

2 Aufgabenstellung

2.1 Mutantenuntersuchung

Die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der peroxisomalen Membranbiogenese ist sehr umstritten (s. Abschn. 1.4.3, S. 20). Die Untersuchung dieser Fragestellung ergab widersprüchliche Ergebnisse. Die verschiedenen Forschungsarbeiten wurden jedoch mit verschiedenen Methoden an unterschiedlichen Organismen durchgeführt. Die Behandlung mit BrefeldinA hat zudem pleiotrope Effekte und kann sich daher von Organismus zu Organismus und abhängig von den Versuchsbedingungen ändern.

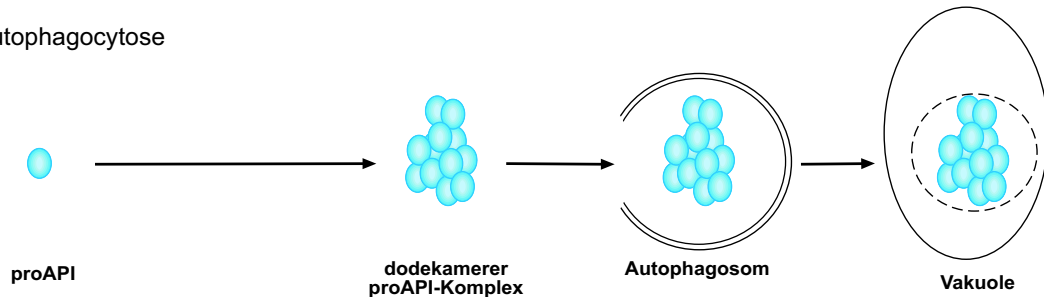
Ein direkter Ansatz für die Erforschung der ER-Beteiligung ist die Untersuchung von Sekretionsmutanten, wie von der Arbeitsgruppe Rachubinski durchgeführt [153]. In *Yarrowia lipolytica* steht jedoch nur eine begrenzte Anzahl von wenig charakterisierten Sekretionsmutanten zur Verfügung. In *Saccharomyces cerevisiae* ist hingegen eine Vielzahl von gut charakterisierten Sekretionsmutanten vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Sekretionsmutanten auf einen Defekt in der Peroxisomenbiogenese untersucht werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine ER-Lokalisation von Pex3p in einer der Mutanten zu beobachten ist. Die ER-Mutanten wurden so ausgewählt, dass in den verschiedenen Mutanten jeder der Schritte des ER-Importes und des ER-Golgi-Transportes sowie des retrograden Transportes blockiert werden kann (Abb. 1.1, S. 6).

Außer der Frage nach der Topogenese der peroxisomalen Membranproteine ist die Herkunft peroxisomaler Membranen bisher ungeklärt. Wenn das ER nicht direkt an der Peroxisomenbiogenese beteiligt ist, stellt sich die Frage, wo die peroxisomalen Membranen ihren Ursprung haben. Eine mögliche zelluläre Membran, an deren Bildung der Standardsekretionsweg nicht beteiligt ist, ist die präautophagosomale Membran. Das Autophagocytoseproteine auch am Abbau der Peroxisomen durch Pexophagocytose beteiligt sind [80, 47], schließt eine Beteiligung an der Peroxisomenbiogenese nicht aus, da gezeigt wurde, dass die Pexophagocytose nur bei Abwesenheit des Peroxins Pex14p eingeleitet wird [10]. Autophagocytose und Peroxisomenbiogenese weisen zudem mechanistische Parallelen wie den Import gefalteter oligomerer Proteine auf (s. Abb. 2.1). An bei-

den Prozessen sind außerdem Ubiquitin- bzw. ubiquitinähnliche Konjugationen beteiligt (siehe Abb. 2.2 auf der nächsten Seite). Für die peroxisomale Ubiquitin-Konjugation ist bisher zudem kein E1-ähnliches ubiquitinkonjugierendes Enzym identifiziert worden. Aus diesen Gründen sollte eine Überlappung von Autophagocytose- oder cvt-Weg mit der Peroxisomenbiogenese geprüft werden.

Autophagocytose



peroxisomaler Matrixproteinimport

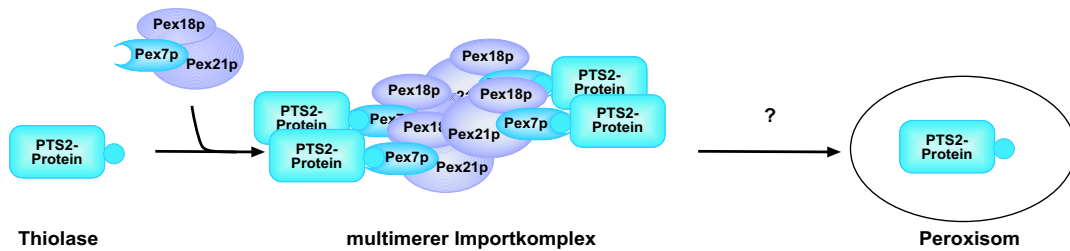


Abbildung 2.1: Parallelen zwischen Autophagocytose und Peroxisomenbiogenese: Sowohl bei der Autophagocytose als auch bei der Peroxisomenbiogenese werden gefaltete oligomere Proteine importiert. Bei der Autophagocytose oder dem *cytoplasm to vacuole transport* wird pro-Amminopeptidase I (proAPI) von einer Doppelmembran umschlossen, deren äußere Membran mit der Vakuole fusioniert. Die innere Membran wird in der Vakuole abgebaut. Beim peroxisomalen Matrixproteinimport erfolgt eine Oligomerisierung des Rezeptor-Cargo Komplexes. Der genaue Mechanismus des Importprozesses ist nicht geklärt.

Auf der Suche nach dem Ursprung peroxisomaler Membranen und dem Importweg für „frühe“ Peroxine sollten außerdem YidC-Homologie-Mutanten untersucht werden. YidC ist ein sec-unabhängiges bakterielles Translokon und könnte somit am sec-unabhängigen Membranproteinimport in das ER oder andere Membranstrukturen beteiligt sein.

Da Pex16p im Menschen ein essentielles Peroxin der „frühen“ Peroxisomenbiogenese ist, sollte auch versucht werden, ein Pex16p-Orthologes für *S. cerevisiae* zu identifizieren.

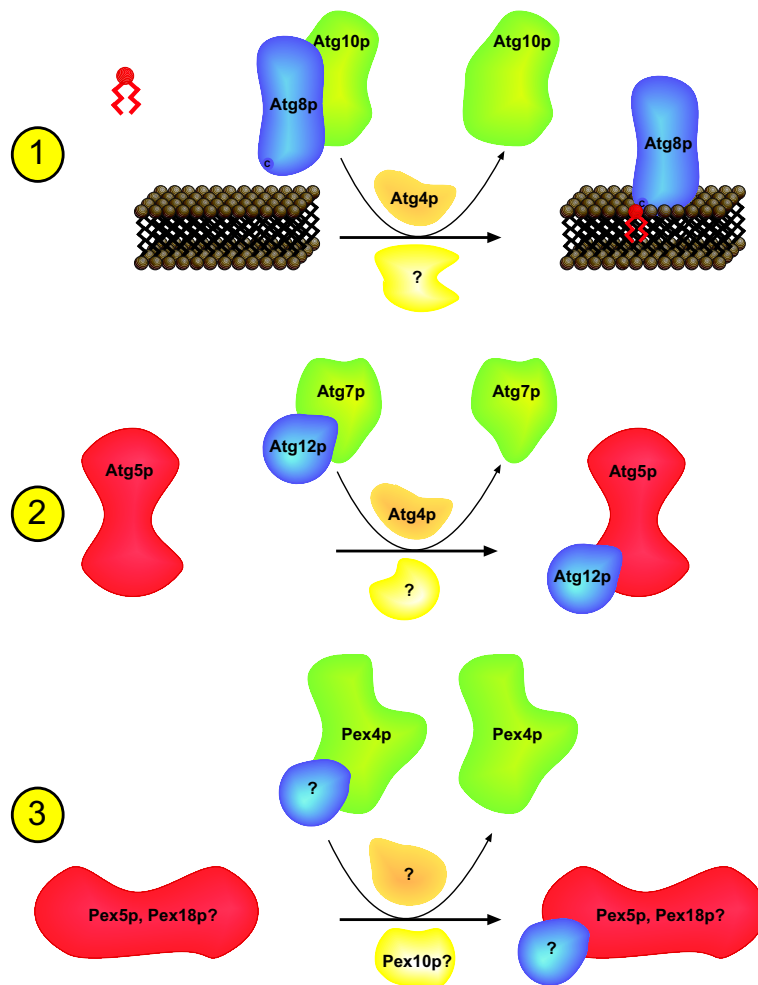


Abbildung 2.2: Ubiquitinähnliche Konjugationen – Parallelen zwischen Autophagocytose und Peroxisomenbiogenese: Sowohl an der Autophagocytose (1 und 2) als auch an der Peroxisomenbiogenese (3) sind ubiquitin(ähnliche) Konjugationen beteiligt. Das Zielprotein (rot) der ubiquitinähnlichen Konjugation bei der Peroxisomenbiogenese ist wahrscheinlich Pex18p es könnte jedoch auch Pex5p sein. Das E1-ähnliche-Enzym (grün) sowie das zu konjugierende Substrat (blau) für die Peroxisomenbiogenese sind noch nicht bekannt. E3-ähnliche Enzyme (gelb) sind wahrscheinlich nicht unbedingt erforderlich und für die Autophagocytose nicht identifiziert. Für die Peroxisomenbiogenese wurde Pex10p als mögliches E3-ähnliches Enzym beschrieben.

2.2 Präperoxisomale Membranstrukturen

Die Existenz von präperoxisomalen Membranstrukturen in „frühen“ *pex*-Mutanten ist umstritten. In *S. cerevisiae* und in humanen Fibroblasten sind in *pex3*-, *pex16*- und *pex19*-Mutanten keine PMP-haltigen Membranstrukturen identifizierbar [142, 143, 56]. Die meisten Membranproteine sind in diesen Mutanten instabil. Pex14p, Pex3p, Pex12p und ALDP β - sind in humanen *pex19*-Mutantenzellen [126] zu Mitochondrien misslokalisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob es bisher undetektierte peroxisomale Membranstrukturen in $\Delta pex3$ - und $\Delta pex19$ -Mutanten aus *S. cerevisiae* gibt und welche Charakteristika diese Membranen haben.

2.3 Komplexisolierung

Über die Struktur und Funktion von Pex3p ist nur wenig bekannt. Als Interaktionspartner wurden Pex19p [23, 48, 139, 126] und Pex15p [23] identifiziert. Eine Interaktion mit anderen peroxisomalen Membranproteinen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Interaktionsstudien mit Pex3p sind jedoch nur schwer durchführbar, da die meisten Versuchsansätze zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen mit überexprimierten Proteinen arbeiten. Für Hefezellen ist die Überexpression von Pex3p jedoch schädlich [6].

In dieser Arbeit sollte endogen expremiertes, C-terminal mit Protein A markiertes Pex3p aus *S. cerevisiae* gereinigt werden. Der Marker hat eine Größe von ca. 20 kDa und enthält eine TEV-Protease Schnittstelle. Zur Reinigung des Proteins wird solubilisiertes Pex3p-Protein A an IgG-Sepharose gebunden. Durch Behandlung mit der TEV-Protease wird das Protein A abgespalten und der Proteinkomplex freigesetzt.

Durch die native Aufreinigung von Pex3p sollten neue Interaktionspartner identifiziert werden. Die Auftrennung der gereinigten Pex3p-haltigen Komplexe über Blaue-Native-Gelelektrophorese sollte einen Einblick über den Aufbau und die Organisation des postulierten Membranproteinrezeptor- bzw. Translokonkomplexes geben.