

# 5 Diskussion

## 5.1 Peroxisomen und ER

Die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der Peroxisomenbiogenese ist umstritten. Bisher durchgeführte Forschungsarbeiten kamen zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, diese Widersprüche aufzuklären.

### 5.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die meisten in dieser Arbeit untersuchten Sekretionsmutanten (*sec16-2*, *sec18-20*, *sec21-1*, *ret3-1*, *csy126*, *sec61-2*) keinen Defekt in der Peroxisomenbiogenese aufweisen. (s. Abb 4.3, S. 63). Pex3p-EGFP konnte zu keinem Zeitpunkt im endoplasmatischen Reticulum detektiert werden. Es gibt jedoch mit Ssh1p ein Sec61p-Homologes, das einen cotranslationalen Transportkomplex im endoplasmatischen Reticulum mit bisher unbekannter Funktion darstellt. Ssh1p ist nicht essentiell, da es durch Sec61p im Komplex ersetzt werden kann. Es ist bisher nicht geklärt, ob Sec61p im cotranslationalen Importkomplex durch Ssh1p ersetzt werden kann. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Doppelmutante  $\Delta ssh1/sec61-2$  untersucht. Es konnte jedoch nur festgestellt werden, dass bei nicht-permissiver Temperatur (30°C) keine peroxisomalen Proteine detektiert werden können (s. Abb. 4.4, S. 65). Ob die Proteine nicht exprimiert oder abgebaut werden, wurde nicht untersucht. Da jedoch nach bisherigem Kenntnisstand auch der Ssh1p-abhängige, cotranslationale Import SRP<sup>1</sup>-abhängig ist und der Transport von Pex3p-EGFP in der SRP-Mutante *csy126* nicht gestört ist (s. Abb 4.3, S. 63), ist anzunehmen, dass Pex3p-EGFP weder Ssh1p- noch Sec61p-abhängig in das ER importiert wird. Das Fehlen beider cotranslationaler Importkomplexe hat jedoch scheinbar einen – wahrscheinlich indirekten – Einfluss auf die Expression bzw. die Stabilität peroxisomaler Proteine. Es ist anzunehmen, dass in der Doppelmutante auf nicht-permissiver Temperatur die Induktion peroxisomaler Proteine gestört ist, da peroxisomale Matrixproteine bei Defekten in

---

<sup>1</sup>*signale recognition particle*

der Peroxisomenbiogenese cytosolisch lokalisiert und stabil sind. Es ist jedoch auch möglich, dass die beobachteten Effekte auf ein schnelles Zellsterben unter den gegebenen Bedingungen zurückzuführen sind.

In *sec61*-Mutanten ist sowohl der post- als auch der cotranslationale Import von Proteinen in das ER blockiert. Ein Defekt der Peroxisomenbiogenese konnte in diesen Mutanten nicht festgestellt werden. Ssh1p kann Sec61p im posttranslationalen Importkomplex nicht ersetzen und auch in der SRP-Mutante konnte keine Störung der Peroxisomenbiogenese beobachtet werden. Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass der für den Import und Transport von sekretorischen und vakuolären Proteinen sowie von Proteinen der Plasmamembran benötigte Standardsekretionsweg (s. Abb 1.1, S. 1.1) in *Saccharomyces cerevisiae* nicht an der Peroxisomenbiogenese beteiligt ist. Zu dem gleichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von S. Gould [141] in ihrer – parallel zu der vorliegenden Arbeit – durchgeführten Untersuchung. In der vorgenannten Arbeit wurden jedoch nur eine *sec61*-Mutante und die Deletionsmutante  $\Delta ssh1$  untersucht.

Auch in Sekretionsmutanten von *Yarrowia lipolytica* konnte keine Blockade der Peroxisomenbiogenese nachgewiesen werden [153]. In diesen Mutanten wurde eine transiente Lokalisation von Pex16p und Pex2p im endoplasmatischen Reticulum nachgewiesen. Das bedeutet, dass in diesen Zellen der Transport von Pex16p und Pex2p verlangsamt aber nicht unterbunden werden konnte. Auch wurde für Pex16p und Pex2p in SRP-Mutanten aus *Y. lipolytica* eine transiente ER-Lokalisation beobachtet und nicht – wie für SRP abhängig importierte Proteine zu erwarten wäre – eine cytosolische Lokalisation. Diese Daten weisen auf eine indirekte Beeinflussung der Peroxisomenbiogenese durch den Standardsekretionsweg hin.

In *S. cerevisiae* konnte keine transiente ER-Lokalisation in Sekretionsmutanten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Pex2p und Pex16p in *Y. lipolytica*, für die nach Induktion durch Ölsäure eine 10fach höhere Expression als auf Glucosemedien zu beobachten ist, ist die Expression und Induzierbarkeit von Pex3p in *S. cerevisiae* sehr gering. Es wäre somit möglich, dass eine transiente Lokalisation von Pex3p-EGFP in *S. cerevisiae* mit den verwendeten mikroskopischen Methoden nicht detektiert werden kann. Es ist allerdings auch möglich, dass Pex3p-EGFP – trotz seiner Beteiligung an der „frühen“ peroxisomalen Membranbiogenese – als Markerprotein für den Transport von peroxisomalen Membran-

proteinen über das endoplasmatische Reticulum ungeeignet ist. Die für Pex2p und Pex16p in Sekretionsmutanten von *Y. lipolytica* nachgewiesene transiente ER-Lokalisation konnte aber auch in humanen Zellen nicht nachgewiesen werden [158, 143]. In humanen Zellen wurde jedoch nur der Effekt von Blockaden des COPI und COPII abhängigem Transports untersucht.

## 5.1.2 Biochemische Untersuchungen

In Sekretionsmutanten aus *Y. lipolytica* konnte nicht nur eine transiente ER-Lokalisation von Pex2p und Pex16p nachgewiesen werden, sondern es wurde auch eine cytosolische Lokalisation peroxisomaler Matrixproteine nach subzellulärer Fraktionierung beobachtet [153]. Dieses Ergebnis konnte für Sekretionsmutanten aus *S. cerevisiae* bestätigt werden. Auch hier ist eine – teilweise temperaturabhängige – cytosolische Lokalisation der peroxisomalen Katalase in Sekretionsmutanten nachweisbar (s. Abb. 4.4, S. 65).

In der vorliegenden Arbeit wurde, im Gegensatz zu den in *Y. lipolytica* durchgeführten Untersuchungen, zum Vergleich die Lokalisation eines mitochondrialen Proteins (mtHsp70) untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Misslokalisierung von peroxisomaler Katalase mit einer Misslokalisierung des mitochondrialen Chaperons mtHsp70p einhergeht (s. Abb. 4.4, S. 65). Da viele mitochondriale Proteine im Gegensatz zu peroxisomalen Proteinen nach dem Import prozessiert werden, konnte festgestellt werden, dass in der cytosolischen Fraktion nicht nur neusynthetisiertes, unprozessiertes prä-mtHsp70p, sondern auch prozessiertes mtHsp70p nachgewiesen werden kann. Das bedeutet, dass mtHsp70p in diesen Mutanten importiert und dann wahrscheinlich während des Zellaufschlusses wieder in das Cytosol freigesetzt wurde. Diese Unterscheidung ist für peroxisomale Proteine nicht möglich. Da mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie keine cytosolische Lokalisation peroxisomaler Markerproteine detektiert werden konnte, ist anzunehmen, dass auch die peroxisomale Katalase nach dem Import in die Peroxisomen wieder freigesetzt wurde.

Da im endoplasmatische Reticulum die Lipidbiosynthese stattfindet und somit in Sekretionsmutanten die Membranlipidsynthese gestört ist, könnte dies eine Verringerung der Membranstabilität der Organellen im Vergleich zum Wildtyp zur Folge haben. Durch den Zellaufschluss der Sekretionsmutanten werden dann die im Wildtyp unter diesen Bedingungen stabilen Organellen zerstört und die

peroxisomalen und mitochondrialen Matrixproteine freigesetzt.

Vergleicht man die vorliegende Arbeit mit den in *Y. lipolytica* durchgeführten Forschungsarbeiten, erscheint es möglich, dass auch die in *Y. lipolytica* beobachtete Misslokalisierung peroxisomaler Matrixproteine auf eine verringerte Stabilität der Organellen und nicht auf eine gestörte Peroxisomenbiogenese zurückzuführen ist.

### 5.1.3 *ret2-1* und *sec23-1*

In den meisten von mir untersuchten Sekretionsmutanten konnte eine peroxisomale Lokalisation der verwendeten Fluoreszenzmarkerproteinen beobachtet werden (s. Abb. 4.3, S. 63). In drei Mutanten ( $\Delta ssh1/sec61-2$ , *ret2-1* und *sec23-1*) konnten die fluoreszenten Markerproteine jedoch nicht detektiert werden.

Der Phänotyp der Doppelmutante  $\Delta ssh1/sec61-2$  wurde bereits diskutiert (siehe Abschnitt 5.1.1 auf Seite 101).

*ret2-1* exprimiert keine der Fluoreszenzmarker; die endogenen peroxisomalen Proteine konnten jedoch im Westernblot detektiert werden (s. Abb. 4.4, S. 65). Es wurde dabei – wie schon für *ret3-1* und *sec61-2* – eine temperaturabhängige Misslokalisierung der peroxisomalen Katalase und des mitochondrialen Chaperons mtHsp70p beobachtet. Auch hier scheint die Blockade des Sekretionsweges einen Einfluss auf die Membranstabilität der Organellen zu haben. Die fehlende Expression der fluoreszenten, peroxisomalen Markerproteine ist mit den vorhandenen Daten nicht erklärbar. Da sowohl Ret2-1p und als auch Ret3-1p Untereinheiten des *coats* von COPI-Vesikeln des retrograden Transports darstellen, würde man für die Mutanten *ret2-1* und *ret3-1* ähnliche Phänotypen erwarten. *ret3-1* zeigte jedoch – im Gegensatz zu *ret2-1* – eine wildtypähnliche Fluoreszenzfärbung. Da die hier untersuchten Mutanten aus ungerichteten Mutageneseansätzen hervorgegangen sind, besteht jedoch die Möglichkeit, dass beobachtete Effekte nicht auf die Mutation des RET2 sondern auf Zweitmutationen in anderen Genen zurückzuführen sind. Eine solche zusätzliche Mutation könnte für die fehlende Expression der fluoreszenten Markerproteine verantwortlich sein.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *ret2-1* (s. Abb. 4.5, S. 67) bei permissiver Temperatur (23°C) erschienen die Peroxisomen teilweise von einer kristallinen Matrix umgeben. Ursprung und Bedeutung dieser Strukturen sind unklar. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *ret2-1* war außerdem

erkennbar, dass sich die mitochondrialen Strukturen deutlich von Wildtypmitochondrien unterscheiden. Veränderungen der mitochondrialen Struktur in Sekretionsmutanten wurden bereits für die COPI-Mutante *ret1-3* und SRP-Mutanten beschrieben [117]. Desweiteren konnte in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *ret2-1* bei nicht permissiver-Temperatur (37°C) häufig die Verbindung von Peroxisomen mit ER-artigen Membranstrukturen beobachtet werden. In Wildtypzellen waren solche Strukturen nur sehr selten erkennbar (s. Abb. 4.5, S. 67). Allerdings waren diese Membranstrukturen bei *ret2-1* scheinbar mit der Vakuole verbunden. Sie stellten aber keine typische Mikro- oder Makroautophagocytosestruktur dar. Herkunft und Bedeutung sind daher unklar. Die in Abbildung 4.5 in der Wildtypzelle erkennbaren Membranstrukturen wurden auch in BrefeldinA behandelten Zellen aus *Hansenula polymorpha* beobachtet [128]. Dort konnte gezeigt werden, dass diese Membranstrukturen Pex3p, Pex8p, Pex14p und Alkoholoxidase enthalten. Vor kurzem konnten solche Strukturen auch in unbehandelten dendritischen Mauszellen nachgewiesen werden [40, 151].

In *sec23-1* waren weder die fluoreszenten Markerproteine noch die endogenen peroxisomalen Proteine detektierbar. Ob dies auf fehlende Synthese oder sofortigen Abbau zurückzuführen ist, wurde nicht näher untersucht. Im elektronenmikroskopischen Bild sind in *sec23-1*-Zellen bereits bei permissiver Temperatur keine Peroxisomen und Mitochondrien detektierbar. Sec23p ist wie Sec16p am Abschnüren der Transportvesikel vom endoplasmatischen Reticulum beteiligt. Im Gegensatz zu *sec23-1* zeigt *sec16-2* jedoch keine Defekte in der Peroxisomenbiogenese (siehe Abbildung 4.3 auf Seite 63). Peroxisomale und mitochondriale (nicht gezeigt) Markerproteine sind im Fluoreszenzmikroskop gut detektierbar.

Eine ähnliche Divergenz der Phänotypen konnte bei der Untersuchung der Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der Autophagocytose beobachtet werden [63]. Ursprünglich wurde angenommen, dass das endoplasmatische Reticulum nicht an der Autophagocytose beteiligt ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Standardsekretionsweg, der am Transport von sekretorischen und vakuolären Proteinen beteiligt ist, nicht für die Autophagocytose benötigt wird. In einzelnen Sekretionsmutanten wie *sec23* und *sec24* konnte jedoch ein Defekt der Autophagocytose nachgewiesen werden. Sec23p und Sec24p bilden mit Sec13p und Sec31p den *coat* von COPII-Vesikeln. Dieser besteht aus zwei Subkomplexen. Ein Subkomplex wird von Sec23p und Sec24p gebildet, der andere

von Sec13p und Sec31p. *sec13*- und *sec31*-Mutanten zeigen im Gegensatz zu *sec23* und *sec24*-Mutanten keinen Defekt in der Autophagocytose.

#### 5.1.4 Neue Wege in das endoplasmatische Reticulum

Wie am Beispiel der Coatamerprotein Sec23p und Sec24p von COPII-Vesikeln dargestellt, scheinen bestimmte Proteine außer ihrer Funktion im Standardsekretionsweg, Funktionen in anderen Biogenesewegen zu erfüllen. Somit ist der Import und Transportweg für die meisten vakuolären, sekretorischen sowie für Plasmamembranproteine, der in der vorliegenden Arbeit als Standardsekretionsweg bezeichnet wurde, nicht der einzige Import und Transportweg in und über das endoplasmatische Reticulum. So konnte nachgewiesen werden, dass das Plasmamembranprotein Ist2p mRNA-abhängig zum corticalen ER der Tochterzelle transportiert und dort importiert wird [70]. Ob dieser Importvorgang von Proteinen des Standardsekretionsweges abhängig (sec-abhängig) oder unabhängig (sec-unabhängig) ist, wurde noch nicht geklärt.

Ein weiteres Beispiel ist der Import von *tail-anchored* Proteinen: *tail-anchored* Proteine werden in das perinukleäre ER importiert. Dieser Vorgang ist sec-unabhängig [144]. So kann in *sec61* und *sec63*-Lysaten  $\alpha$ -Faktor nicht mehr *in vitro* in das ER importiert werden. Der Import des *tail-anchored* Proteins Nyv1p ist jedoch nicht blockiert.

#### 5.1.5 *Tail-anchored* Proteine

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peroxisomenbiogenese ohne Beteiligung des Standardsekretionsweges abläuft. Es gibt jedoch Untersuchungen in verschiedenen Organismen, welche die transiente oder permanente Lokalisation peroxisomaler Membranproteine im ER oder ER-artigen Strukturen nachweisen konnten. So konnte eine transiente Kolokalisation von Pex2p und Pex16p mit dem ER-Protein Kar2p in Sekretionsmutanten aus *Y. lipolytica* nachgewiesen werden [153]. In Pflanzen führt die Behandlung von Zellen mit BrefeldinA zu einer Akkumulation von Ascorbat-Peroxidase (APX) in einem zirkulär-retikulärem Netzwerk [101]. Die Behandlung der Zellen führt jedoch nicht zur Kolokalisation von APX mit ER-Markerproteinen wie BiP, Calnexin oder Calreticulin. Die APX enthaltenden ER-artigen Strukturen können aber mit dem

ER-Lipidmarker DiOC<sub>6</sub> angefärbt werden. Desweiteren konnten in Lysaten pflanzlicher Zellen peroxisomale Membranproteine *in vitro* importiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass *S. cerevisiae* Pex15p (ScPex15p) und APX in ER-Membranen importiert werden können; wohingegen *Candida bodinii* Pex14p nur direkt in Peroxisomen importiert werden kann [101]. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass APX ein *tail-anchored* Protein ist [102]. Auch Pex15p hat die Charakteristika eines *tail-anchored* Proteins [27]. So besitzen *tail-anchored* Proteine nur eine Transmembrandomäne. Dieser Membrananker befindet sich innerhalb der letzten 50 Aminosäuren des Proteins [144]. Der N-Terminus von *tail-anchored* Proteinen ist cytosolisch lokalisiert.

ScPex3p<sup>2</sup> weist nicht die Charakteristika eines *tail-anchored* Proteins auf. YIPex2p<sup>3</sup> und YIPex16p besitzen hingegen die notwendigen Eigenschaften. Ob der C-Terminus für das ER-*targeting* dieser beiden Proteine in *Y. lipolytica* ausreichend ist, wurde jedoch nicht untersucht. Der C-Terminus von Pex15p führt zum Import eines Reporterkonstruktes in das endoplasmatische Reticulum [27]. Für die peroxisomale Zielsteuerung wird der N-Terminus von Pex15p benötigt.

Da das *tail-anchored* Protein Nyv1p sec-unabhängig *in vitro* in das ER von *S. cerevisiae* importiert werden kann [144], wurde versucht diese *in vitro* Importmethode auf Pex3p, Pex15p und Ant1p anzuwenden. Es konnten jedoch nur unspezifische Membraninsertionen beobachtet werden (nicht gezeigt). Es wurde aber auch für Cytb5p – ein weiteres *tail-anchored* Protein – eine unspezifische Assoziation mit Lipiden *in vitro* beobachtet [144]. Es ist daher anzunehmen, dass für den *in vitro* Import von Pex3p, Pex15p, Ant1p und Cytb5p in *S. cerevisiae* cytosolische Proteine benötigt werden, die durch das verwendete Retikulocytenlysat nicht zur Verfügung gestellt werden können. Für den *in vitro* Import von Nyv1p werden keine zusätzlichen Faktoren benötigt. Es ist daher möglich, dass einige peroxisomale Membranproteine und Nyv1p den selben Importmechanismus verwenden, aber unterschiedliche cytosolischer Kofaktoren benötigen. Diese Annahme wird durch kürzlich publizierte Untersuchungen bestärkt, in denen humanes Pmp22p nach *in vitro* Translation mit *weat germ* Extrakten unlöslich ist [134]. Nach Zugabe von rekombinantem Pex19p, kann jedoch ein Teil des *in vitro* synthetisierten Pmp22p im löslichen Überstand der Translationsreaktion detektiert werden.

---

<sup>2</sup>*Saccharomyces cerevisiae* Pex3p

<sup>3</sup>*Yarrowia lipolytica* Pex2p

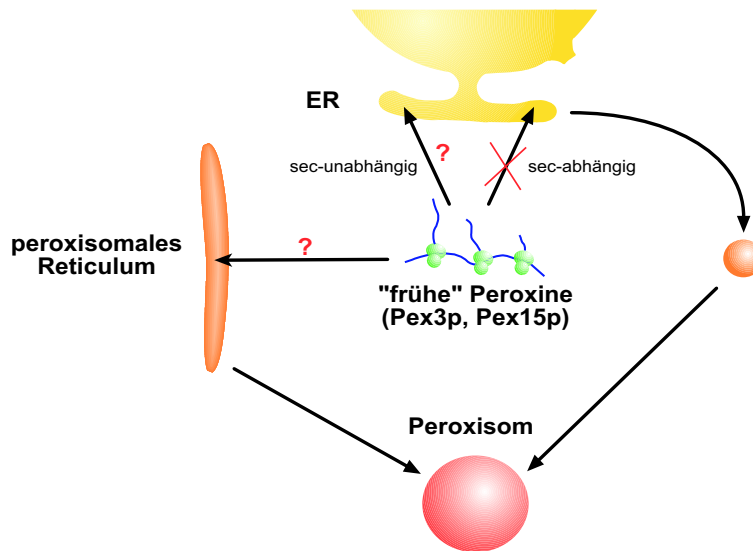
### 5.1.6 Endoplasmatisches Reticulum – eine Frage der Form?

In Pflanzenzellen kann APX nach Behandlung mit BrefeldinA in einem ER-artigen Membransystem gefunden werden, das jedoch keines der ER-Proteine BiP, Calnexin oder Calreticulin enthält [101]. Ein *tail-anchored* GFP kolokalisiert mit APX in diesen Zellen [96]. In unbehandelten dendritischen Mauszellen kann Pex13p in Membransystemen gefunden werden, die mit reifen Peroxisomen verbunden sind und sich in einer ER-artigen nicht mit Ribosomen besetzten Membranstruktur fortsetzen [40, 151]. Auf Grund dieser Forschungsergebnisse wurde postuliert, dass es eine spezialisierte Subdomäne des endoplasmatischen Reticulums gibt, in die peroxisomale Membranproteine importiert werden. Dieses wurde als „peroxisomales ER“ oder „peroxisomales Reticulum“ bezeichnet und seine Existenz bereits von Lazarow und Fujiki 1985 postuliert [92]. Dabei stellt sich die Frage: Was bezeichnet man als endoplasmatisches Reticulum? Alle Strukturen in denen ER-residente Proteine des Standardsekretionsweges wie Kar2p lokalisiert sind? Dann dürfte man das cirkulär-retikuläre Membransystem in dem APX nach Behandlung von Pflanzenzellen mit BrefeldinA detektierbar ist, nicht als ER bezeichnen. Darf nur bei einer Beteiligung des Standardsekretionsweges von einer Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der Peroxisomenbiogenese gesprochen werden? Dann ist das ER nicht an der Peroxisomenbiogenese beteiligt. Ist es sinnvoll, zwischen sec-unabhängigem ER-Import und einem Import in ein peroxisomales Reticulum zu unterscheiden? Wäre es möglich, dass von der Hefezelle zur Pflanzenzelle bzw. humanen Zellen eine Spezialisierung innerhalb des endoplasmatischen Reticulums stattgefunden hat? Dies könnte erklären, warum in *Y. lipolytica* eine Kolokalisation von peroxisomalen Proteinen mit Kar2p beobachtet werden kann, APX jedoch in pflanzlichen Zellen in ER-artigen Strukturen lokalisiert ist, in denen keine ER-residenten Proteine detektiert werden können.

Abbildung 5.1 fasst den derzeitigen Stand der Untersuchungen zur Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der Peroxisomenbiogenese zusammen. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass der Standardsekretionsweg nicht an der Peroxisomenbiogenese beteiligt ist. Also kein sec-abhängiger Import peroxisomaler Membranproteine in das ER stattfindet. Es konnte leider nicht geklärt werden, ob peroxisomale Membranproteine sec-unabhängigen in das ER importiert werden, wie dies für *tail-anchored* Proteine beschrieben



wurde. Auch besteht die Möglichkeit, dass peroxisomale Membranproteine direkt in ein peroxisomales Reticulum importiert werden, welches entweder eine spezialisierte Subdomäne des endoplasmatischen Reticulums oder ein davon unabhängiges Membransystem darstellt.



**Abbildung 5.1: Mögliche Importwege für „frühe“ Peroxine:** In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass kein sec-abhängiger Import von peroxisomalen Proteinen in das ER erfolgt. Es ist jedoch möglich, dass sec-unabhängige Wege, wie der Import von *tail-anchored* Proteinen, für den Import peroxisomaler Proteine in das ER genutzt werden oder dass der Import direkt in ein peroxisomales Reticulum stattfindet.

## 5.2 Mutantenuntersuchungen

Auf der Suche nach dem Ursprung peroxisomaler Membranen wurden in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl von Mutanten auf Defekte in der Peroxisomenbiogenese untersucht. Zu diesen Mutanten gehörten Deletionsmutanten nicht-essentieller ER-Proteine, YidC-Homologiemutanten und Autophagocytosemutanten. Mit allen Mutanten wurden Wachstumstests auf Ölsäure durchgeführt. Bei den ER-Mutanten wurde zusätzlich getestet, ob sie Petrosilinsäure abbauen können. In den untersuchten Mutanten wurde außerdem die subzelluläre Lokalisation der peroxisomalen Fluoreszenzmarker Pex3p-EGFP, EGFP-PTS1 und PTS2-DsRed untersucht. Durch subzelluläre Fraktionierung wurde bei den ER- und

Autophagocytosemutanten zusätzlich die Lokalisation der peroxisomalen Katalase ermittelt.

Zwei der ER-Mutanten ( $\Delta arl1$  und  $\Delta ste4$ ) zeigten ein stark reduziertes Wachstum auf Petrosilinsäuremedien (s. Abb. 4.6, S. 68), aber keinen Wachstumsdefekt auf Ölsäure. Ein ähnlicher Phänotyp kann auch für  $\Delta pex11$ -Mutanten beobachtet werden.  $\Delta pex11$ -Zellen wachsen auf Ölsäuremedium aber nicht auf Petrosilinsäure oder Laurinsäure enthaltenden Medien [125].  $pex11$ -Mutanten haben einen Defekt in der Peroxisomenteilung. Eine schwere Störung der Peroxisomenbiogenese ist in diesen Mutanten nur zu beobachten, wenn zusätzlich  $PEX25$  und  $PEX27$  deletiert werden. Pex11p ist demnach redundant. Der Wachstumstest auf Petrosilinsäuremedium ermöglicht somit auch die Detektion von geringfügigen Störungen der Peroxisomenbiogenese. Es wäre daher möglich, dass auch Arl1p und Ste4p an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind, jedoch durch andere Proteine ersetzt werden können und daher keinen Wachstumsdefekt auf Ölsäuremedium besitzen und sich auch in der subzellulären Lokalisation peroxisomaler Marker nicht von Wildtypzellen unterscheiden (siehe Abbildung 4.7 auf Seite 69 und Abbildung 4.8 auf Seite 70). Da für humanes Pex11p eine Interaktion mit ARFs nachgewiesen wurde [113], wäre es möglich, dass Arl1p mit Pex11p interagiert.

Bei den Autophagocytosemutanten zeigten zwei der untersuchten Mutanten ( $\Delta apg14$  und  $\Delta cvt4$ ) einen generellen Wachstumsdefekt (s. Abb. 4.11, S. 75), keine Expression der fluoreszenten Markerproteine sowie eine stark verminderte Expression der peroxisomalen Matrixproteine Katalase und Thiolase (s. Abb. 4.13, S. 78). Diese Mutanten wiesen eine schwerwiegende Störung des Zellstoffwechsels auf. Dadurch war auch die Peroxisomenbiogenese gestört. Der beobachtete Defekt ist somit nicht spezifisch für Peroxisomen. Es ist daher nicht anzunehmen, dass Apg14p und Cvt4p direkt an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind.

Die YidC-Homologiemutante  $\Delta oxa1$  wies den gleichen Phänotyp wie die Autophagocytosemutanten  $\Delta apg14$  und  $\Delta cvt4$  auf (s. Abb. 4.9, S. 72). Auch Oxa1p ist daher wahrscheinlich nicht direkt an der Peroxisomenbiogenese beteiligt.

Bei der Autophagocytosemutante  $\Delta cvt8$  konnte kein Wachstumsdefekt auf Ölsäuremedium detektiert werden (s. Abb. 4.11, S. 75). Auch die Untersuchung der Lokalisation der peroxisomalen Fluoreszenzmarker wies nicht auf einen Defekt in der Peroxisomenbiogenese hin (s. Abb. 4.12, S. 76). Bei der Untersuchung der

---

Lokalisation der peroxisomalen Katalase durch subzelluläre Fraktionierung, konnte jedoch festgestellt werden, dass diese in Zellaufschlüssen von  $\Delta cvt8$ -Mutanten partiell im Cytosol misslokalisiert war (s. Abb. 4.13, S. 78). Da jedoch auch das mitochondriale Matrixprotein mtHsp70 cytosolisch misslokalisiert war und in der Fluoreszenzmikroskopie keine Misslokalisierung peroxisomaler Marker festgestellt werden konnte, ist anzunehmen, dass  $\Delta cvt8$  – wie auch einige der Sekretionsmutanten (s. Abschn. 5.1.2, S. 103) – eine Instabilität der Organellenmembranen aufweist. Die Organellen werden dann beim Zellaufschluss zerstört und die Matrixproteine freigesetzt. Da Cvt8p zudem – zusammen mit Cvt4p – an der homotypischen Vakuolenfusion beteiligt ist, kann davon ausgegangen werden, dass Cvt8p nicht direkt an der Peroxisomenbiogenese beteiligt ist.

Alle anderen untersuchten Mutanten wiesen keinen Wachstumsdefekt und auch keine Misslokalisierung peroxisomaler Markerproteine auf. Es konnten somit keine neuen für die Peroxisomenbiogenese essentiellen Proteine gefunden werden. Es konnte auch keine Überlappung der Autophagocytose oder des *cytoplasm to vacuole transport* mit der Peroxisomenbiogenese nachgewiesen werden.

### 5.3 Pex16p-Orthologe

Pex16p ist beim Menschen [143] für die Peroxisomenbiogenese essentiell. In *S. cerevisiae* konnte bisher jedoch noch kein Orthologes identifiziert werden. Es wurden in *S. cerevisiae* fünf Proteine mit Sequenzähnlichkeiten zu Pex16p aus *Y. lipolytica* identifiziert – Rec107p, Ifh1p, Kap114p, Yer124cp und Yol075cp.

Ifh1p wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, da eine Mutante mit Deletion von *IFH1* nicht lebensfähig ist und keines der bisher identifizierten Peroxine essentiell für das Überleben der Zelle in Vollmedien ist. Es ist daher unwahrscheinlich, dass Ifh1p ein Pex16p-Orthologes darstellt.

$\Delta rec107$  besitzt einen generellen Wachstumsdefekt (s. Abb. 4.14) und die peroxisomalen Reporterkonstrukte konnten nicht detektiert werden. Rec107p Mutanten könnten somit auch einen Defekt in der Peroxisomenbiogenese aufweisen. Da sich der Phänotyp der menschlichen *pex16*-Mutante jedoch auf Störungen in der Peroxisomenbiogenese beschränkt, ist auch Rec107p kein Pex16p-Orthologes.

In den Mutanten  $\Delta kap114$ ,  $\Delta yer134c$  und  $\Delta yol975c$  konnte kein Defekt in der Peroxisomenbiogenese nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.14 und Ab-

bildung 4.15 auf Seite 80). Damit sind auch die hierzu korrespondierenden Proteine keine Pex16p-Orthologen. In der vorliegenden Arbeit konnte somit kein Pex16p-Orthologes identifiziert werden.

In einer Homologiesuche mit dem *S. cerevisiae* Peroxin Pex3p konnte festgestellt werden, dass die Pex3p-Orthologen in Säugetieren (Rn<sup>4</sup>Pex3p, Hs<sup>5</sup>Pex3p und Mm<sup>6</sup>Pex3p) und Pflanzen (At<sup>7</sup>Pex3p, Os<sup>8</sup>Pex3p) nur sehr wenig Ähnlichkeit zu Pex3p aus *S. cerevisiae* besitzt. Wie das Alignment im folgenden Abschnitt zeigt, weist dabei nur der N-Terminus von ScPex3p (AS 1- 170) signifikante Ähnlichkeit zu den Pex3p-Orthologen höherer Eukaryoten auf. Außerdem konnte in der Mutante *pas3-1* aus *S. cerevisiae*, die eine Mutation in Aminosäure 18 von Pex3p aufweist, die Peroxisomenbiogenese durch die Expression eines N-terminalen Fragments von Pex3p wiederhergestellt werden [20]. N- und C-Terminus von Pex3p können somit ihre Funktion auch erfüllen, wenn sie auf getrennten Proteinen lokalisiert sind. Es wäre somit möglich, dass in *S. cerevisiae* der C-Terminus von Pex3p die Funktion von Pex16p in der Peroxisomenbiogenese übernimmt. Ein solcher Prozess wäre nicht einmalig. So wurde bereits nachgewiesen, dass Pex20p aus *Neurospora crassa* die gleiche Funktion wie Pex18p und Pex21p in *S. cerevisiae* erfüllt und das Pex18p und Pex21p in *S. cerevisiae* durch NcPex20p ersetzt werden können [135]. Im Menschen wird die Funktion von ScPex18p/ScPex21p von der langen Isoform von Pex5p übernommen [25]. Wenn Pex3p aus *S. cerevisiae* die Funktion von menschlichem Pex3p und Pex16p übernehmen könnte, wäre dies somit nur ein weiteres Beispiel der Protein- bzw. Funktionsevolution.

### 5.3.1 Alignment ScPex3p

Im folgenden Alignment wurden die Aminosäuresequenzen der Pex3p-Homologen aus Säugetieren – RnPex3p, MmPex3p und HsPex3p – sowie der Pex3p-Homologen aus Pflanzen – AtPex3p und OsPex3p – jeweils mit Pex3p aus *S. cerevisiae* verglichen. Ähnliche Aminosäuren sind rot gekennzeichnet, identische Aminosäuren blau.

---

<sup>4</sup>*Rattus norvegicus*

<sup>5</sup>*Homo sapien*

<sup>6</sup>*Mus musculus*

<sup>7</sup>*Arabidopsis thaliana*

<sup>8</sup>*Oryza sativa*

```

1  ..MLRSMWNFLKRHKKCCIIFLGTVLGGVYILGKYGQKKLR RnPex3p
1  ..MLRSMWNFLKRHKKCCIIFLGTVLGGVYILGKYGQKKIR MmPex3p
1  ..MLRSVWNFLKRHKKCCIIFLGTVLGGVYILGKYGQKKIR HsPex3p
1  ...MDLVRGLWRKRRKILVTITCLGSGYLLYKLYNAHTR AtPex3p
1  ..MLASARGFWGRHRKILVSLGVAGAGYAAARYLDSHRR OsPex3p
1  MAPNQRSRSLLQRHRGKVLISLTGTAALFTTGSVVVFFVK Scpex3

39  EIQERE.....AAEYIAQARRQYHFESNQRTCNTVLS RnPex3p
39  EIQERE.....AAEYIAQARRQYHFESNQRTCNTVLS MmPex3p
39  EIQERE.....AAEYIAQARRQYHFESNQRTCNTVLS HsPex3p
38  KLADLERELANERENDEIITKTMKAHFDNIQMIADTTLP AtPex3p
39  QLVRVEQRALAEERAAEEIKNQLQTHFENVQKISDTTLP OsPex3p
41  RWLYKQQLR...ITEQHFIKEQIKRRFEQTQEDSLYT IYE Scpex3

72  .MLPTLREALMQQLNSESLTALLK..... RnPex3p
72  .MLPTLREALMQQLNSESLTALLK..... MmPex3p
72  .MLPTLREALMQQLNSESLTALLK..... HsPex3p
78  HAIHHLSSRVVEEIDVSSIMDKLSKGG..... AtPex3p
79  FAMHYLRSRIMEELDISHLTEKLMHGKGESAP..... OsPex3p
78  LLPVWRMVLNENDLNLDSIVTQLKDQKNQLTRAKSSESRE Scpex3

95  .NRPSNKLKLEIWEDIKIISFTRSIIVAVYSTCMLVVLRLRVQL RnPex3p
95  .SRPSNKLKLEIWEDIKIISFTRSIIVAVYSTCMLVVLRLRVQL MmPex3p
95  .NRPSNKLKLEIWEDIKIISFTRSTVAVYSTCMLVVLRLRVQL HsPex3p
106  ILIPSEKLLQWNEKILSFTRMVLSLWSVTMLSLYIRVQV AtPex3p
112  ALTPKKEKYDTWEKIKILSFTRTVSSIWAMTLLSLYVRVQV OsPex3p
118  SSPLKSKAELWNELELKSLEIKLVTVTYTVSSLILLTRLQL Scpex3

134  NIIGGYIYLDNATVG..... RnPex3p
134  NIIGGYIYLDNATVG..... MmPex3p
134  NIIGGYIYLDNAAVG..... HsPex3p
146  NILGRHLYIDTARGL..... AtPex3p
152  TILGRHLYLDFARVT..... OsPex3p
158  NILTRNEYLDSAIKLTMQQENCNKLQNRFYNNWVTSWWSDP Scpex3

149  ...KNGTSTLAP...PDVQQQYLSSIQHLLG.....DG RnPex3p
149  ...KNGTTVLAP...PDVQQQYLSSIQHLLG.....DG MmPex3p
149  ...KNGTTILAP...PDVQQQYLSSIQHLLG.....DG HsPex3p
161  ...GSSHLDELDLIERDDEKFLTSADFLAT.....SG AtPex3p
167  ...DGAQLQEGSDTFSKSGHKDFLATADYLAT.....YG OsPex3p
198  EDKADDAMVMAAKKSKKEGQEVYINEQAFLLSLSWILNKG Scpex3

```

176	LTELVT	V	K	Q	A	V	Q	R	I	L	G	S	I	S	L	K	H	S	L	S	L	L	D	L	E	Q	K	L	K	E	I	R	..	RnPex3p										
176	LTELVT	V	K	Q	A	V	Q	R	I	L	G	S	V	S	L	K	H	S	L	S	L	L	D	L	E	Q	K	L	K	E	I	R	..	MmPex3p										
176	LTELIT	V	K	Q	A	V	Q	K	V	L	G	S	V	S	L	K	H	S	L	S	L	L	D	L	E	Q	K	L	K	E	I	R	..	HsPex3p										
192	MP	S	L	I	S	N	M	Q	N	A	V	K	E	V	L	K	C	K	Q	L	K	D	V	L	I	T	S	A	L	R	E	T	V	M	R	I	L	..	AtPex3p					
198	I	N	A	L	I	T	K	M	Q	H	A	A	T	E	I	L	K	E	K	Q	L	K	D	P	M	G	I	D	E	V	L	E	T	I	L	Q	I	L	..	OsPex3p				
238	W	L	S	Y	N	E	I	T	N	Q	I	E	I	E	F	D	G	I	H	P	R	D	T	L	T	L	E	E	F	S	S	R	L	T	N	I	F	R	N	..	Scpex3			
214	.	T	L	V	E	Q	H	R	S	.	C	W	N	D	K	D	A	S	K	S	S	L	C	H	Y	M	M	P	D	E	E	T	P	L	A	A	Q	A	Y	G	..	RnPex3p		
214	.	I	L	V	E	Q	H	Q	S	.	S	W	N	D	K	D	V	S	R	S	S	L	C	Q	Y	M	M	P	D	E	E	T	P	L	A	A	Q	A	Y	G	..	MmPex3p		
214	.	N	L	V	E	Q	H	K	S	S	S	W	I	N	K	D	G	S	K	P	L	L	C	H	Y	M	M	P	D	E	E	T	P	L	A	V	Q	A	C	G	..	HsPex3p		
230	.	D	V	F	M	S	T	G	S	P	H	H	V	D	Y	L	M	S	Q	D	.	.	.	A	T	T	D	V	S	S	S	.	D	A	T	.	.	.	.	..	AtPex3p			
236	.	K	Q	F	M	G	L	C	E	D	N	S	W	I	N	Y	L	V	P	E	N	A	N	V	Y	A	Q	L	M	A	V	S	S	S	G	F	D	D	S	S	..	OsPex3p		
278	T	N	S	I	F	Q	Q	N	N	N	L	T	S	I	L	L	P	K	D	S	S	G	Q	E	F	L	L	S	Q	T	L	D	A	D	A	L	T	S	..	Scpex3				
252	L	S	P	R	D	I	T	T	I	K	L	L	N	E	T	R	D	M	L	E	S	P	D	F	S	T	V	L	N	T	C	L	N	R	G	F	S	R	L	L	..	RnPex3p		
252	L	S	H	R	D	I	T	T	I	K	L	L	N	E	T	R	D	M	L	E	S	P	D	F	S	T	V	L	N	T	C	L	N	R	G	F	S	R	L	L	..	MmPex3p		
253	L	S	P	R	D	I	T	T	I	K	L	L	N	E	T	R	D	M	L	E	S	P	D	F	S	T	V	L	N	T	C	L	N	R	G	F	S	R	L	L	..	HsPex3p		
262	.	.	.	.	V	T	K	F	H	L	L	I	T	E	T	R	E	V	L	T	S	N	D	F	S	N	V	A	E	I	S	L	K	C	C	A	V	A	L	V	..	AtPex3p		
275	L	L	K	D	V	R	K	L	D	Q	L	M	S	E	T	R	I	V	L	S	S	D	D	F	R	N	I	M	D	R	S	L	K	K	I	A	S	V	V	..	OsPex3p			
318	F	H	S	N	T	L	V	F	N	Q	L	V	N	E	L	T	Q	C	I	E	S	T	A	T	S	I	V	L	E	S	L	I	N	E	S	F	H	F	I	M	..	Scpex3		
292	D	N	M	A	E	F	F	R	P	T	E	Q	D	L	Q	H	G	M	S	I	N	S	L	S	S	V	S	L	P	L	A	K	I	I	P	I	V	N	G	Q	..	RnPex3p		
292	D	N	M	A	E	F	F	R	P	T	E	Q	D	L	Q	H	G	M	S	I	N	S	L	S	S	V	S	L	P	L	A	K	I	I	P	I	V	N	G	Q	..	MmPex3p		
293	D	N	M	A	E	F	F	R	P	T	E	Q	D	L	Q	H	G	M	S	M	N	S	L	S	S	V	S	L	P	L	A	K	I	I	P	I	V	N	G	Q	..	HsPex3p		
298	E	E	M	E	T	Q	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	AtPex3p
315	E	D	L	A	V	Q	I	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	OsPex3p	
358	N	K	V	G	I	K	T	I	A	K	K	P	G	Q	E	D	Q	Q	Y	Q	M	A	V	F	A	M	S	M	K	D	C	C	Q	E	M	L	Q	T	..	Scpex3				
332	I	H	S	V	C	S	E	T	P	.	S	H	F	V	Q	D	I	L	M	M	E	Q	V	K	D	F	A	A	N	V	Y	E	A	F	S	T	P	Q	Q	L	..	RnPex3p		
332	I	H	S	V	C	S	E	T	P	.	S	H	F	V	Q	D	I	L	M	M	E	Q	V	K	D	F	A	A	N	V	Y	E	A	F	S	T	P	Q	Q	L	..	MmPex3p		
333	I	H	S	V	C	S	E	T	P	.	S	H	F	V	Q	D	I	L	L	T	M	E	Q	V	K	D	F	A	A	N	V	Y	E	A	F	S	T	P	Q	Q	L	..	HsPex3p	
323	M	P	E	I	S	A	E	P	E	K	N	R	F	L	Q	L	I	R	D	L	P	E	V	K	L	F	F	T	L	Y	A	N	M	P	Q	.	.	.	.	..	AtPex3p			
343	S	L	P	L	L	E	E	P	D	K	N	K	H	I	Q	I	I	R	S	M	P	E	V	E	L	F	Y	T	F	L	Y	A	N	M	P	P	E	T	.	.	..	OsPex3p		
398	T	A	G	S	S	H	S	G	S	V	N	E	Y	L	A	T	L	D	S	V	Q	P	L	D	D	L	S	A	S	V	Y	S	N	F	G	V	S	S	S	F	..	Scpex3		
371	E	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	RnPex3p	
371	E	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	MmPex3p		
372	E	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	HsPex3p		
359	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	AtPex3p		
381	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	OsPex3p		
438	S	F	K	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	..	Scpex3		

---

## 5.4 Peroxisomale Membranbiogenese

In den meisten *pex*-Mutanten sind leere, peroxisomale Membranstrukturen – sogenannte *ghosts* – detektierbar [4, 30, 45]. In *pex3*-, *pex16* und *pex19*-Mutanten können keine *ghosts* detektiert werden [143, 142, 56]. Die meisten peroxisomalen Membranproteine sind in diesen Mutanten instabil [56]. Peroxisomale Matrixproteine sind cytosolisch lokalisiert [4, 30, 45]. In humanen Fibroblasten sind die mitochondrialen Membranproteine Pex14p, Pex3p, Pex12p und ALDP $\beta$  in *pex19*-Mutantenzellen mit mitochondrialen Strukturen kolokalisiert [126].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob es in *S. cerevisiae*  $\Delta$ *pex3* und  $\Delta$ *pex19*-Zellen peroxisomale Restrukturen gibt. Dazu wurde zunächst eine Saccharosegradientenzentrifugation durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnten in  $\Delta$ *pex19*-Zellaufschlüssen Membranstrukturen detektiert werden, die Pex3p, Pex13p und Pex14p enthielten (s. Abb. 4.17, S. 84). Diese Strukturen kolokalisierten im Saccharosegradienten mit Mitochondrien. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Lokalisation von Pex14p-EGFP konnte jedoch festgestellt werden, dass die Membranstrukturen nicht mit dem mitochondrialen Fluoreszenzmarker kolokalisieren (s. Abb. 4.19, S. 87). Die Pex3p-EGFP enthaltenden Membranstrukturen kolokalisierten teilweise mit Mitochondrien; das Fluoreszenzmuster unterschied sich jedoch deutlich von der mitochondrialen Färbung. Da nebeneinander liegende Organellen im Fluoreszenzmikroskop nicht voneinander unterscheidbar sind und auch in Wildtypzellen eine Überlagerung des Peroxisoms mit den Mitochondrien zu beobachten ist, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Pex3p-haltigen Membranstrukturen um Mitochondrien handelt. Die in  $\Delta$ *pex19* vorhandenen peroxisomalen Membranstrukturen sind demnach im Gegensatz zu humanen Zellen keine Mitochondrien.

Dass die beobachtete Pex14p-Lokalisation nicht durch die Fusion mit EGFP verursacht wurde, konnte durch immunologische Fluoreszenzmarkierung von Pex14p gezeigt werden (s. Abbildung 4.20 auf Seite 88).

Auch in  $\Delta$ *pex3*-Zellen waren im Saccharosegradienten Pex13p und Pex14p enthaltende Membranstrukturen detektierbar, die mit den Mitochondrien kolokalisierten (s. Abb. 4.17, S. 84). In der Fluoreszenzmikroskopie waren diese Strukturen jedoch deutlich von Mitochondrien unterscheidbar (s. Abbildung 4.19 auf Seite 87 und Abbildung 4.20 auf Seite 88). Auch in *Pichia pastoris* konnten in  $\Delta$ *pex3*-Mutanten Pex8p, Pex12p und Pex14p enthaltende Strukturen detektiert

werden, die deutlich von Mitochondrien unterscheidbar sind [53]. Diese, parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten, Arbeiten bestätigen somit die für *S. cerevisiae* erhaltenen Ergebnisse.

Für *Hansenula polymorpha* wurden vergleichbare Untersuchungen für *pex19*-Mutanten durchgeführt [111]. Auch hier konnten im Saccharosegradienten Pex3p und Pex14p enthaltende Membranstrukturen detektiert werden, die mit Mitochondrien kolokalisieren. Es konnte jedoch zusätzlich Pex3p in den cytosolischen Fraktionen detektiert werden und in Floatationsgradienten konnte nachgewiesen werden, dass dieser Teil des Pex3p nicht membrangebunden ist. *H. polymorpha* Pex3p (HpPex3p) wurde jedoch im Gegensatz zu *S. cerevisiae* Pex3p (ScPex3p) als peripheres Membranprotein charakterisiert [49] und HpPex3p kann in *H. polymorpha*  $\Delta pex19$ -Zellen in deutlich größeren Mengen detektiert werden als ScPex3p in *S. cerevisiae*  $\Delta pex19$ -Zellen. Daher könnte die Diskrepanz in den Ergebnissen auf die unterschiedlichen Proteineigenschaften von Pex3p in den beiden Organismen zurückzuführen sein.

Die in fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen für *H. polymorpha*  $\Delta pex19$ -Zellen gezeigten Pex14p-haltigen Strukturen, gleichen den in *S. cerevisiae* in der vorliegenden Arbeit beobachteten Strukturen. Wie in *S. cerevisiae* sind die Pex14p-haltigen Membranstrukturen deutlich von Mitochondrien unterscheidbar. Auf Grund ihrer räumlichen Nähe zu Mitochondrien wurde die in *H. polymorpha* beobachtete Pex14p-Lokalisation von den Autoren der obengenannten Arbeit jedoch als mitochondrial beschrieben.

In der Arbeit von Otzen et. al. [111] wurde außerdem die Lokalisation von ScPex3p in *S. cerevisiae*  $\Delta pex19$ -Mutanten durch subzelluläre Fraktionierung untersucht. Dabei wurde eine überwiegend cytosolische Lokalisation von Pex3p beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit Pex3p in *S. cerevisiae*  $\Delta pex19$ -Mutanten ausschließlich im Membranpellet gefunden werden (s. Abb. 4.18, S. 85). Diese Diskrepanz ist nur schwer erklärbar. Da ScPex3p in *S. cerevisiae*  $\Delta pex19$ -Mutanten jedoch schlecht detektierbar ist und der in beiden Arbeiten verwendete Antikörper viele Kreuzreaktionen verursacht, wäre es möglich, dass das Pex3p-Signal in der Arbeit von Otzen et. al. [111] durch ein Kreuzreaktionssignal überlagert wurde und es dadurch zu Fehlinterpretationen kam. In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Fehlinterpretation verhindert, indem die Zellen parallel durch Glasperlen ohne vorherige Spheroplas-



tierung aufgeschlossen wurden. Die Detektion des ScPex3p wurde dadurch deutlich verbessert (s. Abb. 4.18, S. 85). Die Membranassoziation von ScPex3p in  $\Delta pex19$ -Zellen konnte dabei bestätigt werden.

### 5.4.1 Drei Klassen peroxisomaler Membranproteine?

Fasst man die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse und die in den letzten Jahren veröffentlichten Daten zum Import von Membranproteinen zusammen, ergibt sich folgendes Bild: Zum einen gibt es peroxisomale Membranprotein vom Typ I, die Pex19p-abhängig zur peroxisomalen Membran transportiert werden [33]. Zum anderen gibt es peroxisomale Membranproteine vom Typ II (wie Pex3p), die Pex19p unabhängig importiert werden können. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass es in  $\Delta pex19$ -Zellen Pex3p und Pex14p enthaltende Membranstrukturen gibt, wäre es möglich, dass auch Pex14p unabhängig von Pex19p importiert werden kann. Die Existenz von geringen Mengen Pex13p in diesen Strukturen könnte auf die Interaktion von Pex13p mit Pex14p zurückzuführen sein. Ob auch Pex13p unabhängig von Pex19p importiert werden kann, bleibt deshalb nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit und den parallel dazu durchgeführten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den nachgewiesenen Strukturen um peroxisomale Prästrukturen – aus denen sich reife Peroxisomen entwickeln könnten – oder um Misslokalisationsstrukturen handelt. Sollte es sich bei den in  $\Delta pex3$  und  $\Delta pex19$  nachweisbaren peroxisomalen Membranstrukturen um Vorstufen der Peroxisomenbiogenese handeln, wäre auch Pex14p ein peroxisomales Membranprotein des Typs II. Wie diese Proteine importiert werden ist weiterhin unklar.

In Pflanzen gibt es *tail-anchored* Proteine wie Ascorbatperoxidase [102], die über das endoplasmatische Retikulum zum Peroxisomen transportiert werden [101]. Zu diesen Proteinen könnte auch das *S. cerevisiae* Protein Pex15p gehören, da es im pflanzlichen *in vitro* Importversuch wie die Ascorbatperoxidase in ER-Membranen importiert wird und außerdem die Charakteristika eines *tail-anchored* Proteins aufweist [144, 27].

Fasst man alle Ergebnisse zusammen, existieren drei Typen peroxisomaler Membranproteine: Typ I wird an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert, Pex19p-abhängig zur peroxisomalen Membran transportiert und dort mit Hilfe

eines noch unbekanntes Mechanismus in die peroxisomale Membran inseriert. Peroxisomale Membranproteine vom Typ II werden unabhängig von Pex19p in peroxisomale Membranstrukturen inseriert. Der Import dieser Proteine ist noch nicht charakterisiert. Peroxisomale Membranproteine vom Typ III (ScPex15p und APX) werden wahrscheinlich posttranslational in das ER importiert und dann zu den Peroxisomen transportiert. Wie dieser Transport stattfindet, wurde bisher nicht untersucht. Der Import dieser Proteine könnte jedoch teilweise mit dem Import anderer *tail-anchored* Proteine überlappen (siehe Abschnitt 5.1.5 auf Seite 106 und [144]).

## 5.5 Pex3p-Komplexe

Pex3p wird eine Rolle beim Import peroxisomaler Membranproteine zugeschrieben [131, 33, 134]. Über die genaue Funktion von Pex3p ist bisher nur sehr wenig bekannt. So konnten bisher nur Interaktionen von Pex3p mit Pex19p [23, 48, 139, 126, 134] und Pex15p [23] nachgewiesen werden, aber keine Interaktionen zu anderen peroxisomalen Membranproteinen. Da Pex3p ein integrales peroxisomales Membranprotein ist, das mit dem cytosolischen Membranproteinrezeptor und Chaparon Pex19p [134, 33] interagiert, wird außerdem angenommen, dass Pex3p Bestandteil eines putativen Translokons für den peroxisomalen Membranproteinimport ist. Die Untersuchung des Pex3p-Komplexes sollte daher einen Einblick in den Mechanismus dieses Prozesses ermöglichen.

Bei der Reinigung des Pex3p-Komplexes konnte außer dem schon bekannten Interaktionspartner Pex19p eine Interaktion mit Pex13p nachgewiesen werden (s. Abb. 4.24, S. 92). Die im Split-Ubiquitinsystem detektierte Interaktion zu Pex15p [23] konnte durch Komplexreinigung nicht verifiziert werden. Dies könnte jedoch daran liegen, dass der Titer und die Affinität des in der Arbeitsgruppe vorhandenen Pex15p Antikörpers sehr gering ist und somit geringe Konzentrationen von Pex15p nicht nachweisbar waren. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass bei der Aufreinigung von Pex15p-Komplexen, über Pex15p-ProteinA, vor Kurzem unter anderem auch Pex3p nachgewiesen werden konnte (persönlich Mitteilung Katja Rosenkranz<sup>9</sup>). Dies würde die im Split-Ubiquitinsystem nachgewiesene Interaktion von Pex3p mit Pex15p bestätigen. Außerdem konnten in

<sup>9</sup>Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum

---

Pex15p-Komplexen auch Pex13p und Pex14p in geringen Mengen nachgewiesen werden (Modell s.u.). In den Pex14p-ProteinA-Komplexreinigungen konnte jedoch – wie in den Pex3p-ProteinA-Komplexaufreinigungen – kein Pex15p nachgewiesen werden [2].

Parallel zu der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere Arbeiten zur Untersuchung des putativen Pex3p-Komplexes durchgeführt [53, 115]. In beiden Arbeiten wurden Komplexreinigungen durch Immunoisolierung von Pex3p durchgeführt. In der Arbeitsgruppe von Subramani wurde der Komplex jedoch vor der Aufreinigung mit dem DTT-spaltbaren Vernetzer DSP<sup>10</sup> behandelt [53]. In beiden Arbeiten konnte eine Interaktion von Pex3p mit Pex13p nachgewiesen werden; es konnten jedoch in den gereinigten Komplexen zusätzlich Pex14p und Pex17p detektiert werden. Beide Proteine sind Bestandteil des Importkomplexes für peroxisomale Matrixproteine [2]. Die Gruppe von Subramani konnte außerdem Pex2p, Pex10p und Pex12p nachweisen. In Bezug auf die Interaktion von Pex3p mit Pex13p stimmen die hier vorgestellten Ergebnisse aber mit den genannten Arbeiten überein.

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Versuchsansatz zur Komplexreinigung ähnelt dem von Uta Perband durchgeführten Experiment [115]. Uta Perband verwendete jedoch ein wesentlich geringeres Puffervolumen, um die Sepharose nach der Bindung des ProteinA zu waschen. Dadurch konnte sie in ihrer späteren Analyse deutlich mehr unspezifisch gebundene Proteine nachweisen, als dies in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Es war ihr dadurch jedoch auch möglich mehr spezifisch gebundene Proteine (Pex14p und Pex17p) nachzuweisen. Da die in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen zur Isolierung des Pex3p-Komplexes stringenter waren als die von Uta Perband gewählten und außerdem nachgewiesen wurde, dass Pex13p mit Pex14p und Pex17p einen Subkomplex des Importomer für peroxisomale Matrixproteine darstellt [2], ist anzunehmen, dass in der vorliegenden Arbeit nur direkte Interaktionen identifiziert wurden und die durch Uta Perband nachgewiesenen Interaktionen mit Pex14p und Pex17p über Pex13p stattfinden.

Da die Arbeitsgruppe von Subramani mit einem Vernetzer die Komplexe zusätzlich stabilisierte, war es möglich, auch die über Pex8p an den Pex13p-Komplex gebundenen Proteine Pex2p, Pex10p und Pex12p zu identifizieren (Im-

---

<sup>10</sup>Dithiobis(succinimidylpropionat)

portkomplex s. Abb. 1.3, S. 18).

Pex15p konnte auch von Uta Perband nicht in den Eluaten der Komplexereinigung nachgewiesen werden. Sie arbeitete jedoch mit dem gleichen Antikörper, der auch zur Detektion von Pex15p in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In den Arbeiten der Gruppe von Subramani wurde das Eluat nicht auf die Existenz von Pex15p oder Pex1p und Pex6p getestet.

Die Existenz eines großen Pex3p Komplex konnte durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Blauen-Nativen-Gelelektrophoresen und die Vernetzungsversuche bestätigt werden. So konnte in der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese von Eluaten der Pex3p-ProteinA-Komplexereinigung mit Pex19p-Antikörpern ein Komplex mit einer Größe von ca. 1MDa in kleinen Mengen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.26, S. 94). Da der Anteil dieses Komplexes am detektierbaren Pex3p jedoch sehr gering ist, erscheint es durchaus möglich, dass nicht alle Proteine dieses Komplexes im Immunoblot nachgewiesen werden konnten.

Da Pex3p ein integrales Membranprotein ist, wurden hauptsächlich Aufreinigungen aus dem Membransolubilisat durchgeführt. Bei Aufreinigungen des Pex3p-Komplexes aus dem cytosolischen Überstand zeigte sich jedoch, dass hier im Vergleich zu den Aufreinigungen aus dem Membransolubilisat mehr Pex19p und Pex13p nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.25, S. 93). Außerdem konnte im ungereinigten cytosolischen Überstand in der Blauen-Nativen Gelelektrophorese ein deutlich größerer Anteil des Pex3p in dem 1 MDa-Komplex detektiert werden als in ungereinigten Membransolubilisaten (s. Abb. 4.27, S. 95). Da die Zusammensetzung und Größe des im cytosolischen Überstand detektierten Pex3p-Komplexes ähnlich dem im Membransolubilisat detektierbaren Pex3p-Komplexes war, die Menge an mitgereinigten Proteinen jedoch größer war, kann folgendes angenommen werden: Es handelt sich um den gleichen Komplex, der im cytosolischen Überstand detektierbare Pex3p-Komplex ist jedoch stabiler als der in Membransolubilisaten nachweisbare. Da der Pex3p-Komplex des cytosolischen Überstandes membranassoziiert war (s. Abb. 4.31, S. 99), handelt es sich nicht um neusynthetisierte Proteine. Wahrscheinlicher ist, dass sich in dieser Fraktion Membranbruchstücke befanden, die während des Aufschlusses von der peroxisomalen Membran abgeschert wurden.

Während der Blauen-Nativen-Gelelektrophorese zerfällt der größte Teil des Pex3p-Komplexes zu einem ca. 100kDa Komplex (s. Abb. 4.26, S. 94). Bei diesem

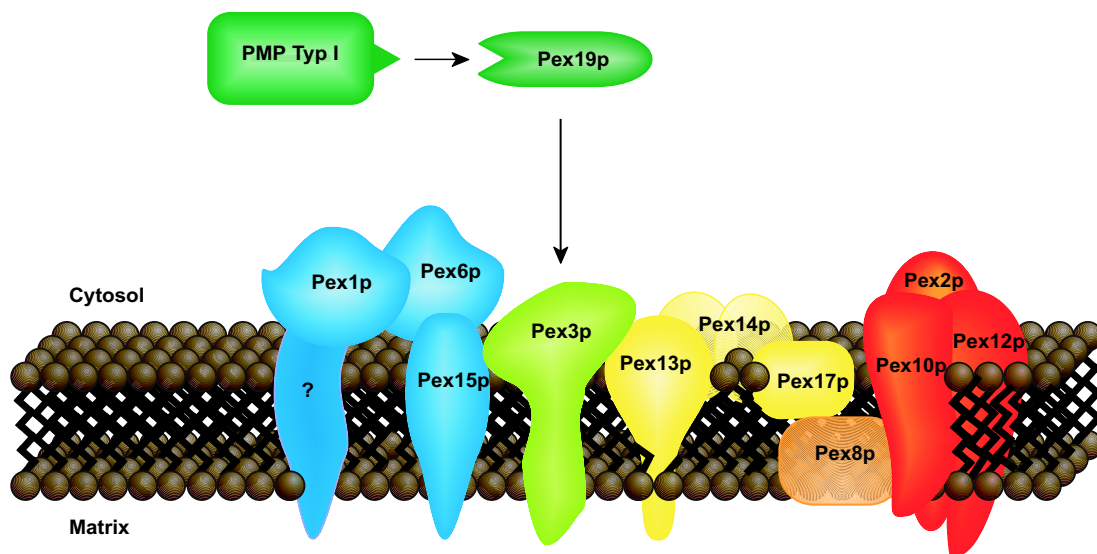
---

Komplex könnte es sich um ein Dimer aus Pex3p (48kDa) und Pex19p (40kDa) handeln, da er sowohl mit Antikörpern gegen Pex3p als auch mit Antikörpern gegen Pex19p nachweisbar war.

In den Vernetzungsexperimenten konnte die Existenz eines ca. 1MDa großen Komplexes bestätigt werden (s. Abb. 4.29, S. 98). Außerdem konnte ein 6-7MDa-Komplex nachgewiesen werden (s. auch Abb. 4.28, S. 97). Ob dieser Komplex ein Artefakt des Vernetzungsexperiments ist oder auch *in vivo* existiert, konnte nicht geklärt werden. Da er jedoch auch bei geringen Vernetzerkonzentrationen noch detektierbar ist, könnte es sich hierbei durchaus um eine *in vivo* existierenden Komplex handeln.

Aus den in dieser Arbeit und in parallel durchgeführten Untersuchungen gewonnen Ergebnissen kann ein neues Modell der Komplexorganisation an der peroxisomalen Membran erstellt werden (siehe Abbildung 5.2 auf der nächsten Seite). Danach verbindet Pex3p den AAA-Komplex aus Pex1p, Pex6p und Pex15p und dem noch unbekanntem Membrananker von Pex1p mit dem Importkomplex. Der Importkomplex besteht nach Agne et. al. [2] aus dem Komplex der Ring-Zinkfingerproteine Pex2p, Pex10p und Pex12p, der über Pex8p an den Komplex aus Pex13p, Pex14p und Pex17p gebunden ist. Außerdem bindet Pex19p an Pex3p und vermittelt so den Transport von peroxisomalen Membranproteinen (PMPs) vom Typ I zur peroxisomalen Membran [33]. Pex3p ist somit zum einen der Andockrezeptor für Pex19p und damit für PMPs vom Typ I. Zum anderen verbindet Pex3p den Importkomplex mit dem AAA-Komplex. Den putativen großen peroxisomalen Komplex bilden damit 10 der bisher bekannten 12 (zusätzlich Pex4p und Pex22p) am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligten, membrangebundenen Peroxine.

Da für Pex3p im Gegensatz zu Pex19p keine direkte Interaktion mit den peroxisomalen Membranproteinen vom Typ I nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass Pex3p nicht als Translokon für PMPs fungiert aber an der Organisation und Stabilisierung der peroxisomalen Membranproteine beteiligt ist. An der Insertion der Proteine ist dann entweder ein bisher noch nicht identifiziertes Protein beteiligt oder es wird hierfür kein weiteres Protein benötigt.



**Abbildung 5.2: Modell der peroxisomalen Komplexorganisation:** Nach der in der vorliegenden Arbeit postulierten Komplexorganisation verbindet Pex3p den AAA-Komplex aus Pex1p, Pex6p und Pex15p und dem Membrananker (?) von Pex1p mit dem Importkomplex. Der Importkomplex besteht aus dem Pex13p-Subkomplex, der Pex14p und Pex17p enthält, und dem Subkomplex der Ring-Zinkfingerproteine Pex2p, Pex10p und Pex12p. Die Subkomplexe des Importkomplexes werden über Pex8p miteinander verbunden.