

## 4 Diskussion

Seit der Erstellung von *pex*-Mutanten in *S. cerevisiae* über einen hefegenetischen Ansatz (Erdmann *et al.*, 1989) konnten seither 23 Peroxine identifiziert werden. Bei diesen Peroxinen handelt es sich um Gene, deren Genprodukte für die Biogenese von Peroxisomen essentiell sind. Die bislang identifizierten Peroxine können im wesentlichen zwei funktionellen Bereichen zugeteilt werden, jenen des Imports von Matrixproteinen und denen der Membranbiogenese.

Am Proteinimport sind sowohl cytosolische als auch membranständige Komponenten beteiligt. Zu den ersteren gehören die beiden Signalsequenz-Erkennungsrezeptoren Pex5p (McCollum *et al.*, 1993; Van der Leij *et al.*, 1993) und Pex7p (Elgersma *et al.*, 1998; Rehling *et al.*, 1996b; Zhang und Lazarow, 1996) sowie die beiden redundanten Proteine Pex18p und Pex21p (Purdue und Lazarow, 2001a; Purdue *et al.*, 1998). Den Hauptanteil stellen aber die peroxisomalen Membranproteine dar. Es wird angenommen, dass mittlerweile alle Komponenten der Importmaschinerie, gefunden wurden (Sacksteder *et al.*, 1999; Subramani *et al.*, 2000).

Über die Funktion dieser Peroxine, die nach dem Docking fungieren, ist jedoch noch immer wenig bekannt. Die aktuellen Funktionsanalysen dieser Peroxine sollen deren Teilnahme am Proteinimport in die peroxisomale Matrix genauer definieren. In diesem Zusammenhang ist es von großer Bedeutung, Informationen über die Struktur, die Topologie und die potentiellen Bindungspartner zu erhalten. Die bis heute gewonnenen Erkenntnisse reichen jedoch noch immer nicht aus, um den Mechanismus der Proteintranslokation aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Funktionsanalyse des peroxisomalen Membranproteins Pex13p durchgeführt und dabei insbesondere die Rolle von Pex13p im PTS2-abhängigen Proteinimport analysiert. Weiter wurde eine zweite Bindestelle innerhalb von Pex13p für Pex14p identifiziert. Schließlich konnte die Interaktionsstelle in Pex13p für Pex19p anhand von Two-Hybrid Daten sowie durch *in vitro* Bindungsstudien gezeigt werden.

## 4.1 Pex7p interagiert mit Pex13p, eine Komponente der peroxisomalen Dockingmaschinerie

Die im Cytosol stattfindende Signalerkennung der peroxisomalen Matrixproteine durch die beiden Signalsequenzrezeptoren Pex5p und Pex7p erfordert die Existenz von Rezeptorbindenden Proteinen an der peroxisomalen Membran (Elgersma *et al.*, 1996a; Rehling *et al.*, 1996b). Das integrale peroxisomale Membranprotein Pex13p ist in der Lage, den PTS1-Rezeptor zu binden (Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996). Des Weiteren scheint Pex13p für den PTS2-abhängigen Proteinimport ebenfalls wichtig zu sein (Girzalsky *et al.*, 1999). Pex14p ist in der Lage, an die beiden PTS-Rezeptoren Pex5p und Pex7p zu binden. Daher wurde Pex14p die Rolle des Konvergenzpunktes innerhalb des PTS-abhängigen Proteinimportweges zugesprochen (Albertini *et al.*, 1997).

Aufgrund der Tatsache, dass zwei Membranproteine in der Lage sind, beide PTS-Rezeptoren zu binden, wurde ein Modell postuliert, welches den Import peroxisomaler Matrixproteine als Kaskade beschreibt (Erdmann *et al.*, 1997). Es beschreibt den Ablauf, wonach die Rezeptoren von einem Bindepartner an der Membran zum nächsten weitergeleitet werden, worauf sich dann die Translokation anschließt.

Obwohl Pex13p als zweite Komponente der peroxisomalen Dockingmaschinerie gilt (Girzalsky *et al.*, 1999), konnte bislang nicht gezeigt werden, ob für Bindung zwischen dem PTS2-Rezeptor und Pex13p direkt ist oder ob dafür noch ein weiteres, bislang nicht identifiziertes Protein notwendig ist.

Um nun zu klären, welcher Bereich von Pex13p für eine Interaktion mit Pex7p erforderlich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von N- und C-terminalen Verkürzungen (Abb. 3.3) von Pex13p erstellt und anschließend in einer Hefe Two-Hybrid Studie auf deren Fähigkeit, mit Pex7p zu interagieren, untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits die Aminosäuren 1-151 in der Lage sind, mit Pex7p zu interagieren. Hingegen zeigt ein Konstrukt, bestehend aus dem Aminosäurebereich 151-386, keine Interaktion mit Pex7p. Der aminoterminal Bereich von Pex13p war jedoch unfähig zu Interaktionen mit den weiteren bislang bekannten Interaktionspartnern, Pex5p und Pex14p (Abb. 3.4).

Im Laufe dieser Analysen wurden von Purdue *et al.* 1998 weitere Interaktionspartner von Pex7p identifiziert. Es handelt sich dabei um die beiden redundanten, cytosolisch

lokalisierten Peroxine Pex18p und Pex21p. Der Bereich von Pex13p, der mit Pex7p interagiert, wurde deshalb auf die Interaktionsfähigkeit mit Pex18p/Pex21p hin untersucht (Abb. 3.35). Tatsächlich waren die beiden Proteine Pex18p und Pex21p ebenfalls in der Lage, an die ersten 100 Aminosäuren von Pex13p zu binden. Die ersten 55 Aminosäuren von Pex13p, welche für eine Interaktion mit Pex7p ausreichend waren, interagierten aber nicht mit Pex18p und Pex21p (Abb. 3.6). Dieses Ergebnis ließ die Vermutung aufkommen, dass die Bindung zwischen Pex13p und Pex18p respektive Pex21p schwächer ist als jene mit Pex7p und möglicherweise von Pex7p vermittelt wird. Diese Vermutung konnte in einer *pex7Δ* Mutante bestätigt werden, da hier keine Interaktion mehr zwischen Pex13p<sub>1-100</sub> und Pex18p/Pex21p beobachtet werden konnte (Abb. 3.8). Andererseits war die Interaktion zwischen Pex7p und Pex13p im Two-Hybrid Test unabhängig von der Anwesenheit von Pex18p/Pex21p (Abb. 3.8).

In einer Analyse von Immunopräzipitaten des *myc*-Pex7-Proteins aus Wildtyp-Zellen und ausgewählten *pex*-Mutanten konnten die Ergebnisse aus den Two-Hybrid Untersuchungen ebenfalls bestätigt werden (Abb. 3.9). Schließlich konnte eine direkte Interaktion zwischen den beiden heterolog exprimierten Proteinen Pex7p und Pex13p<sub>1-100</sub> gezeigt werden (Abb. 3.12), womit ausgeschlossen werden konnte, dass eine weitere, bislang noch nicht identifizierte Komponente bei dieser Interaktion eine Rolle spielt.

Bisher gelang es jedoch nicht, diese Pex7p Bindestelle in Pex13p anhand eines Pex13p-Peptidscans, der mit heterolog exprimiertem und aufgereinigtem His<sub>6</sub>-Pex7p bzw. mit MBP-Pex7p inkubiert wurde, weiter zu charakterisieren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Notwendigkeit einer gefalteten, nichtlinearen Struktur des Aminoterminus von Pex13p. Die Kontaktflächen eines Proteins stellen in der Regel diskontinuierliche Bereiche dar. Diese Bereiche können sich innerhalb der Primärsequenz auf unterschiedlichen Abschnitten befinden und unter Umständen werden sie erst durch die Faltung des Proteins zu einem einzigen Epitop geformt. Dieses Problem ist vermutlich auch bei der Inkubation des gleichen Pex13p-Peptidscans mit Pex14p aufgetreten, wo nämlich die bekannte Bindung von Pex14p an die SH3-Domäne von Pex13p ebenfalls nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es wäre daher an dieser Stelle notwendig, ungerichtete Punktmutationen in diesem Bereich von Pex13p einzuführen, und anschließend auf jene zu selektionieren, welche keine Bindung mehr an Pex7p zeigen.

## 4.2 Die Beteiligung des Aminoterminus von Pex13p beim PTS2-abhängigen Proteinimport

Um die physiologische Funktion des aminoterminalen Bereichs von Pex13p und somit dessen Interaktion mit Pex7p näher beschreiben zu können, wurde der Aminosäurebereich 56-386 von Pex13p in eine *pex13Δ* Mutante mit integriertem PTS2-DsRed exprimiert (Abb. 3.18). Durch diese Studie konnte die Rolle von Pex13p im PTS2-abhängigen Proteinimport entscheidend verfestigt werden. Die aminoterminaler Deletion von Pex13p, welche die Interaktion mit Pex7p verhindert, zeigte auch keinen PTS2-abhängigen Proteinimport mehr, wohingegen der PTS1-abhängige Proteinimport von dieser Deletion unbeeinflusst blieb (Abb. 3.18). Dies bedeutete zugleich, dass in diesem Stamm Pex14p korrekt an der peroxisomalen Membran lokalisiert war. Pex14p ist nämlich einerseits essentiell für den PTS1-abhängigen Proteinimport, andererseits ist Pex14p in einer *pex13Δ* Mutante mislokalisiert.

Somit kann nun gefolgert werden, dass die Rolle von Pex13p nicht alleine auf die gerichtete Lokalisation von Pex14p beschränkt ist, sondern dass Pex13p vielmehr auch eine entscheidende Rolle beim PTS2-abhängigen Import inne hat. Somit sind beide Importwege auch von der Anwesenheit von Pex13p abhängig. Da die beiden PTS-Rezeptoren unterschiedliche Regionen in Pex13p binden, kann ausgeschlossen werden, dass die beiden Importwege im engeren Sinne in Bezug auf Pex13p an einem Punkt zusammentreffen.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Punktmutationen in den Peroxinen Pex2p und Pex8p gefunden wurden, welche selektiv eine der beiden Importrouten blockieren. Pex2p und Pex8p stellen somit zwei Proteine dar, die vermutlich ebenso beide Rezeptoren binden und in einem späteren Schritt der Importkaskade beteiligt sind (Huang *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1995).

### 4.3 Pex7p interagiert mit Pex14p in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p

Das peroxisomale Membran-Protein Pex14p ist ebenso in der Lage, an den PTS2-Rezeptor Pex7p zu binden (Albertini *et al.*, 1997). In einem Two-Hybrid Assay konnte hier gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p sowie im Falle von Pex13p von der Anwesenheit von Pex18p/Pex21p unabhängig ist (Abb. 3.19). Darüber hinaus erscheint die Interaktion in der *pex18Δpex21Δ* Doppelmutante gleich stark wie im Wildtyp, es ist somit keine Verringerung der Affinität zu beobachten. Diese von Pex18p und Pex21p unabhängige Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p konnte auch durch ein Co-Immunopräzipitations-Experiment bestätigt werden (Abb. 3.20). Dieses Ergebnis weist somit auf eine *in vivo* Assoziation dieser beiden Proteine hin.

Durch einen Bindeassay mit heterolog exprimiertem MBP-Pex7p und His-Pex14p (Abb. 3.21) konnte tatsächlich gezeigt werden, dass für die Bindung zwischen Pex7p und Pex14p keine zusätzlichen Hefeproteine erforderlich sind und die Bindung somit direkt ablaufen kann (Abb. 3.21). Da Pex7p ebenfalls in der Lage war, eine direkte Bindung mit Pex13p einzugehen (Abb. 3.22), konnte eine bisher denkbare Funktion von Pex18p und Pex21p ausgeschlossen werden, nämlich die, dass die beiden Proteine als sogenannte Adapter-Proteine zwischen Pex7p und dem Docking-Komplex in Funktion treten.

### 4.4 Die Bindung zwischen Pex7p und Thiolase

Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass Pex7p aus *S. cerevisiae* eine direkte Bindung mit der PTS2-Sequenz der Thiolase eingehen kann (Rehling *et al.*, 1996b; Zhang und Lazarow, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine *in vitro* Bindungsstudie mit bakteriell exprimiertem Pex7p durchgeführt. Dieses Protein war in der Lage, an ein synthetisches PTS2-Protein zu binden (Abb. 3.24), was ein Beweis dafür ist, dass Pex7p an die peroxisomale Signalerkennungssequenz 2 von Thiolase auch in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p binden kann. Die Erkennung des PTS2-Signals geht somit einzig und alleine von Pex7p aus.

## 4.5 Die Rolle von Pex18p und Pex21p im PTS2-abhängigen Proteinimport

In Co-Immunopräzipitations-Experimenten im Rahmen dieser Studie wurde Fox3p aus Zellen des Wildtyps beziehungsweise aus unterschiedlichen Mutanten mit *myc*-Pex7p copräzipitiert (Abb. 3.26). Dabei war zu beobachten, dass die Menge an Thiolase in Stämmen, die einen Importdefekt für PTS2-Proteine aufweisen, drastisch erhöht war, nicht jedoch in *pex18pex21Δ* Stämmen.

Thiolase aus *S.cerevisiae* wird bereits im Cytosol als dimeres Protein zusammengesetzt, was auch in Abwesenheit eines PTS2-Signals möglich ist (Glover *et al.*, 1994). Diese Tatsache widerspricht der Vermutung, dass die beiden Proteine Pex18p und Pex21p eine essentielle Rolle bei der Formation der enzymatisch aktiven Thiolase innehaben könnten. Ihre Aufgabe besteht vermutlich viel eher darin, dass sie für die Formation eines importkompetenten Thiolase-Komplexes erforderlich sind.

Eine ähnliche Funktion wie sie in dieser Arbeit für Pex18p und Pex21p in Bezug auf den Thiolase-Import vorgeschlagen wurde, trifft für Pex20p aus *Y.lipolytica* zu. *Y.l.* Pex20p ist in der Lage, in einer von einem PTS2-Signal unabhängigen Weise an Thiolase zu binden und liegt in Form eines hetero-oligomeren Komplexes zusammen mit Fox3p vorliegt (Titorenko *et al.*, 1998). Die Bildung dieses hetero-oligomeren Komplexes ist vermutlich die Voraussetzung für die Entstehung eines importkompetenten Komplexes. In Analogie zu Pex20p wären Pex18p und Pex21p in der Lage, eine physikalische Interaktion mit Thiolase, welche an Pex7p gebunden vorliegt, einzugehen. In dieser Situation würde das Targeting-signal der Thiolase von Pex7p gebunden werden, während Pex18p/Pex21p sowohl in Kontakt zu Pex7p wie auch in Kontakt zur Thiolase stehen würden, so dass es zu einer Oligomerisierung käme.

Eine Alternative hierzu wäre die Erklärung, dass die beiden Proteine Pex18p und Pex21p für die Formation eines oligomeren oder aber auch eines importkompetenten Komplexes, bestehend aus Pex7p und Fox3p, notwendig sind, indem sie die Bindung zwischen diesen beiden Proteinen stabilisieren. Die dazu in dieser Arbeit gewonnenen Two-Hybrid Daten stützen allerdings diese Hypothese nicht. Beide Möglichkeiten könnten jedoch eine Erklärung für die Tatsache sein, dass Pex20p in der Lage ist, die Doppeldeletionsmutante *pex18Δpex21Δ* zumindest teilweise zu komplementieren (Einwächter *et al.*, 2001).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Oligomerisierung eines Proteins als Voraussetzung für den Import des betreffenden Proteins nicht nur im Falle der Thiolase gewährleistet sein muss. Für die Alkohol-Oxidase aus *Candida boidinii* scheint der Import von einer Oligomerisierung oder einer Aggregation, die auf der cytoplasmatischen Seite des Peroxisoms stattfindet, abhängig zu sein (Bellion und Goodman, 1987). Nach diesem Ergebnis wurde noch mehrfach über die Fähigkeit von Peroxisomen, gefaltete oder oligomerisierte Proteine zu importieren, berichtet (McNew und Goodman, 1994; Walton *et al.*, 1995).

Als Beweis für die Bildung eines oligomeren Komplexes kann das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation herangezogen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pex18p assoziiert mit Pex7p und Fox3p vorliegt (Stein *et al.*, 2002). Ein weiterer Hinweis für die Existenz eines oligomeren Komplexes stellt das Ergebnis der Two-Hybrid Studie in Abb. 3.23 dar, in dem Fox3p nur in Anwesenheit von Pex7p in der Lage war, eine Bindung mit Pex18p einzugehen. Somit konnte die Formation eines ternären Komplexes, bestehend aus Pex18p/Pex21p, Thiolase und Pex7p gezeigt werden.

Im Gegensatz zu Pex18p/Pex21p ist Pex20p in der Lage, an *S. cerevisiae* Pex13p und Pex14p auch in Abwesenheit von Pex7p zu binden (Einwächter *et al.*, 2001). Da bislang in diesem Organismus Pex7p noch nicht identifiziert wurde, kann die Vermutung angestellt werden, dass Pex20p aus *Y. lipolytica* alle Funktionen erfüllt, die für den Import von Thiolase notwendig sind. Es gilt hierbei allerdings zu beachten, dass Pex20p zwar Thiolase bindet, nicht jedoch in Abhängigkeit des PTS2. Die Funktion könnte also derjenigen von Pex18p entsprechen, wobei Pex20p notwendig ist, um einen importkompetenten Komplex zu formen. Es könnte aber im Gegensatz zu Pex18p/Pex21p zusätzlich benötigt werden, um an die Docking-Maschinerie zu binden. Dann müsste aber auch ein Pex7p in *Y. lipolytica* existieren.

Im Menschen konnte ein dem Pex18p ähnlicher Faktor, Pex5pL, identifiziert werden. Dieses Protein ist ebenfalls notwendig, um PTS2-Substrate zu importieren. Somit ist durchaus vorstellbar, dass Pex5pL ebenso an der Bildung eines Cargo-beladenen, importkompetenten PTS2-Komplex beteiligt ist. Im Einklang mit dieser Hypothese steht die von Shimizu *et al.* gefundene Bindung von menschlichem Pex7p an Pex14p (Shimizu *et al.*, 1999). Allerdings kann Pex5pL auch mit Pex14p interagieren. Hierbei verläuft die Interaktion über die di-aromatischen Pentapeptid-Wiederholungen (Fransen *et al.*, 1998; Saidowsky *et al.*, 2001; Will *et al.*, 1999). Im menschlichen Organismus wäre es demnach ebenso denkbar, dass das Docking von Pex5pL und nicht von Pex7p übernommen wird.

## 4.6 Existiert in Pex13p eine zweite Bindestelle für Pex14p?

Die SH3-Domäne von Pex13p ist in der Lage mit Pex14p und mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p zu interagieren. Dies, sowie die Beobachtung, dass Pex14p in *pex13Δ* Zellen mislokalisiert vorliegt (Girzalsky *et al.*, 1999) führte zu der Annahme, dass das integrale Membranprotein Pex13p als Andockstelle für das nur peripher mit der Membran assoziierte Pex14p dient.

Die prolinreiche Region von Pex14p ist für die Interaktion mit der SH3-Domäne von Pex13p nötig (Girzalsky *et al.*, 1999). Da aber eine mutierte Variante von Pex14p (P<sub>87</sub>XXP<sub>90</sub>) → (A<sub>87</sub>XXA<sub>90</sub>) noch korrekt lokalisiert wird, scheint es eine zweite Bindestelle für Pex14p in Pex13p zu geben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein solcher Bereich, der die Aminosäure 173-233 einschließt, gefunden werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass die mutierte Form von Pex14p, (A<sub>87</sub>XXA<sub>90</sub>), trotzdem in der Lage war, mit diesem Bereich von Pex13p zu interagieren (Abb. 3.33). Somit scheint der von der SH3-Domäne unabhängige Bindebereich in Pex13p auch von einer anderen Domäne von Pex14p erkannt zu werden.

Versuche, das Ergebnis durch eine *in vitro* Bindungsstudie mit heterolog exprimiertem Pex14p und einem Pex13p Peptid-Scan zu bestätigen (siehe 3.6.3.1) wurden durchgeführt, konnten aber nicht eindeutig eine direkte Bindung belegen. Denn die als Negativkontrolle durchgeführte Inkubation des Peptidscans mit einem *E.coli* Extrakt lieferte nämlich falsch positive Spots, welche die mit Pex14p erzielten, überlagerten. Eine GST-Pex14p Fusion sollte diesbezüglich Klarheit schaffen, da GST alleine keine Bindung mit diesem Bereich einging (siehe 3.6.3.1). Ob es sich bei den zusätzlich gefundenen Spots um falsch positive Spots oder um Bindebereiche, die nur sehr schwach mit Pex14p interagieren handelt, kann an dieser Stelle noch nicht beantwortet werden.

In jedem Fall scheint die Lokalisation von Pex14p also nicht alleine von der SH3-Domäne, sondern auch vom Aminosäurebereich 233-258 von Pex13p abzuhängen. Dieser „Loop-Bereich“ von Pex13p, der eventuell auch noch eine Transmembrandomäne beinhaltet, könnte Pex14p im Dockingkomplex verankern. Es steht nun an, diese Hypothese durch immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zu bestätigen.

## 4.7 Die Rolle von Pex14p im PTS2-abhängigen Proteinimport

Thiolase war in einem Two-Hybrid Assay in der Lage, mit Pex14p eine Bindung einzugehen. In Abwesenheit von Pex7p oder aber von Pex18p/Pex21p war dies jedoch nicht mehr der Fall (Abb. 3.25). Dies könnte bedeuten, dass ein Komplex gebildet wird, der gleichzeitig Membran-assoziiertes Pex14p, cytosolisch lokalisiertes Pex7p, Pex18p/Pex21p und Thiolase enthält. Im Gegensatz dazu war Thiolase nicht in der Lage, eine Bindung mit dem Aminoterminus von Pex13p in einem solchen Two-Hybrid Assay einzugehen (Abb. 3.25). Dabei erscheint es unwahrscheinlich, dass das Pex13p-Konstrukt als Gal4p Fusionsprotein ein Funktionsdefizit aufweist, da diese beiden Konstrukte erfolgreich eingesetzt wurden, um die Interaktion mit Pex7p und mit Pex18p/Pex21p zu demonstrieren (Abb. 3.6).

Demnach hätte Pex14p im PTS2-abhängigen Import die Rolle des initialen Dockingproteins inne, während Pex13p die bereits unbeladenen PTS1- und PTS2-Rezeptoren binden würde. In nachfolgenden Studien müsste gezeigt werden, ob ein mit Cargo-Proteinen beladener PTS2-Rezeptor tatsächlich in einem Komplex gefunden werden kann, der Pex14p, nicht aber Pex13p beinhaltet. Ein Hinweis hierfür könnte das Ergebnis aus einer Studie mit menschlichen Zellen sein, in dem gezeigt wurde, dass der Pex7p-Pex5pL-PTS2-Substratkomplex anscheinend zuerst Pex14p und danach Pex13p kontaktiert (Otera *et al.*, 2000).

Für den PTS1-Rezeptor Pex5p aus *Pichia pastoris* wurde eine ähnliche Schlussfolgerung gezogen. Hier konnte gezeigt werden, dass Pex5p, wenn es mit einem Cargo-Protein beladen ist, stärker an Pex14p bindet, als ungeladenes Pex5p. Im Gegenzug war die Bindung von unbeladenem Pex5p an Pex13p effektiver als die Bindung zwischen Pex13p und cargobeladenem Pex5p (Urquhart *et al.*, 2000).

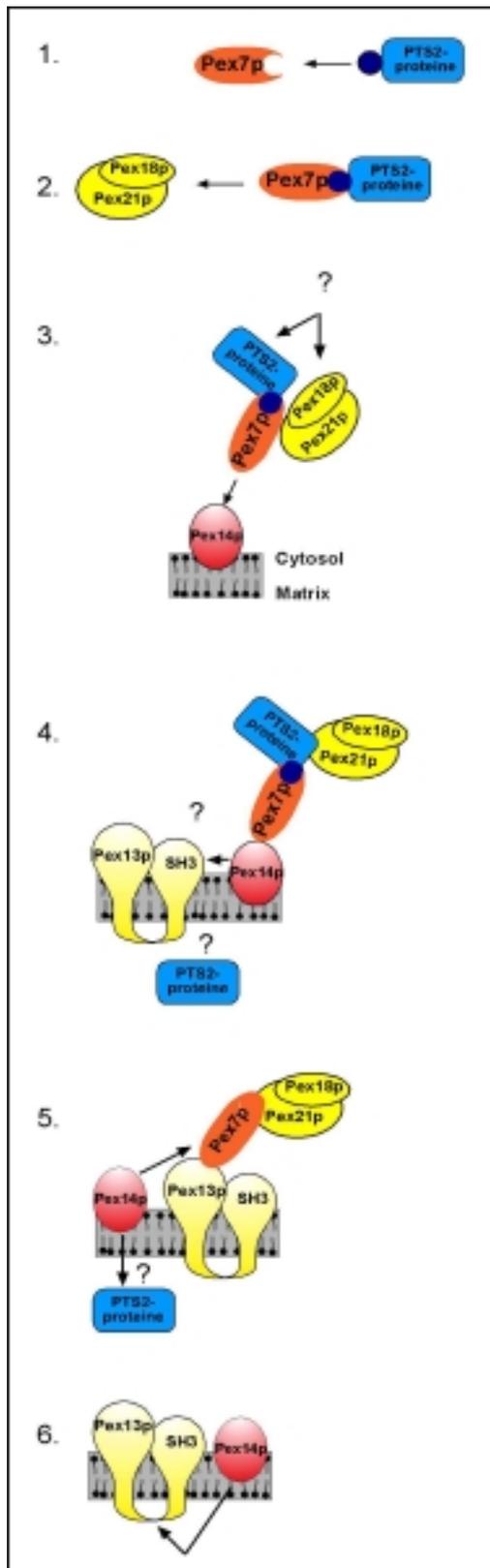
Es stellt sich nun die Frage, warum die Bindung von Fox3p an Pex14p von der Anwesenheit von Pex18p/Pex21p abhängig ist, im Gegensatz hierzu die Bindung von Fox3p an Pex7p jedoch unabhängig von Pex18p/Pex21p erfolgt (Abb. 3.23). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Fox3p nur dann an die peroxisomale Membran rekrutiert wird, wenn ein cytosolischer, importkompetenter Komplex vorliegt. Dies schließt nicht aus, dass Pex7p sowohl Pex14p als auch Pex13p kontaktieren kann; und zwar auch in Abwesenheit von Cargo-Proteinen - eine Konstellation, wie sie in einer *pex18Δpex21Δ* Mutante vorliegt. Diese Vermutung steht im Einklang mit den Daten von Purdue (Purdue und Lazarow, 2001b). Letztere Arbeit zeigte, dass die cytosolische/peroxisomale Verteilung von Pex7p in Abwesenheit von Fox3p unverändert bleibt. Als Konsequenz daraus und als Folge der Daten, die in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunopräzipitationen, ergibt sich, dass *in*

*in vivo* zumindest eine teilweise Bindung des unbeladenen Pex7p an den Docking-Komplex erfolgt (Abb. 3.29). Bisher sind die Schritte, die nach dem Docking ablaufen, noch immer unklar. Der peroxisomale Proteinimport weicht in jedem Fall beträchtlich von der Art und Weise des Imports in Mitochondrien oder in das endoplasmatische Retikulum ab. Bis dato konnte noch immer kein Protein-Translokationskanal identifiziert werden. Es darf dabei jedoch vergessen werden, dass Peroxine durchaus in der Lage sind, gefaltete oder sogar oligomere Proteine zu importieren (McNew und Goodman, 1994).

Interessanterweise konnte in der Arbeit von Purdue (2001) gezeigt werden, dass Pex18p und Pex21p in Folge einer Ubiquitylierung einem ständigen Abbau unterliegen. Dies geschieht jedoch nur in Fraktionen, in denen Pex18p und Pex21p peroxisomal lokalisiert vorliegen (Purdue und Lazarow, 2001b). Der Grund für die Degradation konnte noch nicht weiter aufgeklärt werden. Es könnte sein, dass dieser Abbau eine physiologische Bedeutung im PTS2-abhängigen Proteinimport inne hat. Somit besteht die Möglichkeit, dass die beiden Proteine Pex18p und Pex21p nicht nur für die Formation eines import-kompetenten PTS2-Cargoprotein beladenen Komplexes notwendig sind, sondern auch noch für einen Schritt, der dem Docking folgt.

## **4.8 Modell zum peroxisomalen Import**

Abschließend soll versucht werden, das in Abb. 1.2 vorgestellte Modell zum peroxisomalen Proteinimport mit den in dieser Studie gewonnenen Daten zu ergänzen. Diese Ergänzung erfolgt vor allem in Bezug auf eine mögliche Abfolge des PTS2-abhängigen Proteinimports.



1. Pex7p ist Pex7p ausreichend und notwendig, um im Cytosol das PTS2-Signal zu erkennen.

2. Das mit dem PTS2-Protein (Fox3p) beladene Pex7p bindet an Pex18p und Pex21p, diese Bindung läuft im cytoplasmatischen Raum ab.

Ob das an Pex7p gebundene Pex18p/Pex21p auch Fox3p bindet, ist offen.

3. Anschließend folgt die Bindung dieses Komplexes an Pex14p (Docking). Pex14p kommt also die Rolle des initialen Dockingproteins zu.

4. Die Relevanz der Interaktion von Pex14p mit der SH3-Domäne im PTS2 Import könnte sein, dass durch diese Bindung Pex7p in die Nähe des Pex13p-Aminoterminus gebracht wird.

5. Zu einem späteren Zeitpunkt bindet der unbeladene Pex7p/Pex18p/Pex21p-Komplex an den Aminoterminus von Pex13p. Ob dies geschieht bevor oder nachdem Fox3p in die peroxisomale Matrix transloziert wurde, ist noch unklar.

6. Außerdem bindet Pex14p an einen weiteren Bereich von Pex13p, der sich in der peroxisomalen Matrix befindet. Ob diese Bindung für die von Pex13p vermittelte peroxisomale Lokalisation von Pex14p, bzw. für die Verankerung von Pex14p als integrales Membranprotein von Bedeutung ist, ist offen. Denkbar ist auch, dass die 2 Bindestellen zu unterschiedlichen Zeiten von Pex14p kontaktiert werden. Dann sollte Pex14p zwischen der cytosolischen und lumenalen Seite pendeln.

Abb. 4.1 Modell zum PTS2-abhängigen Matrixproteinimport

## 4.9 Interaktion zwischen Pex19p und Pex13p

Bislang gelang es nicht, ein eindeutiges Modell für das Targeting von PMP zu beschreiben. Lange Zeit wurde angenommen, dass peroxisomale Membranproteine nur ein Targeting-signal enthalten. Jones *et al.* (2001) konnte jedoch zeigen, dass sowohl *PMP34* als auch Pex13p zwei unabhängige Targeting-Informationen enthalten, wobei beide minimalen Targeting-Bereiche von *PMP34* in der Lage waren, an Pex19p zu binden. Es gelang jedoch nicht, ein gemeinsames PMP-Signal zu identifizieren; beschrieben wurde lediglich die Bedeutung basischer Reste innerhalb des putativen Signals (Baerends *et al.*, 2000; Pause, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun analysiert werden, ob in ScPex13p eine oder mehrere Bindestellen für Pex19p vorliegen. Anhand unterschiedlicher Verkürzungskonstrukte von Pex13p wurde in einer *in vivo* Bindungsstudie gezeigt, dass Pex19p in der Lage ist, mit dem Aminosäurebereich 173-233 von Pex13p im Two-Hybrid System zu interagieren (Abb. 3.45). Durch eine *in vitro* Bindungsstudie konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Interaktion direkt ist (Abb. 3.43). Weiterhin war es möglich, den Bindebereich weiter einzuengen, indem gezeigt wurde, dass die Bindung von Pex19p an Pex13p über die Aminosäuren 203-213 verläuft (Abb. 3.47). Somit konnte hiermit gezeigt werden, dass in Pex13p eine Bindestelle für Pex19p vorliegt und dass die Bindung zwischen Pex13p und Pex19p direkt verläuft.

Bei der Suche nach einem Membran-Targetingsignal konnte mittels einer Verkürzungsanalyse das 11 Aminosäuren umfassende Pex13p-Peptid 203-IMKFLKKILYR-213 identifiziert werden (Abb. 3.46). In einer folgenden Substitutionsanalyse konnten außerdem die Aminosäuren, die für die Vermittlung dieser Bindung essentiell waren, ermittelt werden (Abb. 3.47). Es handelt sich bei den für die Bindung wichtigen Aminosäuren hauptsächlich um unpolare Aminosäuren. Wobei die beiden Leucinreste (L) in Position 207 und 211 in diesem identifizierten Konsensussequenz vermutlich eine entscheidende Rolle einnehmen. Mittels *in vivo* Analysen kann deren Bedeutung in weiterführenden Studien durch eben diese eingeführte Punktmutationen geklärt werden. Weiterhin ist hierbei von Interesse, inwieweit dieser Bereich von Pex13p für das Targeting an die peroxisomale Membran ausreichend ist. Dies könnte anhand Verkürzungen, die mit GFP fusioniert werden in einer *pex13Δ* Mutante in Fluoreszenzstudien gezeigt werden.