

# 1 Einleitung

Eukaryotische Zellen verfügen über ein komplexes System von Membranen, wobei membranumschlossene Kompartimente (Organellen) für eine intrazelluläre Unterteilung sorgen und die Zelle nach außen durch die Plasmamembran abgegrenzt wird. Jedes dieser membranumschlossenen Kompartimente besitzt eine charakteristische und zugleich dynamische Zusammensetzung an Protein- und Lipid-Komponenten, welche es dem jeweiligen Organell ermöglichen, bestimmte Funktionen zu erfüllen.

Verglichen mit anderen Organellen blieben die Peroxisomen über viele Jahre unerforscht. Bereits in den 50er Jahren wurden die Peroxisomen als „sphärische oder ovale Körper“ ("microbodies") entdeckt. Ihren Namen erhielten diese neuen Organellen dann von DeDuve und Baudhuin in den 60er Jahren aufgrund des Besitzes von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Oxidasen und Katalasen (40). Die Zellbiologie der Peroxisomen wurde jedoch erst in den letzten zehn Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen intensiv untersucht und heute ist bekannt, dass Peroxisomen eine funktionell heterogene Gruppe verwandter Zellorganellen sind, die ubiquitär in Eukaryoten vorkommen. Ihre Größe, Anzahl, Proteinzusammensetzung und biochemische Funktion kann in Abhängigkeit vom Organismus, Zelltyp und/oder den sie umgebenden Bedingungen stark variieren (zur Übersicht: (229)). Zusätzlich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierenden Oxidasen und Katalasen verfügen die Peroxisomen über ein  $\beta$ -Oxidationssystem, das sich von dem der Mitochondrien deutlich unterscheidet (95, 140, 164). Während in menschlichen Zellen die  $\beta$ -Oxidation auf die Mitochondrien und die Peroxisomen verteilt ist und nur der Abbau langkettiger Fettsäuren peroxisomal ist (144), konnten Kunau und Mitarbeiter zeigen, dass Fettsäuren in niederen Pilzen ausschließlich in Peroxisomen abgebaut werden (140). In Abhängigkeit vom Organismus und Zelltyp erfüllen Peroxisomen zahlreiche weitere metabolische Funktionen. Dazu gehören in Säugerzellen die Synthese von Plasmalogenen, Cholesterin und Gallensäuren (16)), der Prostaglandin-Stoffwechsel (207) und zusätzlich zur  $\beta$ - auch die  $\alpha$ -Oxidation verzweigtkettiger Fettsäuren (229). Trotz zahlreicher Untersuchungen blieben grundlegende Fragen bislang unbeantwortet: Wie entstehen Peroxisomen, wie integrieren Membranproteine und wie gelangen Proteine in die Matrix der Peroxisomen (107, 141)?

Als Modellorganismen zur Erforschung peroxisomaler Proteine haben die Hefen immer mehr an Bedeutung gewonnen. *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* und *Pichia pastoris* haben den Vorteil, dass sie für das Wachstum auf Medien mit bestimmten Kohlenstoffquellen, wie z. B. Ölsäure, funktionelle Peroxisomen benötigen, wohingegen jene für ein Wachstum in Glukosemedium nicht gebraucht werden (63). Die Suche nach Hefezellen, die nicht mehr in der Lage sind, auf fettsäurehaltigen Medien zu

wachsen und somit Mutationen in Genen tragen, die für die Funktion von Peroxisomen essentiell sind, führte zur Identifizierung zahlreicher peroxisomaler Proteine (63, 220). Hefezellen, die einen Wachstumsdefekt auf Ölsäuremedium und einen daraus resultierenden *onu*-Phänotyp ("oleate non utilizer") zeigten, konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Dabei handelt es sich zum einen um die *fox*-Mutanten ("fatty acid oxidation"), die einen Defekt in einem Enzym der  $\beta$ -Oxidation besitzen und zum anderen um die *pex*-Mutanten ("peroxisome assembly"), die aufgrund ihrer peroxisomalen Biogenesestörung nicht mehr über funktionelle Peroxisomen verfügen oder deren Matrixproteine mislokalisiert vorliegen (43). Mit Hilfe verschiedener Methoden konnten mittlerweile drei *fox*- und 24 *pex*-Komplementationsgruppen identifiziert werden (zur Übersicht: (190)).

## 1.1 Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen

Die Vielzahl an metabolischen Funktionen der Peroxisomen in der Zelle weist bereits darauf hin, dass ein Ausfall dieses Organells nicht ohne Folgen für die Zelle oder den gesamten Organismus bleiben kann. So beobachteten Goldfischer und Kollegen 1973 (83) als erste einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen von Peroxisomen und einer rezessiven Erbkrankheit in Leber- und Nieren-Zellen von Patienten mit Zellweger-Syndrom, welches erstmals 1964 von Bowen und Mitarbeitern beschrieben worden war (22). In den 70er und 80er Jahren wurden wichtige metabolische Wege wie die  $\beta$ -Oxidation identifiziert und charakterisiert (95, 144). Funktionsstörungen von Peroxisomen wurden 1982 von Brown und Mitarbeitern entdeckt. Sie konnten in Patienten mit Zellweger-Syndrom und neonataler Adrenoleukodystrophie die Akkumulation von sehr langen Fettsäuren zeigen (27). Diese und andere auf peroxisomale Defekte zurückzuführende Krankheiten werden heute als peroxisomale Erkrankungen ("peroxisomal disorders") zusammengefasst, die wiederum in zwei Kategorien eingeordnet werden: in peroxisomale Biogenese-Erkrankungen (PBDs, "peroxisome biogenesis disorders"), zu denen das Zellweger-Syndrom, die neonatale Adrenoleukodystrophie, die infantile Refsum-Krankheit, Rhizomelische Chondrodysplasia Punctata und ein Zellweger-ähnliches Syndrom gezählt werden, und in Erkrankungen mit Einzel-Enzymausfällen. Störungen bei Krankheiten der ersten Kategorie be- und verhindern gleichzeitig mehrere peroxisomale Stoffwechselwege, da hierbei die Biogenese des gesamten Peroxisomes beeinflusst ist. Sie führen zu schwerwiegenden neurologischen Defekten und morphologischen Abnormalitäten, die meist schon kurz nach der Geburt zum Tod des Patienten führen (zur Übersicht, siehe (74, 165, 200)). Von den 24 für die Biogenese, Teilung und Vererbung von Peroxisomen benötigten Peroxinen sind Mutationen in 11 dieser Proteine für peroxisomale Biogenese-Erkrankungen beim Menschen verantwortlich (72, 88, 165). Im Gegensatz dazu stehen die Erkrankungen der zweiten

Kategorie, bei denen nur ein einzelnes peroxisomales Enzym betroffen und nur ein einzelner Stoffwechselweg gestört ist (251).

## 1.2 Die *PEX*-Gene und ihre Genprodukte, die Peroxine

Die Sequenzierung von verschiedenen Hefegenomen, pflanzlichen Genomen und des humanen Genoms ermöglichte die Identifizierungen neuer peroxisomaler Proteine durch Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Protein-Sequenzen. Anhand von Motiven in den Aminosäuresequenzen und der entsprechenden Mutanten-Analyse konnten einige Peroxine (43) bereits bekannten Proteinfamilien zugeordnet werden (Tab. 1.1).

Die Peroxine Pex1p und Pex6p sind ATPasen und gehören zu der großen und funktionell uneinheitlichen Familie der AAA-Proteine ("ATPases associated with various cellular activities") (65, 185), die an der Regulation des Zellzyklus, der Proteindegradation, der Organellenbiosynthese und dem Vesikel-vermittelten Proteintransport beteiligt sind. Pex2p, Pex10p und Pex12p sind integrale peroxisomale Membranproteine, von denen man annimmt, dass sie gemeinsam einen Multi-Protein-Komplex bilden (4). Sie besitzen ins Cytosol gerichtete Zinkringfinger-Domänen (20), die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (31, 175). Pex3p ist ebenfalls ein integrales Membranprotein und für die Synthese peroxisomaler Membranen mitverantwortlich (105). Pex4p gehört zur E2-Familie der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (256) und vermag Ubiquitin zu binden (36). Pex4p ist außerdem mit Pex22p, einem integralen Membranprotein, an dessen cytoplasmatischer Seite verbunden (135). Pex8p befindet sich an der Innenseite der peroxisomalen Membran und interagiert mit Pex5p (196). Pex15p liegt als integrales Protein phosphoryliert in der peroxisomalen Membran vor (56). Pex16p konnte bislang nur in der peroxisomalen Membran von *Y. lipolytica* und in menschlichen Fibroblasten nachgewiesen werden (108, 217). Pex19p ist ein überwiegend cytosolisches und zu einem kleinen Teil an der Membran assoziiertes Protein, das farnesyliert vorliegt (84). Das cytosolische Pex20p spielt eine Rolle in der Oligomerisierung und Zielsteuerung des Fox3p (Thiolase) in der Hefe *Y. lipolytica* (230). Pex9p, Pex23p und Pex24p sind integrale Membranproteine, die bisher nur in *Y. lipolytica* gefunden wurden (28, 53, 225).

Djp1p ist im Cytosol lokalisiert und als Peroxisomen-spezifisches Chaperon am Import von Proteinen in Peroxisomen beteiligt (100)

Pex11p, ein 24-30 kDa großes peroxisomales Membranprotein, hat wesentliche Effekte auf die Morphologie induzierter Peroxisomen in Hefen. Eine Überexpression verursacht die Proliferation vieler kleiner Peroxisomen, wohingegen die Mutante, die das *PEX11* fehlt, nur wenige vergrößerte Peroxisomen besitzt ("giant peroxisomes") (59, 154, 203). Säugetier-Pex11p existiert in zwei Isoformen,  $\alpha$  und  $\beta$  (2, 184). Für dieses Protein konnte zudem eine

Bindung von Coatamer-Untereinheiten, die wichtige Faktoren für eine Vesikelfusion darstellen, gezeigt werden (184).

Ein anderes Modell zur Funktion von Pex11p wurde auf der Basis von Wachstumsanalysen auf mittellangen Fettsäuren (MCFA, "middle chain fatty acids") erstellt. Diese Experimente zeigten, dass Pex11p eine essentielle Rolle bei der Oxidation dieser Fettsäuren in *S. cerevisiae* spielt (243).

Auf die speziellen Gene, die an der Biogenese und der Zielsteuerung von peroxisomalen Proteinen beteiligt sind, wird gesondert eingegangen.

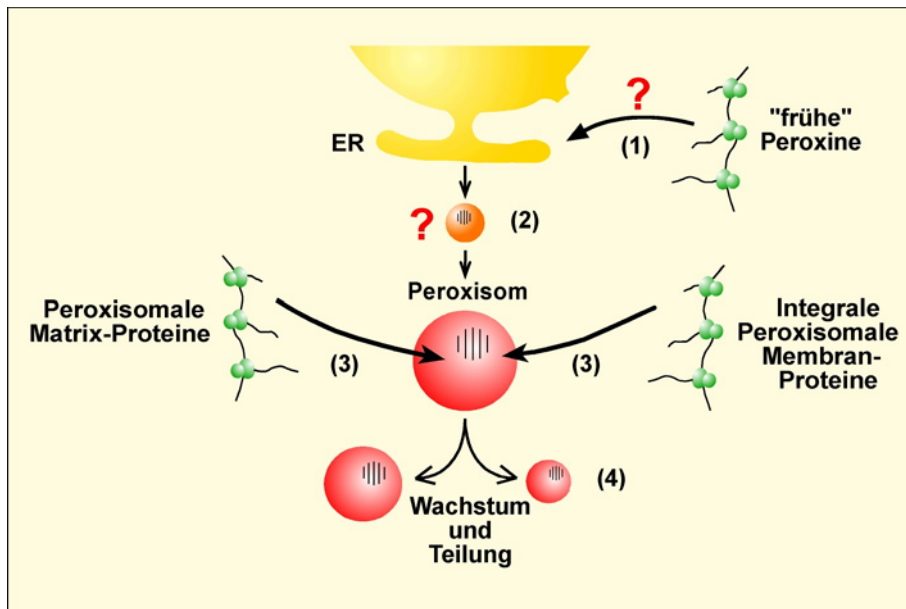
**Tab. 1.1: Übersicht der bisher identifizierten Peroxine und deren Charakteristika**

<b>PEX-Gen</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
<i>PEX1</i>	ATPase der AAA-Familie	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>H. sapiens</i>	(64) (102) (188)
<i>PEX2</i>	Zink-bindendes integrales peroxisomales Membranprotein mit C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> -Motiv	<i>P. pastoris</i> <i>P. anserina</i> <i>H. sapiens</i> <i>R. norvegicus</i>	(253) (14) (212) (233)
<i>PEX3</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein, benötigt für Membranproteinimport	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>H. polymorpha</i> <i>H. sapiens</i>	(105) (258) (9) (128)
<i>PEX4</i>	Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), Peroxisomen-assoziiert	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>H. polymorpha</i>	(256) (36) (236)
<i>PEX5</i>	PTS1-Rezeptor, enthält 7 TPR-Motive, an Peroxisomen und im Cytosol lokalisiert	<i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. polymorpha</i> <i>Y. lipolytica</i> <i>H. sapiens</i> <i>C. vulgaris</i> <i>N. tabacum</i>	(160) (239) (237), (174) (224) (45),(70),(257) (261) (138)
<i>PEX6</i>	ATPase der AAA-Familie	<i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Y. lipolytica</i> <i>R. norvegicus</i> <i>H. sapiens</i>	(218) (246) (173) (234) (267)
<i>PEX7</i>	PTS2-Rezeptor, 6 WD 40-Motive, an Peroxisomen und im Cytosol lokalisiert	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>H. sapiens</i>	(155) (54) (166),(24),(193)
<i>PEX8</i>	Peripheres Membranprotein mit PTS1- und PTS2-Signalsequenz	<i>H. polymorpha</i> <i>P. pastoris</i> <i>Y. lipolytica</i> <i>S. cerevisiae</i>	(253) (149) (149) (61)
<i>PEX9</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein	<i>Y. lipolytica</i>	(53)
<i>PEX10</i>	Zink-bindendes integrales peroxisomales Membranprotein mit C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> -Motiv	<i>P. pastoris</i> <i>H. polymorpha</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i>	(126) (226) (61) (252)
<i>PEX11</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein	<i>S. cerevisiae</i> <i>C. boidinii</i> <i>H. sapiens</i> <i>T. brucei</i> <i>R. norvegicus</i>	(59) (154) (2) (150) (184)
<i>PEX12</i>	Zink-bindendes integrales peroxisomales Membranprotein mit C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> -Motiv	<i>P. pastoris</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i>	(127) (61) (30)

<b>PEX-Gen</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
<i>PEX13</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein mit C-terminaler SH3-Domäne, Bestandteil des Docking-Komplexes für Matrixprotein-Rezeptoren, bindet Pex5p, Pex7p, Pex14p	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>H. sapiens</i>	(55),(60) (86) (71)
<i>PEX14</i>	Peroxisomales Membranprotein, Klasse II-Bindemotiv für SH3-Liganden, Bestandteil des Docking-Komplexes für Matrixprotein-Rezeptoren, bindet Pex5p, Pex7p und Pex13p	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>H. polymorpha</i> <i>H. sapiens</i> <i>A. taliana</i>	(5),(26) (121) (136) (71) (96)
<i>PEX15</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein, phosphoryliert und glykosyliert	<i>S. cerevisiae</i>	(56)
<i>PEX16</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein, benötigt für Membranbiogenese	<i>Y. lipolytica</i> <i>H. sapiens</i>	(53) (217)
<i>PEX17</i>	Peripheres Membranprotein, bindet Pex14p	<i>S. cerevisiae</i>	(114)
<i>PEX18</i>	Überwiegend cytosolisches Protein, nur für PTS2-Import benötigt, starke Homologie zu Pex21p	<i>S. cerevisiae</i>	(192)
<i>PEX19</i>	Farnesyliertes Peroxisomen-assoziiertes Protein, bindet Pex3p	<i>S. cerevisiae</i> <i>H. sapiens</i> <i>P. pastoris</i>	(84) (23) (215)
<i>PEX20</i>	Cytosolisches Protein, zur Dimerisierung und zum Import von Fox3p benötigt	<i>Y. lipolytica</i>	(230)
<i>PEX21</i>	Cytosolisches Protein, benötigt für PTS2-vermittelten Proteinimport, starke Homologie zu Pex18p	<i>S. cerevisiae</i>	(192)
<i>PEX22</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein, interagiert mit Pex4p	<i>P. pastoris</i>	(135)
<i>PEX23</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein	<i>Y. lipolytica</i>	(28)
<i>PEX24</i>	Integrales peroxisomales Membranprotein	<i>Y. lipolytica</i>	(225)
<i>DJP1</i>	Cytosolisches Protein, Chaperon, zum Import benötigt	<i>S. cerevisiae</i>	(100)

### 1.3 Biogenese von Peroxisomen

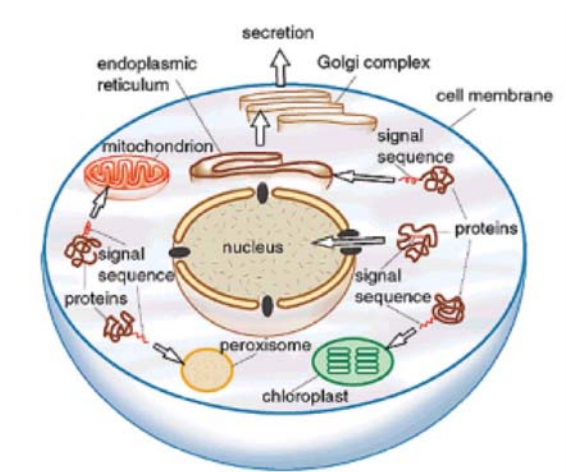
Studien in den 60er Jahren an Peroxisomen zeigten, dass diese durch Abknospung vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet werden (40). Diese Ansicht änderte sich mit der Beobachtung, dass peroxisomale Matrix- und Membranproteine an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert werden. Später wurde von Lazarow und Fujiki (145) ein „Wachstums- und Teilungs-Modell“ postuliert, das bis heute weitgehend akzeptiert ist. Demnach werden neu synthetisierte Proteine in existierende Peroxisomen importiert. Jene wachsen und teilen sich schließlich nach Erreichen einer kritischen Größe. Dieses Modell impliziert, dass Peroxisomen nicht *de novo* entstehen können, sondern dass in jeder Zelle mindestens ein Peroxisom vorhanden sein muss (145). Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre führten jedoch zu der Erkenntnis, dass vom ER stammende Vesikel oder andere Endomembranen an der Bildung der peroxisomalen Membran beteiligt sind und dass somit eine *de novo* Synthese von Peroxisomen doch möglich sein könnte (zur Übersicht, siehe (62, 229)). Dass eine Biogenese ohne zuvor existierende Peroxisomen stattfinden kann, konnte durch die Expression von Pex3p, Pex16p und Pex19p in den entsprechenden Mutanten gezeigt werden, die zur Neogenese von Peroxisomen führte (84, 157, 217).



**Abb. 1.1: Modell der Biogenese von Peroxisomen.** Die Topogenese der peroxisomalen Matrix- und Membranproteine wird von verschiedenen Transportmaschinerien durchgeführt. (1) Einige der peroxisomalen Membranproteine, die für die ersten Schritte der Biogenese von Bedeutung sind (sog. frühe Peroxine), werden möglicherweise in Membranen des ER inseriert. (2) Vesikel, die diese Membranproteine enthalten, knospen vom ER ab und fusionieren mit Peroxisomen. (3) Peroxisomale Matrixproteine und andere Membranproteine werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und posttranslational in die Peroxisomen importiert. (4) Die Peroxisomen wachsen und teilen sich, um neue Peroxisomen zu bilden (modifiziert nach (107)).

## 1.4 Peroxisomale Signalsequenzen und ihre Rezeptoren

Peroxisomen besitzen weder ein eigenes Genom noch eine unabhängige Maschinerie, um selbst Proteine zu synthetisieren. Die peroxisomalen Proteine werden von Genen im Zellkern kodiert und an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert (145). Analog zu Proteinen anderer Zellorganellen besitzen auch die peroxisomalen Proteine Signalsequenzen, die von cytosolischen Rezeptoren gebunden werden. Dazu ist eine Sortier- und Transportmaschinerie notwendig, die in der Lage ist, diese Signalsequenzen zu erkennen und das zu importierende Protein einer Translokationsmaschinerie zu übergeben.



**Abb. 1.2: Zielgerichteter Transport von Proteinen zu den verschiedenen Zellorganellen.** (aus der Pressemitteilung zum Nobelpreis des Jahres 1999 in Physiologie oder Medizin (172)).

Bisher konnten zwei Klassen von Signalsequenzen identifiziert und charakterisiert werden, die als PTS1 und PTS2 ("peroxisomal targeting signal", peroxisomale Zielsteuerungssequenzen) bezeichnet werden. Eine dritte Klasse, das PTS3, bleibt noch uncharakterisiert und scheint heterogener zu sein. Ein solches PTS3 wurde in Matrixproteinen von *S. cerevisiae*, wie beispielsweise der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase, die weder ein PTS1 noch ein PTS2 besitzt (131, 213) identifiziert.

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine werden aufgrund ihrer PTS1-Sequenz, die aus drei Aminosäuren besteht und am extremen C-Terminus liegt, importiert. In frühen Studien wurde diese Zielsteuerungssequenz als ein Tripeptid mit der Konsensussequenz (S/A/C)-(K/R/H)-L charakterisiert, das sowohl in Hefezellen als auch in Pflanzen-, Insekten und Säugerzellen vorkommt (87). Nachfolgende Arbeiten belegten jedoch, dass Länge, Sequenz und Spezies ebenfalls eine Rolle bei der Zielsteuerung der peroxisomalen Proteine spielen (57, 143). Die PTS1-Sequenz der humanen Katalase besteht beispielsweise aus einem Tetrapeptid (-KANL) statt aus einem Tripeptid, wobei das Lysin an vierter Stelle eine kritische Komponente darstellt (191). Diese Variante der PTS1-Sequenz konnte außerdem am C-Terminus der peroxisomalen 2-Methylacyl-CoA-Racemase in der Ratte und der Maus nachgewiesen werden (137).

Das PTS1-Signal interagiert direkt mit seinem cytosolischen Rezeptor (Pex5p), welcher für die Zielsteuerung zu den Peroxisomen unbedingt benötigt wird. Das Pex5p gehört zu den bestuntersuchten und -verstandenen Peroxinen, das als PTS1-Rezeptor erstmals in der Hefe *Pichia pastoris* (160) charakterisiert wurde. *PEX5* konnte erfolgreich in verschiedenen Spezies, einschließlich Säugern (Mensch, Maus, CHO-Zellen und Meerschweinchen), 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*) kloniert werden (42, 45, 70, 118, 138, 160, 174, 224, 237, 239, 257, 261). Diese Pex5p Orthologe gehören zu einer Familie, die durch den Besitz von sechs bis sieben TPR-Motiven ("tetratricopeptid repeats") innerhalb der C-terminalen Hälfte des Proteins charakterisiert ist. Der Nachweis der spezifischen Bindung der PTS1-Sequenz konnte mittels Interaktionsstudien von PTS1-Peptiden *in vivo* und *in vitro* erbracht werden (25, 45, 75, 160, 227). Ausführliche Mutagenese-Experimente an ScPex5p konnten die Bedeutung der TPR-Domänen an der PTS1-Bindung belegen (130). Eine detaillierte Vorstellung von der Interaktion zwischen Pex5p und den PTS1-Peptiden erbrachten molekulare Modellierungs-Experimente und die Identifizierung der Kristallstruktur des Pex5p-PTS1-Komplexes (75). Diese Studien zeigten, dass die sieben TPR-Domänen von Pex5p in zwei Abschnitte unterteilt werden können: in TPRs 1-3 und TPRs 5-7, wobei die 4. Domäne als Verbindungsstück funktioniert, an die das PTS1-Signal bindet. Die intrazelluläre Lokalisation des Importrezeptors wird derzeit kontrovers diskutiert. So wurde entweder eine

weitgehend cytosolische, eine membrangebundene oder intraperoxisomale Lokalisation beschrieben (zur Übersicht: (190, 229)). Diese Daten stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Sequenz von Pex5p über keine Transmembrandomänen verfügt. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Lokalisationen gibt die sog. "erweiterte shuttle-Hypothese" (37, 46, 62, 238), bei der Pex5p die zu importierenden Proteine bindet und sich als mobiler Rezeptor mit seiner Fracht zwischen dem Cytosol und der peroxisomalen Matrix bewegt.

Die PTS2-Zielsteuerungssequenz besitzt eine konservierte Sequenz aus neun Peptiden (R/K)-(L/V/I)-(X<sub>5</sub>)-(H/Q)-(L/A/F) am oder in der Nähe des N-Terminus einiger weniger peroxisomaler Matrixproteine und wurde erstmals am N-Terminus der Thiolase in der Ratte nachgewiesen (223). Obwohl die PTS2-Sequenz bisher nur in wenigen peroxisomalen Matrixproteinen nachgewiesen werden konnte, scheint auch sie hochkonserviert zu sein. PTS2-haltige Proteine konnten bislang in Hefen (58, 81), Pflanzen (68), Trypanosomen (18) und Säugern (117, 163, 177, 223) identifiziert werden. Analog zum PTS1 besitzt das PTS2 ebenfalls einen Importrezeptor, der in diesem Fall von dem *PEX7*-Gen kodiert wird. Dieser Rezeptor (Pex7p) interagiert direkt mit dem PTS2-Nonapeptid und wird gleichfalls unbedingt zum Import PTS2-haltiger Proteine gebraucht (54, 195, 271). Wie Pex5p besitzt auch Pex7p keine Transmembranabschnitte. Das lösliche Protein wurde in einigen Hefen und Säugern gefunden (24, 54, 155, 166, 193, 271), fehlt aber in *C. elegans* (167) und *Y. lipolytica*. Der Pex7p-Rezeptor besitzt sieben charakteristische Sequenzwiederholungen, welche als WD40-Motive bezeichnet werden. Das Hefeprotein hat eine bis zu 20% längere Sequenz als das Homologe in Säugern, was auf längere Abschnitte zwischen den WD40-Motiven zurückzuführen ist (193). Experimente zur Klärung der subzellulären Lokalisation des Pex7p zeigten sowohl eine cytosolische als auch peroxisomale Lokalisation des Proteins (24, 54, 195, 270), was auch in diesem Fall für die "erweiterte shuttle-Hypothese" spricht.

Mit Pex18p und Pex21p wurden zwei strukturell verwandte Peroxine identifiziert, die gemeinsam zusätzlich zu Pex7p beim PTS2-Import in Peroxisomen von *S. cerevisiae* eine Rolle spielen. Die Abwesenheit eines der beiden Peroxine hat nur einen moderaten Einfluss auf den PTS2-Import. Fehlen jedoch beide, wird dieser Weg der peroxisomalen Biogenese unterbrochen, ohne dass aber der PTS1-Import davon betroffen zu sein scheint (192, 219).

In der Hefe *Y. lipolytica* scheinen die PTS2-Zielsteuerung wie auch andere Aspekte der peroxisomalen Biogenese auf gesonderten Wegen zu verlaufen. Weder Pex7p noch Pex18p oder Pex21p konnten bisher identifiziert werden, obwohl die Thiolase eine PTS2-Sequenz zu besitzen scheint. Stattdessen wurde ein neues cytosolisches Peroxin, Pex20p, detektiert, das spezifisch Thiolase in Peroxisomen importiert (230). Zudem interagiert Pex20p mit Pex8p, einem intraperoxisomalen Protein (214), weshalb angenommen wird, dass sich Pex20p ebenfalls wie ein mobiler Rezeptor durch die Membran in die Peroxisomen und zurück bewegt.



Im Gegensatz zu den Matrixproteinen ist der Transportmechanismus für peroxisomale Membranproteine noch weitgehend unverstanden. Ein Membran-PTS (mPTS) konnte erstmals in einer hydrophoben Schleife des Pmp47p von *Candida boidinii* identifiziert werden (49). Dieses integrale Membranprotein besitzt sechs mögliche, die Membran durchspannende Abschnitte und agiert als Transporter für ATP in Peroxisomen (170). Die hydrophobe Schleife enthält eine zentrale Gruppe positiv geladener Aminosäuren, gefolgt von einem Block verschiedener Aminosäuren. Diese zwölf Aminosäuren scheinen für die Zielsteuerung wichtig zu sein. Durch Sequenzvergleiche verschiedener peroxisomaler Membranproteine, einschließlich Pmp70p und Pex3p, schlugen Dyer *et al.* (49) für das mPTS die Konsensussequenz XX(K/R)(KR)3-7X(T/S)XX(D/E)X vor, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Jones *et al.* (123) zeigten, dass peroxisomale Membranproteine auch mehrere Zielsequenzabschnitte besitzen können. So wird Pmp34p, das humane Homologe zu Pmp47p, von zwei sich nicht überlappenden Sequenzabschnitten in die Peroxisomen dirigiert (123). Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass beide Zielsteuerungsabschnitte des Pmp34p an Pex19p binden.

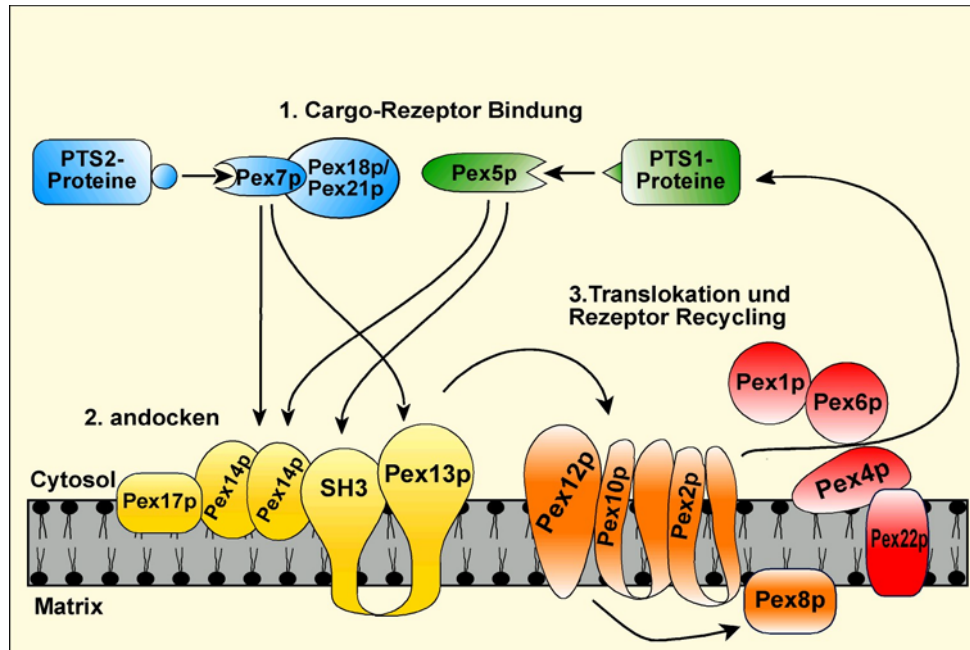
## 1.5 Importkomponenten an der peroxisomalen Membran

Wie bereits zuvor beschrieben, sind Pex5p und Pex7p lösliche Proteine, die sich zwischen dem Cytosol und der peroxisomalen Matrix bewegen können. Das daraus resultierende "erweiterte shuttle-Modell" setzt die Existenz von Rezeptor-spezifischen Bindeproteinen an der peroxisomalen Membran voraus. Unter den peroxisomalen Membranproteinen wurden bislang drei Peroxine als Bindeproteine ("Docking-Proteine") für den peroxisomalen Matrixprotein-Import nachgewiesen.

Als erste Komponente der membrangebundenen Importmaschinerie wurde 1996 das Peroxin Pex13p identifiziert. Es handelt sich dabei um ein integrales Membranprotein mit einer charakteristischen C-terminalen SH3-Domäne, die ins Cytosol gerichtet ist und direkt mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p interagiert (55, 60, 86).

Bei der zweiten Komponente dieses Komplexes handelt es sich um das Pex14p, welches in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden konnte. Sowohl in der Hefe *H. polymorpha* (136) als auch in Säugern (211, 260) wurde das Peroxin als integrales Membranprotein identifiziert. In *S. cerevisiae* dagegen wurde einerseits eine integrale (26) und andererseits eine periphere (5) Lokalisation des Proteins beobachtet. Übereinstimmende Daten gibt es jedoch für ein teilweise an der cytosolischen Seite der peroxisomalen Membran lokalisiertes Pex14p. Es konnte gezeigt werden, dass Pex14p für den PTS1- wie auch für den PTS2-Import essentiell ist. Unter Verwendung des Zwei-Hybrid-Systems wurde eine Interaktion des Pex14p mit beiden Rezeptoren Pex5p und Pex7p beobachtet (71, 178, 211, 235). Ferner

interagiert Pex14p mit Pex13p (5, 26). Diese Bindung ist direkt und erfolgt durch eine Interaktion zwischen einem PXXP-Motiv (in Pex14p) und der SH3-Domäne des Pex13p (21, 71, 80). Pex14p interagiert ebenfalls mit sich selbst (5, 26), mit Pex17p (114, 216) und eventuell mit Pex3p (216, 221), was auf einen Komplex aus verschiedenen Untereinheiten deutet (dazu Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Hypothetisches Modell zum peroxisomalen Matrixprotein-Import.** (1) Proteine, die eine der zwei Zielsteuerungssequenzen, PTS1 oder PTS2, enthalten, werden im Cytosol von den Importrezeptoren Pex5p oder Pex7p erkannt, gebunden und (2) zur peroxisomalen Membran dirigiert. Hier erfolgt die Bindung der Komplexe über membranständige, Rezeptor-spezifische Bindeproteine. (3) Anschließend werden die zu importierenden Proteine in die peroxisomale Matrix gebracht und die Rezeptoren zurückgeführt (nach (107)).

Pex17p, das bislang nur in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert wurde (114), ist ein peripheres Membranprotein, das an der cytosolischen Seite der peroxisomalen Membran lokalisiert ist (Abb. 1.3). Die Fähigkeit, mit Pex14p zu interagieren und die Beobachtung, dass es zusammen mit Pex7p, Pex5p, Pex13p und Pex14p in Koimmunpräzipitations-Experimenten isoliert werden konnte (5, 114), weisen darauf hin, dass es sich bei Pex17p um eine weitere Komponente der peroxisomalen Translokationsmaschinerie handelt.

Wenn die Funktion der peroxisomalen Komponenten Pex13p, Pex14p und Pex17p in der Hefe ausfällt, führt das zu einem vollständigen Importdefekt peroxisomaler Matrixproteine und lässt deshalb auf deren essentielle Bedeutung für den peroxisomalen Matrixprotein-Import schließen. Dennoch bleibt unklar, ob diese Proteine einen stabilen Komplex in der Membran ausbilden oder ob es sich bei den beschriebenen Interaktionen um transiente Wechselwirkungen handelt (zur Übersicht: (107)). Das Modell zum peroxisomalen Matrixprotein-Import kann ebenfalls keine Auskunft darüber geben, wie ein zu importierendes

Protein von der membrangebundenen Importmaschinerie über die Membran in die Matrix der Peroxisomen gelangt. Von Bedeutung ist aber auch die Tatsache, dass im Gegensatz zu Erkenntnissen, die bisher von anderen Organellen gewonnen wurden, nicht nur gefaltete Proteine, sondern auch Oligomere oder selbst mit bis zu 9 nm großen Goldpartikeln beladene Substrate die Peroxisomenmembran passieren können (161, 249, 250). Bei beiden Importwegen scheinen auch Chaperone, das Hsp70p und das DnaJ-ähnliche Djp1p, an der Substraterkennung oder der Zielsteuerung der Substrat-Rezeptor-Komplexe beteiligt zu sein (100, 250).

## 1.6 Die $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren

Neben den  $H_2O_2$ -produzierenden Oxidasen und Katalasen besitzen Peroxisomen ein  $\beta$ -Oxidationssystem, welches dem Abbau aktivierter Fettsäuren (Acyl-CoAs) in Acetyl-CoA-Untereinheiten dient. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, deren  $\beta$ -Oxidation in einen mitochondrialen und einen peroxisomalen Abschnitt unterteilt ist, findet die  $\beta$ -Oxidation in der Hefe *S. cerevisiae* ausschließlich in den Peroxisomen statt und kann mit nicht mitochondrialen Abbauwegen in anderen Organismen verglichen werden (140). Der Abbau gesättigter Fettsäuren wird von drei Enzymen katalysiert. Der Prozess beginnt mit der Oxidation der aktivierten Fettsäure, dem Acyl-CoA, mit Hilfe der Acyl-CoA-Oxidase, welche von dem *POX1*-Gen (oder *FOX1*) kodiert wird (44). Das bifunktionelle Enzym Fox2p (104) katalysiert sowohl den  $\Delta^2$ -Enoyl-CoA-Hydratase- als auch den  $NAD^+$ -abhängigen D-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Schritt, indem es ein 3-Ketoacyl-CoA produziert, das danach von der Keto-Acyl-Thiolase (Fox3p/Pot1p) in Acetyl-CoA und ein um 2 Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA umgewandelt wird (52, 63). Die Abwesenheit von Pox1p, Fox2p oder Fox3p führt zur Unfähigkeit der Zellen, auf Fettsäuren als alleinige Kohlenstoffquelle zu wachsen (44, 63, 104).

*S. cerevisiae* ist in der Lage, auch eine Reihe ungesättigter und mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit *cis*-Doppelbindungen an gerader und ungerader Position abzubauen (Abb. 3.10). Unabhängig von der Lage der Doppelbindung erfolgt zunächst ein  $\beta$ -Oxidationszyklus für gesättigte Fettsäuren bis die Doppelbindung an der 3-*cis* oder 2-*cis*-Position angelangt ist. Zum weiteren Abbau bedarf es einer Reihe zusätzlicher Enzyme (zur Übersicht: (231)). Dazu gehören Isomerasen (Eci1p, Dci1p), die Doppelbindungen umlagern (77, 78, 91), eine  $NADPH$ -abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase (Sps19p) (92) und eine Isocitrat-Dehydrogenase (Idp3p), die für die  $NADPH$ -Regeneration verantwortlich ist (98, 242)]. Kürzlich veröffentlichte Daten beschreiben sogar den Abbau *trans*-ungesättigter Fettsäuren. Es konnte gezeigt werden, dass dazu weder Eci1p, Sps19p noch Dci1p benötigt werden, allerdings wurden auch keine alternativen Proteine gefunden (90).

## 1.7 Porine

Porine, auch als spannungsgesteuerte, Anionen-selektive Kanäle bezeichnet (VDAC, "voltage-dependent anion-selective channel"), gehören zu den dominanten Proteinen der äußeren Membran von Bakterien (13) und der äußeren Mitochondrienmembran (12, 34). Des Weiteren kommen sie sowohl in nicht grünen Plastiden (66) als auch in Chloroplasten vor (67, 187). Sie besitzen eine tonnenartige Protein-Struktur ("β-barrel") und unterscheiden sich kaum in Pro- und Eukaryoten (13, 151). Diese Struktur bildet eine Pore aus, die die Passage kleiner Moleküle durch die Membran erlaubt. Wie diese Pore allerdings in die Membran gelangt und dort inseriert wird, ist bisher noch wenig erforscht. Krimmer *et al.* (139) konnten zeigen, dass der physiologische Biogeneseweg der Porine in die Mitochondrien von verschiedenen Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Proteinen) abhängig ist.

Durch zahlreiche Arbeiten konnte die Existenz von Porinen auch in pflanzlichen Peroxisomen belegt werden (zum Überblick, siehe (197)). Von porinähnlichen Kanälen wurde ebenfalls in peroxisomalen Membranen von Säugern und Hefen berichtet (222, 244). Sulter *et al.* (222) konnten ein Gen für ein 31 kDa großes integrales Membranprotein aus *H. polymorpha* mit porenformenden Eigenschaften klonieren. Die β-Oxidation von Fettsäuren stellt eine der Hauptfunktionen im Stoffwechsel von pflanzlichen, menschlichen und Hefe-Peroxisomen dar. Dabei müssen Intermediate die Organellenmembran passieren. Aber nur wenige Proteine, die als Transporter in der Membran funktionieren, wurden bislang identifiziert und charakterisiert (ABC-Transporter (209); Pat1p/Pat2p, (101, 210)). Spannungsgesteuerte Kanäle konnten bisher in Peroxisomen von *S. cerevisiae* noch nicht kloniert werden, was wahrscheinlich auf präparative Schwierigkeiten zurückzuführen ist. Wegen der Ähnlichkeiten im peroxisomalen Metabolismus verschiedener Organismen liegt dennoch die Annahme nahe, dass Homologe zu pflanzlichen Porinen in Peroxisomen von Hefen oder Säugern existieren.

## 1.8 Fluoreszenzproteine als Reporterproteine

Das grüne Fluoreszenz-Protein (GFP) wurde ursprünglich aus der biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert. Es wird *in vivo* durch das Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Photoprotein Aequorin zu einer grünen Fluoreszenz angeregt. Die Anregung durch blaues oder UV-Licht führt *in vitro* ebenfalls zu derselben Fluoreszenz (189). Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren (27 kDa) mit einem Extinktionsmaximum bei 395 nm und einer Emission bei 509 nm. Untersuchungen in verschiedenen Organismen zeigten, dass für die Fluoreszenz des GFP keine *Aequorea*-spezifischen Faktoren notwendig sind. Es verhält sich stabil

gegenüber Chemikalien und die gleichbleibende Fluoreszenz bei N- oder C-terminaler Fusion mit Fremdproteinen stellt einen weiteren Vorteil dar. Die Klonierung und Expression in heterologen Systemen führten das GFP als einen neuen Reporter für lebende Zellen ein. Durch Mutagenese konnten sowohl intensiver strahlende als auch andersfarbige Varianten (blau, cyan, gelb) des GFP erzeugt werden (232), so dass Mehrfachmarkierungen innerhalb einer Zelle, eines Gewebes oder eines gesamten Organismus möglich wurden.

Mit der Isolierung des roten Fluoreszenz-Proteins DsRed aus einer Anemone der *Discosoma species* wurde ein zusätzliches autofluoreszierendes Reporterprotein entdeckt (10). Das 28 kDa große Protein besitzt ein Absorptionsmaximum bei 558 nm und emittiert bei 583 nm. Es deckt somit als einziges fluoreszierendes Protein den roten Bereich ab. In seiner Anwendung gleicht das DsRed dem GFP. Eine Kombination von GFP- und DsRed-markierten Fremdproteinen innerhalb eines Kompartments oder in verschiedenen Organellen ermöglicht Untersuchungen zur Lokalisation von Proteinen, zu deren Dynamik und Struktur (109, 219)

Die Möglichkeiten, *in vivo* Untersuchungen durchzuführen, machen GFP und DsRed zu wertvollen Reporterproteinen.

## 1.9 Der reverse genetische Ansatz

Im Gegensatz zum klassischen genetischen Ansatz, der mit der Funktionsanalyse aufgrund der Identifizierung von Proteinen mittels phänotypischer Charakterisierung von Mutanten beginnt, geht der ursprünglich von Erdmann und Blobel (59) entwickelte reverse genetische Ansatz den umgekehrten Weg. Aus Zellen von *S. cerevisiae* werden zunächst die Peroxisomen und dann deren Proteine isoliert. Die Sequenzierung (Edman-Abbau) bzw. die massenspektrometrischen Analysen der Proteine in Verbindung mit dem Hefe-Genom-Projekt, welches die vollständige genetische Information der Hefe erst zugänglich macht (82), ermöglichen die Identifizierung, so dass eine anschließende Charakterisierung der Proteine vorgenommen werden kann. Dabei sind Datenbanken, wie die "Yeast proteome database" (35) oder die "MIPS Yeast Genome Database" (162) hilfreich. In ihnen sind Informationen zu den offenen Leserahmen (ORF) der Hefe zusammengestellt.

Dieser methodische Ansatz führte bisher zur Identifizierung von mehr als 30 Proteinen (Erdmann, persönliche Mitteilung), unter anderem von essentiellen Proteinen der Biogenese von Peroxisomen (Pex11p, (59); Pex13p, (60); Pex8p, (196)), von Komponenten der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation (Idp3p, (98)) oder von peroxisomalen Transportern (Fat2p; (19) und Ant1p;(182)).

## 1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Da bislang nur 24 Peroxine und einige Enzyme der  $\beta$ -Oxidation identifiziert und charakterisiert werden konnten, stellt die Suche nach weiteren peroxisomalen Proteinen, vor allem nach membranständigen Transportern, ein wichtiges Ziel der derzeitigen Forschung dar. Auf der anderen Seite ist die Charakterisierung bereits identifizierter peroxisomaler Komponenten für das Verständnis der Biogenese und Funktion dieses Organells wichtig. Beide Forschungsschwerpunkte führten zur Gliederung dieser Arbeit in zwei Teilbereiche.

Den Hauptaspekt bildete die Anwendung des von Erdmann und Blobel (1995) ursprünglich entwickelten reversen genetischen Ansatzes (1.9) in Kombination mit sensiblen massenspektrometrischen Methoden zur systematischen Identifizierung von potentiellen peroxisomalen Proteinen. Im Verlauf dieser Arbeit wurde dazu eine Modifizierung des Ansatzes vorgenommen. Gene potentieller peroxisomaler Proteine sollten kloniert und die Genprodukte charakterisiert werden. Hierbei stellte die GFP-Markierung einen wichtigen Aspekt zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Proteine dar. Zur Funktionsanalyse der Gene sollten Deletionsmutanten erstellt oder bereits vorhandene Mutanten untersucht werden.

In einem zweiten Teilprojekt sollten weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung des peroxisomalen Membranproteins Pex11p erfolgen. Im Detail stellte sich die Frage, ob Pex11p einen spannungsgesteuerten Kanal (1.7) in der Peroxisomenmembran bildet? Dazu sollten elektrophysiologische Messungen an Membranen vorgenommen werden und eine Markierung des Pex11p mit einem Tag erfolgen.