

## 4 Diskussion

Der Import peroxisomaler Matrixproteine ins Peroxisom erfolgt durch das koordinierte Zusammenwirken von cytosolischen und membranständigen Peroxinen (93). Die beiden Rezeptoren Pex5p (139, 222) und Pex7p (47, 170, 251) binden Cargoproteine im Cytosol und gelangen dann an Komponenten der membranständigen Dockingmaschinerie. Diese Komponenten sind sowohl Pex13p (48, 74, 79) als auch das als „point of convergence“ geltende Pex14p (4, 98). Das Modell der Importkaskade beschreibt sowohl die sukzessiven Bindevorgänge zwischen Rezeptoren und membranständigen Komponenten, als auch Translokations- und Recyclingvorgänge (93), wobei der Translokationsprozess analytisch nur unzureichend beschrieben ist. Aufgrund seiner intraperoxisomalen, membranassoziierten Lokalisation wird Pex8p unter anderem die Funktion eines intraperoxisomalen Organisators der peroxisomalen Importmaschinerie zugeordnet (2). In Pex8p-Deletionsmutanten ist der Import sowohl von PTS1- als auch PTS2-Proteinen inhibiert. Membranproteine wie Pex14p gelangen in dieser Mutante weiterhin zur peroxisomalen Membran (171). Welche Funktion die Interaktion zwischen Pex8p und Pex5p bzw. Pex7p hat, ist bisher gänzlich unbekannt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere Komponenten der Rezeptor-/Docking-Maschinerie zu identifizieren mit denen Pex8p interagiert.

In einem zweiten Schritt sollten die Interaktionsbereiche zwischen Pex8p und den in Frage kommenden Peroxinen eingengt und die Abhängigkeit dieser Interaktionen von anderen Peroxinen in verschiedenen Two-Hybrid-Stämmen untersucht werden. Anschließend sollte eine Mutationsanalyse Aufschlüsse über Funktion von Pex8p geben.

Schließlich sollte, neben der Funktionsanalyse von Pex8p, dessen Targeting in Abhängigkeit der Rezeptoren Pex5p und Pex7p untersucht werden.

### 4.1 Die verschiedenen Interaktionspartner von Pex8p

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Two-Hybrid-Analysen konnten Interaktionspartner von Pex8p – nämlich Pex7p, Pex14p und Pex8p selbst – identifiziert werden (3.2, 3.9). In den weiteren Untersuchungen wurden keine

Interaktionen mit anderen Peroxinen der Docking-Maschinerie – Pex13p und Pex17p – ermittelt. Auch zu Peroxinen der Zinkfinger-Klasse und Peroxinen anderer Funktionskreise (3.2) wurden keine Interaktionen festgestellt. Ebenfalls kommt Fox3p als Interaktionspartner von Pex8p nicht in Frage. Obwohl Pex8p in einem heteromeren Komplex aus Proteinen des Docking-Komplexes und Zinkfinger-Komplexes zu finden ist (2), kann damit keine Interaktion zwischen Pex8p und den Peroxinen Pex10p, Pex12p (C-Terminus), Pex13p und Pex17p nachgewiesen werden.

Es ist zu ergänzen, dass von Deckers (34) eine Interaktion zwischen Pex8p und Pex13p beschrieben wird. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten ihre Ursache in der Verwendung verschieden sensitiver Two-Hybrid-Stämme oder der Benutzung verschiedener Reportergene haben. Ebenfalls ist zu bemerken, dass Pex8p sowohl ein PXXP- (Aminosäure 84-87) als auch ein WXXXF-Motiv (Aminosäure 95-99) besitzt. Im Vergleich zu Pex14p zeigt sich, dass die Lage der Motive in beiden Proteinen nahezu deckungsgleich ist. In Pex14p liegt das PXXP-Motiv bei den Aminosäuren 87-90, das WXXXF-Motiv bei den Aminosäuren 94-98. In Pex14p sind beide Motive notwendig für die Bindung von Pex14p an Pex13p (74, 162) (148). Damit ist eine Interaktion zwischen Pex8p und Pex13p nicht vollständig auszuschliessen und wird im Modell zu möglichen Wirkmechanismen von Pex8p (Abb. 4.1) berücksichtigt. Pex8p ist also neben dem Transmembranprotein Pex13p und dem peripheren Membranprotein Pex14p ein intraperoxisomales peripheres Membranprotein, das ebenfalls mit beiden Rezeptoren interagieren kann. Pex14p ist in *Saccharomyces cerevisiae* ein auf der cytosolischen Seite peripheres peroxisomales Membranprotein (4). Sein dem Cytosol zugewandter C-Terminus ist in der Lage, sowohl Pex5p als auch Pex7p zu binden (148). *In-vitro*-Bindungen des Pex5p-Rezeptors an Pex14p (235-341 aa) und des Pex7p Rezeptors an Pex14p sind belegt (148, 191).

Pex14p gilt als „point of convergence“ – also als die Stelle, an der beide Importwege an der dem Cytosol zugewandten Seite der peroxisomalen Membran zusammenlaufen. Es stellt sich demnach die Frage, ob Pex8p der intraperoxisomale „point of convergence“ ist.

## 4.2 Einengung der Interaktionsbereiche von Pex8p zu den identifizierten Peroxinen

Bei Betrachtung der Interaktionen Pex8p-Pex5p, Pex8p-Pex7p, Pex8p-Pex8p und Pex8p-Pex14p wird deutlich, dass sich der Interaktionsbereich zwischen Pex8p und Pex5p, Pex8p bzw. Pex14p mit dem Bereich Pex8p/KS4 (146-586 aa) nur geringfügig eingrenzen läßt (3.4-3.7), während Pex7p das gesamte Pex8-Protein zur Interaktion benötigt. Pex5p, Pex8p und Pex14p interagierten im Vergleich der Verkürzungskonstrukte ausschließlich mit Pex8p/KS4 (146-586 aa). Aufgrund ungenügend sensitiver Antikörper war eine Expressionskontrolle der einzelnen Verkürzungskonstrukte Pex8p/KS1 (19-293 aa), Pex8p/KS2 (293-586 aa), Pex8p/KS3 (19-440 aa) und Pex8p/KS4 (146-586 aa) nicht möglich, so dass eine mangelhafte Expression der Fusionsproteine nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Die Interaktion von Pex8p zu Pex5p verläuft sowohl ohne das PTS1-Signal von Pex8p als auch ohne die TPR-Domänen von Pex5p (3.5). In Rehling *et al.* konnte eine nur sehr schwache Interaktion zwischen Pex8p bzw. Pex8p $\Delta$ PTS1 und Pex5p (1-308 aa) gezeigt werden (171). Die in dieser Arbeit untersuchte Interaktion zwischen Pex8p/KS4 (146-586 aa) und Pex5p (1-312 aa) ist deutlich und damit offensichtlich stabiler. Es wäre möglich, dass die Aminosäuren 309-312 von Pex5p einen Einfluss auf die Stärke der Interaktion zwischen Pex8p und Pex5p haben. Gleichzeitig ist durch diese Analyse eine importtypische Bindung der TPR-Domänen des Rezeptors an das PTS1-Signal von Pex8p ausgeschlossen (68, 69). Es bleibt offen, ob Pex8p seinerseits trotzdem in der Lage ist, mit den TPR-Domänen von Pex5p zu interagieren.

Die nur geringe Eingrenzung des Interaktionsbereiches deckt sich mit den Analysen von Y/Pex8p, dessen Bindebereich zu Y/Pex20p ebenfalls nur geringfügig N- und C-terminal eingrenzbar ist (183). Zur Interaktion von Y/Pex8p mit Y/Pex20p kann Y/Pex8p N-terminal nur um 11, C-terminal nur um 27 Aminosäuren verkürzt werden. Daher kann nicht eindeutig die Funktionalität des putativen PTS2-Signals von Pex8p geklärt werden (3.6). Es ist eher anzunehmen, dass die Interaktion zwischen Pex8p und seinen Interaktionspartnern nicht auf einer Information der Primärsequenz von Pex8p beruht, sondern einer strukturellen Eigenschaft von Pex8p zugrunde liegt.

Topogene Informationen könnten also zur Interaktion dieser Proteine notwendig sein, so dass Verkürzungen die Integrität einer dreidimensionalen Struktur zerstören und damit die Interaktion unterbinden würden.

In dieser Arbeit konnte eine Interaktion zwischen Pex8p mit sich selbst festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen zur Interaktion zwischen *HpPex5p* und *HpPex8p* (231), in denen das in *E. coli* heterolog exprimierte Peroxin *HpPex8p* sich pH-unabhängig wie ein Monomer verhält. Ebenfalls pH-unabhängig ist *HpPex8p* in der Lage, mit *HpPex5p* einen heterodimeren Komplex zu bilden. Gleichzeitig schlägt das Pre-Implex-Modell vor, dass cytosolische, tetramere Pex5p-Komplexe vier PTS1-Proteine binden (78). Dies wird durch Untersuchungen von Wang *et al.* unterstützt (231). *In vivo*-Untersuchungen werden zeigen müssen, ob der cytosolisch tetramere Rezeptorkomplex im peroxisomalen Lumen in monomere Rezeptoren zerfällt oder in anderer Stöchiometrie an Pex8p bzw. Pex8p-Oligomere bindet.

### **4.3 Die Abhängigkeit der Interaktionen zwischen Pex8p und Pex5p, Pex7p und Pex14p von anderen Peroxinen**

Um die Abhängigkeit der Interaktionen zwischen den Peroxinen Pex8p/KS4 (146-586 aa) und Pex5p, Pex8p und Pex7p, Pex8p/KS4 (146-586 aa) und Pex14p von anderen Peroxinen zu untersuchen, erfolgte eine Two-Hybrid-Analyse in unterschiedlichen peroxisomalen Mutanten (3.8). Keines der untersuchten Peroxine scheint die Interaktionen zwischen Pex8p und Pex5p bzw. Pex7p derart zu beeinflussen, dass sie ausfallen. Die ablaufenden Interaktionen werden also vermutlich von keinem weiteren Peroxin vermittelt.

Die Interaktion von Pex8p zu Pex14p in den verschiedenen Mutanten ist nicht einheitlich zu beschreiben. Generell ist schwer zu beantworten, welche Aufgabe den einzelnen fehlenden Peroxinen bei der Vermittlung der Pex8p-Pex14p-Interaktion zukommt, da deren Funktion oft nur unzureichend beschrieben ist. Weiter zu beachten ist, dass zur Interaktion der Peroxine deren Import und der Import der akzessorischen Peroxine in den Zellkern erfolgen muss. Daher ist es durchaus möglich, dass einige Peroxine, besonders Membranproteine, diesen Ko-Import nicht mitvollziehen können. Auffallend ist, dass Peroxine sowohl der

Funktionskreise „Cargo-Rezeptor-Bindung“, „Docking-Maschinerie“ als auch der „Rezeptor-Translokation“ eine Rolle bei der Vermittlung der Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p zu spielen scheinen. Daher sollen im Folgenden die Interaktionsausfälle unter Einbeziehung verschiedener Daten kritisch auf direkte oder indirekte Effekte hin betrachtet werden.

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pex8p in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren. Pex14p ist ebenfalls in der Lage mit sich selbst zu interagieren. So könnte es möglich sein, dass bei Fehlen des jeweiligen Dimerisierungspartners im Falle von *pex8Δ* die Interaktion geschwächt ist, oder sogar, wie bei *pex14Δ*, gänzlich ausfällt. Agne *et al.* konnten zeigen, dass ein Fehlen von Pex14p indirekt das Fehlen des Rezeptors Pex5p nach sich zieht (2). Da das Fehlen von Pex5p die Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p unterbindet, könnte dies ebenfalls der Grund für den Ausfall der Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p in *pex14Δ* sein. Desweiteren ist bekannt, dass das Fehlen von Pex13p die Stabilität von Pex14p herabsetzt (74). Pex14p ist in *pex13Δ* instabil und damit als Folgeeffekt auch Pex5p, so dass die Interaktion in *pex13Δ* ausfällt. Es bleibt offen, ob dieser Effekt der Instabilität von Pex14p in Abwesenheit von Pex13p auch im Two-Hybrid-System eine Rolle spielt. Die Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p wird ebenfalls durch das Fehlen von Pex7p geschwächt, durch das Fehlen von Pex21p gänzlich unterbunden. Die redundanten Peroxine Pex18p/Pex21p interagieren mit Pex7p. ScPex18p/ScPex21p gelten als Funktionshomologe zu Y/Pex20p, welches mit Y/Pex8p interagiert. Es wäre also zukünftig nachzuprüfen, ob ScPex8p mit ScPex18p/ScPex21p interagieren kann. Ebenso beeinflusst das Fehlen der Zinkfingerproteine die Interaktion von Pex8p zu Pex14p. Auch die Peroxine dieses Komplexes sind in der Lage mit Pex5p zu interagieren (3, 24, 97, 152). Es stellt sich also generell die Frage, ob die Pex8p-Pex14p-Interaktion nicht ausschließlich von den Rezeptoren und den akzessorischen Proteinen (Pex18p, Pex21p) bestimmt wird und jegliches Fehlen membranständiger Komponenten, die ebenfalls mit diesen Rezeptoren interagieren dann zu einem Verlust dieser Pex8p-Pex14p-Interaktion führen.

#### 4.4 Die Mutationsanalyse von Pex8p

Diese Mutationsanalyse wurde durchgeführt, um notwendige Interaktionsbereiche in Pex8p zur Bindung von Pex5p zu definieren. Alle identifizierten Klone wiesen multiple Veränderungen der DNA-Sequenz auf. Eine Mutationsrate von einer Mutation pro *PEX8*-Gen wäre für diese Art der Funktionsanalyse normal und vermutlich durch weniger stringente Mutationsbedingungen erreichbar.

Die in Kapitel 3.10.1 beschriebene Mutationsanalyse führte zu der Untersuchung der drei Punktmutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P), die in unterschiedlicher Weise zu einem Ausfall der Interaktionen zwischen Pex8p und Pex5p führten. Tabelle 4.1 fasst das Interaktionsprofil dieser Mutationen zusammen.

**Tab. 4.1 Tabellarische Zusammenfassung der Interaktionen der Mutationen Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V), Pex8pM-D (T327P) mit den Peroxinen Pex5p, Pex7p und Pex14p**

Mutation/ Interaktionspartner	Pex8pM-A (S231P),	Pex8pM-C (A238V),	Pex8pM-D (T327P)
Pex5p	-	-	+
Pex7p	-	+	-
Pex14p	-	-	-

+ Interaktion  
- keine Interaktion

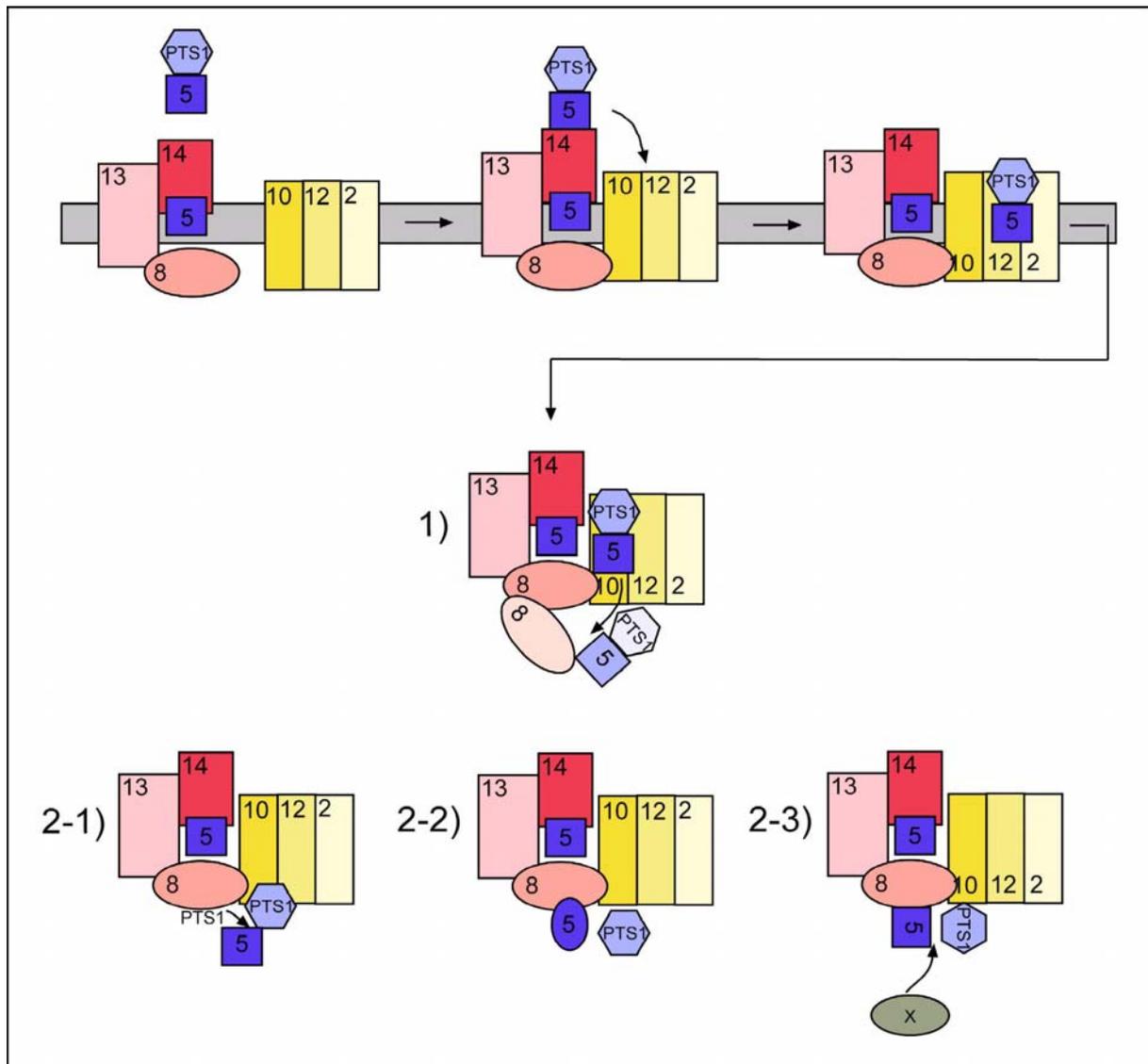
Es zeigte sich, dass diese Mutationen ebenfalls die Interaktionen zwischen Pex8p und Pex7p beeinflussen. Die Mutationen Pex8pM-A (S231P) und Pex8pM-C (A238V) führen zu einem Interaktionsverlust zwischen Pex8p und Pex5p, auch mit dessen PTS1-Signal, während die Mutationen Pex8pM-A (S231P) und Pex8pM-D (T327P) zu einem Interaktionsverlust zwischen Pex8p und Pex7p führen. Die Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p ist bei allen Mutationen unterbunden. Dies korrespondiert mit den Untersuchungen in Kapitel 3.8, die zeigen, dass die Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p mindestens über die Rezeptoren vermittelt wird. Damit liegt die Vermutung nahe, dass beide Rezeptoren zur Vermittlung der Interaktion zwischen Pex8p und Pex14p notwendig sind.

---

Obwohl die Mutationen Pex8pM-A (S231P) und Pex8pM-C (A238V) sehr dicht beieinander liegen, unterbindet nur Mutation Pex8pM-A (S231P) die Interaktion zwischen Pex7p und Pex8p. Die Tatsache, dass die Interaktion zwischen Pex7p und Pex8pM-D (T327P) ebenfalls unterbunden ist legt nahe, dass es sich entweder um zwei distinkte Bindebereiche für Pex7p in Pex8p handelt, oder dass die Bildung einer Sekundärstruktur nur eine Bindestelle für Pex7p bereitstellt. Die Bindestelle für Pex5p scheint linear zu sein und sich im Bereich der Aminosäuren 231-238 zu befinden.

Trotz der jeweiligen Veränderungen des Proteins durch die gerichtete Mutagenese scheint die Funktionalität keines der mutierten Pex8-Proteine beeinflusst zu sein. Die mit diesen mutierten Pex8-Proteinen komplementierten Pex8p-Mutanten sind in der Lage auf Oleatmedium zu wachsen und mit Signalsequenzen versehene Reporterproteine in Peroxisomen zu bringen. Hierbei ist zu beachten, dass die Pex8-Proteine überexprimiert in den Hefezellen vorliegen. Die Untersuchung der Phänotypen dieser Transformanten bei Expression der mutierten Pex8-Proteine unter dem schwächeren endogenen *PEX8*-Promotor könnte zu anderen Phänotypen führen.

Fehlt Pex8p an der peroxisomalen Membran sind sowohl PTS1- als auch PTS2-Proteine im Cytosol misslokalisiert. Dies führte zu dem Rückschluss, Pex8p sei am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligt. Allerdings läßt sich daraus keine aktive Rolle von Pex8p durch Hereinziehen der Cargo-Rezeptor-Komplexe in das peroxisomale Kompartiment ableiten. Sein Fehlen führt zu strukturellen Veränderungen des importkompetenten Proteinnetzwerkes auf der Ebene der peroxisomalen Membran (2), so dass dieser Sekundäreffekt – eine passive Rolle von Pex8p beim Proteinimport - zum Importdefekt führt. Pex8p scheint aber ebenfalls für die Ablösung des Cargo-Proteins vom PTS1-Rezeptor Pex5p notwendig zu sein (231). Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalyse von Pex8p sind verschiedene Wirkmechanismen des Proteins Pex8p in Betracht zu ziehen. Im Folgenden wird jeweils deren Möglichkeit mit den bisherigen Ergebnissen abgeglichen und diskutiert. Abbildung 4.1 beschreibt die jeweiligen Mechanismen am Beispiel von Pex5p.



**Abb. 4.1** Verschiedene mögliche Wirkmechanismen von Pex8p

1) Aktive Beteiligung von Pex8p am Import Cargo-beladener Rezeptoren

Beteiligung von Pex8p an der Cargo-Loslösung vom Rezeptor nach erfolgtem Import:

2-1) Pex8p verdrängt das Cargo von seiner Bindestelle am jeweiligen Rezeptor zum Beispiel durch Nutzung seiner eigenen PTS-Signale.

2-2) Pex8p bindet an den Rezeptor und erzeugt eine Konformationsänderung, welche die Bindekapazität des Rezeptors zum Cargo herabsetzt und zur Cargolösung führt.

2-3) Pex8p bindet den Rezeptor und ist notwendig für dessen Bereitstellung, so dass die Loslösung des Cargos durch ein anderes Protein bewerkstelligt werden kann.

### 1) Aktive Beteiligung von Pex8p am Import Cargo-beladener Rezeptoren

Die aktive Beteiligung von Pex8p am Import Cargo-beladener Rezeptoren wäre möglich, würde der Cargo-Rezeptor-Komplex von Pex8p in das peroxisomale Kompartiment hineingezogen werden (extended shuttle model).

Dies setzt zunächst eine Interaktion von Pex8p mit den Rezeptoren voraus. Diese Voraussetzungen sind gegeben. Pex8p interagiert sowohl mit Pex5p als auch mit

Pex7p (171) (3.2). Innerhalb der in dieser Arbeit erstellten Mutationsanalyse von Pex8p konnten Mutationen (Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V) und Pex8pM-D (T327P)) identifiziert werden, die einen Abbruch der Interaktionen von Pex8p mit den jeweiligen Rezeptoren nach sich zogen (3.10.4). Trotzdem konnten mit den PTS1- und PTS2-Signalsequenzen versehene Reporterproteine in peroxisomale Kompartimente gelangen (3.10.6), genauso wie Proteine mit diesen Mutationen das Wachstum der Pex8-Mutante auf Oleatmedium komplementieren konnten (3.10.5).

Dies läßt den Schluss zu, dass Pex8p nicht am aktiven Import von Matrixproteinen durch das Hereinziehen des Cargo-Rezeptorkomplexes beteiligt ist.

Erste Hinweise, dass Rezeptoren in der *pex8Δ*-Mutante peroxisomal vorliegen können, sind in Untersuchungen im Targetingprozess von PTS2-Proteinen der Hefe *Yarrowia lipolytica* zu finden. *YIPex20p* ist für den Import des PTS2-haltigen Proteins *Fox3p* notwendig. Es interagiert mit *YIPex8p* und liegt unter Wildtypbedingungen zu 98% cytosolisch vor. In der Mutante *pex8Δ* jedoch ist das Protein vorwiegend in der peroxisomalen Fraktion zu detektieren und vor Angriffen von Proteasen geschützt. Dies legt nahe, dass *YIPex20p* in *pex8Δ*-Zellen intraperoxisomal lokalisiert ist und nicht wieder zurück ins Cytosol gelangen kann (184).

Die Alternative, Pex8p könne mit dem Cargo direkt interagieren und dieses in das peroxisomale Kompartiment ziehen, mit (extended shuttle model) oder ohne (shuttle model) Eintritt des Rezeptors in das peroxisomale Kompartiment ist ebenfalls nicht wahrscheinlich, da Pex8p nicht mit *Fox3p*, einem PTS2-Cargo-Protein interagiert. Wenn auch die Möglichkeit der Interaktion von Pex8p mit anderen Cargoproteinen nicht hinlänglich untersucht ist, so ist sie doch vor diesem Hintergrund eher unwahrscheinlich.

Desweiteren konnte auch in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass Pex8p ein PTS1-Peptid nicht spezifisch bindet (231). Die Mutationen, die zu einem Wegfall der Interaktionen von Pex8p mit den jeweiligen Rezeptoren führen, müssen eine dem Import nachfolgende Funktion haben. Ebenfalls haben sie wegen des weiterhin funktionierenden Imports der Matrixproteine keine Auswirkung auf die Bildung eines funktionsfähigen Importomers.

## 2) Beteiligung von Pex8p an der Cargo-Loslösung vom Rezeptor nach erfolgtem Import

Pex8p könnte durch Interaktion mit dem Rezeptor an der Spaltung des Fracht-Rezeptor-Komplexes beteiligt sein. Auf der Ebene dieses Mechanismus sind mindestens drei Prozesse vorstellbar:

1. Pex8p verdrängt das Cargo von seiner Bindestelle am jeweiligen Rezeptor durch Nutzung seiner eigenen PTS-Sequenzen.
2. Pex8p bindet an den Rezeptor und erzeugt eine Konformationsänderung, welche die Bindekapazität des Rezeptors zum Cargo herabsetzt und zur Cargolösung führt.
3. Pex8p bindet den Rezeptor und ist notwendig für dessen Bereitstellung, sodass die Loslösung des Cargos durch ein anderes Protein bewerkstelligt werden kann.

Es scheint aufgrund mehrerer Daten nicht wahrscheinlich, dass Pex8p mit Hilfe seiner eigenen PTS-Sequenzen die Lösung des Cargo-Rezeptor-Komplexes bewirkt.

Untersuchungen zur Interaktion zwischen Pex5p und Pex8p haben gezeigt, dass Pex8p in der Lage ist, die Bindung von Pex5p an ein PTS1-Peptid von 14% auf 9% herabzusetzen (231). Der genaue Vorgang, durch den Pex8p die Binefähigkeit von Pex5p an das PTS1-Peptid herabsetzt, ist nicht bekannt. Das Pex8p-interne PTS1-Signal ist vermutlich aber nicht dafür verantwortlich, da es in diesen Analysen durch einen Proteinfusionsanteil blockiert wurde. Auch ist eine Loslösung des Cargos durch ein anderes Protein unwahrscheinlich, da *in vitro*-Experimente gezeigt haben, dass Pex8p zur Lösung des Rezeptor-Cargo-Komplexes ausreichend ist (231). Die in dieser Arbeit erstellten Punktmutationen innerhalb des Pex8-Proteins unterbinden die Interaktionen zu den jeweiligen Rezeptoren vollständig. Somit könnte Pex8p eine Konformationsänderung des Rezeptors durch dessen Bindung hervorrufen und damit dessen Bindekapazität zum Cargo herabsetzen. Unterstützt wird dies dadurch, dass Pex5p mit Pex8p in unkonventioneller Weise ohne seine TPR-Domänen mit Pex8p $\Delta$ SKL interagiert. So könnte durch die erzeugten Mutationen der Prozess der Cargo-Loslösung vom Rezeptor derart gestört sein, dass die Reporterproteine zwar importiert, aber nicht von ihren Rezeptoren getrennt im peroxisomalen Kompartiment vorliegen. Dies könnte auch die Komplementation der *pex8* $\Delta$ -Deletionsmutante durch alle

mutierten Pex8-Proteine erklären. Der Import der Cargo-Rezeptor-Komplexe würde noch funktionieren, während die Ablösung des Cargos vom Rezeptor durch die Mutationen in Pex8p nicht mehr ablaufen könnte.

Aufschlussreich wäre somit eine Lokalisationsanalyse der Rezeptoren Pex5p und Pex7p in UTL-7A *pex8Δ* [Pex8pM-A (S231P)], UTL-7A *pex8Δ* [Pex8pM-C (A238V)] und UTL-7A *pex8Δ* [Pex8pM-D (T327P)] im Vergleich zum Wildtyp UTL-7A. Bei einem fehlerhaften Ablösungsprozess des Cargos vom Rezeptor müssten die Rezeptoren vorwiegend in den peroxisomalen Fraktionen auszufinden sein.

Auch wäre eine *in vivo*-Untersuchung dieses Prozesses mittels FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) möglich. Diese Methode ermöglicht es intermolekulare Distanzen von Protein und Liganden im Aktionsradius von 10-100 Angström zu untersuchen. Unter Wildtypbedingungen sollten mit Fluorophoren versehene Rezeptoren (Donor) und Cargoproteine (Akzeptoren) im Cytosol eine Fluoreszenz des Akzeptormoleküls aufweisen oder eine Auslöschung (quenching) der Donorfluoreszenz. Im peroxisomalen Kompartiment dürfte unter Wildtypbedingungen dieser Energietransfer von Donor zu Akzeptor nicht mehr zu sehen sein, da Pex5p und PTS1-Cargo voneinander getrennt werden, während bei mangelnder Lösung des Rezeptor-Cargo-Komplexes in den untersuchten komplementierten Mutanten *pex8Δ* [Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V) und Pex8pM-D (T327P)] weiterhin ein Energietransfer im peroxisomalen Kompartiment messbar wäre.

Von Interesse wäre es zu untersuchen, ob derartig in einem Rezeptor-Cargo-Komplex arretierte Rezeptoren erneut in das Cytosol recycelt werden können. Da der Rezeptor Pex5p konstitutiv exprimiert wird, müsste dessen Transkription durch einen induzierbaren Promotor manipuliert werden. Die Lokalisation des Rezeptors unter reprimierten bzw. induzierten Bedingungen in *pex8Δ*, *pex8Δ* [Pex8p] und *pex8Δ* [Pex8pM-A (S231P), Pex8pM-C (A238V) und Pex8pM-D (T327P)]-Hefestämmen könnte Aussagen über den Recyclingprozess des Rezeptors ermöglichen.

## 4.5 Erfolgt das Targeting von Pex8p über die Rezeptoren Pex5p und Pex7p?

Pex8p besitzt sowohl ein PTS1- als auch möglicherweise ein PTS2-Signal, so dass die Vermutung nahe liegt, sein Targeting zu Peroxisomen könnte über einen oder beide Rezeptoren erfolgen. Dieses Targeting muss nicht notwendigerweise über eine der beiden Signalsequenzen verlaufen. Dies wird durch die Pex8p-Pex5p-Interaktion belegt, für die das PTS1-Signal von Pex8p entbehrlich ist. Die Bindung des Pex8-Proteins an einen anderen Bereich des jeweiligen Rezeptors und sein nachfolgendes Targeting zum Peroxisom wäre also genauso denkbar (112, 248). Um das Targeting von Pex8p in Abhängigkeit von Pex5p und Pex7p zu untersuchen, erfolgten Lokalisationsanalysen des Proteins im Wildtyp UTL-7A [Pex8p-ProtA] als auch in den Mutanten UTL-7A $\Delta$ pex5 $\Delta$ [Pex8p-ProtA], UTL-7A $\Delta$ pex7 $\Delta$ [Pex8p-ProtA], und UTL-7A $\Delta$ pex5 $\Delta$ pex7 $\Delta$ [Pex8p-ProtA]. In der Dichtegradientenzentrifugation (3.11.1) war Pex8p-ProtA im Wildtyp mit Fox3p und Pex13p, Markerproteine für die peroxisomale Matrix bzw. Membran, kolokalisiert. Auch in den Mutanten war Pex8p-ProtA sowohl mit Pex13p, als auch Fox3p kolokalisiert. Eine separate Trennung der Membranproteine von den Matrixproteinen hätte einen eindeutigen Rückschluss auf die Pex8p-ProtA-Lokalisation ermöglicht. Diese Kolokalisation aber keine genaue Aussage darüber, ob Pex8p-ProtA an Membranen vorlag oder cytosolisch misslokalisiert war.

Aus diesem Grunde wurden Flotationsgradienten durchgeführt. In allen Mutanten zeigte sich, dass Pex8p-ProtA in Fraktionen geringerer Dichte zu detektieren war. Untersuchungen in UTL-7A $\Delta$ pex5 $\Delta$ [Pex8p-ProtA] zeigen, dass in dieser Mutante zwiebelähnlich gestaltete Membranschlaufen zu detektieren sind, die eine Kolokalisation von Fox3p mit dem Membranprotein mit Pex11p aufweisen (41, 88). In UTL-7A $\Delta$ pex5 $\Delta$ [Pex8p-ProtA] konnte innerhalb dieser Flotationsgradientenanalyse das PTS2-Protein Fox3p nicht in Fraktionen geringere Dichte, kolokalisiert mit dem Membranmarker Pex13p, detektiert werden. Vermutlich war die Detektion von Fox3p aufgrund der geringen Menge in den leichteren Fraktionen nicht möglich. Im Experiment der Flotation wurde deutlich, dass Pex8p-ProtA in UTL-7A  $\Delta$ pex5 $\Delta$ [Pex8p-ProtA] sowohl in der nicht flotierbaren Fraktion zu finden ist, als auch in den Fraktionen, in denen flotierbare Membranstrukturen zu detektieren sind und hierbei mit Pex13p kolokalisiert vorliegt. Deutlich wird dies besonders in der Mutante

UTL-7A*pex5* $\Delta$ *pex7* $\Delta$  [Pex8p-ProtA], in der Pex8p-ProtA und Pex13p flotierbar sind und sich auf alle Fraktionen des Gradienten verteilen, während Fox3p in den Fraktionen hoher Dichte verbleibt. Gleiches gilt für die Proteinverteilung in der Mutante UTL-7A *pex7* $\Delta$  [Pex8p-ProtA]. Allerdings entsprechen die Peakfraktionen beider Membranproteine Pex8p-ProtA und Pex13p in den Mutanten UTL-7A *pex7* $\Delta$  [Pex8p-ProtA] und UTL-7A*pex5* $\Delta$ *pex7* $\Delta$  [Pex8p-ProtA] nicht einander. Dies spricht dafür, dass sowohl Pex8p als auch Pex13p in diesen Mutanten an Membranstrukturen vorliegen. Mit geringfügigen Überschneidungen befinden sich ihre Peakfraktionen an anderen Populationen von Membranen, eventuell Vesikel unterschiedlicher Dichte.

Es bleibt festzuhalten, dass Pex8p in allen Mutanten membranassoziiert vorliegt. Damit kann ein Targeting des Proteins über einen der Rezeptoren ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Untersuchung zur Extrahierbarkeit des Proteins Pex8p-ProtA aus den Membranen von UTL-7A, UTL-7A*pex5* $\Delta$ [Pex8p-ProtA] und UTL-7A *pex7* $\Delta$  [Pex8p-ProtA] läßt sich ableiten, dass die Lokalisation von Pex8p an der Membran in allen Fällen unbeeinflusst ist. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der Lokalisationsanalysen durch die Zentrifugationstechniken.

Die limitierte Proteolyse der untersuchten Proteine zeigt, dass Pex8p-ProtA in UTL-7A*pex5* $\Delta$ [Pex8p-ProtA] bei einer hohen Konzentration der Proteinase K abgebaut wird. Im Wildtyp wird Pex8p-ProtA somit durch Pex5p geschützt. Modelle zur Topologie von Pex14p (148) demonstrieren sowohl eine N- als auch eine C-terminale Bindestelle in Pex14p für Pex5p. Es wird postuliert, dass der hydrophobe N-Terminus von Pex14p zusammen mit Pex5p in der peroxisomalen Membran verankert ist. Eventuell wird Pex8p durch dieses membranassoziierte Pex5-Protein geschützt. Würde dieses Molekül fehlen, wäre Pex8p zu einem geringfügigen Teil für die Proteinase K zugänglich.

Wie könnte Pex8p an die peroxisomale Membran gelangen?

Wäre Pex8p-ProtA Teil einer frühen Proteinpopulation innerhalb der Peroxisomenbiogenese, und seine Membranassoziation trotz fehlender Rezeptoren unterstützt diese Annahme, wäre das Targeting von Pex8p zur peroxisomalen Membran in Abhängigkeit von Pex19p und Pex3p zu untersuchen. Damit müssen erneut Untersuchungen von Hazra *et al.* (86) in Betracht gezogen werden. In *pex3*  $\Delta$ -Zellen von *Pichia pastoris* konnten einige Membranproteine,

---

Pex8p, Pex12p, Pex13p, Pex14p und Pex17p an Membranstrukturen gebunden gefunden werden. Diese Membranstrukturen unterschieden sich von denen der Mitochondrien, ob es sich aber um peroxisomale Membranstrukturen handelt ist nicht geklärt. Daher kann auch eine Fehlinsertion der PMPs aufgrund fehlender peroxisomaler Membranstrukturen in *pex3*Δ nicht ausgeschlossen werden. Es sollte aber bedacht werden, dass, falls es sich hierbei um peroxisomale Strukturen handelt, sich der Kernkomplex der peroxisomalen Importmaschinerie bereits zu einem sehr frühen Stadium in peroxisomalen Membranstrukturen befinden würde.

Die Mutanten *pex3*Δ, *pex19*Δ und *pex16*Δ weisen keine Peroxisomen oder peroxisomalen Reststrukturen auf (71, 95, 173). Neuere Untersuchungen jedoch identifizierten ein vesikuläres und tubuläres System in *pex19*Δ-Zellen von *Pichia pastoris*, die Pex3p enthielten (185). So scheint die Existenz eines frühen peroxisomalen Kompartiments belegt und damit auch die Möglichkeit für PMPs gegeben in solche Membranstrukturen inserieren zu können.

Ebenfalls ist ein peroxisomales Biogenesemodell diskutierbar, in dem Vesikelfusionen eine Rolle spielen. Untersuchungen zur Reifung der Peroxisomen in *Yarrowia lipolytica* zeigen eine dynamische Vesikelpopulation von Peroxisomen, die sich in Aspekten der Membranproteinausstattung und Importkompetenz unterscheiden und in Abhängigkeit von Pex1p und Pex6p miteinander fusionieren können (206, 209). Auch andere Daten belegen die Anwesenheit von Peroxisomen geringerer Dichte mit unterschiedlicher Ausstattung und Importkompetenz (87, 131). Da Pex8p auch in *Yarrowia lipolytica* vorkommt, müsste die Assoziation von Pex8p innerhalb dieser unterschiedlichen Vesikelpopulation untersucht werden.