

Institut für Experimentelle Genetik,  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,  
Neuherberg



**Biogenese peroxisomaler Membranen:  
Funktion von PEX19 beim Transport  
peroxisomaler Membranproteine**

Dipl.-Biochem. Christian Johannes Gloeckner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Rudolf Balling,  
Technische Universität Braunschweig  
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner  
3. Priv.-Doz. Dr. Jerzy Adamski

Die Dissertation wurde am 15.03.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.06.2001 angenommen.

Es sollen wohl Berge weichen und Hügel hinfallen; aber meine Gnade soll nicht von dir weichen und der Bund meines Friedens soll nicht hinfallen. (Jesaja 54,10)

*Verbum Dei manet in aeternum.*

Meiner Gaby,  
meinen Eltern  
und meinen Geschwistern



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	<b>vi</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Stoffwechsel der Peroxisomen . . . . .	2
1.2 Biogenese der Peroxisomen . . . . .	4
1.2.1 Import peroxisomaler Matrixproteine . . . . .	5
1.2.2 Biosynthese peroxisomaler Membranen . . . . .	7
1.3 Pathogenese peroxisomaler Biogenese- oder Enzymdefekte . . . . .	8
1.4 Peroxisomale ABC-Transporter: das Adrenoleukodystrophie-Protein . . . . .	13
1.5 Ziel der Arbeit . . . . .	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Material . . . . .	17
2.1.1 Bezugsquellen der verwendeten Substanzen . . . . .	17
2.1.2 Puffer und Lösungen . . . . .	19
2.1.3 Medien . . . . .	21
2.1.4 Bakterien- und Hefestämme sowie Zelllinien . . . . .	23
2.1.5 Vektoren . . . . .	24
2.1.6 cDNA-Bibliotheken . . . . .	24
2.1.7 Geräte . . . . .	24
2.2 Methoden . . . . .	25
2.2.1 Bakterien- bzw. Hefekultur . . . . .	25
2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	27
2.2.3 Gelelektrophoretische Methoden . . . . .	28

2.2.4	Herstellung und Aufbereitung von DNA-Fragmenten . . .	29
2.2.5	PCR-Methoden . . . . .	30
2.2.6	Ligation . . . . .	30
2.2.7	Verifizierung von Klonierungsprodukten mittels DNA-Sequenzierung . . . . .	31
2.2.8	Klonierung der Vektoren . . . . .	31
2.2.9	LexA Two-Hybrid System (Interaction Trap) . . . . .	32
2.2.10	Proteinexpression und -aufreinigung . . . . .	37
2.2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford . . .	37
2.2.12	<i>in vitro</i> Translation/Transkription . . . . .	38
2.2.13	<i>in vitro</i> Farnesylierung . . . . .	38
2.2.14	GST-Pull-Down-Assay . . . . .	38
2.2.15	Zellkultur (Transfektion) . . . . .	39
2.2.16	Immunhistochemische Färbung . . . . .	39
2.2.17	DAPI-Färbung von Zellkernen . . . . .	40
2.2.18	Sequenz-Alignment und Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen . . . . .	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Suche nach Proteininteraktoren für peroxisomale ABC-Transporter . . . . .	41
3.1.1	Wahl der Methode . . . . .	41
3.1.2	Identifizierung von PEX19 als Interaktor für das ALD-Related Protein . . . . .	43
3.1.3	Test von ALDR-verwandten ABC-Transportern auf PEX-19-Interaktion . . . . .	44
3.2	Einfluß der PEX19-Farnesylierung auf die ALDP-PEX19 Wechselwirkung . . . . .	45
3.2.1	<i>in vitro</i> -Interaktionsassay . . . . .	45
3.2.2	Einfluß der Farnesylierung im Hefe Two-Hybrid System .	49
3.3	Bestimmung der PEX19-Bindungs-Domäne . . . . .	50
3.3.1	Der ALDP-N-Terminus ist essentiell für die PEX19-Interaktion . . . . .	50
3.3.2	Alignment der N-terminalen Bereiche von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69 . . . . .	52
3.3.3	Motiv A ist ein Kandidat für die PEX19-Interaktionsdomäne . . . . .	53

---

3.3.4	Einfluß der konservierten Motive A und B auf die Interaktion von ALDP mit PEX19 . . . . .	53
3.3.5	Mutationsanalyse des Motivs A von ALDP . . . . .	58
3.4	Targeting eines PEX19-ALD-GFP-Fusionsproteins . . . . .	59
3.5	Interaktion von PEX19 mit PEX16 im Hefe Two-Hybrid System	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Peroxisomale ABC-Halbtransporter interagieren mit PEX19 . .	63
4.2	Die PEX19-Interaktionsdomäne von ALDP überlappt mit einem Signal für peroxisomales Targeting . . . . .	64
4.3	Targeting eines PEX19-ALDP-Fusionsproteins . . . . .	65
4.4	Einfluß der Farnesylierung von PEX19 auf die Wechselwirkung mit peroxisomalen Membranproteinen . . . . .	66
4.5	Modell für Transport und Assembly peroxisomaler Membranproteine . . . . .	67
4.6	Ausblick . . . . .	69
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>81</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>87</b>
	<b>Anhang</b>	<b>89</b>





# Zusammenfassung

X-chromosomale Adrenoleukodystrophie wird durch einen Defekt des ALDP-Proteins, eines von vier peroxisomalen ABC-Halbtransportern, verursacht. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine verminderte peroxisomale  $\beta$ -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFAs) aus. Abgesehen von einigen Daten über die Homo- bzw. Heterodimerisierung, ist über Protein-Protein Wechselwirkungen peroxisomaler ABC-Transporter bisher nichts bekannt. Die Aufklärung solcher Protein-Interaktionen könnte zu einem besseren Verständnis der Adrenoleukodystrophie beitragen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Hefe Two-Hybrid Screen durchgeführt, um neue Proteininteraktoren für die peroxisomalen ABC-Transporter zu identifizieren. Mit dieser Methode konnte erstmals das peroxisomale Biogenese-Gen PEX19 als Interaktionspartner für alle vier bekannten peroxisomalen ABC-Transporter (ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69) identifiziert werden. Eine anschließende Charakterisierung der Interaktion zeigte, daß die mit PEX19 interagierende Domäne von ALDP in Proteinbereichen liegt, die essentiell für das peroxisomale Targeting dieses Proteins sind. Diese Resultate lassen erstmals einen Schluß auf die Funktion von PEX19 zu. So könnte dieses Peroxin am Transport oder Zusammenbau peroxisomaler Membranproteine beteiligt sein. Pex19 ist *in vivo* C-terminal farnesyliert. C-terminale Prenylierungen sind für die Reifung vieler Proteine von Bedeutung, die Schlüsselfunktionen in der Signaltransduktion und der Regulation des Zellwachstums spielen. Deshalb wurde der Einfluß der Farnesylierung von PEX19 auf die Interaktion mit peroxisomalen ABC-Transportern untersucht. Mit der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die Interaktion von PEX19 mit dem peroxisomalen ABC-Halbtransporter ALDP im Two-Hybrid-System stark von der Farnesylierung beeinflusst wird.



## Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy is caused by a defect in the ALD-protein, one of four peroxisomal ABC half-transporters. It is characterised by an impaired peroxisomal  $\beta$ -oxidation of very long chain fatty acids (VLCFAs). Besides the dimerization of peroxisomal ABC half-transporters, very little is known about protein-protein interactions of these proteins. The identification of new protein-protein interactions could give new insights in the understanding of the pathogenesis of this disease. Therefore, this work focused on the search for new protein-interactors using the yeast two-hybrid system. With the LexA two-hybrid system (interaction trap) the peroxisomal assembly factor PEX19 has been identified as a new interactor for the four peroxisomal ABC-transporters (ALDP, ALDRP, PMP70 and PMP69). Subsequently, a protein region of ALDP has been found that specifically interacts with PEX19. The same region contains an essential signal for the peroxisomal targeting of this protein. Thus, PEX19 could be involved in the trafficking or assembly of peroxisomal ABC-transporters and other peroxisomal membrane proteins. PEX19 is shown to be farnesylated *in vivo*. A C-terminal prenylation is important in the maturation of many proteins that play critical roles in signal transduction and cell growth regulation. Therefore, the influence of this modification on the PEX19-ALDP interaction was tested. This work shows that the interaction of PEX19 with ALDP strongly depends on its farnesylation.



# Abkürzungsverzeichnis

AAA-ATPase	mit diversen Zellaktivitäten assoziierte ATPasen
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	Adrenoleukodystrophie Protein
ALDRP	Adrenoleukodystrophie-Related-Protein
AMN	Adrenomyelopathie
AO	<i>Addinson-only</i> (ALD-Verlaufsform mit isolierter Nebennieren-Symptomatik)
APS	Ammoniumperoxosulfat
APX	Ascorbat Peroxidase
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cfu	<i>colony forming units</i> (Kolonie-formierende Einheiten)
CoA	Coenzym A
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
COP	<i>coat protein complexes</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol
DTT	Dithiotreitol
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Gal	Galactose
Glu	Glucose
GST	Glutathion-S-Transferase
Ghosts	peroxisomale Reststrukturen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LacZ	$\beta$ -Galactosidase-Gen
LiAc	Lithiumacetat
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
MFP1	<i>multifunctional protein 1</i>
MFP2	<i>multifunctional protein 2</i>
NBF	Nukleotid-Bindungsfalte
ONPG	O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMP	peroxisomales Membranprotein
Pmp22	22 kDa peroxisomales Membranprotein
PMP24	humanes 24 kDa peroxisomales Membranprotein
PMP34	humanes 34 kDa peroxisomales Membranprotein

---

Pmp47	47 kDa peroxisomales Membranprotein ( <i>C. boidini</i> -Homolog zu PMP34)
PMP70	humanes 70 kDa peroxisomales Membranprotein
PMP-TS	peroxisomales Targeting-Signal für Membranproteine
Pex	Peroxin
PEX	humanes Peroxin
<i>PEX</i>	humanes Peroxingen
PEX3	humanes Peroxin 3
PEX19	humanes Peroxin 19
PEXF	farnesyliertes Peroxin (PEX19)
PTS	peroxisomales Targeting-Signal
Raf	Raffinose
RING-Motiv-Protein	Zink-Finger-Motiv zuerst beschrieben beim „ <b>R</b> eally <b>I</b> nteresting <b>N</b> ew <b>G</b> ene 1“-Protein
SCPx	Sterolcarrier-Protein x
SDS	Sodiumdodecylphosphat
SH3-Domäne	SRC-homologe Domäne 3
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRITC	Tettrhodamin-isothiocyanat
THCA	<i>trihydroxy coprostanoic acid</i> (Trihydroxycoprostansäure)
TM	Transmembran-Helix
Upm	Umdrehungen pro Minute
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
VLCFA	<i>very long chain fatty acids</i> (sehr langkettige Fettsäuren)
X-ALD	<i>X-linked adrenoleukodystrophy</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

**Anmerkung zur Nomenklatur:** Für Peroxine wurde allgemein die Schreibweise „Pex“ für das Protein bzw. „*Pex*“ für das Gen gewählt. Ist speziell von humanen Peroxinen die Rede, wurde die Schreibweise „PEX“ bzw. „*PEX*“ gewählt. Zur Hervorhebung anderer Spezies wurde die Abkürzung des Speziesnamen vorangestellt: z.B. : „scPex19“ für Pex19 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Analog wurde für die peroxisomalen Membranproteine, Pmp, verfahren. Die Angabe der Einheiten erfolgt im SI-System.

# 1 Einleitung

Peroxisomen sind 0,2 – 1  $\mu\text{m}$  große Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorhanden sind. Sie enthalten Enzyme, die für eine Vielzahl von Stoffwechselwegen, wie z.B für die  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren, essentiell sind (LAZAROW & MOSER, 1995). Aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbildes und ihrer Sedimentationseigenschaften in der Ultrazentrifugation werden die Peroxisomen, zusammen mit den Glyoxisomen der Pflanzen (BREIDENBACH & BEEVERS, 1967) und den Glykosomen der Kinetoplastida (OPPERDOES & BORST, 1977), zu der Organellenfamilie der „Microbodies“ zusammengefaßt. Die ersten morphologischen Hinweise für die Existenz dieser Organellenfamilie lieferten 1954 elektronenmikroskopische Untersuchungen von Rhodin (RHODIN, 1954). In murinen Nierentubuluszellen entdeckte er von einer einfachen Membran umschlossene, granuläre Strukturen, die er als „Microbodies“ bezeichnete. Anfang der sechziger Jahre waren genug Beweise gesammelt, die die Einführung einer neuen Organellenfamilie rechtfertigten. So wurden die Enzyme Katalase, Ureatoxidase und D-Aminosäureoxidase in zytoplasmatischen Partikeln nachgewiesen, die sich in Dichtegradientenzentrifugationen von den bis dahin bekannten Organellen, den Mitochondrien, Lysosomen und Vesikeln des Golgi-Apparates, sowie den Endosomen, unterschieden (BAUDHUIN et al., 1965). Ihren heutigen Namen erhielten die Peroxisomen 1965 durch de Duve, der in ihrer Eigenschaft Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase umzusetzen, ihre Funktion im Zellstoffwechsel sah (DE DUVE, 1965). Einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Peroxisomen lieferten auch die Arbeiten von Novikoff und Goldfischer, die eine selektive Färbemethode zum Nachweis von Katalase in der Elektronenmikroskopie entwickelten und so die einfache Identifizierung von Peroxisomen in einer Vielzahl verschiedener Gewebeproben ermöglichten (NOVIKOFF & GOLDFISCHER, 1969). Die fundamentale Bedeutung der Peroxisomen im Zellstoffwechsel wird nicht zuletzt durch die Schwere der Erkrankungen deutlich, die durch peroxisomale Enzym- und Biogenesedefekte, wie z.B. das Zellwegersyndrom, verursacht werden (MOSER & MOSER, 1996). Peroxisomale Defekte treten bei Neugeborenen mit einer Häufigkeit von 1:20.000 auf (POWERS & MOSER, 1998). Neuere Schätzungen, die die pränatalen Todesfälle mitrechnen, gehen von einer deutlich höheren Frequenz (1:5000) aus (MÖLLER et al., 2001). Häufigkeit und Schwere der Defekte zeigen, wie wichtig der peroxisomale Stoffwechsel ist. Lange Zeit war nur wenig über Metabolismus und Biogenese der Peroxisomen bekannt. Erst in den letzten Jahren konnten deutliche Erfolge in

der Erforschung der komplexen peroxisomalen Biogenese erzielt werden.

## 1.1 Stoffwechsel der Peroxisomen

In den Peroxisomen sind Enzyme vieler Stoffwechselwege lokalisiert. Neben der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren sind die Peroxisomen an der Cholesterol-Biosynthese, der Glycerolipid-Biosynthese (insbesondere Plasmalogen) sowie der Synthese von Gallensäuren beteiligt (VAN VELDHoven & MANNAERTS, 1999).

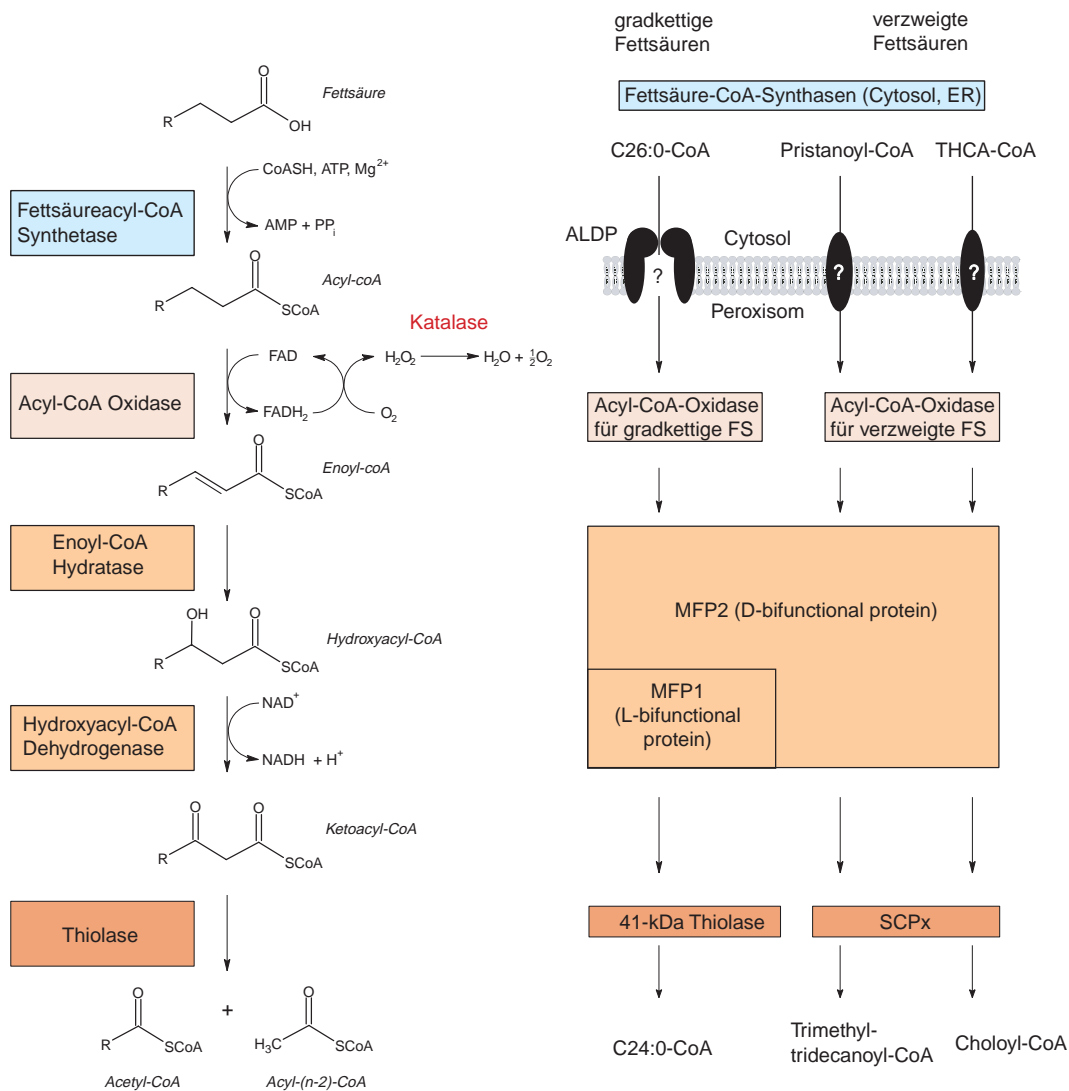
Wegen ihrer grundlegenden Bedeutung für den Zellstoffwechsel wird im folgenden näher auf die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation eingegangen. In den Peroxisomen findet die  $\beta$ -Oxidation eines weiten Spektrums von Fettsäuren statt. Zu den wichtigsten gehören verzweigte und unverzweigte, sehr langkettige Fettsäuren (C24 und C26), einige langkettige Fettsäuren ( $\leq$  C20) und langkettige Dicarboxyl-Fettsäuren (die Produkte der  $\omega$ -Oxidation). Ebenfalls können die Seitenketten der Eicosanoide in den Peroxisomen abgebaut werden. Metabolite der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation sind weiterhin für die Synthese der Gallensäuren wichtig (WANDERS et al., 2000). In Abb. 1.1 sind die Schritte der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation zusammengefaßt.

Die Aktivierung der Substrate der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation durch Coenzym A findet an verschiedenen Orten statt. Sehr langkettige Fettsäuren können im ER und an den Peroxisomen aktiviert werden (VAN VELDHoven & MANNAERTS, 1999). Vom Cytosol werden aktivierte Fettsäuren über verschiedene, nur zum Teil identifizierte, Transportmechanismen in die Peroxisomen transportiert. Der Transport unverzweigter, sehr langkettiger Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA) läuft höchstwahrscheinlich über ALDP, einem peroxisomalen ABC-Transporter (Abschn. 1.4).

In den Peroxisomen werden die CoA-Ester der Fettsäuren durch spezifische Acyl-CoA-Oxidasen zum entsprechenden Enoyl-CoA-Ester oxidiert. Im Gegensatz zur mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation wird der Wasserstoff der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase nicht auf  $\text{NAD}^+$  und anschließend auf die Atmungskette, sondern über FAD auf Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) übertragen, so daß Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entsteht. Dieses wird von der Katalase, dem Leitenzym der Peroxisomen, zu Wasser und Sauerstoff abgebaut.

Im nächsten Schritt der  $\beta$ -Oxidation wird durch die Enoyl-CoA-Hydratase Wasser an die Doppelbindung des Enoyl-CoA-Esters addiert. Die entstehende Hydroxylgruppe wird durch die Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase zur Keto-Gruppe oxidiert. Hier besteht ein weiterer Unterschied zur mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation: In den Peroxisomen sind Enoyl-CoA-Hydratase und Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase zu einem multifunktionellen Enzym zusammengefaßt, während in den Mitochondrien dafür zwei getrennte Enzyme existieren. Bisher sind zwei peroxisomale, multifunktionelle Enzyme bekannt: Das L-spezifische MFP1 (*multifunctional protein 1*), welches unverzweigte Enoyl-CoA-Fettsäuren um-





**Abb. 1.1: Peroxisomale  $\beta$ -Oxidation.** In den Peroxisomen werden verzweigte und unverzweigte, sehr langkettige Fettsäuren abgebaut. Auf der linken Seite sind die Schritte der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation schematisch wiedergegeben. Auf der rechten Seite wird die  $\beta$ -Oxidation geradkettiger, sehr langkettiger Fettsäuren am Beispiel der Hexacosansäure (C26:0) erläutert. Am Beispiel der Pristansäure und Trihydroxycoprostanäure (THCA), einer Gallensäure, wird der Abbauweg verzweigter, langkettiger Fettsäuren dargestellt.

setzt, und das D-spezifische MFP2 (*multifunctional protein 2*), welches sich durch ein breiteres Substratspektrum auszeichnet und neben den unverzweigten auch verzweigte Enoyl-CoA-Fettsäuren metabolisiert. Während ein MFP1-Knock-out in der Maus nur zu einem schwach ausgeprägten Phänotyp führt, zeigt eine MFP2-Knock-out Maus einen schweren, Zellweger-ähnlichen Phänotyp. Beim Menschen führen Defekte des MFP2 ebenfalls zu Zellweger-ähnlichen Symptomen (WANDERS et al., 2000; DE LAUNOIT & ADAMSKI, 1999). Somit scheint ein Defekt des MFP1 (QI et al., 1999), im Gegensatz zu einem von

MFP2, kompensierbar zu sein. MFP2-Knock-out-Mäuse zeichnen sich zusätzlich dadurch aus, daß sie neben den verzweigten, sehr langkettigen Fettsäuren auch die unverzweigten nicht verstoffwechseln (BAES et al., 2000). Es kann daher angenommen werden, daß MFP2 unter physiologischen Bedingungen für den Abbau geradkettiger, als auch der verzweigten Fettsäuren, essentiell ist (WANDERS et al., 2000). MFP2 wird aufgrund seiner Eigenschaft Östradiol zu Östron umzusetzen, auch als 17 $\beta$ -HSD4 bezeichnet (LEENDERS et al., 1996; LEENDERS et al., 1998).

Im letzten Schritt der  $\beta$ -Oxidation wird Acetyl-CoA vom Ketoacyl-CoA-Ester durch die Thiolase abgespalten. Bisher sind zwei peroxisomale Tholasen beschrieben worden: ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 41 kDa, das Ketoacyl-CoA-Ester unverzweigter Fettsäuren spaltet, und SCPx, welches die verzweigten Ketoacyl-CoA-Ester umsetzt. SCPx und MFP2 tragen zusätzlich eine Domäne (Sterol-Carrier-Protein), die als Fettsäurecarrier fungieren kann (LEENDERS et al., 1996; SEEDORF et al., 2000).

Da nur sehr langkettige und langkettige Fettsäuren von der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidationsmaschinerie abgebaut werden, müssen die, nach mehreren Abbau-schritten resultierenden, kürzeren Fettsäure-CoA-Ester für eine weiterführende Verstoffwechslung in die Mitochondrien transportiert werden. Es wird vermutet, daß der Transport aus den Peroxisomen zu den Mitochondrien, wie für Acetyl-CoA und Propionyl-CoA gezeigt, über Carnitinester erfolgt (WANDERS et al., 2000; JAKOBS & WANDERS, 1995).

## 1.2 Biogenese der Peroxisomen

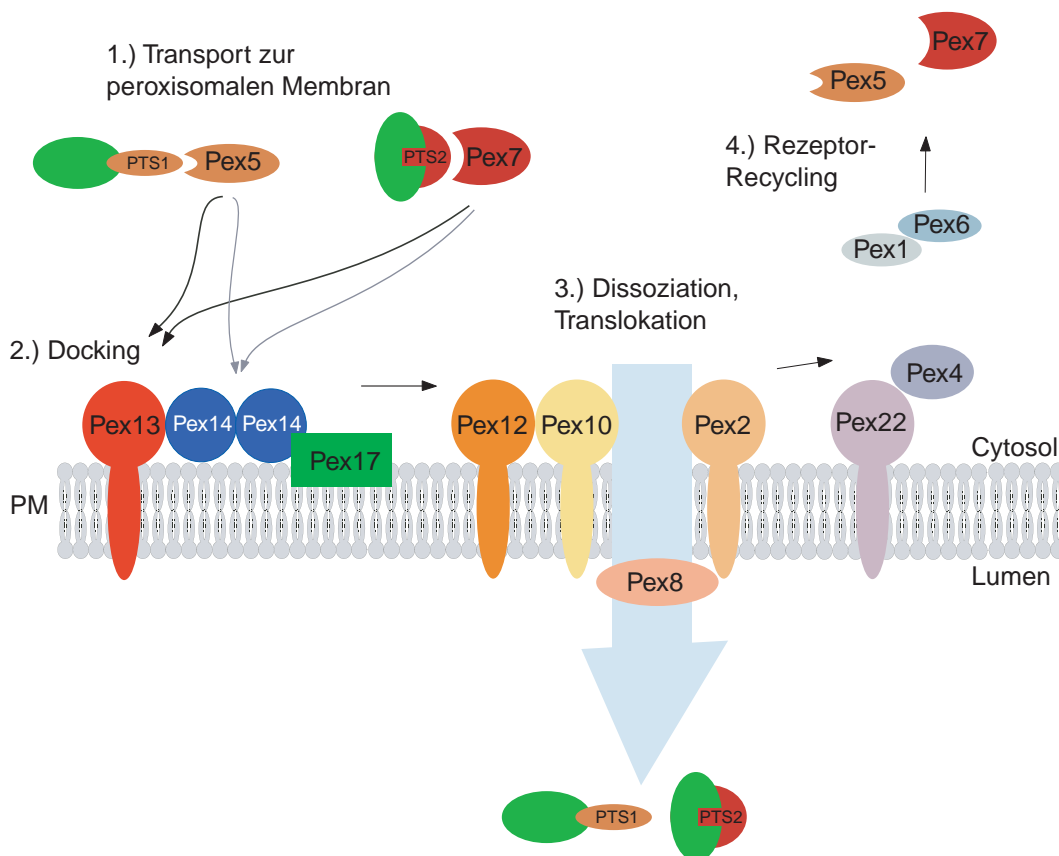
Bis Mitte der achtziger Jahre herrschte die These vor, Peroxisomen würden durch Vesikelabschnürung aus dem endoplasmatischen Retikulum hervorgehen. 1985 hatten Lazarow und Fujiki genug Beweise gesammelt, die diese frühe Hypothese widerlegten. So zeigte sich, daß peroxisomale Matrixproteine über eine cytosolische Importmaschinerie in die Peroxisomen gelangen (LAZAROW & FUJIKI, 1985). Peroxisomale Membranproteine werden ebenfalls an freien Ribosomen translatiert (IMANAKA et al., 1996b; DIESTELKÖTTER & JUST, 1993). Die peroxisomale Biogenese ähnelt damit sehr der Bildung der Mitochondrien und Chloroplasten, die ebenfalls eine Großzahl ihrer Proteine aus dem Cytosol erhalten. Bisher sind 23 peroxisomale Biogenesefaktoren, sogenannte Peroxine (Pex-Proteine<sup>1</sup>), bekannt. Die meisten von ihnen sind in Hefen (*S. cerevisiae* bzw. *Y. lipolytica*) beschrieben worden. Homologe humane Peroxine sind nur zum Teil bekannt. So konnten bei Säugetieren bisher 12 Peroxine identifiziert werden. In Tab. 1.1 ist eine Übersicht über die bekannten Peroxine zusammengestellt.

---

<sup>1</sup>Zur Nomenklatur der Peroxine siehe Anmerkung auf Seite x

### 1.2.1 Import peroxisomaler Matrixproteine

Der Import peroxisomaler Matrixproteine läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst werden die frisch synthetisierten Proteine von cytosolischen Rezeptoren gebunden und zu den Peroxisomen transportiert (Targeting). An der peroxisomalen Membran wird dieser Rezeptor-Substrat Komplex durch membranständige Proteinkomplexe gebunden (Docking). Nach der Bindung an den „Docking-Komplex“ erfolgt die Translokation der Matrixproteine durch die peroxisomale Membran in das peroxisomale Lumen. Der Mechanismus der Translokation ist, wie die Dissoziation der Matrixproteine von ihrem Rezeptor bzw. dessen Recycling, noch nicht aufgeklärt. Abb. 1.2 zeigt ein Modell für den Import von Matrixproteinen.



**Abb. 1.2: Import peroxisomaler Matrixproteine.** Das Modell beruht weitgehend auf Daten, die in Hefen (*S. cerevisiae* und *P. pastoris*) gewonnen wurden (verändert nach COLLINS et. al, 2000). Einzelheiten siehe Text.

## Transport zur peroxisomalen Membran

Für die peroxisomalen Matrixproteine sind bis heute zwei cytosolische Rezeptoren (Pex5 und Pex7) und deren Erkennungssignale (Peroxisomale Targeting Signale, PTS) bekannt. Das von Pex5 (MCCOLLUM et al., 1993) erkannte peroxisomale Targeting Signal 1 (PTS1) besteht aus einer C-terminalen Sequenz von 3 Aminosäuren mit dem Consensus (S,C,A)-(K,R,H)-(L,M) (SWINKELS et al., 1992). Das weniger konservierte peroxisomale Targeting Signal 2 (PTS2) mit dem Consensus (R,K)-(L,V,I)-x5-(H,Q)-(L,A) ist nur für wenige Proteine beschrieben worden. PTS2-Proteine werden über Pex7 zu den Docking-Stellen der peroxisomalen Membran transportiert (MARZIOCH et al., 1994). Im Gegensatz zum PTS1, das nur am äußersten C-Terminus des Zielproteins funktionell ist, kann PTS2 auch als internes Signal peroxisomales Targeting bewirken, wird jedoch vorwiegend am N-Terminus peroxisomaler Matrixproteine gefunden (REHLING et al., 1996).

Während Pex5 und Pex7 in Hefen unabhängig voneinander das Targeting von PTS1- bzw. PTS2-Proteinen steuern, ist dieses bei Säugetieren anders. So betrifft eine PEX5-Defizienz beim Menschen beide Importwege. Beim Menschen kommen zwei Isoformen, eine kurze (PEX5S) und eine lange (PEX5L), vor, die durch alternatives Splicing entstehen (BRAVERMAN et al., 1998). Die kurze Isoform, PEX5S, steuert, homolog zum Pex5 in Hefen, das Targeting von PTS1-Proteinen. Die lange Isoform, PEX5L, hingegen ist, neben seiner Funktion als PTS1-Rezeptor, essentiell für das Targeting von PTS2-Proteinen. So kann der Komplex aus PEX7 und PTS2-Proteinen in humanen Zellen nur PEX5L vermittelt an den Docking-Komplex der peroxisomalen Membran binden (OTERA et al., 2000; BRAVERMAN et al., 1998).

## Peroxisomales Docking

Die mit Matrixproteinen beladenen Rezeptoren Pex5 und Pex7 binden an einen „Docking-Komplex“ der peroxisomalen Membran. In Hefen sind bisher drei Proteine dieses Komplexes identifiziert worden: Pex13, Pex14 und Pex17 (HETTEMA et al., 1999). Pex13, als auch Pex14, binden beide PTS-Rezeptoren. Für Pex13 konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Bindungsdomänen für die PTS-Rezeptoren an den entgegengesetzten Enden des Proteins lokalisiert sind. So wird Pex5 von der C-terminalen SH3-Domäne und Pex7 (URQUHART et al., 2000) vom N-Terminus des Pex13 gebunden (GIRZALSKY et al., 1999). Ausgehend von *in vitro*-Experimenten wird vermutet, daß Pex14 Oligomere bildet (ALBERTINI et al., 1997). Das dritte bekannte Protein des Docking-Komplexes, das periphere peroxisomale Membranprotein Pex17, wurde über seine Bindung an Pex14 identifiziert (HUHSE et al., 1998).

Zur Zeit sind nur die humanen homologen Proteine für Pex13 und Pex14 des Docking-Komplexes bekannt. Während in Hefen Pex5 und Pex7 unabhängig voneinander an den Docking-Komplex binden, wird beim Menschen die Bindung des PEX7-PTS2-Komplexes an PEX14 von der langen Isoform des PTS1-Rezeptors (PEX5L) vermittelt (OTERA et al., 2000; BRAVERMAN et al., 1998).

### Dissoziation und Translokation

An der Translokation der Matrixproteine sind vermutlich die RING-Motiv Peroxine Pex2, Pex10 und Pex12 beteiligt, da Defekte dieser Proteine zu einer Akkumulation des PTS1-Rezeptors, PEX5, an der peroxisomalen Membran führen. Zusätzlich bilden Pex10 und Pex12 Komplexe und können Pex5 binden (CHANG et al., 1999; OKUMOTO et al., 2000).

Es wird angenommen, daß die Dissoziation der Matrixproteine von ihrem Rezeptor auf der Lumenseite der peroxisomalen Membran stattfindet. In Hefen wird dieser Schritt vermutlich von Pex8 gesteuert. Es ist mit der luminalen Seite der peroxisomalen Membran assoziiert und bindet PTS1-unabhängig an Pex5 (REHLING et al., 2000). Pex20, ein cytosolisches Protein, das in *Y. lipolytica* selektiv am peroxisomalen Import von Thiolase beteiligt ist, bindet ebenfalls an Pex8 (SMITH & RACHUBINSKI, 2001).

### Rezeptor-Recycling

Pex22, Pex4, Pex1 und Pex6 sind vermutlich am Rezeptor-Recycling beteiligt. Dies schlossen COLLINS et al. aus der Tatsache, daß Mutationen dieser Proteine zu einer verringerten Pex5 (PTS1-Rezeptor) Menge in den betroffenen Hefen führen, während Hefen mit zusätzlichen Defekten von Peroxinen des Docking- bzw. des Translokations-Komplexes normale Pex5 Konzentrationen aufweisen (COLLINS et al., 2000).

Die Funktion der AAA-ATPasen Pex1 und Pex6 als mögliche Recyclingfaktoren der PTS-Rezeptoren ist allerdings umstritten. So kommen frühere Arbeiten zu dem Schluß, daß diese Peroxine an ganz anderer Stelle, und zwar der peroxisomalen Membranbiogenese, aktiv werden (TITORENKO & RACHUBINSKI, 1998B).

## 1.2.2 Biosynthese peroxisomaler Membranen

Während für den Import der Matrixproteine cytosolische Rezeptoren und Docking-Stellen an der peroxisomalen Membran beschrieben wurden, ist über den Transport von peroxisomalen Membranproteinen nur wenig bekannt. Es wurde beschrieben, daß die integralen, peroxisomalen Membranproteine ebenfalls an freien Ribosomen translatiert werden und wie für PMP70 (IMANAKA et al., 1996a; IMANAKA et al., 1996b) und PMP22 (DIESTELKÖTTER & JUST, 1993) gezeigt, die Peroxisomen mittels cytosolischer Faktoren erreichen. Eine Consensus-Sequenz für ein Targetingsignal peroxisomaler Membranproteine konnte bisher nicht gefunden werden. Für einige Membranproteine existiert ein Targeting-Signal, bestehend aus einer Arginin- und Lysin-reichen Sequenz in unmittelbarer Nähe zu einer Transmembranhelix, z.B. für humanes und Hefe-Pex3 (KAMMERER et al., 1998), für Pmp47 in *C. boidinii* (DYER et al., 1996) und sein humanes Homolog PMP34 (HONSHO & FUJIKI, 2000) sowie für die Ascorbat-Peroxidase (APX) aus Baumwollsaamen (MULLEN & TRELEASE, 2000). Ein weiteres Targeting-Signal für peroxisomale Membranproteine (mPTS), welches weniger basisch ist, konnte in PMP22 identifiziert werden

(PAUSE et al., 2000).

Bisher sind drei Peroxine, Pex3, Pex16 und das farnesylierbare Protein Pex19, beschrieben worden, die an der Biogenese peroxisomaler Membranen bzw. dem Import peroxisomaler Membranproteine beteiligt sein könnten. Im Gegensatz zu Defekten von Peroxinen des Matrixproteinimports, sind bei Defekten dieser Peroxine selbst Ghosts (peroxisomale Reste, bei denen nur noch die Membranproteine, üblicherweise PMP70, nachweisbar sind) nicht mehr vorhanden (GÖTTE et al., 1998; MUNTAU et al., 2000a; HONSHO et al., 1998; MATSUZONO et al., 1999). Die Tatsache, daß Mutationen dieser Peroxine zu ghostfreien Zellen führen, spricht dafür, daß diese Proteine bei sehr frühen Schritten der peroxisomalen Biogenese aktiv werden. Ihre genaue Funktion diesbezüglich ist allerdings unbekannt. Für PEX19 konnte in dieser und in anderen Arbeiten eine Bindung an verschiedene peroxisomale Membranproteine gezeigt werden (GLOECKNER et al., 2000; SACKSTEDER et al., 2000; SNYDER et al., 2000). PEX19 könnte somit am Transport von peroxisomalen Membranproteinen zur peroxisomalen Membran beteiligt sein.

Die Herkunft peroxisomaler Membranstrukturen ist bis heute ungewiß. Peroxisomen können *de novo* sowohl aus prä-peroxisomalen Membranstrukturen als auch durch Pex11-vermittelte Teilung entstehen (SCHRADER et al., 1998; SOUTH & GOULD, 1999). Eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER) an der Entstehung peroxisomaler Vorgängerstrukturen ist nicht auszuschließen. Auch die Glykosylierung peroxisomaler Membranproteine, wie z.B. Pex2 und Pex16 in *Y. lipolytica*, zeigt, daß einige peroxisomale Proteine im ER modifiziert, wenn nicht sogar über das ER zu den Peroxisomen dirigiert werden (EITZEN et al., 1997).

## 1.3 Pathogenese peroxisomaler Biogenese- oder Enzymdefekte

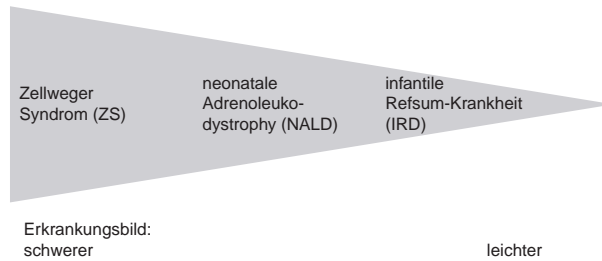
### Peroxisomale Biogenesedefekte

Störungen des peroxisomalen Stoffwechsels haben in der Regel schwerwiegende Erkrankungen zur Folge. So sterben vom Zellwegersyndrom betroffene Kinder, denen peroxisomale Matrixproteine vollständig fehlen, meist noch im ersten Lebensjahr. Das Zellwegersyndrom ist ein Multiorgan-Krankheitskomplex. So sind die, an dieser Krankheit leidenden, Neugeborenen aufgrund schwerer neurologischer Entwicklungsstörungen oft blind und/oder taub und stark zurückgeblieben, leiden an Krampfanfällen und zeigen eine allgemeine Muskelschwäche sowie eine schwache Muskelspannung (Hypotonie). Andere pathologische Merkmale sind eine Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie), Nierenzysten und ein typischer Turmschädel mit weit offenen Fontanellen. Weiterhin ist das Zellwegersyndrom durch seine auffälligen biochemischen Störungen, wie der Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren, dem Auftreten anormaler Intermediate der Gallensäurensynthese und einer Störung

Peroxin	Funktion	Quelle
Pex1	AAA ATPase, interagiert mit Pex6	(KIEL et al., 1999; FABER et al., 1998)
Pex2	RING-Protein, beteiligt am Matrixproteinimport (Translokation)	(HUANG et al., 2000)
Pex3	peroxisomales Membranprotein, beteiligt am PMP-Import, interagiert mit Pex19	(GÖTTE et al., 1998)
Pex4	ubiquitinkonjugierendes Enzym (E2), möglicherweise beteiligt am Rezeptorrecycling	(COLLINS et al., 2000)
Pex5	PTS1-Rezeptor, bindet an den Dockingkomplex, zwei humane Isoformen, PEX5S und PEX5L bekannt – Pex5L ist am PTS2-Import beteiligt	(URQUHART et al., 2000; OTERA et al., 2000; BRAVERMAN et al., 1998)
Pex6	AAA ATPase, beeinflusst PTS1-Rezeptorstabilität in humanen Fibroblasten, interagiert mit Pex1	(KIEL et al., 1999; FABER et al., 1998)
Pex7	PTS2-Rezeptor, bindet an Dockingkomplex, Pex18 und Pex21 ( <i>S. cerevisiae</i> )	(BRAVERMAN et al., 1997)
Pex8	peripheres Membranprotein, Wechselwirkung mit PTS1 und PTS2-Signal ( <i>S. cerevisiae</i> ), Interaktion mit PTS1-Rezeptor (Pex5) und Pex20, vermutliche Funktion: Importrezeptor-Dissoziation; humanes Homolog unbekannt	(REHLING et al., 2000; SMITH & RACHUBINSKI, 2001)
Pex9	peroxisomales Membranprotein, kloniert für <i>Y. lipolytica</i> (PAY2)	(EITZEN et al., 1995)
Pex10	RING-Protein, integrales Membranprotein, interagiert mit Pex12 und Pex5, vermutlich beteiligt an PTS-Rezeptortranslokation	(OKUMOTO et al., 2000; CHANG et al., 1999)
Pex11	peroxisomales Membranprotein, beteiligt an Peroxisomenteilung, bindet ARF ( <i>ADP-ribosylation factor</i> ) und Coatomer, zwei humane Isoformen PEX11 $\alpha$ und PEX11 $\beta$ bekannt	(SOUTH & GOULD, 1999; PASSREITER et al., 1998; ABE & FUJIKI, 1998)
Pex12	RING-Protein, vermutlich beteiligt an PTS-Rezeptortranslokation, interagiert mit Pex10	(OKUMOTO et al., 2000; CHANG et al., 1999)
Pex13	SH3-Protein, integrales Membranprotein, Teil des Dockingkomplexes	(URQUHART et al., 2000; GIRZALSKY et al., 1999)
Pex14	assoziiert mit peroxisomaler Membran, Teil des Dockingkomplexes	(URQUHART et al., 2000; GIRZALSKY et al., 1999)
Pex15	peroxisomales Membranprotein (phosphoryliert), kloniert für <i>S. cerevisiae</i>	(ELGERSMA et al., 1997)
Pex16	peroxisomales Membranprotein, beteiligt an Membranbiogenese oder PMP-Import	(HONSHO et al., 1998)
Pex17	peripheres Membranprotein, Teil des Dockingkomplexes in <i>S. cerevisiae</i> , humanes Homolog unbekannt	(SNYDER et al., 1999b; HUHSE et al., 1998)
Pex18	PTS2-spezifischer Importfaktor in <i>S. cerevisiae</i> , vorwiegend cytosolisch lokalisiert, hoch homolog zu Pex21	(PURDUE et al., 1998)
Pex19	farnesyliertes Protein, vorwiegend cytosolisch lokalisiert, Importfaktor für PMP	(GLOECKNER et al., 2000; SACKSTEDER et al., 2000; GÖTTE et al., 1998)
Pex20	vorwiegend cytosolisch lokalisiert, Thiolase-spezifischer Importfaktor in <i>S. cerevisiae</i>	(TITORENKO et al., 1998)
Pex21	PTS2-spezifischer Importfaktor in <i>S. cerevisiae</i> hoch homolog zu Pex18	(PURDUE et al., 1998)
Pex22	peroxisomales Membranprotein, interagiert mit Pex4, beteiligt am Matrixproteinimport (Rezeptorrecycling) in <i>S. cerevisiae</i>	(COLLINS et al., 2000; KOLLER et al., 1999)
Pex23	peroxisomales Membranprotein, beteiligt am Matrixproteinimport in <i>Y. lipolytica</i>	(BROWN et al., 2000)
Djp1	DnaJ-verwandtes Protein in <i>S. cerevisiae</i> , beteiligt am Matrixproteinimport	(HETTEMA et al., 1998)

**Tab. 1.1: Übersicht über die bekannten Peroxine.** Bisher sind 24 Peroxine bekannt. Für 12 Peroxine sind die humanen Homologa bekannt.

der Plasmalogensynthese, charakterisiert. Andere vererbare, peroxisomale Störungen, wie die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) oder die infantile Refsum-Erkrankung (IRD), sind weniger schwer, so daß betroffene Patienten durchaus das 40. Lebensjahr erreichen können. Die Symptome und biochemischen Störungen dieser Erkrankungen entsprechen denen des Zellwegersyndroms, allerdings in schwächerer Ausprägung (siehe Abb. 1.3) (LAZAROW & MOSER, 1995).



**Abb. 1.3: Zellwegerspektrum.**

Mittlerweile sind 12 verschiedene peroxisomale Biogenesedefekte beim Menschen bekannt, die historisch in 14 sog. Komplementationsgruppen eingeteilt werden. Bis auf der Komplementationsgruppe 8 (auch Gruppe A genannt), konnte allen Komplementationsgruppen ein Peroxin-Defekt zugeordnet werden (Tab. 1.3). Die meisten peroxisomalen Erkrankungen gehen mit zum Teil schwerwiegenden neurologischen Störungen einher. Sie lassen sich in drei Klassen einteilen: 1. neuronale Migrations- und Differenzierungsstörungen, wie sie beim klassischen Zellwegersyndrom auftreten, 2. Defekte der Bildung und Erhaltung der weißen Substanz und 3. nach der Embryonalentwicklung auftretende neuronale Degenerationen (wie z.B. bei der Adrenoleukodystrophie) (POWERS & MOSER, 1998).

Komplementations-Gruppe		mutiertes Gen
USA	Japan	
1	E	<i>PEX1</i>
2		<i>PEX5</i>
3		<i>PEX12</i>
4, 6	C	<i>PEX6</i>
7, 5	B	<i>PEX10</i>
8	A	unbekannt
9	D	<i>PEX16</i>
10	F	<i>PEX2</i>
11 (RCDP)		<i>PEX7</i>
12	G	<i>PEX3</i>
13	H	<i>PEX13</i>
14	J	<i>PEX19</i>

**Tab. 1.2: Übersicht der Zellweger-Komplementationsgruppen.** (POWERS & MOSER, 1998) ergänzt durch: *PEX3* (MUNTAU et al., 2000b), *PEX13* (LIU et al., 1999b), *PEX19* (MATSUZONO et al., 1999)



Die meisten peroxisomalen Biogenesestörungen, mit Ausnahme der PEX7 (PTS2-Rezeptor)-Defizienz, führen zu einer, mehr oder weniger, ausgeprägten Beeinträchtigung aller peroxisomalen Stoffwechselwege. Ein PEX7-Defekt führt zur Rhizomelischen Chondrodysplasia Punctata Typ 1 (RCDP), einer isolierten Störung der Plasmalogensynthese und des Phytansäuremetabolismus.

### **Einzelenzymdefekte**

Isolierte Defekte von Matrixenzymen haben Erkrankungen zur Folge, die denen der peroxisomalen Biogenese zum Teil entsprechen. So können Krankheiten, welche durch Störungen der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation hervorgerufen werden, im Zellwegerspektrum (Zellwegersyndrom-NALD-IRD-Kontinuum, Abb. 1.3) eingeordnet werden. Hierzu zählen die MFP2-Defizienz, mit einem des klassischen Zellwegersyndroms vergleichbaren Krankheitsbild, die Acyl-CoA-Oxidase-Defizienz und die Thiolase-Defizienz. Zwei weitere Formen (Typ II und Typ III) der RCDP werden durch Defekte der Dihydroxyacetonphosphatacyltransferase (DAHP-Acyltransferase) bzw. Alkyldihydroxyacetonphosphatsynthase (Alkyl-DHAP-Synthase) verursacht. Beide Enzyme sind an der Plasmalogenbiosynthese beteiligt. Sie unterscheiden sich von der RCDP Typ I durch einen normalen Phytansäuremetabolismus. Zusätzlich kommt es, anders als bei Typ I, bei Typ II und Typ III der RCDP nicht zu einer Thiolasedefizienz durch inkorrekte Proteinprozessierung.

### **Adrenoleukodystrophie**

Die X-chromosomale Erkrankung Adrenoleukodystrophie (X-ALD) zählt, mit einer Häufigkeit von 1:20.000 bei Jungen, zu den häufigsten peroxisomalen Erkrankungen (KEMP et al., 1998). Sie wird durch Defekte des peroxisomalen ABC-Transporters ALDP verursacht (BRAUN et al., 1995).

X-ALD zeichnet sich biochemisch durch einen Defekt der  $\beta$ -Oxidation der gesättigten, sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA,  $>C22$ ) und einer eingeschränkten Aktivität der LVLFCF-Acyl-CoA-Synthetase aus. Von der Krankheit sind vornehmlich das Myelin des gesamten Nervensystems, die Nebennierenrinde sowie die Testis betroffen. Charakteristisch für die Adrenoleukodystrophie ist der sehr variable Krankheitsverlauf. So läßt sich die X-ALD in mehrere Verlaufsformen einteilen, wobei die Übergänge fließend sind. Die schwerste und häufigste Form ist die juvenile, stark progressive, cerebrale Form der Krankheit (ALD), die durch eine entzündliche cerebrale Demyelinisierung charakterisiert ist und innerhalb weniger Jahre zum Tod führt. Betroffen sind Jungen im Alter von sechs bis acht Jahren. Eine mildere Form, die erst im jugendlichen Alter auftritt, ist die Adrenomyeloneuropathie (AMN), deren Symptome anfänglich auf das Rückenmark beschränkt bleiben. Seltener kommt es zu einer isolierten Nebenniereninsuffizienz (Addison-only, AO) ohne neurologische Symptome, einer Form der Addisonschen Erkrankung (MOSER et al., 1995). Bemerkenswerter Weise konnte bisher keine Genotyp-Phänotyp Beziehung zwischen der Art

der Mutation des ALD-Gens und der Verlaufsform der Krankheit gefunden werden. Vermutlich beeinflussen weitere Gene den Krankheitsverlauf (SMITH et al., 1999; GÄRTNER et al., 1998a).

Eine wirksame Therapie, die zur Heilung der Erkrankung führt, ist zur Zeit nicht verfügbar. Eine VLCFA-arme Diät in Verbindung mit der Gabe von Lorenzo's Öl<sup>2</sup>, welches ein 4:1-Gemisch aus Glyceroltrioleat und Glyceroltrierucat darstellt, führt zu einer Normalisierung der C26- bzw. C24-Plasmaspiegel. Sobald die neurologischen Symptome eingetreten sind, läßt sich der Krankheitsverlauf der juvenilen cerebralen ALD nicht mehr beeinflussen. Aktuell werden Substanzen getestet, die in die Genregulation der peroxisomalen ABC-Transporter eingreifen. So kann z. B. 4-Phenylbutyrat ALDR, das homologe Gen von ALD, (KEMP et al., 1998) oder Phenofibrat die beiden peroxisomalen ABC-Transporter ALDR und PMP70 hochregulieren (NETIK et al., 1999). Für ALDR und PMP70 konnte gezeigt werden, daß sie in der Zellkultur den ALD-Defekt komplementieren können (siehe Abschn. 1.4).

### Tiermodelle peroxisomaler Erkrankungen

Als Modell für peroxisomale Biogenesedefekte wurden Knock-out-Mausmodelle für Pex2 (FAUST & HATTEN, 1997) und Pex5 (BAES et al., 1997) untersucht. Im wesentlichen konnten dieselben Phänotypen wie bei den menschlichen Zellwegerkomplementationsgruppen (10 bzw. 2) beobachtet werden. Während die Funktion der Peroxine zwischen Mensch und Maus hoch konserviert ist, weist der peroxisomale Stoffwechsel selbst Unterschiede auf. So zeigen Defekte des MFP2, abhängig vom Ort der Mutation, beim Menschen im schwersten Falle zellwegerähnliche Symptome, die postnatal letal sind. Der Phänotyp des kürzlich hergestellten MFP2-Mausmodells, das keine MFP2-Restfunktionalität mehr aufweist, ist sehr heterogen. Während ein Verlust der MFP2 Aktivität beim Menschen in jedem Fall zum Tod führt, überleben etwa 2/3 der MFP2-Knock-out-Mäuse (BAES et al., 2000). Das Mausmodell für die Adrenoleukodystrophie (*Ald* Knock-out) zeigt zwar den biochemischen Phänotyp einer ALDP-Insuffizienz, entwickelt aber keinen pathologischen Befund (LU et al., 1997; FORSS-PETTER et al., 1997).

Unterschiede in der Regulation des peroxisomalen Stoffwechsels wurden schon früher bei der Untersuchung sogenannter Peroxisomen-Proliferatoren, Liganden des *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*, beobachtet. Während Mäuse bei Behandlung mit diesen Substanzen mit einer Proliferation der Peroxisomen reagieren, wurde ein solches Verhalten bei menschlichen Zellen nicht beobachtet (SCHOONJANS et al., 1996).

Ein weiteres interessantes Tiermodell für die Adrenoleukodystrophie ist die *Drosophila*-Mutante „*bubblegum*“. Sie trägt eine Mutation im Gen für die VLCFA-CoA-Synthase, die bei der Adrenoleukodystrophie eine verringerte Aktivität zeigt. Die Fliegenmutanten zeigen nicht nur erhöhte VLCFA-Spiegel,

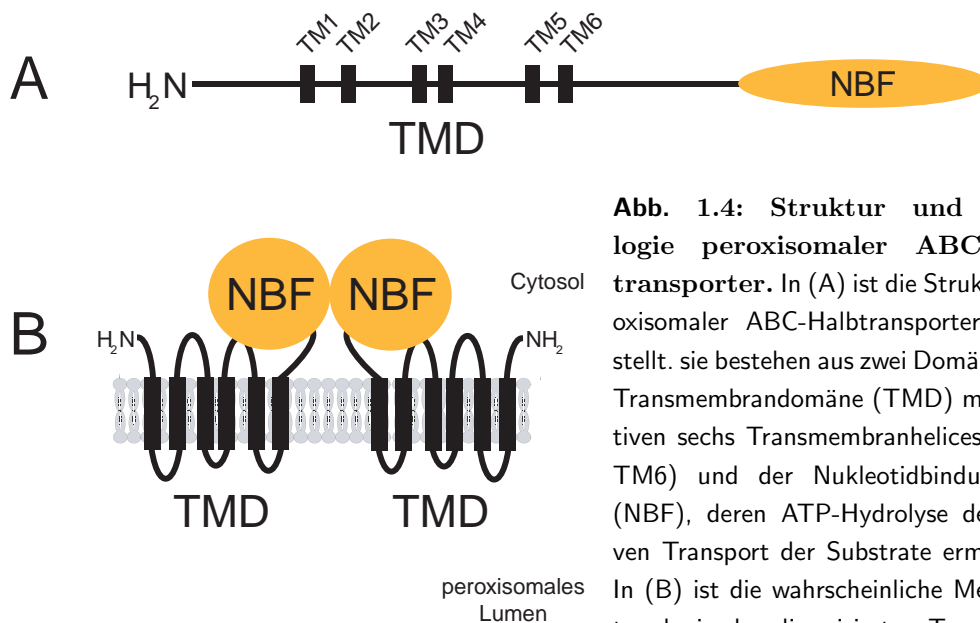
---

<sup>2</sup>Lorenzo's Öl war das erste Therapeutikum für ALD, welches die Eltern von Lorenzo Odone, einem an ALD erkrankten Kind, entwickelten.

sondern zusätzlich neuronale Degenerationen. So zeigen ältere Fliegen eine spezifische regionale Degeneration im ersten optischen Ganglion (MIN & BENZER, 1999).

## 1.4 Peroxisomale ABC-Transporter: das Adrenoleukodystrophie-Protein (ALDP)

Das Adrenoleukodystrophie-Protein gehört zu einer Gruppe von vier peroxisomalen ABC-Halbtransportern. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind das ALD-verwandte Protein (ALDRP) (HOLZINGER et al., 1997b), PMP70 (PXMP1) (KAMIJO et al., 1990) und PMP69 (PXMP1-L) (HOLZINGER et al., 1997a; SHANI et al., 1997). ABC-Transporter stellen eine große Familie von Transporterproteinen dar, die ein breites Spektrum an Substanzen (von Ionen bis hin zu Peptiden) transportieren (KLEIN et al., 1999). Die Substrate der peroxisomalen ABC-Transporter sind bisher nicht bekannt. Vermutlich sind sie am Transport diverser Fettsäuren in die Peroxisomen beteiligt. Aus Knock-out-Experimenten mit den Hefeanaloga Pxa1 (Pat2) und Pxa2 (Pat1) (HETTEMA et al., 1996) und biochemischen Befunden bei der Adrenoleukodystrophie, in denen die Plasmaspiegel sehr langkettiger Fettsäuren (>C22) stark erhöht sind, läßt sich schließen, daß das ALDP als Transporter sehr langkettiger Fettsäuren fungiert. Die Funktion der Transporter ist überlappend. So kann ein ALDP-Defekt in Fibroblasten durch eine ALDP- oder PMP70-Überexpression komplementiert werden (KEMP et al., 1998; NETIK et al., 1999). Bemerkenswerterweise wurden bei Zellweegerpatienten Mutationen im PMP70-Gen gefunden. Weiterhin konnte ein PEX2-Defekt in Fibroblastenzel-



**Abb. 1.4: Struktur und Topologie peroxisomaler ABC-Halbtransporter.** In (A) ist die Struktur peroxisomaler ABC-Halbtransporter dargestellt. sie bestehen aus zwei Domänen: der Transmembrandomäne (TMD) mit putativen sechs Transmembranhelices (TM1-TM6) und der Nukleotidbindungsfalte (NBF), deren ATP-Hydrolyse den aktiven Transport der Substrate ermöglicht. In (B) ist die wahrscheinliche Membrantopologie des dimerisierten Transporters dargestellt.

linien durch die Überexpression von PMP70 gemildert werden, was auf eine mögliche Beteiligung von PMP70 an der peroxisomalen Biogenese schließen läßt (GÄRTNER et al., 1998b; GÄRTNER et al., 1994).

Charakteristisch für diese Proteinfamilie ist die Nukleotidbindungsfalte, die über ATP-Hydrolyse den aktiven Transport von Substraten ermöglicht (siehe Abb. 1.4). Die Kernstruktur der ABC-Transporter besteht aus zwei Transmembrandomänen mit sechs Transmembranhelices und zwei NBF-Domänen (KLEIN et al., 1999). Einige ABC-Transporter, wie die der MRP/CFTR-Subfamilie, haben eine zusätzliche Transmembrandomäne (TUSNADY et al., 1997). Halbtransporter, welche aus einer Transmembrandomäne und einer NBF-Domäne bestehen, müssen, um einen aktiven Transporter zu bilden, dimerisieren. Für die peroxisomalen ABC-Halbtransporter ALDP, ALDRP, PMP70 (LIU et al., 1999a) und die homologen Hefepoteine Pxa1 und Pxa2 (HETTEMA et al., 1999) ist nachgewiesen worden, daß sie nicht nur Homo-, sondern auch Heterodimere bilden können. Eine mögliche Funktion der Heterodimerisierung könnte z.B. die Bildung eines Transporters mit veränderter Substratspezifität gegenüber den entsprechenden Homodimeren sein (LIU et al., 1999a).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Alle an Adrenoleukodystrophie Erkrankten zeichnen sich durch Mutationen im ALD-Gen aus (GÄRTNER et al., 1998a; KEMP et al., 1998). Trotzdem sind Ausbruch, Verlauf und Schwere der Krankheit sehr variabel. Eine Abhängigkeit der Schwere der Erkrankung vom Ort der Mutation im ALD-Gen ist nicht zu erkennen. Proteininteraktionen sind für eine korrekte Lokalisation, den Zusammenbau und die Funktion der peroxisomalen ABC-Transporter wichtig. So ist die Wechselwirkung mit cytosolischen Faktoren nicht nur für peroxisomale Matrixproteine, sondern auch für peroxisomale Membranproteine notwendig (IMANAKA et al., 1996a; IMANAKA et al., 1996b). Um funktionelle Einheiten zu bilden, müssen die Halbtransporter homo- oder heterodimerisieren. Nicht zuletzt zeichnet sich die Adrenoleukodystrophie durch eine reduzierte VLCF-CoA-Synthase-Aktivität aus. Es wird vermutet, daß sie durch eine gestörte Interaktion der VLCF-CoA-Synthase mit dem Adrenoleukodystrophie-Protein verursacht wird (YAMADA et al., 1999). Die Untersuchung von weiteren Proteininteraktionen mit ALDP kann dazu beitragen, seine Funktion bzw. Pathogenese besser zu verstehen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Suche nach neuen Proteininteraktoren, insbesondere solcher, die am Targeting dieser Halbtransporter zur peroxisomalen Membran beteiligt sein könnten. Für diese Suche sollte das Hefe-Two-Hybrid System eingesetzt werden. Anschließend sollte die Wechselwirkung, der auf diese Weise neu identifizierten Interaktionspartner mit den ABC-Transportern genauer charakterisiert werden. So war die Identifikation und Lokalisierung der Interaktionsdomänen der beteiligten Proteine geplant. Dazu sollten Deletions- und Mutationsstudien im Hefe-Two Hybrid System durchgeführt werden. Weiterhin sollten die gefundenen Protein-

wechselwirkungen *in vitro* bestätigt werden. Abschließend sollten die Funktion der identifizierten Proteinwechselwirkungen *in vivo* untersucht werden. Hierzu waren immunhistochemische Experimente in Zellkultur geplant.



---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bezugsquellen der verwendeten Substanzen

##### Reagenzien für Bakterien- und Hefekultur

Ampicillin	Biomol, Hamburg
Hefeextrakt	Difco (Otto Nordwald, Hamburg)
Pepton	Difco (Otto Nordwald, Hamburg)
Bactoagar	Difco (Otto Nordwald, Hamburg)
Yeast-Nitrogen-Base (YNB)	Difco (Otto Nordwald, Hamburg)
Aminosäuren für DO-Medien	Sigma, Taufkirchen
Adenin	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Galactose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Raffinose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-Gal	Biomol, Hamburg
ONPG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
DAPI	Roche Diagnostics, Mannheim

##### Reagenzien für die Transformation von Hefen

Lachs Testes DNA (#D-9156)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PEG 3350	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

##### Reagenzien für Proteinexpression, Proteinaufreinigung und GST-Pull-Down

Dialyseschlauch (Visking 8/32 Ø6 mm) Serva, Heidelberg

Farnesylpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathionsepharose	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Redivue <sup>35</sup> S-Methionin (#AG1094)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
TNT-Retikulozytenlysats (#L4610)	Promega, Mannheim

### Reagenzien für SDS-PAGE bzw. Proteinanalytik

Acrylamid/Bis (30%, 37,5:1)	Biomol, Hamburg
Coomassie-Blau G250	Biomol, Hamburg
Gradientengele	Biorad, München

### Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Fötale Kälber Serum (FCS)	Gibco BRL (Life Technologies), Karlsruhe
RPMI-1640 Medium mit GLUTAMX I	Gibco BRL (Life Technologies), Karlsruhe
MEM Medium	Gibco BRL (Life Technologies), Karlsruhe
Ampicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL (Life Technologies), Karlsruhe

### Transfektionsreagenzien

Fugene6	Roche Diagnostics, Mannheim
Lipofectamin	Life Technologies, Karlsruhe

### Reagenzien für die Immunhistochemie

Vectashield	Vector Laboratories, Inc., Burlingame
<b>primärer Antikörper:</b>	
anti human Catalase (IgG, Kaninchen)	The Binding Site, San Diego
<b>sekundärer Antikörper:</b>	
TRITC – anti Kaninchen IgG (Maus)	Jackson Immunoresearch Laboratory, Inc., West Grove
DAPI-Stammlösung	1 mg/ml (Gebrauchslösung: 0,05 mg/ml)

### Enzyme

<i>Eco</i> RI	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Xho</i> I	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Nco</i> I	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bam</i> HI	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Nhe</i> I	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bgl</i> II	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Not</i> I	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot



Taq-Polymerase	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot
CIAP	Roche Diagnostics, Mannheim
Turbo Pfu	Gibco BRL (Life Technologies), Karlsruhe
Zymolase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Endonuclease	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-Ligase	MBI/Fermentas, St. Leon-Rot

**Kits**

Plasmid-Mini Kit	Macherey Nagel, Düren
Plasmid-Midi Kit	Qiagen, Hilden
PCR-Aufreinigungs Kit	Qiagen, Hilden
Gel-Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
Dye-Terminator-Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt

**Verbrauchsmaterial**

Kammer-Objektträger	Nunc, Wiesbaden
6-Kammerplatten	Nunc, Wiesbaden
Glaskugeln (Ø 1 mm)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**2.1.2 Puffer und Lösungen****Standardpuffer:**

1 × PBS                      10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4

**Puffer für die Herstellung chemisch Rb-kompetenter Bakterien**

TFB1                      30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 10% (w/v) Glycerin

TFB2                      10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15% (w/v) Glycerin

**Puffer für die Transformation von Hefen**

10 × TE                      100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5

10 × Lithiumacetat        1 M Lithiumacetat, pH 7,5 (pH mit Essigsäure einstellen)

**Puffer für die Plasmidisolierung aus Hefen**

S-Puffer	10 mM Kaliumphosphat, 10 mM EDTA, 50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 $\mu$ g/ml Zymolase
Lysis-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM EDTA, 2,5% (v/w) SDS

**Puffer für den  $\beta$ -Galactosidase-Assay**

Z-Puffer	16,1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Z-Puffer/ $\beta$ -ME	zu 100 ml Z-Puffer werden 0,27 ml $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben.
ONPG-Lösung	4 mg/ml in Z-Puffer (zum Lösen 1 – 2 h schütteln bei RT)

**Puffer für den GST-Pull-Down:**

Pull-Down-Puffer (Standard)	50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, 1 mM $\text{MgCl}_2$ , 10% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Tween20, 1,5% (w/v) BSA, pH 7,4
Wasch-Puffer (Standard)	50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, 1 mM $\text{MgCl}_2$ , 10% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Tween20, pH 7,4

**Puffer und Lösungen für die Tris-HCl-PAGE (Laemmli 1970):**

Sammelgel-Puffer	1 M Tris-HCl pH 8,8
Trenngel-Puffer	1 M Tris-HCl pH 6,8
Acrylamid-Stammlösung	30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (c = 2,6%)
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS (pH nicht einstellen, ca. pH 8,3)
5 $\times$ Laemmlipuffer	0,16 M Tris-HCl pH 6,8, 50% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau

**Lösungen für die Proteinfärbung**

Coomassie-Lösung	200 ml Methanol, 5 ml Essigsäure, 295 ml Wasser, 500 mg Coomassie-Blau G250 (filtrieren)
------------------	--

**Puffer für die Dephosphorylierung von 5'-Enden**

CIAP-Puffer                      0,2 M Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>

**2.1.3 Medien****Medien und Stock-Reagenzien für die Hefekultur****Stammlösungen:**

10 × BU-Salze	70 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O, 30 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0 (sterilfiltriert)
Glucose-Stammlösung	50% (w/v) Glucose, sterilfiltriert
Galactose-Stammlösung	25% (w/v) Galactose, sterilfiltriert
Raffinose-Stammlösung	25% (w/v) Raffinose, sterilfiltriert
X-Gal-Sammlösung	20% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid
YPD-Medium	10 g Hefe-Extrakt, 20 g Pepton, 40 ml Glucose (50 % (w/v)), ad 1 l mit Milli-Q-Wasser und autoklavieren

**Drop-out-Pulver (DO):**

Adenin	2,5 g	L-Methionin	1,2 g
L-Arginin	1,2 g	L-Phenylalanin	3,0 g
L-Aspartat	6,0 g	L-Serin	22,5 g
L-Glutamat	6,0 g	L-Threonin	12,0 g
L-Isoleucin	1,8 g	L-Tyrosin	1,8 g
L-Lysin	1,8 g	L-Valin	9,0 g

**Konzentrationen der Selektiv-Nährstoffe:**

L-Leucin	10 g/l	(Endkonzentration: 60 mg/l DO-Medium)
L-Tryptophan	10 g/l	(Endkonzentration: 40 mg/l DO-Medium)
L-Histidin	10 g/l	(Endkonzentration: 20 mg/l DO-Medium)
Uracil	10 g/l	(Endkonzentration: 20 mg/l DO-Medium)

**Drop-out-Medien<sup>1</sup>:**

Glucose-Drop-out-Medien	6,7 g Yeast-Nitrogen-Base (ohne Aminosäuren), 1,1 g Drop-out-Pulver, 800 $\mu$ l 5M NaOH, 20 g Bactoagar, ad 900 ml mit Milli-Q-Wasser und autoklavieren; 40 ml Glucose (50 % (w/v))
Galactose/Raffinose-Drop-out-Medien	6,7 g Yeast-Nitrogen-Base (ohne Aminosäuren), 1,1 g Drop-out-Pulver, 800 $\mu$ l 5M NaOH, 20 g Bactoagar, ad 850 ml mit Milli-Q-Wasser und autoklavieren; 80 ml Galactose (25 % (w/v)) , 40 ml Raffinose (25 % (w/v))
X-Gal-Gal/Raf-Drop-out-Medien	6,7 g Yeast-Nitrogen-Base (ohne Aminosäuren), 1,1 g Drop-out-Pulver, 800 $\mu$ l 5M NaOH, 20 g Bactoagar, ad 850 ml mit Milli-Q-Wasser und autoklavieren; 80 ml Galactose (25 % (w/v)), 40 ml Raffinose (25 % (w/v)), 100 ml 10 $\times$ BU-Salze, 4 ml X-Gal-Stammlösung
X-Gal-Glucose-Drop-out-Medien	6,7 g Yeast-Nitrogen-Base (ohne Aminosäuren), 1,1 g Drop-out-Pulver, 800 $\mu$ l 5M NaOH, 20 g Bactoagar, ad 930 ml mit Milli-Q-Wasser und autoklavieren; 40 ml Glucose (50 % (w/v)), 100 ml 10 $\times$ BU-Salze, 4 ml X-Gal-Stammlösung

**Medien und Stock-Reagenzien für Bakterienkultur****LB-Medien (Luria Bertani):**

10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl ad 1 l Milli-Q-Wasser

<sup>1</sup>Für die Drop-out-Medien werden, je nach Experiment, die entsprechenden Selektiv-Aminosäuren bzw. Uracil weggelassen.

für Platten: 20 g/l Bacto-Agar (autoklavieren)

#### **Zugabe der Antibiotika zur Selektion:**

LB-Medium auf 50 °C abkühlen lassen.

für LB-Amp. Medien: 50 mg/l Ampicillin

zusätzlich für X-Gal-IPTG-Platten: 0.004% (w/v) X-Gal, 40 mmol/l IPTG

#### **Desoxyoligonukleotide (Primer)**

Primer für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte, sowie Primer für die analytische PCR, Sequenzierprimer und Oligonukleotide für die Klonierung der MCS in pJG4-5 wurden vom hauseigenen Synthese-Service (U. Linzner) hergestellt.

Alle nicht aufgeführten Reagenzien wurden im Reinheitsgrad p. a. von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

### **2.1.4 Bakterien- und Hefestämme sowie Zelllinien**

**TOP10F<sup>'</sup>**: F<sup>'</sup>{*lacI<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)*} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)

$\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 $\Delta$ *lacX74 deoR recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galK rpsL endA1 nupG*;

Invitrogen, Groningen

**XL1 blue MRF<sup>'</sup>**:  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[F<sup>'</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]<sup>c,d</sup>;

Stratagene

**BL21 (DE3)**: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3); Invitrogen, Groningen

**EGY48**: *Mata his3 leu::3 lexAop-LEU2 ura3 trp1 LYS2* (GOLEMIS & KHAZAK, 1997) Der Hefestamm EGY48 wurde dankend von R. Brent (Massachusetts General Hospital, Boston) zur Verfügung gestellt.

#### **Zelllinien**

HepG2, humane Hepatokarzinoma Zelllinie (ADEN et al., 1979) (Invitrogen, Groningen)

Cos-7, grüne Meerkatze, Niere (GLUZMAN, 1981) (Invitrogen, Groningen)

### 2.1.5 Vektoren

pEG202 (Ködervektor) (GOLEMIS & KHAZAK, 1997)

pJG4-5 (Beutevektor) (GOLEMIS & KHAZAK, 1997)

pSH18-34 (LacZ-Reporterplasmid) (GOLEMIS & KHAZAK, 1997)

pJK101 (Kontrollektor zum Test der Kerngängigkeit) (GOLEMIS & KHAZAK, 1997) pcDNA3 (Invitrogen, Groningen)

pGEX $\Delta$ BamHI (pGEXH) (LEENDERS et al., 1996)

pFRED143 (LUDWIG et al., 1999)

Die Vektoren pEG202, pJG4-5, pSH 18-34 sowie pJK101 wurden dankend von R. Brent (Massachusetts General Hospital, Boston) zur Verfügung gestellt.

pGEX $\Delta$ BamHI wurde dankend von J. Adamski (GSF Neuherberg) und pFRED143 dankend von M. Neumann (GSF, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.6 cDNA-Bibliotheken

humanes Gehirngewebe (adult), Clontech, Heidelberg

Die cDNA-Bibliothek wurde dankend von J. Zilliacus (Karolinska Intitutet, Stockholm) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Geräte

Kühlzentrifugen	Avanti J20 (Beckman, Unterschleißheim) Universal 32R(Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C (Eppendorf, Köln)
PCR-System	GeneAmp PCR-System 9700 (Applied Biosystems, Weiterstadt)
DNA-Sequenzierer	ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Phospho-Imaging-System	Fuji FLA-3000 (Raytest, Straubenhardt)
Photometer	Uvicon 933 (Kontron, Neufarn)
Gelelektrophorese-Apparatur für Proteine	Mini-Protean3 (Biorad, München) Kammer für 15 cm Fertiggele (Biorad, München)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterien- bzw. Hefekultur

#### Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Eine *E. coli*-Übernachtskultur wird in frisches 1000 ml LB-Medium überimpft ( $OD_{600} = 0,1$ ). Die Kulturen werden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 – 0,8 bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen in einer Kältemischung (Eis und Kochsalz) 15 min gekühlt. Anschließend werden die Zellen in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (8000 × g, 15 min, 4 °C). Um die nachfolgenden Schritte annähernd bei 0 °C ausführen zu können, werden alle Gegenstände und Lösungen vorgekühlt. Das Sediment der Zellen wird in 1000 ml und anschließend in 500 ml eiskaltem, sterilem VE-Wasser gewaschen. Die Zellen werden in 20 ml kalter, steriler 10%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich werden die Bakterien in 2 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert, in 50 µl-Fractionen portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

Die Kompetenz der *E. coli*-Zellen wird mittels einer Probetransformation von 20 ng Plasmid bestimmt. Sie liegt üblicherweise bei  $10^8$  bis  $10^9$  cfu/µg Plasmid.

#### Herstellung RbCl-kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wird die RbCl-Methode angewandt (NEB, 1994). 2,5 ml einer Übernachtskultur werden zu 250 ml LB-Medium + 20 mM  $MgSO_4$  gegeben und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 – 0,6 herangezogen. Die Zellsuspension wird 15 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (4500 × g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wird in 100 ml kalter TFB1-Lösung resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (4500 × g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wird in 10 ml kalter TFB2-Lösung resuspendiert und 15 – 60 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen in 100 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

Die Kompetenz der *E. coli*-Zellen wird mittels einer Probetransformation von 20 ng Plasmid bestimmt. Sie liegt üblicherweise bei  $10^5$  bis  $10^7$  cfu/µg Plasmid.

#### Hitzeschock-Transformation von RbCl-kompetenten Bakterien

Ein 100 µl-Aliquot chemisch kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl eines Ligationsansatzes wird 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen 2 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zellen mit 500 µl LB-Medium gemischt und 1 h zur Induktion der Antibiotika-Resistenz bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der

Inkubationszeit werden 200  $\mu\text{l}$  auf eine LB-Amp.-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### Elektrotransformation von Bakterien

Zunächst wird ein Aliquot elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut. Gleichzeitig werden die Elektroporationsküvetten eisgekühlt. Auf den getauten Ansatz werden dann 1 – 2  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Ansatz in die Elektroporationsküvette gegeben und unter folgenden Bedingungen in einem BioRad-*E. coli*-Pulser „gepulst“: 25  $\mu\text{F}$ , 2,5 kV, 100  $\Omega$ . Die Länge des Pulses beträgt dabei zwischen 5 und 5,7 ms. Der Ansatz wird sofort nach dem Puls mit 1 ml LB-Medium gemischt und 1 h bei 37 °C und 220 Upm in einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Ansatz auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte (LB-Amp.) ausplattiert.

### Transformation von Hefen

Für die Transformation von Vektoren in Hefen wird zunächst eine 400 ml Kultur in YPD-Medium mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 aus einer Übernachtskultur angesetzt. Die Kultur wird bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 herangezogen. Die Hefen werden bei 2000  $\times$  g (3 min, RT) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die Zellen werden abzentrifugiert (2000  $\times$  g, 3 min) und in 5 ml 1  $\times$  LiAc/TE-Puffer erneut gewaschen. Abschließend wird das Pellet in 2 ml 1  $\times$  LiAc/TE-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Hefen werden bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Am Tag der Transformation wird der Hefe-Transformationspuffer frisch hergestellt. Für 2 Ansätze werden 600 mg PEG 3350 in 600  $\mu\text{l}$  Wasser durch Inkubation im Wasserbad (42 °C) gelöst. Nachdem das PEG vollständig gelöst ist, werden jeweils 150  $\mu\text{l}$  10  $\times$  LiAc und 10  $\times$  TE-Puffer hinzugegeben und auf einem Vortex-Mischer gut gemischt. In einen Transformationsansatz werden in der angegebenen Reihenfolge 100  $\mu\text{l}$  Suspension kompetenter Hefen, DNA-Mix (1 – 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, 6  $\mu\text{g}$  Carrier-DNA (Salmon Testes DNA, Sigma) ad. 20  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$ ), 13,3  $\mu\text{l}$  DMSO und 600  $\mu\text{l}$  frisch hergestellter Hefe-Transformationspuffer gegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Abschließend wird ein Hitzeschock durchgeführt (15 min, 42 °C). Zur Feststellung der Kompetenz werden 20  $\mu\text{l}$  Transformationsansatz in 200  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert (1:10-Verdünnung). Zusätzlich werden eine 1:100 und eine 1:1000 Verdünnung hergestellt. 100  $\mu\text{l}$  jeder Verdünnung werden auf entsprechenden Drop-Out-Selektionsplatten ( $\varnothing$  10 cm) ausplattiert.

Die Kompetenz ( $c$ ) pro  $\mu\text{g}$  Plasmid errechnet sich wie folgt:

$$c = \frac{\text{Anz. Kolonien}[\text{cfu}] \times 7,3 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{inges. Plasmidmenge}[\mu\text{g}]}$$



Für die Verdünnung 1:1000 ergibt sich z.B. bei 100 Kolonien:

$$c = \frac{100[cfu] \times 7,3 \times 1000}{2[\mu g \text{ Plasmid}]} = 3,7 \times 10^5 \frac{[cfu]}{[\mu g \text{ Plasmid}]}$$

Für die Transformation einer cDNA-Bibliothek wird der restliche Transformationsansatz auf vier Drop-Out-Selektionsplatten ( $\varnothing$  14 cm) aufgeteilt und mit sterilen Glaskugeln ( $\varnothing$  1 mm) ausplattiert.

## 2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

### Analytische Plasmid-DNA-Isolierung (Mini-Präparation )

Für die Plasmidpräparation zu analytischen Zwecken werden 4 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Klons eingesetzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte über Spinsäulchen (Macherey Nagel) gemäß Herstellerprotokoll.

### Präparative Plasmid-DNA-Isolierung (Midi-Präparation )

Für die präparative Plasmidpräparation werden 25 ml einer Übernachtskultur eingesetzt. Die Isolation der Plasmide erfolgte über Kieselgelsäulen (Midi Kit, Qiagen) gemäß Herstellerangaben.

### Plasmidisolierung aus Hefen

Die Hefezellen einer 1 ml Übernachtskultur werden zunächst in einer Tischzentrifuge pelletiert (14.000 Upm, RT) und in 0,5 ml S-Puffer resuspendiert. Die Suspension wird 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 0,1 ml Lysis-Puffer zugegeben und auf einem Vortex-Mischer gemischt. Zur Zellyse wird 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird der Ansatz durch Zugabe von 133  $\mu$ l 3 M Kaliumacetatlösung neutralisiert, 10 min auf Eis gekühlt und 10 min in einer Tischzentrifuge bei voller Drehzahl abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Zum Fällern der Plasmid-DNA werden 0,8 ml kaltes Ethanol (abs.) hinzugegeben, 10 min auf Eis inkubiert, 10 min in einer Tischzentrifuge bei voller Drehzahl zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 40  $\mu$ l sterilem Wasser resuspendiert.

## 2.2.3 Gelelektrophoretische Methoden

### Analyse von DNA in Agarosegelen

Zur Analyse von Plasmiden oder linearisierter DNA werden TBE-Agarosegele eingesetzt. Die Konzentration der Gele beträgt je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 0,5 – 3 % (w/v). Die Elektrophorese erfolgt unter Standardbedingungen (SAMBROOK et al., 1989)

### Präparative DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Aufreinigung linearisierter DNA werden TAE-Agarosegele eingesetzt. Die Konzentration der Gele beträgt je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 0,5-1,5 % (w/v). Die Elektrophorese erfolgt unter Standardbedingungen (SAMBROOK et al., 1989)

### Analyse von Proteinen in der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wird die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, modifiziert nach Laemmli, eingesetzt (LAEMMLI, 1970).

#### • Zusammensetzung der Gele:

Für zwei 10 cm Gele (Mini Protean 3, BioRad) ergibt sich folgende Zusammensetzung:

Trenngel	10 %	12 %	Sammelgel	4 %
Acrylamid-Stammlsg.	3,3 ml	4 ml	Acrylamid-Stammlsg.	0,7 ml
1 M Tris HCl <b>pH 8,8</b>	3,75 ml	3,75 ml	1 M Tris HCl <b>pH 6,8</b>	1 ml
10 % SDS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	10 % SDS	80 $\mu$ l
10 % APS	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	10 % APS	50 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	TEMED	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2,7 ml	2 ml	H <sub>2</sub> O	3,16 ml
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	Gesamtvolumen	5 ml

Sollen Proteine deutlich unterschiedlicher Masse aufgetrennt werden, kommen kommerzielle Polyacrylamid-Gradientengele (Biorad) zum Einsatz. Die Elektrophorese wird in einer speziellen Gelapparatur für Fertiggele (Biorad) durchgeführt.

- **Probenvorbereitung:**

Die Proben werden 1:1 mit  $5 \times$  Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert.

- **Elektrophoresebedingungen:**

Die Elektrophorese wird in  $1 \times$  Laufpuffer bei 80V durchgeführt.

### **Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau G250**

Zur Analyse der Proteine auf Polyacrylamidgelen werden die Proteine mit Coomassie-Blau G250 angefärbt. Dazu werden die Gele 15 – 60 min in Coomassie-Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Zum Entfärben werden die Gele 2 – 3 mal in 7%iger Essigsäure aufgeköcht.

## **2.2.4 Herstellung und Aufbereitung von DNA-Fragmenten**

### **Bestimmung der DNA-Konzentrationen**

Die Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA erfolgt photometrisch über die Bestimmung der Extinktion einer geeigneten DNA-Verdünnung in Wasser bei 260 nm (SAMBROOK et al., 1989).

### **Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Für den Verdau von Vektoren bzw. PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen werden  $2 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder ein PCR-Produkt in einem  $15 \mu\text{l}$  Ansatz mit 1 U Restriktionsenzym/ $\mu\text{g}$  DNA 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut. Ideale Pufferbedingungen für den Doppelverdau werden den Herstellerprotokollen entnommen. Ist ein sequentieller Verdau erforderlich, wird die DNA zunächst wie unter „Aufreinigung von PCR-Produkten“ beschrieben, aufgereinigt und der Ansatz anschließend in einem Vakuum-Konzentrator eingengt.

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNA-Fragmente werden nach Auftrennung auf einem TAE-Agarosegel ausgeschitten. Die DNA wird anschließend über Spinsäulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

### **Aufreinigung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte werden über Spinsäulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

### **Dephosphorylierung von 5'-Enden**

Die Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Molekülen wird durch die alkalische Phosphatase katalysiert. Die DNA wird dazu in 50  $\mu\text{l}$  CIAP-Puffer aufgenommen und mit 1  $\mu\text{l}$  alkalischer Phosphatase (1U/ $\mu\text{l}$ ) aus Rinderpankreas (CIAP) versetzt. Der Reaktionsansatz wird 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  des Enzyms und weiterer Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C wird die Phosphatase durch zehnmütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Die DNA wird anschließend über ein TBE-Gel aufgereinigt.

## **2.2.5 PCR-Methoden**

### **Analytische PCR**

Für die analytische PCR werden 20  $\mu\text{l}$  Ansätze eingesetzt. Ein 20  $\mu\text{l}$  Ansatz enthält 2  $\mu\text{l}$  10  $\times$  Taq-Puffer (MBI), 1,2  $\mu\text{l}$  25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (MBI), 2  $\mu\text{l}$  2 mM dNTP-Lösung und jew. 1  $\mu\text{l}$  5' und 3' Primer-Stammlösung (10 mM). Als Template dienen 2  $\mu\text{l}$  einer Bakterienkultur eines Klons mit dem zu analysierenden Plasmid. Die Kultur wird durch Überimpfen eines Bakterienklons von einer LB-Amp.-Agarplatte in 100  $\mu\text{l}$  LB-Amp.-Medium hergestellt und 2 h bei 37 °C inkubiert.

Für die Amplifikation werden 30 Zyklen eingesetzt. Die Annealing-Temperatur wird nach der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Verlängerung wird bei 72 °C durchgeführt. Die Zeit für diesen Schritt wird der Fragmentlänge angepaßt. Es werden 30 sec für 500 bp gerechnet. Die PCR wird auf einem PCR-Cycler 9600, Perkin Elmer, durchgeführt.

### **Präparative PCR**

Für die präparative PCR werden 40  $\mu\text{l}$  Ansätze eingesetzt. Ein 40  $\mu\text{l}$  Ansatz enthält 4  $\mu\text{l}$  10  $\times$  Pfu-Puffer, 4  $\mu\text{l}$  dNTP-Lösung, jew. 2  $\mu\text{l}$  5' und 3' Primer-Stammlösung (10 mM), 10 U Turbo-Pfu (Gibco BRL) und 50 – 100 ng Template-DNA. Die PCR-Bedingungen werden, wie unter Punkt „Analytische PCR“ beschrieben, gewählt.

## **2.2.6 Ligation**

Die Ligation eines linearisierten, dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Dazu werden 100 ng

Vektor-DNA mit einem fünf- bis zehnfachen molaren Überschuß des zu ligierenden Fragmentes in 15  $\mu$ l Ligase-Puffer (MBI) mit 1 U der T4-DNA-Ligase (MBI) über Nacht bei 14 °C inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne das zu ligierende Fragment wird parallel inkubiert. Der Ligationsansatz wird ohne weitere Reinigung zur Transformation kompetenter Bakterienzellen des *E. coli*-Stammes TOP10F' eingesetzt.

### 2.2.7 Verifizierung von Klonierungsprodukten mittels DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der Inserts werden die Vektoren nach der Klonierung mit vektorständigen Primern sequenziert. Die Sequenzierung wird mittels der Dye-Terminator Methode auf einem ABI-PRISM 3100-Kapillarsequenzierer durchgeführt.

Cycle Sequencing: Ein Sequenzieransatz enthält: 200 ng Vektor, 1  $\mu$ l 10mM Primer-Stammlösung, 2  $\mu$ l Dye-Terminator Mix (Applied Biosystems) ad 10  $\mu$ l Wasser. Das Cycle Sequencing wird auf einer PCR-Maschine ABI-PRISM 3600 (Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 10 sec 95°C, 10 sec Annealing, 10 sec 60°C, 25 – 30 Cyclen. Die Annealingtemperatur beträgt standardmäßig 60°C. Bei eingeschränkter Qualität der Sequenzierungen wird sie dem Primer individuell angepaßt (50 – 60°C).

Aufreinigung: Zur Abtrennung der Dye-Terminatoren wird eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierzu wird der Ansatz mit 8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 32  $\mu$ l Ethanol (100 %) versetzt, auf einem Vortex-Mischer gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird 10 min bei RT und voller Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird 2  $\times$  in 200  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Pellet in einer Speed Vac. getrocknet und in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

Für die Sequenzierung im ABI 3100 werden 10  $\mu$ l des Ansatzes eingesetzt.

### 2.2.8 Klonierung der Vektoren

#### Konstrukte

Für Hefe Two-Hybrid Screens bzw. Assays wurden die Konstrukte<sup>2</sup> ALDRP 1-218, ALDRP 181-297, ALDRP 273-489, ALDRP 365-741, ALDRP 1-102, ALDP 1-203, ALDP 260-485, ALDP 52-746, ALDP 1-107, ALDP 1-90, ALDP 1-65, ALDP 1-58, ALDP 1-40, ALDP 66-203, ALDP 90-203, ALDP 110-203, ALDP 131-203, ALDP 67-90, ALDP 67-164, PMP70 1-199, PMP70 1-38, PMP69 1-156, PMP69 1-38, Pxa-1 1-216, Pxa-2 1-255, PEX19 7-295, PEX19 7-166, PEX19 139-299, PEX16 in pEG202 sowie PEX19 2-299 bzw. C296S-PEX19 2-299 in pJG4-5-MCS subkloniert. Für die Konstrukte in pEG202 wurden zusätzlich 3 Glycin-Codons als Platzhalter

<sup>2</sup>Die Bezeichnung der Konstrukte erfolgte nach den Aminosäurepositionen des entsprechenden Proteins: z.B. enthält ALDRP 1-218 die Aminosäuren 1 bis 218 von ALDRP

zum LexA in den 5'-Primer eingefügt.

Die cDNAs von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69 wurden von A. Holzinger (Dr. von Haunersches Kinderspital, München), PEX19 1-299 in pEG202 wurde von S. Kammerer (Sequenom, San Diego) zur Verfügung gestellt. PXA-1 und PXA-2 wurden direkt aus genomischer DNA von Hefen (EGY48) amplifiziert. PEX16 wurde aus dem EST-Klon P2406568 subkloniert. Der EST-Klon wurde vom Ressourcen-Zentrum (Berlin) bezogen und die Sequenz durch Sequenzierung bestätigt.

Für *in vitro* Interaktionsassays wurde PMP70 in pcDNA3 einkloniert. ALDP, ALDRP, sowie  $\Delta 66$  ALDP,  $\Delta 186$  ALDP und  $\Delta 281$  ALDP in pcDNA3.1 wurden von A. Holzinger (Dr. von Haunersches Kinderspital, München) bereitgestellt.

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden PEX19 und C266S-PEX19 in pGEX $\Delta$ BamHI (LEENDERS et al., 1996) kloniert. Für die Mutationsanalyse wurden folgende Mutations-Konstrukte von ALDP 67-164 in pEG202 hergestellt:  $\Delta$ D80-82, F71V, F71S, R74W, R74G, L78F, L81V, P84A. Die Templates für die Mutanten (in pEGFPN) wurden von P. Landgraf (Dr. von Haunersches Kinderspital, München) bezogen.

Für die Targetingexperimente wurden ALDP 67-164, ALDP 90-164 und ALDP 110-164 in pFRED143 kloniert.

Das Fusionsprotein aus PEX19 (über *Bam*HI und *Not*I kloniert) und ALD90-164 (über *Not*I und *Xba*I kloniert) wurde zunächst in pcDNA3 subkloniert, um dann über *Nhe*I in pFRED143 kloniert zu werden (Schema im Anhang).

### Klonierung

Die entsprechenden DNA-Sequenzen der Konstrukte werden mittels einer PCR (30 Cyclen, *Pfu*-Polymerase) amplifiziert und über vektorständige Restriktionsendonukleasestellen nach Standardmethoden (SAMBROOK et al., 1989) in die Zielvektoren kloniert. Primersequenzen und benutzte Restriktionsendonukleasen sind im Anhang angegeben. Die Sequenzen der Konstrukte werden per Sequenzierung (Primer siehe Anhang) verifiziert.

## 2.2.9 LexA Two-Hybrid System (Interaction Trap)

Für die Suche nach Proteininteraktoren für ALDRP wird das LexA Two-Hybrid System (Interaktion Trap) eingesetzt (GOLEMIS & KHAZAK, 1997). Vor dem Screen einer pJG4-5-cDNA-Bibliothek (Beuteproteine) werden die pEG202-Köderkonstrukte auf ihre Eignung getestet. Voraussetzung für einen Einsatz im LexA-System ist eine ausreichende Kerngängigkeit des Köderproteins. Weiterhin dürfen die Reportergene nicht durch das Köderprotein alleine aktiviert werden, so daß ein Test auf

Selbstaktivität des Köderproteins erforderlich ist. Ausführliche Beschreibungen der Methoden sind den *Current Protocols in Molecular Biology* zu entnehmen (GOLEMIS et al., 2000).

### **Transformation des LacZ-Reporters**

Für das LexA-System wird der Hefestamm EGY48 eingesetzt. Dieser enthält einen chromosomalen Leu2-Reporter. Für nachfolgende Interaktorstudien bzw. Tests ist es erforderlich, den Hefestamm mit dem LacZ-Reporterplasmid pSH18-34 zu transformieren. Hierzu wird der Hefestamm zunächst auf YPD-Platten herangezogen und wie in Abschn. 2.2.1 beschrieben, mit pSH18-34 transformiert. Die Selektion auf den Vektor erfolgt auf Glu-Ura<sup>-</sup>-Selektionsplatten.

### **Test des Köderproteins**

#### **Test auf Kerngängigkeit**

Der Test auf Kerngängigkeit erfolgt über die Repression eines speziellen LacZ-Reporters auf dem Plasmid pJK101. Der pJK101-Reporter wird durch die Bindung des LexA-Anteils eines Köderproteins reprimiert. Je mehr Köderprotein in den Kern gelangt und an Bindestellen im Promotor von pJK101 bindet, desto stärker die Repression der LacZ-Expression.

Zunächst wird der Hefestamm EGY48 mit dem Reporterplasmid pJK101 transformiert. Die Selektion erfolgt auf Glu-Ura<sup>-</sup>-Selektionsplatten. In die vortransformierten Hefen EGY-pJK101 werden die zu testenden pEG202-Köderplasmide sowie der Originalvektor pEG202 (Kontrolle für maximale Kerngängigkeit) transformiert. Die Selektion erfolgt auf Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>-Selektionsplatten.

Der Test auf Kerngängigkeit erfolgt mit jedem Köder-Konstrukt. Die pEG202-Positivkontrolle sowie ein Originalklon von EGY48-pJK101 (Negativkontrolle) werden in Wasser suspendiert und auf X-Gal-Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplattiert. Die Blaufärbung der Kolonien wird zeitlich dokumentiert. Je stärker die Blaufärbung, desto schlechter ist die Kerngängigkeit des entsprechenden LexA-Fusionsproteins (Köderprotein).

#### **Test auf Selbstaktivierung des Köders bzw. auf Interaktion mit der transaktivierenden Domäne**

Neben der Selbstaktivierung von Köderproteinen, muß vor dem Einsatz im Two-Hybrid System die Interaktion der Köderproteine mit der transaktivierenden Domäne (B42) der Beuteproteine ausgeschlossen werden. Diese Tests können zusammen durchgeführt werden. Hierzu werden mit dem Reporterplasmid

pSH18-34 und dem leeren Beuteplasmid pJG4-5 vortransformierte Hefeklonen (EGY48-pSH18-34) mit den entsprechenden pEG202-Köderkonstrukten transformiert. Die Selektion erfolgt auf Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>-Selektionsplatten. Zum Test werden Suspensionen der Klone auf X-Gal-Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>- bzw. Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten aufgetropft. Eine Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-Selektionsplatten bzw. Wachstum der Hefen auf den leucindezienten Selektionsplatten zeigt Selbstaktivierung bzw. Interaktion mit B42 an.

## Bibliotheks-Screen

### Transformation:

Mit pSH18-34 vortransformierte Hefen (EGY48-pSH18-34) werden wie in Abschn. 2.2.1 mit der kommerziellen pJG4-5 cDNA-Bibliothek (hergestellt durch Umschreiben von mRNA aus humanem Gehirngewebe in cDNA, Clontech) transformiert. Nach zwei bis drei Tagen werden die gewachsenen Klone von der Selektionsplatte geerntet. Um eine Aushärtung des Agars zu erzielen, werden die Platten zunächst für 2 – 3 h in den Kühlschrank gelegt. Danach werden die Klone mittels eines Glasspatels von den Platten gekratzt. Zum besseren Lösen der Klone wird steriler TE-Puffer auf die Platten gegeben (5 ml/14 cm-Platte). Es ist darauf zu achten, daß keine Agarstücke in die Suspension gelangen. Die Hefesuspensionen der Platten eines Screens werden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und bei 2000 × g (RT) für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird zweimal mit 2 – 3 Volumen sterilem TE-Puffer gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wird schließlich in 1 Volumen sterilem Glycerinpuffer (65% (v/v) Glycerin, 0,1 M MgSO<sub>4</sub>, 25 mM Tris-HCl pH 7,4) resuspendiert und zur Lagerung in 1 ml Fraktionen bei -70 °C eingefroren.

Zur Bestimmung der Plattierungseffizienz wird ein Aliquot aufgetaut. 20 µl Gefrierkultur werden in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert. 100 µl einer 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup> und 1:10<sup>7</sup>-Verdünnung werden auf Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>-Selektionsplatten (Ø 10 cm) ausplattiert. Die Plattierungseffizienz pro 100 µl Gefrierstock in cfu (*colony forming units*) wird wie folgt bestimmt: *Anzahl gewachsener Klone* × *Verdünnung* × 10. Sie sollte bei 10<sup>8</sup> cfu liegen.

### Selektion der Interaktoren:

Zur Gal1-Promotor-gesteuerten Expression des Beuteproteins werden die Gefrierstocks (10 – 100 µl, abhängig von der Plattierungseffizienz) zunächst 1:10 – 1:100 in galaktosehaltigem Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>-Selektionsmedium verdünnt und 4 h inkubiert. Vor dem Ausplattieren werden die Hefen 2 × mit Wasser gewaschen und in Wasser resuspendiert (etwa gleiches Volumen der Flüssigkultur). Für die



Selektion von Interaktoren werden die Hefen auf Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten (Ø 10 cm) ausplattiert (10<sup>6</sup> cfu pro Platte). Um eine statistisch vollständige Repräsentation der cDNA-Klone zu erreichen, werden 2 – 3 × 10<sup>6</sup> cfu pro 10<sup>5</sup>-Transformanden ausplattiert.

Das Erscheinen der Kolonien wird über 4 Tage verfolgt und dokumentiert. Nach 4 Tagen werden die Kolonien auf eine Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>-Selektionsplatte (Ø 10 cm) überführt und einem Interaktionsassay unterzogen.

### Interaktions-Assay

Die auf Interaktoren zu testenden Kolonien werden von einer Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>-Selektionsplatte (Ø 10 cm) mittels eines Stempels auf vier Selektionsplatten (Ø 10 cm), X-Gal-Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup> (LacZ-Reporter), X-Gal-Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup> (LacZ-Reporter Negativkontrolle), Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> (Leu2-Reporter) und Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> (Leu2-Reporter, Negativkontrolle), überführt. Die Blaufärbung der Kolonien auf den X-Gal-Platten wird über 2 Tage – das Wachstum der Kolonien auf den leucine-defizienten Selektionsplatten über 4 Tage verfolgt.

### Charakterisierung der Beuteplasmide pJG4-5 aus Hefen

Zur Charakterisierung der Hefeklone positiver Interaktoren wird zunächst die Insertgröße des Beuteplasmids pJG4-5 bestimmt. Hierzu wird eine PCR mit vektorständigen, Insert-flankierenden Primern (pJG4-5 (5'), bzw. pJG4-5 (3'), Sequenz siehe Anhang) durchgeführt.

Die Beuteplasmide werden schließlich aus einer 1 ml -Übernachtskultur des entsprechenden Hefeklons isoliert. Zur Selektion des Beuteplasmids werden 1 – 2 µl einer Hefepiasmidpräparation in elektrokompetente Bakterien (Stamm: XL1-Blue MRF') transformiert. Zum Ausschluß des Vektors psH18-34 wird der Transformationsansatz auf X-Gal-IPTG-LB-Amp-Platten ausplattiert. Blaufärbung der Kolonien zeigt LacZ-Expression durch den Vektor psH18-34 an. Zur Selektion der Kolonien, die das Beuteplasmid (pJG4-5) enthalten wird ein PCR-Screening (analytische PCR) durchgeführt. Hierzu werden die weißen Klone in 100 µl-LB-Amp. Kulturen überimpft und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die PCR erfolgt mit Insert-flankierenden Primern für pJG4-5 (Sequenz siehe Anhang). Für jeweils einen positiv getesteten Klon pro Interaktor wird eine Plasmid Midi-Präparation durchgeführt.

Die Beute-cDNA wird anschließend sequenziert (Primer: pJG4-5 (5') bzw. pJG4-5 (3')). Der cDNA-Klon wird anhand seiner Sequenz mittels einer BLAST-Datenbanksuche identifiziert.

### $\beta$ -Galactosidase-Flüssigassay

Zur Quantifizierung der Interaktionsstärke wird ein  $\beta$ -Galactosidase-Flüssigassay durchgeführt. Bestimmt wird die LacZ-Aktivität über den Umsatz von ONPG (O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid).

Hierzu werden aus entsprechende Hefeklone aus einer Übernachtskultur (Glu-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>-Medium) in 15 ml Galactose-Selektionsmedium (Gal/Raf-Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>) überimpft ( $OD_{600} = 0,2 - 0,3$ ). Die Kulturen werden bis zu einer Dichte von  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8 herangezogen (3 – 5 h). Die zu untersuchenden Hefeklone werden in einer 25 ml Übernachtskultur in Selektionsmedium gezogen. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden pro Kultur  $3 \times 1,5$  ml resuspendiert. Die Aliquote werden in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (5 min, 14.000 upm, 4 °C) und die Zellpellets in 1,5 ml Z-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation werden die Pellets in 300  $\mu$ l Z-Puffer aufgenommen. Jeweils 100  $\mu$ l werden in neue Gefäße überführt. Die verbleibenden 200  $\mu$ l werden mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und dienen der Bestimmung der Zelldichte ( $OD_{600}$ ).

Die Zellen der 100  $\mu$ l Aliquote werden durch 3-faches Einfrieren in flüssigem Stickstoff und nachfolgendem Auftauen im Wasserbad (30 °C) aufgebrochen.

Anschließend werden zu den 100  $\mu$ l Aliquote 700  $\mu$ l Z-Puffer +  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 160  $\mu$ l frisch zubereiteter ONPG-Lösung gestartet. Die Reaktionszeit wird dokumentiert. Eine Gelbfärbung durch Umsatz von ONPG tritt nach 10 bis 30 min ein. Nach dieser Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von 400  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Die Proben werden in einer Tischzentrifuge (10 min, 13.000 upm) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wird der ONPG-Umsatz (Gelbfärbung durch Nitrophenol) durch Messung der Extinktion bei 420 nm bestimmt. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität errechnet sich wie folgt: Eine  $\beta$ -Galactosidaseaktivität von 1 Unit ist definiert als der Umsatz von 1  $\mu$ mol ONPG zu O-Nitrophenol und D-Galactose pro Minute und Zelle (MILLER, 1972; MILLER, 1992).

$$A[U] = \frac{1.000 \times OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$$

$$t = \text{Reaktionszeit}$$

$$V = 0,1 \text{ ml} \times \text{Konzentrationsfaktor}$$

$$OD_{600} \hat{=} \text{Zelldichte}$$

Der Konzentrationsfaktor in diesem Experiment beträgt 5 (1,5 ml/0,3 ml).

### 2.2.10 Proteinexpression und -aufreinigung

Zur Expression der Fusionsproteine GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 werden die Vektoren pGEXH-PEX19wt bzw. pGEXH-C296S-PEX19 in *E. coli* (Stamm: BL21-DE3) transformiert. Eine Übernachtskultur des entsprechenden Klons wird 1:100 in LB-Amp. Medium verdünnt und bei 37 °C bis  $OD_{600} = 0,5$  herangezogen. Zur Induktion der Fusionsprotein-Expression wird IPTG (Endkonzentration: 2,5 mM) hinzugegeben und weitere 2 – 3 h bei 37 °C geschüttelt. Zur Ernte der Zellen wird die Kultur bei  $3500 \times g$  (15 min, 4 °C) in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1/10 Volumen PBS + 1 mM DTT resuspendiert und mit Lysozym versetzt (Endkonzentration: 5 µg/ml). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wird  $MgCl_2$  (Endkonzentration: 2 mM) und Endonuklease (0,5 U/50 ml Kulturvolumen) hinzugegeben.

Nach 20 min Inkubation erfolgt eine 20 minütige Zentrifugation ( $3500 \times g$ , 4 °C). Der Überstand wird abgenommen und mit gewaschenen ( $3 \times$  in PBS) Glutathionagarosebeads (100 µl Ausgangssuspension / 10 ml Kulturvolumen, Pharmacia) versetzt. Zum Binden des GST-Fusionsproteins wird 2 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wird  $1 \times$  mit PBS gewaschen (3faches Volumen, 10 min, 4 °C). Die Beads werden anschließend in PBS mit 1 mM DTT bei 4 °C gelagert. Beladene Beads können direkt im GST-Pull-Down eingesetzt werden. Für die *in vitro* Farnesylierung muß das Protein mit Glutathion (50 mM in PBS mit 1 mM DTT) eluiert werden. Hierzu wird 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert.

Zur Abtrennung des Glutathions wird eine Dialyse (Visking 8/32, Ø 6 mm, Serva) gegen PBS, 1 mM DTT bei 4 °C durchgeführt.

### 2.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von proteinhaltigen Lösungen wird die Methode von BRADFORD (1976) verwendet. Für das Färbe-Reagenz werden 8 mg Coomassie-Brilliant-Blue G250 in 5 ml Ethanol gelöst, mit 10 ml 85%iger Phosphorsäure versetzt und mit  $H_2O$  auf 100 ml aufgefüllt. Zu je 5 ml dieser Lösung werden 0,1 ml der zu analysierenden wäßrigen Proteinlösung gegeben und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Durch Extinktionsmessung bei 578 nm kann die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgeraden berechnet werden. In der Regel werden für eine Proteinlösung Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 2.2.12 *in vitro* Translation/Transkription

ALDP, ALDRP, PMP70, sowie  $\Delta 66$ -ALDP,  $\Delta 186$ -ALDP und  $\Delta 281$ -ALDP werden in T7-Polymerase-gekoppelten TNT-Retikulozytenlysat (Promega, #L4610) nach Herstellerprotokollen exprimiert und gleichzeitig mit Redivue- $^{35}\text{S}$ -Methionin (Amersham, #AG1094) markiert.

### 2.2.13 *in vitro* Farnesylierung

GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 werden in TNT-Retikulozytenlysat (Promega, #L4610) mit Farnesylpyrophosphat (Sigma) umgesetzt. Der Farnesylierungsansatz enthält 6  $\mu\text{g}$  GST-Fusionsprotein, 12,5  $\mu\text{l}$  TNT-Retikulozytenlysat, 2,5  $\mu\text{l}$  TNT-Puffer, 1  $\mu\text{l}$  FPP ad 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Der Ansatz wird 2 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird das GST-Fusionsprotein an PBS-gewaschene Glutathionsepharose-Beads (1  $\mu\text{l}$  Suspension pro  $\mu\text{g}$  Protein, Pharmacia) gebunden. Nach 2 h Inkubation bei 4 °C in einem Überkopfschüttler werden die Beads 4  $\times$  mit PBS gewaschen.

### 2.2.14 GST-Pull-Down-Assay

Für den Nachweis von Proteininteraktionen *in vitro* wird der GST-Pull-Down-Assay eingesetzt. Pro Ansatz werden 1,5  $\mu\text{g}$  GST-Protein gebunden an Glutathionsepharose-Beads eingesetzt. Die Beads werden zunächst 1  $\times$  mit Pull-Down-Puffer gewaschen und anschließend in 200  $\mu\text{l}$  Pull-Down-Puffer resuspendiert. Pro Ansatz werden 5  $\mu\text{l}$  *in vitro* Translationsansatz mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markierten ABC-Transporter-Protein zugegeben. Der Ansatz wird 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden die Beads in einer Tischzentrifuge (4000 Upm, 2 min ) sedimentiert und der Überstand entfernt. Es folgen 4 Waschschrte mit je 1 ml Pull-Down-Wasch-Puffer.

Nach dem Waschen werden die sedimentierten Beads (Restvolumen etwa 10 –15  $\mu\text{l}$ ) mit 10  $\mu\text{l}$  1/2 Vol. Laemmli-Puffer versetzt. Anschließend werden die Proben einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Die radioaktiv markierten Proteine werden durch eine Autoradiographie (Phosphoimagersystem Fuji FLA-3000, 12 h Exposition) nachgewiesen.

## 2.2.15 Zellkultur (Transfektion)

### HepG2

Für die Transfektion werden HepG2-Zellen in Kammer-Objektträgern in RPMI-1640 Medium (Gibco BRL) mit 10% FCS (bei 37°C und 5 Vol. % CO<sub>2</sub>) bis zu einer Konfluenz von 50 – 70% herangezogen. Die Transfektion wird mittels eines Transfektionsreagenz auf Lipidbasis (Fugene6, Boehringer) durchgeführt. Pro Transfektionsansatz (ausreichend für eine Kammer) werden zu 50 µl serumfreien Medium in der angegebenen Reihenfolge 0,6 µl Fugene-Reagenz und 0,2 µg Plasmid-DNA (Verhältnis DNA:Transfektionsreagenz = 1:3) gegeben. Der Ansatz wird mit einer Pipette gemischt und 15 min bei RT inkubiert (Micellenbildung). Das Medium der Zellen wird abgesaugt und pro Kammer 250 µl frisches RPMI-1640 Medium (GibcoBRL) mit 10% FCS hinzugegeben. Danach wird der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und mit einer Pipette gemischt. Zur Transfektion und Expression werden die Kulturen zurück in den Brutschrank gestellt.

### COS-7

Die COS-7 Zellen werden in 6-Kammerplatten in MEM-Medium (Gibco BRL) mit 10% FCS (bei 37°C und 5 Vol. % CO<sub>2</sub>) bis zu einer Konfluenz von 50 – 70% herangezogen. Die Transfektion der Zellen wird mittels eines Transfektionsreagenz auf Lipidbasis (Lipofectamin, Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.2.16 Immunhistochemische Färbung

COS-7 Zellen werden in 6-Kammerplatten auf Deckgläsern herangezogen und mit entsprechenden pFRED-ALDP-Vektoren transformiert. 48 h nach der Transfektion werden die Zellen einer immunhistochemischen Färbung unterzogen. Dazu wird das Medium abgezogen und die Zellen 2 × mit PBS gewaschen. Danach werden die Zellen in 3% Formalin/PBS fixiert. Nach 20 – 30 min Inkubation wird die Fixierlösung abgezogen und die Zellen anschließend 1 × mit PBS-Lösung gewaschen. Zum Permeabilisieren wird eine 1%ige TritonX-100/PBS Lösung auf die Zellen gegeben und 5 min inkubiert. Nach dem Absaugen der Permeabilisierungslösung werden die Zellen 2 × mit PBS gewaschen. Die Deckgläser werden aus den 6-Kammerplatten entnommen und mit der bewachsenen Seite nach unten in einen Tropfen (80 µl) Lösung des primären Antikörpers (anti-human Catalase aus Kaninchen, Biotools), 1:100 in PBS verdünnt, gegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT werden die Deckgläser (mit der bewachsenen Seite nach oben) zurück in die 6-Kammerplatten überführt und 10 – 12 × in PBS gewaschen. Zur Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden die Deckgläser aus den 6-Kammerplatten entnommen und mit der bewachsenen Seite nach unten in einen Tropfen (80 µl) Lösung des sekundären An-

tikörpers (Tettrahodamin-Isothiocyanat (TRITC)-markierter anti-Kaninchen-IgG aus der Maus, Jackson Immunoresearch Laboratory, Inc.) gegeben. Nach 1 h Inkubation werden die Deckgläser, wie zuvor beschrieben,  $10 - 12 \times$  in PBS gewaschen. Für die Fluoreszenzmikroskopie werden die Deckgläser kurz getrocknet und auf Objektträger in einen Tropfen Vectashield (Vector Laboratories, Inc.) gegeben. Die Ränder der Deckgläser werden mit Nagellack abgedichtet.

### **2.2.17 DAPI-Färbung von Zellkernen**

Zum Anfärben der Zellkerne werden, in Aceton/Isopropanol (1:1) fixierte und  $3 \times$  mit PBS gewaschene, HepG2-Zellen 1 – 2 min mit DAPI-Lösung ( $0,05 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Nach dem Absaugen der DAPI-Lösung wird  $3 \times$  mit PBS gewaschen. Die Zellen werden getrocknet und in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt.

### **2.2.18 Sequenz-Alignment und Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen**

Zur Berechnung von Sequenzalignments für Proteine wird das Clustal-X-Multisequenz-Alignment-Programm (HERINGA, 1999) eingesetzt. Zur Vorhersage von Transmembranhelices wird das Programm PHDhtm auf dem Predict Proten Server<sup>3</sup> eingesetzt (ROST, 1997).

---

<sup>3</sup>URL: [www.embl-heidelberg.de/predictprotein/](http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/)

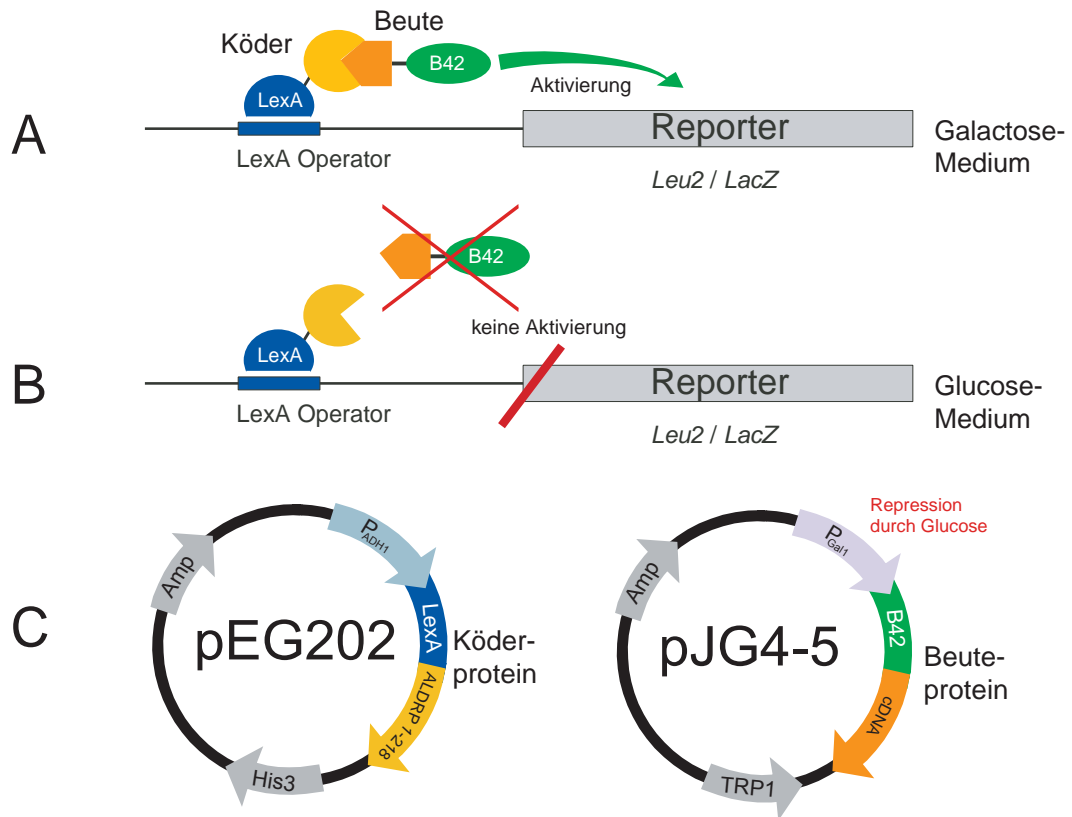
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Suche nach Proteininteraktoren für peroxisomale ABC-Transporter

#### 3.1.1 Wahl der Methode

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen gibt es verschiedene Möglichkeiten. *In vitro* lassen sich Protein-Protein-Interaktionen z.B. mittels des GST-Pull-Downs, eines Overlay-Assays, der SPR-Methode (*surface plasmon resonance*) oder des Phage-Displays nachweisen. Als mögliche *in vivo*-Methoden sind das Hefe Two-Hybrid, das Säugetier Two-Hybrid System, die Immunopräzipitation oder das Protein-Crosslinking zu nennen.

Im vorliegenden Fall sollten Proteininteraktoren für peroxisomale ABC-Transporter gefunden werden. Eine einfache und effektive Methode für die Suche nach neuen Proteininteraktoren ist das Hefe Two-Hybrid System. In diesem System kann ein Protein auf Interaktion gegen eine ganze cDNA-Expressionsbibliothek untersucht werden. Hefe Two-Hybrid Systeme bestehen aus zwei Klassen von Fusionsproteinen, den Köderproteinen, die neben den Proteinen, die auf Wechselwirkung getestet werden sollen, eine spezifische DNA-Bindungsdomäne enthalten und einer Bibliothek aus Beuteproteinen, die an die transaktivierende Domäne eines Transkriptionsfaktors fusioniert sind. Findet eine Wechselwirkung statt, so kann durch den gebildeten Komplex aus Köder- und Beuteprotein die Expression eines entsprechenden Reportergens induziert werden. Heute werden hauptsächlich zwei Systeme eingesetzt: das Gal4-System und das LexA-System (Interaction Trap) (GOLEMIS & KHAZAK, 1997). Die beiden Systeme unterscheiden sich im wesentlichen in ihrer DNA-bindenden und ihrer transaktivierenden Domäne. Während beim Gal4 System beide Domänen vom eukaryotischen Transkriptionsfaktor Gal4 stammen, werden beim LexA-System die DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen Repressors LexA und die transaktivierende Domäne des bakteriellen Transkriptionsfaktors B42 eingesetzt. In der vorliegenden Studie wurde das LexA-System verwendet. Es hat den Vorteil, daß DNA-bindende und transaktivierende Domäne nicht aus eukaryotischen Transkriptionsfaktoren stammen. Somit ist das LexA-System weniger anfällig für falsch positive Ergebnisse, die auf einer Wechselwirkung mit eukaryotischen Expressionsfaktoren beruhen. Die Gefahr, daß das Köderprotein alleine zur Expression der Reportergene führt, also selbstaktivie-



**Abb. 3.1: Funktionsweise des LexA-Two-Hybrid Systems (Interaktion Trap).** (A) Interaktion. Eine Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein führt zur Aktivierung des Leu2- bzw. LacZ-Reporters. (B) Kontrolle. Die Expression des Beuteproteins wird durch Glucose reprimiert. (C) Zur Expression der Köderproteine (LexA-Fusionsproteine) dient das Köderplasmid pEG202, zur Gal1-gesteuerten Expression der Beuteproteine (B42-Fusionsproteine) das Beutepiasmid pJG4-5.

rend ist, ist beim LexA-System ebenfalls geringer. Das LexA-System verfügt über zwei Reportergene, einem Leucinreporter (Leu2), der zur Leucinauxotrophie der EGY48-Hefen führt, sowie einen plasmidständigen LacZ-Reporter (pSH18-34), der zur Expression von  $\beta$ -Galactosidase führt, die über den Umsatz von X-Gal (Blaufärbung der Kolonien) nachgewiesen werden kann. Der LacZ Reporter ist weniger sensibel als der Leu2-Reporter und kann zur Quantifizierung der Interaktionsstärke eingesetzt werden. Zur zusätzlichen Kontrolle ist die Expression des Beuteproteins über den Gal1-Promotor gesteuert, der durch Glucose reprimiert wird. Hefen, die echte Interaktoren aufweisen, sollten somit nur auf entsprechenden Galactose/Raffinose-Selektionsmedien, nicht aber auf glucosehaltigen Selektionsmedien wachsen bzw. blau werden. In



Abb. 3.1 ist die Funktionsweise des LexA-Systems dargestellt.

### 3.1.2 Identifizierung von PEX19 als Interaktor für das ALD-Related Protein

Um Protein-Interaktoren für die peroxisomalen ABC-Halbtransporter zu finden, wurde ein Two-Hybrid-Screen für drei verschiedene Köder-Konstrukte des ALD-Related-Protein (ALDRP) durchgeführt. Die Konstrukte umfaßten die Aminosäuren 1 – 218 (ALDRP 1-218), 273 – 489 (ALDRP 273-489) und 365 – 741 (ALDRP 365-741)(Abb. 3.2). Die Unterteilung wurde aus zwei Gründen vorgenommen: Zum einen sollte die Trennung in verschiedene Domänen des Proteins erfolgen. So decken die ersten beiden Köder-Proteine (ALDRP 1-218 bzw. ALDRP 273-489) die Transmembrandomäne von ALDRP ab. Das C-terminale Köderprotein enthält die vollständige Nukleotid-Bindungsfalte (NBF) (Abb. 3.2 linker Teil). Zum anderen enthält das Köderprotein des pEG202-Vektors kein Kernlokalisierungssignal (NLS), so daß man auf passiven Kerntransport angewiesen ist. Um ausreichende Kerngängigkeit zu gewährleisten, sollte das Molekulargewicht der Köderproteine 60 kDa nicht überschreiten.

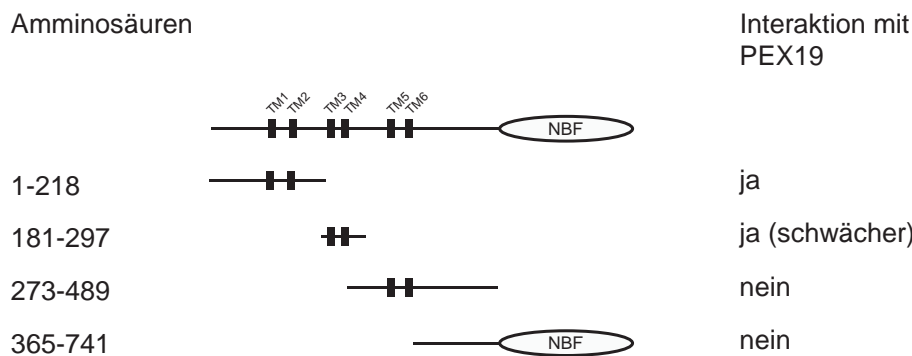
Zunächst wurde die Kerngängigkeit der Köder-Proteine sichergestellt sowie ein Test auf Selbstaktivierung durchgeführt. Lediglich der N-Terminus (ALDRP 1-218) zeigte eine eingeschränkte Kerngängigkeit. Selbstaktivierung war bei keinem der drei Köder-Proteine festzustellen. Zusätzlich wurde durch einen Interaktionstest ausgeschlossen, daß die verwendeten Köderkonstrukte mit der transaktivierenden Domäne (B42) interagieren.

Die Köder-Proteine wurden gegen eine kommerzielle pJG4-5-cDNA-Bibliothek von Clontech gescreent, die durch Umschreiben von RNA aus humanem Gehirngewebe in cDNA hergestellt worden war. Je Köder-Protein wurden zwischen  $2 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$ -Klone auf Interaktion getestet. Insgesamt konnten 2 starke, 3 mittelstarke und 27 schwache Interaktoren erhalten werden. Die Klone wurden sequenziert und mittels einer Datenbanksuche auf dem NCBI-Server<sup>1</sup> unter Benutzung des BLAST-Programms (ALTSCHUL et al., 1990) identifiziert. Ein starker Interaktor konnte mit dem N-Terminus von ALDRP (ALDRP1-218) ermittelt werden (Abb. 3.2 bzw. Abb. 3.3). Es handelte sich um das Peroxin PxF<sup>2</sup> (PEX19), einen peroxisomalen Biogenesefaktor mit einer Masse von 33 kDa, der ein C-terminales Farnesylierungsmotiv (CaaX) aufweist. Der Klon ( $\Delta$ 6PEX19) umfaßte etwa 2 kb der PEX19-cDNA und enthielt, bis auf den Bereich der ersten 6 Aminosäuren, die vollständige kodierende Sequenz. Der zweite, starke Interaktor konnte mit dem C-Terminus (ALDRP 365-741) isoliert werden. Er enthielt den 5'-Bereich der cDNA eines Kinesin-verwandten Proteins, des ATSV<sup>3</sup> (axonal transport of vesicles). Da speziell Proteine gesucht wurden, die an der Biogenese von peroxisomalen Membranen bzw. dem

<sup>1</sup>[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

<sup>2</sup>Datenbankeintrag Nr. NM\_002857

<sup>3</sup>Datenbankeintrag Nr. NM\_004321



**Abb. 3.2: Interaktion verschiedener ALDRP-Köderkonstrukte (pEG202) mit dem den isolierten Klon  $\Delta 6$ -PEX19.**

Transport von Membranproteinen beteiligt sein könnten, beschränkte sich die weitere Arbeit auf die Untersuchung von PEX19.

Um die Wechselwirkung von PEX19 mit ALDRP zu verifizieren, wurde der isolierte Klon  $\Delta 6$ PEX19 in Hefen (EGY48) retransformiert und gegen verschiedene Köderproteine von ALDRP getestet. Zusätzlich wurde die Interaktion von PEX19 mit der DNA-Bindungsdomäne des LexA (pEG202) ausgeschlossen. Neben den im Screen eingesetzten Köderproteinen ALDRP 1-218, ALDRP 273-489 und ALDRP 365-741, wurde ein weiteres Köderprotein, welches die Aminosäuren 181 bis 297 von ALDRP (ALDRP 181-297) enthielt, auf PEX19-Interaktion untersucht. PEX19 zeigte eine starke Wechselwirkung mit den ersten 218 Aminosäuren von ALDRP. Der überlappende Bereich von Aminosäure 181 bis 297 zeigte deutlich schwächere Interaktion. Eine Blaufärbung der Kolonien durch den LacZ-Reporter war bei beiden Konstrukten zu sehen. Weiter C-terminal liegende Konstrukte zeigten keine Interaktion (kein Wachstum auf Leucin-defizienten Medien).

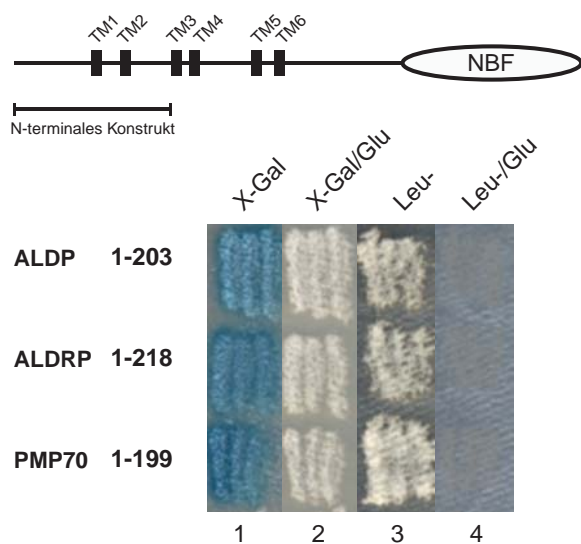
Zur weiteren gezielten Charakterisierung der PEX19-Interaktion sollte PEX19 als Köder gegen verschiedene Konstrukte peroxisomaler ABC-Transporter getestet werden. Zusätzlich wurden Hefe Two-Hybrid Screens mit PEX19 versucht. Es zeigte sich allerdings, daß alle getesteten LexA-PEX19 Konstrukte (Aminosäuren 1 – 299, 7 – 295, 7 – 166 und 139 – 299) selbstaktivierend waren.

### 3.1.3 Test von ALDR-verwandten ABC-Transportern auf PEX19-Interaktion

Um zu testen, ob ALDRP-verwandte ABC-Halbtransporter ebenfalls mit PEX19 interagieren, wurden die N-terminalen Bereiche von ALDP und PMP70 auf Interaktion mit  $\Delta 6$ PEX19 getestet (Abb. 3.3). Es zeigte sich, daß die ersten 202 Aminosäuren von ALDP (ALDP-1-203) bzw. die ersten 199 Aminosäuren von PMP70 (PMP70-1-199) ebenfalls stark mit PEX19 wechselwirken. Ein äquivalentes Konstrukt von PMP69 (Aminosäuren 1-156) konnte nicht entsprechend getestet werden, da es nicht kerngängig war. Zusätzlich wurden homologe N-

terminale Bereiche der peroxisomalen ABC-Transporter aus Hefe, Pxa1 und Pxa2, auf Interaktion mit PEX19 getestet. Im Fall von Pxa1 wurde eine schwache und im Fall von Pxa2 eine starke Interaktion mit PEX19 festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Für ALDP wurden zusätzlich weiter C-terminal liegende Bereiche, die die Aminosäuren 260 bis 485 bzw. 352 bis 746 enthielten, getestet. Die Bereiche wurden homolog zu den C-terminalen Konstrukten von ALDRP gewählt. Mit diesen Deletionsmutanten ließ sich keine Interaktion mit PEX19 beobachten, so daß man davon ausgehen kann, daß PEX19 spezifisch mit dem N-Terminus von ALDP interagiert.



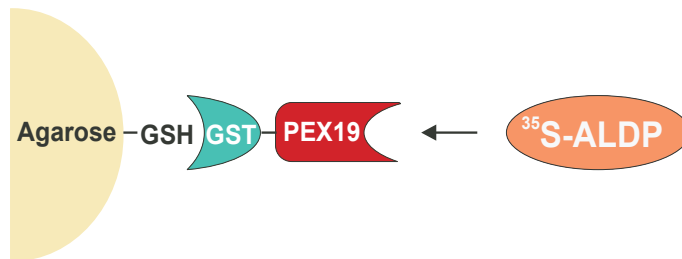
**Abb. 3.3: Two-Hybrid Assay der N-Termini von ALDP, ALDRP und PMP70.** ALDP (Aminosäuren 1 – 203), ALDRP (Aminosäuren 1 – 218) und PMP70 (Aminosäuren 1 – 199) wurden als LexA-Fusionsprotein (Köderprotein) gegen das B42-Fusionsprotein (Beuteprotein)  $\Delta 6$ -PEX19 auf Interaktion getestet. Spalte 1: LacZ-Reporter (Färbung durch Umsatz von X-Gal), Spalte 3: Leucin-Reporter (Wachstum der Hefen durch Leucin-Auxotrophie), Spalten 2 und 4: Negativkontrollen (Hemmung der Expression der B42-Fusionsproteine durch Glucose).

## 3.2 Einfluß der PEX19-Farnesylierung auf die ALDP-PEX19 Wechselwirkung *in vitro* und im Two-Hybrid System

### 3.2.1 *in vitro*-Interaktionsassay

#### Wahl der Methode

Um die Interaktion zwischen den peroxisomalen ABC-Transportern und PEX19 durch ein unabhängiges Experiment zu bestätigen, wurde ein *in vitro*-Interaktions-Assay, ein GST-Pull-Down durchgeführt (Abb. 3.4). PEX19 wurde dazu als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-PEX19) rekombinant exprimiert und auf Interaktion mit *in vitro* translatierten- und  $^{35}\text{S}$ -Methioninmarkierten Kandidatenproteinen, den peroxisomalen ABC-Transportern ALDP, ALDRP und PMP70, getestet.



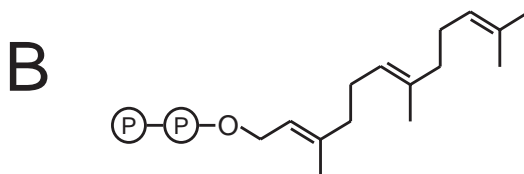
**Abb. 3.4: Funktionsweise des GST-Pull-Downs.** An Gluthationsepharose-Beads gebundenes GST-PEX19 wurde auf Interaktion mit *in vitro* translatierten und gleichzeitig  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten ABC-Halbtransporterproteinen getestet. Fand eine Wechselwirkung statt, so wurde Radioaktivität über GST-PEX19 an die Gluthationsepharose-Beads gebunden. Diese wurde nach Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel über eine Autoradiographie nachgewiesen.

### Proteinaufreinigung

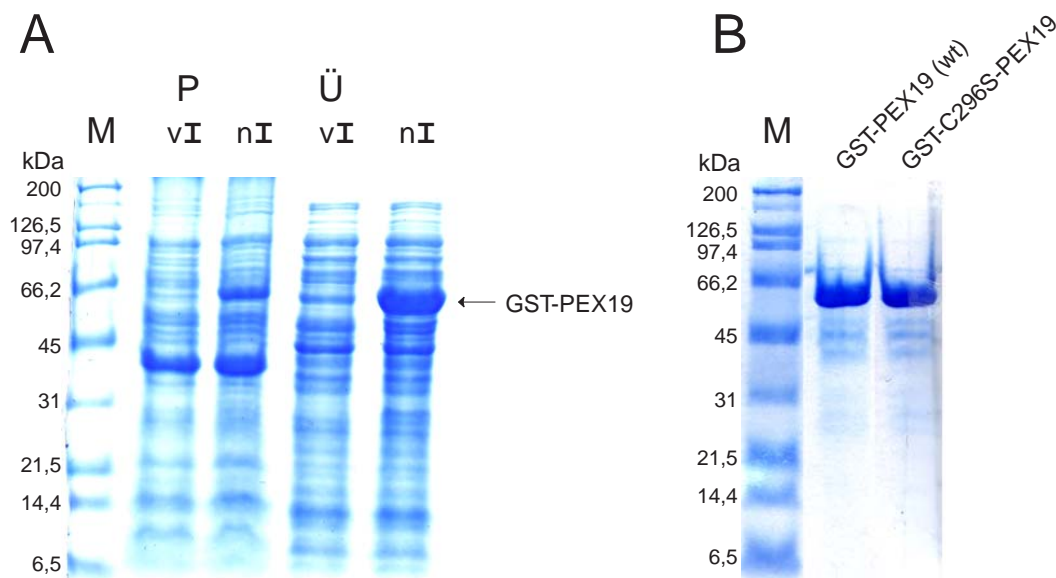
PEX19 enthält ein C-terminales Farnesylierungsmotiv (CaaX-Motiv) (Abb. 3.5). Da seine Funktion für PEX19 nicht bekannt ist, wurden sowohl das Wildtyp Protein PEX19 als auch eine PEX19-Mutante mit mutiertem CaaX-Motiv (C296S-PEX19) als GST-Fusionsprotein in *E. coli* (BL21-DE3) exprimiert (Abb. 3.6 A). Beide Proteine befanden sich nach dem Aufschluß der Bakterien im Überstand, so daß keine zusätzlichen Detergenzien zur Lösung der Proteine notwendig waren. Die Proteine wurden über eine Gluthationsepharosematrix aufgereinigt und die Ausbeute bzw. Reinheit des Proteins über ein Coomassie-Gel abgeschätzt (Abb. 3.6 B).

**A**

Consensus	...	CaaX-COOH
wt	...	CLIM-COOH
C296S	...	SLIM-COOH



**Abb. 3.5: C-terminales-Farnesylierungsmotiv von PEX19.** In (A) sind die Consensussequenz für das Farnesylierungsmotiv, die „Wildtyp“-Sequenz des PEX19-Farnesylierungsmotivs sowie das veränderte Motiv der nicht farnesylierbaren PEX19-Mutante C296S angegeben. (B) zeigt die Strukturformel von Farnesylpyrophosphat.

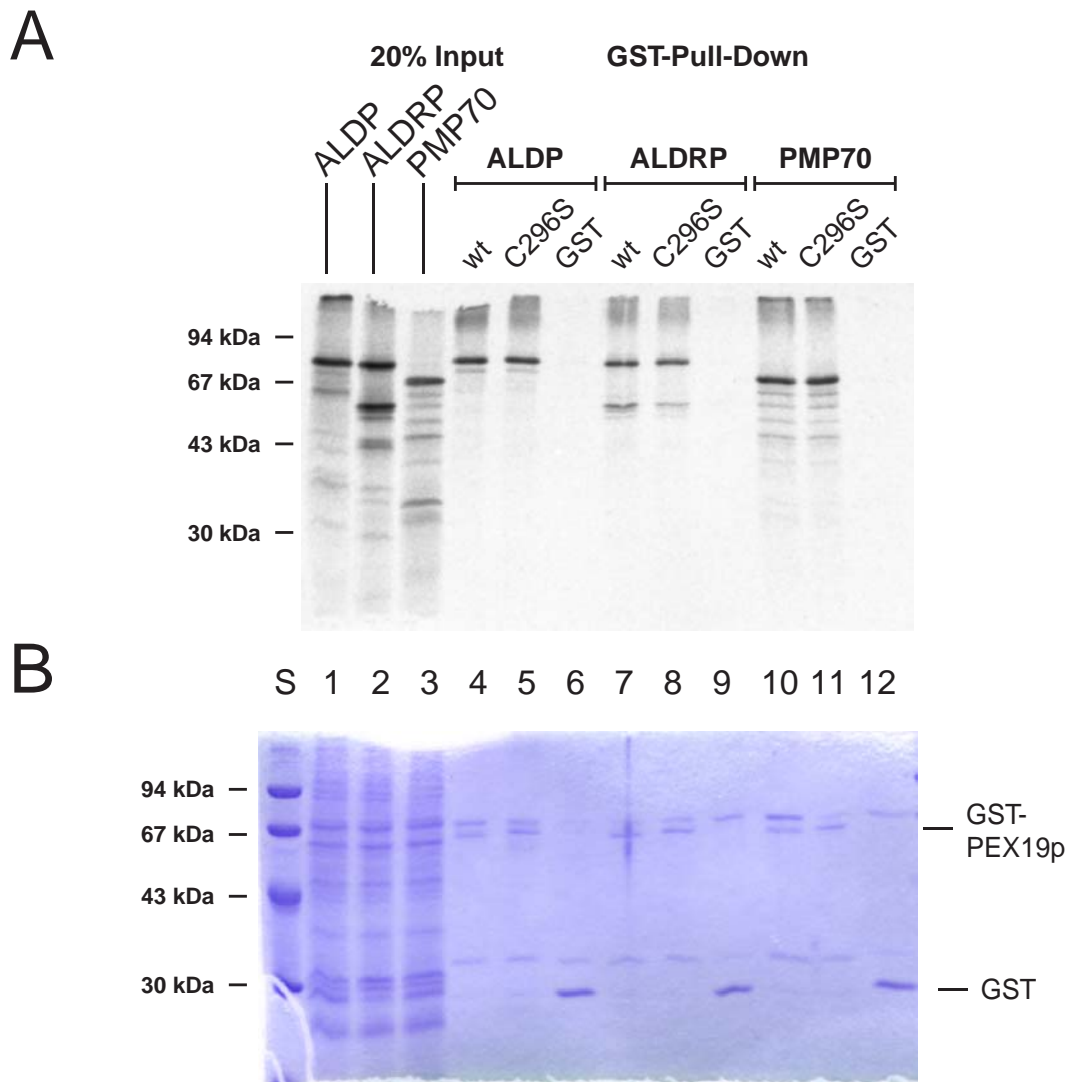


**Abb. 3.6: Aufreinigung des Fusionsproteins GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19.** GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 wurden in *E. coli* (Stamm: BL21 DE3) exprimiert. (A) Aufschluß der Zellen vor bzw. nach der Induktion der GST-PEX19-Expression. (B) Aufgereinigte Fusionsproteine GST-PEX19 (wt) bzw. GST-C296S-PEX19. Die Fusionsproteine haben ein Molekulargewicht von 60 kDa. Die Auftrennung erfolgte auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. M = Molekulargewichtsmarker, Ü = Überstand, P = Pellet, vI = vor Induktion, nI = nach Induktion

### ALDP, ALDRP und PMP70 interagieren mit PEX19 *in vitro*

Da in Bakterien Proteine nicht farnesyliert werden, wurden sowohl Wildtyp-PEX19 als auch C296S-PEX19 vor dem Einsatz im GST-Pull-Down Assay *in vitro* mit Farnesylpyrophosphat umgesetzt. Die Modifikationsreaktion wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysat nach KAMMERER et al. (1997) durchgeführt. Die so modifizierten Proteine GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 wurden auf Interaktion mit ALDP, ALDRP und PMP70 getestet, die in voller Länge *in vitro* translatiert und gleichzeitig mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert worden waren. Das Experiment wurde mehrfach und mit unterschiedlichen Mengen an GST-Protein (zwischen 0,2  $\mu\text{g}$ -1,5  $\mu\text{g}$ ) durchgeführt. Die gleichmäßige Beladung mit GST-Fusionsprotein wurde durch Coomassie-Färbung überprüft. Als Negativkontrolle diente GST alleine (Abb. 3.7).

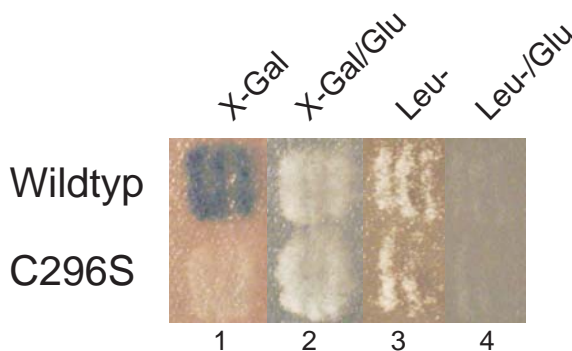
Es zeigte sich, daß GST-PEX19 mit allen drei ABC-Halbtransportern (ALDP, ALDRP und PMP70) interagiert. Es konnte *in vitro* kein signifikanter Unterschied zwischen farnesylierbarem Wildtyp GST-PEX19 und nicht farnesylierbarem GST-C296S-PEX19 festgestellt werden.



**Abb. 3.7: *In vitro* Bindungsassay (GST-Pull-Down) peroxisomaler ABC-Halbtransporter mit GST-PEX19.** ALDP, ALDRP und PMP70 wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysate *in vitro* translatiert und gleichzeitig mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Im GST-Pull-Down Assay wurden die markierten Proteine auf ihre Fähigkeit an GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 zu binden, getestet. GST-PEX19 bzw. die Farnesylierungs-defiziente Mutante, GST-C296S-PEX19, wurden zuvor in Kaninchen-Retikulozytenlysate mit Farnesylpyrophosphat umgesetzt. (A) Autoradiogramm des Bindungsassays. In den Spuren 1 bis 3 sind 20% der eingesetzten Menge (Input) an markiertem ABC-Halbtransporterprotein aufgetragen. In Spur 4 bis 12 ist der Anteil an gebundenem Protein wiedergegeben. Als Negativkontrolle wurde GST alleine eingesetzt. (B) Coomassiefärbung des Gels (Kontrolle der gleichmäßigen Beladung bzw. des gleichmäßigen Einsatzes an GST-Fusionsprotein). Die Banden von GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 und GST sind markiert (Die Bande oberhalb von GST-PEX19 zeigt BSA-Reste des Bindungspuffers.). Die Auftrennung erfolgte auf einem 10%igem Tris-HCl-Polyacrylamidgel.

### 3.2.2 Einfluß der Farnesylierung im Hefe Two-Hybrid System

Um die Ergebnisse aus den *in vitro* Interaktionsstudien in einem unabhängigen Test zu überprüfen, wurde ein Two-Hybrid Experiment für Wildtyp-PEX19 und C296S-PEX19 durchgeführt. Hierzu wurden PEX19 und C296S-PEX19 in voller Länge abzüglich des Startcodons in den Beutevektor (pJG4-5) einkloniert und auf Interaktion mit ALDP1-203 im Ködervektor (pEG202) getestet. Es zeigte sich, daß sowohl Wildtyp PEX19 als auch die nicht farnesylierbare Mutante, C296S-PEX19, mit ALDP interagieren. Die PEX19-Mutante zeigte allerdings eine signifikant schwächere Interaktion. So wuchsen entsprechende Hefekolonien beider PEX19-Konstrukte in Abwesenheit von Leucin; der LacZ-Reporter war im Falle von C296S-PEX19 nur schwach aktiv (Abb. 3.8). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein signifikanter Unterschied zwischen dem *in vitro* und dem *in vivo* Experiment zu beobachten war. Während die Farnesylierung die PEX19-Wechselwirkung mit den peroxisomalen ABC-Transportern im Two-Hybrid Experiment stark beeinflußt, konnte im *in vitro*-System keine Abhängigkeit der Bindungsstärke von der Farnesylierung beobachtet werden. Als zusätzliches Ergebnis des GST-Pull-Downs läßt sich die Bestätigung der Wechselwirkung zwischen PEX19 und den peroxisomalen ABC-Transportern festhalten.



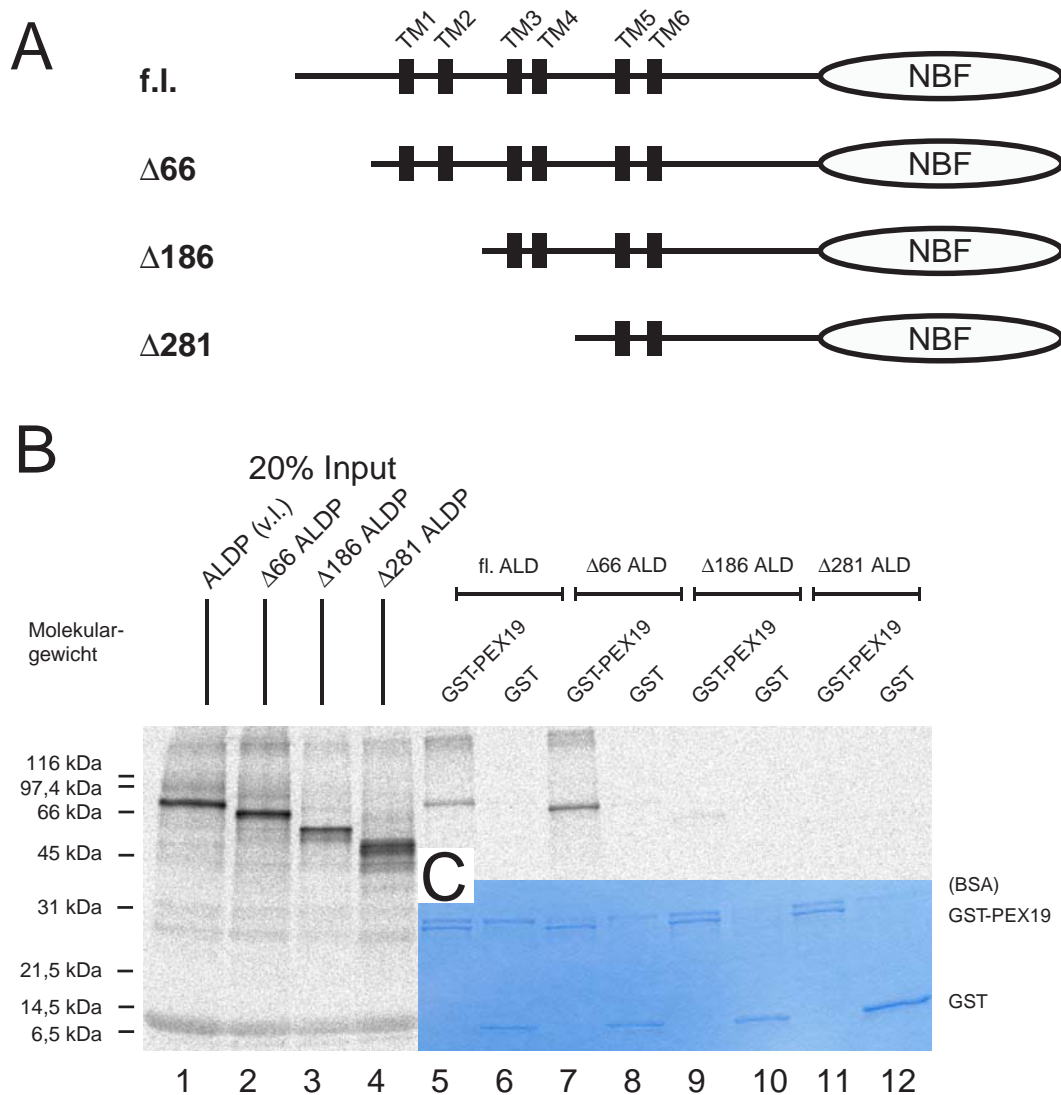
**Abb. 3.8: Einfluß der PEX19-Farnesylierung auf die Interaktion mit ALDP im Hefe Two-Hybrid-System.** ALDP 1-203 (Aminosäuren 1 - 203) wurde als LexA-Fusionsprotein (Köderprotein) auf Interaktion mit den B42-Fusionsproteinen (Beuteprotein) von Wildtyp PEX19 bzw. C296S-PEX19 getestet. Spalte 1: LacZ-Reporter (Färbung durch Umsatz von X-Gal), Spalte 3: Leucin-Reporter (Wachstum der Hefen durch Leucin-Auxotrophie), Spalten 2 und 4: Negativkontrollen (Hemmung der Expression der Beuteproteine durch Glucose).

### **3.3 Bestimmung der PEX19-Bindungs-Domäne**

#### **3.3.1 Der ALDP-N-Terminus ist essentiell für die PEX19-Interaktion**

Nachdem im Hefe Two-Hybrid System gezeigt werden konnte, daß die ersten 203 Aminosäuren von ALDP für die Interaktion mit PEX19 ausreichen, wurden nun Deletionsstudien mit ALDP durchgeführt. Hierzu wurden ALDP-Konstrukte, denen die ersten 66, 186 respektive 281 Aminosäuren fehlten auf Interaktion mit GST-PEX19 im GST-Pull-Down Assay getestet. Die Startpunkte der Konstrukte wurden so gewählt, daß sie mit internen Methioninen begannen. Es zeigte sich, daß die Deletion der ersten 66 Aminosäuren keinen Einfluß auf die Wechselwirkung von ALDP mit PEX19 hat. Die Konstrukte  $\Delta 186$  bzw.  $\Delta 281$ , bei denen die ersten 186 bzw. 281 Aminosäuren deletiert waren, zeigten keine Interaktion mit PEX19 (Abb 3.9) mehr. Somit sind die für die Wechselwirkung von ALDP mit PEX19 wichtigen Epitope in den ersten 186 Aminosäuren enthalten.



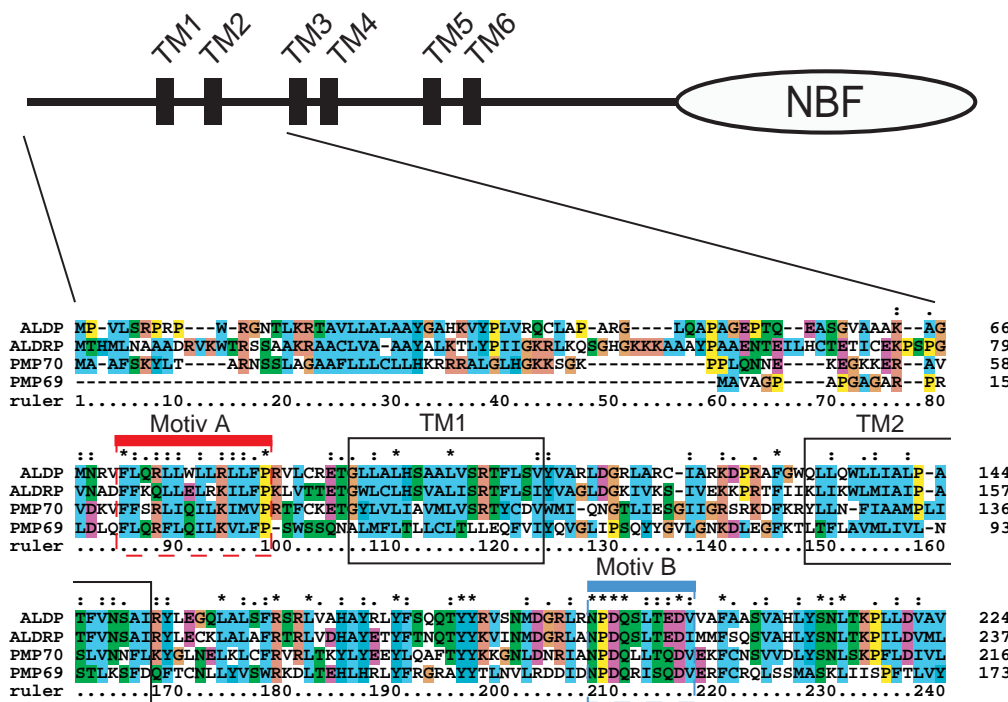


**Abb. 3.9: Einfluß N-terminaler Deletionen von ALDP auf die Interaktion mit PEX19.**

(A) Konstrukte. ALDP (volle Länge), sowie drei N-terminale ALDP-Konstrukte ( $\Delta 66$ ,  $\Delta 186$  und  $\Delta 281$ ), denen die ersten 66, 186 respektive 281 Aminosäuren fehlten, wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert und gleichzeitig mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markiert. (B) GST-Pull-Down. In den Spuren 1 – 4 sind 20% des eingesetzten, markierten Proteins (Input) aufgetragen. Die Spuren 5 – 12 zeigen die Banden des gebundenen, *in vitro*-translatierten Proteins. GST-Negativkontrolle (Spuren 6,8,10 und 12). (C) Zur Kontrolle der gleichmäßigen Gelbeladung wurde das Gel mit Coomassie-Blue gefärbt. Die Banden des GST bzw. GST-PEX19 sind markiert. Die Bande oberhalb von GST-PEX19 zeigt BSA-Reste aus dem Pull-Down-Puffer. Abweichend vom Standard-Puffer wurde bei diesem Assay die Tween-Konzentration auf 0,5% erhöht. Die Auftrennung erfolgte auf einem Tris-HCl-Polyacrylamid-Gradientengel (10 – 20%).

### 3.3.2 Alignment der N-terminalen Bereiche von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69

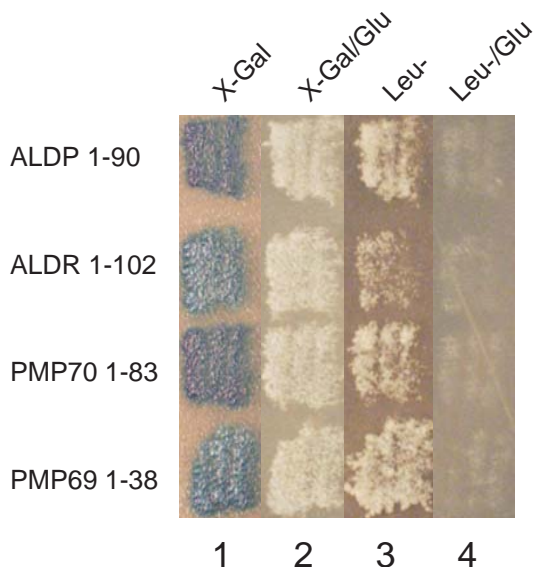
Um konservierte Regionen im N-Terminus der peroxisomalen ABC-Transporter, die ein mögliches Wechselwirkungsepitop für PEX19 darstellen könnten, zu identifizieren, wurde ein Alignment von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69 errechnet. Das Alignment ist in Abb. 3.10 wiedergegeben. Im Vergleich zur hochkonservierten C-terminalen Nukleotidbindungsfalte sind die N-Termini der peroxisomalen ABC-Transporter vergleichsweise wenig konserviert. Zwei Bereiche in den N-Termini zeigen jedoch eine relativ hohe Konservierung: ein semikonservierter Bereich von 14 Aminosäuren, der vor der ersten Transmembranhelix liegt (hier mit Motiv A gekennzeichnet) und ein hochkonservierter Bereich von 10 Aminosäuren zwischen der 2. und 3. Transmembranhelix (Motiv B).



**Abb. 3.10: Alignment der N-Termini von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69.** Die konservierten Motive A und B sind im Alignment farblich unterlegt. Durch die Farbgebung werden Aminosäuren entsprechend ihrer biophysikalischen Eigenschaften in Gruppen eingeteilt. Hydrophobe Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. Die positiv geladenen Reste Arginin und Lysin sind orange gekennzeichnet. TM = Transmembranhelices.

### 3.3.3 Motiv A ist ein Kandidat für die PEX19-Interaktionsdomäne der peroxisomalen ABC-Transporter

Um die PEX19-Interaktionsdomäne der peroxisomalen ABC-Transporter weiter einzuengen, wurden kurze N-terminale Bereiche von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69 auf Interaktion getestet. Die Konstrukte enthielten den cytosolischen Bereich bis zur ersten Transmembranhelix und wurden anhand des Alignments (Abschn. 3.3.2) so gewählt, daß sie das zuvor ermittelte Motiv A enthalten. PEX19 interagiert mit den äußeren N-terminalen Bereichen aller vier ABC-Transporter. PMP69, dessen Interaktion mit PEX19 aufgrund der schlechten Kerngängigkeit des getesteten Köderproteins (PMP69 1-156) zuvor nicht ermittelt werden konnte, zeigte in diesem Experiment ebenfalls eine Interaktion.



**Abb. 3.11: Interaktion kurzer N-terminaler Bereiche der peroxisomalen ABC-Halbtransporter mit  $\Delta 6$ -PEX19.** Aus dem Alignment wurden homologe Bereiche der cytosolisch lokalisierten N-Termini (Bereich bis zur 1. Transmembranhelix) der vier peroxisomalen ABC-Halbtransporter bestimmt und als LexA-Fusionsprotein (Köderprotein) auf Interaktion mit dem B42-Fusionsprotein  $\Delta 6$ -PEX19 (Beuteprotein) getestet. Spalte 1: LacZ-Reporter (Färbung durch Umsatz von X-Gal), Spalte 3: Leucin-Reporter (Wachstum der Hefen durch Leucin-Auxotrophie), Spalten 2 und 4: Negativkontrollen (Hemmung der Expression der B42-Fusionsproteine durch Glucose).

Darüberhinaus läßt sich eine mögliche Funktion des Motivs A als Interaktionsdomäne von PEX19 ableiten. So ist der N-Terminus von PMP69 im Vergleich zu den restlichen peroxisomalen ABC-Transportern sehr kurz. Eine Überlappung homologer Sequenzen der Konstrukte aller vier ABC-Transporter ergibt sich daher nur im Bereich des Motivs A, wie in der Abb. 3.10 gezeigt.

### 3.3.4 Einfluß der konservierten Motive A und B auf die Interaktion von ALDP mit PEX19

Um den Einfluß der semikonservierten Bereiche, insbesondere des Motivs A, auf die Wechselwirkung peroxisomaler ABC-Transporter mit PEX19 genau-

er zu untersuchen, wurden Deletionsstudien mit ALDP durchgeführt. Hierzu wurden, ausgehend vom Konstrukt ALDP1-203, zwei Reihen von Deletionskonstrukten, hergestellt. In der einen Reihe wurden die Konstrukte N-terminal (Abb. 3.12 A), in der anderen C-terminal verkürzt (Abb. 3.13 A). Bei C-terminaler Verkürzung zeigte sich, daß die Interaktion bei Deletion des semikonservierten Bereichs (Motiv A) abnahm (Abb. 3.12 B). Eine Verkürzung auf die ersten 40 Aminosäuren von ALDP führte schließlich zum Verlust der Interaktion. Die N-terminale Deletion des Ausgangskonstrukts ALDP1-203 zeigte, wenn auch deutlich schwächer, ebenfalls einen Einfluß von Motiv A auf die Interaktion mit PEX19. So interagierten die Konstrukte ALDP 1-203 sowie ALDP 66-203 deutlich stärker mit PEX19 als ALDP 90-203, das das Motiv A nicht mehr enthielt. Überraschender Weise zeigte ein noch weiter verkürztes Konstrukt, ALDP 108-203, bei dem zusätzlich die erste Transmembrandomäne deletiert war, wieder stärkere Interaktion mit PEX19 (Abb. 3.13 B).

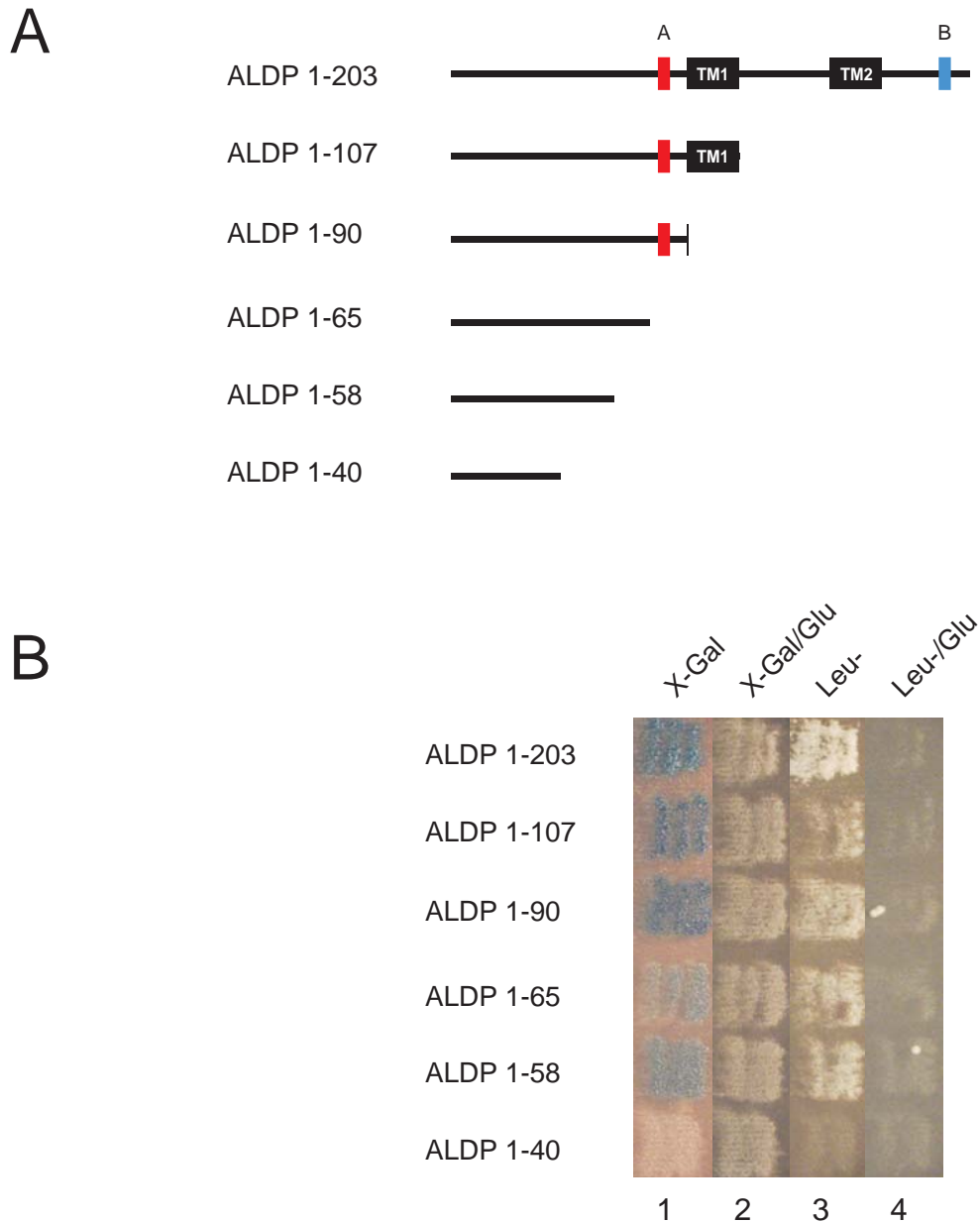
Um die Interaktionsstärken der Konstrukte besser vergleichen zu können, wurde die  $\beta$ -Galaktoseaktivität in einem Flüssigassay mit ONPG (O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) als Substrat quantifiziert (Abb. 3.14). Die bereits qualitativ beobachteten Unterschiede in den Interaktionsstärken der verschiedenen Konstrukte bestätigten sich. Die C-terminale Deletionsreihe von ALDP zeigte einen deutlichen Einfluß des Motivs A auf die Interaktion von ALDP mit PEX19. Auch die N-terminale Reihe läßt einen Einfluß von Motiv A auf die Interaktionsstärke erkennen.

Zusätzlich läßt sich mit dem Experiment eine zweite Beobachtung machen. Vergleicht man die Konstrukte in der Reihenfolge von ALDP 1-90, über ALDP 1-107 bis ALDP 1-203, so ist eine Abnahme in der Interaktionsstärke beobachten. Grund hierfür könnte eine Beeinflussung des Experiments durch die Kerngängigkeit der gewählten Konstrukte sein. Im LexA-System ist man auf den passiven Kerntransport der Köderproteine angewiesen, da sie kein Kernlokalisierungssignal (NLS) enthalten. Der Kerntransport, und damit die Menge des für die Anschaltung des Reporterplasmides zur Verfügung stehenden Proteins, wird negativ durch die Größe und die Hydrophobizität des Proteins beeinflusst. Die genannten Konstrukte unterscheiden sich durch die Anzahl an Transmembrandomänen und damit in ihrer Hydrophobizität. So lassen sich in diesem Experiment nur Konstrukte direkt vergleichen, die etwa die gleiche Hydrophobizität aufweisen. Ein Test der Konstrukte als Beuteprotein mit NLS war aufgrund der erwähnten Selbstaktivierung eines PEX19-Köders nicht möglich.

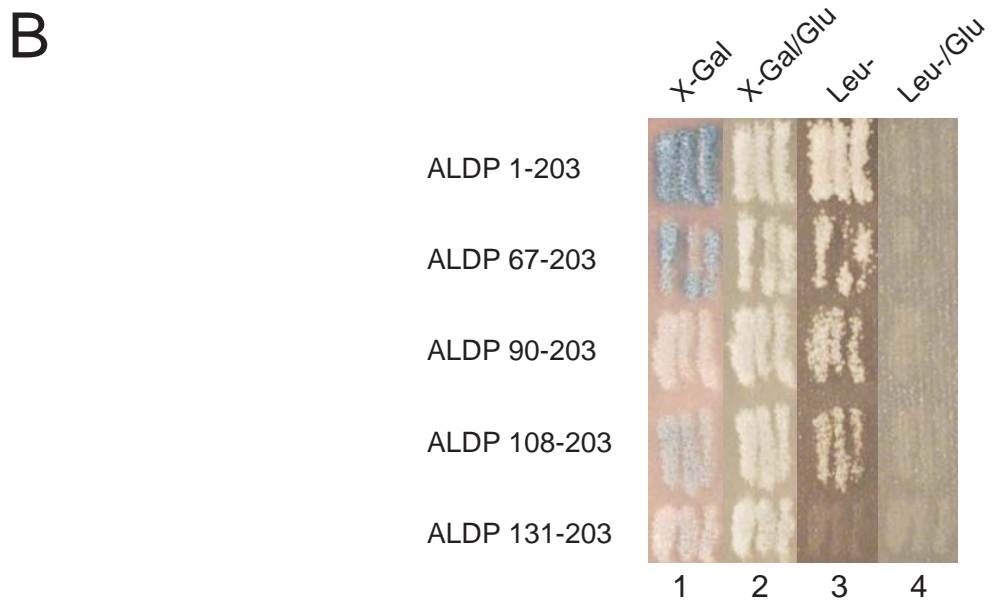
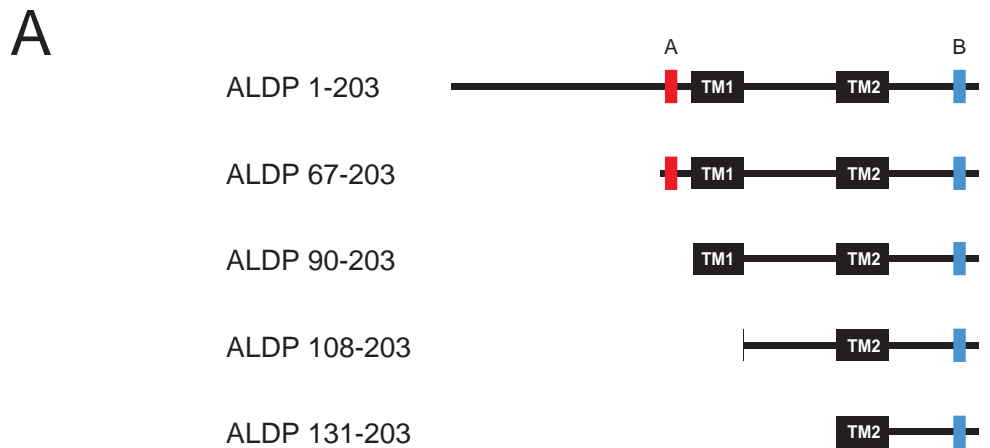
Da die bisher durchgeführten Experimente eine Beeinflussung der Interaktion von ALDP mit PEX19 durch das Motiv A zeigten, wurde ein kurzes Konstrukt (ALDP 67-90), das nur das Motiv A von ALDP enthielt, auf Interaktion mit PEX19 getestet (Abb. 3.15). Es zeigte sich, daß das semikonservierte Motiv A von ALDP ausreichend für eine starke Interaktion mit PEX19 ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein semikonservierter Bereich vor der ersten Transmembranhelix von ALDP (Aminosäuren 67 – 90) ausreichend für eine Interaktion mit PEX19 ist. Darüber hinaus bleibt festzuhalten, daß dieser

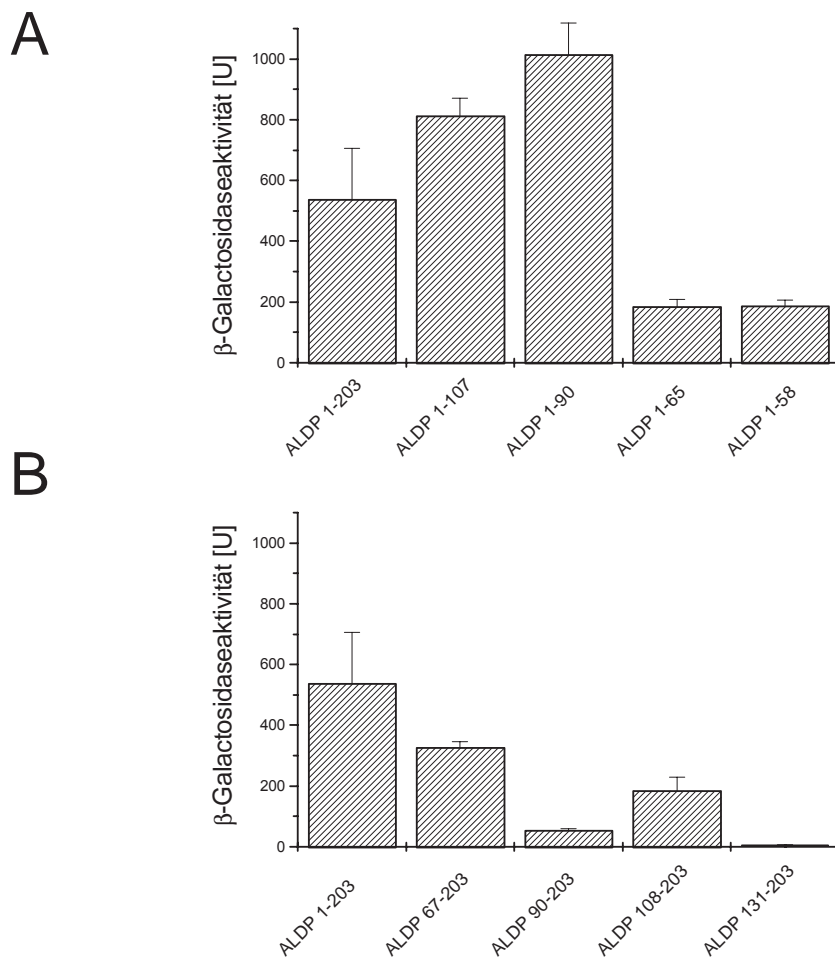
Bereich in größeren Konstrukten von ALDP zwar deutlich deren Interaktion mit PEX19 beeinflusst, aber nicht zwingend für eine Interaktion dieser Proteine erforderlich ist.



**Abb. 3.12: C-terminale Deletionsstudien des ALDP-N-Terminus.** Ausgehend vom ALDP-N-Terminus (Aminosäuren 1 - 203) wurden C-terminal weiter verkürzte Konstrukte als LacZ-Fusionsproteine auf Interaktion mit dem B42-Fusionsprotein  $\Delta 6$ -PEX19 im Hefe Two-Hybrid-System getestet. Spalte 1: LacZ-Reporter (Färbung durch Umsatz von X-Gal), Spalte 3: Leucin-Reporter (Wachstum der Hefen durch Leucin-Auxotrophie), Spalten 2 und 4: Negativkontrollen (Hemmung der Expression der Beuteproteine durch Glucose). Die aus dem Alignment bestimmten, konservierten Motive (A und B) sind gekennzeichnet.

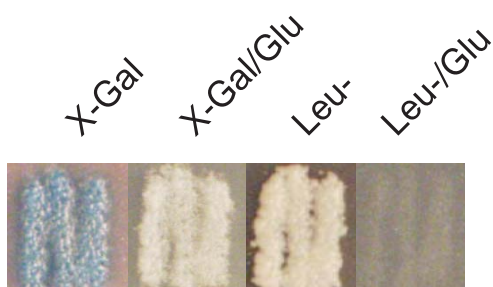


**Abb. 3.13: N-terminale Deletionsstudien des ALDP-N-Terminus.** Ausgehend vom ALDP-N-Terminus (Aminosäuren 1 – 203) wurden zusätzlich N-terminal weiter verkürzte Konstrukte als LacZ-Fusionsproteine auf Interaktion mit dem B42-Fusionsprotein  $\Delta 6$ -PEX19 im Hefe Two-Hybrid-System getestet. Die aus dem Alignment bestimmten, konservierten Motive (A und B) sind gekennzeichnet.



**Abb. 3.14:  $\beta$ -Galactosidase-Flüssigassay** Die Interaktion N- und C-terminaler Deletionskonstrukte des ALDP-N-Terminus (Aminosäuren 1 – 203) mit  $\Delta 6$ -PEX19-B42 wurde über den  $\beta$ -Galactosidase-Reporter (pSH18-34) quantifiziert. Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität wurde über den Umsatz von ONPG (O-Nitophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) bestimmt. (A) Reihe C-terminaler Deletionen. (B) Reihe N-terminaler Deletionen.

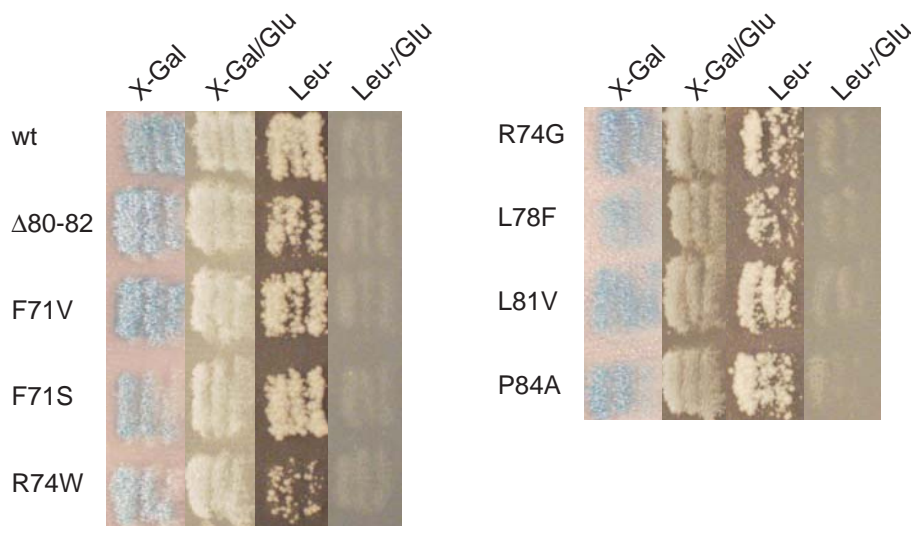
## ALDP 67-90



**Abb. 3.15: PEX19-Interaktion mit dem Motiv A.** Der semikonservierte Bereich vor der ersten Transmembranhelix von ALDP (Aminosäuren 67 - 90) wurde als LexA-Fusionsprotein auf Interaktion mit dem B42-Fusionsprotein  $\Delta 6$ -PEX19 im Hefe Two-Hybrid-System getestet.

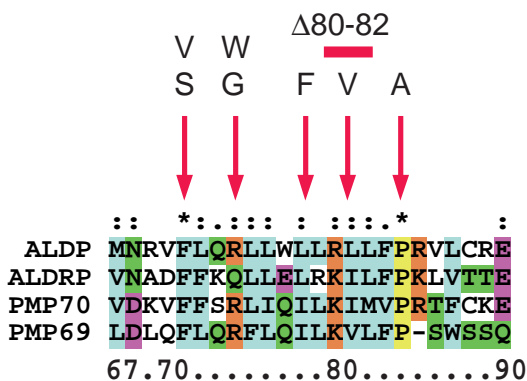
### 3.3.5 Mutationsanalyse des Motivs A von ALDP

Um die Bedeutung des Motivs A auf die Wechselwirkung von ALDP mit PEX19 genauer zu charakterisieren, wurden Mutationsstudien dieses konservierten Motivs durchgeführt. Als Basis diente dabei ein ALDP-Konstrukt, das die Aminosäuren 67-164 enthielt. Die Mutationen (Abb. 3.17) wurden in Anlehnung an Arbeiten von P. LANDGRAF (pers. Mitt.) gewählt, in denen eine mögliche Funktion des Motiv A im ALDP-Targeting untersucht wurde. In dieser Studie konnte für eine Mutante, der die Aminosäuren 80–82 fehlten ( $\Delta 80-82$ ) kein peroxisomales Targeting mehr festgestellt werden. Bei dieser Mutante handelt es sich um eine, bei ALD-Patienten nachgewiesene Mutation (WICHERS et al., 1999). Die Konstrukte mit eingefügten Punktmutationen im Motiv A (F71V, F71S, R74W, R74G, L78F, L81V und P84A, Abb. 3.17) zeigten noch peroxisomales Targeting. Die Mutanten wurden in einem Hefe Two-Hybrid Experiment auf die Interaktion mit PEX19 getestet. Die ALDP-Konstrukte wurden als Köderprotein, PEX19 als Beuteprotein eingesetzt. Alle getesteten Mutanten zeigten Wechselwirkung mit PEX19. Neben  $\beta$ -Galactosidase Platten-Assays, wurde die Interaktionsstärke mit ONPG im Flüssigassay quantifiziert. In mehreren unabhängigen Messungen ergab sich kein signifikanter Einfluß der Mutationen auf die Interaktionsstärke zwischen den ALDP-Konstrukten und PEX19. Das Ergebnis ist in Abb. 3.16 zusammengefaßt.



**Abb. 3.16: Wechselwirkung von verschiedenen ALDP-Mutanten des Motivs A mit PEX19.** Die in Abb. 3.17 dargestellten Mutationen des Motivs A von ALDP, ausgehend von einem LexA-Fusions-Konstrukt, das die Aminosäuren 67 – 164 enthielt, wurden auf Wechselwirkung mit dem B42-Fusionsprotein  $\Delta 6$ -PEX19 getestet. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Bindungsverhalten der unterschiedlichen Mutanten festgestellt werden.





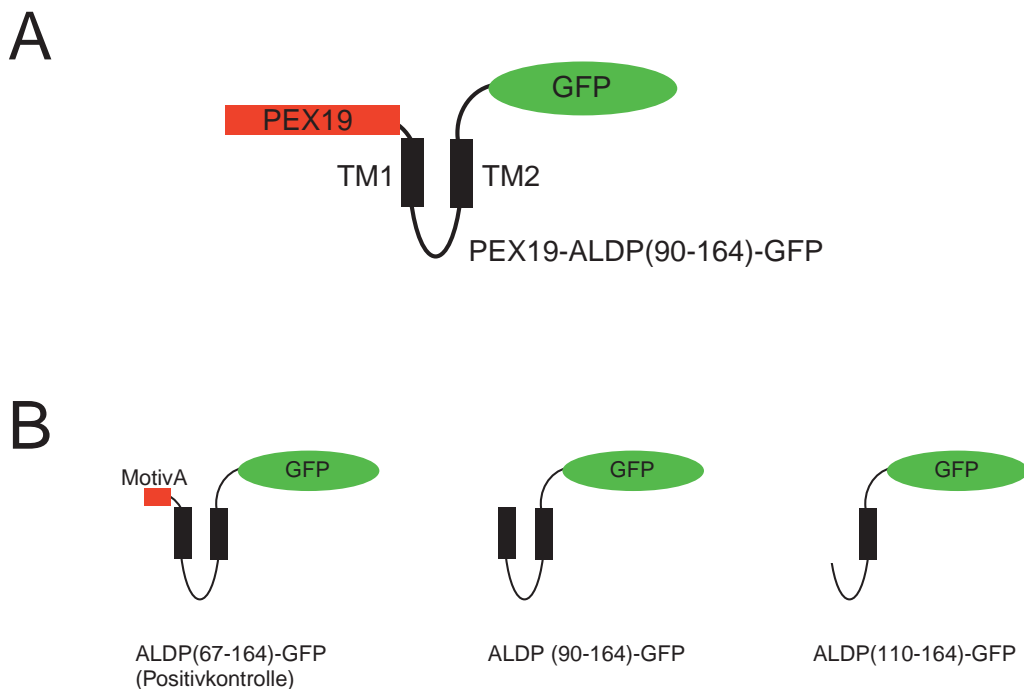
**Abb. 3.17: Alignment und Mutagenese des Motivs A.** Verschiedene Mutationen des semikonservierten Bereichs (Motiv A) von ALDP wurden, ausgehend von einem LexA-Fusions-Konstrukt, das die Aminosäuren 67 - 164 enthielt, hergestellt:  $\Delta$ 80-82, F71V, F71S, R74W, R74G, L78F, L81V und P84A. Bei  $\Delta$ 80-82 handelt es sich um eine bei Patienten nachgewiesene Mutation (WICHERS et al., 1999). Die Orte der eingeführten Punktmutationen von ALDP sind im Alignment durch Pfeile gegenzeichnet.

### 3.4 Targeting eines PEX19-ALD-GFP-Fusionsproteins

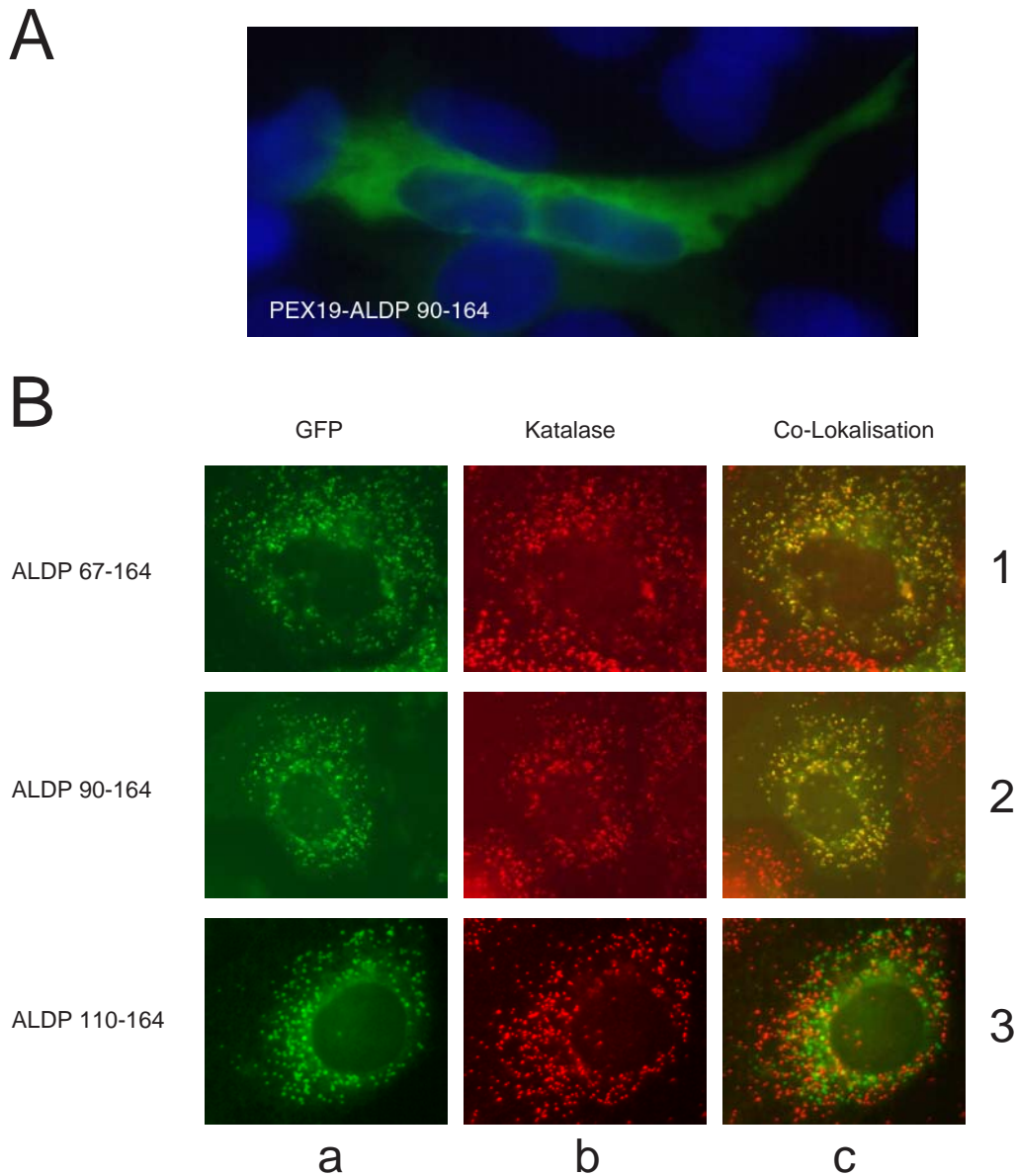
PEX19 ist ein Kandidat für einen Targetingfaktor peroxisomaler Membranproteine. Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit von PEX19, an die peroxisomale Membran zu binden, alleine ausreicht, um Membranproteine peroxisomal zu lokalisieren, wurde ein Fusionsprotein aus PEX19 und ALDP konstruiert. Auf diese Weise sollte ermittelt werden, ob PEX19 die putativen Signale für das Targeting ersetzen kann. Für das Experiment wurde ein Bereich von ALDP ausgewählt (Aminosäuren 90 – 164), der das postulierte Targetingsignal von ALDP (Motiv A) nicht enthielt (P. LANDGRAF, pers. Mitt.). Im Vergleich zu einer Positivkontrolle für peroxisomales Targeting ALDP 67-164 war nur das Motiv A deletiert; die Membrantopologie des Konstruktes (2 Transmembranhelices) wurde jedoch nicht verändert. Dieses ALD-Konstrukt wurde C-terminal an PEX19 fusioniert. Zum späteren Nachweis der Lokalisation wurde GFP (*green fluorescent protein*) C-terminal an das Protein fusioniert (Abb. 3.18 A). Als Kontrollen wurden ALDP 67-164 (Aminosäuren 67 bis 164), ALDP 90-164 (Aminosäuren 90 bis 164) und ALDP 108-164 (Aminosäuren 110-164) an GFP fusioniert (Abb. 3.18 B). Die peroxisomale Lokalisation wurde immunhistochemisch durch Co-Lokalisation mit Katalase nachgewiesen (Abb. 3.19). Das Experiment ergab, daß das Fusionsprotein aus PEX19 und ALDP 90-164 nicht peroxisomal lokalisiert, sondern cytosolisch verteilt war (Abb. 3.19 A). Die eingesetzte Positivkontrolle (ALDP(67-164)-GFP) zeigte eindeutige Co-Lokalisation mit Katalase. Das als Negativkontrolle eingesetzte ALDP(90-164)-GFP zeigte, abweichend zur Annahme aus den vorangegangenen Studien (P. LANDGRAF, pers. Mitt.), ebenfalls Co-Lokalisation mit Katalase. Allerdings war die Anzahl der Zellen mit eindeutiger peroxisomaler Lokalisation gegenüber der Positivkontrolle deutlich vermindert. Weiterhin konnte eine peroxisomale Lokalisation nur bei Zellen mit einer schwachen Expression dieses Konstruktes festgestellt

werden. Die überwiegende Anzahl der Zellen zeigte eine partikuläre, nicht peroxisomale Lokalisation. Vermutlich ist diese Verteilung durch Lokalisation in Einschlußkörpern entstanden. Eine Quantifizierung ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Auf eine Zellfraktionierung zur quantitativen Analyse der peroxisomalen Lokalisation wurde aus zeitlichen Gründen verzichtet. Das um 20 Aminosäuren kürzere Konstrukt ALDP(110-164)-GFP war granulär verteilt, zeigte aber keine Co-Lokalisation mit Katalase mehr.

Die Fusion eines Transmembranproteins an PEX19 reicht nicht aus, um ein peroxisomales Targeting zu erreichen, bzw. interne Targeting-Signale von ALDP zu ersetzen. Während alle betrachteten ALDP-GFP Konstrukte, die nicht peroxisomal lokalisiert waren, statt einer cytosolischen Lokalisation ein granuläres Muster zeigten (Abb. 3.19, ALDP110-164), war das PEX19-Fusionsprotein ausschließlich cytosolisch lokalisiert.



**Abb. 3.18: Konstrukte für das Targeting von GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsproteinen.** Ein Fusionskonstrukt PEX19-ALDP(90-164)-GFP, das neben PEX19 die Aminosäuren 90 bis 164 von ALDP enthielt, wurde für peroxisomale Lokalisationsstudien im Ausgangsvektor pFRED143 hergestellt (A). Als Kontrollen dienten ALDP(67-164)-GFP, daß das potentielle Targetingmotiv (Motiv A) von ALDP enthielt, ALDP(90-164)-GFP und ALDP(110-164)-GFP in pFRED143 (B).

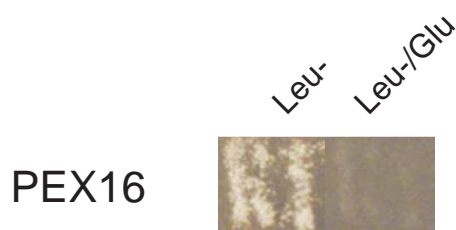


**Abb. 3.19: Targeting eines PEX19-ALDP-GFP-Fusionsproteins.** (A) PEX19-(ALDP67-164)-GFP – PEX19 fusioniert an ALDP (Aminosäuren 67 – 164) mit C-terminalem GFP (pFRED143), in HepG2-Zellen exprimiert, zeigte eine cytosolische Verteilung. Die Kerne sind DAPI gefärbt (blau). (B) ALDP 67-164 (Aminosäuren 67 – 164) – ALDP 90-164 (Aminosäuren 90 – 164) und ALDP 110-164 (Aminosäuren 110 – 164) mit C-terminalem GFP (pFRED143) wurden in COS-7 Zellen exprimiert (1a-3a). Als Marker für peroxisomale Co-Lokalisation diente die immunhistochemische Gegenfärbung von Katalase. Der sekundäre Antikörper war TRITC-markiert (1b-3b). ALDP 67-164 zeigt eine eindeutige Co-Lokalisation mit Katalase (1c). ALDP 90-164 zeigt bei wenigen Zellen eine Co-Lokalisation mit Katalase (2c), ALDP 110-164 dagegen keine (3c). grün: GFP, rot: Katalase, gelb: Co-Lokalisation.

### 3.5 Interaktion von PEX19 mit PEX16 im Hefe Two-Hybrid System

Zellen mit defekter PEX3- oder PEX16-Funktion zeigen, genauso wie Zellen mit defekter PEX19-Funktion, einen peroxisomalen Phänotyp, in dem nicht einmal mehr Ghosts nachweisbar sind. Dies läßt auf eine Funktion dieser Peroxine im selben Biogeneseabschnitt schließen. Denkbar ist eine physikalische Interaktion der drei Proteine. Während die Interaktion von PEX19 mit PEX3 von mehreren Studien bestätigt wurde, ist die Interaktion von PEX19 mit PEX16 in nur einer Arbeit erwähnt (SACKSTEDER et al., 2000).

Aus diesem Grund wurde PEX16 in pEG202 kloniert und auf Interaktion mit PEX19 getestet. In der vorliegenden Arbeit konnte die PEX16-PEX19 Wechselwirkung im LexA-System bestätigt werden: So zeigte PEX16 eine schwache Interaktion (Wachstum auf Glu-Leu<sup>-</sup> DO-Platten, keine Blaufärbung auf X-Gal DO-Platten) mit PEX19.



**Abb. 3.20: Interaktion von PEX16 mit PEX19** Ein PEX16-Köderprotein wurde im Hefe Two-Hybrid System auf Interaktion mit PEX19 getestet. Spalte 1: Leucin-Reporter (Wachstum der Hefen durch Leucin-Auxotrophie), Spalten 2: Negativkontrolle (Hemmung der Expression der B42-Fusionsproteine durch Glucose).

## 4 Diskussion

### 4.1 Peroxisomale ABC-Halbtransporter interagieren mit PEX19

ALDP, ein peroxisomaler ABC-Transporter, ist an der Pathogenese der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (ALD) beteiligt. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine verminderte peroxisomale  $\beta$ -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren (VCLFA) aus. Ziel dieser Arbeit war die Suche nach Proteininteraktoren für ALDP bzw. die homologen Proteine ALDRP, PMP70 und PMP69 mittels des Two-Hybrid Systems. Über Protein-Protein Wechselwirkungen dieser Proteine ist, abgesehen von einigen Daten über die Homo- bzw. Heterodimerisierung, wenig bekannt. Die Identifikation von Faktoren, die am Targeting dieser Proteine beteiligt sind, war von besonderem Interesse, da solche bisher nicht identifiziert waren. In der vorliegenden Arbeit konnte PEX19 als spezifischer Interaktor für die peroxisomalen ABC-Transporter (ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69) identifiziert werden. Daran anknüpfend konnte auch eine Interaktion mit den homologen ABC-Transportern von *S. cerevisiae*, Pxa1 und Pxa2, festgestellt werden.

PEX19 ist ein 33 kDa großes Protein, das an der peroxisomalen Biogenese beteiligt ist. Ein kleiner Anteil des Proteins weist eine peroxisomale Lokalisation auf, während der überwiegende Teil im Cytosol verteilt ist (GÖTTE et al., 1998; MATSUZONO et al., 1999). Zusätzlich kann dieses Protein C-terminal farnesyliert werden (KAMMERER et al., 1997; GÖTTE et al., 1998). Mutationen im PEX19 führen zu einem auffälligen Phänotyp. So fehlen betroffenen Zellen sogar Ghosts, d.h. peroxisomale Reststrukturen, die üblicherweise bei Mutationen in Peroxinen des peroxisomalen Matrixprotein-Imports beobachtet werden (GÖTTE et al., 1998; KAMMERER et al., 1997; MATSUZONO et al., 1999). Das bedeutet, daß in PEX19-Mutanten nicht nur die Matrixproteine fehlgeleitet werden, sondern daß auch die peroxisomalen Membranproteine (PMP) nicht an ihr Ziel gelangen.

## 4.2 Die PEX19-Interaktionsdomäne von ALDP überlappt mit einem Signal für peroxisomales Targeting

In parallelen Arbeiten mit ALDP-GFP-Fusionsproteinen (*green fluorescent protein*) konnte nachgewiesen werden, daß der N-Terminus von ALDP, Signale für das peroxisomale Targeting dieses Proteins enthält (P. LANDGRAF pers. Komm., siehe auch GLOECKNER et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß der N-Terminus von ALDP essentiell für die Interaktion mit PEX19 ist. Somit kann angenommen werden, daß PEX19 am Targeting-Prozeß dieses peroxisomalen Membranproteins beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden die hier gewonnenen Daten zur Eingrenzung der PEX19-Interaktionsdomäne von ALDP mit den Daten aus Targeting-Studien für dieses Protein verglichen. So konnte ein kurzer Bereich von ALDP (Aminosäuren 66 – 90) identifiziert werden, der eine starke Interaktion mit PEX19 zeigt. Er enthält ein etwa 14 – 17 Aminosäuren umfassendes Motiv (Motiv A), das über die peroxisomalen ABC-Transporter konserviert ist. Lokalisationsstudien mit ALDP-Deletionsmutanten konnten zeigen, daß dieser Bereich ebenfalls essentielle Signale für das peroxisomale Targeting dieses Proteins enthält (P. LANDGRAF, pers. Mitt.). Somit fällt eine Domäne von ALDP, die ausreichend für eine PEX19-Interaktion ist, mit Signalen für das peroxisomale Targeting dieses Proteins zusammen. Aus diesem Grund ist PEX19 ein guter Kandidat für einen Faktor, der frisch synthetisierte PMPs bindet und zur peroxisomalen Membran bringt, analog zur Funktion des PTS1-Rezeptors, der peroxisomale Matrixproteine zum Zielort transportiert. Gegen eine Funktion von PEX19 als Rezeptor sprechen jedoch alternative Bindungsstellen, die in den hier durchgeführten Deletionsstudien mit ALDP nachgewiesen wurden. Zusätzlich zeigte eine, bei Patienten gefundene, Deletion im Motiv A von ALDP,  $\Delta 80-82$  (WICHERS et al., 1999), die zum Verlust der peroxisomalen Lokalisation (P. LANDGRAF pers. Mitt.) führte, keinen Einfluß auf die Interaktion dieses Proteins mit PEX19. Zwar zeigten Konstrukte, die das postulierte Targeting-Signal enthielten, eine deutlich stärkere Interaktion mit PEX19 als Konstrukte, in denen dieses Motiv deletiert war, dennoch würde man für einen cytosolischen Targeting-Rezeptor eine diskrete Bindungsstelle erwarten. Die Tatsache, daß PEX19 als einziger Proteininteraktor für den N-Terminus für das ALD-verwandte Protein ALDRP in einem Two-Hybrid-Screen erhalten wurde, spricht jedoch dafür, daß es sich in diesem Fall um eine sehr spezifische Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen handelt. Die hier beobachteten, alternativen PEX19-Bindungsstellen von ALDP könnten für die biologische Funktion von PEX19 von Bedeutung sein. Die sehr hydrophoben peroxisomalen Membranproteine gelangen überwiegend über das Cytosol zu den Peroxisomen. Es sind folglich Chaperoninsysteme zum Stabilisieren dieser Proteine in der hydrophilen Umgebung des Cytosols erforderlich. Mehrere Bindungsstellen ließen sich mit einer möglichen Funktion von PEX19 als spe-

zifisches Chaperon oder Co-Chaperon, das an peroxisomale Membranproteine bindet, erklären. Weiterhin könnte die alternative Bindung von PEX19 durch weitere Proteine, z.B. Chaperonine, vermittelt worden sein, die im Hefesystem, das für die Interaktionsstudien eingesetzt wurde, vorhanden sind. So könnte es sein, daß eine Bindung des PEX19-ALDP-Komplexes an der peroxisomalen Membran nur dann erfolgen kann, wenn PEX19 an ein spezifisches Epitop von ALDP gebunden ist. Zieht man die bisher verfügbaren Daten aus der Literatur hinzu, so zeigt sich, daß das Targeting von peroxisomalen Membranproteinen deutlich komplexer ist als das der peroxisomalen Matrixproteine. Während sogar die C-terminale Fusion des Tripeptids des PTS1-Signals peroxisomaler Matrixproteine ausreicht, um GFP in die Peroxisomen zu transportieren (MONOSOV et al., 1996), können die bisher identifizierten Targeting-Signale für PMPs nur mit Transmembrandomänen zusammen peroxisomal lokalisiert werden. Im Fall von PMP22 (PAUSE et al., 2000) sind zwei und im Fall von PMP34 (HONSHO & FUJIKI, 2000) sogar drei Transmembrandomänen für die peroxisomale Lokalisation dieser Proteine erforderlich. Die Konservierung des hier identifizierten Motiv A von ALDP als Wechselwirkungsepitop für PEX19 sowie als peroxisomales Targeting-Signal läßt eine homologe Funktion auch in den verwandten ABC-Transportern ALDRP, PMP70 und PMP69 erwarten. SACKSTEDTER et al. (2000) konnten allerdings zeigen, daß die ersten 61 Aminosäuren von PMP70, die das Motiv A nicht enthalten, ausreichend für eine Wechselwirkung mit PEX19 sowie für ein peroxisomales Targeting dieses Proteins sind. So könnte PMP70 mehrere Signale für ein PEX19 gesteuertes, peroxisomales Targeting aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß eine Konsensussequenz für peroxisomales Targeting von Membranproteinen nicht mit einfachen Deletionsstudien zu ermitteln ist. Vielmehr müßten die identifizierten postulierten Signale zur genaueren Charakterisierung auf nicht-peroxisomale Membranproteine übertragen werden. Auf diese Weise ließen sich auch detailliertere Informationen über die Funktion von PEX19 im Transport von PMPs zur peroxisomalen Zielmembran gewinnen.

### 4.3 Targeting eines PEX19-ALDP-Fusionsproteins

Um die mögliche Funktion von PEX19 als Targetingfaktor peroxisomaler Membranproteine nachzuweisen, wurde das postulierte, „intrinsische“ Targeting-Signal von ALDP durch PEX19 ersetzt. Hierzu wurden die Aminosäuren 90 bis 164 von ALDP C-terminal an PEX19 fusioniert. Zum späteren Nachweis des Proteins wurde zusätzlich GFP C-terminal an das Fusionskonstrukt angehängt. PEX19 sollte den spezifischen Kontakt zu Docking-Stellen an der peroxisomalen Membran herstellen und die fusionierten Transmembrandomänen von ALDP eine Integration des Fusionsproteins ermöglichen. Das Fusionsprotein zeigte allerdings statt einer peroxisomalen Lokalisation eine cytosolische Verteilung. Ein Grund hierfür könnte sein, daß für den Targeting-Prozeß eine

Konformation von PEX19 erforderlich ist, die nur durch die korrekte Bindung eines PMPs induziert wird. Zum anderen muß beachtet werden, daß das CaaX-Farnesylierungsmotiv von PEX19 durch die Fusion des ALDP sich nicht mehr in C-terminaler Position befindet und folglich nicht mehr farnesyliert werden kann. Ist die Farnesylierung für die Erkennung durch peroxisomale Docking-Proteine wichtig, könnte das Fusionskonstrukt aus diesem Grund keine peroxisomale Lokalisation aufweisen.

Zusätzlich lieferte das Targeting-Experiment noch ein anderes Ergebnis. So zeigte eine Negativkontrolle für peroxisomales Targeting, die die Aminosäuren 90 bis 164 von ALDP enthielt und dem somit das postulierte Targeting-Motiv fehlte, zu einem geringen Anteil peroxisomale Lokalisation. Demnach könnten die bereits erwähnten, alternativen Bindungsstellen von PEX19 in diesem Fall ein peroxisomales Targeting bewirkt haben.

#### **4.4 Einfluß der Farnesylierung von PEX19 auf die Wechselwirkung mit peroxisomalen Membranproteinen**

PEX19 weist ein C-terminales CaaX-Prenylierungsmotiv (CLIM) auf, welches farnesylierbar ist (KAMMERER et al., 1997). Die posttranslationale Addition von Isoprenoid-Lipiden durch eine C-terminale Prenylierung ist für die Reifung vieler Proteine von Bedeutung, die Schlüsselfunktionen in der Signaltransduktion und der Regulation des Zellwachstums spielen (MARSHALL, 1993). Eine Farnesylierung ist z.B. für die Funktion des Protoonkogens Ras entscheidend (KATO et al., 1992). Eine Prenylierung erhöht die Hydrophobizität von Proteinen. Sie vermittelt nicht nur Kontakte mit Zielmembranen, sondern ist auch für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung (MARSHALL, 1993). So interagieren prenylierte Proteine mit spezifischen Chaperonsystemen, die den Transport zur Zielmembran übernehmen (CASEY, 1992). Weiterhin wurden prenylierungsabhängige Interaktionen von Proteinen, wie z.B. Ki-Ras, mit den Microtubuli, Teilen des Cytoskeletts, gefunden. Es wird vermutet, daß die Interaktion von Ki-Ras mit dem Cytoskelett eine Rolle beim Transport dieses Proteins zum Zielort spielt (THISSEN et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte in einem Hefe Two-Hybrid Experiment gezeigt werden, daß die Wechselwirkung von PEX19 mit ALDP stark von seiner Farnesylierung abhängt. So interagiert der farnesylierbare Wildtyp von PEX19 stark mit ALDP, eine nicht farnesylierbare Mutante C296S-PEX19 hingegen nur schwach. In einem *in vitro*-Experiment konnte hingegen keine Abhängigkeit der Interaktion von PEX19 mit den peroxisomalen ABC-Transportern von der Farnesylierung festgestellt werden (GLOECKNER et al., 2000). Da in Bakterien keine Prenylierungen stattfinden, wurden die im Test eingesetzten GST-Proteine (GST-PEX19 und GST-C296S-PEX19) zuvor *in vitro* mit Farnesylypyrophosphat umgesetzt. Die abweichenden Ergebnisse aus dem *in vitro*-Experiment könnten durch ei-



ne ineffiziente Farnesylierung von GST-PEX19 verursacht worden sein. So sind die Thiolgruppen freier Cysteine, die für die Addition von Farnesylpyrophosphat erforderlich sind, bei der Proteinaufreinigung stark oxidationsgefährdet. Die Farnesylierung von PEX19 könnte einerseits die Interaktion mit Chaperon-Komplexen ermöglichen, oder andererseits Kontakte zum Cytoskelett vermitteln. Diese Proteininteraktionen könnten ein Targeting des Komplexes aus PMP und PEX19 zur Zielmembran, z.B. prä-peroxisomale Vesikel (peroxisomale Vorläufer), ermöglichen. In dieser Arbeit wurde jedoch eine Verstärkung der Interaktion zwischen PEX19 und PMPs durch die Farnesylierung gefunden. Demnach könnte die Erhöhung der Hydrophobizität durch die Farnesylierung die Wechselwirkung mit hydrophoben Domänen, und damit die Faltung der peroxisomalen Membranproteine, erleichtern. Die Farnesylierung würde somit eine Chaperon-Funktion von PEX19 ermöglichen. So sind bereits farnesylierte Co-Chaperone, z.B. das DnaJ homologe AtJ2 in *A. thaliana*, beschrieben worden. Die Funktion der Farnesylierung dieser Proteine ist allerdings nicht bekannt (ZHOU et al., 2000).

## 4.5 Modell für Transport und Assembly peroxisomaler Membranproteine

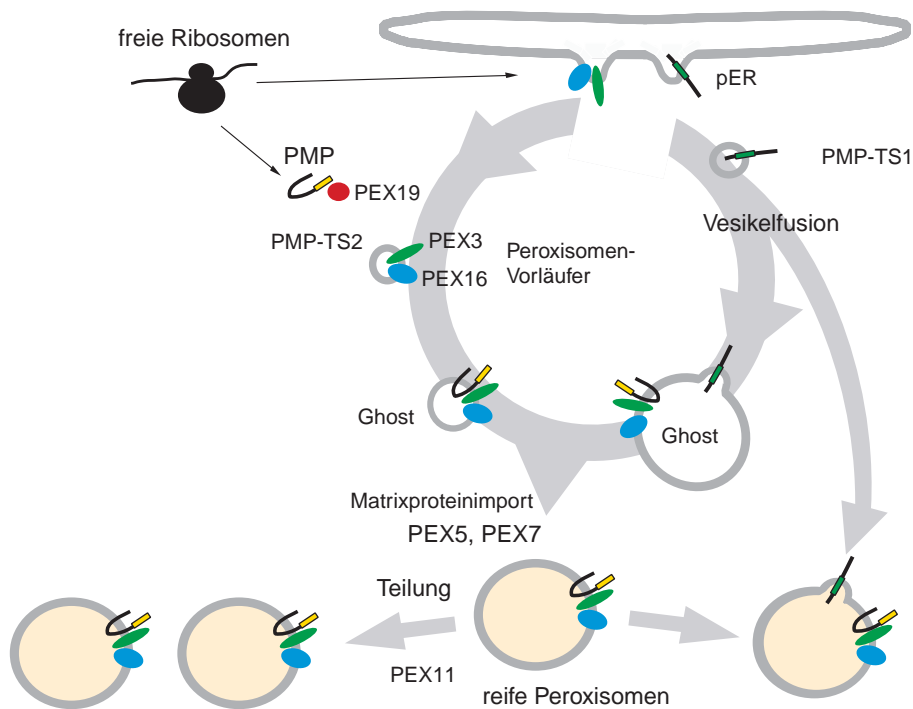
Mittlerweile sind für über 15 peroxisomale Membranproteine Wechselwirkungen mit PEX19 nachgewiesen worden. So interagieren neben den vier peroxisomalen ABC-Transportern auch die humanen PMPs PEX2, PEX3, PEX10, PEX11 $\alpha$ , PEX11 $\beta$ , PEX14, PEX16, PMP22, PMP24, PMP34 (SACKSTEDER et al., 2000) und die Hefepoteine Pex3, Pex10 und Pex17 (GÖTTE et al., 1998; SNYDER et al., 1999a; SNYDER et al., 1999b), mit PEX19. In Einklang mit den in dieser Arbeit erlangten Ergebnissen für ALDP, konnte für einige PMPs (PEX11 $\beta$ , PEX14 und PMP70) ebenfalls gezeigt werden, daß die PEX19-Interaktionsdomänen in Regionen liegen, die am peroxisomalen Targeting dieser Proteine beteiligt sind (SACKSTEDER et al., 2000). Diese Ergebnisse unterstreichen eine mögliche Funktion von PEX19 im Transport von frisch synthetisierten PMPs. PEX19 könnte als spezifisches Chaperonin peroxisomale Membranproteine binden und die richtige Faltung katalysieren. Zwar kommen SNYDER et al. (2000) zum Ergebnis, daß die PEX19-Bindung an der peroxisomalen Membran erfolgt und das Targeting-Signal einiger peroxisomaler, membranständiger Hefepoteine nicht mit der PEX19-Bindung korreliert, eine Wechselwirkung im Two-Hybrid-System, die im Kern stattfinden muß, sowie Kernshiftexperimente von SACKSTEDER et al. (2000) sprechen aber eher dafür, daß freie, frisch synthetisierte, peroxisomale Membranproteine mit PEX19 interagieren. Spezifische Chaperoninsysteme sind bereits für das Targeting verschiedener Organellen, wie Mitochondrien oder das ER, bekannt. PEX19 weist allerdings keinerlei Ähnlichkeiten zu den bekannten DnaK-(Hsp70)/DnaJ-Systemen auf und wäre somit Teil eines neuen Chaperoninsystems. Die Farnesylierung könnte die Bindung an hydrophobe Proteinbereiche

unterstützen. Um ein Targeting von Proteinen zu ermöglichen, müssen cytosolische Komplexe spezifisch von membranständigen Rezeptoren (Docking-Stellen) erkannt werden. Als Kandidaten für einen membranständigen Rezeptor für einen PEX19-PMP-Komplex kämen z.B. PEX3 und PEX16 in Frage. Beide sind an der peroxisomalen Membranbiogenese beteiligt, da Defekte dieser Proteine zu Ghost-freien Zellen führen (MUNTAU et al., 2000a; HONSHO et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß PEX19 von PEX3 (MUNTAU et al., 2000b) und PEX16 gebunden wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß PEX19 nicht an das Targetingsignal von PEX3 bindet, sondern der intakte, cytosolisch orientierte PEX3-C-Terminus, der eine Länge von etwa 2/3 des Proteins ausmacht, für die Wechselwirkung erforderlich ist (P. MAYERHOFER, pers. Mitt.). PEX3 könnte somit ein geeigneter Kandidat für einen membranständigen Rezeptor sein. PEX16 ist zwar in Säugetierzellen essentiell für die peroxisomale Biogenese, seine Funktion scheint aber nicht konserviert zu sein. So ist ein homologes Protein in *S. cerevisiae* nicht bekannt. Da PEX19 von der Hefe zum Säugetier konserviert ist, ist PEX16 kein geeigneter Kandidat für einen PEX19-Akzeptor.

Der membranständige Rezeptor eines PEX19-„Substrats“ wird vermutlich erst in einem Three-Hybrid-System gefunden werden, in dem ein peroxisomales Membranprotein als Köder und PEX19 als zusätzlicher Faktor eingesetzt werden.

Wenn PEX3 und PEX16 für die Integration peroxisomaler Membranproteine benötigt werden, woher kommen dann die peroxisomalen Vorläufer? Das ursprünglich von LAZAROW und FUJIKI (1985) aufgestellte Bild der Peroxisomen als komplett eigenständige Organellen wird mehr und mehr unwahrscheinlich. So scheinen Peroxisomen Teil eines vom ER ausgehenden, allgemeinen Vesikelflusses zu sein. In Hefen konnten verschiedene Subpopulationen peroxisomaler Vesikel mit unterschiedlicher Importkompetenz für peroxisomale Proteine identifiziert werden. Es scheint zwei Wege für einen peroxisomalen Import von Membranproteinen zu geben: zum einen über das ER (PMP-TS1) und zum anderen, vermutlich über einen PEX19 gesteuerten Weg, über das Cytosol (PMP-TS2). Einen indirekten Hinweis für ein ER Targeting einiger Peroxine liefern Glycosylierungen, die nur im ER stattfinden können: Für yIPex2 und yIPex16 in *Y. lipolytica* konnte eine N-Glycosylierung (TITORENKO & RACHUBINSKI, 1998A) und für scPex15 (*S. cerevisiae*) eine O-Glycosylierung (ELGERSMA et al., 1997) nachgewiesen werden. Die peroxisomale Ascorbatperoxidase (APX) wird posttranslational ins ER transportiert. Sie gehört zu der Gruppe der „tail anchored“ Proteine des ER. Peroxisomale Vorläufervesikel vom ER könnten PEX3 und PEX16 enthalten, wenn auch die Inhibition des Coat-Protein-Komplexe COPI- bzw. COPII-abhängigen, sekretorischen ER-Vesikelflusses keinen Einfluß auf das Targeting dieser Proteine gezeigt hat. Über diese Vesikel könnten frühe peroxisomale Membranproteine (PMP-TS1), somit auch der Akzeptor von beladenem PEX19, ihren Weg in die Peroxisomen finden. In einem späteren Schritt könnten dann PEX19 vermittelte PMP-TS2 Proteine, wie ALDP, in die Peroxisomen gelangen. In Abb. 4.1 ist ein mögliches

Schema der Peroxisomenbiogenese wiedergegeben.



**Abb. 4.1: Hypothetische Wege des Imports von peroxisomalen Membranproteinen.** Post-translationale Modifikationen einiger Peroxine, wie Glycosylierungen, sprechen dafür, daß ein Teil der peroxisomalen Membranproteine über das ER zu den Peroxisomen gelangt. So könnte es zwei peroxisomale Membran-Tragetingsignale geben: ein PMP-TS1, für ein ER-vermitteltes Targeting, und ein PMP-TS2, für ein, durch cytosolische Faktoren wie z.B. PEX19 vermitteltes Targeting. Mögliche membranständige PEX19-Akzeptoren, wie PEX3 oder PEX16, könnten von einem für peroxisomale Proteine spezifischen Teil des ER (peroxisomales ER, pER) mit Vesikeln abgeschnürt werden. Ein über PEX19 vermitteltes PMP-TS2-Targeting könnte dann an diesen peroxisomalen Vorläufern stattfinden. Durch Vesikelfusionen könnten laufend PMP-TS1-Membranproteine in die wachsenden oder maturen Peroxisomen gelangen. Ein weiterer Weg für die Entstehung von Peroxisomen ist die PEX11-vermittelte Teilung (SOUTH & GOULD, 1999; PIEPER et al., 2000).

## 4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die peroxisomalen ABC-Transporter spezifisch mit dem peroxisomalen Biogeneseagen PEX19 interagieren. Da Proteinbereiche mit PEX19 interagieren, die essentielle Signale für das peroxisomale Targeting dieser PMPs enthalten, kann angenommen werden, daß PEX19 am Transport dieser Proteine zur peroxisomalen Membran beteiligt ist. Das Auftreten mehrerer Bindungsstellen für PEX19

in ALDP spricht dafür, daß PEX19 nicht im Sinne einer einfachen Rezeptor-Substrat-Beziehung, sondern eher als ein spezifisches Chaperon wirkt. Somit könnte es neben dem Transport dieser Proteine, auch an deren Faltung bzw. Assembly beteiligt sein. Multiple Bindungsstellen sind häufig ein Indiz für die Beteiligung weiterer Protein-Faktoren. So könnte PEX19 Teil eines cytosolischen Proteinkomplexes zur Faltung und zum Targeting peroxisomaler Membranproteine sein.

Die vorliegende Arbeit liefert somit interessante Ansätze zur weiteren Erforschung des Proteintargetings. Zukünftige Arbeiten könnten in zwei Richtungen gehen. Zum einen könnten Studien zur Identifizierung eines „Minimalsignals“ für peroxisomales Targeting von PMPs durchgeführt werden. Dazu könnten z.B. die postulierten Targeting-Signale der PMPs auf nicht-peroxisomale Membranproteine übertragen werden und die Auswirkungen auf deren zelluläre Lokalisation untersucht werden. Zum anderen ist die Frage offen, welche weiteren Proteine am Transport bzw. Targeting von PMPs beteiligt sind. Für ein Targeting werden neben cytosolischen Akzeptorkomplexen auch membranständige Rezeptoren benötigt. Über eine mögliche Funktion von PEX3 und PEX16 als Teil eines Rezeptorkomplexes kann zwar spekuliert werden, der Nachweis steht allerdings noch aus. Ein weiterer interessanter Ansatz ergibt sich aus der Farnesylierung von PEX19. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abhängigkeit der Interaktionsstärke von PEX19 mit PMPs von der Farnesylierung festgestellt. Farnesylierte Proteine können aber auch in Abhängigkeit von dieser posttranslationalen Modifikation spezifische Kontakte mit Micotubuli eingehen, die ein Targeting dieser Proteine zur Zielmembran fördern (THISSEN et al., 1997). Ziel zukünftiger Arbeiten könnte daher sein, zu klären, ob eine diskrete Wechselwirkung eines PEX19-PMP-Komplexes mit Teilen des Cytoskeletts erforderlich ist, um ein Targeting peroxisomaler Proteine zu ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- Abe, I. & Fujiki, Y. (1998). cDNA cloning and characterization of a constitutively expressed isoform of the human peroxin PEX11p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252:529–533.
- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282:615–616.
- Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J.A., Veenhuis, M. & Kunau, W.H. (1997). Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell*, 89:83–92.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215:403–410.
- Baes, M., Gressens, P., Baumgart, E., Carmeliet, P., Casteels, M., Franssen, M., Evrard, P., Fahimi, D., Declercq, P.E., Collen, D., van Veldhoven, P.P. & Mannaerts, G.P. (1997). A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat. Genet.*, 17:49–57.
- Baes, M., Huyghe, S., Carmeliet, P., Declercq, P.E., Collen, D., Mannaerts, G.P. & van Veldhoven, P.P. (2000). Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 275:16329–16336.
- Baudhuin, P., Müller, M., Poole, B. & de Duve, C. (1965). Non-mitochondrial oxidizing particles (microbodies) in rat liver and kidney and in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20:53–59.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- Braun, A., Ambach, H., Kammerer, S., Rolinski, B., Stockler, S., Rabl, W., Gärtner, J., Zierz, S. & Roscher, A.A. (1995). Mutations in the gene for X-linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, 56:854–861.
- Braverman, N., Dodt, G., Gould, S.J. & Valle, D. (1998). An isoform of PEX5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Hum. Mol. Genet.*, 7:1195–1205.

- Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S.J. & Valle, D. (1997). Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat. Genet.*, 15:369–376.
- Breidenbach, R.W. & Beevers, H. (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27:462–469.
- Brown, T.W., Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A. (2000). Mutants of the *Yarrowia lipolytica* PEX23 gene encoding an integral peroxisomal membrane peroxin mislocalize matrix proteins and accumulate vesicles containing peroxisomal matrix and membrane proteins. *Mol. Biol. Cell*, 11:141–152.
- Casey, P.J. (1992). Biochemistry of protein prenylation. *J Lipid Res.*, 33:1731–1740.
- Chang, C.C., Warren, D.S., Sacksteder, K.A. & Gould, S.J. (1999). PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J. Cell Biol.*, 147:761–774.
- Collins, C.S., Kalish, J.E., Morrell, J.C., McCaffery, J.M. & Gould, S.J. (2000). The peroxisome biogenesis factors Pex4p, Pex22p, Pex1p, and Pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *Mol. Cell Biol.*, 20:7516–7526.
- de Duve, C. (1965). Functions of Microbodies. *J. Cell Biol.*, 27:25A–26A.
- de Launoit, Y. & Adamski, J. (1999). Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J. Mol. Endocrinol.*, 22:227–240.
- Diestelkötter, P. & Just, W.W. (1993). In vitro insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J. Cell Biol.*, 123:1717–1725.
- Dyer, J.M., McNew, J.A. & Goodman, J.M. (1996). The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J. Cell Biol.*, 133:269–280.
- Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., Szilard, R.K., Veenhuis, M., Nuttley, W.M. & Rachubinski, R.A. (1995). The *Yarrowia lipolytica* gene PAY2 encodes a 42-kDa peroxisomal integral membrane protein essential for matrix protein import and peroxisome enlargement but not for peroxisome membrane proliferation. *J. Biol. Chem.*, 270:1429–1436.
- Eitzen, G.A., Szilard, R.K. & Rachubinski, R.A. (1997). Enlarged peroxisomes are present in oleic acid-grown *Yarrowia lipolytica* overexpressing the PEX16 gene encoding an intraperoxisomal peripheral membrane peroxin. *J. Cell Biol.*, 137:1265–1278.
- Elgersma, Y., Kwast, L., van Den, Berg M., Snyder, W.B., Distel, B., Subramani, S. & Tabak, H.F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated

- peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.*, 16:7326–7341.
- Faber, K.N., Heyman, J.A. & Subramani, S. (1998). Two AAA family peroxins, PpPex1p and PpPex6p, interact with each other in an ATP-dependent manner and are associated with different subcellular membranous structures distinct from peroxisomes. *Mol. Cell Biol.*, 18:936–943.
- Faust, P.L. & Hatten, M.E. (1997). Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J. Cell Biol.*, 139:1293–1305.
- Forss-Petter, S., Werner, H., Berger, J., Lassmann, H., Molzer, B., Schwab, M.H., Bernheimer, H., Zimmermann, F. & Nave, K.A. (1997). Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J. Neurosci. Res.*, 50:829–843.
- Gärtner, J., Braun, A., Holzinger, A., Roerig, P., Lenard, H.G. & Roscher, A.A. (1998a). Clinical and genetic aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics.*, 29:3–13.
- Gärtner, J., Brosius, U., Obie, C., Watkins, P.A. & Valle, D. (1998b). Restoration of PEX2 peroxisome assembly defects by overexpression of PMP70. *Eur. J. Cell Biol.*, 76:237–245.
- Gärtner, J., Obie, C., Watkins, P. & Valle, D. (1994). Restoration of peroxisome biogenesis in a peroxisome-deficient mammalian cell line by expression of either the 35 kDa or the 70 kDa peroxisomal membrane proteins. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 17:327–329.
- Girzalsky, W., Rehling, P., Stein, K., Kipper, J., Blank, L., Kunau, W.H. & Erdmann, R. (1999). Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes. *J. Cell Biol.*, 144:1151–1162.
- Gloeckner, C.J., Mayerhofer, P.U., Landgraf, P., Muntau, A.C., Holzinger, A., Gerber, J.K., Kammerer, S., Adamski, J. & Roscher, A.A. (2000). Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271:144–150.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23:175–182.
- Golemis, E.A. & Khazak, V. (1997). Alternative yeast two-hybrid systems. The interaction trap and interaction mating. *Methods Mol. Biol.*, 63:197–218.
- Golemis, E.A., Serebriiskii, I., Jr, R.L., Kolonin, M.G., Gyuris, J. & Brent, R. (2000). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. IN: *Current Protocols in Molecular Biology*, Kapitel 20.1. John Wiley & Sons.

- Götte, K., Girzalsky, W., Linkert, M., Baumgart, E., Kammerer, S., Kunau, W.H. & Erdmann, R. (1998). Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 18:616–628.
- Heringa, J. (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput. Chem.*, 23:341–364.
- Hettema, E.H., Distel, B. & Tabak, H.F. (1999). Import of proteins into peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1451:17–34.
- Hettema, E.H., Ruigrok, C.C., Koerkamp, M.G., van Den, Berg M., Tabak, H.F., 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, E.H., van Roermund, C.W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R.J. & Tabak, H.F. (1996). The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 15:3813–3822.
- Holzinger, A., Kammerer, S., Berger, J. & Roscher, A.A. (1997a). cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239:261–264.
- Holzinger, A., Kammerer, S. & Roscher, A.A. (1997b). Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237:152–157.
- Honsho, M. & Fujiki, Y. (2000). Topogenesis of peroxisomal membrane protein requires a short, positively charged intervening-loop sequence and flanking hydrophobic segments: study using human membrane protein PMP34. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Honsho, M., Tamura, S., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N. & Fujiki, Y. (1998). Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am. J. Hum. Genet.*, 63:1622–1630.
- Huang, Y., Ito, R., Miura, S., Hashimoto, T. & Ito, M. (2000). A missense mutation in the RING finger motif of PEX2 protein disturbs the import of peroxisome targeting signal 1 (PTS1)-containing protein but not the PTS2-containing protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270:717–721.
- Huhse, B., Rehling, P., Albertini, M., Blank, L., Meller, K. & Kunau, W.H. (1998). Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J. Cell Biol.*, 140:49–60.
- Imanaka, T., Shiina, Y., Takano, T., Hashimoto, T. & Osumi, T. (1996a). Insertion of the 70-kDa peroxisomal membrane protein into peroxisomal membranes in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.*, 271:3706–3713.
- Imanaka, T., Takano, T., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1996b). Sorting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein into rat liver peroxisomes in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 804:663–665.



- Jakobs, B.S. & Wanders, R.J. (1995). Fatty acid beta-oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213:1035–1041.
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1990). The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.*, 265:4534–4540.
- Kammerer, S., Arnold, N., Gutensohn, W., Mewes, H.W., Kunau, W.H., Höfler, G., Roscher, A.A. & Braun, A. (1997). Genomic organization and molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein. *Genomics*, 45:200–210.
- Kammerer, S., Holzinger, A., Welsch, U. & Roscher, A.A. (1998). Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p. *FEBS Lett.*, 429:53–60.
- Kato, K., Der, C.J. & Buss, J.E. (1992). Prenoids and palmitate: lipids that control the biological activity of Ras proteins. *Semin. Cancer Biol.*, 3:179–188.
- Kemp, S., Wei, H.M., Lu, J.F., Braiterman, L.T., McGuinness, M.C., Moser, A.B., Watkins, P.A. & Smith, K.D. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat. Med.*, 4:1261–1268.
- Kiel, J.A., Hilbrands, R.E., van, der Klei, Rasmussen, S.W., Salomons, F.A., van der, Heide M., Faber, K.N., Cregg, J.M. & Veenhuis, M. (1999). Hansenula polymorpha Pex1p and Pex6p are peroxisome-associated AAA proteins that functionally and physically interact. *Yeast*, 15:1059–1078.
- Klein, I., Sarkadi, B. & Varadi, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1461:237–262.
- Koller, A., Snyder, W.B., Faber, K.N., Wenzel, T.J., Rangell, L., Keller, G.A. & Subramani, S. (1999). Pex22p of *Pichia Pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J. Cell Biol.*, 146:99–112.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Lazarow, P.B. & Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1:489–530.
- Lazarow, P.B. & Moser, H.W. (1995). Disorders of peroxisome biogenesis. IN: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., Hrsg., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Kapitel 71, Seiten 2287–2324. McGraw-Hill, New York, 7. Ausg.
- Leenders, F., Dolez, V., Begue, A., Möller, G., Gloeckner, C.J., de Launoit, Y. & Adamski, J. (1998). Structure of the gene for the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV. *Mamm. Genome*, 9:1036–1041.

- Leenders, F., Tesdorpf, J.G., Markus, M., Engel, T., Seedorf, U. & Adamski, J. (1996). Porcine 80-kDa protein reveals intrinsic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, fatty acyl-CoA-hydratase/dehydrogenase, and sterol transfer activities. *J. Biol. Chem.*, 271:5438–5442.
- Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V, Cartier, N., Benarous, R. & Aubourg, P. (1999a). Homo- and Heterodimerization of Peroxisomal ATP-binding Cassette Half- transporters. *J. Biol. Chem.*, 274:32738–32743.
- Liu, Y., Bjorkman, J., Urquhart, A., Wanders, R.J., Crane, D.I. & Gould, S.J. (1999b). PEX13 is mutated in complementation group 13 of the peroxisomebiogenesis disorders. *Am. J. Hum. Genet.*, 65:621–634.
- Ludwig, E., Silberstein, F.C., van Empel, J., Erfle, V., Neumann, M. & Brack-Werner, R. (1999). Diminished Rev-mediated stimulation of human immunodeficiency virus type 1 protein synthesis is a hallmark of human astrocytes. *J. Virol.*, 73:8279–8289.
- Lu, J.F., Lawler, A.M., Watkins, P.A., Powers, J.M., Moser, A.B., Moser, H.W. & Smith, K.D. (1997). A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94:9366–9371.
- Marshall, C.J. (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science*, 259:1865–1866.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. & Kunau, W.H. (1994). PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *EMBO J.*, 13:4908–4918.
- Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimozawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R.J., Suzuki, Y., Kondo, N. & Fujiki, Y. (1999). Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96:2116–2121.
- McCollum, D., Monosov, E. & Subramani, S. (1993). The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells—the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein fam. *J. Cell Biol.*, 121:761–774.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Miller, J.H. (1992). *A Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Min, K.T. & Benzer, S. (1999). Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant bubblegum. *Science*, 284:1985–1988.
- Möller, G., van Grunsven, E.G., Wanders, R.J. & Adamski, J. (2001). Molecular basis of D-bifunctional protein deficiency. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 171:60–71.

- Monosov, E.Z., Wenzel, T.J., Luers, G.H., Heyman, J.A. & Subramani, S. (1996). Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 44:581–589.
- Moser, H.W. & Moser, A.B. (1996). Peroxisomal disorders: overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 804:427–441.
- Moser, H.W., Smith, K.D. & Moser, A.B. (1995). X-linked Adrenoleukodystrophy. IN: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., Hrsg., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Kapitel 72, Seiten 2325–2349. McGraw Hill, New York, 7. Ausg.
- Mullen, R.T. & Trelease, R.N. (2000). The sorting signals for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase are within its C-terminal tail. *J. Biol. Chem.*, 275:16337–16344.
- Muntau, A.C., Mayerhofer, P.U., Albet, S., Schmid, T.E., Bugaut, M., Roscher, A.A. & Kammerer, S. (2000a). Genomic organization, expression analysis, and chromosomal localization of the mouse PEX3 gene encoding a peroxisomal assembly protein. *Biol. Chem.*, 381:337–342.
- Muntau, A.C., Mayerhofer, P.U., Paton, B.C., Kammerer, S. & Roscher, A.A. (2000b). Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G. *Am. J. Hum. Genet.*, 67:967–975.
- NEB (1994). RbCl transforming procedure for improved efficiency. *NEB-Transcript*, Seite 7.
- Netik, A., Forss-Petter, S., Holzinger, A., Molzer, B., Unterrainer, G. & Berger, J. (1999). Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum. Mol. Genet.*, 8:907–913.
- Novikoff, A.B. & Goldfischer, S. (1969). Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.*, 17:675–680.
- Okumoto, K., Abe, I. & Fujiki, Y. (2000). Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *J. Biol. Chem.*, 275:25700–25710.
- Opperdoes, F.R. & Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.*, 80:360–364.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N. & Fujiki, Y. (2000). The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *J. Biol. Chem.*, 275:21703–21714.

- Passreiter, M., Anton, M., Lay, D., Frank, R., Harter, C., Wieland, F.T., Gorgas, K. & Just, W.W. (1998). Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatomer. *J. Cell Biol.*, 141:373–383.
- Pause, B., Saffrich, R., Hunziker, A., Ansorge, W. & Just, W.W. (2000). Targeting of the 22 kDa integral peroxisomal membrane protein. *FEBS Lett.*, 471:23–28.
- Pieper, H., Kunau, W.H. & Dodt, G. (2000). Proliferation of peroxisomal structures caused by *HsPEX11 $\beta$* . *Biol. Chem.*, 381(Suppl.):S133–S133.
- Powers, J.M. & Moser, H.W. (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol.*, 8:101–120.
- Purdue, P.E., Yang, X. & Lazarow, P.B. (1998). Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J. Cell Biol.*, 143:1859–1869.
- Qi, C., Zhu, Y., Pan, J., Usuda, N., Maeda, N., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Hashimoto, T. & Reddy, J.K. (1999). Absence of spontaneous peroxisome proliferation in enoyl-CoA Hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse liver. Further support for the role of fatty acyl CoA oxidase in PPARalpha ligand metabolism. *J Biol Chem.*, 274:15775–15780.
- Rehling, P., Marziach, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M. & Kunau, W.H. (1996). The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PAS7 gene. *EMBO J.*, 15:2901–2913.
- Rehling, P., Skaletz-Rorowski, A., Girzalsky, W., Voorn-Brouwer, T., Franse, M.M., Distel, B., Veenhuis, M., Kunau, W.H. & Erdmann, R. (2000). Pex8p, an intra-peroxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor Pex5p. *J. Biol. Chem.*, 275:3593–3602.
- Rhodin, J. (1954). *Correlation of ultrastructural organisation and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of mouse kidney*. Dissertation, Stockholm.
- Rost, B. (1997). Better 1D predictions by experts with machines. *Proteins*, Suppl. 1:192–197.
- Sacksteder, K.A., Jones, J.M., South, S.T., Li, X., Liu, Y. & Gould, S.J. (2000). PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J. Cell Biol.*, 148:931–944.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Ausg.
- Schoonjans, K., Staels, B. & Auwerx, J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302:93–109.

- Schrader, M., Reuber, B.E., Morrell, J.C., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Stroh, T.A., Valle, D., Schroer, T.A. & Gould, S.J. (1998). Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J. Biol. Chem.*, 273:29607–29614.
- Seedorf, U., Ellinghaus, P. & Roch, Nofer J. (2000). Sterol carrier protein-2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1486:45–54.
- Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M. & Valle, D. (1997). Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum. Mol. Genet.*, 6:1925–1931.
- Smith, J.J. & Rachubinski, R.A. (2001). A Role for the Peroxin Pex8p in Pex20p-dependent Thiolase Import into Peroxisomes of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.*, 276:1618–1625.
- Smith, K.D., Kemp, S., Braiterman, L.T., Lu, J.F., Wei, H.M., Geraghty, M., Stetten, G., Bergin, J.S., Pevsner, J. & Watkins, P.A. (1999). X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem. Res.*, 24:521–535.
- Snyder, W.B., Faber, K.N., Wenzel, T.J., Koller, A., Luers, G.H., Rangell, L., Keller, G.A. & Subramani, S. (1999a). Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell*, 10:1745–1761.
- Snyder, W.B., Koller, A., Choy, A.J., Johnson, M.A., Cregg, J.M., Rangell, L., Keller, G.A. & Subramani, S. (1999b). Pex17p Is Required for Import of Both Peroxisome Membrane and Luminal Proteins and Interacts with Pex19p and the Peroxisome Targeting Signal- Receptor Docking Complex in *Pichia Pastoris*. *Mol. Biol. Cell*, 10:4005–4019.
- Snyder, W.B., Koller, A., Choy, A.J. & Subramani, S. (2000). The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J. Cell Biol.*, 149:1171–1178.
- South, S.T. & Gould, S.J. (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J. Cell Biol.*, 144:255–266.
- Swinkels, B.W., Gould, S.J. & Subramani, S. (1992). Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett.*, 305:133–136.
- Thissen, J.A., Gross, J.M., Subramanian, K., Meyer, T. & Casey, P.J. (1997). Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J Biol Chem.*, 272:30362–30370.
- Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A. (1998a). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends. Biochem. Sci.*, 23:231–233.
- Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A. (1998b). Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 18:2789–2803.

- Titorenko, V.I., Smith, J.J., Szilard, R.K. & Rachubinski, R.A. (1998). Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. *J. Cell Biol.*, 142:403–420.
- Tusnady, G.E., Bakos, E., Varadi, A. & Sarkadi, B. (1997). Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.*, 402:1–3.
- Urquhart, A.J., Kennedy, D., Gould, S.J. & Crane, D.I. (2000). Interaction of Pex5p, the type 1 peroxisome targeting signal receptor, with the peroxisomal membrane proteins Pex14p and Pex13p. *J. Biol. Chem.*, 275:4127–4136.
- van Veldhoven, P.P. & Mannaerts, G.P. (1999). Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 466:261–272.
- Wanders, R.J., van Grunsven, E.G. & Jansen, G.A. (2000). Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.*, 28:141–149.
- Wichers, M., Kohler, W., Brennemann, W., Boese, V., Sokolowski, P., Bidlingmaier, F. & Ludwig, M. (1999). X-linked adrenomyeloneuropathy associated with 14 novel ALD-gene mutations: no correlation between type of mutation and age of onset. *Hum. Genet.*, 105:116–119.
- Yamada, T., Taniwaki, T., Shinnoh, N., Uchiyama, A., Shimozawa, N., Ohyagi, Y., Asahara, H. & Kira, J. (1999). Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very long-chain acyl-coenzyme A synthetase with the peroxisome. *Neurology*, 52:614–616.
- Zhou, R., Kroczyńska, B. & Miernyk, J.A. (2000). Expression of the Arabidopsis thaliana AtJ2 cochaperone protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 2000 Jul. ;19. (2. ):253. -8., 19:253–258.

# Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über die bekannten Peroxine . . . . .	9
1.2	Übersicht der Zellweger-Komplementationsgruppen . . . . .	10





# Abbildungsverzeichnis

1.1	Peroxisomale $\beta$ -Oxidation . . . . .	3
1.2	Import peroxisomaler Matrixproteine . . . . .	5
1.3	Zellwegerspektrum . . . . .	10
1.4	Struktur und Topologie peroxisomaler ABC-Halbtransporter . . . . .	13
3.1	Funktionsweise des Interaction Traps . . . . .	42
3.2	Interaktion verschiedener LexA-ALDRP-Konstrukte mit B42- $\Delta$ 6-PEX19 . . . . .	44
3.3	Two-Hybrid Assay der N-Termini von ALDP, ALDRP und PMP70 . . . . .	45
3.4	Funktionsweise des GST-Pull-Downs . . . . .	46
3.5	C-terminales Farnesylierungsmotiv von PEX19 . . . . .	46
3.6	Aufreinigung von GST-PEX19 bzw. GST-C296S-PEX19 . . . . .	47
3.7	GST-Pull-Down peroxisomaler ABC-Transporter mit GST-PEX19 . . . . .	48
3.8	Vergleich von Wildtyp PEX19 und C296S-PEX19 im Two-Hybrid-Experiment . . . . .	49
3.9	Einfluß N-terminaler Deletionen von ALDP auf die Interaktion mit PEX19 . . . . .	51
3.10	Alignment der N-Termini von ALDP, ALDRP, PMP70 und PMP69 . . . . .	52
3.11	Interaktion kurzer N-terminaler Bereiche peroxisomaler ABC-Halbtransporter mit $\Delta$ 6-PEX19 . . . . .	53
3.12	C-terminale Deletionsstudien des ALDP-N-Terminus . . . . .	55
3.13	N-terminale Deletionsstudien des ALDP-N-Terminus . . . . .	56
3.14	$\beta$ -Galactosidase-Flüssigassay . . . . .	57
3.15	PEX19-Interaktion mit Motiv A . . . . .	57
3.16	Wechselwirkung von verschiedenen ALDP-Mutanten des Motivs A mit PEX19 . . . . .	58
3.17	Mutationsanalyse des Motivs A . . . . .	59
3.18	Konstrukte für das Targeting von GFP-Fusionsproteinen . . . . .	60
3.19	Targeting eines PEX19-ALDP-GFP-Fusionsproteins . . . . .	61
3.20	Interaktion von PEX16 mit PEX19 . . . . .	62
4.1	Hypothetische Wege des PMP-Imports . . . . .	69



# Lebenslauf

**Persönliche Daten:**

Christian Johannes Gloeckner  
geb. am 15.01.1972 in Kiel  
ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulausbildung:**

1978–1982                    Grundschule, Seesen  
1982–1984                   Orientierungsstufe, Seesen  
1984–1991                   Jacobson Gymnasium, Seesen  
Abschluß: Abitur.

**Wehrdienst:**

7/1991–6/1992             Fernmeldestab Clausthal-Zellerfeld

**Hochschulausbildung:**

10/1992–12/1997           Studium der Biochemie an der Universität Hannover  
10/1996–12/1996           wissenschaftlicher Aufenthalt am Institut für Zellbiologie der ETH-Zürich  
  
7/1997–12/1997           Diplomarbeit am Institut für Säugetiergenetik, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Thema: Expression der *orphan nuclear receptor*-Genfamilie in embryonalen Stammzellen.  
Abschluß: Diplom.

**Dissertation:**

seit 1/1998:                wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für experimentelle Genetik (früher: Institut für Säugetiergenetik), GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
  
11/1998–12/1998 und  
11/1999–12/1999           wissenschaftlicher Aufenthalt am Department for Medical Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm



# Danksagung

Herrn **PD. Dr. Jerzy Adamski** danke ich für die freundliche Vergabe des Themas, sowie für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit.

Herrn **Prof. Dr. Adelbert A. Roscher** (Dr. von Haunersches Kinderspital, München) danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Allen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe Adamski** möchte ich für das angenehme und teilweise lustige Arbeitsklima danken.

Ganz besonders aber danke ich Herrn **Dr. Josef-Karl Gerber**,

**Dr. Gabriele Möller** sowie Herrn **Dipl.-Biochem. Rainer Breitling**, deren fachliche Ratschläge maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau **Leb.-Chem. Daniela Laubner** sowie Frau **Dipl.-Biol. Zrinka Marijanović**, danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin danke ich Herrn **Dipl.-Biol. Peter Meyerhofer** (Dr. von Haunersches Kinderspital, München) und Herrn  **cand.-med. Pablo Landgraf** (Dr. von Haunersches Kinderspital, München) für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet des peroxisomalen Targetings von ALDP,

Herrn **Dr. Andreas Holzinger** (Dr. von Haunersches Kinderspital, München), für die Überlassung der cDNAs für die peroxisomalen ABC-Transporter,

Herrn **Dr. Stefan Kammerer** (Sequenom, San Diego) für die Überlassung der cDNA von PEX19,

Frau **Dr. Johanna Zilliacus** (Karolinska Institutet, Stockholm), für die Überlassung der cDNA Bibliothek und

Herrn **Utz Linzner** für die Synthese der zahlreichen Oligonukleotide.

Herrn **Dr. Norman Klopp** und Herrn **Dr. Johannes Lengler** danke für ihre freundschaftliche Diskussionsbereitschaft auch nach Feierabend.

An ganz besonderer Stelle möchte ich meiner Freundin **Dipl.-Biol. Gabriele Dütsch** von Herzen danken – nicht nur für ihre fachliche Unterstützung, sondern auch für ihre „tägliche“ liebevolle Betreuung in allen Lebenslagen, insbesondere in der Zeit des Zusammenschreibens. Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank **meinen Eltern**, die nicht nur mein Studium finanzierten, sondern auch immer ein offenes Ohr für mich hatten, sowie meinen Geschwistern **Mirjam** und **Friederike**.



# Anhang

## Primer für die Klonierung in pEG202

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
ALDRP 1-218	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGACACATATGCTAAATGCAGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTTAGGAGAACATCATAATATCCTCCG
ALDRP 181-297	5'	<i>Eco</i> RI	AGAGAATTCGGAGGCGGGCTAGTAGACCACGCCTATGAAACC
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCACACATACCGCAAATAGCCTTTTC
ALDRP 273-489	5'	<i>Bam</i> HI	AGGGATCCTTGGGGGAGGTAAAGTGTTAAAAGCCTGTTCTCC
	3'	<i>Nco</i> I	TCCCATGGTTACCCCACCACTTCTCCTGCTGG
ALDRP 365-741	5'	<i>Bam</i> HI	AGGGATCCTTGGGGGAGGTGCAACTGGCTTTGCAGATGG
	3'	<i>Nco</i> I	TCCCATGGTCAAACAAATTAAGATGTCTCATCTTC
ALDRP 1-102	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGACACATATGCTAAATGCAGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCAAGTGGTCACAAGTTTTGGAAAC
ALDP 1-203	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGCCGGTGCTCTCCAGG
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCAGGCCACCACGTCCTCCG
ALDP 260-485	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGTTCGCCCCAAGTTCGGGGAGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACTCTCCTGAGGGCGTGACG
ALDP 352-746	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGCCACTGGCTACTCAGAGTCAGATGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTGTCAGGTGGAGGCACCCTGG
ALDP 1-107	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGCCGGTGCTCTCCAGG
	3'	<i>Xho</i> I	CCTCGAGTCACAGGAAGGTGCGGCTCACC
ALDP 1-90	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGCCGGTGCTCTCCAGG
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACTCCCGCACAGGACCCG
ALDP 1-65	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGCCGGTGCTCTCCAGG
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCAGCCAGCTTTGGCCGCC
ALDP 1-58	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGCCGGTGCTCTCCAGG
	3'	<i>Xho</i> I	TTATCTCGAGTCAGGAGGCCTCCTGCGTGGG
ALDP 1-40	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGATGCCGGTGCTCTCCAGG
	3'	<i>Xho</i> I	TTATCTCGAGTCACAGGCACTGGCGCACCAAG
ALDP 67-203	5'	<i>Eco</i> RI	AATAGAATTCGGAGGCGGGATGAACCGGGTATTCTGCAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCAGGCCACCACGTCCTCCG
ALDP 90-203	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGGAGACGGGGCTGCTGGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCAGGCCACCACGTCCTCCG
ALDP 108-203	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGTATGTGGCCCGCTGGAC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCAGGCCACCACGTCCTCCG
ALDP 131-203	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGGCTGGCAGCTGCTGCAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCAGGCCACCACGTCCTCCG
ALDP 67-90	5'	<i>Eco</i> RI	AATAGAATTCGGAGGCGGGATGAACCGGGTATTCTGCAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACTCCCGCACAGGACCCG
ALDP 67-164	5'	<i>Eco</i> RI	AATAGAATTCGGAGGCGGGATGAACCGGGTATTCTGCAG
	3'	<i>Xho</i> I	TTATCTCGAGTCAGCTGCGGAACGACAGGGCC
PMP70 1-199	5'	<i>Eco</i> RI	AGAGAATTCGGAGGCGGAATGGCGGCCTTCAGCAAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCAACTGTTACAAAATTTTTCTACATCTTGTG
PMP70 1-83	5'	<i>Eco</i> RI	AGAGAATTCGGAGGCGGAATGGCGGCCTTCAGCAAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCATTTACAAAATGTTCTAGGGACCATG
PMP69 1-156	5'	<i>Eco</i> RI	AGAGAATTCGGAGGCGGAATGGCGGTCGCGGGG
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCACTGCCGCGAGAATCGC
PMP69 1-38	5'	<i>Eco</i> RI	AGAGAATTCGGAGGCGGAATGGCGGTCGCGGGG
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCATTGTGATGACCAAGAAGGAAAC
PEX19 7-295	5'	<i>Bam</i> HI	GGAGATCTGGGATCCTTGGAGGCGGCTGTAGTGTGGGGCCGAAGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACTGTTCAACCACTGGCACCTGG
PEX19 7-166	5'	<i>Bam</i> HI	GGAGATCTGGGATCCTTGGAGGCGGCTGTAGTGTGGGGCCGAAGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCAATCCCCTTCGTCCATGCCTAGC

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
PEX19 139-299	5'	<i>Eco</i> RI	GAGAATTCGGAGGCGGGGAATGCCACTGACCTTCAGAACTCC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACATGATCAGACACTGTTCAACCAC
Pxa-1 1-216	5'	<i>Bam</i> HI	AGAGGATCCTTGGAGGCGGCATGCAATTAGACAGTGGTGCAAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCACGCATCGCAAATTTTGC
Pxa-2 1-255	5'	<i>Bam</i> HI	AGAGGATCCTTGGAGGCGGCATAATGATCTCAACAGCTTCTGCA
	3'	<i>Xho</i> I	TCTCTCGAGTCAGTTCATTGAAAATGTGTAAATATCTTTTG

**Primer für mutierte ALD 67-164-Konstrukte in pEG202 (Templates: P. Landgraf)**

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
Δ80-82, R74W, R74G L78F, L81V, P84A	3'	<i>Eco</i> RI	AATAGAATTCGGAGGCGGGATGAACCGGGTATTCCTGCAG
	5'	<i>Xho</i> I	TTATCTCGAGTCAGCTGCGGAACGACAGGGCC
F71V	3'	<i>Eco</i> RI	AATAGAATTCGGAGGCGGGATGAACCGGGTAGTCTGCAG
	5'	<i>Xho</i> I	TTATCTCGAGTCAGCTGCGGAACGACAGGGCC
F71S	3'	<i>Eco</i> RI	AATAGAATTCGGAGGCGGGATGAACCGGGTAAGCCTGCAG
	5'	<i>Xho</i> I	TTATCTCGAGTCAGCTGCGGAACGACAGGGCC

**Primer für die Klonierung in pJG4-5 MCS**

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
PEX19 2-299	5'	<i>Bgl</i> II	AATAAGATCTGCCCGCGCTGAGGAAGGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACATGATCAGACACTGTTCAACCAC
C296S-PEX19 2-299	5'	<i>Bgl</i> II	AATAAGATCTGCCCGCGCTGAGGAAGGC
	3'	<i>Xho</i> I	TGTCTCGAGTCACATGATCAGACTCTGTTCAACC

**Primer für die Klonierung in pcDNA3**

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
PMP70	5'	<i>Bam</i> HI	AGAAGGATCCGCCATGGCGGCCTTCAGC
	3'	<i>Xho</i> I	TCTTCTCGAGCTCTAAGAGCCAAACTCAACTGTATC

**Primer für die Klonierung in pGEX-Hannover**

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
PEX19	5'	<i>Bam</i> HI	ACAGGATCCATGGCCGCGCTGAGGAAG
	3'	<i>Xho</i> I	TCCTCGAGTCACATGATCAGACACTGTTCAACCAC
C296-PEX19	5'	<i>Bam</i> HI	ACAGGATCCATGGCCGCGCTGAGGAAG
	3'	<i>Xho</i> I	TGTCTCGAGTCACATGATCAGACTCTGTTCAACC

**Primer für die Klonierung in pFRED143**

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
ALDP 67-164	5'	<i>Nhe</i> I	AATAGCTAGCGCATGAACCGGGTATTCCTGC
	3'	<i>Nhe</i> I	TTATGCTAGCGCTGCGGAACGACAGGGCC
ALDP 90-164	5'	<i>Nhe</i> I	AATAGCTAGCGAGACGCGGGCTGCTGGC
	3'	<i>Nhe</i> I	TTATGCTAGCGCTGCGGAACGACAGGGCC
ALDP 110-164	5'	<i>Nhe</i> I	AATAGCTAGCTATGTGGCCCGCCTGGACG
	3'	<i>Nhe</i> I	TTATGCTAGCGCTGCGGAACGACAGGGCC



**Primer für die Klonierung von PEX19-ALDP90-164 in pFRED143 (über pcDNA3)**

Konstrukt	Richtung	REN	Primer
PEX19	5'	<i>Bam</i> HI , <i>Nhe</i> I	AATAGGATCCGCTAGCATGGCCGCCGCTGAGG
	3'	<i>Not</i> I	TTATGCGGCCCGCCATGATCAGACACTGTTACCAC
ALDP 90-194	5'	<i>Not</i> I	TTATGCGGCCCGCGGAGACGGGGCTGCTGGC
	3'	<i>Xba</i> I , <i>Nhe</i> I	TTATTCTAGAGCTAGCGCTGCGGAACGACAGGGCC

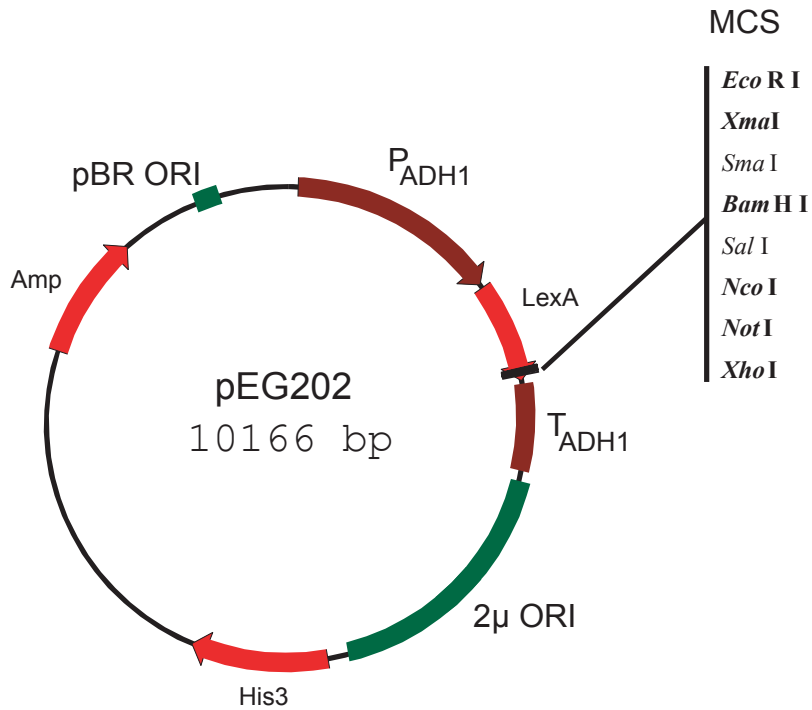
**Primer zur Konstruktion der MCS für pJG4-5**

sense       AATTCAGATCTCCCGGGCCGCGGCCATGGGCTAGCATCGATAGGCCTC  
antisense   TCGAGAGGCCTATCGATGCTAGCCCATGGCCGCGGCCCGGAGATCTG

**Vektorprimer für PCR und Sequenzierung**

Vektor	Richtung	Primer
pEG202	5'	ATTGAAGGGCTGGCGGTTGG
	3'	GCCCGGAATTAGCTTGGCTG
pJG4-5	5'	GATGCCTCCTACCCTTATGATGTGCC
	3'	GGAGACTTGACCAAACCTCTGGCG
pGEXΔ <i>Bam</i> .HI	5'	GCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
	3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAG
pcDNA3	5'	GCGGTAGGCGTGTACGGTGGG
	3'	GGCAAACAACAGATGGCTGGC
pFRED143	5'	GAAGACACCGGGACCGATCC
	3'	TCGACCAGGATGGGCACC

## pEG202



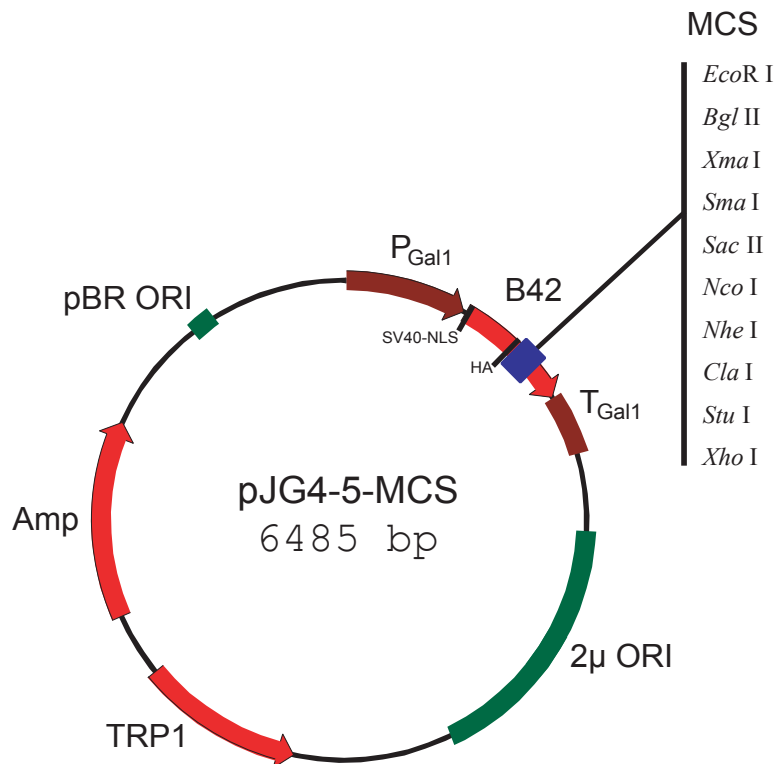
### MCS

```

                                     XmaI
                                     ~~~~~
                                     SmaI
                                     ~~~~~
                                     SalI           NotI           SalI
                                     ~~~~~           ~~~~~           ~~~~~
                                     EcoRI           BamHI           NcoI           XhoI
                                     ~~~~~           ~~~~~           ~~~~~           ~~~~~
A   E   L   ~~~~~           ~~~~~           ~~~~~           ~~~~~
GCA GAG CTG GAA TTC CCG GGG ATC CGT CGA CCA TGG CGG CCG CTC GAG TCG AC
CGT CTC GAC CTT AAG GGC CCC TAG GCA GCT GGT ACC GCC GGC GAG CTC AGC TG

```

## pJG4-5-MCS<sup>1</sup>



**MCS**

	<i>EcoRI</i>	<i>BglIII</i>	<i>SmaI</i>	<i>SacII</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>ClaI</i>	<i>StuI</i>	<i>XhoI</i>
A	G	A	A	A	A	A	A	A	A
S	A	A	A	A	A	A	A	A	A
P	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	CCG	CTT	AAG	TCT	AGA	GGG	CCC	GCC	GGC
	GCC	TCT	CCC	GGG	CCG	CGG	CCA	TGG	GCT
	AGC	ATC	GAT	AGG	CCT	CTC	GAG	CGG	AGA
	GGG	CTT	AAG	TCT	AGA	GGG	CCC	GCC	GGC

<sup>1</sup>Die Multiple Cloning-Site wurde in dieser Arbeit eingefügt. Der Originalvektor verfügt nur über die Klonierungsstellen *EcoRI* bzw. *XhoI*.

## Klonierung von PEX19-ALD 90-164

