

5 Zusammenfassung

1. Two-Hybrid Studien mit N- und C-terminal verkürztem Pex13p zeigten, dass bereits die ersten 55 Aminosäuren von Pex13p eine Interaktion mit dem PTS2-Erkennungsrezeptor Pex7p eingehen. Diese Interaktion konnte *in vivo* durch eine Co-Immunopräzipitation gezeigt werden. Dass es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt, wurde in einer *in vitro* Bindungsstudie durch die Bindung zwischen GST-Pex13p₁₋₁₀₀ und His₆-Pex7p belegt.
2. Pex13p₁₋₁₀₀ war in der Lage, sowohl mit Pex18p als auch mit Pex21p zu interagieren. Die Interaktion war hierbei von der Anwesenheit von Pex7p abhängig, wie in einer Two-Hybrid Studie gezeigt werden konnte.
3. Ein aminoterminal deletiertes Pex13p-Konstrukt (Pex13p₅₆₋₃₈₆) war nicht in der Lage, eine *pex13Δ* Mutante zu komplementieren. Somit hat dieser aminoterminal Bereich für die Biogenese des Organells eine entscheidene Funktion inne. Es konnte weiterhin durch Fluoreszenzstudien gezeigt werden, dass dieser Bereich spezifisch für den PTS2-abhängigen Import benötigt wird. Da die PTS1-Signalerkennung [Elgersma, 1996 #192; Erdmann, 1996 #24; Gould, 1996 #239] über die SH3-Domäne von Pex13p erfolgt, sind zwei unterschiedliche Regionen in Pex13p an der PTS-Rezeptor-Erkennung beteiligt.
4. β -Keto-Acyl-CoA-Thiolase (Fox3p) interagierte mit dem peroxisomalen Dockingprotein Pex14p, jedoch nur in Anwesenheit von Pex18p, Pex21p und von Pex7p. Andererseits konnte eine Bindung an Pex13p nicht gezeigt werden, was bedeuten könnte, dass Pex14p beim Import von PTS2-haltigen Proteinen das initiale Dockingprotein darstellt. Das Andocken der PTS2-Cargoproteine erfolgte dabei offensichtlich sowohl in Abhängigkeit von Pex7p als auch von Pex18p/Pex21p.
5. Die Menge an mit Pex7p co-immunopräzipitiertem Fox3p war in einer *pex18Δpex21Δ* sowie in einer *pex14Δpex18Δpex21Δ* Mutante deutlich geringer als in einer *pex14Δ* Mutante. Daraus wurde geschlossen, dass die Anwesenheit von Pex18p und Pex21p bereits vor dem Andocken von Pex7p an die peroxisomale Membran gebraucht wird. Die Funktion der beiden cytosolisch lokalisierten, redundanten Proteine Pex18p und

Pex21p liegt wahrscheinlich in der Bildung eines importkompetenten PTS2-Substrat-Komplexes.

6. In einer *in vitro* Bindungsstudie mit heterolog exprimiertem His₆-Pex14p und MBP-Pex7p konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen Pex7p und Pex14p unabhängig von der Anwesenheit von Pex18p/Pex21p stattfinden kann und somit direkt ist.
7. Durch eine *in vitro* Bindungsstudie mit einem synthetischen PTS2-Protein gelang es zu zeigen, dass Pex7p direkt an das PTS2-Signal binden kann.
8. Mit der Methode des Two-Hybrid Systems konnte in Pex13p eine zweite Bindestelle für Pex14p identifiziert werden. Der Bindebereich umfasst die Aminosäuren 233-258 von Pex13p. Im Gegensatz zur SH3-Domäne erfolgt diese Bindung unabhängig von dem prolinreichen Motiv von Pex14p.
9. Durch heterologe Expression von Pex19p und seine Verwendung als Antigen konnte ein Antiserum gegen das Protein gewonnen und dessen Spezifität gezeigt werden.
10. In einer Two-Hybrid Studie konnte die Interaktion zwischen Pex19p und Pex13p gezeigt werden. Der Aminosäurebereich 173-258 von Pex13p war ausreichend, um die Bindung *in vivo* zu vermitteln. Mit einem Peptidscan gelang es außerdem, den notwendigen Bindebereich für Pex19p auf die Aminosäuren 203-213 von Pex13p einzuengen.
11. Auf der Suche nach einem möglichen allgemeinen Targetingsignal für Membranproteine wurde der über einen Peptidscan ermittelte Pex19p-Bindebereich 203-IMKFLKKILYR-213 umfassend substituiert. Die beiden Leucine in Position 207 und 211 erwiesen sich hierbei als entscheidend, womit sie vermutlich eine besondere Rolle bei der Bindung an Pex19p einnehmen.
12. Es wurde ein Modell erstellt, welches den möglichen Ablauf des PTS2-abhängigen Proteinimports beschreibt (Abb. 4.1).