

5 Zusammenfassung

Identifizierung

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung des ursprünglichen reversen genetischen Ansatzes zur Identifizierung peroxisomaler Proteine 78 Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert und dabei 59 verschiedene Proteine identifiziert. Neunzehn der Proteine erwiesen sich als peroxisomal, darunter auch die neu identifizierten Proteine Eci1p (Enoyl-CoA Isomerase), Dci1p (Dienoyl-CoA Isomerase), welchen eine akzessorische Funktion beim Abbau ungesättigter Fettsäuren zukommt, und die peroxisomale Thioesterase Tes1p. Für elf weitere Proteine dieses Ansatzes konnte eine potentielle peroxisomale Lokalisation angenommen werden. Im Rahmen dieser Studie wurde ein zweiter, modifizierter Ansatz zur Analyse des peroxisomalen Proteoms etabliert, der auf dem kombinatorischen Einsatz von 1D-SDS-Gelelektrophorese und MALDI-MS und LC-ESI-MS basierte. Hierbei konnten 66 Proteine identifiziert werden, darunter befanden sich 25 peroxisomale. 17 Proteine, deren Lokalisation in der Zelle noch nicht festgestellt worden war, wurden daraufhin untersucht.

Funktionsanalyse

Die subzelluläre Lokalisation unbekannter Proteine wurde mit Hilfe von Doppel-Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von GFP-Fusionsproteinen in Verbindung mit einem rot-fluoreszierenden peroxisomalen Markerprotein (PTS2DsRed) und Zellfraktionierungsanalysen untersucht. Zur Klärung der potentiellen peroxisomalen Funktion eines neuen Proteins, wurde das Wachstum der entsprechenden Deletionsmutante auf verschiedenen Kohlenstoffquellen analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass **Yor084wp** eine ölsäureinduzierbare, potentielle peroxisomale Lipase/Esterase ist, die Pex5p-abhängig in die Peroxisomenmatrix importiert wird. Die Deletion des entsprechenden Gens hat keinen Einfluss auf die Degradation von Fettsäuren. Die potentielle 2-Hydroxyphytanoyl-CoA-Lyase **Yel020cp** kann zu den peroxisomalen Matrixproteinen gezählt werden, die Pex5p-abhängig importiert werden. Sie verfügt außerdem über eine Thiamin-Diphosphat-Bindestelle. Für die Biogenese von Peroxisomen ist das Protein nicht essentiell. **Ygl184cp** ist eine mögliche Cystathionin- β -Lyase und konnte in dieser Arbeit in der Membran von Peroxisomen nachgewiesen werden. Für die Biogenese der Organellen wird dieses Protein nicht benötigt. **Yir034cp** ist ein peroxisomales Matrixprotein, das aufgrund seiner PTS1-Sequenz in die Organellen gelangt. Seine Rolle in der Biosynthese des Lysins führte zu der Hypothese, dass dieser Aminosäurestoffwechsel in Hefe in Peroxisomen stattfindet. Für die Acetyl-CoA-Hydrolase **Ybl015wp** konnte gezeigt werden, dass sie aufgrund ihrer potentiellen N-terminalen

peroxisomalen (PTS2) als auch mitochondrialen Zielsteuerungssequenz (MTS) in beide Organellen importiert wird. **Ycr091wp** wurde ebenfalls in diesen beiden Organellen nachgewiesen und sorgt dort als potentielle Serin/Threonin-Kinase vermutlich für entsprechende posttranslationale Modifikationen. Die mitochondriale Lokalisation des unbekanntes Proteins **Yor228cp** konnte gezeigt werden. Computergestützte Analysen weisen außerdem auf drei transmembrane Bereiche hin, so dass es sich um ein mitochondriales Membranprotein handeln könnte. Der Succinat-Fumarat-Transporter **Sfc1p/Yjr095wp** gehört zur Familie der mitochondrialen Transporter, der auch peroxisomale Proteine angehören. Eine zusätzliche peroxisomale Lokalisation konnte für dieses Protein nicht bestimmt werden. Das unbekanntes **Yhr199cp** wurde ebenfalls in den Mitochondrien detektiert, die zelluläre Funktion bleibt allerdings unbekannt. Die vermutete peroxisomale Lokalisation des **Yal054cp** konnte nicht bestätigt werden. Dagegen wurde eine mikrosomale Lokalisation vermutet. Für weitere **22** untersuchte Proteine konnte ebenfalls keine peroxisomale Lokalisation festgestellt werden, so dass diese Proteine als Kontaminationen bei der Isolierung peroxisomaler Proteine betrachtet werden müssen.

Pex11

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels elektrophysiologischer Messungen nicht nachgewiesen werden, ob Pex11p einen spannungsgesteuerten Kanal in der Peroxisomenmembran bildet. ScPex11p wurde in Form eines TAP-Fusionsproteins erfolgreich exprimiert und kann so zur affinitätschromatographischen Isolierung und weiterführenden Funktionsanalysen verwendet werden.