

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Eukaryotische Zelle

Eukaryotische Zellen enthalten eine Vielzahl von Kompartimenten und membranbegrenzten Reaktionsräumen (Organellen). Diese Kompartimentierung ist notwendig, damit unterschiedliche – zum Teil gegenläufige – biochemische Reaktionen nebeneinander in der Zelle ablaufen können. Es gibt keine typischen eukaryotischen Zellen. Fast alle eukaryotischen Zellen besitzen aber eine Plasmamembran, einen Zellkern, Mitochondrien, Vakuolen, Peroxisomen und die Membransysteme des endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Apparates [98].

### 1.1.1 Struktur der Organellen und Proteintransport

Der Zellkern ist von einer Doppelmembran umgeben, dessen äußerer Teil sich in das endoplasmatische Reticulum fortsetzt. Der Transport in den Kern und aus dem Kern heraus erfolgt durch die Kernporen. Im Kern befindet sich der Nukleolus als Ort der Synthese der ribosomalen RNA (rRNA).

Das endoplasmatische Reticulum (ER) ist ein weitverzweigtes Endomembransystem, bestehend aus glattem und rauhem endoplasmatischem Reticulum. Am glatten ER findet vor allem die Lipidsynthese statt. Am mit Ribosomen besetzten rauhen ER werden Proteine cotranslational in das ER importiert (s. Abschn. 1.2, S. 3). Die meisten der Proteine, die nicht im ER verbleiben, sind Proteine der Plasmamembran, vakuoläre oder sekretorische Proteine. Die Zielsteuerung erfolgt dabei über Zielsequenzen und Proteinmodifikation in Form von Glykosylierung [98]. Die O-Glykosylierung<sup>1</sup> von Proteinen findet im Cytosol, im Golgi-Apparat und im ER statt. Die N-Glykosylierung<sup>2</sup> von Proteinen ist auf das ER beschränkt.

Sekretorische und vakuoläre Proteine sowie Proteine der Plasmamembran werden über Vesikel vom ER zum Golgi-Apparat transportiert (s. Abschn. 1.2.3, S. 5) und dort weiter modifiziert. Nach der Proteinreifung auf dem Weg vom cis- zum trans-Golgi werden die Proteine in Vesikel verpackt und zu ihrem Bestimmungsort

---

<sup>1</sup> $\alpha$ -O-glycosidische Bindung an Serin- oder Threoninresten des Proteins

<sup>2</sup> $\beta$ -N-glycosidische Bindung an Asparaginresten des Proteins

transportiert. ER-Proteine werden über den retrograden Vesikeltransport wieder dem ER zugeführt (s. Abschn. 1.2.5, S. 7).

Mitochondrien sind die Orte der Energiegewinnung der Zelle. Sie sind von einer Doppelmembran umgeben, wobei die äußere Membran proteinarm und für kleine Moleküle durchlässig ist. Die innere, stark eingefaltete Membran ist proteinreich und mit den Komplexen der Atmungskette besetzt. Sie ist undurchlässig für Ionen und Metabolite. Mitochondrien enthalten DNA, die vor allem für integrale Membranproteine der Atmungskette codiert. Der größte Teil der mitochondrialen Proteine wird jedoch im Kern codiert, im Cytosol synthetisiert und posttranslational in die Mitochondrien importiert (Übersichtsartikel Mitochondrienimport siehe [82]). Der posttranslationale Import von Proteinen benötigt cytosolische und mitochondriale Chaperone der Hsp70-Familie. Am Transport der Proteine über die mitochondrialen Membranen sind der Tom<sup>3</sup> und zwei Tim<sup>4</sup>-Komplexe beteiligt. Dieser Prozeß benötigt Energie. Einige Proteine der inneren mitochondrialen Membran werden erst in die mitochondriale Matrix importiert und dann über Oxa1p in die innere Membran eingebaut. Oxa1p ist homolog zu YidCp. YidCp bildet in Bakterien ein sec-unabhängiges Translokon der Plasmamembran.

Pflanzliche Zellen enthalten zusätzlich Chloroplasten, in denen die Photosynthese stattfindet. Auch Chloroplasten sind von einer Doppelmembran umgeben und enthalten eigene DNA. Ein Großteil der Chloroplastenproteine wird jedoch im Kern codiert und – wie bei den Mitochondrien – im Cytoplasma synthetisiert und posttranslational in die Chloroplasten importiert (Übersichtsartikel Proteintransport über Membranen siehe [1]). Der Import in die Chloroplasten ist nicht so gut untersucht wie der Proteinimport in die Mitochondrien, verwendet aber einen ähnlichen Mechanismus. Auch hier werden Chaperone der Hsp70-Familie benötigt und der Transport erfolgt über den Toc<sup>5</sup>- und den Tic<sup>6</sup>-Komplex. Dieser Prozeß erfordert Energie in Form von ATP.

In den Chloroplasten enthalten sind die Thylakoidmembranen. Einige Proteine werden in gefaltetem Zustand aus der Chloroplastenmatrix in die Thylakoidmembran importiert. Dies erfolgt über einen Mechanismus ähnlichem dem

---

<sup>3</sup>*translocon in the outer mitochondrial membrane*

<sup>4</sup>*translocon in the inner mitochondrial membrane*

<sup>5</sup>*translocon in the outer chloroplast membrane*

<sup>6</sup>*translocon in the inner chloroplast membrane*

---

bakteriellen TAT<sup>7</sup>-Weg. Die betreffenden Proteine enthalten ein Zwillingsargininmotiv in ihrer Zielsteuerungssequenz. Dieser Transport ist abhängig vom Protonengradienten über die Thylakoidmembran. Zusätzlich gibt es auch in Chloroplasten ein YidC-Homologes (Albino3), welches am Transport von Proteinen über die Membranen beteiligt sein könnte.

Alle eukaryotischen Zellen enthalten außerdem Peroxisomen. Die Funktionen und Charakteristika dieser heterogenen Zellorganellen werden in Abschnitt 1.4 ab Seite 15 näher beschrieben.

Die Vakuole der Hefezelle entspricht dem Lysosom tierischer Zellen. Im Gegensatz zur Speichervakuole pflanzlicher Zellen erfolgt im Lysosom der Abbau von Zellmaterial. Lysosomen enthalten daher eine Vielzahl von Peptidasen und Proteinasen. Vakuolen sind von einer einfachen Zellmembran umgeben und enthalten keine DNA. Die meisten vakuolären Proteine werden über den *vacuolar protein sorting pathway (vps)* unter Beteiligung des ER und des Golgi-Apparates in die Vakuole importiert. Eine Ausnahme bildet Aminopeptidase I, die über den *cytoplasm to vacuole transport (cvt)* direkt vom Cytosol in die Vakuole importiert wird (s. Abschn. 1.3, ab S. 7). Abzubauendes Zellmaterial wird über Mikro- und Makroautophagocytose der Vakuole zugeführt (s. Abschn. 1.3, ab S. 7).

## 1.2 Endoplasmatisches Reticulum

Das endoplasmatische Reticulum (ER) ist das umfangreichste Membransystem der Zelle. Es wurde 1945 von Keith Porter entdeckt. Am mit Ribosomen besetzten rauhen ER (RER) findet die Synthese vieler Membranproteine und von sekretorischen Proteinen statt. Im glatten (*smooth*) ER (SER) erfolgt die Synthese der Membranlipide. Außerdem unterteilt man das endoplasmatische Reticulum nach seiner Lokalisation in perinukleäres und corticales (peripheres) ER. Das perinukleäre ER umgibt den Zellkern. Das corticale endoplasmatische Reticulum ist in der Nähe der Plasmamembran zu finden. Die Synthese und der Import von sekretorischen und vakuolären Proteinen sowie der meisten Proteine der Plasmamembran findet am perinukleärem ER statt.

---

<sup>7</sup>twin arginin translocation

### 1.2.1 Proteinimport in das ER

Die Zielsteuerung von neusynthetisierten Proteinen zu ihrem Bestimmungsort erfolgt über Zielsteuerungssequenzen (Targetingsignale oder Signalsequenzen). Proteine, die cotranslational in das ER importiert werden sollen, besitzen an ihrem N-Terminus eine Signalsequenz aus basischen Aminosäuren, gefolgt von einer hydrophoben Region, der erneut basische Aminosäuren folgen.

Die Proteinsynthese beginnt an freien Ribosomen im Cytosol. Das *signal recognition particle* (SRP<sup>8</sup>) bindet an das Targetingsignal im N-Terminus der naszierenden Polypeptidkette (Übersichtsartikel [81]). Dies führt zu einem Stopp der Translation und dem Transport des Ribosoms zum ER. Dort bindet das SRP an das kanalbildende Protein des Translokons Sec61p und die Proteinbiosynthese wird fortgesetzt (Übersicht Proteintransport über das ER [165, 66]). Das Protein wird direkt in den Sec61p-Kanal synthetisiert. Bei den meisten Proteinen wird die Zielsteuerungssequenz im ER-Lumen abgespalten. Die Membraninsertion erfolgt ebenfalls cotranslational.

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde außerdem ein posttranslatonaler Import von Protein in das ER nachgewiesen [14]. Hierfür sind jedoch nur wenige Substrate bekannt. Desweiteren existiert ein sec-unabhängiger Import von *tail-anchored* Proteinen in das endoplasmatische Reticulum [144].

Einige Proteine werden im ER durch Glykosylierungen posttranslational modifiziert. Proteine, die vollständig modifiziert und korrekt gefaltet wurden, werden in *coated*-Vesikel verpackt, zum Golgi-Apparat transportiert (Übersicht [8, 71]) und dort weiter modifiziert. Einige Proteine gelangen über Vesikeltransport oder heterotrophe Fusion des Zielorganells mit dem ER ohne Beteiligung des Golgi-Apparat zu ihrem Bestimmungsort. Die Existenz der heterotropen Fusion von Organellen mit dem ER ist jedoch umstritten. Fehlgefaltete Proteine werden von einem System, das als *unfolded protein response* (UPR) bezeichnet wird, erkannt und abgebaut.

### 1.2.2 Das Translokon

Sec61p ist der Hauptbestandteil des Translokons für den cotranslationalen Proteinimport. Die wässrige Pore wird von einem heterotrimeren Sec61p-Komplex

---

<sup>8</sup>Bestandteile des SRP sind unter anderem Sec65p und Srp54p

gebildet. Nichtessentieller Bestandteil des Komplexes ist Sbh1p. Sec61p ist außerdem essentieller Bestandteil des posttranslationalen Proteinimportkomplexes, der von einem tetrameren Sec62p/Sec63p-Komplex gebildet wird [67].

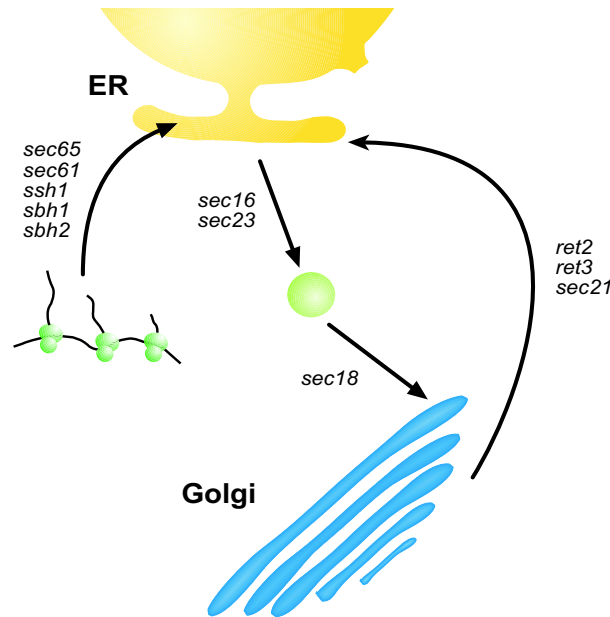
In *S. cerevisiae* gibt es einen weiteren heterotrimeren Komplex, der das Sec61p-Homologe Ssh1p und das Sbh1p-Homologe Sbh2p enthält [34]. Der Ssh1p-Komplex ist wahrscheinlich ein weiterer cotranslatinaler Proteinimportkomplex, dessen Substrate unbekannt sind. Möglicherweise kann der Ssh1p-Komplex die Funktion des Sec61p-Translokons für den cotranslationalen Proteinimport in *sec61*-Mutanten teilweise übernehmen. Die Funktion von Sec61p im posttranslationalen Komplex kann Ssh1p nicht übernehmen [34]. Ssh1p ist nicht essentiell, da Ssh1p durch Sec61p im Komplex ersetzt werden kann. Die genaue Funktion des Ssh1p-Komplexes ist nicht geklärt.

### 1.2.3 Anterograder Transport

Der Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt über COPII-Vesikel und wird auch als anterograder Vesikeltransport bezeichnet (Übersicht siehe Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite). Der Coat von COPII-Vesikeln wird von zwei Coatamer-Subkomplexen bestehend aus Sec23p und Sec24p sowie Sec13p und Sec31p gebildet.

Sec16p bildet die Kontaktstelle für die Coatamer-Komplexe am ER und ist an der Vesikelknospung (*budding*) beteiligt [71]. Die Bildung des Coats wird durch die kleine GTPase Sar1p vermittelt. Der Austausch von GDP zu GTP durch Sec12p führt zur Aktivierung von Sar1p und zur Bindung der Coatamer-Subkomplexe an die Membran. Der Zusammenbau des Coats führt zur Abknospung des Vesikels. Sec23p wirkt als GTPase aktivierendes Protein für Sar1p. Durch die Hydrolyse des GTPs wird der Coat freigesetzt. Dieser Vorgang wird als *uncoating* bezeichnet.

Die Fusion des Vesikels mit dem Golgi-Apparat wird über das *N-ethylmaleimid sensitive fusion protein (NSF)* Sec18p und seinen Partner, das *soluble NSF attachment protein (SNAP)* Sec17p, vermittelt [123]. Sec17p bindet hierfür an seinen *SNAP receptor (SNARE)* auf der Golgi-Membran. Dies führt zur Erhöhung der GTPase Aktivität des NSF Sec18p und zu dessen Freisetzung. Die nachfolgende



**Abbildung 1.1: Übersicht über den Proteintransport über das endoplasmatische Reticulum:** Die Proteintranslation beginnt an freien Ribosomen. Über das SRP wird dieses dann zur ER-Membran transportiert. Dort wird das Protein cotranslational in das ER importiert. Die Proteine werden dann über *coated* Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert. ER-residente Proteine werden über den retrograden Transport zum ER zurück gebracht. Die Abbildung zeigt, welche Schritte bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mutanten unterbrochen sind.

Interaktion des vesikelseitigen  $v^9$ -SNAREs mit dem  $t^{10}$ -SNARE auf der Zielmembran führt zur Fusion des Vesikels mit der Golgi-Membran.

#### 1.2.4 ARF

Sar1p gehört zur Familie der ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ARF). ARFs sind Bestandteile des Coats von Transportvesikeln und an der Vesikelknospung und dem *uncoating* von Vesikeln beteiligt. Arf1p und Arf2p sind am retrograden und anterograden intra-Golgi-Vesikeltransport beteiligt. In der Hefe gibt es zwei Homologe zu Arf3p, Arl1p und Arl2p. Die genaue Funktion von Arf3p ist nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Arf3p nicht für den Golgi-ER-Transport benötigt wird. Ihm wurde eine mögliche Beteiligung an der Peroxisomenbiogenese zugesprochen [128].

<sup>9</sup>*vesicle*  
<sup>10</sup>*target*

## 1.2.5 Retrograder Transport

Der Rücktransport von ER-residenten Proteinen vom Golgi-Apparat zum ER erfolgt über den retrograden Transport. Dieser wird durch COPI-Vesikel vermittelt. Der Coat von COPI-Vesikeln besteht aus mehreren Untereinheiten und beinhaltet unter anderem die Proteine Ret2p ( $\delta$ -Untereinheit), Ret3p ( $\zeta$ -Untereinheit) und Sec21p ( $\gamma$ -Untereinheit) [9].

BrefeldinA ist ein unkompetitiver Inhibitor des intra-Golgi-Transports und wird in Versuchsansätzen als Inhibitor des COPI-Vesikeltransports verwendet [142]. Es bindet den Komplex aus dem ARF des Intragolgitransports und seinem Nucleotidaustauschfaktor Sec7p und unterbindet damit den Austausch von GDP zu GTP am ADP-Ribosylierungs-Faktor. Dies führt zur Auflösung des Golgi-Apparats bzw. dessen Fusion mit dem ER [73]. Bei der Behandlung von Zellen mit BrefeldinA wurden aber auch unspezifische Fusionen von zellulären Membranstrukturen mit dem ER beobachtet. In *S. cerevisiae* hat die Behandlung mit BrefeldinA keinen Effekt.

## 1.2.6 *sec*-Mutanten

Die meisten der am oben beschriebenen Standardsekretionsweg beteiligten Proteine sind essentiell, d.h. Deletionsmutanten sind nicht lebensfähig. In der Hefe *S. cerevisiae* stehen zur Untersuchung des Sekretionsweges jedoch eine Vielzahl temperatursensitive (ts) Mutanten zur Verfügung. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *sec*-Mutanten sind hitzesensitiv. Das heißt die zugehörigen Proteine sind bei permissiver Temperatur (23°C) weitgehend funktionsfähig, bei nicht-permissiver (=restriktiver) Temperatur (30 bis 37°C) ist der jeweilige Sekretionsweg jedoch unterbrochen und die Zellen zeigen einen generellen Wachstumsdefekt. Eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *sec*-Mutanten unter Angabe der in diesen Mutanten gestörten Importschritte gibt Abbildung 1.1 auf der vorherigen Seite.

## 1.3 Autophagocytose

Das Aufrechterhalten der zellulären Homöostase ist wichtig für das Überleben der Zelle. Hierfür muss ein Gleichgewicht zwischen Biosynthese und Abbau geschaf-

fen werden. Der Abbau einzelner Proteine findet am Proteasom der Zelle im Cytosol statt. In der Vakuole werden größere Mengen Zellmaterial abgebaut. Die Aufnahme und der Transport von Teilen des Cytosols oder von Organellen zur Vakuole wird über Mikro- und Makroautophagocytose gewährleistet (Übersicht s. [80]). Bei der Mikroautophagocytose werden kleine Teile des Cytosols von der Vakuole umschlossen. Bei Nahrungsmangel wird die Makroautophagocytose, auch als Autophagocytose bezeichnet, von großen Mengen cytosolischen Materials und von Organellen induziert. Autophagocytose spielt eine wichtige Rolle bei Embryogenese, Differenzierung und Alterung. Fehlfunktionen führen zu einer Vielzahl genetischer Krankheiten und Krebs. Außerdem spielen Defekte in der Autophagocytose eine Rolle bei neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson und Alzheimer [74].

Der *cytoplasm to vacuole transport (cvt)* hat einen ähnlichen Mechanismus und teilt wichtige Komponenten mit der Autophagocytose, findet aber unter Wachstumsbedingungen statt. Beim *cvt*-Weg wird Pro-AminopeptidaseI (prAPI) als dodekamerer Komplex vom Cytosol in die Vakuole transportiert. Dort wird sie von vakuolären Peptidasen prozessiert. Bei Nahrungsmangel wird prAPI über die Autophagocytose in die Vakuole importiert. Im Gegensatz zum *vacuolar protein sorting (vps)* Zielsteuerungsweg, über den die meisten vakuolären Proteine transportiert werden, ist der *cvt*-Weg weitgehend unabhängig vom Golgi-Apparat und dem Standardsekretionsweg.

Bei der Autophagocytose (*atg*) und dem *cvt*-Weg wird zelluläres Material von einer Doppelmembran umschlossen, deren Herkunft bisher nicht geklärt werden konnte. Die äußere Membran des so gebildeten Autophagosoms (bzw. *cvt*-Vesikels) fusioniert mit der Vakuole. Das innere Vesikel – auch als autophagisches oder *cvt*-Körperchen bezeichnet – wird in die Vakuole freigesetzt und abgebaut. *cvt*-Vesikel sind mit 140-160nm deutlich kleiner als Autophagosomen (300-900nm).

Die Hefe *S. cerevisiae* dient als Modellorganismus zur Untersuchung der Autophagocytose und des *cvt*-Weges. Einige Gene, die für die Autophagocytose und den *cytoplasm to vacuole transport* notwendig sind, konnten identifiziert werden (Übersicht siehe Tabelle A.1 auf Seite 146). Die Untersuchung der zugehörigen *atg*- und *cvt*-Mutanten hat zur Entdeckung neuer Mechanismen des Membran- und Proteintransports geführt.



### 1.3.1 Nomenklatur

Die Suche nach Autophagocytosemutanten wurde parallel und unabhängig voneinander in zwei Arbeitsgruppen durchgeführt. Die Gruppe von Ohsumi nannte ihre Autophagocytosemutanten *apg*-Mutanten [154]. Die Gruppe von Thumm nannte ihre Mutanten *aut*-Mutanten [152]. Beide Gruppen benutzten voneinander unterschiedliche Methoden zur Identifizierung von Autophagocytosemutanten. Die Gruppe von Klionsky untersuchte den *cytoplasm to vacuole transport* von Pro-Aminopeptidase I [78] und identifizierte Mutanten mit einem Defekt in diesem *vps*-unabhängigen vakuolären Importweg [51]. Diese Mutanten wurden als *cvt*-Mutanten bezeichnet. Alle drei Arbeitsgruppen nutzten *S. cerevisiae* als Modellorganismus. Nach der Veröffentlichung der vollständigen Sequenz des Genoms von *S. cerevisiae* stellte sich heraus, dass *aut*- und *apg*-Mutanten überlappten und dass es eine Überlappung von Autophagocytose und *cvt*-Weg gibt [50, 133].

Bis Ende 2003 wurden nach der offiziellen Nomenklatur abwechselnd *Apg*-, *Aut*- und *Cvt*-Bezeichnungen und in einigen Fällen davon unabhängige Alternativbezeichnungen verwendet. Im Jahr 2003 einigten sich alle Arbeitsgruppen auf eine einheitliche Nomenklatur [79]. Die meisten für die Autophagocytose oder den *cvt*-Weg essentiellen Proteine werden hiernach mit *Atg*- bezeichnet. Sind Proteine auch am *vps*-Weg beteiligt, wie *Atg6p*, weicht die offizielle Benennung vom *Atg*-System ab. *Cvt1p*, *Cvt4p* und *Cvt8p* sind an mehreren vakuolären Prozessen beteiligt und sind damit keine für die Autophagocytose spezifischen Proteine. Sie besitzen deshalb keine *Atg*-Bezeichnung. In der vorliegenden Arbeit wurde für alle verwendeten Mutanten und Proteine die *Atg*- und *Cvt*-Bezeichnung verwendet – auch wenn dies nicht der offizielle Name des Gens ist. In Tabelle 4.1 auf Seite 74 sind alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine mit ORF und Alternativbezeichnung dargestellt. Die offizielle Bezeichnung ist jeweils durch Fettdruck hervorgehoben.

### 1.3.2 Zwei neue ubiquitinähnliche Konjugationssysteme

Der größte Teil der bisher identifizierten Proteine, die für die Autophagocytose essentiell sind, ist an neuartigen ubiquitinähnlichen Konjugationen beteiligt. Ursprünglich wurde diese Art der kovalenten Bindung bei der Markierung von abzubauenen Proteinen durch Ubiquitin beschrieben. Zum Abbau am Protea-

som bestimmte Proteine werden multiubiquitiniert. Dabei wird Ubiquitin, ein kleines, aus 76 Aminosäuren bestehendes, hochkonserviertes Protein, durch eine Isopeptidbindung über sein C-terminales Cystein an einen Lysin Rest des zu markierenden Proteins gebunden. An dieser Reaktion sind drei Enzyme beteiligt [98]. Mit Hilfe des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) entsteht aus Acyl-AMP-Ubiquitin ein über einen Thioester kovalent verknüpftes Zwischenprodukt aus E1 und Ubiquitin. Unter Freisetzung von E1 wird Ubiquitin auf das Ubiquitin-carrierprotein (E2) übertragen. Ubiquitin-Proteinligasen (E3) katalysieren dann die Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein. Außer Polyubiquitinierungen sind auch Monoubiquitinierungen bekannt. Diese scheinen regulative Funktion zu besitzen.

In den letzten Jahren wurden immer mehr ubiquitinähnliche Konjugationen beschrieben, bei denen zwei Proteine über Isopeptidbindungen kovalent miteinander verbunden werden (Übersichtsartikel siehe [164]). Auch diese Reaktionen benötigen Ubiquitin aktivierende Enzyme (E1) und Ubiquitincarrierproteine (E2); eine Ubiquitinligase (E3) scheint jedoch nicht immer erforderlich zu sein. Ubiquitinähnliche Konjugationen spielen häufig eine Rolle bei Proteintransport- und Membranfusionsprozessen [160]. Als E3-ähnliche Enzyme fungieren häufig Ring-Zinkfingerproteine.

Bei der Autophagocytose sind zwei essentielle ubiquitinähnliche Konjugationen bekannt (Übersichtsartikel s. [108]). Bei der ersten Konjugation wird Atg12p über seinen C-terminalen Cystein-Rest an ein internes Lysin von Atg5p gebunden [100]. Bei der zweiten wird Atg8p über seinen C-terminalen Cysteinrest kovalent an Phosphatidylethanolamin gebunden [61]. Als E1 für beide Reaktionen fungiert Atg7p. Das Ubiquitincarrierprotein für die Bindung von Atg12p an Atg5p ist Atg10p. Atg3p ist das E2-Enzym für die ungewöhnliche ubiquitinähnliche-Konjugation zwischen Atg8p und dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE). E3-ähnliche Enzyme sind für beide Prozesse nicht bekannt.

Die zentrale Komponente des Autophagocytosemechanismus ist Atg8p. Es wird als Pro-Atg8p synthetisiert. Die letzten zwei Aminosäuren von Pro-Atg8p werden durch die Endopeptidase Atg4p, eine Cystein Protease (Caspase), abgespalten und damit das C-terminale Cystein des reifen Atg8p freigelegt [80]. Nach der Bindung von Atg8p an PE wird es zum sich bildenden Autophagosom transportiert. Dieser Vorgang ist abhängig von der Konjugation von Atg12p an

Atg5p [150]. Nach Bildung des Autophagosoms werden alle Proteinkomponenten freigesetzt. Ausnahmen bilden Atg8p und bei cvt-Vesikeln Atg19p [107]. Nach der Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole wird der Teil von Atg8p, der in die Vakuole freigesetzt wird, abgebaut. Der Teil des Atg8p, der sich in der äußeren Membran des Autophagosoms befand und nun in der vakuolären Membran verankert ist, wird unter Abspaltung von PE durch Atg4p in das Cytosol freigesetzt. Danach steht es für eine erneute Bindung an PE zur Verfügung (Atg8p-Zyklus siehe Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite).

Atg8p und Atg19p sind die einzigen Proteine, die bei Nahrungsmangel induziert werden. Wahrscheinlich ist dies notwendig, um die Konzentration beider Proteine unter diesen Bedingungen konstant zu halten.

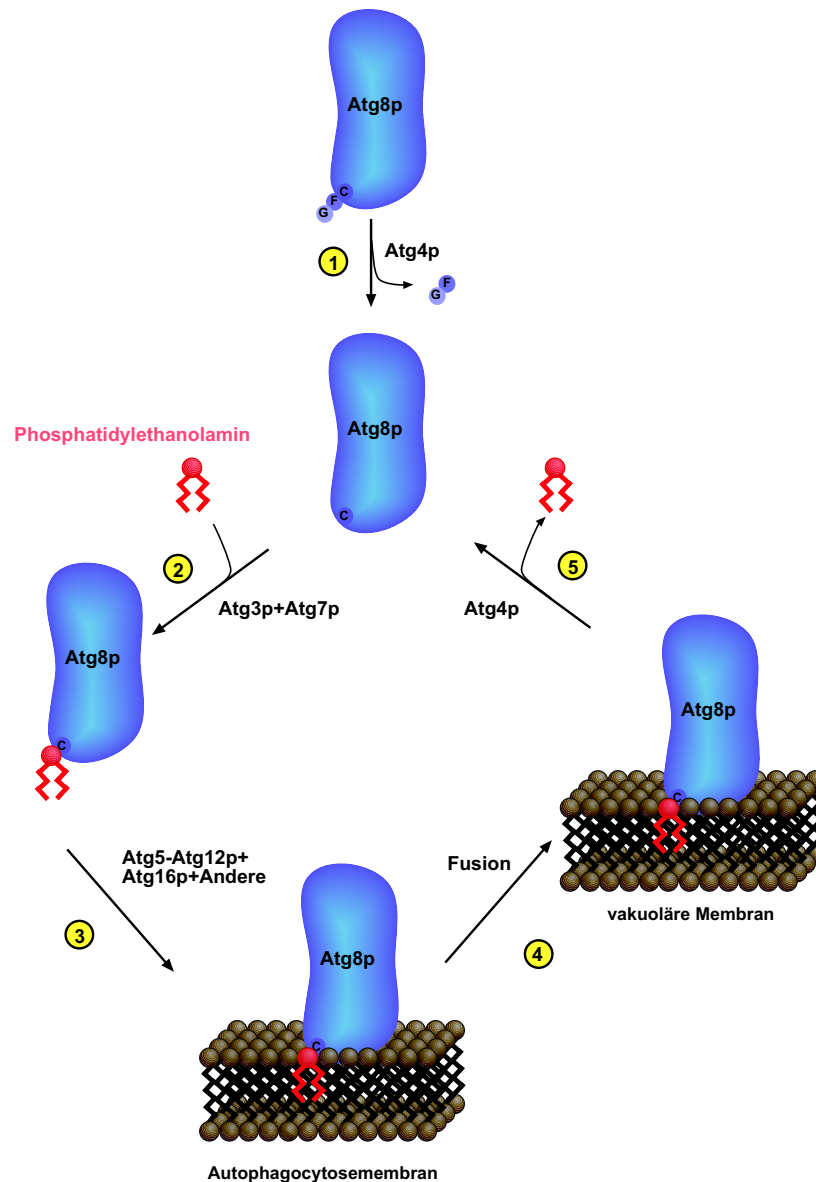
Die Bindung von Atg12p an Atg5p ist notwendig aber nicht hinreichend für die Bindung von Atg8p an das entstehende Autophagosom, das auch als *pre-autophagosomal membrane source* (PAS) bezeichnet wird. Hierfür ist die Oligomerisierung des Atg12p-Atg5p Konjugates über Atg16p notwendig [87]. Die Membranbindung von Atg8p wird wahrscheinlich über Atg3p vermittelt, da Atg3p an Atg12p bindet.

### 1.3.3 Regulation der Autophagocytose

Alle anderen bisher identifizierten für die Autophagocytose essentiellen Proteine scheinen an der Regulation der Autophagocytose oder am Umschalten zwischen Autophagocytose und cvt-Weg beteiligt zu sein. Die zentrale Komponente des regulierten Wechsels zwischen cvt-Weg und Autophagocytose ist die Serin-Threonin-Kinase Atg1p. Sie wird durch die Interaktion mit hypophosphoryliertem Atg13p aktiviert. Unter Wachstumsbedingungen wird Atg13p über den Tor-Signalweg hyperphosphoryliert [72] und hat eine geringe Affinität zu Atg1p. Tor ist eine Phosphatidylinositol-Kinase und reguliert den Zellzyklusfortschritt abhängig vom Nahrungsangebot.

Die Substrate von Atg1p sind unbekannt. Atg1p interagiert mit Atg17p und Atg11p. Atg17p ist für die Autophagocytose spezifisch und nicht notwendig für den cvt-Weg. Atg11p hingegen ist für den cvt-Weg essentiell, aber nicht an der Autophagocytose (Übersichtsartikel s. [146]) beteiligt.

Ein anderer Regulationsmechanismus der Autophagocytose wird über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) Vps34p vermittelt. Vps34p ist eine



**Abbildung 1.2: Reversible Modifikation von Atg8p:** Die Bindung von Atg8p an die Membran wird durch reversible Modifikation reguliert. (1) Neu synthetisiertes Atg8p wird durch Atg4p gespalten. (2) Das freigelegte C-terminale Cystein wird in einer ubiquitinähnlichen Konjugation kovalent an Phosphatidylethanolamin=PE gebunden. Diese Reaktion wird durch Atg7p (E1) und Atg3p (E2) katalysiert. (3) Atg8p wird, abhängig von der Konjugation von Atg12p an Atg5p und der Oligomerisierung des Konjugates, zum sich bildenden Autophagosom transportiert. (4) Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert mit der Vakuole. (Die innere Membran und das darin befindliche Atg8p werden abgebaut.) (5) Der Teil des Atg8p, der sich nach der Fusion in der vakuolären Membran befindet, wird durch Atg4p vom PE abgespalten und in das Cytosol freigesetzt. Hier kann es erneut an PE gebunden werden.

Klasse III PI-3-Kinase und katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P).

Die PI-3-Kinase Vps34p existiert in verschiedenen Komplexen. Komplex I besteht aus Vps30 (Atg6p), Vps34p, Vps15p und Atg14p und ist für die Autophagocytose essentiell. Komplex II enthält Vps38p statt Atg14p und wird für die Autophagocytose nicht benötigt.

Das Produkt der Klasse III PI-3-Kinase Vps34p, PtdIns(3)P aktiviert die Autophagocytose, während Produkte von Klasse I PI-3-Kinasen, wie Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)-P3) die Autophagocytose inhibieren. Die Synthese vom PtdIns(3)P durch den Komplex I der Vps34p Kinase an der präautophagosomalen Membran ist auch für die Membranassoziation von zwei cvt-spezifischen Proteinen, Atg24p und Atg20p, erforderlich [105].

### 1.3.4 Fusion und Abbau

Das Autophagosom wird zur Vakuole transportiert und die äußere Membran fusioniert mit der vakuolären Membran. Dies führt zur Freisetzung des autophagischen Körperchens in die Vakuole. Dort erfolgt der Abbau von Proteinen und Lipiden mit Hilfe von vakuolären Proteasen, wie Prb1p (Cvt1p) und Pep4p, und Lipasen (z.B. Atg15p). Zusätzlich ist Atg22p – ein Protein mit Homologien zu Permeasen – am Abbau des autophagischen Körperchens beteiligt.

### 1.3.5 Unterteilung der Autophagocytose

Die Autophagocytose kann in verschiedene Schritte unterteilt werden. Davon ausgehend können die Autophagocytosemutanten in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden [150].

In Klasse A Mutanten sind sowohl Atg5p als auch Atg8p mit der präautophagosomalen Membranstruktur (PAS) assoziiert, aber das Autophagosom wird nicht gebildet. Klasse A Mutanten sind *atg1*, *atg2*, *atg13* und *atg17*.

Bei Klasse B Mutanten findet keine Assoziation von Atg8p mit der PAS statt. Klasse B Mutanten sind *atg3*, *atg4*, *atg5*, *atg7*, *atg10* und *atg12*. Diese Mutanten haben einen Defekt in den ubiquitinähnlichen Konjugationssystemen. Die Ligation von Atg8p an PE und die damit verbundene Assoziation mit der PAS ist notwendig für die Bildung und Ausweitung des Autophagosoms. Fehlt Atg8p

oder wird die Proteinneusynthese durch Cycloheximid unterbunden, werden Autophagosomen noch gebildet, sind aber wesentlich kleiner als normale Autophagosomen.

In Klasse C Mutanten – *atg6*, *atg9*, *atg14* und *atg16* – sind sowohl Atg5p als auch Atg8p misslokalisiert. Atg16p ist notwendig für die Oligomerisierung und Stabilisierung des Atg12p-Atg5p Konjugates. Atg6p und Atg14p sind Bestandteile des PI-3-Kinase-Komplexes. Die Funktion von Atg9p ist unbekannt.

### 1.3.6 ER-Beteiligung an der Autophagocytose?

Man kann die präautophagosomalen Membranstrukturen (PAS) visualisieren. Woher sie kommen oder wie sie gebildet werden, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Als Ort der Lipidsynthese könnte das ER der Ursprung der PAS sein. Lange Zeit ging man jedoch davon aus, dass die Autophagocytose und der *cytoplasm to vacuole transport* unabhängig vom endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat sind.

Aktuelle Forschungen haben jedoch ergeben, dass einige Sekretionsmutanten einen Defekt in der Autophagocytose aufweisen [63]. So wurde gezeigt, dass in *sec12*, *sec16*, *sec17*, *sec18*, *sec23* und *sec24*-Mutanten keine Autophagocytose mehr stattfindet, *sec13* und *sec31* jedoch keinen Autophagocytosedefekt haben. Sec23p, Sec24p, Sec13p und Sec31p sind Coatamer-Proteine von COPII-Vesikeln, die sich vom ER abschnüren und zum Golgi-Apparat transportiert werden. Die Coatamer-Proteine sind in zwei Subkomplexen, bestehend aus Sec23p und Sec24p sowie Sec13p und Sec31p, organisiert. Für die Autophagocytose ist der Sec23p/Sec24p-Subkomplex notwendig, nicht jedoch der Sec13p/Sec31p-Subkomplex. Sec17p und Sec18p sind im Standardsekretionsweg an der Fusion von COPII-Vesikeln mit dem Golgi-Apparat beteiligt. Während der Autophagocytose werden sie für die Fusion des Autophagosoms mit der Vakuole benötigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass einzelne Komponenten des Sekretionsweges für die Autophagocytose essentiell sind. Der Standardsekretionsweg, der z.B. für den Proteintransport über den vps-Weg notwendig ist, ist jedoch nicht beteiligt.

Atg8p ist notwendig für die Bildung und Vergrößerung des Autophagosoms und könnte daher für die Rekrutierung der Membran verantwortlich sein [76]. Wenn ER oder Golgi-Membranen die Quelle für die PAS sind, müsste Atg8p mit Komponenten des ER oder des Golgi-Apparates interagieren. Es konnte

---

gezeigt werden, dass Atg8p mit einem v-SNARE des ER-Golgi-Transports wechselwirkt [93]. Zusätzlich ist das humane Atg8p-Homologe – GATE-16 – am intra-Golgi-Transport beteiligt. Atg8p kann GATE-16 *in vitro* weitgehend ersetzen.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, könnte das ER oder die Golgi-Zisternen die Quelle der autophagosomalen Membranen sein. Der Transport der beteiligten Proteine und die Bildung der präautophagosomalen Membranen erfolgt jedoch nicht unter Beteiligung des Standardsekretionsweges.

## 1.4 Peroxisomen

1954 wurden Peroxisomen erstmals von Rhodin [121] als „*spherical and oval microbodies*“ beschrieben. 1966 wurden sie dann – nach dem in Ihnen stattfindenden Abbau von Peroxiden – von de Duve und Baudhuin [21] in Peroxisomen umbenannt.

Peroxisomen sind von einer Einzelmembran umgebene heterogene Organellen eukaryotischer Zellen und sind 0,2 bis 1  $\mu\text{m}$  groß. Sie können abhängig vom Organismus und den Umweltbedingungen mehr als 50 Enzyme enthalten. Allen Peroxisomen gemeinsam ist der Abbau von Peroxiden durch Katalase. In Ihnen finden aber auch Stoffwechselreaktionen wie Plasmalogen-, Gallensäure- und Cholesterinbiosynthese [11, 84] sowie Reaktionen des Prostaglandin-Stoffwechsels [129] statt. In einigen niederen Pilzen sind die Peroxisomen die Orte der Penicillin-Biosynthese [104].

Peroxisomen sind mit einem Fettsäure-Oxidationssystem ausgestattet, das sich vom mitochondrialen  $\beta$ -Oxidationssystem deutlich unterscheidet [52, 88, 38]. In niederen Pilzen ist die Fettsäureoxidation ausschließlich in Peroxisomen lokalisiert [88]. In Zellen höherer Eukaryonten findet in den Peroxisomen lediglich der Abbau langkettiger Fettsäuren statt [91].

Eine besondere Form von Peroxisomen ist der *Woronin body* [65] von filamentösen Pilzen wie z.B. *Neurospora crassa*. Diese spezialisierten Peroxisomen enthalten in Ihrer Matrix einen hexagonalen Kristalloiden. *Woronin bodies* dienen dem Verschließen der Plasmamembran bei Schäden am Syncytium.

Defekte in der Biogenese von Peroxisomen führen beim Menschen zu einer Gruppe sehr schwerer angeborener Krankheiten, den *peroxisomal biogenesis disorders* (PBD). Dazu gehören die neonatale Adrenoleukodystrophie, das Refsum



Syndrom, die rhizomelische Chondrodysplasie punctata und das Zellweger Syndrom (Übersichtsartikel s. [37, 46]). Die Krankheiten verlaufen meistens tödlich. Zellweger Patienten sterben oft innerhalb des ersten Lebensjahres.

### 1.4.1 Untersuchung der Peroxisomenbiogenese

Durch die Identifizierung von peroxisomalen Erkrankungen stieg das Interesse an der Erforschung peroxisomaler Funktionen und der Peroxisomenbiogenese. *S. cerevisiae* ist ein idealer Modellorganismus für die Erforschung zellulärer Prozesse, da das Genom sequenziert und das Erzeugen von Mutanten und Transformanten problemlos möglich ist. Die Tatsache, dass die Fettsäureoxidation in *S. cerevisiae* ausschließlich in Peroxisomen stattfindet, ermöglichte die Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Mutanten mit peroxisomalen Defekten [28]. Diese als *oleate non utilizer* (*onu*) bezeichneten Mutanten können in drei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen Mutanten, die einen Defekt in Enzymen der Fettsäureoxidation haben. Diese werden als *fox*<sup>11</sup>-Mutanten bezeichnet. Dem stehen die *pex*<sup>12</sup>-Mutanten gegenüber, die Mutationen in für die Peroxisomenbiogenese essentiellen Genen haben. Die dritte und kleinste Klasse von Mutanten – *pmp*-Mutanten – weisen Mutationen in peroxisomalen Membranproteinen (PMP) auf, die nicht an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind. PMPs sind Transporterproteine.

Die Suche nach *onu*-Mutanten in *S. cerevisiae* [28], proteomische Ansätze [29, 30], der Einsatz von *micro arrays* [137] und andere Versuchsansätze haben zur Identifizierung von bisher 32 für die Biogenese der Peroxisomen essentiellen Proteinen geführt [157]. Sie werden als Peroxine bezeichnet. Eine Übersicht über die bisher bekannten Funktionen und Eigenschaften der Peroxine gibt Tabelle A.2 im Anhang.

### 1.4.2 Import peroxisomaler Matrixproteine

Die meisten der bisher identifizierten 32 Peroxine sind am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligt. Da Peroxisomen keine DNA enthalten, werden alle peroxisomalen Proteine im Kern kodiert. Peroxisomale Matrixproteine wer-

---

<sup>11</sup>*fatty acid oxidation*

<sup>12</sup>*peroxisome biogenesis*



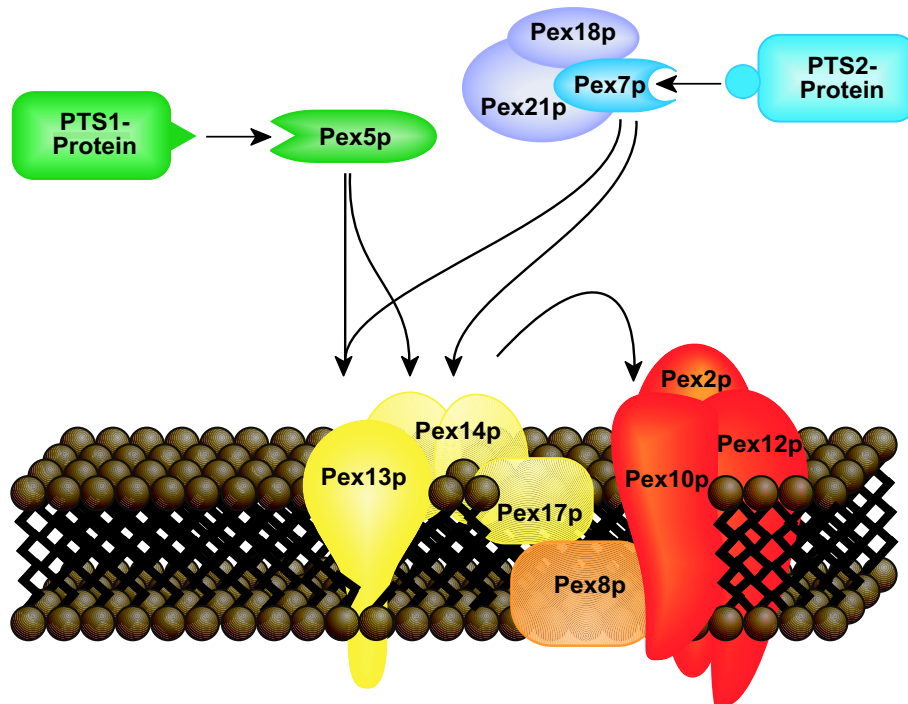
den an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und posttranslational in die Peroxisomen importiert. Bisher sind zwei unterschiedliche Zielsteuerungssequenzen für den Transport von Matrixproteinen zum Peroxisom identifiziert. Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen das *peroxisomal targeting signal* I (PTS1), bestehend aus der Tripeptidsequenz Serin-Lysin-Leucin (SKL) oder Sequenzvarianten mit der Konsensussequenz (S/A/C)(K/H/R)(L/M) am extremen C-Terminus des Proteins [44, 26, 147] und einer davor gelegenen weniger konservierten Region [90]. Das zweite peroxisomale Targetingsignal (PTS2) ist weniger verbreitet und nicht so stark konserviert. Es befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins und folgt der Konsensussequenz (R/K)(L/I/V)X<sub>5</sub>(H/Q)(L/A) [120]. Außerdem gibt es Proteine, die weder ein PTS1-, noch ein PTS2-Signal besitzen [148], z.B. Acyl-CoA-Oxidase aus *S. cerevisiae* [77], *Candida tropicalis* und *Hansenula polymorpha*.

### PTS1-Import

PTS1-enthaltende Proteine werden im Cytosol von dem cytosolischen Rezeptor Pex5p erkannt und gebunden (Schema Matrixproteinimport s. Abb. 1.3 auf der nächsten Seite). Dieser bindet an Pex14p an der peroxisomalen Membran [130, 127]. Pex5p interagiert auch mit Pex13p. Pex13p hat jedoch im Gegensatz zu Pex14p eine geringere Affinität zu dem mit Cargo beladenen Pex5p als zum freien, unbeladenen Pex5p [156].

Der Prozeß der Translokation der Proteine über die peroxisomale Membran ist bisher wenig charakterisiert. Da Pex5p in *pex2*-, *pex10*-, *pex12*- und *pex13*-Mutanten in den Peroxisomen akkumuliert [110], wird angenommen, dass Pex5p gemeinsam mit seinem Cargo transloziert wird und der Pex5p-Cargo-Komplex erst in den Peroxisomen zerfällt. An der Freisetzung des Cargoproteins an der inneren peroxisomalen Membran ist wahrscheinlich Pex8p beteiligt. Pex8p besitzt sowohl eine PTS1- als auch eine PTS2-Sequenz, wird aber unabhängig von diesen beiden Signalen in die Peroxisomen importiert [119]. Außerdem verbindet Pex8p den Dockingkomplex aus Pex13p, Pex14p und Pex17p mit dem Ring-Zinkfingerkomplex aus Pex2p, Pex10p und Pex12p [2].

Die Funktion der anderen am Import beteiligten Peroxine ist bisher nicht geklärt. Eine Studie über die Reihenfolge der Aktion der verschiedenen Proteine hat die Arbeitsgruppe von Gould [18] angefertigt. Sie konnte zeigen, dass Pex13p



**Abbildung 1.3:** Modell des peroxisomalen Matrixproteinimports: PTS1-Proteine werden von Pex5p im Cytosol erkannt und zur peroxisomalen Membran transportiert. PTS2-haltige Proteine werden von Pex7p erkannt. Dieser Komplex wird von Pex18p/Pex21p stabilisiert und zur peroxisomalen Membran transportiert. Die Rezeptor-Cargo-Komplexe binden an den Importkomplex aus Pex13p, Pex14p und Pex17p. Dieser ist über Pex8p an den Komplex der Ring-Zinkfingerproteine Pex2p, Pex10p und Pex12p gebunden. Ob Pex2p, Pex10p und Pex12p für die Translokation der Rezeptor-Cargo-Komplexe oder für den Rücktransport des Rezeptors notwendig sind, ist bisher nicht geklärt. (Abbildung verändert nach Holroyd und Erdmann [57])

und Pex14p an frühen Importschritten beteiligt sind. Pex10p und Pex12p agieren nach Pex13p und Pex14p, jedoch vor Pex4p, Pex22p, Pex1p, Pex6p und Pex2p. Ob Pex10p und Pex12p am Import des Rezeptor-Cargo-Komplexes in die Peroxisomen oder am Rücktransport der Rezeptors, oder an beiden Prozessen beteiligt ist, ist nicht bekannt. Bisher konnte auch nicht geklärt werden, ob der Import von peroxisomalen Matrixproteinen über einen Kanal erfolgt oder ob Vesikeltransport oder Invaginationsprozesse beteiligt sind.

### Import von PTS2-Proteinen und Acyl-CoA-Oxidase

Der cytosolische Rezeptor für PTS2-Proteine ist Pex7p. Pex7p gehört zur Familie der WD40-Proteine; es enthält sechs WD-Wiederholungen. Die WD-Sequenzen sind ungefähr 40 Aminosäuren lang und enthalten ein zentrales Tryptophan(W)-Asparaginsäure(D)-Motiv.

In *S. cerevisiae* wird der Komplex aus Cargo und Pex7p von den redundanten Proteinen Pex18p und Pex21p gebunden. Dies führt wahrscheinlich zur Stabilisierung und/oder zur Oligomerisierung des Rezeptor-Cargo Komplexes [145]. Im Menschen wird diese Funktion wahrscheinlich von Pex5pL (eine lange Isoform des PTS1-Rezeptors Pex5p) übernommen [25], in *Yarrowia lipolytica* und *Neurospora crassa* von Pex20p [135].

Der Komplex aus Cargo, Pex7p, Pex18p und Pex21p bindet über Pex14p an die peroxisomale Membran. Der Mechanismus des Imports ist auch für PTS2-enthaltende Proteine bisher nicht geklärt. Wahrscheinlich ist, dass der Komplex in die Peroxisomen importiert wird und erst dort zerfällt. Für Pex18p ist gezeigt worden, dass es importabhängig mono- und diubiquitiniert und danach abgebaut wird [118]. Da Pex4p ein E2-ähnliches (s. Abschn. 1.3.2, S. 9) Ubiquitin konjugierendes Enzym ist, ist es möglich, dass Pex4p an der Ubiquitinierung von Pex18p beteiligt ist. Bei anderen Importprozessen übernehmen Ring-Zinkfingerproteine häufig die Funktion von E3-ähnlichen Enzymen [164]. Es ist daher vorstellbar, dass Pex2, Pex10p und Pex12p an der Ubiquitinierung von Pex18p beteiligt sind. Für Pex10p konnte bereits eine für Ring-Zinkfinger-E3-Ligasen häufig beobachtet Autoubiquitinierung gezeigt werden [3]. Ein zugehöriges E1-ähnliches Enzym für den peroxisomalen Import konnte bisher nicht identifiziert werden. Vor kurzem konnte außerdem eine Pex10p-abhängige Ubiquitinierung von Pex5p nachgewiesen werden [116], diese ist jedoch unabhängig von Pex4p.

Acyl-CoA-Oxidase (Pox1p) besitzt weder eine PTS1- noch eine PTS2-Sequenz, wird aber von Pex5p erkannt und importiert. Der Bereich der Interaktion von Pox1p mit Pex5p unterscheidet sich jedoch von dem der Interaktion von PTS1-Proteinen mit Pex5p [77]. Während PTS1-Proteine über die TPR<sup>13</sup>-Domäne von Pex5p gebunden werden, bindet Pox1p an einen eng begrenzten Bereich im N-Terminus von Pex5p.

### 1.4.3 Peroxisomale Membranbiogenese

Nur für drei der bisher identifizierten 32 Peroxine – Pex3p, Pex16p und Pex19p – konnte eine Beteiligung an der peroxisomalen Membranbiogenese nachgewiesen werden. Wobei für *S. cerevisiae* noch kein Pex16p-Orthologes identifiziert werden konnte.

Das peroxisomale Matrix- und Membranproteinimport unabhängig voneinander stattfinden, zeigt die Tatsache das Zellen von *pex*-Mutanten mit Defekten im peroxisomalen Matrixproteinimport leere peroxisomale Reststrukturen (*ghosts* oder *remnants* genannt) enthalten.  *Ghosts* enthalten keine Matrixproteine, die Topogenese der Membranproteine ist jedoch nicht beeinträchtigt [4, 30, 45].

In Zellen von *pex3*-, *pex16*- und *pex19*-Mutanten können keine typischen peroxisomalen *ghosts* nachgewiesen werden [143, 142, 56] und viele peroxisomale Membranproteine (PMPs) sind in diesen Mutanten instabil [56]. In humanen *pex19*-Zellen sind Pex14p, Pex3p, Pex12p und ALDP $\beta$  zu mitochondrialen Strukturen misslokalisiert [126].

### ER-Beteiligung an der Peroxisomenbiogenese

Zu Beginn der Untersuchung der Peroxisomenbiogenese wurde angenommen, dass Peroxisomen durch Knospung vom endoplasmatischen Reticulum (ER) entstehen, da die Lipidzusammensetzung der Peroxisomen der des endoplasmatischen Reticulums ähnelt und das ER Ort der Lipidsynthese ist. Es wurde postuliert, dass peroxisomale Membranproteine über das ER zu den Peroxisomen transportiert werden. Für zwei peroxisomale Membranproteine – Pmp22p aus Rattenleber [36] und glyoxisomale Malatsynthase [86, 85] – wurde jedoch gezeigt, dass sie an freien Ribosomen synthetisiert und posttranslational direkt in die Peroxisomen

<sup>13</sup>*tetratricotide peptide repeats*

importiert werden. Deshalb postulierten Lazarow und Fujiki [92] in ihrem *growth and division model*, dass Peroxisomen nicht *de novo* entstehen, sondern sich wie Mitochondrien nur durch Teilung bereits bestehender Peroxisomen vermehren. Nach diesem Modell werden alle peroxisomalen Membranproteine posttranslational direkt in die Peroxisomen importiert.

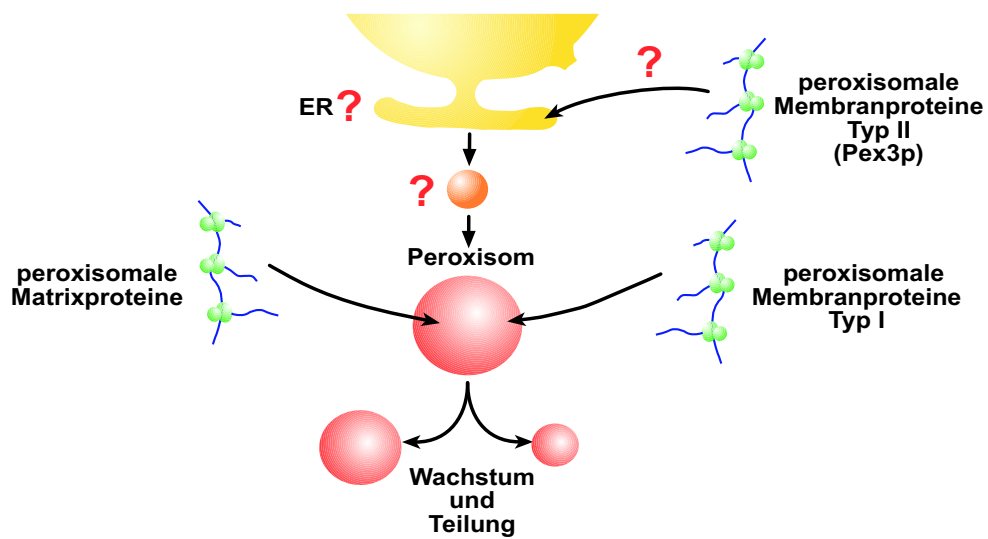
Die Identifizierung von peroxisomalen Mutanten, die keine *ghosts* besitzen [143, 142, 56], jedoch nach Komplementation mit den korrespondierenden Genen *PEX3*, *PEX16* und *PEX19* wieder Peroxisomen bilden können [126, 99], zeigte jedoch, dass Peroxisomen *de novo* entstehen können. Dies hat die Diskussion über eine Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der peroxisomalen Membranbiogenese erneut entfacht.

Das modifizierte Modell der Peroxisomenbiogenese (s. Abb. 1.4) geht davon aus, dass alle Matrixproteine und der größte Teil der Membranproteine an freien Ribosomen synthetisiert und posttranslational direkt in bestehende Peroxisomen importiert werden. Diese wachsen dadurch und teilen sich nach Erreichen einer kritischen Größe. Ein Teil der Peroxine – peroxisomale Membranprotein vom Typ II (auch als „frühe“ Peroxine bezeichnet) – werden hingegen über das ER zum Peroxisom transportiert. Dadurch wäre auch der Transport von Membranlipiden vom ER zum Peroxisomen gewährleistet.

Dieses neue Modell und im Besonderen die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums ist jedoch nach wie vor umstritten. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Beteiligung des ERs sind widersprüchlich. Während z.B. eine Behandlung mit BrefeldinA in *H. polymorpha* zur Akkumulation von Pex3p, Pex8p und Pex14p in ER-artigen Strukturen führt [128], zeigt die BrefeldinA-Behandlung von menschlichen Fibroblasten keinen Effekt. Die Peroxisomenbiogenese wird nicht gestört [142, 143, 158].

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des ER an der Peroxisomenbiogenese wurden in *Y. lipolytica* gefunden. Die Arbeitsgruppe von Rachubinski konnte in Sekretionsmutanten eine transiente Akkumulation von Pex2p und Pex16p in Kar2p haltigen ER-Strukturen nachweisen [153]. Außerdem beobachtete er eine Misslokalisierung von Thiolase. In *pex1*- und *pex6*-Mutanten beobachtete er außerdem die vollständige Lokalisierung von Pex2p und Pex16p zu Kar2p haltigen Strukturen [153].

In Pflanzen führte die Behandlung von Zellen mit BrefeldinA zu einer Akku-



**Abbildung 1.4: Verändertes Modell der Peroxisomenbiogenese:** (1) Peroxisomale Membranproteine vom Typ II, wie Pex3p, werden möglicherweise über das ER und anschließenden Vesikeltransport (2) zum Peroxisom transportiert. (3) Peroxisomale Membranproteine vom Typ I werden, wie auch die Matrixproteine (4), an freien Ribosomen synthetisiert und posttranslational in die Peroxisomen importiert. (4) Durch den Import von Proteinen wachsen die Peroxisomen bis zu einer kritischen Größe und teilen sich dann. (Abbildung verändert nach Holroyd und Erdmann [57])

mulation von überexprimierter peroxisomaler Ascorbat-Peroxidase (APX) in ER-artigen Strukturen. Es konnte jedoch keine Kollokalisierung mit ER-residenten Proteinen wie BIP oder Calnexin nachgewiesen werden [101]. Nach Entfernen des BrefeldinA wurde APX von den ER-artigen Strukturen zum Peroxisom transportiert. Die beobachteten Strukturen stellen also keine Misslokalisationsartefakte, sondern tatsächliche Transportintermediate dar. In *S. cerevisiae* konnte jedoch gezeigt werden, dass die ER-Lokalisation von überexprimiertem Pex15p [27] ein Artefakt der Überexpression ist und endogen exprimiertes Pex15p zu keinem Zeitpunkt eine ER-Lokalisation zeigt [56].

Zusammenfassend, kann festgestellt werden, dass die Frage nach der Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums an der Peroxisomenbiogenese bisher nicht geklärt ist.

### **Pex3p, Pex16p und Pex19p**

Die Untersuchung von Struktur und Funktion der an der Membranbiogenese beteiligten Proteine Pex3p, Pex16p und Pex19p, ist ein wichtiger Bestandteil der Aufklärung des Importmechanismus für peroxisomale Membranproteine.

Pex19p ist am besten charakterisiert. Es ist zum großen Teil cytosolisch lokalisiert und kommt nur partiell an die peroxisomale Membran gebunden vor. Die Membranbindung von Pex19p ist in *S. cerevisiae* abhängig von der Farnesylierung des Proteins [48], in *Y. lipolytica* jedoch nicht [89]. An der peroxisomalen Membran interagiert Pex19p mit Pex3p [103]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Pex19p mit peroxisomalen Membranproteinen interagiert [15, 68, 35, 138, 134, 33]. Vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass Pex19p dabei an eine spezifische Konsensussequenz in peroxisomalen Membranproteinen bindet [124]. Diese Interaktion ist jedoch nicht ausreichend für die Insertion peroxisomaler Membranproteine in die peroxisomale Membran. Hierfür ist zusätzlich eine Transmembrandomäne erforderlich, die das Protein in der Membran verankert. Pex19p dient dabei sowohl als Importrezeptor als auch als Chaparon [124, 69, 33, 134]. So konnte auch festgestellt werden, dass dies nur für peroxisomale Membranprotein vom Typ I gilt [33]. Peroxisomale Membranprotein vom Typ II werden nicht Pex19p-abhängig in die Peroxisomen inseriert. Pex3p ist bisher das einzige PMP vom Typ II. Pex19p-abhängig importierte Membranproteine werden demnach posttranslational in die Peroxisomen importiert. Wie peroxisomale Membranpro-

teine wie Pex3p importiert werden ist noch nicht geklärt. Sie könnten über das ER zum Peroxisomen transportiert werden, wie es das Modell Abb. 1.4 (S. 22) vorschlägt. Es wäre möglich, dass Pex19p auch am Import und Transport dieser Proteine beteiligt ist, dabei jedoch eine andere Funktion als beim Import von peroxisomalen Membranproteinen vom Typ I hat.

Pex16p ist ein integrales peroxisomales Membranprotein. Es wurde noch nicht näher charakterisiert.

Pex3p interagiert mit Pex19p [103] und ist ein integrales Membranprotein [60]. Es wird daher angenommen, dass es den Rezeptor und/oder das Translokon für die Membranproteine an der peroxisomalen Membran darstellt. Die Untersuchung der Topologie von Pex3p führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während in menschlichen Fibroblasten und in *S. cerevisiae* der N-terminus von Pex3p peroxisomal lokalisiert ist [140, 60], sind in CHO-Zellen N- und C-Terminus von Pex3p cytosolisch [41]. In Pflanzen wurde kürzlich eine  $N_{in}$ - $C_{in}$  Topologie für eine der zwei in *Arabidopsis thaliana* existierenden Formen von Pex3p beschrieben [59]. In *H. polymorpha* wurde Pex3p als peripheres Membranprotein [49] charakterisiert.

Für Pex3p werden – je nach Vorhersagematrix – 1 bis 2 Transmembran-domänen angegeben. Die ersten 16 Aminosäuren des *H. polymorpha* Pex3p führen zur Insertion eines Reporterprotein in das ER [7]. Die ersten 40 Aminosäuren des *S. cerevisiae* Pex3p, die auch den ersten Transmembranbereich enthalten [60], bringen ein Reporterkonstrukt zum Peroxisom [83]. Werden die ersten 50 Aminosäuren des *H. polymorpha* Pex3p (entspricht den ersten 40 AS aus *S. cerevisiae*) jedoch in  $\Delta pex3$ -Mutanten exprimiert, insertieren diese in Vesikel nahe der nukleären Membran [32]. Nach Komplementation mit dem gesamten *PEX3*-ORF reifen diese Vesikel zu intakten Peroxisomen.

Faßt man die bisherigen Untersuchungen von Pex3p zusammen, so konnte die genaue Topologie und Funktion von Pex3p bisher nicht eindeutig geklärt werden. Scheinbar beinhaltet die Targetinsequenz von Pex3p auch ein ER-Targetingsignal. Ob dieses funktionell ist und ob Pex3p über das ER zum Peroxisom transportiert wird, ist umstritten.