

# 1 Einleitung

Eine Kompartimentierung ermöglicht die Trennung komplexer biochemischer Prozesse in einzelne Reaktionsräume mit unterschiedlichem chemischen Milieu, wodurch ein Fortschritt der Eukaryotenzelle gegenüber den Prokaryotenzellen erzielt wird. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Funktion verfügen Organellen wie Nukleus, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Vakuole, Mitochondrien, Chloroplasten und auch die Peroxisomen über eine spezifisch auf das jeweilige Organell abgestimmte Ausstattung an Membran- und Matrixproteinen. Unter diesem Aspekt sind die Biogenese und die Erhaltung der Organellen mit dem dazu gehörigen Proteinimport von besonderer Bedeutung für jede Zelle.

## 1.1 Peroxisomen

Peroxisomen wurden zuerst von (DeDuve und Baudhuin, 1966) als solche bezeichnet. In der Rattenleber wurden sie als neue Organellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Katalasen und Oxidasen nachgewiesen (Lazarow, 1985). Zunächst wurden Peroxisomen in der Forschung wenig beachtet, obwohl es sich um ubiquitär vorkommende Organellen handelt (Lazarow, 1985). Erst durch die Entdeckung einer gestörten Funktion der Peroxisomen als Ursache einiger genetisch bedingter humaner Krankheiten erwachte das Interesse an ihrer Rolle innerhalb des eukaryotischen Organismus (Goldfischer *et al.*, 1973).

Nach der rein morphologischen Definition gehören Peroxisomen der funktionell heterogenen Gruppe der Microbodies an. Zu den Peroxisomen zählen auch die Glyoxysomen höherer Pflanzen (Breidenbach und Beevers, 1967) und die Glycosomen von Trypanosomen (Opperdoes, 1977). Peroxisomen sind durch eine einfache Lipidmembran begrenzte Organellen und enthalten weder eigene Ribosomen noch DNA.

Bedingt durch ihre funktionelle Variabilität (Opperdoes, 1988) nehmen sie eine Sonderstellung innerhalb der Zellorganellen ein. Biochemische Analysen ergaben eine neuartige Heterogenität ihrer enzymatischen Zusammensetzung in Abhängigkeit vom Zell- und Gewebetyp sowie dem Entwicklungszustand und dem Substratangebot, weshalb sie auch als „multifunktionelle“ Organellen bezeichnet werden. Dabei unterscheiden sie sich in Abhängigkeit vom Organismus, Zelltyp und exogenen Faktoren in Größe, Anzahl und Proteingehalt (Geraghty *et al.*, 1999; Subramani, 1993; Wanders und Tager, 1998).

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Peroxisomen ist die Induzierbarkeit von Proliferation und Metabolismus (Veenhuis *et al.*, 1987).

In Säugetierzellen sind sie z.B. an der Plasmalogensynthese (Hajra und Bishop, 1982), der Gallensäure- und Cholesterinbiosynthese (Biardi und Krisans, 1996; Krisans, 1996), dem Prostaglandin-Stoffwechsel (Schepers *et al.*, 1988) sowie dem Polyamin- und Purin-Metabolismus (Takada, 1986) und bei niederen Pilzen beispielsweise an der Penicillinbiosynthese (Müller, 1991) beteiligt.

Trotz unterschiedlicher Stoffwechselfunktionen sind alle Peroxisomen zur  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren befähigt. Im Gegensatz zu pflanzlichen und tierischen Mikroorganismen verfügen tierische Zellen außerdem über ein mitochondriales  $\beta$ -Oxidationssystem, welches konstitutiv ist und sich damit grundlegend von dem peroxisomalen System unterscheidet.

Erste Komponenten von Peroxisomen wurden hauptsächlich durch Studien an von Patienten gewonnenen Gewebeproben isoliert. Anschließend kamen CHO-Zelllinien (*chinese hamster ovary*) hinzu. Eine besondere Rolle bei der Erforschung peroxisomaler Proteine spielt die Hefe als Modellorganismus (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris*). Der Vorteil gegenüber Fibroblastenzelllinien besteht in der geringeren Genomgröße, in der kürzeren Generationszeit und in der leichten genetischen Manipulierbarkeit dieser Einzeller. Aufgrund der phylogenetischen Konservierung der Peroxisomen-Biogenese ist dabei die Übertragbarkeit der Ergebnisse weitgehend gegeben.

Zum Wachstum auf bestimmten Kohlenstoffquellen wie Fettsäure oder Ethanol benötigt die Hefe funktionelle Peroxisomen. Während diese für Wachstum auf Glukose als Kohlenstoffquelle verzichtbar sind (Erdmann *et al.*, 1989). Anhand dieser Gegebenheit konnten in verschiedenen genetischen Ansätzen zahlreiche peroxisomale Membranproteine isoliert werden (Erdmann *et al.*, 1989; Subramani, 1998; Terlecky *et al.*, 1996), die nicht mehr in der Lage waren, Fettsäure zu verstoffwechseln und somit durch einen Wachstumsdefekt auf Ölsäuremedium (*onu*-Mutante, *oleate non utilizing*) auffielen. Weitere, ähnliche oder modifizierte Methoden zur gerichteten Suche nach Mutanten wurden in den Hefen *S.cerevisiae* (Elgersma *et al.*, 1993; Van der Leij *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993), *Hansenula polymorpha* (Cregg *et al.*, 1990), *Pichia pastoris* (Gould *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992) und *Yarrowia lipolytica* (Nuttley *et al.*, 1993) eingesetzt.

## 1.2 Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen

Die Genese, Teilung und Vererbung von Peroxisomen erfolgt durch die Regulation von mindestens 23 Peroxinen, welche von den *PEX*-Genen des Zellkerns kodiert werden. Die Bedeutung der Peroxisomen innerhalb des Metabolismus wird besonders deutlich durch das Auftreten genetisch bedingter, peroxisomaler Biogenesestörungen (PBDs, *peroxisomal biogenesis disorders*), welche durch die Beeinträchtigung einer oder mehrerer peroxisomaler Funktionen hervorgerufen werden. Die klinischen Befunde werden dabei in drei Gruppen unterteilt (Fujiki *et al.*, 2000; Gould und Valle, 2000; Wanders *et al.*, 1995): In die Gruppe I fallen Erkrankungen, die durch einen generellen Funktionsverlust der Peroxisomen hervorgerufen werden, wie z.B. die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), das Zellweger Syndrom (ZS) oder die infantile Refsum'sche Krankheit (IRD) (Braverman *et al.*, 1995; Lazarow und Moser, 1995; Moser *et al.*, 1995; Powers und Moser, 1998). In der Gruppe II liegt ein partieller Importdefekt peroxisomaler Matrixproteine vor, wie es beispielsweise bei der rhizomelen Chondrodysplasia punctata (RCDP) der Fall ist. Krankheiten der Gruppe III werden auf singuläre Enzymdefekte zurückgeführt.

## 1.3 Isolierung von Mutanten mit Defekten in der peroxisomalen Biogenese

Positive und negative Selektionen resultierten in einer großen Zahl an *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten, die einen Defekt in der Biogenese von Peroxisomen aufweisen. Es handelt sich hierbei um die sogenannten *pex*-Mutanten (*peroxisome assembly*) (Elgersma *et al.*, 1993; Erdmann *et al.*, 1989; Van der Leij *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993). *Pex*-Mutanten konnten auch in *Hansenula polymorpha* (Cregg *et al.*, 1990), *Pichia pastoris* (Gould *et al.*, 1992, Liu, 1995 #614) und *Yarrowia lipolytica* (Nuttley, 1995) identifiziert werden. Bei höheren Eukaryoten verlief die Suche nach *pex*-Mutanten ebenfalls erfolgreich. So konnten diese beispielsweise bei CHO-Zellen identifiziert werden (Tsukamoto *et al.*, 1990; Zoeller *et al.*, 1989; Zoeller und Raetz, 1986). Durch eine anschließende Komplementation war es möglich, eine große Anzahl von *PEX*-Genen zu identifizieren und deren Genprodukte, die Peroxine, zu charakterisieren. Das erste Peroxin aus *S. cerevisiae* wurde im Jahre 1991 beschrieben (Erdmann *et al.*, 1991). Neben dem direkten genetischen Weg wurden auch über den reversen genetischen Ansatz Peroxine gefunden, was anhand der Bestimmung der Identität von HPLC-gereinigten, peroxisomalen Proteinen erfolgte (Erdmann und Blobel, 1995; Erdmann und Blobel, 1996; Schäfer *et al.*, 2001). Auf diesem Wege konnten über 30

peroxisomale Proteine identifiziert werden, die sowohl an der Biogenese der Peroxisomen als auch an der  $\beta$ -Oxidation (Henke *et al.*, 1998) beteiligt sind; so unter anderem auch Pex13p (Erdmann und Blobel, 1996). Anhand massenspektroskopischer Analysen gelang die Identifizierung weiterer peroxisomaler Proteine (Geisbrecht *et al.*, 1999; Geisbrecht *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999; Schäfer *et al.*, 2001). Ein anderer Ansatz wurde bei der Identifizierung von Pex18p und Pex21p verfolgt. Hierbei wurden Two-Hybrid-Genbanken auf eine Interaktion mit *PEX7* getestet, wodurch es gelang, Pex18p und Pex21p zu identifizieren (Purdue *et al.*, 1998). Die Identifizierung orthologer humaner Gene erfolgte aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu Genen aus der Hefe bzw. Ratten. Dies erfolgte mittels der Nukleinsäure-Hybridisierungstechnik (Fukuda *et al.*, 1996; Shimosawa *et al.*, 1992) bzw. durch den Vergleich von Aminosäure-Sequenzen von „*expressed sequence tags*“ mit Datenbanken. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der bisher identifizierten *PEX*-Gene und deren Charakteristika verändert nach Subramani (1998).

Gen	Peroxin-Charakteristika	Org.	Referenz
PEX1	ATPase der AAA-Familie	Sc Pp Hs	(Erdmann et al., 1991) (Heyman et al., 1994) (Portsteffen, 1997; Reuber et al., 1997)
PEX2	Zink-bindendes IPMP mit C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> -Motiv	Rn Hs Pp Sc	(Tsukamoto, 1991) (Shimozawa et al., 1992) (Waterham, 1996) (Erdmann and Kunau, 1992)
PEX3	IPMP	Sc Hp Pp Hs	(Höhfeld et al., 1991) (Baerends et al., 1996) (Wiemer et al., 1996) (Kammerer, 1998)
PEX4	Peroxisomen assoziiertes Ubiquitin-konjugierendes Enzym	Sc Pp Hp	(Wiebel, 1992) (Crane et al., 1994) (van der Klei et al., 1998)
PEX5	PTS1-Rezeptor, 7 TPR-Motive, im Cytoplasma und an Peroxisomen lokalisiert	Pp Sc Hs Hp Yl	(McCollum et al., 1993) (Van der Leij et al., 1993) (Dodt et al., 1995; Fransen et al., 1998; Wiemer et al., 1995a) (Nuttley, 1995; van der Klei, 1995) (Szilard et al., 1995)
PEX6	ATPase der AAA-Familie	Pp Sc Yl Rn Hs	(Spong and Subramani, 1993) (Voornt-Brouwer et al., 1993) (Nuttley, 1994) (Tsukamoto et al., 1995) (Yahraus et al., 1996)
PEX7	PTS2-Rezeptor, 6 WD 40-Motive, im Cytoplasma und an Peroxisomen lokalisiert	Sc Hs Pp	(Marzioch et al., 1994) (Braverman et al., 1997; Motley et al., 1997; Purdue et al., 1997) (Elgersma et al., 1998)
PEX8	Peripheres PMP mit PTS1- und/oder PTS2-Signalsequenz	Hp Pp Yl Sc	(Waterham et al., 1994) (Liu et al., 1995) (Liu et al., 1995) (Erdmann and Kunau, 1992)
PEX9	IPMP	Yl	(Eitzen, 1995)
PEX10	Zink-bindendes IPMP mit C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> -Motiv	Hp Pp Hs Sc	(Tan, 1995) (Kalish et al., 1995) (Warren et al., 1998) (Erdmann and Kunau, 1992)
PEX11	IPMP	Sc Hs	(Erdmann and Blobel, 1995) (Abe, 1998)
PEX12	Zink-bindendes IPMP mit C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> -Motiv	Pp Hs Sc	(Kalish et al., 1996) (Chang et al., 1997) (Erdmann and Kunau, 1992)
PEX13	IPMP mit C-terminaler SH3-Domäne, die Pex5p und Pex14p bindet	Sc Pp Hs	(Elgersma et al., 1996a; Erdmann and Blobel, 1996) (Gould et al., 1996) (Gould et al., 1996)
PEX14	PMP, Klasse II-Bindemotiv für SH3-Liganden, 'Coiled Coil'-Region, Hefeprotein bindet Pex5p, Pex7p, Pex13p, Pex14p und Pex17p	Hp Sc Hs	(Komori, 1997) (Albertini et al., 1997; Brocard et al., 1997) (Fransen et al., 1998)
PEX15	IPMP, phosphoryliert und glykosyliert	Sc	(Elgersma et al., 1997)
PEX16	PMP	Yl Hs	(Eitzen, 1997) (South and Gould, 1999)
PEX17	Peripheres PMP, bindet Pex14p	Sc	(Huhse et al., 1998)
PEX18	Überwiegend cytosolisches Protein, bindet Pex7p	Sc	(Purdue et al., 1998)
PEX19	Peroxisomen assoziiert, farnesyliert, bindet Pex3p	Hs Sc	(Braun, 1994) (Götte et al., 1998)
PEX20	Cytosolisch, Dimerisierung von Fox3p	Yl	(Titorenko et al., 1998)
PEX21	Bindet Pex7p	Sc	(Purdue et al., 1998)
PEX22	enthält ein mPTS in den ersten 20 Aminosäuren, interagiert mit Pex4p	Pp	(Koller et al., 1999)
PEX23	beteiligt am Import von Matrixproteinen	Yl	(Brown et al., 2000)

**Abkürzungen:** Org., Organismus; IPMP, integrales peroxisomales Membranprotein; PMP, peroxisomales Membranprotein; Hs, *Homo sapiens*; Pp, *Pichia pastoris*; Rn, *Rattus norvegicus*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Yl, *Yarrowia lipolytica*

Bereits in der Tabelle wird deutlich, dass in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an Peroxinen gefunden wurden. Zu ihrer Funktion ist jedoch bislang nicht sehr viel bekannt. Zwei grundlegende Fragen bezüglich der Biogenese von Peroxisomen stehen bis heute noch immer offen:

Wie entstehen Peroxisomen?

Wie gelangen Matrixproteine in die Peroxisomen?

Aus diesem Grund wird in Zukunft vor allem die Analyse dieser Fragen und somit auch die Aufklärung der Funktion der Peroxine im Vordergrund stehen.

## 1.4 Biogenese von Peroxisomen

Im Laufe der Jahre hat sich die Vorstellung zur Biogenese der Peroxisomen mehrfach gewandelt. Im ältesten Modell wurde aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen die Hypothese aufgestellt, dass Peroxisomen durch Abknospung vom endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen (DeDuve und Baudhuin, 1966). Später wurde von Lazarow und Fujiki (Lazarow, 1985) ein Modell postuliert, welches als „Wachstum- und Teilungs-Modell“ bezeichnet wurde. Hierbei kommt es durch den Import von Proteinen zum Wachstum der Peroxisomen, welche sich nach Erreichen einer kritischen Größe teilen. Diese Vorstellung setzt voraus, dass in jeder Zelle mindestens ein Peroxisom enthalten ist und dass diese somit nicht *de novo* entstehen können.

Einen weiteren Hinweis für das Modell der Reifung wurde von Heinemann und Just (1992) erbracht. Hierbei werden neu synthetisierte peroxisomale Proteine hauptsächlich in kleine Präperoxisomen, die sich durch eine niedere bis mittlere Dichte auszeichnen, importiert. Diese reifen dann zu größeren Peroxisomen mit höherer Dichte. In dem anschließenden Teilungsprozess nimmt das peroxisomale Membranprotein Pex11p eine besondere Stellung ein. Dabei ist es selbst weder in der Lage, peroxisomale Matrixproteine zu importieren, noch ist es an der Bildung der Membran beteiligt. Jedoch scheint Pex11p in unterschiedlichen Organismen eine zur Teilung stimulierende Funktion einzunehmen (Erdmann und Blobel, 1995; Li *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 1995; Passreiter *et al.*, 1998; Schrader *et al.*, 1998).

Das Modell von „Wachstum und Teilung“ wurde jedoch in der Vergangenheit immer häufiger in Frage gestellt. Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die zeigen sollten, dass Vesikel, die vom ER oder anderen Endomembranen stammen, an der Bildung von Peroxisomen beteiligt sind. Dies wäre dann ein Hinweis für eine *de novo* Synthese von Peroxisomen. Ein experimenteller Ansatz war die Studie an *pex19Δ*-Zellen aus *S.cerevisiae*, in denen keine morphologisch detektierbaren Peroxisomen vorhanden waren (Götte *et al.*, 1998). Ein

weiterer Hinweis für einen Biogeneseweg ohne zuvor existierende Peroxisomen war die Beobachtung, dass die Expression von Pex19p, Pex3p und Pex16p in den entsprechenden Mutanten zur Neogenese von Peroxisomen führte (Götte *et al.*, 1998; Matsuzono *et al.*, 1999; South und Gould, 1999). Über die genaue Bildung der Peroxisomen gibt es noch keinen eindeutigen Hinweis, aber die Beteiligung des ER kann dabei nicht ausgeschlossen werden (Elgersma *et al.*, 1997). Kritiker dieser Hypothese führen die beobachtete Beteiligung des ER auf eine Artefakt-Bildung aufgrund der Überexpression von Pex15p zurück (Hetteema *et al.*, 2000). Andererseits konnte eine Neogenese in Zelllinien von PBD-Patienten, die überhaupt keine peroxisomale Membran mehr aufwiesen, gezeigt werden. Anschließende Komplementationsstudien ergaben, dass solch ein Phänotyp nur durch eine Mutation in den Genen *PEX3*, *PEX16* oder in *PEX19* hervorgerufen werden kann (Matsuzono *et al.*, 1999; Shimozawa *et al.*, 1998; South und Gould, 1999; South *et al.*, 2000). In einer Biogenesestudie in *S. cerevisiae* konnte jedoch gezeigt werden, dass nur Pex3p und Pex19p zur Synthese der peroxisomalen Membran erforderlich sind, wobei zu berücksichtigen ist, dass bislang kein zu Pex16p homologes Protein in *S.cerevisiae* identifiziert werden konnte. Offen bleibt die Frage nach dem Verbleib der peroxisomalen Membranproteine (PMP) in den Mutanten *pex3Δ*, *pex16Δ* und *pex19Δ*. Es konnte bisher lediglich gezeigt werden, dass in den entsprechenden Zellen die Anzahl an PMP verringert war, was eventuell auf eine erhöhte Proteolyse zurückzuführen ist (Kinoshita *et al.*, 1998), oder aber, dass die PMP fehllokalisiert im Mitochondrium anzufinden waren (Okumoto *et al.*, 1998; South *et al.*, 2000). Da in Zellen, denen *PEX3*, *PEX16* oder *PEX19* fehlt, keine peroxisomalen Membranen nachgewiesen werden können, kann daraus geschlossen werden, dass diese drei Proteine eine essentielle Rolle in der Biogenese der peroxisomalen Membran innehaben. Von diesen ist Pex19p das bislang am besten untersuchte Protein. Es ist überwiegend cytosolisch, ein geringer Anteil liegt jedoch auch an der peroxisomalen Membran vor. Dabei handelt es sich um den *in vivo* farnesylierten Anteil von Pex19p (Götte *et al.*, 1998). Anhand von Two-Hybrid Studien konnte gezeigt werden, dass Pex19p an etliche PMP bindet, vor allem an diejenigen Bereiche der PMP, welche die Information für das Targeting dieser Proteine an die peroxisomale Membran tragen.

Eine Fusion von Pex19p mit einem Kernlokalisierungssignal zeigt eine Anreicherung von neusynthetisierten PMP im Nucleoplasma. Dies deutet auf eine Funktion als Rezeptormolekül für PMP hin (Sacksteder *et al.*, 2000). Über Pex3p und Pex16p ist mittlerweile bekannt, dass sie in der Lage sind, eine Interaktion mit Pex19p einzugehen (Götte *et al.*, 1998; Sacksteder *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 1999a). Es wird jedoch vermutet, dass diese beiden Proteine eher eine Rolle als Pex19p-Rezeptoren spielen. Ein alternatives Modell bietet die Vorstellung, dass das Targeting unabhängig von der Bindung abläuft.

Anhand dieser Beobachtung kann zusammenfassend ein Modell postuliert werden, welches zwei sich ergänzende Wege für die Biogenese der peroxisomalen Membran darstellt:

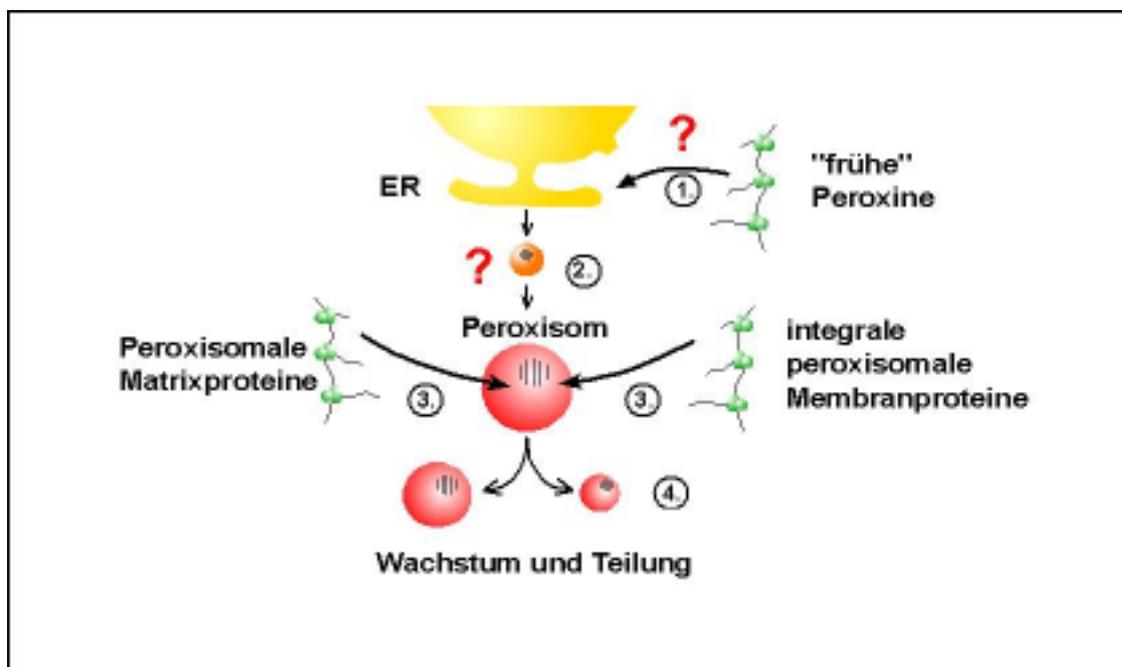


Abb. 1.1. Modell der Peroxisomen-Biogenese. Die Topogenese der peroxisomalen Matrix- und Membranproteine erfolgt durch verschiedene Transportmechanismen. (1) Eine Gruppe von PMP sind an der frühen Phase der Peroxisomen Biogenese beteiligt („frühe Peroxine“). Von ihnen wird angenommen, dass sie in Endomembranen inserieren, eventuell ins ER. (2) Vesikel, welche die PMP enthalten, knospen vom ER ab und fusionieren mit den Peroxisomen oder reifen zu Peroxisomen. (3) Peroxisomale Matrixproteine und andere PMP werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und posttranslational in Peroxisomen importiert. (4) Um neue Peroxisomen entstehen zu lassen, wachsen die Peroxisomen und teilen sich.

Dabei wird zum einen von der Bildung peroxisomaler Vesikel, vermittelt von Pex3p und Pex19p (in *Homo sapiens* auch von Pex16p) ausgegangen. Der Ursprung dieser Vesikel liegt vermutlich in einem präperoxisomalen Kompartiment, das auch als Protoperoxisom bezeichnet wird und dessen Existenz noch immer sehr umstritten ist [Purdue, 2001 #560]. Die alternative Variante innerhalb des Modells geht von bereits existierenden Peroxisomen aus, welche durch den Einbau von PMP und Lipiden sowie durch den Import von Matrixproteinen wachsen und sich anschließend teilen. Die Teilung des Organells erfolgt durch eine bislang noch nicht näher verstandene Induktion von Pex11p. Mit diesem Zwei-Wege-Modell zur peroxisomalen Biogenese lässt sich eine Vielzahl der gefundenen Beobachtungen der vergangenen Jahre erklären. Das Modell ist jedoch nicht mit den von Titorenko durchgeführten Studien über eine Vesikelfusion in Peroxisomen aus *Y. lipolytica* in Einklang zu bringen (Titorenko *et al.*, 2000). Dabei muss berücksichtigt werden, dass es zwischen *Y. lipolytica* und anderen Organismen in Bezug auf die Peroxisomen-Biogenese weitere deutliche Unterschiede gibt und dass dieser Organismus vermutlich eine

Sonderstellung einnimmt (Dodt *et al.*, 1995; Eitzen, 1997; South und Gould, 1999; Szilard *et al.*, 1995; Titorenko *et al.*, 1998).

## 1.5 Proteinimport in Peroxisomen

Peroxisomen besitzen weder eigene DNA noch die notwendige Maschinerie, um selbst Proteine zu synthetisieren. Alle peroxisomalen Proteine werden deshalb von Genen im Zellkern kodiert und an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert. Analog zu anderen Zellkompartimenten ergibt sich hieraus die Notwendigkeit topogener Signalsequenzen, welche die Informationen über den finalen Bestimmungsort enthalten. Darüber hinaus ist eine spezifische Sortierungs- und Transportmaschinerie notwendig, um die Signalsequenzen zu decodieren und die Proteine in die Peroxisomen zu transportieren.

Der Import peroxisomaler Matrixproteine läuft in mehreren Schritten ab. Zunächst werden die frisch synthetisierten Proteine von den cytosolischen Rezeptoren gebunden und zu den Peroxisomen transportiert (Targeting). An der peroxisomalen Membran wird dann 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. Dem schliesst sich dann die Dissoziation des Rezeptors an. Sowohl der Mechanismus der Translokation wie auch der Mechanismus der Dissoziation der Matrixproteine von ihrem Rezeptor bzw. dessen Recycling ist noch nicht aufgeklärt.

### **Targeting**

In Analogie zu Mitochondrien und Chloroplasten, die über ein posttranslationales Proteinimportsystem verfügen, wurde in den letzten 15 Jahren intensiv nach Signalsequenzen in peroxisomalen Proteinen sowie nach spezifischen Importrezeptoren an der peroxisomalen Membran gesucht. Bislang konnten zwei unterschiedliche Signalsequenzen identifiziert und charakterisiert werden, die als PTS1 (*peroxisomales targeting signal*) und als PTS2 bezeichnet werden. Eine Übersicht hierzu bieten McNew und Goodman (1996) sowie Subramani (1996).

### **PTS1**

Das PTS1 ist am extremen Carboxylterminus zahlreicher peroxisomaler Matrixproteine lokalisiert. Anhand durchgeführter Expressionsstudien in unterschiedlichen Organismen konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein konserviertes, universelles Tripeptid-Sequenzmotiv handelt, welches sowohl in Hefe, als auch in Pflanzen, Insekten und Säugern

vorhanden ist. Das PTS1 ist konserviert in allen Organismen, seine Variationsmöglichkeiten sind spezifisch für einzelne Organismen, jedoch auch für einzelne Proteine möglich (Elgersma *et al.*, 1996b; Gould *et al.*, 1990; Hettema *et al.*, 1996; Motley *et al.*, 1995). Daher wurde als PTS1 folgende Konsensussequenz definiert: (S/A/C)(K/H/R)(L/M) (Gould *et al.*, 1989; Lametschwandtner *et al.*, 1998; Subramani *et al.*, 2000). Die räumliche Präsentation des PTS1 sowie eine zusätzliche interne Signalsequenz scheinen bei einigen Proteinen von Bedeutung zu sein (Kragler, 1993; McNew und Goodman, 1994; Motley *et al.*, 1995).

## **PTS2**

Das zweite peroxisomale Targetingsignal PTS2 wurde am Aminoterminus einiger weniger Matrixproteine identifiziert. Es handelt sich bei dem PTS2 um einen bis zu 30 Aminosäuren langen N-terminalen Sequenzbereich, der die konservierte Nonapeptidsequenz (R/K)(L/V/I)X<sub>5</sub>(H/Q)(L/A/F) enthält (de Hoop und Ab, 1992; Rehling *et al.*, 1996b; Subramani *et al.*, 2000; Swinkels *et al.*, 1991). Der Nachweis des PTS2-Erkennungssignals erfolgte bislang in Säugern (Jansen *et al.*, 1997; Mihalik *et al.*, 1997; Osumi *et al.*, 1991; Swinkels *et al.*, 1991), in Pflanzen (Gietl, 1990), in Trypanosomen (Blattner *et al.*, 1992) und in der Hefe *S. cerevisiae* (Erdmann und Kunau, 1994). Die PTS2-Erkennungssequenz wird im Gegensatz zum PTS1 in einigen Organismen nach dem Import prozessiert (de Hoop und Ab, 1992; Gietl *et al.*, 1994; Osumi *et al.*, 1991; Szilard *et al.*, 1995). Dabei sind die Prozessierung und der Import nicht aneinander gekoppelt, so wie dies bei den Mitochondrien der Fall ist. Das am besten charakterisierte Protein, welches ein PTS2 Signal enthält, ist die 3-Oxoacyl-CoA-Thiolase (Fox3p), sie wurde erstmals bei der Ratte identifiziert. Es handelt sich um ein Enzym des  $\beta$ -Oxidationssystems, welches in den Peroxisomen von Pflanzen, Tieren, Hefen und Menschen vorkommt. Die Pre-Thiolase kann in primäre Fibroblasten von NALD-Patienten importiert werden, welche einen selektiven PTS1 Importdefekt aufweisen (Motley *et al.*, 1994). Es finden sich auch peroxisomale Matrixproteine, die weder ein PTS1, noch ein PTS2 aufweisen, wie zum Beispiel die Acyl-CoA-Oxidase (Small *et al.*, 1996). Dies lässt vermuten, dass es noch weitere, bislang unbekannte Sortierungssignale gibt oder aber, dass es sich um Varianten der bislang identifizierten Importwege handeln könnte. Der Verlust des peroxisomalen Targetingsignals muss jedoch nicht gleichbedeutend mit einem Verlust des Targetings sein. Es konnte gezeigt werden, dass Deletionen der Thiolase, die einen Verlust des PTS2 zur Folge hatten, in Peroxisomen importiert werden konnten, sofern sie zuvor mit PTS2 enthaltenden, importkompetenten Thiolase-Molekülen inkubiert wurden. (Elgersma *et al.*, 1996b; Glover *et al.*, 1994; Lee und Mullen, 1997; McNew und Goodman, 1994). Aufgrund der Formation gemischter Oligomere im Cytosol ist bei einer Co-Expression der Import von Matrixproteinen, denen ein PTS fehlt, möglich (Glover *et al.*, 1994; Lee und Mullen, 1997; McNew und Goodman, 1994).

## **mPTS**

Der Transportmechanismus der Membranproteine erfolgt unabhängig vom Import der Matrixproteine. Wie die peroxisomalen Matrixproteine werden auch die Membranproteine an den Ribosomen des Cytosols synthetisiert und anschließend in die Membran inseriert. Dies erfordert sowohl Komponenten des Cytosols als auch die Proteine der peroxisomalen Außenseite (Diestelkötter und Just, 1993; Imanaka *et al.*, 1996). Es konnte allerdings hierbei keine ATP-Abhängigkeit, wie beim Matrixproteinimport, gezeigt werden (Diestelkötter und Just, 1993; Imanaka *et al.*, 1987; Wendland und Subramani, 1993).

Peroxisomale Membranproteine weisen in der Regel weder ein PTS1 noch ein PTS2 auf. Bislang konnte in vier integralen PMP ein mPTS identifiziert werden. Das erste identifizierte Protein, das ein mPTS trägt, war *PMP47* aus *Candida boidinii*. Es handelt sich um ein im Peroxisom lokalisiertes Mitglied einer Proteinfamilie, zu der zahlreiche mitochondriale Transporter gezählt werden (Nakagawa *et al.*, 2000). Der im Protein enthaltenen Loop-Bereich ist notwendig und ausreichend für das Targeting von *PMP47* an Peroxisomen in *S. cerevisiae* (McCammon *et al.*, 1994). Beim humanen PMP34 handelt es sich vermutlich um ein orthologes Protein zu *CbPMP47*, doch es weist eine gegensätzliche Topologie auf, bei welcher der N- und der C- Terminus ins Cytosol ragen. Der vierte Loop enthält 6 positiv geladene Aminosäuren. Dieser Bereich ist notwendig, jedoch nicht ausreichend für das Targeting, da hierzu drei zusätzliche Transmembrandomänen notwendig sind (Honscho und Fujiki, 2001).

Die ersten 40 Aminosäuren der Pex3-Proteine von *Pichia pastoris*, *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* oder die ersten 54 Aminosäuren von ScPex3p reichen aus, um GFP spezifisch an die peroxisomale Membran zu lenken (Wiemer *et al.*, 1996). Die Domäne enthält einen konservierten Block positiv geladener Aminosäuren, denen eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren folgt, welche die Rolle eines Membran-Ankers innehaben. Für *HpPex3p* konnte gezeigt werden, dass als minimale Länge des mPTS 33 Aminosäuren ausreichen, wovon die ersten 8 erforderlich, jedoch nicht ausreichend sind für die Effizienz. Die ersten 16 Aminosäuren führen zur Mislokalisierung von GFP in die Mitochondrien (Soukupova *et al.*, 1999). Weiterhin erfolgt mit den ersten 16 Aminosäuren eine Mislokalisierung der Katalase (ohne PTS1) in das ER oder in nukleare Membranen (Baerends *et al.*, 1996). Ein Vergleich zwischen Hefe und menschlichem Pex3p führte zu einem Konsensus aus RX(K/R)XK (Baerends *et al.*, 2000).

Der Befund, dass ScPex15p im ER O-glykosyliert wird (Elgersma *et al.*, 1998), legte den Verdacht nahe, dass dieses Peroxin eventuell über das ER zu den Peroxisomen transportiert

wird. Die Überexpression dieses Proteins führt außerdem zur Induktion von Endomembranen, die auch als Karmellae bezeichnet werden, in welchen Pex15p detektiert werden konnte (Elgersma *et al.*, 1997). Das topogene Sortierungssignal für die peroxisomale Membran, welches im carboxyterminalen Teil des ScPex15p (AA302-371) lokalisiert ist, überlappt sich zum einen mit dem ER-Sortierungssignal (AA302-351) und enthält andererseits einen potentiellen Transmembranbereich (AA332-349) (Elgersma *et al.*, 1997). Ein Vergleich entsprechender, die Sortierungssignale enthaltender Bereiche von CbPmp47, HpPex3p und ScPex15p ergab gewisse Sequenzähnlichkeiten. Dies führte Elgersma *et al.* (1997) zur Eingrenzung der Konsensussequenz (R/K)X(K/R)X(K/R)X(L/I)X<sub>(9-10)</sub>(F/Y) für das mPTS, wobei es sich um eine Folge von vier basischen Aminosäuren handelt, während X dabei für eine beliebige Aminosäure steht. Eine Studie mit PpPex22p konnte belegen, dass die ersten 25 N-terminalen Aminosäuren ausreichen, um ein GFP-Reporterprotein an die peroxisomale Membran zu dirigieren (Koller *et al.*, 1999). Der dabei identifizierte Bereich enthält einen Abschnitt positiv geladener Aminosäuren und zeigt somit gewisse Sequenzähnlichkeiten zu der postulierten Konsensussequenz für das mPTS.

Zusammenfassend bleibt die Frage offen, ob ein gemeinsames Sortierungssignal (mPTS) für peroxisomale Membranproteine existiert. Des Weiteren bleibt zu klären, ob von allen Membranproteinen der gleiche Insertionsweg in die peroxisomale Membran verwendet wird, oder ob unterschiedliche Wege genutzt werden.

### ***Peroxisomales Docking***

Durch eine funktionelle Komplementation von Hefemutanten, in denen selektiv nur ein Importweg defekt war, wurden die PTS-Rezeptoren identifiziert (Elgersma *et al.*, 1998; Marzioch *et al.*, 1994; McCollum *et al.*, 1993; Nuttley, 1995; Rehling *et al.*, 1996b; Szilard *et al.*, 1995; van der Klei, 1995; Zhang und Lazarow, 1995). Zusätzlich wurden die Gene für die humanen Rezeptorproteine anhand der Sequenzähnlichkeit zu den orthologen Hefegenen (Braverman *et al.*, 1997; Dodt *et al.*, 1995; Motley *et al.*, 1997; Purdue *et al.*, 1997; Wiemer *et al.*, 1995a) oder anhand des Hefe Two-Hybrid Systems in verschiedenen Laboren kloniert (Fransen *et al.*, 1995).

## **PTS1-Rezeptor**

Der PTS1-Rezeptor gehört zur Familie der TPR Proteine (*tetratricopeptide repeat*). Die Proteine sind durch mehrmalige Wiederholungen einer degenerierten Konsensussequenz charakterisiert [Sikorski, 1990 #672]. Durch *in vitro* Bindungsstudien mit PTS1-tragenden Peptiden (Dodt *et al.*, 1995; Fransen *et al.*, 1995; McCollum *et al.*, 1993; Terlecky *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995b) und durch *in vivo* Analysen mit Hilfe des Two-Hybrid Systems (Brocard *et al.*, 1994; Fransen *et al.*, 1995) konnte die spezifische Bindung zwischen der PTS1-Sequenz und dem Rezeptor gezeigt werden. Der Ausfall des PTS1 Rezeptors hat sowohl im Menschen, als auch in der Hefe einen Importdefekt von PTS1-haltigen Matrixproteinen zur Folge. Hinzu kommt, dass dieser Funktionsausfall beim Menschen, in CHO-Linien und in *pex5* Deletionsmäusen ebenfalls eine Störung im PTS2-abhängigen Importweg der Matrixproteine nach sich zieht (Dodt *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995a). Im Gegensatz zur Hefe existiert der PTS1-Rezeptor im Menschen und in den CHO-Zellen in zwei verschiedenen Isoformen, dem *PEX5L* und dem *PEX5S*. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen (Braverman *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 1998). Die kurze Isoform, *PEX5S*, steuert homolog zum Pex5p in der Hefe 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 durch *PEX5L* vermittelt an den Docking-Komplex der peroxisomalen Membran binden (Braverman *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 2000). Hier zeigen sich bereits erste mechanistische Unterschiede im Import von PTS1-haltigen Proteinen zwischen Hefen und Säugern auf.

## **PTS2-Rezeptor**

Der PTS2-Rezeptor wird durch das *PEX7*-Gen kodiert. Er enthält 6 WD-40-Motive (Neer *et al.*, 1994; van der Voorn, 1992). Analog zum PTS1-Rezeptor konnte auch hier eine Bindung an PTS2-haltige Proteine gezeigt werden (Elgersma *et al.*, 1998; Rehling *et al.*, 1996b; Zhang und Lazarow, 1996). Pex7p wurde von Rehling *et al.* (1996b) als Rezeptormolekül für PTS2 identifiziert, wobei Pex7p die beiden Proteine Pex18p und Pex21p als Co-Rezeptoren benötigt, um an die peroxisomale Membran zu gelangen (Purdue *et al.*, 1998).

Kontrovers wird die Lokalisation der beiden Rezeptoren diskutiert. Neben einer überwiegend cytosolischen Lokalisation wird auch eine Assoziation mit der peroxisomalen Membran und ebenfalls eine intraperoxisomale Lokalisation beschrieben (Übersicht in Crookes, 1999;

Subramani, 1998; Waterham und Cregg, 1997). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchliche Distribution der PTS-Rezeptoren könnte deren dynamische Verteilung sein. Anhand dieser Verteilung wurden unterschiedliche Modellvorstellungen für die Funktion der peroxisomalen Rezeptorproteine entwickelt. Zur Zeit werden vor allem zwei Modelle diskutiert (Dodt und Gould, 1996; Erdmann *et al.*, 1997; Marzioch *et al.*, 1994; van der Klei, 1996):

**Modell 1 (*shuttle model*):** Beide PTS-Rezeptoren sind überwiegend cytosolisch und an der peroxisomalen Membran lokalisiert. Sie erkennen und binden im Cytoplasma die PTS-haltigen Proteine und transportieren diese anschließend an die peroxisomale Membran. Es erfolgt dort die Übergabe der PTS-haltigen Proteine an den Translokationsapparat unter gleichzeitiger Dissoziation des PTS-Rezeptors (Dodt und Gould, 1996), der ins Cytosol zurückkehrt.

**Modell 2 (*extended shuttle model*):** Nach der Bindung der PTS-haltigen Proteine im Cytoplasma wird der Rezeptor zusammen mit dem gebundenen Protein in die peroxisomale Matrix importiert. Dort erfolgt die Entkopplung des Rezeptors, welcher anschließend ins Cytosol zurückgeschleust wird (Dammai und Subramani, 2001; van der Klei, 1998 #682). Diese „*extended shuttle*“ Hypothese leidet allerdings zur Zeit noch daran, dass sich die Beobachtungen über die Aufenthaltsorte sowohl für Pex5p wie für Pex7p je nach Spezies widersprechen (Crookes, 1999). Es steht noch offen, welches der beiden Modelle den Importprozess der peroxisomalen Matrixproteine treffender beschreibt. Somit sind hier weiterführende Importstudien erforderlich.

Beide Modelle setzen jedoch die Existenz von rezeptorspezifischen Bindeproteinen an der peroxisomalen Membran voraus. Bisher konnten in der Hefe drei Peroxine identifiziert werden, die eine entscheidende Rolle beim Import von Matrixproteinen innehaben. Pex13p ist ein integrales PMP mit zwei Transmembrandomänen (TMD), wobei sich beide Termini auf der cytosolischen Seite befinden. Die C-terminale Region besitzt eine SH3-Domäne (*Src* Homologie 3), die direkt an Pex14p und Pex5p bindet (Albertini *et al.*, 1997; Bottger *et al.*, 2000; Elgersma *et al.*, 1996a; Erdmann und Blobel, 1996; Girzalsky *et al.*, 1999; Huhse *et al.*, 1998). Für Pex5p wird postuliert, dass Pex14p der erste Bindungspartner an der peroxisomalen Membran ist (Otera *et al.*, 2000; Salomons *et al.*, 2000). Für Pex7p könnten als erste Bindungspartner sowohl Pex14p als auch Pex13p in Frage kommen. Für Pex14p sind Interaktionen mit Pex5p, Pex7p, Pex13p und Pex17p nachgewiesen (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1999). Unklar ist bislang die Topologie von Pex14p, sie wird vielfältig diskutiert. In *H. sapiens* und *H. polymorpha* wird Pex14p als integrales

Membranprotein beschrieben (Komori, 1997; Will *et al.*, 1999), in *S. cerevisiae* hingegen als peripheres Membranprotein (Albertini *et al.*, 1997). Nach Will *et al.* (1999) befindet sich der C-Terminus des humanen Pex14p im Cytosol, nach Shimizu *et al.* (1999) auch der N-Terminus. Wenig bekannt ist bislang über die Funktion von Pex17p, allerdings konnte eine Interaktion mit Pex14p (Huhse *et al.*, 1998) sowie in Abhängigkeit von Pex14p mit Pex5p (Snyder *et al.*, 1999b) gezeigt werden. Obwohl die Komponenten des Dockingkomplexes sehr intensiv beschrieben wurden, ist die Art und Weise, wie das zu importierende Protein vom Docking-Komplex über die Membran in den Innenraum des Peroxisoms gelangt, bis *dato* noch unklar. Dabei muss besonders berücksichtigt werden, dass Peroxisomen nicht nur in der Lage sind, gefaltete Proteine, sondern sogar Oligomere zu importieren (McNew und Goodman, 1994; McNew und Goodman, 1996). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Goldpartikel von bis zu 9 nm Durchmesser, welche an Importsubstrate gekoppelt wurden, die Membran des Peroxisoms passieren können (Walton *et al.*, 1995). Vermutlich spielen bei beiden Importwegen Chaperone, nämlich Hsp70 und das DnaJ ähnliche Djp1p, in der Substraterkennung oder der Zielsteuerung der Rezeptor-Substrat-Komplexe eine entscheidende Rolle (Hetteema *et al.*, 1998; Walton *et al.*, 1994). Ein umfassendes mechanistisches Modell, welches in der Lage ist, alle Beobachtungen zusammenfassend zu erklären, fehlt derzeit noch.

### ***Dissoziation und Translokation***

Aus der erstaunlichen Zahl von Bindepartnern für Pex5p wird die Existenz einer Import-Kaskade auf der peroxisomalen Membran vermutet. Außer Pex13p und Pex14p binden an Pex5p auch noch Pex8p, Pex10p und Pex12p (Chang *et al.*, 1999; Gould, 2001; Okumoto *et al.*, 2000; Rehling *et al.*, 2000). Pex8p ist auf der Matrixseite der peroxisomalen Membran lokalisiert. In *pex8Δ*-Zellen wurde gezeigt, dass die Bindung von Pex5p an die Rezeptorbindungsstellen der Membran immer noch funktioniert (Rehling *et al.*, 2000). Anhand weiterer Studien wird vermutet, dass Pex8p für die Entkopplung von Rezeptor und Substrat verantwortlich ist (Smith und Rachubinski, 2001).

Als Kandidaten für das Ausbilden einer Translokationspore kommen die RING-Finger-Proteine Pex2p, Pex10p und Pex12p in Betracht. Von ihnen wird angenommen, dass sie einen heterotrimeren Komplex bilden, der nach dem Andocken des Rezeptors an den Pex13p-Pex14p-Pex17p-Komplex fungiert (Gould und Valle, 2000; Holroyd und Erdmann, 2001). In Okumoto *et al.* (2000) und Zhang *et al.* (1999) konnte gezeigt werden, dass Pex12p und Pex10p über ihre jeweiligen C-terminalen Zink-RING-Domänen miteinander interagieren und dass Pex5p an die RING-Domäne von Pex12p bindet. Auch für eine

Funktion nach dem Andocken des Rezeptors an die Membran (Chang *et al.*, 1999) und für eine direkte Verbindung beider Komplexe durch eine Interaktion von Pex12p mit Pex13p (Albertini, *et al.*, 2001) gibt es Belege. Für die bereits seit längerem vermutete Beteiligung von Pex2p an diesem Komplex (Dodt und Gould, 1996; Gould und Valle, 2000; Okumoto *et al.*, 2000) gibt es erst seit kurzem direkte Evidenz (Reguenga *et al.*, 2001).

### **Rezeptor-Recycling**

Die Importmaschinerie besteht aus noch weiteren Komponenten, denen bislang keine Funktion zugeordnet werden konnte. Dabei handelt es sich um Pex4p und Pex22p sowie Pex1p und Pex6p. Pex4p ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Ubc10p oder E2) (Crane *et al.*, 1994; Wiebel, 1992). In *Hansenula polymorpha* konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *PEX4* in einem Defekt des PTS1-Importweges resultiert. Dieser kann durch Überexpression von Pex5p kompensiert werden (van der Klei *et al.*, 1998). Von daher besteht die Vermutung, dass Pex4p eine Rolle in der Entkopplung von Pex5p vom Substrat und in der Aktivierung oder Rückführung von Pex5p für den nächsten Transportzyklus spielt. In Koller *et al.*, (1999) wurde eine Interaktion mit dem peroxisomalen Transmembranprotein Pex22p in *P. pastoris* beschrieben. Außerdem wurde dort gezeigt, dass dieses Protein höchstwahrscheinlich für die Rekrutierung von Pex4p an die peroxisomale Membran erforderlich ist. In Studien von Collins *et al.* (2000) wurden *pex1Δ*-, *pex4Δ*-, *pex6Δ*- und *pex22Δ* Deletionsmutanten untersucht und eine späte Rolle von Pex4p und Pex22p in der Translokation (nachdem das Substrat bereits das Lumen des Peroxisoms erreicht hat) bestätigt. Des Weiteren wurde für Pex1p und Pex6p eine Rolle vor den von Pex22p und Pex4p beeinflussten Ereignissen beschrieben. Pex1p und Pex6p sind ATPasen der AAA-Familie (Erdmann *et al.*, 1991). Mitglieder dieser Familie können an oligomere Proteinkomplexe binden und die Interaktionen unter ATP-Verbrauch modifizieren oder sogar auflösen (Patel, 1998). In Holroyd und Erdmann (2001) wird spekuliert, dass Pex1p und Pex6p die Abtrennung der Rezeptoren von der Translokationsmaschinerie bewerkstelligen und sie diese an den Pex22p-Pex4p-Komplex weiterleiten könnten, wo dann auch ihre Rückführung/-gewinnung stattfinden könnte. Diese Spekulation steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Titorenko (Titorenko und Rachubinski, 2001; Titorenko *et al.*, 1998). Hier wird eine Rolle in der frühen Peroxisomenfusion in *Y. lipolytica* postuliert.

Vor allem unter Berücksichtigung der Rolle von Pex1p, Pex2p und Pex6p ergibt sich das in Abb. 1.2 dargestellte Modell des Import peroxisomaler Matrixproteine.

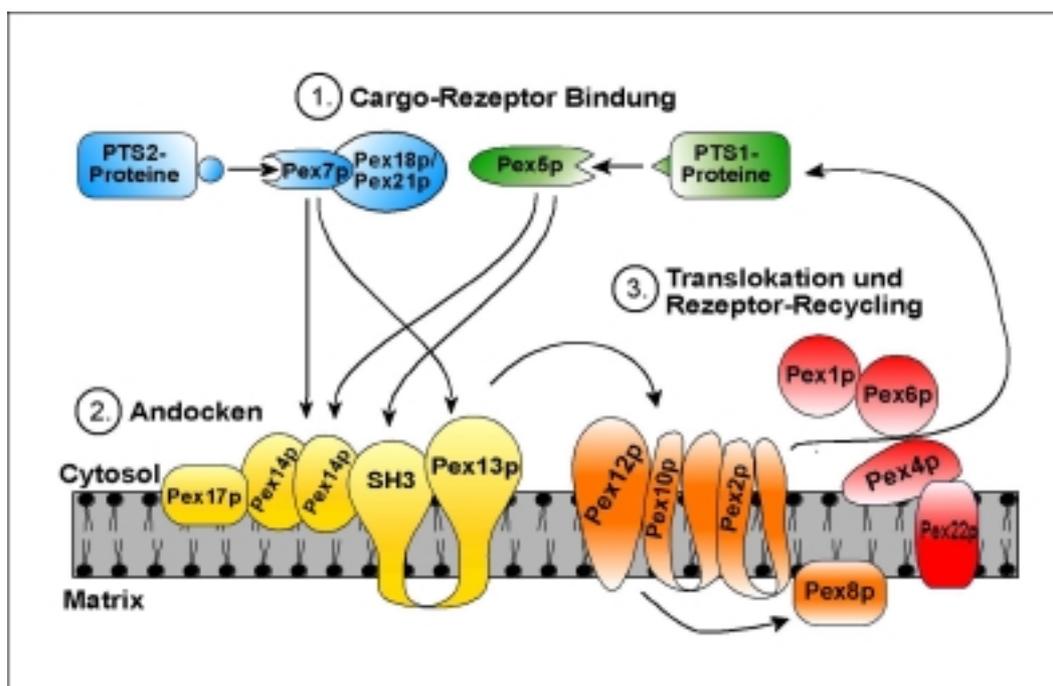


Abb. 1.2 Modell der peroxisomalen Matrixprotein-Importkaskade. Proteine welche ein PTS1 oder PTS2 enthalten, werden im Cytosol von den entsprechenden Rezeptoren Pex5p oder Pex7p erkannt und gebunden. Die verschiedenen Bindestellen für peroxisomale Signalsequenzerkennungsrezeptoren an der peroxisomalen Membran lassen auf die Existenz einer Importkaskade schließen, bei der die beladenen Rezeptoren sukzessiv mit verschiedenen Komponenten der Importmaschinerie interagieren. Die Interaktionen bewirken eine Konformationsänderung der Proteine innerhalb der Kaskade, die für die folgenden Schritte des Imports notwendig sind: Docking, Translokation, Freilassen der Cargo-Proteine und das Rezeptor-Recycling.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit stand die funktionelle Analyse der für den PTS2-Importweg spezifischen Proteine Pex7p und Pex18p/Pex21p und ihrer Docking-Faktoren Pex13p und Pex14p im Vordergrund.

Im einzelnen wurden dabei folgende Punkte bearbeitet:

- Analyse des Aminoterminus von Pex13p mit der Identifizierung des Bindebereichs für Pex7p und der Beschreibung der physiologischen Relevanz des Aminoterminus von Pex13p für den PTS2-abhängigen Proteinimport.
- Charakterisierung der beiden redundanten Proteine Pex18p/Pex21p in Bezug auf ihre Funktion in der frühen Phase des PTS2-abhängigen Proteinimports.
- Studien zur Funktion von Pex14p und dessen mögliche Rolle als das initiale Docking-Protein.
- Identifizierung einer weiteren Bindestelle innerhalb von Pex13p für das Dockingprotein Pex14p mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid Systems und einer Pex13p Peptid-Bibliothek.
- Analyse der Bindung zwischen Pex13p und Pex19p anhand von Two-Hybrid Studien und einer Pex13p Peptid Bibliothek.