

1 Einleitung

In eukaryotischen Zellen laufen komplexe biochemische Prozesse ab. Dies ist nur durch eine räumliche Trennung der einzelnen, in der Zelle ablaufenden Reaktionswege möglich. Ein komplexes System von Membranen und Organellen stellt daher membranumschlossene Reaktionsräume her. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Funktionen verfügen Organellen über charakteristische und dynamische Zusammensetzungen an Protein- und Lipid-Komponenten.

Nach der morphologischen Definition gehören die von DeDuve und Baudhuin 1966 zuerst entdeckten Peroxisomen der funktionell heterogenen Gruppe der Microbodies an (31). In der Rattenleber wurden sie als Organellen mit H₂O₂-produzierenden Katalasen und Oxidasen nachgewiesen (121) und obwohl sie ubiquitär vorkommen, waren sie zunächst kaum Gegenstand der Forschung. In den Fokus der Aufmerksamkeit rückten sie erst durch die Entdeckung, dass einige Krankheiten durch Funktionsstörungen der Peroxisomen verursacht werden (76).

Die durch eine einfache Lipidmembran begrenzten Organellen enthalten weder eigene Ribosomen noch DNA. Ihre Größe, Anzahl, Proteinzusammensetzung und biochemischen Funktionen variieren je nach Organismus, Zelltyp und exogenen Faktoren stark (70, 193, 230). Aus diesem Grund werden sie auch als multifunktionelle Organellen (155) bezeichnet und die Glyoxysomen höherer Pflanzen (17) zählen ebenso zu dieser Gruppe wie die Glycosomen von Trypanosomen (155). In Säugetierzellen sind sie an der Plasmalogensynthese (84), der Gallensäure- und Cholesterinbiosynthese (10, 118), dem Prostaglandin-Stoffwechsel (176) sowie dem Polyamin- und Purin-Metabolismus (199) beteiligt, bei niederen Pilzen beispielsweise an der Penicillinbiosynthese (146). Zusätzlich zu den bereits erwähnten H₂O₂-produzierenden Oxidasen und Katalasen verfügen sie über ein β -Oxidationssystem, wobei in niederen Pilzen der Fettsäureabbau ausschließlich in Peroxisomen, in menschlichen Zellen nur der Abbau langkettiger Fettsäuren in den Peroxisomen erfolgt. Zur Erforschung sowohl der Funktion peroxisomaler Proteine als auch der Organellenbiosynthese spielen verschiedene Hefearten (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* und *Pichia pastoris*), eine wichtige Rolle. In ihnen ist die Peroxisomenproliferation durch das Wachstum auf bestimmten Kohlenstoffquellen wie Fettsäure oder Ethanol induzierbar (53, 225) und setzt

funktionelle Peroxisomen voraus. Zur Identifizierung von Proteinen, die essentiell für das Organell sind, wurden aufgrund dieses Funktionszusammenhangs zahlreiche genetische Ansätze verfolgt (54, 192, 203). Anhand dieser Analysen werden Hefezellen, die einen Wachstumsdefekt auf Ölsäuremedium und einen daraus resultierenden *onu*-Phänotyp ("oleate non utilizer") zeigen, in zwei Gruppen unterschieden:

- in *fox*-Mutanten ("fatty acid oxidation"), die einen Defekt in einem Enzym der β -Oxidation aufweisen und in
- *pex*-Mutanten ("peroxisome assembly"), deren Peroxisomen aufgrund von Biogenesestörungen oder Misslokalisierung der Matrixproteine nicht mehr funktionell sind.

Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden in *S. cerevisiae* (50, 223, 252), *Hansenula polymorpha* (28), *Pichia pastoris* (82, 128) und *Yarrowia lipolytica* (150) werden mittlerweile drei *fox*- und 24 *pex*-Komplementationsgruppen beschrieben. Tabelle 1.1 ermöglicht eine Übersicht der bisher identifizierten Peroxine.

Tab. 1.1 Übersicht über bisher identifizierte Peroxine und ihre Charakteristika

Peroxin	Spezies/Referenzen	vorgeschlagene Funktion	Lokalisation
Pex1p	<i>Sc</i> ⁽⁵⁷⁾ , <i>Pp</i> ⁽⁹⁰⁾ , <i>Hs</i> ⁽¹⁶³⁾	Matrixproteinimport, Vesikelfusion	Speziesabhängig LP oder MGP
Pex2p	<i>Sc</i> ⁽⁵⁵⁾ , <i>Yj</i> ⁽⁴⁶⁾ , <i>P</i> ⁽²³⁵⁾ , <i>Pa</i> ⁽⁹⁾ , <i>Rn</i> ⁽²¹³⁾ , <i>Cg</i> ⁽²⁰⁵⁾ , <i>Mm</i> ⁽²⁴³⁾ , <i>Ld</i> ⁽⁶⁰⁾ , <i>Hs</i> ⁽¹⁸¹⁾	Rezeptor Recycling/ Translokation	IMP
Pex3p	<i>Sc</i> ⁽⁹²⁾ , <i>Hp</i> ⁽⁶⁾ , <i>Pp</i> ⁽²³⁹⁾ , <i>Hs</i> ⁽¹⁰⁷⁾	PMP Targeting/ Import	IMP
Pex4p	<i>Sc</i> ⁽²³⁸⁾ , <i>Hp</i> ⁽²¹⁸⁾ , <i>Pp</i> ⁽²⁷⁾	Ubiquitin Konjugase	LP, MGP
Pex5p	<i>Sc</i> ⁽²²²⁾ , <i>Yj</i> ⁽¹⁹⁸⁾ , <i>Hp</i> ⁽²¹⁹⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹³⁸⁾ , <i>Mm</i> ⁽⁷⁾ , <i>Cla</i> ⁽²⁴⁵⁾ , <i>At</i> ⁽¹⁹⁾ , <i>Nt</i> ⁽¹¹⁶⁾ , <i>Hs</i> ⁽³⁶⁾	PTS1-Rezeptor	LP, MGP, P
Pex6p	<i>Sc</i> ⁽²²⁶⁾ , <i>Yj</i> ⁽¹⁵⁰⁾ , <i>Hp</i> ⁽¹⁰⁸⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹⁹⁰⁾ , <i>Rn</i> ⁽²¹⁴⁾ , <i>Hs</i> ⁽²⁴⁷⁾	Matrixproteinimport, Vesikelfusion	Speziesabhängig LP oder MGP
Pex7p	<i>Sc</i> ⁽¹³³⁾ , <i>Pp</i> ⁽⁴⁷⁾ , <i>Kl</i> ⁽¹⁶⁸⁾ , <i>Hs</i> ⁽¹⁶⁾	PTS2-Rezeptor	LP, P
Pex8p	<i>Sc</i> ⁽¹⁷¹⁾ , <i>Hp</i> ⁽²³⁶⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹²⁷⁾	Matrixproteinimport	MGP, IP
Pex9p	<i>Yj</i> ⁽⁴⁴⁾	Matrixproteinimport	IMP
Pex10p	<i>Sc</i> ⁽⁵⁵⁾ , <i>Hp</i> ⁽²⁰²⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹⁰⁶⁾ , <i>At</i> ⁽¹⁷⁸⁾ , <i>Hs</i> ⁽²³³⁾	Rezeptor Recycling/ Translokation	IMP
Pex11p	<i>Sc</i> ⁽⁵³⁾ , <i>Cb</i> ⁽¹³²⁾ , <i>Tb</i> ⁽¹²⁹⁾ , <i>Rn</i> ⁽¹⁵⁹⁾ , <i>Hs</i> ⁽¹⁾	Proliferation, Lipid- Metabolismus	IMP
Pex12p	<i>Sc</i> ⁽³⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹⁰⁵⁾ , <i>Rn</i> ⁽¹⁵⁴⁾ , <i>Hs</i> ⁽²³⁾	Rezeptor Recycling/ Translokation	IMP

Peroxin	Spezies/Referenzen	vorgeschlagene Funktion	Lokalisation
Pex13p	<i>Sc</i> ⁽⁴⁸⁾ , <i>Hs</i> ⁽⁷⁹⁾ , <i>Cg</i> ⁽²¹²⁾	Matrixproteinimport/ Docking	IMP
Pex14p	<i>Sc</i> ⁽⁴⁾ , <i>Hp</i> ⁽¹¹⁴⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹⁰³⁾ , <i>Rn</i> ⁽¹⁸⁰⁾ , <i>At</i> ⁽⁸⁵⁾ , <i>Hs</i> ⁽⁶³⁾	Matrixproteinimport/ Docking	MGP, IMP
Pex15p	<i>Sc</i> ⁽⁴⁹⁾	Verankerung von Pex6p	IMP
Pex16p	<i>Yl</i> ⁽⁴⁴⁾ , <i>At</i> ⁽¹²⁶⁾ , <i>Hs</i> ⁽¹⁸⁸⁾	PMP Targeting/ Import	MGP, IMP, IP
Pex17p	<i>Sc</i> ⁽⁹⁸⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹⁸⁶⁾	Matrixproteinimport/ Docking	MGP
Pex18p	<i>Sc</i> ⁽¹⁶⁷⁾	PTS2-abhängiger Proteinimport, Cargoaggregation	LP, MGP
Pex19p	<i>Sc</i> ⁽⁷⁷⁾ , <i>Pp</i> ⁽¹⁸⁷⁾ , <i>Cg</i> ⁽¹⁰⁰⁾ , <i>Hs</i> ⁽⁶⁴⁾	PMP Targeting/ Import	LP, MGP
Pex20p	<i>Yl</i> ⁽²¹¹⁾	<i>Yl</i> PTS2-abhängiger Proteinimport	MGP
Pex21p	<i>Sc</i> ⁽¹⁶⁷⁾	<i>Sc</i> PTS2-abhängiger Proteinimport, Cargoaggregation	LP, MGP
Pex22p	<i>Pp</i> ⁽¹¹³⁾	Pex4p-Verankerung	IMP
Pex23p	<i>Yl</i> ⁽²²⁾	Matrixproteinimport	IMP
Pex24p	<i>Yl</i> ⁽²⁰⁰⁾	Matrixproteinimport/ PMP Targeting/ Import	IMP
Pex25p	<i>Sc</i> ⁽²⁰¹⁾	Proliferation und Teilung	MGP
Pex26p	<i>Hs</i> ⁽¹³⁵⁾	Rekrutiert Pex1p und Pex6p zur peroxiso- malen Membran	IMP
Pex27p	<i>Sc</i> ^(172, 201)	Regulierung der Größe und Anzahl von Peroxisomen	IMP

At=*Arabidopsis thaliana*

Cb=*Candida boidinii*

Cg=*Cricetulus griseur*

Cl=*Caenorhabditis elegans*

Cla=*Citrullus lanatus*

Hs=*Homo sapiens*

Hp=*Hansenula polymorpha*

Kl=*Kluyveromyces lactis*

Ld=*Leishmania donovani*

Mm=*Mus musculus*

Nt=*Nicotiana tabacum*

Pa=*Podospora anserina*

Pp=*Pichia pastoris*

Rn=*Rattus norvegicus*

Sc=*Saccharomyces cerevisiae*

Tb=*Trypanosoma brucei*

Yl=*Yarrowia lipolytica*

LP = Lösliches Protein

MGP = Membrangebundenes Protein

IMP = Integrales Membranprotein

IP = Intraperoxisomal

P = Peroxisom

Peroxisomale Biogenesestörungen innerhalb des humanen Metabolismus werden mittels klinischer Befunde in drei Gruppen unterteilt (66, 67, 83, 229):

Gruppe I umfasst die Erkrankungen der peroxisomalen Biogenese (PBD, *peroxisomal biogenesis disorders*), die durch einen generellen peroxisomalen Funktionsverlust gekennzeichnet sind. Hier liegen peroxisomale Matrixproteine im Cytosol misslokalisiert vor, und es können nur peroxisomale Membranstrukturen („ghosts“) nachgewiesen werden (175). Zu dieser Gruppe gehören Krankheiten wie die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), das Zellweger Syndrom (ZS) oder die infantile Refsum'sche Krankheit (IRD) (14, 122, 143).

Bei Krankheiten der **Gruppe II** liegt ein partieller Importdefekt peroxisomaler Matrixproteine vor, wie beispielsweise bei der rhizomalen Chondrodysplasia punctata (RCDP). Krankheiten der **Gruppe III** werden auf singuläre Enzymdefekte zurückgeführt, wie bei der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (X-ALD).

Die klinische Klassifizierung ist durch das breite Spektrum an Krankheitsverläufen erschwert. Schwere peroxisomale Defekte, die neurologische Schäden, Leber- und Niereninsuffizienzen erzeugen, führen oft kurz nach der Geburt zum Tod des betroffenen Patienten.

1.1 Biogenese von Peroxisomen

Die Frage, wie Peroxisomen entstehen, ist trotz intensiver Studien zur Biogenese dieser Organellen bisher nicht zu beantworten. Aus unterschiedlichen Organismen gewonnene experimentelle Daten sind nicht selten widersprüchlich, so dass daraus resultierende Modelle Wandlungen unterliegen und nicht jeden experimentellen Befund zufriedenstellend integrieren.

DeDuve und Baudhuin (31) stellten aufgrund elektronenmikroskopischer Beobachtungen die Hypothese auf, dass Peroxisomen sich aus Abknospungen des Endoplasmatischen Reticulums formieren. Peroxisomale Matrix- und Membranproteine müssen jedoch im Cytosol an freien Ribosomen synthetisiert und posttranslational in die Organellen importiert werden, so dass gegensätzlich zu dieser ER-Hypothese das „Wachstums- und Teilungs-Modell“ postuliert wurde (121). Demnach wachsen und teilen sich Peroxisomen nach Erreichen einer kritischen Größe. Dies schließt eine *de novo* Entstehung von Peroxisomen aus

und impliziert, dass in jeder Zelle mindestens ein Peroxisom vorhanden sein muss. Nach Heinemann und Just (87) werden neu synthetisierte peroxisomale Proteine hauptsächlich in kleine Präperoxisomen niedriger bis mittlerer Dichte importiert und reifen dann zu größeren Peroxisomen höherer Dichte. Die Existenz dieses präperoxisomalen Kompartiments oder Protoperoxisom ist jedoch umstritten (166). Die Involvierung des ER scheint aber nach neueren Daten wahrscheinlich. So sind die peroxisomalen Proteine Pex3p, Pex16p und Pex19p essentiell für die Biogenese von Membranen, da in den entsprechenden Deletionsmutanten keine peroxisomalen Membranen nachweisbar sind. Die in diesen Deletionsmutanten vorhandenen peroxisomalen Membranproteine (PMP) werden aufgrund einer erhöhten Proteolyse rate abgebaut (109), oder sind in Mitochondrien fehllokalisiert (153, 189). Werden diese Gene jedoch in den jeweiligen Mutanten überexprimiert, konnte eine Neogenese von Peroxisomen angeregt werden (77, 136, 188). Interaktionsstudien mit Pex19p haben gezeigt, dass es in der Lage ist, mit Regionen von Targetingsignalen zahlreicher peroxisomaler Membranproteine zu interagieren, weshalb Pex19p als Rezeptormolekül für PMP gilt (173). Pex3p und Pex16p scheinen als Interaktionspartner von Pex19p ihrerseits Pex19p-Rezeptoren zu sein (77, 173, 187). Anhand dieser Daten wird die Biogenese der peroxisomalen Membran in einem Modell, das sowohl die ER-Involvierung als auch die Hypothese der Reifung miteinbezieht, zusammengefasst:

Die Bildung peroxisomaler Vesikel, deren Ursprung in einem präperoxisomalen Kompartiment liegt, wird durch Pex3p, Pex19p und zusätzlich in *Homo sapiens* durch Pex16p vermittelt. Bereits existierende Peroxisomen wachsen durch den Einbau von PMP, Lipiden und den Import von Matrixproteinen bis zu einer kritischen Größe und teilen sich anschließend. Die Teilung des Organells erfolgt durch eine stimulierende Funktion von Pex11p auf diesen Teilungsprozess (53, 125, 132, 159, 177). Mit diesem Modell nicht in Einklang stehen Untersuchungen der Peroxisomenbiogenese in *Yarrowia lipolytica* (210). Die Reifung des Organells wird hier als eine sukzessive Vesikelfusion beschrieben, so dass dieser Organismus im Vergleich zu anderen vermutlich eine Sonderstellung einnimmt (36, 45, 188, 198, 207). In Abbildung 1.1 ist die Modellvorstellung der Peroxisomenbiogenese dargestellt.

Die genauen Mechanismen dieser Translokation der Matrixproteine, deren Dissoziation von ihrem Rezeptor und dessen Recycling sind bisher ungeklärt.

1.2.1 Signalsequenzen

Um die Importmechanismen von Peroxisomen besser verstehen zu können, werden die topogenen Signalsequenzen peroxisomaler Proteine intensiv untersucht. Es konnten unterschiedliche Signalsequenzen peroxisomaler Matrixproteine identifiziert und charakterisiert werden, die als PTS1 (*peroxisomales targeting signal*, peroxisomale Zielsteuerungssequenzen), PTS2 und PTS3 bezeichnet werden (112, 141, 194). Peroxisomale Membranproteine gelangen scheinbar mit Hilfe anderer Signalsequenzen oder Importmechanismen als Matrixproteine zum Peroxisom. Die Zielsteuerungssequenzen von PMP sind bis auf wenige Ausnahmen unbekannt und erscheinen insgesamt inhomogener als die der Matrixproteine.

1.2.2 PTS1

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine werden mit Hilfe des PTS1 in die Peroxisomen importiert. Es handelt sich hierbei um ein, am extremen C-Terminus befindliches Tripeptid-Sequenzmotiv mit der Konsensussequenz (S/A/C)(K/H/R)(L/M) (80, 120, 195). Dieses Motiv ist sowohl in Hefen, Pflanzen, Insekten als auch Säugern zu finden, jedoch sind Variationsmöglichkeiten spezifisch für einzelne Organismen und auch für einzelne Proteine zu finden (51, 81, 89, 144). So bestehen die Signalsequenzen der humanen Katalase und der 2-Methylacyl-CoA-Racemase aus *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* aus einem Tetrapeptid (-KANL) statt einem Tripeptid (165). Wichtig für Funktion und Erkennung des Signals durch den Rezeptor scheinen ebenfalls räumliche Präsentation des PTS1 und zusätzliche interne Signalsequenzen zu sein (117, 140, 144).

1.2.3 PTS2

Seltener als das PTS1 ist die PTS2-Zielsteuerungssequenz peroxisomaler Matrixproteine. Es ist ein bis zu 30 Aminosäuren, in seiner Sequenz konserviertes Nonapeptid (R/K)(L/V/I)X5(H/Q)(L/A/F) im Bereich des N-Terminus (32, 170, 195, 196). Diese Konsensussequenz wurde bislang in Säugern (101, 142, 156, 196), in Pflanzen (72), in Trypanosomen (11) und in der Hefe *S. cerevisiae* (52)

nachgewiesen. In einigen Organismen wird die PTS2-Erkennungssequenz nach dem Import in die Peroxisomen prozessiert (32, 73, 156, 198). Das am besten charakterisierte Protein dieser Klasse ist ein Enzym der β -Oxidation, die 3-Oxoacyl-CoA-Thiolase (Fox3p).

1.2.4 PTS3 und andere Importsignale

Auch peroxisomale Matrixproteine ohne PTS1- oder PTS2-Signal gelangen zielgesteuert zu Peroxisomen. Es ist zu vermuten, dass weitere, bislang unbekannte Sortierungssignale bekannter Importwege existieren. So ist Import der weder PTS1- noch PTS2-haltigen Acyl-CoA-Oxidase aus *S. cerevisiae* in die Peroxisomen von Pex5p abhängig (182). Die Acyl-CoA-Oxidase besitzt ein internes PTS3-Signal (112) und interagiert mit dem aminoterminalen Bereich von Pex5p statt mit dessen TPR-Domänen, welche für die PTS1-Erkennung notwendig sind.

Dass der Verlust des Importsignals nicht mit falschem Targeting einhergehen muss, ist anhand von Matrixproteinen ohne Zielsteuerungssequenz belegt, die nach der Bildung von Mischoligomeren mit PTS-haltigen Proteinen erfolgreich in Peroxisomen importiert wurden (75, 123, 140, 248).

1.2.5 mPTS

PMP werden an den Ribosomen des Cytosols synthetisiert und mit Hilfe cytosolischer und peroxisomaler Membrankomponenten in die peroxisomale Membran inseriert. Dieser Prozess ist im Gegensatz zu dem der Matrixproteine nicht ATP-abhängig (35, 99, 161, 237). Die bisher bekannten, für das Targeting des jeweiligen PMP notwendigen Aminosäuresequenzen lassen sich im Vergleich zu denen der Matrixproteine nur ungenügend zu Konsensus-Signalsequenzen zusammenfassen. So benötigt *CbPmp47* sowohl einen hydrophilen, aus 12 Aminosäuren bestehenden basischen Bereich, als auch eine angrenzende Transmembrandomäne zum effizienten Targeting des Proteins zur peroxisomalen Membran (40, 232). Für das Targeting und die korrekte Insertion des Proteins in die peroxisomale Membran des humanen orthologen Proteins sind drei Transmembrandomänen und angrenzende basische Aminosäuren notwendig (94). Pex3p benötigt entweder die ersten 40 Aminosäuren (von *Pichia pastoris*, *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*) oder die ersten 54 Aminosäuren (*Saccharomyces cerevisiae*), um zur peroxisomalen Membran zu gelangen (239).

Das mPTS von Pex3p liegt damit im N-terminalen Bereich des Proteins und umfasst einen konservierten Bereich positiv geladener Aminosäuren, gefolgt von einem hydrophoben Membrananker (71, 96, 107). Es bleibt die Frage offen, ob ein gemeinsames Sortierungssignal (mPTS) für peroxisomale Membranproteine existiert oder ob jedes Membranprotein durch eine spezifische Aminosäuresequenz zur peroxisomalen Membran gelangt.

1.2.6 Rezeptoren

Anhand funktioneller Komplementationsanalysen von Hefemutanten erfolgte die Identifizierung der Rezeptoren Pex5p und Pex7p (47, 133, 139, 151, 170, 197, 219, 250). Die Gene der humanen Rezeptorproteine hingegen wurden durch ihre Sequenzähnlichkeiten zu den orthologen Hefegenen gefunden oder mit Hilfe des Hefe Two-Hybrid-Systems entdeckt (16, 36, 61, 145, 168, 241).

1.2.7 PTS1-Rezeptor

Proteine mit PTS1-Signal werden von dem Rezeptor Pex5p erkannt und zur peroxisomalen Membran dirigiert. Erstmals in der Hefe *Pichia pastoris* (139) charakterisiert, konnte der PTS1-Rezeptor sowohl in Säugern (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, CHO-Zellen), als auch Hefen (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *H. polymorpha* und *Y. lipolytica*), Invertebraten (*C. elegans*), Pflanzen (*N. tabacum*, *C. vulgaris* und *A. thaliana*) und Protozoen (*Trypanosoma brucei* und *Leishmania donovani*) identifiziert werden (33, 36, 62, 102, 116, 139, 151, 198, 219, 222, 241, 245).

Der Pex5p-Rezeptor gehört zur Familie der TPR-Proteine (**t**etrat**r**ico**p**eptide **r**epeat), in deren C-terminalen Hälfte sechs bis sieben TPR-Motive zu finden sind. Die spezifische Bindung des Rezeptors an die PTS1-Sequenz konnte durch *in vitro*-Bindungsstudien (36, 61, 68, 69, 139, 204, 240), mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems (20, 62, 110), durch Mutagenese-Experimente und durch die Kristallstruktur des Pex5p-PTS1-Komplexes nachgewiesen werden. Bei Menschen, in CHO-Zellen und Mäusen liegt der PTS1-Rezeptor durch alternatives Spleißen in zwei verschiedenen Isoformen vor (15, 158). Die kurze Isoform Pex5pS ist für das Targeting PTS1-haltiger Proteine notwendig, während die lange Isoform Pex5pL zusätzlich für das Targeting von PTS2-Proteinen notwendig ist. In humanen Zellen vermittelt Pex5pL das Docking des Pex7p / PTS2-Proteinkomplexes an die peroxisomale Membran (15), (36, 38, 157). Es konnte

gezeigt werden, dass Pex5pL funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten zu ScPex18p und ScPex21p besitzt (38) und YPex20p, ScPex18p/ScPex21p und HsPex5pL gleiche Funktionen im frühen Importprozess von PTS2-Proteinen übernehmen (43).

1.2.8 PTS2-Rezeptor

Proteine mit PTS2-Signal werden von dem Rezeptor Pex7p erkannt und zur peroxisomalen Membran dirigiert. In einigen Hefen und Säugern konnte der Rezeptor charakterisiert werden (16, 47, 133, 145, 168, 250), während in *Y. lipolytica* bisher weder Pex7p noch Pex18p oder Pex21p identifiziert werden konnte. Die Rolle des Rezeptors übernimmt hier das lösliche Peroxin Pex20p, das darüber hinaus mit Pex8p interagiert. Der PTS2-Rezeptor ist notwendig zum Import PTS2-haltiger Proteine (47, 170, 251) und seine charakteristischen WD-40-Motive interagieren direkt mit dem PTS2-Nonapeptid (147, 224). Desweiteren benötigt er zum korrekten Targeting des Cargoproteins an die peroxisomale Membran die strukturell verwandten Proteine Pex18p und Pex21p als Ko-Rezeptoren (167). Der Import PTS2-haltiger Proteine ist komplett unterbrochen, sobald Pex18p und Pex21p fehlen. Der PTS1-Import ist davon nicht betroffen (167, 191). Die intrazelluläre Lokalisation der Importrezeptoren ist umstritten und wird verschiedentlich als weitgehend cytosolisch, membrangebunden oder intraperoxisomal beschrieben (29, 192, 234). Diese widersprüchlichen Verteilungen der Rezeptoren werden anhand von zwei unterschiedlichen Modellvorstellungen, diskutiert (37, 56, 134, 220):

1.2.9 Modell 1 (shuttle model)

Beide Rezeptoren sind überwiegend cytosolisch und an der peroxisomalen Membran lokalisiert. Sie erkennen PTS-haltige Proteine im Cytoplasma, binden sie dort und transportieren ihre Fracht an die peroxisomale Membran. Unter Dissoziation dieses Rezeptor-Fracht-Komplexes erfolgt die Übergabe der Frachtproteine an den Translokationsapparat (37). Die Rezeptoren verbleiben im Cytosol.

1.2.10 Modell 2 (extended shuttle model)

PTS-haltige Proteine werden von ihren Rezeptoren im Cytoplasma erkannt, gebunden und an die peroxisomale Membran transportiert. Dort werden die

Rezeptoren zusammen mit dem gebundenen Protein in die peroxisomale Matrix importiert. Der Rezeptor wird erst hier von seiner Fracht entkoppelt und gelangt zurück ins Cytosol (30, 221). Welches der beiden Modelle den Importprozess von Proteinen in die peroxisomale Matrix treffender beschreibt, ist Gegenstand aktueller Forschung.

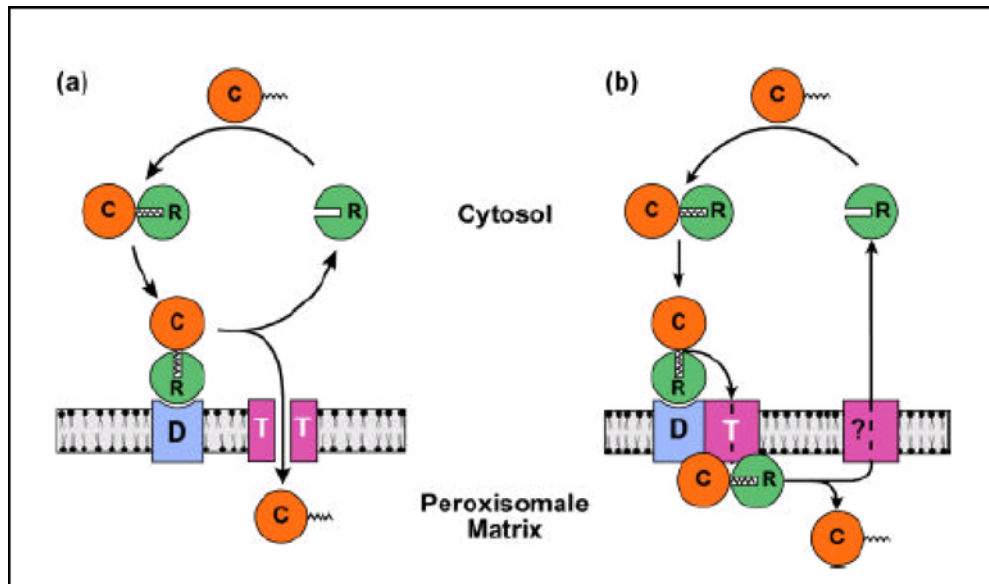


Abb. 1.2 Verschiedene Modelle für den Proteinimport in die peroxisomale Matrix

Die Graphik illustriert a) Modell 1 (shuttle model) und b) Modell 2 (extended shuttle model) für den Proteinimport in Peroxisomen. Das Cargoprotein wird im Cytosol vom Rezeptor gebunden, zum Dockingprotein der peroxisomalen Matrix gebracht und gelangt a) ohne den Rezeptor durch das Translokon in die peroxisomale Matrix oder b) wird mit dem Rezeptor in die peroxisomale Matrix importiert. Der Rezeptor wird nach Loslösung des Cargos in das Cytosol exportiert.

C=Cargo, R=Rezeptor, D= Dockingprotein, T=Translokon (nach (119)).

1.2.11 Peroxisomales Docking

Sowohl Modell 1 als auch Modell 2 setzen die Existenz von rezeptorspezifischen Bindeproteinen an der peroxisomalen Membran voraus. Mit Pex13p, Pex14p und Pex17p wurde dieser sogenannte Docking-Komplex identifiziert und näher charakterisiert. Das es sich um drei essentielle Proteine des peroxisomalen Matriximports handelt, zeigt der vollständige Importdefekt peroxisomaler Matrixproteine bei deren Funktionsausfall. Pex13p ist ein mit zwei Transmembrandomänen integrales Membranprotein, dessen Termini cytosolisch lokalisiert sind. In der C-terminalen Region befindet sich eine SH3-Domäne (*Src* Homologie 3), die direkt an Pex14p und Pex5p bindet (4, 13, 51, 54, 74, 98). Die Topologie von Pex14p ist umstrittener. Sie wird verschiedentlich als integral oder peripher beschrieben (4, 21, 115, 242), mit unterschiedlichen Lokalisationen der Termini (180, 242). Pex14p ist für den Import beider PTS-haltigen Proteinspezies

essentiell, was durch seine Interaktion mit beiden Importrezeptoren untermauert wird (62, 157, 180, 215). Zusätzlich interagiert es direkt über sein PXXP-Motiv mit der SH3-Domäne von Pex13p (13, 62, 74) und ist auch in der Lage mit sich selbst (4, 21) und mit Pex17p (98, 186) zu interagieren. Pex14p ist für Pex5p erster Bindungspartner an der peroxisomalen Membran (157, 174), während für Pex7p sowohl Pex14p als auch Pex13p als erste Bindungspartner an der peroxisomalen Membran diskutiert werden. Über die Funktion von Pex17p ist wenig bekannt. Bislang nur in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert (98), ist es ein peripheres, an der cytosolischen Seite der peroxisomalen Membran lokalisiertes Membranprotein. Es interagiert sowohl mit Pex14p (98) als auch in Abhängigkeit von Pex14p mit Pex5p (186). In Koimmunpräzipitations-Experimenten ist es mit Pex7p, Pex5p, Pex13p und Pex14p isoliert worden (2, 4, 98). In keinem der genannten Fälle ist klar, ob es sich um stabile oder transiente Komplexe handelt, wobei Beobachtungen zur Rezeptoraffinität in An- bzw. Abwesenheit von PTS1 zu Pex13p für transiente Wechselwirkungen sprechen (215).

Generell sind Peroxisomen in der Lage, gefaltete Proteine, Oligomere und importkompetente Goldpartikel von bis zu 9 nm Durchmesser zu importieren (140, 141, 227). Zusätzlich scheinen beim Import PTS-haltiger Proteine die Chaperone Hsp70p und das DnaJ-ähnliche Djp1p an der Substraterkennung oder der Zielsteuerung der Substrat-Rezeptor-Komplexe beteiligt zu sein (89, 228).

1.2.12 Translokation und Dissoziation

Die große Anzahl der für Pex5p identifizierten Interaktionspartner - Pex13p, Pex14p, Pex8p, Pex10p und Pex12p (2, 24, 79, 152, 171) - legt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor-Fracht-Komplex über eine Import-Kaskade in die peroxisomale Matrix gelangt. Da Pex5p ebenfalls mit der Zinkfinger-Domäne von Pex12p interagiert (152) und eine Mutation im Zinkfingermotiv von Pex2p zu einem selektiven Importdefekt von PTS1-Proteinen führt (97), wird den Zinkfingerproteinen die Funktion als Translokationspore zugesprochen (83, 93). Desweiteren ist sowohl der PTS1- als auch der PTS2-Import in *Scpex12Δ* unterbunden (3).

Dem intraperoxisomalen Protein Pex8p kommt beim Prozess der Translokation bzw. Dissoziation eine besondere Rolle zu. Pex8p scheint die Rolle einer intraperoxisomalen Schnittstelle zu übernehmen, indem es Docking-Komplex mit Zinkfinger-Komplex verbindet und so ein funktionsfähiges, sogenanntes

Importomer organisiert (2). Während in der Pex8p-Deletionsmutante der Import von PTS1- und PTS2-Proteinen in die peroxisomale Matrix unterbunden ist, wird in Liu *et al.* eine Mutante beschrieben, die einen spezifischen PTS1-Importdefekt aufweist (127). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich PTS1- bzw. PTS2-Importwege auf der Ebene von Pex8p trennen. Welche Funktion die Interaktion zwischen Pex8p und dem PTS1-Rezeptor Pex5p hat, verdeutlichen neuere Untersuchungen, die zeigen, dass Pex8p auf bisher unbekanntem Wege die Dissoziation eines Komplexes aus Pex5p und einem PTS1-Peptid bewirkt (231). Die Existenz beider Importsignale, PTS1 und PTS2, in der Aminosäuresequenz von Pex8p führte zu der Vermutung, Pex8p könne über einen oder beide Rezeptoren zur peroxisomalen Membran gelangen. Es konnte aber gezeigt werden, dass Pex5p mit Pex8p unabhängig von dessen PTS1-Signal interagieren kann, sodass eine zweite Bindestelle von Pex5p innerhalb von Pex8p postuliert wurde (171). Zwar konnte damit ein PTS1-typischer Import von Pex8p durch Pex5p zum Peroxisom ausgeschlossen werden, neuere Untersuchungen zeigen aber, dass der Import peroxisomaler Matrixproteine ohne PTS1-Signal über eine N-terminale Bindestelle des Rezeptors Pex5p verlaufen kann (111).

In *Y. lipolytica* wird eine Interaktion zwischen *Y*Pex8p und *Y*Pex20p beschrieben (184) und die Lokalisation von *Y*Pex8p war nicht von *Y*Pex20p abhängig. *Y*Pex20p, *Sc*Pex18p/Pex21p und *Hs*Pex5pL gelten als Funktionshomologe beim Import von PTS2-haltigen Proteinen in die peroxisomale Matrix (43). Sowohl die weitere Charakterisierung der Interaktionen von Pex8p zu seinen identifizierten Interaktionspartnern sowie die Untersuchung des Targeting von Pex8p zur peroxisomalen Membran sind Gegenstand dieser Arbeit.

1.2.13 Rezeptor-Recycling

Ausgehend vom „**extended shuttle model**“ des peroxisomalen Matriximportes werden für die Peroxine Pex4p, Pex22p sowie Pex1p und Pex6p unterschiedliche Funktionen diskutiert. Pex4p gehört zur E2-Familie der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (Ubc10p oder E2) (27, 238) und ist an der cytosolischen Seite der peroxisomalen Membran lokalisiert. Es interagiert mit dem integralen Membranprotein Pex22p und wird höchstwahrscheinlich auch durch dieses an die peroxisomale Membran rekrutiert (113). In *Hansenula polymorpha* hat eine Deletion von *PEX4* einen Defekt des PTS1-Importweges zur Folge. Dieser kann durch Überexpression von Pex5p kompensiert werden (217). Durch

Epistasestudien in den Deletionsmutanten *pex1Δ*, *pex4Δ*, *pex6Δ* und *pex22Δ* wird diesen Peroxinen eine Funktion nach dem Import des Rezeptor-Fracht-Komplexes in das Organell zugeordnet, und es 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 (26). Die Peroxine Pex1p und Pex6p sind ATPasen und gehören zur funktionell uneinheitlichen Familie der AAA-Proteine ("ATPases associated with various cellular activities") (58, 160), die an vielfältigen zellulären Mechanismen wie zum Beispiel an der Proteindegradation und dem Vesikel-vermittelten Proteintransport beteiligt sind. AAA-Proteine sind in der Lage, Proteinkomplexe zu binden und deren Interaktionen unter ATP-Verbrauch zu modifizieren oder aufzulösen. Pex1p und Pex6p könnten die für den Recyclingprozess notwendige Abtrennung der Rezeptoren von der Translokationsmaschinerie bewerkstelligen und diese an den Pex22p-Pex4p-Komplex weiterleiten (93, 160). Widersprüchlich dazu wird in *Y. lipolytica* den AAA-Proteinen eine Funktion in der frühen Peroxisomenfusion zugeordnet (206, 208, 209). Das in Abbildung 1.3 dargestellte Modell fasst die verschiedenen Schritte des peroxisomalen Proteinimports zusammen:

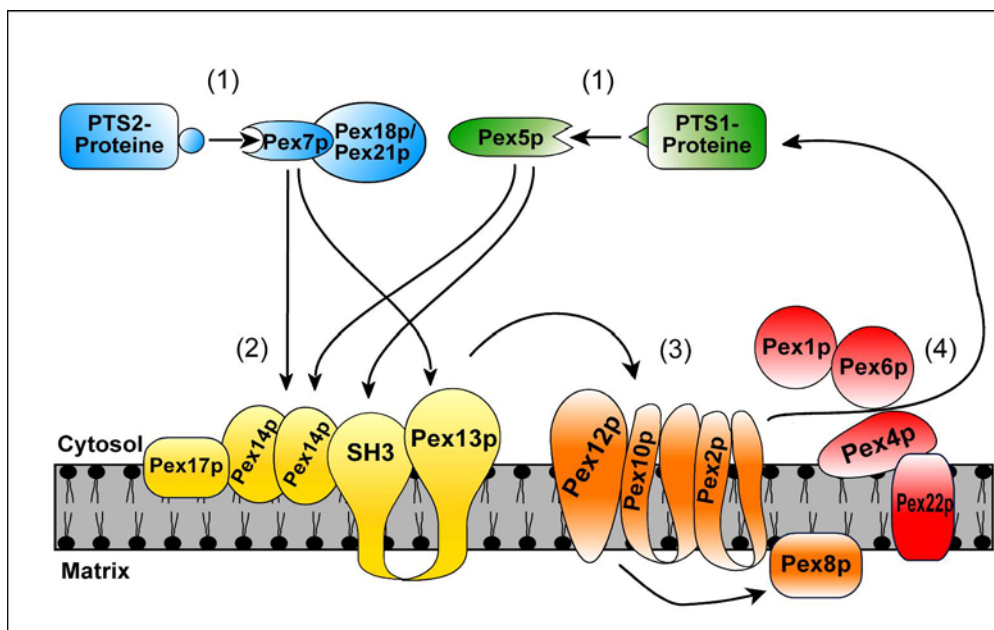


Abb. 1.3 Modell des peroxisomalen Proteinimports

(1) Peroxisomale Matrixproteine mit Signalsequenzen (PTS) werden von den Rezeptoren Pex5p und Pex7p im Cytosol gebunden und zum Docking-Komplex (2) der peroxisomalen Membran gebracht. Ausgehend vom „extended shuttle model“ erfolgt (3) die Translokation der Rezeptor-Cargo-Komplexe in die peroxisomale Matrix. Nach deren Dissoziation findet das Rezeptor-Recycling statt (4). (nach (93)).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit stand die funktionelle Analyse des Peroxins Pex8p im Vordergrund. Seine Funktion innerhalb des PTS1- als auch des PTS2-Importweges sollte näher charakterisiert werden. Dazu wurden folgende Punkte bearbeitet:

- Identifizierung weiterer peroxisomaler Interaktionspartner von Pex8p
- Einengung der Interaktionsbereiche von Pex8p zu Pex5p und zu neu identifizierten Interaktionspartnern
- Two-Hybrid-Untersuchungen zur Abhängigkeit der identifizierten Interaktionen von weiteren peroxisomalen Proteinkomponenten
- Mutationsanalyse von Pex8p zur Identifizierung des für die Interaktion von Pex8p zu Pex5p notwendigen Bereiches und damit einhergehende Analysen
- Untersuchung des Targeting von Pex8p in Abhängigkeit der Rezeptoren Pex5p und Pex7p