellet enthalten (Kamasawa *et al.*, 1996). Aggregate von *Hansenula*-Fusionsproteinen befanden sich bei differentieller Zentrifugation zwar im Organellpellet, sedimentierten im Saccharose-Gradienten aber zu einer höheren Dichte als die peroxisomalen Markerproteine (Hansen *et al.*, 1992).

Als Fazit aller Argumente wurden Aggregate, die eine peroxisomale Lokalisation vortäuschten, ausgeschlossen. Die ICL-Aktivität im Organellpellet sowie die deutliche Co-Lokalisation mit Thiolase im Dichtegradienten wiesen deshalb auf eine partielle peroxisomale Lokalisation der *Ag* ICL8K-6 bzw. der *Ec* ICLAg DII in *Sc* ICL  $\Delta$ PEX5 hin. Beide ICL-Muteine enthielten somit ein neuartiges, PEX5-unabhängiges Peroxisomensignal im Bereich der *Ag* ICL Strukturdomäne II.

### 3. PEX5 und der Import von Proteinen ohne PTS1 oder PTS2

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der peroxisomale Import der ICL-Muteine *Ag* ICL8K-6 und *Ec* ICLAg DII unabhängig vom Rezeptor PEX5 und einem PTS1-Signal stattfand. Da PEX5 den Import einiger ICLs (Olsen *et al.*, 1993; Parkes *et al.*, 2003) und von über 90% aller bekannten peroxisomalen Matrixenzyme (Maynard *et al.*, 2004) vermittelt, war interessant, welche Voraussetzungen einen PEX5-abhängigen Import ermöglichen und wie Proteine ohne die typischen Signale PTS1 und PTS2 importiert werden.

Der PTS1-Rezeptor PEX5 gehört zu den am besten untersuchten Peroxinen und wurde bereits bei vielen unterschiedlichen Organismen isoliert (vgl. Eckert & Erdmann, 2003). Das überwiegend cytosolische Protein zirkuliert im Rahmen seiner Rezeptorfunktion zwischen den Peroxisomen und dem Cytosol und ist durch Spezies-übergreifend konservierte TPR-Motive charakterisiert. Der Tetratricopeptid *Repeat* (TPR) enthält eine Wiederholungssequenz aus 34 Aminosäuren, die eine *Helix-Turn-Helix* Struktur bilden. TPR-Motive vermitteln Protein-Protein Wechselwirkungen. Zudem können auch andere Sequenzmotive zur Assoziation von Proteinen beitragen. So besteht PEX5 aus (mindestens) zwei Domänen: einer C-terminalen Domäne aus 7 - 9 TPR-Motiven zur Interaktion mit dem PTS1-Signal (Brocard *et al.*, 1994; Gatto *et al.*, 2000) sowie einer N-terminalen Domäne mit hochkonservierten Pentapeptid-Wiederholungen für die Interaktion mit den Peroxinen des *Docking* Komplexes (Saidowsky *et al.*, 2001; Otera *et al.*, 2002). Der PEX5-abhängige Import von PTS1-Proteinen benötigt also die PEX5 TPR-Motive und die C-terminalen 12 Aminosäuren der peroxisomalen Proteine (Neuberger *et al.*, 2003a).

Darüber hinaus ist PEX5 auch am Import einiger Matrixproteine mit atypischen PTS-Signalen beteiligt. So führte eine PEX5-Disruption neben der Delokalisierung der PTS1-Proteine auch zu einer Verringerung des peroxisomalen Katalase A-Anteils auf unter 20% (van der Leij *et al.*, 1993). Die Katalase A-Delokalisierung wurde bei der  $\Delta$ PEX5-Mutante der vorliegenden Arbeit bestätigt (siehe Abb. 19B) und ist bemerkenswert, da die Katalase A ein zweites, PTS1-unabhängiges Peroxisomensignal besitzt (Kragler *et al.*, 1993). Nach *Two-Hybrid*-Versuchen interagieren PEX5 und Katalase je nach Organismus entweder nur in der PTS1-Region (Purdue & Lazarow, 1996) oder zusätzlich in einem internen Bereich der Katalase-Sequenz (Kamigaki *et al.*, 2003). Der Interaktionsbereich bei PEX5 wurde nicht charakterisiert.

Allerdings zeigen Proteine mit internen PTS-Signalen oft eine PEX5-Bindung außerhalb der TPR-Region. So war die N-terminale Hälfte (Aminosäuren 1 - 272) von *Hansenula polymorpha* PEX5 ausreichend als Rezeptor für den Import der *Hansenula*-Alkohol Oxidase (Gunkel *et al.*, 2004). In *S.cerevisiae* waren die bimodale Carnitin-Acetyltransferase (MTS + PTS) sowie die PTS1/2-lose Acyl-CoA Oxidase trotz einer PEX5 TPR-Inaktivierung überwiegend in den Peroxisomen lokalisiert (Klein *et al.*, 2002). Mit verschiedenen Methoden wurde der Interaktionsbereich auf die *Sc* PEX5 Aminosäuren 239 - 300 eingegrenzt, wobei die Bindestellen der beiden Substratproteine nur teilweise überlappten.

Anstelle einer TPR-unabhängigen, direkten PEX5-Interaktion wird beim Import der Alanin:Glyoxylat Aminotransferase ein zusätzlicher cytosolischer Faktor als "Adaptermolekül" vermutet (Knott *et al.*, 2000). Die Hypothese basiert auf der Notwendigkeit von Helfer-Peroxinen beim PTS2-vermittelten peroxisomalen Import bei einigen Organismen (Eckert & Erdmann, 2003). Auch die neuronale Funktionsstörung Acatalasaemia bei Säugetieren ist mit einem fehlenden Helfer-Peroxin erklärbar. Bei der Krankheit befanden sich PTS1/2-haltige Proteine normal in den Peroxisomen, doch Katalase fehlte und wurde erst als SKL-Mutein importiert (Sheikh *et al.*, 1998). Ein Importdefekt der humanen Katalase war somit sowohl bei funktionalem PEX5-Rezeptor (Acatalasaemia) als auch durch eine PEX5-Disruption (Purdue & Lazarow, 1996) möglich. Der Katalase-Import könnte deshalb neben PEX5 ein Vermittlerprotein benötigen, dessen Fehlen Acatalasaemia verursacht. In *Yarrowia lypolytica* wurde mit PEX16 bereits ein Peroxin gefunden, das eventuell als Vermittler zwischen Katalase und PEX5 fungieren könnte. So führte eine PEX16 Disruption zur fast vollständigen cytosolischen Delokalisierung von Katalase, Thiolase und Isocitrat-Lyase, während andere Peroxisomen-

proteine nicht oder kaum betroffen waren (Eitzen *et al.*, 1997). Gegen eine Vermittlerfunktion von PEX16 sprachen die Lokalisation auf der Innenseite der Peroxisomenmembran sowie der parallele Importdefekt von Katalase und Thiolase, der bei Acatalasaemia nicht vorlag.

Die Beispiele verdeutlichen, dass neben den bekannten Importmechanismen über PEX5 und PEX7 zusätzliche Varianten mit anderen Interaktionen existieren, interessanterweise auch für eine ICL (*Yarrowia*). Da die Helfer-Peroxine meist Spezies-spezifisch waren, sind alternative Importmechanismen ebenfalls als Spezies-spezifischer oder Protein-spezifischer Einzelfall denkbar. Die ICL könnte so ein Protein mit einem ungewöhnlichen Importmechanismus sein. Ein Indiz dafür war die PEX5-Abhängigkeit des peroxisomalen Imports von Rizinus-ICL und Rizinus-ICL $\Delta$ 19 in *S.cerevisiae*, obwohl keine *Two-Hybrid*-Interaktion der entsprechenden ICL C-Termini mit der PEX5 TPR-Domäne vorlag (Parkes *et al.*, 2003). Für die Rizinus-ICL wurde deshalb eine unkonventionelle PEX5-Bindung vermutet, analog zur Acyl-CoA Oxidase.

Im Gegensatz zur Rizinus-ICL widersprach die peroxisomale Lokalisation von *Ag* ICL8K-6 und *Ec* ICL*Ag* DII in *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5 einem PEX5-abhängigen Import. Es wurde nicht überprüft, ob eine Interaktion mit dem PTS2-Rezeptor PEX7 vorlag. Zwar zeigte der *Ag* ICL N-Terminus keine Übereinstimmung mit dem PTS2-Konsensus (Petriv *et al.*, 2004), der Import könnte jedoch auch über ein an PEX7 bindendes Helfer-Peroxin vermittelt werden. Alternativ war ein PEX5-unabhängiger, neuer Importmechanismus denkbar. Hinweise für die Existenz von mindestens einem weiteren Importweg in *S.cerevisiae* lieferten zum Beispiel der peroxisomale Import der Citrat-Synthase Cit2p und der Isomerase Dci1p in Abwesenheit von PEX5 und PEX7 (Lee *et al.*, 2000; Karpichev & Small, 2000).

#### 4. Lokalisation und Regulation des Glyoxylatwegs am Beispiel der ICL

Die ICL ist ein vielfach reguliertes Schlüsselenzym des Glyoxylatwegs, der durch die Überbrückung der Decarboxylierungsschritte des Citratzyklus ein Zellwachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ermöglicht (vgl. Einleitung, Kapitel I.2).

Da von allen bisher untersuchten Eukaryoten nur die ICL der Bäckerhefe cytosolisch ist, stellte sich die Frage, ob die subzelluläre Lokalisation der *Sc* ICL einen Vor- oder Nachteil gegenüber den peroxisomalen ICLs bedeutet. Auffällig war, dass bei den verschiedenen ICL-Muteinen dieser Arbeit immer der cytosolische Anteil überwog und kein vollständiger peroxisomaler Import einer ICL in *S.cerevisiae* erreicht wurde. Diese Beobachtung könnte mit der subzellulären Anordnung des Glyoxylatwegs zusammenhängen.

Der Glyoxylatweg gliedert sich in einen zyklischen Teil (Glyoxylatzyklus, siehe Abb. 3) und die Reaktionen des Citratzyklus, die das bei der ICL-Reaktion freigesetzte Succinat umwandeln. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass die fünf Reaktionen des Glyoxylatzyklus wiederholt ablaufen und das gebildete Succinat für den Aufbaustoffwechsel zur Verfügung steht (Nelson & Cox, 2000; Madigan *et al.*, 2001). Während die Succinat-Umwandlung in den Mitochondrien stattfindet, ist die Lokalisation des Glyoxylatzyklus umstritten. Untersuchungen der 1960er Jahre sprachen für eine peroxisomale bzw. glyoxysomale Lokalisation der fünf beteiligten Enzyme (ICL, MLS, Malat-Dehydrogenase, Citratsynthase, Aconitase) bei Pflanzenkeimlingen und vielen Pilzen (z.B. Cooper & Beevers, 1969). *S.cerevisiae* bildete eine Ausnahme, da die Schlüsselenzyme ICL und MLS nur im Cytosol nachgewiesen wurden und die anderen drei Enzyme sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien vorlagen (Duntze *et al.*, 1969). Für *S.cerevisiae* war deshalb ein cytosolischer Glyoxylatzyklus denkbar. Heute ist bekannt, dass der

Glyoxylatzyklus von Pflanzen partiell cytosolisch lokalisiert ist aufgrund der cytosolischen Aconitase (Eastmond & Graham, 2001). Im Gegenzug gibt es einige Hinweise für einen partiell peroxisomalen Glyoxylatzyklus bei *S.cerevisiae*. So war trotz der cytosolischen ICL die MLS zu einem geringen Anteil peroxisomal (McCammon *et al.*, 1990), wie differentielle Zentrifugationen dieser Doktorarbeit bestätigten. Darüber hinaus wurde die beteiligte Citratsynthase (Cit2p) zum Teil in den Peroxisomen nachgewiesen (Lee *et al.*, 2000). Interessanterweise waren damit genau die beiden Enzyme partiell peroxisomal, die die Acetyl-CoA Schritte des Glyoxylatzyklus katalysieren. Da Acetyl-CoA beim Abbau von Fettsäuren in den Peroxisomen entsteht, könnte die peroxisomale Lokalisation durch den direkten Substratzugriff vorteilhaft sein beim Wachstum auf Ölsäure (Kunze *et al.*, 2002). Analog wäre ein cytosolischer Glyoxylatzyklus günstiger beim Wachstum auf C-Quellen, die cytosolisches Acetyl-CoA liefern, wie z.B. Ethanol oder Acetat. Mehrere Argumente wiesen darauf hin, dass die cytosolische Anordnung des Glyoxylatzyklus bei *S.cerevisiae* überwiegt. So waren zum Wachstum auf Acetat keine Peroxisomen notwendig (Erdmann *et al.*, 1989) und eine Hefemutante konnte trotz cytosolischer MLS (MLS $\Delta$ SKL) auf Ölsäure wachsen (Kunze *et al.*, 2002). Darüber hinaus wuchs die Bäckerhefe besser auf Ethanol oder Acetat als auf Ölsäure (siehe Abb. 5), d.h. der Stoffwechsel war bei cytosolisch gebildetem Acetyl-CoA effektiver.

Bei einem cytosolischen Glyoxylatzyklus ist die cytosolische Lokalisation der *Sc* ICL kein Nachteil, trotz der Ausnahmeposition verglichen mit den peroxisomalen ICLs anderer Eukaryoten. Stattdessen schien die cytosolische ICL für den *S.cerevisiae* Glyoxylatzyklus vorteilhaft zu sein. So wuchs eine komplementierte *Sc*  $\Delta$ ICL-Mutante je besser, desto größer der cytosolische Anteil der heterologen ICL war (diese Arbeit). Auch der unvollständige peroxisomale Import aller untersuchten ICL-Muteine könnte auf einer Bevorzugung der cytosolischen ICL-Lokalisation basieren. Dabei war die Einbindung der ICL in eine cytosolische Reaktionsabfolge denkbar, analog zu der vermuteten Metabolon-Organisation des pflanzlichen Glyoxylatzyklus (Beeckmans *et al.*, 1994). Dennoch blieb die Frage offen, welche Vorteile die cytosolische *Sc* ICL gegenüber der peroxisomalen ICL anderer Eukaryoten bot. Deshalb wurden die Eigenschaften der ICLs verglichen.

Generell sind ICLs hochkonserviert, unter anderem hinsichtlich des katalytischen Mechanismus, der Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit und möglicher Inhibitoren (Vanni *et al.*, 1990). Zusammen mit den anderen Enzymen des Glyoxylatwegs und z.T. der Gluconeogenese erfolgt eine transkriptionale Regulation der ICL-Aktivität durch eine Kombination aus Repression und Induktion (Schüller, 2003). Fermentierbare C-Quellen wie Glucose bewirken eine ICL-Repression. Dadurch wird der Energieverlust vermieden, der bei der Überbrückung der zwei Decarboxylierungsschritte des Citratzyklus entsteht. Andererseits führen nicht-fermentierbare C-Quellen wie Acetat oder Fettsäuren zu einer Derepression und einer meist starken ICL-Induktion. Die Regulation steht oft im Zusammenhang mit einem CSRE (*Carbon source responsive element*) im ICL-Promotorbereich (Schöler & Schüller, 1994). Wachstumsversuche bestätigten die C-Quellenabhängigkeit der ICL-Aktivität bei *A.gossypii* und *S.cerevisiae*. Dabei wurde die cytosolische *Sc* ICL auf Acetat-, Ethanol- oder Ölsäuremedium langsamer und schwächer induziert als die peroxisomale ICL von *A.gossypii* (siehe Abb. 5). Darüber hinaus lag auf Glucosemedium eine Benachteiligung der *Sc* ICL durch die publizierte Katabolit-Inaktivierung (Herrero *et al.*, 1985) vor, die Teil einer Feinregulation durch Phosphorylierung ist (nicht gezeigt). Eine Inaktivierung eukaryotischer ICLs durch Phosphorylierung trat nach einer Glucosezugabe zu in Ethanol-

medium wachsenden Zellen der Pilze *S.cerevisiae* (López-Boado *et al.*, 1988) und *Phycomyces blakesleeanus* (Rua *et al.*, 1989) auf und wird auch für andere Pilze vermutet, z.B. für *Candida maltosa* (Polish & Hofmann, 1989). Bei der *Sc* ICL erfolgt die Phosphorylierung in zwei Schritten und führt zu einer schnellen, reversiblen sowie einer nachfolgenden, langsamen Inaktivierung (López-Boado *et al.*, 1987). Die Konsensus-Sequenzen RRGT und KKFT der reversiblen Inaktivierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase (Ordiz *et al.*, 1996) sind nur bei wenigen ICLs konserviert (siehe Abb. 11) und nur ein Hinweis auf eine Regulation. So ist die Konsensus-Sequenz RRGT bei der *Ag* ICL konserviert, obwohl keine Phosphorylierungskinetik nachweisbar war (Maeting *et al.*, 1999). Die irreversible, proteolytische Inaktivierung der *Sc* ICL wird durch das Decapeptid KTKRNYSARD vermittelt (Ordiz *et al.*, 1995), dessen Sequenz nicht konserviert ist (siehe Abb. 11). Dennoch gibt es eine irreversible Glucose-Inaktivierung auch bei anderen ICLs. Der Mechanismus war aber grundverschieden zur *Sc* ICL, da nur eine irreversible Degradationssphase vorlag. Anstelle einer gezielten Enzymmodifikation erfolgte die Katabolit-Inaktivierung der ICLs von *Pichia* und *Aspergillus* durch eine spezifische Autophagie der Peroxisomen (Kulachkovsky *et al.*, 1997; Amor *et al.*, 2000). Der Prozess wird mittlerweile als „Pexophagie“ bezeichnet und dient der Proteolyse überschüssiger Peroxisomen durch vakuoläre Proteinasen (Farré & Subramani, 2004). Die beschriebene Degradationskinetik (De Lucas *et al.*, 1994) stimmte mit der Glucose-Inaktivierung der *Ag* ICL überein, weshalb auch für die *Ag* ICL eine Regulation durch Pexophagie vorlag (Schmidt, 1996; Schmidt *et al.*, 1996b).

Die *S.cerevisiae* -ICL unterschied sich damit nicht nur in der subzellulären Lokalisation sondern auch in der Regulation deutlich von den ICLs anderer Eukaryoten. Da die Importversuche mit verschiedenen ICL-Muteinen ergaben, dass die cytosolische Lokalisation nicht durch das Anhängen eines eventuell im Laufe der Evolution verloren gegangenen PTS1-Signals aufgehoben werden konnte, wurde ein funktionaler Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Regulation der *Sc* ICL vermutet. Dabei war interessant, dass die *Sc* ICL Glucose-Inaktivierung auch bei heterologer Expression in der Milchhefe *Kluyveromyces lactis* als 2-stufiger Prozess erfolgte (López *et al.*, 2004). Die *Sc* ICL-Regulation war Protein-spezifisch, denn die *K.lactis* -ICL war nur durch eine C-Quellen-abhängige Transkriptionskontrolle reguliert und zeigte trotz der Konservierung der reversiblen *Sc* ICL-Phosphorylierungsstellen keine Glucose-Inaktivierung.

Zusammengefasst gab es für die ICL-Regulation damit folgende Abstufungen: 1.) nur Transkriptionskontrolle (*K.lactis*), 2.) Transkriptionskontrolle + Pexophagie (*A.gossypii* und andere) und 3.) Transkriptionskontrolle + reversible Phosphorylierung + Proteolyse nach irreversibler Phosphorylierung (*S.cerevisiae*). Die Regulationsmöglichkeiten erschienen angemessen vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Stoffwechsellkapazitäten der Pilze. Zusätzlich zeigte die *Sc* ICL eine höhere Sensitivität bzgl. verschiedener physiologischer Inhibitoren (Schmidt, 1996). Die Stoffwechselregulation von *S.cerevisiae* war damit wesentlich dynamischer als bei *A.gossypii*, so dass eine bessere Feinregulation der ICL-Aktivität Sinn machte. Analog zur schnellen Stoffwechselanpassung bei Prokaryoten durch eine ICL-Dephosphorylierung (Hoyt *et al.*, 1994) war die cytosolische Lokalisation der *Sc* ICL vorteilhaft für eine schnelle Regulationsmöglichkeit durch Phosphorylierung.

Die Hypothese könnte anhand der subzellulären Lokalisation der *Phycomyces blakesleeanus* -ICL überprüft werden. Der respirative Stoffwechsel dieses strikt aeroben Zygomyceten schwankt stark in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase und den Umweltbedingungen (Rua

*et al.*, 2002). Interessanterweise zeigte die ICL dieses Pilzes neben einer reversiblen Redox-Inaktivierung (Rua *et al.*, 2002) eine 2-stufige Glucose-Inaktivierung mit einer reversiblen und einer irreversiblen Phase (Rua *et al.*, 1989). Die subzelluläre Verteilung der *P.blakesleeanus*-ICL ist nicht bekannt. Eine überwiegend cytosolische Lokalisation würde jedoch die These zum Regulationsvorteil der cytosolischen *S.cerevisiae*-ICL unterstützen.

## 5. Ausblick

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, wie die ICL in die Peroxisomen kommt. Es wurde gezeigt, dass der Import der *Ashbya*-ICL nicht nur auf einem PTS1-Signal sondern auch auf einem neuartigen, internen Signal im Bereich der Strukturdomäne II basierte. Der durch das zusätzliche PTS vermittelte Import war unabhängig vom PEX5-Rezeptor. Eine alternativ denkbare Interaktion mit dem PTS2-Rezeptor PEX7 konnte aus Zeitgründen nicht mehr untersucht werden. Der experimentelle Ansatz wäre analog zu PEX5 vorstellbar, d.h. der Import müsste in einer  $\Delta$ PEX7-Mutante untersucht werden. Darüber hinaus könnte für die *Ag* ICL ein neuer Importmechanismus vorliegen. Die Isolierung des relevanten Rezeptors oder eines Helfer-Peroxins ("Adapter") zur Bindung an den bekannten *Docking* Komplex könnte durch die Anwendung der *Two-Hybrid*-Technik für die Strukturdomäne II erfolgen. Innerhalb der Strukturdomäne II wäre eine weitere Eingrenzung der Signalsequenz sinnvoll. Da nicht alle ICLs ein internes Signal besitzen, kommt ein geringer konservierter Bereich in Frage, z.B. die Aminosäuren 329 - 352 der *Ag* ICL. Diese Sequenzregion überlappt mit zwei von Gainey *et al.* (1992) beschriebenen partiellen Aminosäure-Sequenz-Wiederholungen (Position 329 - 345 und 350 - 366 der *Ag* ICL), die bei der cytosolischen *Sc* ICL fehlten.

Ein anderer Aspekt war die Ausnutzung der unterschiedlichen subzellulären ICL-Lokalisation zur Isolierung eines Carriers. Der in der Einleitung (Kapitel 1.3) beschriebene Ansatz basierte auf einer effizienten Delokalisierung der cytosolischen *Sc* ICL in die Peroxisomen. Die Importversuche dieser Arbeit sowie Literaturdaten sprachen allerdings dafür, dass in *S.cerevisiae* nur eine unvollständige peroxisomale Lokalisation unterschiedlicher ICLs erreicht werden kann. Der Ansatz zur Carrier-Isolierung müsste deshalb genau umgekehrt formuliert werden: Als Ausgangsstamm dient eine Mutante, deren peroxisomale ICL durch eine ausschließlich cytosolische ICL ersetzt wurde, z.B. eine *A.gossypii*  $\Delta$ ICL-Mutante mit cytosolischer *Ec* ICL. Aufgrund der nun cytosolischen ICL-Reaktion entsteht Glyoxylat im Cytosol statt im Peroxisom und kann höchstwahrscheinlich nicht importiert werden, weil der beim Wildtyp mit peroxisomaler ICL nicht benötigte Glyoxylat-Import-Carrier fehlt. Es wird daher ein Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen erwartet. Da der *S.cerevisiae* Wildtyp eine cytosolische ICL und den benötigten Carrier besitzt, sollte sich der gesuchte peroxisomale Glyoxylat-Carrier durch die Komplementation der Delokalisierungsmutante mit einer *S.cerevisiae*-Genbank isolieren lassen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Peroxisomen sind von zentraler Bedeutung für den Fettstoffwechsel sowie zur Entgiftung der bei Oxidationsprozessen entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies, z.B.  $H_2O_2$ . Peroxisomale Funktionsstörungen verursachen Krankheiten, oft durch einen Importdefekt bestimmter Enzyme. Die beiden wichtigsten Importwege peroxisomaler Matrixproteine beruhen auf konservierten Signalsequenzen. Das häufigste Signal ist das sogenannte PTS1, ein Tripeptid am Ende des C-Terminus. Seltener kommt ein N-terminales Nonapeptid (PTS2) vor. Darüber hinaus enthalten einige Proteine ein zusätzliches Signal und/oder nutzen einen bisher unbekanntem Importweg. Beispielsweise besitzen nur einige peroxisomale Isocitrat-Lyasen ein PTS1-Signal.

Die Isocitrat-Lyase (ICL) ist als Schlüsselenzym des Glyoxylatwegs essentiell zum Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Eukaryotische ICLs sind normalerweise in den Peroxisomen lokalisiert mit Ausnahme der cytosolischen ICL der Bäckerhefe *S.cerevisiae*. Im Gegensatz zur cytosolischen *Sc* ICL enthält die peroxisomale *Ashbya gossypii*-ICL ein PTS1-Signal. Daher war es interessant zu untersuchen, ob dieses Signal zur Vermittlung des peroxisomalen ICL-Imports ausreichte oder ob ein zusätzliches Signal notwendig war.

Durch die Fusion des PTS1-Tripeptids AKL oder den Austausch des C-Terminus gegen den der *Ag* ICL wurde ein Import von 3 - 4% der modifizierten *Sc* ICL erreicht. Dabei wurde die peroxisomale Lokalisation unabhängig durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation sowie Immuno-Elektronenmikroskopie gezeigt. Auffällig war der mit ca. 20% deutlich effizientere Import von heterolog exprimierter *Ag* ICL. Dieser Unterschied wies auf ein zusätzliches peroxisomales Signal der *Ag* ICL hin, das der *Sc* ICL fehlt. Diese These wurde unterstützt durch Muteine ohne funktionales PTS1, die zu 20% (*Ag* ICL verlängert um 39 Aminosäuren) bzw. 9% (PTS1 deletiert) importiert wurden. Das für diesen Import nötige Signal wurde im Bereich der Strukturdomäne II der *Ag* ICL vermutet und anhand eines Hybridproteins der *E.coli*-ICL untersucht. Die ICL-Strukturdomäne II ist ein interner Bereich von etwa 100 Aminosäuren, der bei Prokaryoten fehlt. Deshalb wurde durch die Insertion der *Ag* ICL Strukturdomäne II (*Ag* DII) das Hybridprotein *Ec* ICL*Ag* DII erzeugt. Differentielle Zentrifugationen zeigten eine signifikant peroxisomale Lokalisation dieses Hybrids. Während nach Aktivitätstests nur 0,7% der Wildtyp *Ec* ICL in den Hefe-Organellen vorlagen, lag der Anteil des Hybridproteins bei 33%. Western Blots bestätigten dieses Ergebnis durch eine deutliche Bande der *Ec* ICL*Ag* DII im Organell-pellet. Damit wurde erstmals die Funktionalität einer ICL-Strukturdomäne II-Sequenz als Organellsignal gezeigt.

Auch bei der Rizinus-ICL ist die PTS1-Region entbehrlich für den peroxisomalen Import, der dennoch den PTS1-Rezeptor PEX5 benötigt (Parkes *et al.*, 2003). Zur Überprüfung, ob diese Beziehung ebenso für die PTS1-lose *Ag* ICL und das Hybrid *Ec* ICL*Ag* DII galt, wurde eine PEX5-Disruptionsmutante erzeugt. Die unveränderte subzelluläre Verteilung beider ICL-Muteine in diesem Stammhintergrund widersprach einer PEX5-Abhängigkeit des Imports. Enzymtests nach differentieller Zentrifugation wiesen 8% der PTS1-losen *Ag* ICL bzw. 34% des Hybrids *Ec* ICL*Ag* DII im Organell-pellet nach. Die Lokalisation der ICLs in den Organellen sowie die Delokalisierung der PEX5-abhängigen Katalase A wurden mit Western Blots bestätigt. Immuno-detektion in den Fraktionen von Saccharose-Dichtegradienten zeigte die Co-Lokalisation beider ICL-Muteine mit Thiolase, einem PTS2-Peroxisomenmarker. Die *Ag* ICL enthielt daher im Bereich ihrer Strukturdomäne II ein neuartiges, PEX5-unabhängiges Peroxisomensignal.

## ANHANG

## Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ICL-Mutanten

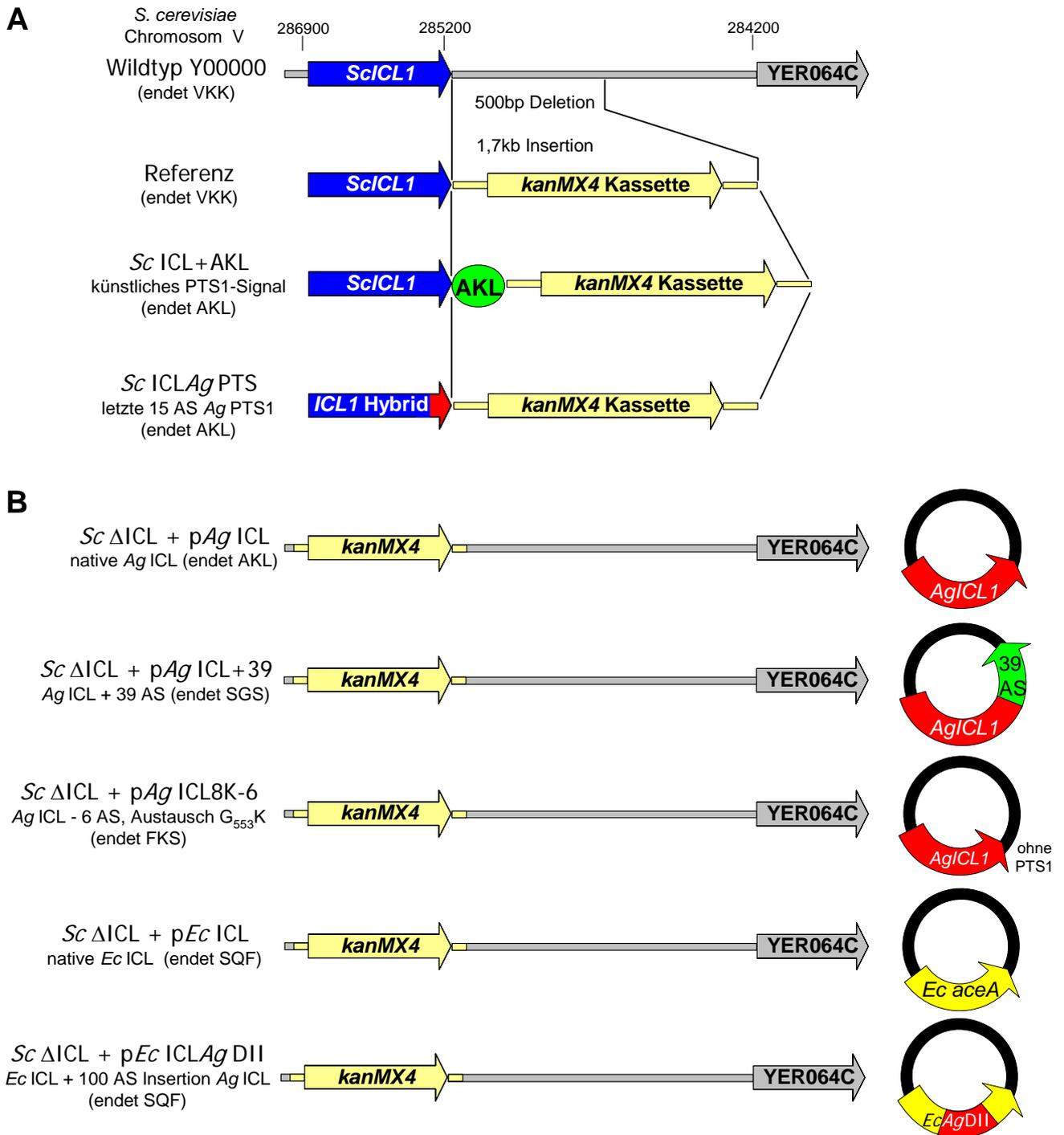
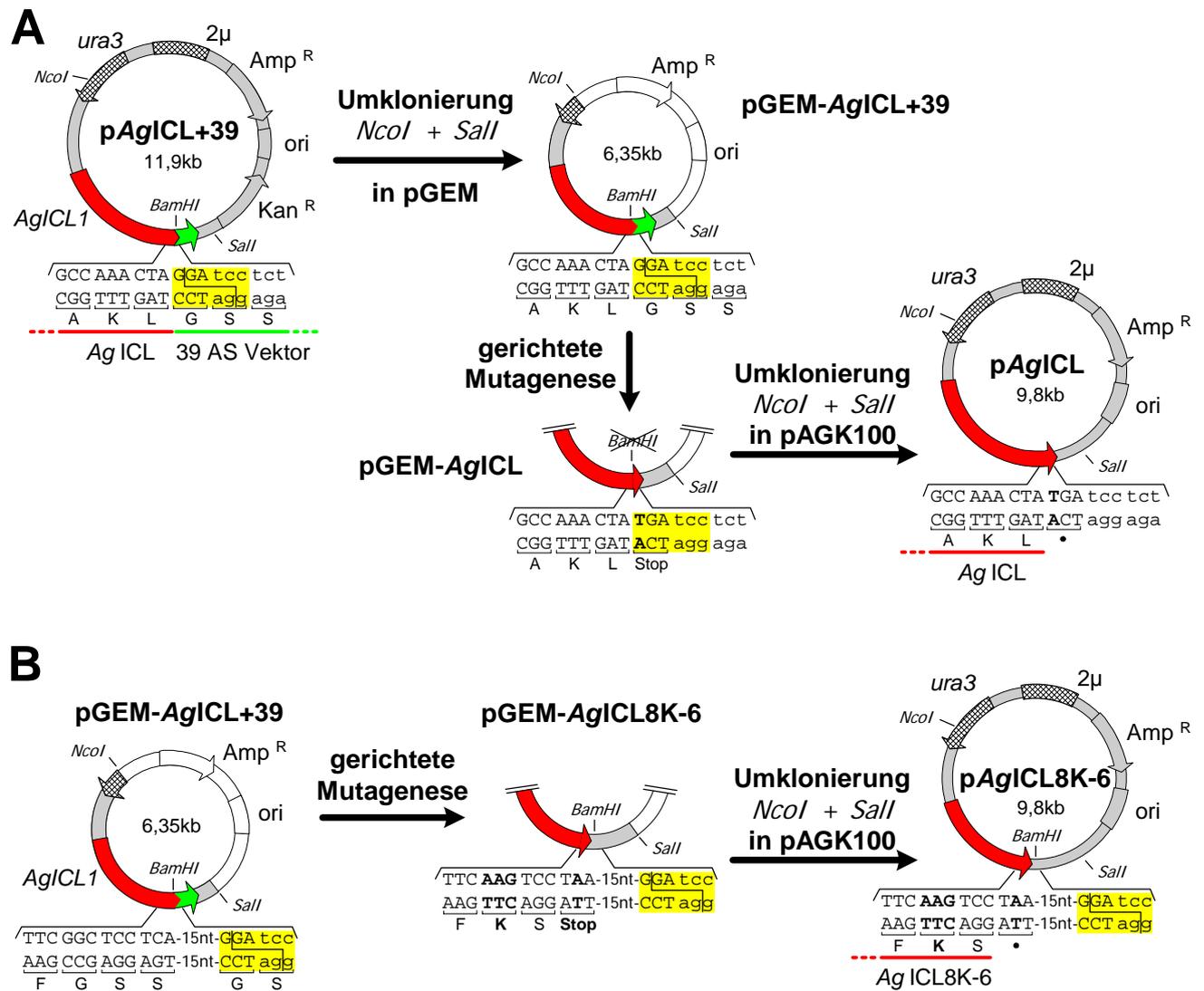


Abb. 30: Schema der verwendeten ICL-Mutanten dieser Arbeit

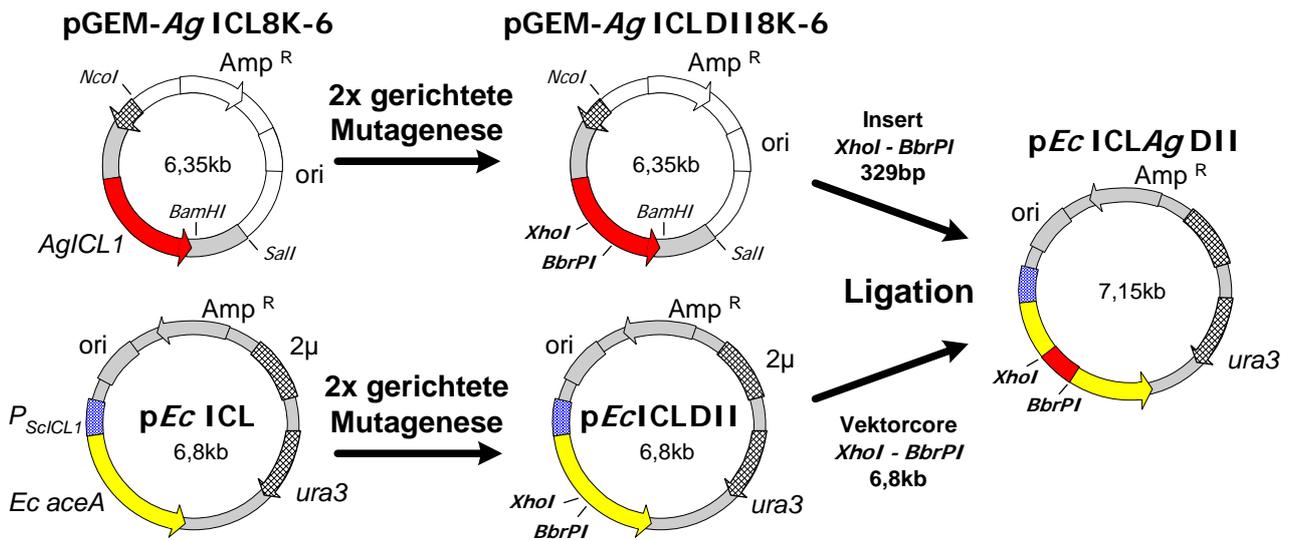
Die Farben markieren die Quelle der jeweiligen DNA: gelb *E.coli*, rot *A.gossypii*, blau *S.cerevisiae* und grün artifizuell. Es sind jeweils die letzten drei Aminosäuren (AS) des C-Terminus angegeben. **A:** Chromosomale Mutanten. **B:** Deletionsmutante *Sc*  $\Delta$ ICL komplementiert mit diversen Plasmidkonstrukten. *Ag* ICL-Konstrukte mit *AgICL1*-Promoter im Plasmid pAG(K)100, *Ec* ICL-Konstrukte mit *ScICL1*-Promotor im Plasmid YEp352. Nicht dargestellt sind die Transformanten der Doppelmutante *Sc*  $\Delta$ ICL  $\Delta$ PEX5 sowie das Genbankkonstrukt GB:*Ag* ICL, das bzgl. des *ICL1*-Locus identisch ist mit pAg ICL.

## Schemata zur Plasmidkonstruktion



**Abb. 31: Konstruktion der Plasmide für *Ag ICL* (A) und *Ag ICL8K-6* (B)**

DNA der codierenden Sequenz von *AgICL1* ist rot markiert, artifizuell angehängte Vektor-DNA grün. Innerhalb der Nukleotidsequenz sind die *BamHI*-Schnittstelle gelb unterlegt und mittels gerichteter Mutagenese veränderte Basen durch Fettdruck hervorgehoben. Abkürzungen: AS Aminosäuren; nt Nukleotide.



**Abb. 32: Konstruktion des Plasmids pEc ICLAg DII**

Die durch gerichtete Mutagenese eingeführten Schnittstellen für *XhoI* und *BbrPI* ermöglichten die Insertion der *AgICL* Domäne II-Sequenz innerhalb des *E.coli aceA* Gens. Der Promotor der *S.cerevisiae*-ICL ist blau markiert, das Gen *AgICL1* rot und *Ec aceA* gelb.

## LITERATUR

### Verwendete Internetprogramme und Datenbanken (Stand: Juni 2005)

**Ashbya Genome Database:** <http://agd.unibas.ch/>

**Boxshade:** [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

**ExPASy Enzyme:** <http://www.expasy.org/enzyme/>

**ExPASy Tools:** <http://www.expasy.org/tools/>

**MultAlign:** <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

**National center for biotechnology information (NCBI):** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Protein Data Bank:** <http://rutgers.rcsb.org/pdb/>

**PTS1-Predictor:** <http://mendel.imp.univie.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp>

**RASMOL:** <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/>

**Saccharomyces Genome Database:** <http://www.yeastgenome.org/>

**SWISS-Model:** <http://swissmodel.expasy.org/>

**SWISS-Prot:** <http://www.expasy.org/sprot/>

### Zitierte Publikationen

**Aitchison JD, Murray WW & Rachubinski RA (1991):** The carboxyl-terminal tripeptide Ala-Lys-Ile is essential for targeting *Candida tropicalis* trifunctional enzyme to yeast peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **266**(34): 23197-23203

**Amor C, Domínguez AI, De Lucas JR & Laborda F (2000):** The catabolite inactivation of *Aspergillus nidulans* isocitrate lyase occurs by specific autophagy of peroxisomes. *Arch. Microbiol.* **174**: 59-66

**Antonenkov VD, Sormunen RT & Hiltunen JK (2004):** The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites *in vitro*. *J. Cell Sci.* **117**: 5633-5642

**Ashby SF & Nowell N (1926):** The fungi of stigmatomycosis. *Annals of Botany* **40**: 69-83

**Atomi H, Umemura K, Ueda M & Tanaka A (1996):** Transcriptional regulation of peroxisomal glyoxylate cycle enzymes of an n-alkane-assimilating yeast, *Candida tropicalis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **804**: 684-686

**Barth G & Scheuber T (1993):** Cloning of the isocitrate lyase gene (*ICL1*) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 422-430

**Barth G & Weber H (1987):** Genetic analysis of the gene *ICL1* of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **3**: 255-262

**Beeching JR (1989):** High sequence conservation between isocitrate lyase from *Escherichia coli* and *Ricinus communis*. *Protein Seq. Data Anal.* **2**: 463-466

- Beeckmans S, Khan AS, Van Driessche E & Kanarek L (1994):** A specific association between the glyoxylic-acid-cycle enzymes isocitrate lyase and malate synthase. *Eur. J. Biochem.* **224**: 197-201
- Behari R & Baker A (1993):** The carboxyl terminus of isocitrate lyase is not essential for import into glyoxysomes in an *in vitro* system. *J. Biol. Chem.* **268**(10): 7315-7322
- Berardi E, Gambini A & Bellu AR (2003):** *ALG2*, the *Hansenula polymorpha* isocitrate lyase gene. *Yeast* **20**: 803-811
- Bergmeyer HU (ed.) (1974):** Methoden der enzymatischen Analyse. Band 1., *VCH Weinheim*, **3. Auflage**
- Berkaloff A, Bourguet J, Favard P & Duinnebault M (1990):** Die Zelle – Morphologie und Physiologie. Kapitel 12: Peroxisomen. *Vieweg*
- Binder M, Schanz M & Hartig A (1991):** Vector-mediated overexpression of catalase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induces inclusion body formation. *Eur. J. Cell Biol.* **54**(2): 305-312
- Birdsey GM, Lewin J, Cunningham AA, Bruford MW & Danpure CJ (2004):** Differential enzyme targeting as an evolutionary adaptation to herbivory in carnivora. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 632-646
- Blobel F & Erdmann R (1996):** Identification of a yeast peroxisomal member of the family of AMP-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **240**: 468-476
- Bongcam V, MacDonald-Comber Petétot J, Mittendorf V, Robertson EJ, Leech RM, Qin YM, Hiltunen JK & Poirier Y (2000):** Importance of sequences adjacent to the terminal tripeptide in the import of a peroxisomal *Candida tropicalis* protein in plant peroxisomes. *Planta* **211**(1): 150-157
- Borst P (1986):** How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes). *Bioch. Biophys. Acta* **866**(4): 179-203
- Borst P (1989):** Peroxisome biogenesis revisited. Review. *Bioch. Biophys. Acta* **1008**: 1-13
- Bowen P, Lee CSM, Zellweger H & Lindenberg R (1964):** A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **114**: 402-414
- Brachat S, Dietrich FS, Voegeli S, Zhang Z, Stuart L, Lerch A, Gates K, Gaffney T & Philippsen P (2003):** Reinvestigation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome annotation by comparison to the genome of a related fungus: *Ashbya gossypii*. *Genome Biol.* **4**: R45
- Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Britton KL, Abeysinghe SIB, Baker PJ, Barynin V, Diehl P, Langridge SJ, McFadden BA, Sedelnikova SE, Stillman TJ, Weeradechapon K & Rice DW (2001):** The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* **D57**: 1209-1218

- Britton KL, Langridge SJ, Baker PJ, Weeradechapon K, Sedelnikova SE, De Lucas JR, Rice DW & Turner G (2000):** The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Structure* **8**: 349-362
- Brocard C, Kragler F, Simon MM, Schuster T & Hartig A (1994):** The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal -SKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 1016-1022
- Brocard CB, Jedeszko C, Song HC, Terlecky SR & Walton PA (2003):** Protein structure and import into the peroxisomal matrix. *Traffic* **4**: 74-82
- Chaves RS, Herrero P, Ordiz I, Angeles del Brio M & Moreno F (1997):** Isocitrate lyase localisation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Gene* **198**: 165-169
- Contreras-Shannon V & McAlister-Henn L (2004):** Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **423**: 235-246
- Cooper TG & Beevers H (1969):** Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm: enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* **244**: 3507-3513
- Crookes WJ & Olsen LJ (1998):** The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* **273**(27): 17236-17242
- De Duve C & Baudhuin P (1966):** Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **46**: 323-357
- De Hoop MJ & Ab G (1992):** Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem. J.* **286**: 657 - 669
- De Lucas JR, Valenciano S, Laborda F, Turner G (1994):** Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* **162**: 409-413
- Dietrich FS, Voegeli S, Brachat S, Lerch A, Gates K, Steiner S, Mohr C, Pohlmann R, Luedi P, Choi S, Wing RA, Flavier A, Gaffney TD & Philippsen P (2004):** The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science* **304**: 304-307
- Distel B, Gould SJ, Voorn-Brouwer T, van der Berg M, Tabak HF & Subramani S (1992):** The carboxyl-terminal tripeptide Serine-Lysine-Leucine of firefly luciferase is necessary but not sufficient for peroxisomal import in yeast. *New Biologist* **4**(2): 157-165
- Distel B, Veenhuis M & Tabak HF (1987):** Import of alcohol oxidase into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **6**: 3111-3116
- Dohmen RJ, Strasser AW, Honer CB & Hollenberg CP (1991):** An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**(7): 691-692
- Duntze W, Neumann D, Gancedo JM, Atzpodien W & Holzer H (1969):** Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **10**: 83-89

- Dyer JM, Chapital DC, Kuan JW, Mullen RT & Pepperman AB (2002):** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of novel lipid compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 224-230
- Dyer JM, McNew JA & Goodman JM (1996):** The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J. Cell Biol.* **133**(2): 269-280
- Easterby JS & Quadri SS (1982):** Hexokinase type II from rat skeletal muscle. *Meth. Enzymol.* **90**: 11-15
- Eastmond PJ & Graham IA (2001):** Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science* **6**(2): 72-77
- Eckert JH & Erdmann R (2003):** Peroxisome biogenesis. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **147**: 75-121
- Eitzen GA, Szilard RK & Rachubinski RA (1997):** Enlarged peroxisomes are present in oleic acid-grown *Yarrowia lipolytica* overexpressing the *PEX16* gene encoding an intraperoxisomal peripheral membrane peroxin. *J. Cell Biol.* **137**(6): 1265-1278
- Elgersma Y, Kwast L, van den Berg M, Snyder WB, Distel B, Subramani S & Tabak HF (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**: 7326-7341
- Elgersma Y, van Roermund CWT, Wanders RJA & Tabak HF (1995):** Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *EMBO J.* **14**(14): 3472-3479
- Elgersma Y, Vos A, van den Berg M, van Roermund CWT, van der Sluijs P, Distel B & Tabak HF (1996):** Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal 1 in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**(42): 26375-26382
- Emanuelsson O, Elofsson A, von Heijne G & Cristóbal S (2003):** *In silico* prediction of the peroxisomal proteome in fungi, plants and animals. *J. Mol. Biol.* **330**: 443-456
- Erdmann R & Blobel G (1995):** Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J. Cell Biol.* **128**(4): 509-523
- Erdmann R & Kunau WH (1994):** Purification and immunolocalization of the peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1173-1182
- Erdmann R, Veenhuis M, Mertens D & Kunau WH (1989):** Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**(14): 5419-5423
- Farré JC & Subramani S (2004):** Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol.* **14**: 515-523
- Feinberg K & Vogelstein B (1983):** A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13

- Gainey LDS, Connerton IF, Lewis EH, Turner G & Ballance DJ (1992):** Characterization of the glyoxysomal isocitrate lyase genes of *Aspergillus nidulans* (*acuD*) and *Neurospora crassa* (*acu-3*). *Curr. Genet.* **21**: 43-47
- Gao X, Marrison JL, Pool MR, Leech RM & Baker A (1996):** Castor bean isocitrate lyase lacking the putative peroxisomal targeting signal 1 ARM is imported into plant peroxisomes both *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol.* **112**(4): 1457-1464
- Gassen HG & Schrimpf G (1999):** Gentechnische Methoden. *Spektrum*, **2. Auflage**: 352-356
- Gatto GJ Jr, Geisbrecht BV, Gould SJ & Berg JM (2000):** Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1091-1095
- Gatto GJ Jr, Maynard EL, Guerrero AL, Geisbrecht BV, Gould SJ & Berg JM (2003):** Correlating structure and affinity for PEX5:PTS1 complexes. *Biochemistry* **42**(6): 1660-1666
- Gerharz T (2004):** Konstruktion des Plasmids pUC18-*aceA*; persönliche Mitteilung
- Gould SJ & Collins CS (2002):** Peroxisomal-protein import: is it really that complex? Review. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(5): 382-389
- Gould SJ, Keller GA & Subramani S (1987):** Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.* **105**: 2923-2931
- Gould SJ, Keller GA & Subramani S (1988):** Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* **107**: 897-905
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J & Subramani S (1989):** A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.* **108**: 1657-1664
- Grimm C, Evers A, Brock M, Maerker C, Klebe G, Buckel W & Reuter K (2003):** Crystal structure of 2-methylisocitrate lyase (PrpB) from *Escherichia coli* and modelling of its ligand bound active centre. *J. Mol. Biol.* **328**: 609-621
- Gross DS, Collins KW, Hernandez EM & Garrad W (1988):** Vakuum blotting: a simple method for transferring DNA from sequencing gels to nylon membranes. *Gene* **74**: 347-356
- Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J & Hegemann JH (1996):** A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* **24**(13): 2519-2524
- Gunkel K, van Dijk R, Veenhuis M & van der Klei IJ (2004):** Routing of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 1347-1355
- Gurvitz A, Mursula AM, Firzinger A, Hamilton B, Kilpelainen SH, Hartig A, Ruis H, Hiltunen JK & Rottensteiner H (1998):** Peroxisomal  $\Delta^3$ -cis- $\Delta^2$ -trans-enoyl-CoA isomerase encoded by *ECI1* is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **273**(47): 31366-31374
- Hanahan D (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557

- Hansen H, Didion T, Thiemann A, Veenhuis M & Roggenkamp R (1992):** Targeting sequences of the two major peroxisomal proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* **235**(2-3): 269-278
- Hartig A, Ogris M, Cohen G & Binder M (1990):** Fate of highly expressed proteins destined to peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **18**(1): 23-27
- Henikoff S & Henikoff JG (1992):** Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**: 10915-10919
- Henke B, Girzalsky W, Berteaux-Lecellier V & Erdmann R (1998):** *IDP3* encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **273**(6): 3702-3711
- Herrero P, Fernández R & Moreno F (1985):** Differential sensitivities to glucose and galactose repression of gluconeogenetic and respiratory enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**: 216-219
- Hettema EH, Ruigrok CCM, Groot Koerkamp M, van den Berg M, Tabak HF, Distel B & Braakman I (1998):** The cytosolic DnaJ-like protein Djplp is involved specifically in peroxisomal protein import. *J. Cell Biol.* **142**: 421-434
- Hettema EH, van Roermund CWT, Distel B, van den Berg M, Vilela C, Rodrigues-Pousada C, Wanders RJA & Tabak HF (1996):** The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**(15): 3813-3822
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ & Tzagoloff A (1986):** Yeast / *E.coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167
- Holmes RS & Masters CJ (1972):** Species specific features of the distribution and multiplicity of mammalian liver catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**: 217-223
- Horiguchi H, Yurimoto H, Goh T, Nakagawa T, Kato N & Sakai Y (2001):** Peroxisomal catalase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*: transport efficiency and metabolic significance. *J. Bacteriol.* **183**(21): 6372-6383
- Hoyt JC, Lin HPP & Reeves HC (1994):** *In vivo* phosphorylation of isocitrate lyase in *Escherichia coli* and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr. Microbiol.* **28**: 67-69
- Hoyt JC, Robertson EF, Berlyn KA & Reeves HC (1988):** *Escherichia coli* isocitrate lyase: properties and comparisons. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* **966**: 30-35
- Jones EW (1991):** Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**: 428-453
- Kal AJ, Hettema EH, van den Berg M, Groot Koerkamp M, van Ijlst L, Distel B & Tabak HF (2000):** *In silicio* search for genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochem. Biophys.* **32**: 1-8
- Kalish JE, Keller GA, Morrell JC, Mihalik SJ, Smith B, Cregg JM & Gould SJ (1996):** Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins. *EMBO J.* **15**(13): 3275-3285

- Kamada Y, Ueda M, Atomi H, Oda K, Kurihada T, Naito N, Ukita R, Kamasawa N, Osumi M & Tanaka A (1992):** Localization of *Candida tropicalis* peroxisomal isocitrate lyase highly expressed in peroxisome-proliferated *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 368-371
- Kamasawa N, Yoshida T, Kasahara M, Kamada Y, Zou W, Ueda M, Tanaka A & Osumi M (1996):** Subcellular destination of mutant peroxisomal isocitrate lyase polypeptides of *Candida tropicalis* in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Electron Microsc.* **45**: 491-497
- Kamasawa N, Yoshida T, Ueda M, Tanaka A & Osumi M (1999):** Three-dimensional analysis of protein aggregate body in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Electron Microsc.* **48**: 173-176
- Kamigaki A, Mano S, Terauchi K, Nishi Y, Tachibe-Kinoshita Y, Nito K, Kondo M, Hayashi M, Nishimura M & Esaka M (2003):** Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor. *Plant J.* **33**: 161-175
- Karpichev IV & Small GM (2000):** Evidence for a novel pathway for the targeting of a *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal protein belonging to the isomerase/hydratase family. *J. Cell Sci.* **113**: 533-544
- Klein ATJ, van den Berg M, Bottger G, Tabak HF & Distel B (2002):** *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p. *J. Biol. Chem.* **277**(28): 25011-25019
- Knott TG, Birdsey GM, Sinclair KE, Gallagher IM, Purdue PE & Danpure CJ (2000):** The peroxisomal targeting sequence type 1 receptor, Pex5p, and the peroxisomal import efficiency of alanine:glyoxylate aminotransferase. *Biochem. J.* **352**: 409-418
- Kokavec A & Crowe SF (2002):** Alcohol consumption in the absence of adequate nutrition may lead to activation of the glyoxylate cycle in man. *Med. Hypotheses* **58**(5): 411-415
- Koller A, Spong AP, Lüers GH & Subramani S (1999):** Analysis of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene product from *Pichia pastoris* and determination of its targeting signal. *Yeast* **15**: 1035-1044
- Kornberg HL & Krebs HA (1957):** Synthesis of cell constituents from C<sub>2</sub>-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* **179**: 988-991
- Kragler F, Langeder A, Raupachova J, Binder M & Hartig A (1993):** Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **120**: 665-673
- Kulachkovsky AR, Moroz OM & Sibirny AA (1997):** Impairment of peroxisome degradation in *Pichia methanolica* mutants defective in acetyl-CoA synthetase or isocitrate lyase. *Yeast* **13**: 1043-1052
- Kunze M, Kragler F, Binder M, Hartig A & Gurvitz A (2002):** Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur. J. Biochem.* **269**: 915-922

- Lametschwandtner G, Brocard C, Fransen M, Van Veldhoven P, Berger J & Hartig A (1998):** The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J. Biol. Chem.* **273**(50): 33635-33643
- LaPorte DC (1993):** The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: regulation and enzymology. *J. Cell Biochem.* **51**: 14-18
- Lasorsa FM, Scarcia P, Erdmann R, Palmieri F, Rottensteiner H & Palmieri L (2004):** The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in  $\Delta$ pH formation across peroxisomal membranes. *Biochem. J.* **381**: 581-585
- Lee JG, Cho SP, Lee HS, Lee CH, Bae KS & Maeng PJ (2000):** Identification of a cryptic N-terminal signal in *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal citrate synthase that functions in both peroxisomal and mitochondrial targeting. *J. Biochem. (Tokyo)* **128**: 1059-1072
- Lee MS, Mullen RT & Trelease RN (1997):** Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *Plant Cell* **9**:185-197
- López ML, Redruello B, Valdés E, Moreno F, Heinisch JJ & Rodicio R (2004):** Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Curr. Genet.* **44**: 305-316
- López-Boado YS, Herrero P, Fernández T, Fernández R & Moreno F (1988):** Glucose-stimulated phosphorylation of yeast isocitrate lyase *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2499-2505
- López-Boado YS, Herrero P, Gascón S & Moreno F (1987):** Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **147**: 231-234
- Madigan MT, Martinko JM & Parker J (2001):** Brock Mikrobiologie. *Spektrum Verlag Heidelberg*, **9. Auflage**
- Maeting I, Schmidt G, Sahn H, Revuelta JL, Stierhof YD & Stahmann KP (1999):** Isocitrate lyase of *Ashbya gossypii* – transcriptional regulation and peroxisomal localization. *FEBS Letters* **444**: 15-21
- Matsuoka M & McFadden BA (1988):** Isolation, hyperexpression, and sequencing of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**(10): 4528-4536
- Maynard EL, Gatto GJ Jr & Berg JM (2004):** Pex5p binding affinities for canonical and noncanonical PTS1 peptides. *Proteins* **55**: 856-861
- McCammion MT, Veenhuis M, Trapp SB & Goodman JM (1990):** Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **172**: 5816-5827
- McClelland GB, Khanna S, González GF, Butz CE & Brooks GA (2003):** Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**(1): 130-135

- McNew JA & Goodman JM (1994):** An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J. Cell Biol.* **127**(5): 1245-1257
- McNew JA & Goodman JM (1996):** The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. Review. *Trends Biochem. Sci. (TIBS)* **21**: 54-58
- Mitraki A & King J (1989):** Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Biotechnology* **7**: 690-697
- Miura S, Kasuya-Arai I, Mori H, Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T & Fujiki Y (1992):** Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions *in vitro* as a minimal peroxisome-targeting signal. *J. Biol. Chem.* **267**(20): 14405-14411
- Morgunov IG, Kondrashova MN, Kamzolova SV, Sokolov AP, Fedotcheva NI & Finogenova TV (2005):** Evidence of the glyoxylate cycle in the liver of newborn rats. *Med. Sci. Monit.* **11**(2): BR57-60 [Epub ahead of print]
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JM & Aubourg P (1993):** Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**: 726-730
- Mosser J, Lutz Y, Stoeckel ME, Sarde CO, Kretz C, Douar AM, Lopez J, Aubourg P & Mandel JM (1994):** The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum. Mol. Genet.* **3**: 265-271
- Mullen RT, Lee MS, Flynn CR & Trelease RN (1997):** Diverse amino acid residues function within the type 1 peroxisomal targeting signal. Implications for the role of accessory residues upstream of the type 1 peroxisomal targeting signal. *Plant Physiol.* **115**: 881-889
- Nelson DL & Cox MM (2000):** Lehninger principles of biochemistry. **3<sup>rd</sup> edition**, *Worth Publishers USA*
- Neuberger G, Kunze M, Eisenhaber F, Berger J, Hartig A & Brocard C (2004):** Hidden localization motifs: naturally occurring peroxisomal targeting signals in non-peroxisomal proteins. *Genome Biol.* **5**(12): R97
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A & Eisenhaber F (2003a):** Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *J. Mol. Biol.* **328**: 567-579
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A & Eisenhaber F (2003b):** Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **328**: 581-592
- Olsen LJ, Ettinger WF, Damsz B, Matsudaira K, Webb MA & Harada JJ (1993):** Targeting of glyoxysomal proteins to peroxisomes in leaves and roots of a higher plant. *Plant Cell* **5**(8): 941-952

- Ordiz I, Herrero P, Rodicio R & Moreno F (1995):** Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by an internal decapeptide sequence. *FEBS Letters* **367**: 219-222
- Ordiz I, Herrero P, Rodicio R & Moreno F (1996):** Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits Tpk1 and Tpk2. *FEBS Letters* **385**: 43-46
- Otera H, Setoguchi K, Hamasaki M, Kumashiro T, Shimidzu N & Fujiki Y (2002):** Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1639-1655
- Pain D, Murakami H & Blobel G (1990):** Identification of a receptor for protein import into mitochondria. *Nature* **347**: 444-449
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F & Erdmann R (2001):** Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J.* **20**(18): 5049-5059
- Parkes JA, Langer S, Hartig A & Baker A (2003):** PTS1-independent targeting of isocitrate lyase to peroxisomes requires the PTS1 receptor Pex5p. *Mol. Membr. Biol.* **20**: 61-69
- Parsons M, Furuya T, Pal S & Kessler P (2001):** Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. Review parasite cell biology. *Mol. Biochem. Parasit.* **115**: 19-28
- Petriv OI, Tang L, Titorenko VI & Rachubinski RA (2004):** A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J. Mol. Biol.* **341**(1): 119-134
- Polnish E & Hofman K (1989):** Cyclic AMP, fructose-2,6-bisphosphate and catabolite inactivation of enzymes of the hydrocarbon-assimilating yeast *Candida maltosa*. *Arch. Microbiol.* **152**: 269-272
- Popov VN, Igamberdiev AU, Schnarrenberger C & Volvenkin SV (1996):** Induction of glyoxylate cycle enzymes in rat liver upon food starvation. *FEBS Lett.* **390**(3): 258-260
- Purdue PE & Lazarow PB (1996):** Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *J. Cell Biol.* **134** (4): 849-862
- Rhodin J (1954):** Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Stockholm University, Aktiebolaget Godvil, Stockholm, Sweden
- Rua J, De Arriga D, Busto F & Soler J (1989):** Effect of glucose on isocitrate lyase in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Bacteriol.* **171**: 6391-6393
- Rua J, Soler J, Busto F & de Arriaga D (2002):** Specific and reversible inactivation of *Phycomyces blakesleeanus* isocitrate lyase by ascorbate-iron: role of two redox-active cysteines. *Fungal Genet. Biol.* **35**(3): 223-234

- Saidowsky J, Dodt G, Kirchberg K, Wegner A, Nastainczyk W, Kunau WH & Schliebs W (2001):** The di-aromatic pentapeptide repeats of the human peroxisome import receptor PEX5 are separate high affinity binding sites for the peroxisomal membrane protein PEX14. *J. Biol. Chem.* **276**: 34524-34529
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York
- Schmidt G (1996):** Stoffwechselphysiologische Untersuchungen bei *Ashbya gossypii* im Hinblick auf die Riboflavinbiosynthese. Dissertation. *Jül-Bericht 3260*
- Schmidt G, Stahmann KP & Sahn H (1996a):** Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiol.* **142**: 411-417
- Schmidt G, Stahmann KP, Kaessler B & Sahn H (1996b):** Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiol.* **142**: 419-426
- Schöler A & Schüller HJ (1994):** A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene *ICL1* is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **14**(6): 3613-3622
- Schüller HJ (2003):** Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43**: 139-160
- Sheikh FG, Pahan K, Khan M, Barbosa E & Singh I (1998):** Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 2961-2966
- Smith L (1955):** Cytochromes a, a1, a2 and a3. *Methods Enzymol.* **2**: 732-740
- Smith MD & Schnell DJ (2001):** Peroxisomal protein import: the paradigm shifts. *Cell* **105**: 293-296
- Southern EM (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Sparkes IA & Baker A (2002):** Peroxisome biogenesis and protein import in plants, animals and yeasts: enigma and variations? Review. *Mol. Membr. Biol.* **19**(3): 171-185
- Stahmann KP (2004):** Konstruktion eines pAG100-Derivats mit *AgICL1* (1995); persönliche Mitteilung
- Stahmann KP, Kupp C, Feldmann SD & Sahn H (1994):** Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin-producing fungus *Ashbya gossypii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 121-127
- Steiner S & Philippsen P (1994):** Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol. Gen. Genet.* **242**(3): 263-271

- Stratford M & Anslow PA (1996):** Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**: 53-58
- Subramani S (1998):** Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation turnover and movement. *Physiol. Reviews* **78**: 171-188
- Swinkels BW, Gould SJ & Subramani S (1992):** Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Letters* **305**: 133-136
- Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA & Subramani S (1991):** A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* **10**: 3255-3262
- Szewczyk E, Andrianopoulos A, Davis MA & Hynes MJ (2001):** A single gene produces mitochondrial, cytoplasmic, and peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **276**(40): 37722-37729
- Taylor KM, Kaplan CP, Gao X & Baker A (1996):** Localization and targeting of isocitrate lyases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **319**: 255-262
- Terlecky SR, Legakis JE, Hueni SE & Subramani S (2001):** Quantitative analysis of peroxisomal protein import *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **263**: 98-106
- Titorenko VI & Rachubinski RA (2001):** Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends Cell Biol.* **11**: 22-29
- Tolbert NE (1974):** Isolation of subcellular organelles of metabolism on isopycnic sucrose gradients. *Meth. Enzymol.* **31**: 734-746
- Trelease RN, Choe SM & Jacobs BL (1994):** Conservative amino acid substitutions of the C-terminal tripeptide (Ala-Arg-Met) on cottonseed isocitrate lyase preserve import *in vivo* into mammalian cell peroxisomes. *Eur. J. Cell Biol.* **65**(2): 269-279
- van der Leij I, Franse MM, Elgersma Y, Distel B & Tabak HF (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.* **90**(24): 11782-11786
- van Roermund CW, de Jong M, IJlst L, van Marle J, Dansen TB, Wanders RJ & Waterham HR (2004):** The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *J. Cell Sci.* **117**: 4231-4237
- van Roermund CWT, Drissen R, van den Berg M, IJlst L, Hetteema EH, Tabak HF, Waterham HR & Wanders RJA (2001):** Identification of a peroxisomal ATP-Carrier required for medium-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation and normal peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**(13): 4321-4329
- van Roermund CWT, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJA & Tabak HF (1995):** The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions. *EMBO J.* **14**(14): 3480-3486

- Vanni P, Giachetti E, Pinzauti G & McFadden BA (1990):** Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. Review. *Comp. Biochem. Physiol.* **95B**(3): 431-458
- Visser WF, van Roermund CW, Ijlst L, Hellingwerf KJ, Wanders RJ & Waterham HR (2005):** Demonstration and characterization of phosphate transport in mammalian peroxisomes. *Biochem J.* 23. Feb 2005 [Epub ahead of print]
- Wanders RJA & Waterham HR (2005):** Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin. Genet.* **67**: 107-133
- Wanders RJA (2004):** Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am. J. Med. Genet. A.* **126**(4): 355-375
- Waterham HR, Titorenko VI, Haima P, Cregg JM, Harder W & Veenhuis M (1994):** The *Hansenula polymorpha* *PER1* gene is essential for peroxisome biogenesis and encodes a peroxisomal matrix protein with both carboxy- and amino-terminal targeting signals. *J. Cell Biol.* **127**: 737-749
- Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E & Bauer JC (1994):** Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**: 119-123
- Yang X, Purdue PE & Lazarow PB (2001):** Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *Eur. J. Cell Biol.* **80**: 126-138
- Yanik T & Donaldson RP (2005):** A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **435**: 243-252
- Yi EC, Marelli M, Lee H, Purvine SO, Aebersold R, Aitchison JD & Goodlett DR (2002):** Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation. *Electrophoresis* **23**(18): 3205-3216
- Zhang JW, Luckey C & Lazarow PB (1993):** Three peroxisome packaging pathways suggested by selective permeabilization of yeast mutants defective in peroxisome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **4**: 1351-1359



---

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich angefertigt und zum Teil von der Deutschen Forschungsgemeinschaft mitfinanziert (STA-600).

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung dieses vielfältigen Themas, die großzügige Unterstützung und sein ständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Seine konstruktive Kritik in wissenschaftlichen Diskussionen hat diese Arbeit bereichert.

Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg möchte ich sehr danken für die freundliche Übernahme des Korreferates und die schnelle Berichterstattung.

Danke auch Herrn Prof. Dr. Stahmann für seine Zeit in Jülich, die Bemühungen der Fernbetreuung und seinen nie endenden Optimismus. Seine Denkanstöße und die fruchtbaren Diskussionen sowie das Vertrauen in meine Laborarbeit und Eigeninitiative waren maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt.

Den ehemaligen "Pilzköpfen" danke ich für die schöne Zeit, als es noch eine AG Stahmann gab. Der Mittagessen-Truppe und besonders Dr. Ute Herrmann, Ulli Degner sowie Cornelia Gätgens sei gedankt für die "Adoption" und die nette, nicht nur fachliche Diskussionsbereitschaft. Danke auch an Anne Wuttke und Susanne Nieland für die Hilfe bei den Wachstumsversuchen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Spendern von Antikörpern, Plasmiden und Hefestämmen: Prof. Dr. M. Bott (Jülich), Dr. B. Distel (Amsterdam), Prof. Dr. R. Erdmann (Bochum), Prof. A. Hartig (Wien), Dr. P. Kötter (Frankfurt), Prof. Dr. W.-H. Kunau (Bochum), Dr. M. Kunze (Wien) und Prof. Dr. H. Tabak (Utrecht).

Herrn Prof. Dr. R. Erdmann (Universität Bochum) möchte ich sehr danken für meinen Laboraufenthalt in Berlin, die hilfreichen Tipps, seinen Vortrag in Jülich, die mehrfache spontane Hilfe per Telefon und die Einladung zum Topo-Meeting. Ebenso gebührt Herrn Prof. Dr. A. Hartig (Universität Wien) ein großer Dank für seinen Besuch in Jülich, die vielen wertvollen Diskussionen, seine methodischen Tipps und die ständige Hilfsbereitschaft per Email und Telefon. Ich danke beiden, Dr. M. Kunze (Wien), Dr. S. Thoms (Bochum), Dr. A. Baker (Leeds) und Prof. Dr. H. Tabak (Utrecht) für ihre Zeit und die guten Diskussionen auf dem Topo-Meeting.

Vielen Dank an Dr. J. Granzin (IBI-2) für die Einführung in die Strukturmodellierung sowie an Horst Kiehl für seine schnelle, kompetente Hilfe bei Problemen mit Computern und Druckern.

Herrn K. A. Sjollema (Universität Groningen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Veenhuis) bin ich sehr dankbar für die professionelle Durchführung der Immuno-Elektronenmikroskopie.

Allen Mitarbeitern des IBT-1 sowie der Enzymgruppe des IBT-2 gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme, die fortwährend gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima.

Ein weiteres Dankeschön gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, deren Zuversicht und Telefonseelsorge mich immer wieder motiviert haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Patrick danken für seine Hilfe und Aufmunterungen in allen Phasen dieser Arbeit. Mit viel Verständnis und Geduld hat er mich stets an die schönen Seiten des Lebens außerhalb des Labors erinnert und so diese Arbeit nachhaltig beeinflusst.