

Identyfikacja sekwencji aminokwasowych kierujących białka do peroksysomów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*
Identification of amino acid sequences directing proteins to peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* yeast

Thesis Supervisor: Dr hab. Marek Skoneczny

Reviewers: Prof. dr hab. Renata Zadrąg-Tęcza

Dr hab. Anna Bielak-Żmijewska

Research performed at the Department of Genetics, IBB PAS. The financial support provided by Polish National Science Center grant no.: 2013/08/M/NZ3/01028

Streszczenie

Peroksysomy są organellami pozbawionymi własnego DNA i aparatu syntezy białek. Import białek do peroksysomów zależny jest od sygnałów skierowujących, zakodowanych w ich sekwencji aminokwasowej. Istnieją dwa dobrze poznane sygnały skierowujące białka do wnętrza peroksysomów, PTS1 rozpoznawany przez białko receptorowe Pex5p za pośrednictwem domeny tetratrikopeptydowej (TPR) i PTS2, rozpoznawany za pomocą domeny WD-40 receptora Pex7p. Do peroksysomów transportowane są także białka, które w *Saccharomyces cerevisiae* albo nie posiadają żadnego z wymienionych wyżej sygnałów, (najbardziej znanym jest oksydaza acylo-CoA, AOx, kodowana przez gen *POX1*) albo posiadają sygnał PTS1, ale nie jest on konieczny do importu (acetylotransferaza karnitynowa, Cat2p, kodowana przez gen *CAT2*). Oba te białka oddziałują z N-końcowym rejonem receptora Pex5p, nieobejmującym domeny TPR rozpoznającej sygnał PTS1 i oddziaływanie to jest kluczowe dla importu AOx i Cat2p. Znane są podstawienia reszt aminokwasowych w N-końcowej części Pex5p, które niszczą oddziaływanie zarówno z AOx jak i Cat2p. W niniejszej pracy doktorskiej zidentyfikowano reszty aminokwasowe w AOx, które ważne są dla oddziaływania tego białka z N-końcowym rejonem receptora Pex5p i pokazano, że niektóre z nich są również ważne dla importu AOx do peroksysomów *in vivo*. Umiejscowienie przestrzenne tych reszt aminokwasowych w cząsteczce AOx, wykonane przy zastosowaniu modelowania struktury trzeciorzędowej tego białka, pozwoliło na wysunięcie hipotezy, że hipotetyczny sygnał PTS3, na który składają się wytypowane reszty aminokwasowe ma charakter rozproszony. W niniejszej pracy udowodniono ponadto, że Fox2p, wielofunkcyjny enzym szlaku β -oksydacji kwasów tłuszczowych, jest kolejnym białkiem *S. cerevisiae*, poza AOx i Cat2p, które oddziałuje z N-końcowym rejonem receptora Pex5p. Fox2p posiada sygnał PTS1, jednak, podobnie jak w przypadku Cat2p może oddziaływać z receptorem Pex5p niezależnie od tego sygnału i rozpoznającej go domeny TPR. Wykazano również, że do importu Fox2p do peroksysomów *in vivo* sygnał PTS1 nie

jest bezwzględnie konieczny, a zatem prawdopodobnie Fox2p jest jeszcze jednym białkiem *S. cerevisiae*, które posiada dodatkowy nieznan jeszcze, wewnętrzny sygnał PTS3, kierujący ten enzym do peroksysomów. Ustalenia te stanowią podstawę do rozszerzenia obowiązującego modelu importu białek do wnętrza peroksysomów w drożdżach *S. cerevisiae*. Są również punktem wyjścia do studiów nad importem białek peroksysomalnych nieposiadających ani PTS1 ani PTS2, w innych organizmach.

Summary

Peroxisomes are organelles that contain neither their own DNA nor protein synthesis apparatus. Import of proteins to peroxisomes depends on targeting signals, encoded within their amino acid sequences. There are two well characterized signals, targeting proteins into peroximal lumen. PTS1 is recognized by Pex5p receptor *via* its tetratricopeptide (TPR) domain and PTS2 is recognized by Pex7p receptor by its WD-40 domain. Nevertheless, some of the proteins transported to peroxisomes do not contain any of these signals. Well known example of such proteins is *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA oxidase, AOX, encoded by *POX1*. What is more, some proteins possess PTS1, but do not need it to be imported to peroxisomes, such as carnitine acetyltransferase, Cat2p, encoded by *CAT2*. Both proteins interact with N-terminal region of Pex5p receptor, outside of its TPR region recognizing PTS1 and this interaction is crucial for their import. Within N-terminal region of Pex5p, specific amino acid substitutions are known to abolish the interaction with both AOX and Cat2p. In this doctoral thesis, AOX amino acids crucial for interaction with N-terminal region of Pex5p were characterized, and it was proved that some of them are important for transport of AOX to peroxisomes *in vivo* as well. Spatial localization of these amino acid residues within AOX polypeptide done by modelling the tertiary structure of this protein, enabled to hypothesise that PTS3 signal, consisting of these amino acids, has a distributed, rather than linear, nature. It was also shown that the multifunctional enzyme of fatty acid β -oxidation pathway, Fox2p, is another *S. cerevisiae* protein, which, besides AOX and Cat2p, interacts with N-terminal region of Pex5p. Even though Fox2p contains PTS1, its interaction with Pex5p, similarly to Cat2p, occurs independently of this signal and of the TPR domain within Pex5p that recognizes it. It was also proved that Fox2p is transported to peroxisomes *in vivo* without the functional PTS1 signal. Therefore Fox2p is probably yet another *S. cerevisiae* protein that contains an additional, internal PTS3 signal targeting this enzyme to peroxisomes. These findings are the basis for extending the current model of protein import to the peroxisomal matrix in yeast *S. cerevisiae*. They are also the starting point for studies on the import of peroxisomal proteins in other organisms that do not have either PTS1 or PTS2.

Barbara Kempinski