

Aus dem Institut für Biologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

Über den Transport von peroxisomalen Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Imke Brauer geb. Harms
aus Kaltenkirchen

Lübeck 2014

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. Kai-Uwe Kalies
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.09.2014

Zusammenfassung

Da alle peroxisomalen Proteine kernkodiert sind, müssen sie nach der Synthese im Zytosol zu den Peroxisomen gelangen. Neben dem Modell eines direkten Transportweges zu den Peroxisomen existiert für peroxisomale Membranproteine (PMP) ein Modell, das einen indirekten Proteintransportweg über das ER zu den Peroxisomen formuliert. Der indirekte Proteintransportweg wird zurzeit stark diskutiert. Über den ersten Schritt dieses Transportweges, also über die Integration der PMP in die ER-Membran, ist bisher besonders wenig bekannt. Für das humane PEX3 existieren z.B. derzeit sehr widersprüchliche Angaben über eine mögliche ER-Integration. Aktuell besteht darüber hinaus die Frage, ob neben Klasse II PMP auch Klasse I PMP in die ER-Membran integrieren können und, ob das peroxisomale Matrixprotein ScPex8p über die ER-Membran translozieren kann und damit über das ER zu den Peroxisomen gelangen könnte.

In dieser Arbeit konnte die alkaliresistente *in vitro* Integration des PMP ScPex3p in ER-Membranen der Bäckerhefe gezeigt werden. Unter gleichen Bedingungen konnte auch die ER-spezifische *in vitro* Integration des humanen PEX3 in Säugermikrosomen beobachtet werden. Die beobachteten, alkaliresistenten Integrationen der PMP ScPex22p und ScPex13p weisen weitergehend darauf hin, dass der indirekte Proteintransportweg über das ER nicht nur von Klasse II PMP genutzt werden könnte, da mit ScPex13p auch ein Klasse I PMP in die ER-Mikrosomen integriert werden konnte. Das Matrixprotein ScPex8p konnte dagegen nicht proteasegeschützt in ER-Mikrosomen translozieren, was gegen einen indirekten Proteintransportweg für ScPex8p zu den Peroxisomen spricht.

Die Charakterisierung der PMP-Integrationen zeigte überraschenderweise, dass die getesteten PMP die Fähigkeit zur posttranslationalen Integration in die ER-Membran besitzen. Für diese posttranslationale Integration des ScPex3p und des HsPEX3 konnte eine Abhängigkeit von energieverbrauchenden Proteinen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu benötigten die posttranslationalen Integrationen des ScPex22p und des ScPex13p deutlich weniger Energie. Darüber hinaus konnte mit einer Glykosylierungsmutante des ScPex3p gezeigt werden, dass die posttranslationale Integration in die ER-Membran über den Sec61-Kanal erfolgte. Dagegen wurde eine essentielle Beteiligung der membranständigen Transportproteine Get1p und Get2p der ER-Membran ausgeschlossen.

Mit der Integration des HsPEX3 in ER-Membranen der Hefe konnte abschließend belegt werden, dass die Integration dieses Säugerproteins durch die Komponenten in der ER-Membran der Hefe durchgeführt werden konnte. Die Integration des ScPex3p in Säugermembranen wurde ebenfalls beobachtet. Diese Daten weisen auf einen evolutionär konservierten Integrationsmechanismus hin und unterstützen damit das Modell eines evolutionär konservierten Proteintransportweges der PMP über das ER zu den Peroxisomen.

Abstract

Peroxisomal proteins are encoded in the nucleus, that is why they get synthesized in the cytosol and have to travel to the peroxisomes afterwards. There exist two models for the protein transport of peroxisomal membrane proteins (PMP). On the one hand one model describes a direct integration into peroxisomal membranes and on the other hand one model formulates an indirect pathway of protein transport through the endoplasmic reticulum to the peroxisomes. The indirect pathway of protein transport is still under discussion. We know the least about the first step within this transport pathway, meaning the integration of PMP into the ER membrane. For human PEX3, for instance, there are inconsistent data concerning the integration into ER membranes. Moreover, it is not clear at the moment, if besides class II PMP class I PMP can integrate as well into ER membranes and, if the matrix protein ScPex8p can translocate into the ER and reach the peroxisomes using also this indirect pathway.

In this thesis we observe that the peroxisomal membrane protein ScPex3p can integrate in an alkaline resistant manner into ER membranes *in vitro*. Under the same conditions we show that the human homologue HsPEX3 can integrate specifically into mammalian ER membranes *in vitro*. We tested two more membrane proteins, ScPex22p (class II PMP) and ScPex13p (class I PMP). Both proteins have the ability to integrate into ER-derived microsomes in an alkaline resistant manner, concluding that even class I PMP can travel via the ER to the peroxisomes. In contrast the matrix protein ScPex8p could not be detected in a translocated and protease protected status, speaking against an indirect protein transport pathway for this protein.

Having a further look on the import mechanism surprisingly we discovered that all the selected membrane proteins can integrate in a translation and ribosome independent way into ER membranes. This posttranslational integration was further characterized as being dependent upon energy consuming proteins for ScPex3p and HsPEX3. In comparison the membrane proteins ScPex22p and ScPex13p needed less energy for posttranslational integration. Furthermore a glycosylation mutant of ScPex3p showed that the posttranslational integration into ER membranes was dependent on the channel protein Sec61p and did not depend on the proteins Get1p and Get2p of the Get pathway.

Showing *in vitro* integration of human HsPEX3 into ER membranes derived from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), we notice that the components of the fungal ER membranes can insert this mammalian protein into the membranes. Moreover even ScPex3p gets integrated into mammalian ER membranes *in vitro*, concluding a conserved mechanism of integration.

In summary the data of this work support the idea of an evolutionarily conserved pathway of peroxisomal membrane proteins through the ER to the peroxisomes.

Veröffentlichungen dieser Arbeit

Poster

Harms, I., Thoms, S., Hartmann, E., Kalies, K.U. (2011). Integration of fungal Pex3 into ER membranes (EMBO Konferenz "Protein Transport Systems", Santa Margherita di Pula, Italien).

Harms, I., Hartmann, E., Kalies, K.U. (2012). Integration of human Pex3 into ER membranes (Konferenz "Molecular Machines in Protein Folding and Transport", München, Deutschland).

Vorträge

Harms, I., Hartmann, E., Kalies, K.U. (2012). In Vitro Integration of Human Pex3p into the ER Membrane (Symposium "Protein Trafficking in Health and Disease", Hamburg, Deutschland).

Harms, I., Hartmann, E., Kalies, K.U. (2013). *In vitro* integration of human Pex3p into the ER-membrane (EMBO Konferenz "From Structure to Function of Translocation Machines", Dubrovnik, Kroatien).

Veröffentlichung in Fachzeitschrift

Thoms, S., Harms, I., Kalies, K.U., and Gärtner, J. (2012). Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic* 13, 599-609.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 PROTEINTRANSLOKATION IN DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM	1
1.1.1 <i>Cotranslationale Proteintranslokation über den Sec61-Kanal</i>	1
1.1.2 <i>Posttranslationale Proteintranslokation über den Sec61-Kanal</i>	3
1.1.3 <i>Get-abhängige posttranslationale Integration von tail-anchored Proteinen</i>	5
1.1.4 <i>Unassistierte posttranslationale Integration von tail-anchored Proteinen</i>	6
1.2 DIREKTER PROTEINTRANSPORT ZU DEN PEROXISOMEN.....	7
1.2.1 <i>Proteinimport in die Peroxisomenmatrix</i>	7
1.2.2 <i>Integration peroxisomaler Membranproteine in die peroxisomale Membran</i>	9
1.3 INDIREKTER PROTEINTRANSPORT ÜBER DAS ER ZU DEN PEROXISOMEN	10
1.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 MATERIAL	14
2.1.1 <i>Bakterienstämme</i>	14
2.1.2 <i>Hefestämme</i>	14
2.1.3 <i>Nukleinsäuren</i>	14
2.1.4 <i>primäre Antikörper</i>	15
2.1.5 <i>sekundäre Antikörper</i>	16
2.1.6 <i>Oligonukleotide</i>	16
2.1.7 <i>Medien und Puffer</i>	17
2.1.8 <i>Antibiotika, Chemikalien und Enzyme</i>	19
2.1.9 <i>Kits und Materialien</i>	20
2.1.10 <i>Geräte</i>	20
2.2 NOMENKLATUR UND SCHREIBWEISE DER PROTEINE.....	21
2.3 KLONIERUNGEN UND BAKTERIENKULTUR.....	21
2.3.1 <i>Klonierungsstrategie "Halbvektoren" für HsPEX3-Glykosylierungsmutanten</i>	21
2.3.1.1 <i>Polymerasekettenreaktion</i>	23
2.3.1.2 <i>PvuI-Restriktionsverdau</i>	24
2.3.1.3 <i>Phosphorylierung</i>	24
2.3.1.4 <i>Ligation</i>	24
2.3.2 <i>Klonierung von ScPex8, ScPex13 und ScPex22 in den Transkriptionsvektor pGEM4a</i>	24
2.3.2.1 <i>Polymerasekettenreaktion</i>	25
2.3.2.2 <i>Restriktionsverdau</i>	25
2.3.2.3 <i>Ligation</i>	26
2.3.3 <i>Klonierung von HsPEX16-Peptid in den Expressionsvektor pProExHTaHRa</i>	26
2.3.3.1 <i>Polymerasekettenreaktion</i>	27

2.3.3.2	Restriktionsverdau.....	27
2.3.3.3	Dephosphorylierung.....	28
2.3.3.4	Ligation.....	28
2.3.4	<i>Plasmid-Transformation in E. coli</i>	28
2.3.5	<i>Kultivierung der Bakterien</i>	28
2.3.6	<i>Überexpression und Ni²⁺-NTA-Aufreinigung von 6xHis-HsPEX16-P-HRa</i>	29
2.4	LINEARES SEC22 DNA-KONSTRUKT.....	29
2.5	<i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION.....	30
2.6	<i>IN VITRO</i> TRANSLATION.....	31
2.7	INTEGRATIONS- UND TRANSPORTASSAYS.....	31
2.8	POSTTRANSLATIONALE INTEGRATIONS- UND TRANSPORTASSAYS.....	31
2.9	ALKALIEXTRAKTION DER ER-MEMBRANEN.....	32
2.10	HEXOKINASE/APYRASE-BEHANDLUNG.....	32
2.11	METHODEN ZUR AUFKONZENTRIERUNG.....	32
2.11.1	<i>Trichloressigsäure-Fällung</i>	32
2.11.2	<i>Ammoniumsulfatfällung</i>	33
2.12	ENDOGLYKOSIDASE-BEHANDLUNG.....	33
2.13	PROTEASESCHUTZEXPERIMENT.....	33
2.14	SDS-PAGE UND WESTERN BLOT.....	33
2.15	MEMBRANPRÄPARATIONEN.....	34
2.15.1	<i>Membranpräparationen aus Hefezellen</i>	34
2.15.1.1	<i>Membranpräparation nach YTX66-shift</i>	35
2.15.2	<i>Membranpräparationen aus Hunde- und Schweinepankreas</i>	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	PEX3-PROTEINE INTEGRIEREN <i>IN VITRO</i> IN ER-MEMBRANEN.....	36
3.1.1	<i>Auch andere PMP integrieren in vitro in Mikrosomen</i>	41
3.2	MATRIXPROTEIN SCPEX8P TRANSLOZIERT <i>IN VITRO</i> NICHT IN ER-MEMBRANEN.....	43
3.2.1	<i>Luziferase interagiert nicht alkaliresistent mit den Mikrosomen</i>	45
3.3	ALLE PMP KÖNNEN POSTTRANSLATIONAL INTEGRIEREN.....	47
3.4	DIE POSTTRANSLATIONALE INTEGRATION DES PEX3P IST ERKENNBAR ENERGIEABHÄNGIG.....	56
3.5	DIE POSTTRANSLATIONALE INTEGRATION IST SEC61P-ABHÄNGIG UND NICHT ABHÄNGIG VON GET1P UND GET2P.....	64
3.6	DIE ER-INTEGRATION DES PEX3P IST EVOLUTIONÄR KONSERVIERT.....	67
4	DISKUSSION	70
4.1	PEROXISOMALE MEMBRANPROTEINE INTEGRIEREN IN DIE ER-MEMBRAN.....	70
4.2	PEROXISOMALE MEMBRANPROTEINE KÖNNEN POSTTRANSLATIONAL IN ER-MEMBRANEN INTEGRIERE.....	75
4.3	DIE PEROXISOMALEN MEMBRANPROTEINE BENÖTIGEN UNTERSCHIEDLICHE MENGEN AN ENERGIE ZUR POSTTRANSLATIONALEN INTEGRATION.....	77
4.4	DIE PEX3P-INTEGRATION IST SEC61-ABHÄNGIG UND NICHT ABHÄNGIG VON GET1P UND GET2P.....	80

4.5	EVOLUTIONÄRE KONSERVIERTHEIT DER INTEGRATION DES PEX3P	83
4.6	MATRIXPROTEIN SCPeX8P TRANSLOZIERT <i>IN VITRO</i> NICHT DURCH DIE ER-MEMBRAN	84
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
6	LITERATURVERZEICHNIS	88
	DANKSAGUNG.....	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(p) α F	(prä)pro-alpha Faktor
° C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
35 S	35 Schwefel
aa	<i>aminoacids</i> (Aminosäuren)
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AS	Ammoniumsulfat
ATP/ADP/AMP	Adenosintriphosphat/ -diphosphat/ -monophosphat
bp	Basenpaare
CytB5	Cytochrom B5
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Mix
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Darmbakterium)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
eq	<i>equivalent</i> (Äquivalent), Mengenangabe bei Mikrosomen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
fwd	<i>forward</i> , Richtungsangabe für Oligonukleotide
gp α F	glykosylierter pro-alpha Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
Hs	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB _{Amp}	Luria-Bertani Medium mit Ampicillin
M	Molar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reation</i> (Polymerasekettenreaktion)
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i> , Richtungsangabe für Oligonukleotide
RM	<i>rough membranes</i> (raue ER-Mikrosomen)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Drehzahl pro Minute)
S1, S2, S3	<i>supernatant</i> (Überstand) 1-3
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRP	<i>signal recognition particle</i>
T	<i>total</i> (Ausgang)
T7	Bakteriophage T7
TA-Protein	<i>tail-anchored</i> Protein
TCA	Trichloressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1-1:</i>	<i>Schematische Abbildung zur cotranslationalen Translokation und Integration über den Sec61-Kanal im Säuger.....</i>	<i>2</i>
<i>Abb. 1-2:</i>	<i>Schematische Abbildung zur posttranslationalen Translokation über den Sec61-Kanal in Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 1-3:</i>	<i>Schematische Abbildung zur posttranslationalen Integration von tail-anchored Proteinen durch das Get-System in Bäckerhefe.....</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 1-4:</i>	<i>Peroxisomaler Matrixproteinimport mit Pex5p in Saccharomyces cerevisiae (schematisch).....</i>	<i>8</i>
<i>Abb. 1-5:</i>	<i>Schematisches Modell zur Integration von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) in die Peroxisomenmembran.....</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 1-6:</i>	<i>Modell des indirekten Proteintransportweges über das ER zu den Peroxisomen.....</i>	<i>11</i>
<i>Abb. 2-1:</i>	<i>Schema der Klonierungsstrategie „Halbvektoren“ für HsPEX3-Mutanten.....</i>	<i>22</i>
<i>Abb. 2-2:</i>	<i>Aufbau lineares Sec22 DNA-Konstrukt.....</i>	<i>29</i>
<i>Abb. 3-1:</i>	<i>ScPex3p wird in vitro in Mikrosomen integriert.....</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 3-2:</i>	<i>24ScPex3p wird nach in vitro ER-Integration glykosyliert.....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 3-3:</i>	<i>24ScPex3p wird genau wie ScPex3p in ER-Membranen integriert.....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 3-4:</i>	<i>Schematische Darstellung der Glykosylierungsmutanten des ScPex3p und des HsPEX3.....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 3-5:</i>	<i>Die Glykosylierungsmutanten des HsPEX3 werden nach der Integration glykosyliert.....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 3-6:</i>	<i>Integration des ScPex22p in vitro.....</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 3-7:</i>	<i>ScPex13p integriert in Mikrosomen in vitro.....</i>	<i>43</i>
<i>Abb. 3-8:</i>	<i>ScPex8p ist nicht proteasegeschützt.....</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 3-9:</i>	<i>Das Matrixprotein ScPex8p lagert sich teilweise alkaliresistent an die Mikrosomen an.....</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 3-10:</i>	<i>Luziferase verhält sich nicht alkaliresistent.....</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 3-11:</i>	<i>Posttranslationale Bedingungen zur Charakterisierung der ER-Integration von peroxisomalen Membranproteinen.....</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 3-12:</i>	<i>Posttranslationale in vitro Integration des ScPex3p.....</i>	<i>48</i>
<i>Abb. 3-13:</i>	<i>Die ER-spezifische Glykosylierung des 24ScPex3p kann auch posttranslational erfolgen.....</i>	<i>50</i>
<i>Abb. 3-14:</i>	<i>HsPEX3 kann in vitro posttranslational in Mikrosomen integrieren.....</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 3-15:</i>	<i>Eine peroxisomale Kontamination der Mikrosomen vom Schwein ist nicht zu detektieren.....</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 3-16:</i>	<i>Die posttranslationale Glykosylierung des 34/20HsPEX3 bestätigt die in vitro Integration spezifisch in die ER-Membranen.....</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 3-17:</i>	<i>Posttranslationale Integration von ScPex22p und ScPex13p in Mikrosomen.....</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 3-18:</i>	<i>Die posttranslationale Integration des ScPex3p ist energieabhängig.....</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 3-19:</i>	<i>Die posttranslationale Glykosylierung des 24ScPex3p erfolgt energieabhängig.....</i>	<i>57</i>
<i>Abb. 3-20:</i>	<i>Die posttranslationale Integration des HsPEX3 ist energieabhängig.....</i>	<i>59</i>
<i>Abb. 3-21:</i>	<i>34/20HsPEX3 wird posttranslational in Anwesenheit von ER-Mikrosomen energieabhängig glykosyliert.....</i>	<i>60</i>

Abb. 3-22: Die posttranslationale Integration des ScPex22p wurde durch ATP-Depletion nicht beeinflusst 61

Abb. 3-23: Die posttranslationale Integration des ScPex13p wurde durch ATP-Depletion nicht beeinflusst 62

Abb. 3-24: Die Integration des 24ScPex3p ist Sec61p-abhängig..... 64

Abb. 3-25: Die Integration des 24ScPex3p ist nicht Get1p- und Get2p-abhängig 66

Abb. 3-26: HsPEX3 kann energieabhängig, posttranslational in Hefemembranen integrieren 67

Abb. 3-27: ScPex3p kann energieabhängig, posttranslational in Säugermikrosomen integrieren..... 69

1 EINLEITUNG

Proteine werden im Zytosol von eukaryotischen Zellen synthetisiert. Sie müssen anschliessend an ihren Wirkungsort gelangen. Für diesen Proteintransport existieren verschiedene Signale und Mechanismen in den Zellen. Es sollen zunächst Mechanismen zur Proteintranslokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) vorgestellt werden.

1.1 PROTEINTRANSLOKATION IN DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM

Am Endoplasmatischen Retikulum beginnt der sekretorische Weg. Er führt vom ER über Vesikeltransport zum Golgi-Apparat und schliesslich zur Plasmamembran (Scheele, 1980). Der erste Schritt ist hierbei die Translokation von sekretorischen Proteinen in das ER-Lumen. Für die Translokation gibt es unterschiedliche Translokationsmechanismen.

1.1.1 Cotranslationale Proteintranslokation über den Sec61-Kanal

Sekretorische Proteine können cotranslational über den Sec61-Kanal in das ER-Lumen transloziert werden (Abb. 1-1). Dieser Transport ist abhängig von dem translatierenden Ribosom und SRP (*signal recognition particle*). Besonders gut wurde dieser Prozess *in vitro* im Säuger beschrieben (für Review: Rapoport *et al.*, 1996; Corsi und Schekman, 1996; Park und Rapoport, 2012).

Sekretorische Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz. Dieser hydrophobe Bereich ist wichtig für den Transport zum ER (Blobel und Dobberstein, 1975). Sobald die Signalsequenz während der Translation aus dem Ribosom herausragt, bindet SRP an diese (Walter und Blobel, 1980). Durch die Bindung von SRP kommt es zu einem Translationsarrest (Walter und Blobel, 1981). Der Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP gelangt zu der ER-Membran. Dort bindet SRP an den SRP-Rezeptor, dadurch kommt es zu einem Konformationswechsel des SRP, wodurch das Ribosom wiederum mit dem Sec61-Komplex interagieren kann (Pool *et al.*, 2002; Halic *et al.*, 2006). Der Translationsarrest wird aufgehoben und SRP wird durch GTP-Hydrolyse von dem SRP-Rezeptor abgelöst (Connolly *et al.*, 1991). An der cotranslationalen Translokation ist der trimere Sec61-Komplex beteiligt (Görlich und Rapoport, 1993). Er besteht aus Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ . Die Translokationspore wird von Sec61 α gebildet (Hanein *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 2004; Gogala *et al.*, 2014). Die naszierende Kette wird bei der Translokation direkt durch den Sec61-Kanal in das ER-Lumen transloziert (Crowley *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994). Sobald die Signalsequenz des Proteins in das ER-Lumen ragt, wird sie von dem Signalpeptidasekomplex erkannt. Der Signalpeptidasekomplex trennt die Signalsequenz vom Protein ab (Jackson und Blobel, 1977). Der restliche Teil des Proteins wird in das ER-Lumen transloziert.

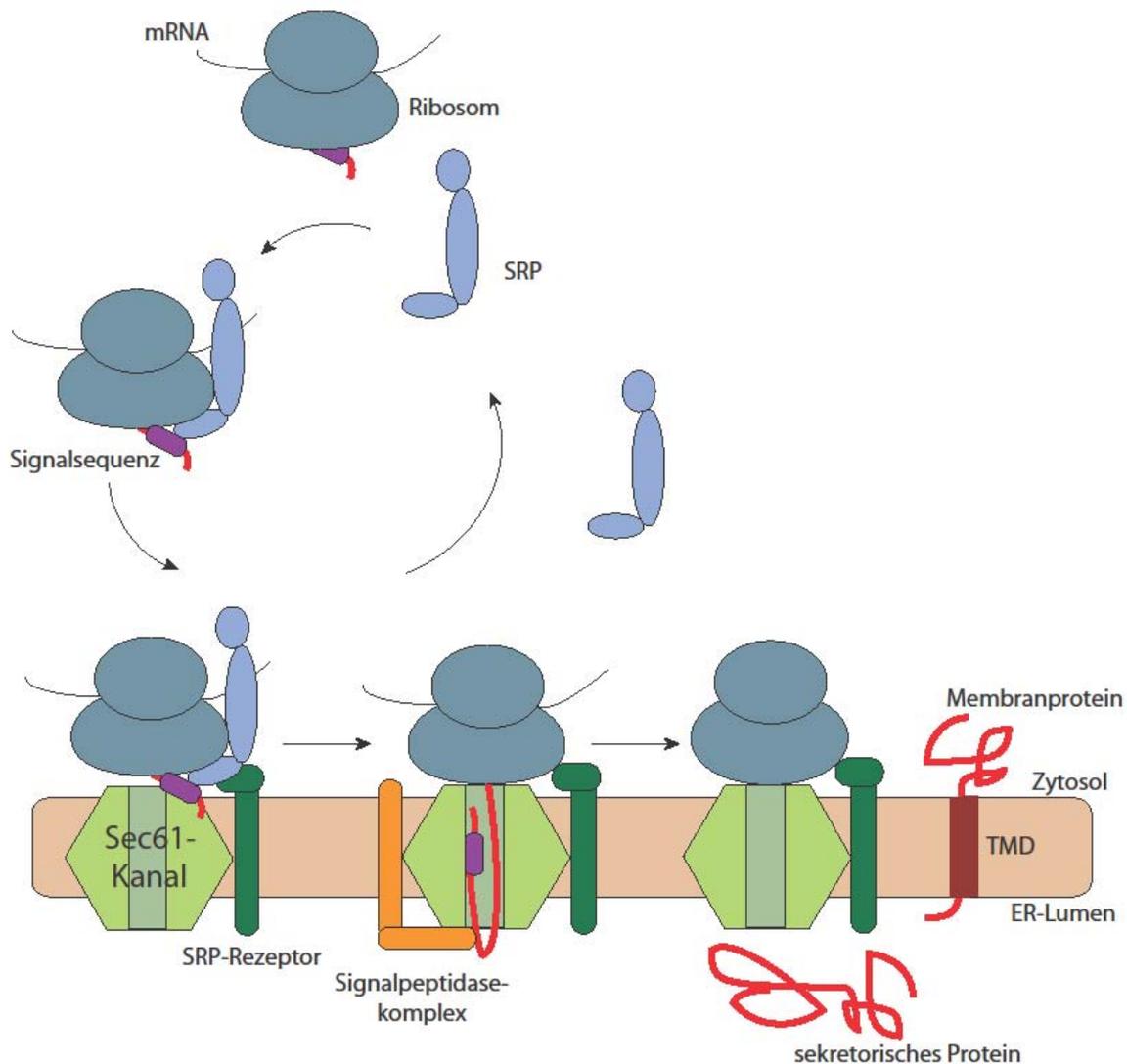


Abb. 1-1: Schematische Abbildung zur cotranslationalen Translokation und Integration über den Sec61-Kanal im Säuger SRP bindet an die Signalsequenz des Proteins und bringt den mRNA-Ribosomen-Komplex zum Sec61-Kanal. Dann bindet SRP an den SRP-Rezeptor und löst sich vom Komplex. Das Ribosom interagiert mit dem Sec61-Kanal, während die wachsende Peptidkette durch den Sec61-Kanal in das ER-Lumen gelangt. Der Signalpeptidasekomplex erkennt die Signalsequenz und trennt diese von dem sekretorischen Protein ab. Nach der Translokation befindet sich das sekretorische Protein vollständig im ER-Lumen. Membranproteine werden dagegen bis zu ihrer Transmembrandomäne in den Kanal transloziert und dann lateral in die Membran entlassen. Nach der Integration sind Membranproteine mit ihrer Transmembrandomäne (TMD) in der ER-Membran verankert.

Membranproteine können ebenfalls durch den trimeren Sec61-Komplex cotranslational in die ER-Membran integriert werden (Abb. 1-1; für Review: Shao und Hegde, 2011b; Park und Rapoport, 2012). Bei Membranproteinen mit einer Signalsequenz bindet SRP wie zuvor beschrieben während der Translation an diese Signalsequenz. Danach gelangt das Ribosom mit naszierender Kette und gebundenem SRP zu der ER-Membran. SRP interagiert mit dem SRP-Rezeptor und anschliessend wird die Translation fortgesetzt. Sobald jedoch eine Transmembrandomäne während der Translokation den Sec61-Kanal erreicht, verändert sich der Ablauf im Gegensatz zur Translokation von sekretorischen Proteinen. Die

Transmembrandomäne verbleibt zunächst im Sec61-Kanal und wird danach lateral in die Membran entlassen (Singer *et al.*, 1987). Dies geschieht auch mit allen folgenden Transmembrandomänen, bis das Membranprotein vollständig translatiert und integriert in der ER-Membran vorliegt. Darüber hinaus existieren auch Membranproteine mit einem Signalanker. Der Signalanker ist die erste Transmembrandomäne des Proteins, diese enthält genau wie die Signalsequenz Informationen zur Lokalisation des Proteins (Wickner und Lodish, 1985). Bei diesen Proteinen bindet SRP während der Translation an den Signalanker. Dieser wird während der Integration im Gegensatz zur Signalsequenz nicht vom Protein abgetrennt.

Im ER-Lumen können weitere Modifikationen der Proteine auftreten, z.B. die Glykosylierung der Proteine an bestimmten Glykosylierungsstellen (für Review: Spiro, 2002). Diese Stellen weisen ein festes Motiv auf, beispielsweise bei N-Glykosylierung (N - die Aminosäure Asparagin) die Aminosäuresequenz NXT (Asparagin-X-Threonin; X= jede AS, außer Prolin). N-Glykosylierung wird ausschließlich im ER-Lumen durch die Oligosaccharyltransferase durchgeführt. Dabei wird an das Protein nach Eintritt in das ER-Lumen eine Oligosaccharidkette angeheftet. Die Anheftung geschieht an das Asparagin der Glykosylierungsstelle.

Der Sec61-Komplex ist evolutionär konserviert (Hartmann *et al.*, 1994). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden für den trimeren Sec61-Komplex die homologen Proteine Sec61p, Sbh1p, und Sss1p gefunden (Deshaies und Schekman, 1987; Toikkanen *et al.*, 1996; Esnault *et al.*, 1994). In der Bäckerhefe existiert weiterhin ein Homolog zum trimeren Sec61-Kanal, der Ssh1-Komplex. Bei diesem Komplex wird vermutet, dass er ebenfalls cotranslational Substrate translozieren kann (Finke *et al.*, 1996).

1.1.2 Posttranslationale Proteintranslokation über den Sec61-Kanal

Einige sekretorische Proteine werden posttranslational über den Sec61-Kanal transloziert. Die posttranslationale Translokation über den Sec61-Kanal wurde bisher größtenteils in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (für Review: Panzner *et al.*, 1995b, Rapoport *et al.*, 1999; Corsi und Schekman, 1996; Park und Rapoport, 2012).

Der Ablauf der posttranslationalen Translokation unterscheidet sich von der cotranslationalen Translokation hauptsächlich dadurch, dass das Protein zunächst vollständig an freien Ribosomen synthetisiert wird (Abb. 1-2). Danach wird das Protein im Zytosol durch Chaperone in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. Die Chaperone gehören zur Hsp70/Hsc40-Familie (Ngosuwana *et al.*, 2003; Buchberger *et al.*, 2010). Wie das Protein anschliessend zur Membran gelangt, ist bisher noch nicht bekannt.

Für die posttranslationalen Translokation in der Hefe ist der heptamere Sec-Komplex essentiell, er besteht aus dem trimeren Sec61-Komplex und dem Sec62/63-Komplex. Der Sec62/63-Komplex setzt sich aus den Proteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p zusammen (Panzner *et al.*, 1995a; Müsch *et al.*, 1992; Deshaies und Schekman, 1989). Die

Brownsche Molekularbewegung ist während der Translokation die treibende Kraft. Damit die Polypeptidkette ins ER-Lumen gelangt, spielt das luminaire Chaperon Kar2p eine essentielle Rolle. Kar2p wird durch Sec63p an die ER-Membran rekrutiert (Brodsky *et al.*, 1995; Lyman und Schekman, 1997). Es bindet an die Peptidkette und verhindert so ein Zurückdiffundieren durch den Sec61-Kanal (Vogel *et al.*, 1990). Kar2p bindet durch einen energieabhängigen Prozess an das translozierende Protein (Matlack *et al.*, 1999). Der Mechanismus der Translokation mittels Bindung von Kar2p wird auch als molekulare Ratsche bezeichnet. Die Polypeptidkette transloziert weiter ins ER-Lumen hinein und weitere Kar2-Proteine binden. Die Translokation ist abgeschlossen, wenn das Protein vollständig im ER-Lumen vorliegt.

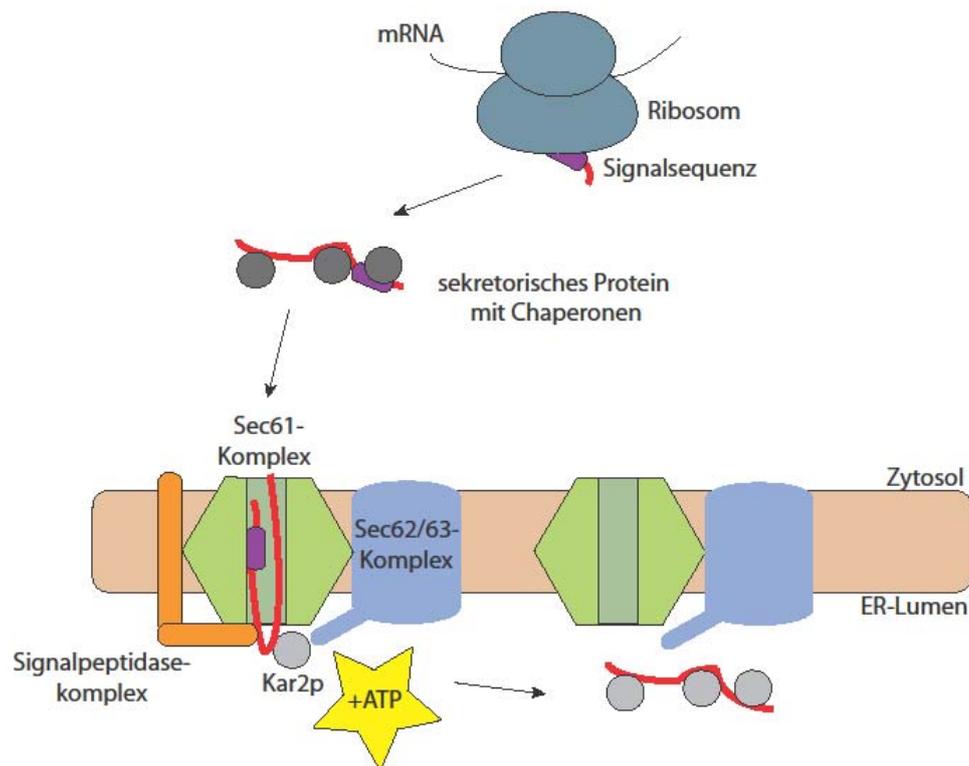


Abb. 1-2: Schematische Abbildung zur posttranslationalen Translokation über den Sec61-Kanal in *Saccharomyces cerevisiae* Das sekretorische Protein wird im Zytosol vollständig synthetisiert. Das Protein wird anschliessend von Chaperonen gebunden und in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. Der Targetingmechanismus zum ER ist unbekannt. Die Translokation erfolgt dann durch den heptameren Sec-Komplex. Sobald die Peptidkette in das ER-Lumen hineinragt, bindet Kar2p und verhindert dadurch ein Zurückgleiten dieser. Die Bindung von Kar2p ist ein energieabhängiger Prozess. Je weiter die Peptidkette in das ER-Lumen hineinreicht, desto mehr Kar2p binden daran. Die Translokation ist abgeschlossen, wenn sich das sekretorische Protein vollständig im ER-Lumen befindet.

Auch bei posttranslationaler Translokation können Modifikationen an dem Protein erfolgen. Die Prozessierung durch den Signalpeptidasekomplex oder N-Glykosylierung mittels Oligosaccharyltransferase sind mögliche posttranslationale Modifikationen.

Im Säuger existiert ebenfalls ein posttranslationaler Translokationsweg über den Sec61-Kanal (Schlenstedt *et al.*, 1990; Shao und Hegde, 2011a; Johnson *et al.*, 2012; Dissertation Vivica Stokes, 2012; Lakkaraju *et al.*, 2012). Für diesen Translokationsmechanismus wird ein

ähnlicher Ablauf wie in der Hefe vermutet, obwohl im Säuger bisher noch keine homologen Proteine zu Sec71p und Sec72p gefunden werden konnten (Park und Rapoport, 2012).

Das Protein wird zunächst vollständig synthetisiert und von Chaperonen gebunden. Im Säuger sind bisher zwei unterschiedliche Targetingmechanismen für eine spezielle Substratgruppe bekannt. Kleine sekretorische Proteine mit N-terminaler Signalsequenz können calmodulinabhängig posttranslational translozieren (Shao und Hegde, 2011a). Posttranslationale Translokation von kleinen sekretorischen Proteinen kann aber auch ein TRC40-abhängiges Targeting zum Sec61-Kanal beinhalten (Johnson *et al.*, 2012). Studien zum Translokationsablauf existieren nicht. Es gibt aber im Säuger ein Homolog zu Kar2p, das BIP genannt wird. Für BIP bestehen Hinweise darauf, dass es die gleiche Funktion wie Kar2p in der posttranslationalen Translokation übernimmt (Awe *et al.*, 2008).

Generell wurde eine posttranslationale Integration eukaryotischer Membranproteine durch den Sec61-Kanal bisher noch nicht beschrieben (Shao und Hegde, 2011b).

1.1.3 Get-abhängige posttranslationale Integration von tail-anchored Proteinen

Es gibt Membranproteine mit C-terminalem Membrananker, diese werden *tail-anchored* Proteine genannt. Ein Großteil der *tail-anchored* Proteine wird posttranslational über den Get-Weg integriert (Get: *guided entry for tail-anchored proteins*; für Review: Denic, 2012). Der grundlegende Ablauf des Get-Weges ist besonders gut in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben.

Nach der vollständigen Synthese des Proteins bindet zunächst ein *pre-targeting complex* das *tail-anchored* Protein (Abb. 1-3). Dieser Komplex besteht aus Get4p, Get5p und Sgt2p. Der *pre-targeting complex* sorgt für den Transfer des Proteins auf den Targetingfaktor Get3p. Das lösliche Protein Get3p bringt die *tail-anchored* Proteine zur ER-Membran und hält diese in einem integrationskompetenten Zustand. Get3p interagiert mit den zwei membranständigen Proteinen Get1p und Get2p. Get3p ist eine ATPase. Das Substrat wird durch ATP-Hydrolyse von Get3p wieder freigegeben (Schuldiner *et al.*, 2008; Shao und Hegde, 2011b; Denic, 2012). Das *tail-anchored* Protein wird anschliessend in die ER-Membran integriert. Der eigentliche Integrationsprozess ist bisher noch nicht im Detail bekannt (Denic, 2012).

Im Säuger existieren für den *pre-targeting complex* die homologen Proteine für Get4p (TRC35), Get5p (UBL4A) und Sgt2p (SGTA), wobei zusätzlich das Protein BAG6 eine wichtige Rolle spielt. Für BAG6 wurde aber bisher kein Homolog in Hefe gefunden. Auch für Get1p (WRB), Get2p (CAML) und Get3p (TRC40) kommen die homologen Proteine im Säuger vor, so dass von der Existenz eines Get-Weges im Säuger ausgegangen werden kann.

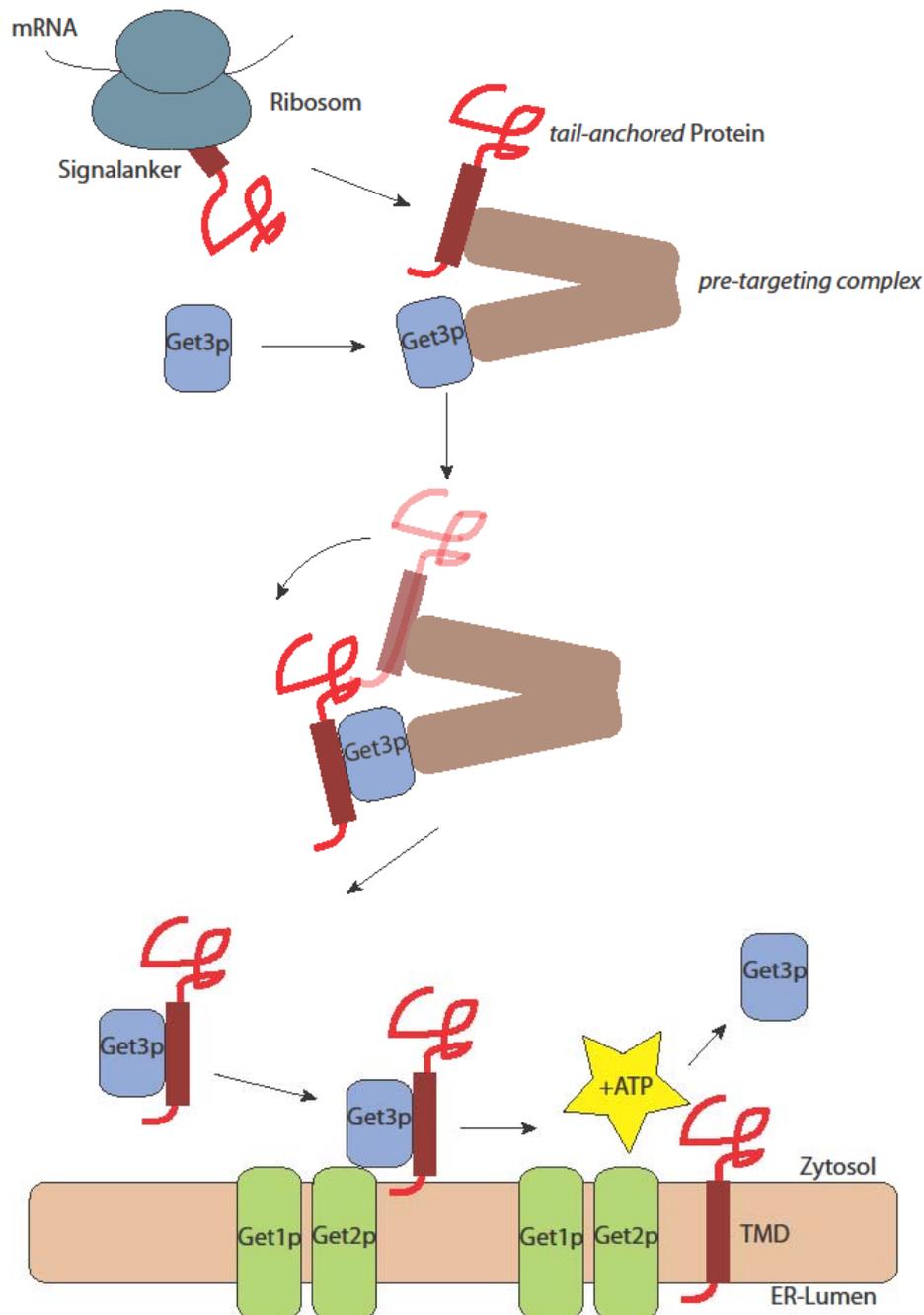


Abb. 1-3: Schematische Abbildung zur posttranslationalen Integration von *tail-anchored* Proteinen durch das Get-System in Bäckerhefe Nach der Synthese wird das *tail-anchored* Protein zunächst von dem *pre-targeting complex* gebunden. Dieser Komplex bindet auch Get3p und transferiert das Protein auf den Targetingfaktor Get3p. Das *tail-anchored* Protein wird durch Get3p zur ER-Membran gebracht. Get3p interagiert mit Get1p und Get2p und gibt das Substrat durch ATP-Hydrolyse frei. Über einen noch unbekanntem Mechanismus erfolgt die posttranslationale Integration in die ER-Membran.

1.1.4 Unassistierte posttranslationale Integration von *tail-anchored* Proteinen

Über einige *tail-anchored* Proteinen wird berichtet, dass sie unabhängig vom Get-System in ER-Membranen integrieren können (High und Abell, 2004; Brambillasca *et al.*, 2006). Zu diesen Proteinen gehört Cytochrom B5. Cytochrom B5 kann generell unabhängig von membranständigen Proteinen in die ER-Membran integrieren, weshalb von unassistierter

Integration gesprochen wird (Takagaki *et al.*, 1983). Die heterogenen Daten zur unassistierten Integration von *tail-anchored* Proteinen sind derzeit noch nicht im Detail verstanden. Die Daten verdeutlichen aber, dass es Membranproteine gibt, die durch einen Get-unabhängigen Mechanismus posttranslational in ER-Membranen integrieren können.

Die Integration des Cytochrom B5 erfolgt zwar unassistiert, aber dennoch gezielt in die ER-Membran (D'Arrigo *et al.*, 1993). Eine Bedingung für die „Erkennung“ ist ein geringer Cholesterolgehalt der Membran (Brambillasca *et al.*, 2005). Eine weitere Bedingung für die ER-Spezifität der Integration ist die Bindung an zytosolische Faktoren. Cytochrom B5 kann in einem artifiziellen System unabhängig von zytosolischen Proteinen und unspezifisch in proteinfreie Liposomen integrieren. Wenn jedoch zytosolische Faktoren an Cytochrom B5 gebunden sind, wird die unspezifische Integration in proteinfreie Liposomen verhindert (Colombo *et al.*, 2009). Die ER-Integration des Cytochrom B5 zeichnet sich weiterhin dadurch aus, dass ATP benötigt wird, wenn es auch deutlich weniger ATP als für die Integration von anderen *tail-anchored* Proteinen ist (Yabal *et al.*, 2003; Kutay *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist die unspezifische Integration in proteinfreie Liposomen weder von Proteinen noch von Energie abhängig (Kim *et al.*, 1997).

1.2 DIREKTER PROTEINTRANSPORT ZU DEN PEROXISOMEN

Seit langem wird angenommen, dass Peroxisomen ausschließlich durch Wachstum und Teilung aus vorhandenen Peroxisomen entstehen (*growth and division model*; Lazarow und Fujiki, 1985). Da Peroxisomen keine DNA und auch keine Maschinerie zur Proteinbiosynthese besitzen, müssen alle Proteine nach der Synthese im Zytosol zu den Peroxisomen transportiert werden.

1.2.1 Proteinimport in die Peroxisomenmatrix

Für Matrixproteine gibt es eine Importmaschinerie zur Translokation in die Matrix der Peroxisomen. Dieser Proteinimport wurde besonders in *Saccharomyces cerevisiae* gut untersucht.

Matrixproteine besitzen als Signal für den Transport zu den Peroxisomen ein sogenanntes peroxisomales Targetingsignal (PTS). Es existieren zwei Varianten dieses Signals: PTS1 und PTS2. Das PTS1 ist ein Erkennungssignal am unmittelbaren C-Terminus der Proteine, das aus den drei Aminosäuren Serin-Lysin-Leucin oder Varianten davon besteht (Einbuchstabencode: SKL; Gould *et al.*, 1987). Das PTS2 wiederum befindet sich in der Nähe des N-Terminus und wird aus einem Nonapeptid gebildet. Die Konsensussequenz des PTS2 lautet RLX₅(H/Q)L (X = beliebige Aminosäure; Lazarow, 2006). Beide Targetingsignale werden von einem Rezeptor im Zytosol gebunden. Das PTS1 interagiert mit Pex5p im Zytosol (Platta *et al.*, 2013). Für Matrixproteine mit einem PTS2 ist Pex7p der Rezeptor. Pex7p reicht für den Transport zur

Peroxisomenmembran alleine nicht aus. In der Bäckerhefe wurden für den Transport die zwei Korezeptoren Pex18p und Pex21p identifiziert (Grunau *et al.*, 2009).

Nachdem der Rezeptor Pex5p ein Protein an dem PTS1 gebunden hat, bringt er das Protein zur peroxisomalen Membran (Abb. 1-4). Dort interagiert Pex5p zunächst mit dem Docking-Komplex in der peroxisomalen Membran. Der Docking-Komplex setzt sich aus Pex13p, Pex14p und Pex17p zusammen. Die Bildung der Translokationspore und der Ablauf der Translokation sind noch nicht vollständig geklärt. Ein Modell besagt, dass Pex5p zusammen mit Pex14p eine transiente Pore in der peroxisomalen Membran bildet (Meinecke *et al.*, 2010). Pex5p wurde in diesem Bezug als Transmembranprotein beschrieben, obwohl es ansonsten ein zytosolisches Protein ist (Gouveia *et al.*, 2000). Matrixproteine werden vollständig gefaltet transloziert. Es wurde gezeigt, dass sogar Goldpartikel mit einem Durchmesser von bis zu 9 nm durch Bindung an ein PTS1 in die Peroxisomenmatrix gelangten (Walton *et al.*, 1995).

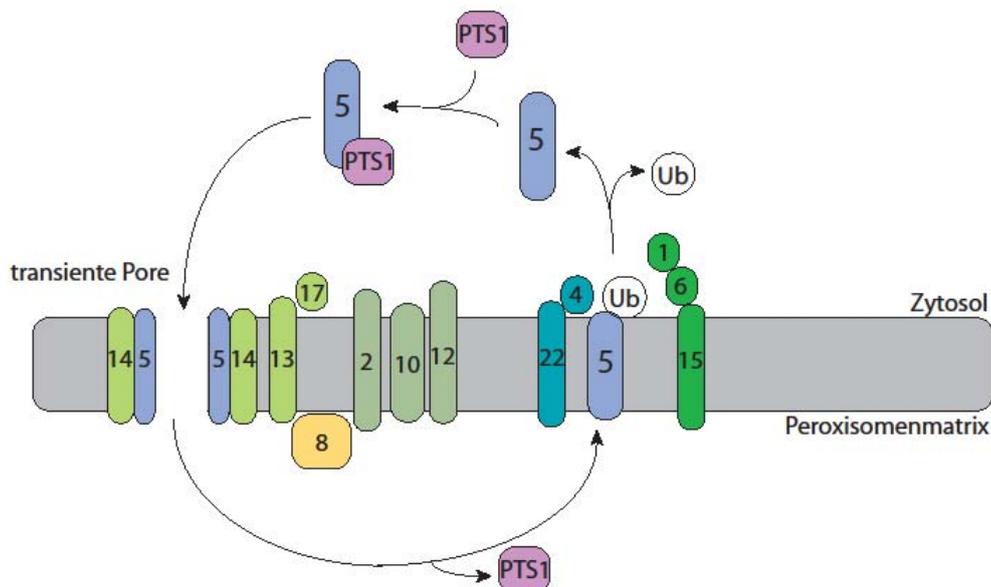


Abb. 1-4: Peroxisomaler Matrixproteinimport mit Pex5p in *Saccharomyces cerevisiae* (schematisch) Pex5p ist der zytosolische Rezeptor für Matrixproteine mit dem peroxisomalen Targetingsignal 1 (PTS 1). Er bringt diese Matrixproteine zur peroxisomalen Membran. Pex5p mit gebundenem Cargo interagiert zunächst mit dem Docking-Komplex (Pex13p, Pex14p und Pex17p). Dann bilden Pex5p und Pex14p eine transiente Pore. Das Matrixprotein gelangt durch diese Pore in die Peroxisomenmatrix. Bei der Freisetzung des Matrixproteins spielt möglicherweise Pex8p eine Rolle, das den Docking-Komplex mit dem RING-Komplex (Pex2p, Pex10p und Pex12p) verbindet. Nach dem erfolgreichen Import wird an Pex5p ein Monoubiquitin als Exportsignal angefügt. Pex22p und Pex4p führen diese Ubiquitinierung von Pex5p aus. An dem Export von Pex5p sind Pex1p, Pex6p und der RING-Komplex beteiligt. Nach der Deubiquitinierung steht Pex5p für den nächsten Import zur Verfügung. Die Peroxine wurden in dieser Abbildung jeweils nur mit ihrer Nummer abgekürzt (z.B. 5 für Pex5p).

Bei der anschließenden Freisetzung der Matrixproteine in die Peroxisomenmatrix spielt möglicherweise Pex8p eine Rolle (Girzalsky *et al.*, 2010). Pex8p verbindet den Docking-Komplex mit dem RING-Komplex (RING: *really interesting new genes*) auf der luminalen Seite der peroxisomalen Membran. Weitere mögliche Mechanismen, die zur Freisetzung des

Matrixproteine beitragen könnten, sind eine Veränderung des pH-Werts oder des Redoxpotentials (Ma und Subramani, 2009; Ma *et al.*, 2013). Nach der Freisetzung des Cargo wird Pex5p wieder ins Zytosol exportiert. Das Signal zum Export ist eine Monoubiquitinylierung des Proteins. An der Monoubiquitinylierung sind Pex4p und Pex22p beteiligt. Darauf folgend wird Pex5p exportiert, hierbei spielen Pex1p, Pex6p und der RING-Komplex (Pex2p, Pex10p und Pex12p) eine Rolle (Platta *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2007). Abschliessend wird im Zytosol das Ubiquitin von dem Pex5p entfernt und damit steht Pex5p für den nächsten Zyklus wieder zur Verfügung. Für den zweiten zytosolischen Rezeptor Pex7p mit gebundenen PTS2-Proteinen wird ein ähnlicher Zyklus wie für Pex5p vermutet (Nair *et al.*, 2004).

Es existieren auch peroxisomale Matrixproteine ohne erkennbare PTS, für diese Proteine wird angenommen, dass sie „Huckepack“ von PTS1-enthaltenden Matrixproteinen Pex5p-abhängig transportiert werden können (Glover *et al.*, 1994). Und es gibt peroxisomale Matrixproteine, die mehrere Targetingsignale beinhalten, z.B. ScPex8p. ScPex8p besitzt das PTS1 und daneben eine PTS2-ähnliche Sequenz. Für ScPex8p wurde trotz der beiden Targetingsignale beobachtet, dass es unabhängig von PTS1 und PTS2 zu den Peroxisomen gelangen kann (Deckers *et al.*, 2010). Durch welchen Mechanismus ScPex8p hierbei in die Peroxisomenmatrix gelangt, ist bisher nicht geklärt.

1.2.2 Integration peroxisomaler Membranproteine in die peroxisomale Membran

Nicht nur Matrixproteine, sondern auch peroxisomale Membranproteine (PMP) integrieren direkt in die peroxisomale Membran (Lazarow und Fujiki, 1985). Dieser Vorgang ist noch nicht so gut verstanden. Man geht davon aus, dass Pex19p und Pex3p eine wichtige Rolle bei der Integration peroxisomaler Membranproteine in *Saccharomyces cerevisiae* spielen.

Membranproteine besitzen ein sogenanntes mPTS (*membrane peroxisomale targeting signal*) aus basischen Aminosäuren und einer Transmembrandomäne. Dieses Signal ist analog zum PTS verantwortlich für das Targeting der Proteine. Eine Konsensussequenz für diesen Bereich konnte bisher nicht erstellt werden (Rottensteiner *et al.*, 2004).

In diesem Modell bindet Pex19p im Zytosol PMP an ihrem mPTS und bringt diese zur peroxisomalen Membran (Abb. 1-5; Muntau *et al.*, 2003). Als Rezeptor für beladenes Pex19p dient Pex3p in der peroxisomalen Membran. Beladenes Pex19p interagiert an der zytosolischen Membranseite mit dem C-Terminus von Pex3p und durch einen unbekanntem Mechanismus wird das PMP in die peroxisomale Membran integriert (Fang *et al.*, 2004). Unbeladenes Pex19p kann danach erneut an ein mPTS binden und weitere PMP zur peroxisomalen Membran bringen.

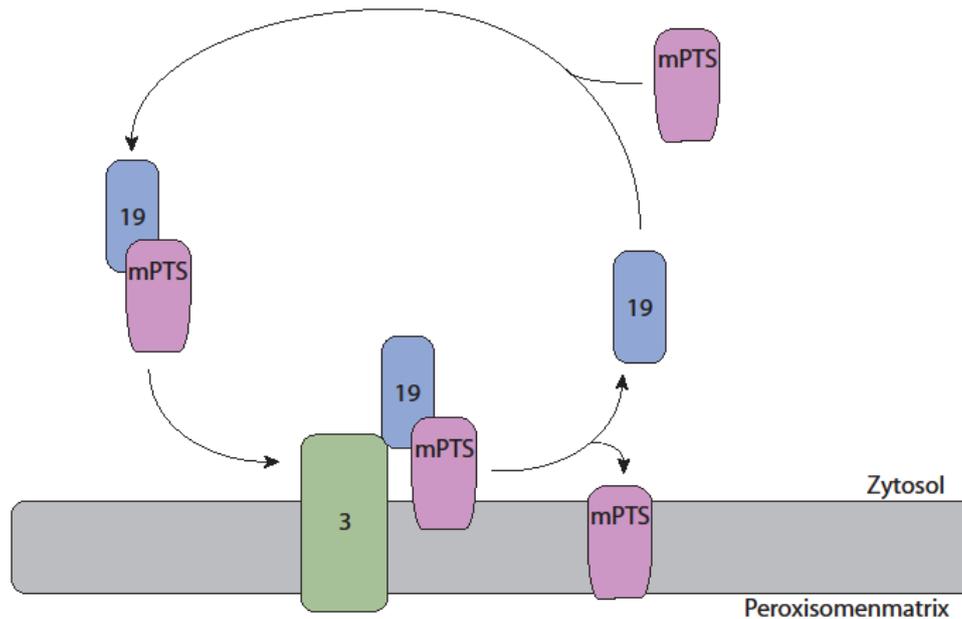


Abb. 1-5: Schematisches Modell zur Integration von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) in die Peroxisomenmembran Der zytosolische Rezeptor Pex19p bindet im Zytosol PMP an dem mPTS und bringt diese zur peroxisomalen Membran. Pex19p bindet an den Dockingfaktor Pex3p in der peroxisomalen Membran. Dann werden die PMP durch einen unbekanntes Mechanismus in die Membran integriert. Pex19p wird wieder freigesetzt und kann weitere PMP zur Membran bringen.

Im Menschen spielt möglicherweise ein weiteres Protein eine essentielle Rolle in dem Integrationsprozess für PMP: PEX16. Die genaue Funktion des PEX16 ist noch nicht bekannt. Von mehreren Arbeitsgruppen wurde jedoch postuliert, dass die Integration des HsPEX3 abhängig von PEX16 sein soll (Matsuzaki und Fujiki, 2008; Toro *et al.*, 2009).

In der Bäckerhefe kann Pex19p nicht an das mPTS von Pex3p binden, d.h. der Transport von Pex3p zu den Peroxisomen kann mit dem oben genannten Modell nicht erklärt werden. Um diesen Umstand zu beschreiben, wurden die PMP in zwei Klassen unterteilt: Pex19p-abhängig und Pex19p-unabhängig (Jones *et al.*, 2004). Klasse I PMP werden Pex19p-abhängig und direkt in die peroxisomale Membran integriert, während Klasse II PMP Pex19p-unabhängig sind und eventuell über das ER zu den Peroxisomen gelangen. Neben Pex3p als Klasse II-Protein wurden auch für humanes PEX16 (Kim *et al.*, 2006) und ScPex22p aus *Saccharomyces cerevisiae* ein unabhängiges Targeting von PEX19/Pex19p gezeigt (Halbach *et al.*, 2009).

1.3 INDIREKTER PROTEINTRANSPORT ÜBER DAS ER ZU DEN PEROXISOMEN

Es hat sich herausgestellt, dass peroxisomale Membranproteine in *Saccharomyces cerevisiae* auch indirekt zu den Peroxisomen transportiert werden können. In dem Modell des indirekten Transportweges (Abb. 1-6) integrieren peroxisomale Membranproteine zunächst in die ER-

Membran. Die Proteine werden danach zu sogenannten *exit sites* im ER sortiert. An diesen *exit sites* knospen präperoxisomale Vesikel vom ER ab. Über das Verhalten der präperoxisomalen Vesikel bestehen zwei Hypothesen. Die erste Hypothese geht von zwei unterschiedlichen Arten an präperoxisomalen Vesikeln aus, die später miteinander fusionieren. Vor der Fusion besitzen beide Vesikelarten nicht die Fähigkeit zum Matrixproteinimport, während mit der Fusion ein funktionsfähiger Translokationsapparat für Matrixproteine entsteht und damit die Vesikel durch die Fusion zu Peroxisomen heranreifen (van der Zand *et al.*, 2012). Die zweite Hypothese besagt, dass die präperoxisomalen Vesikel mit reifen Peroxisomen fusionieren (Lam *et al.*, 2010).

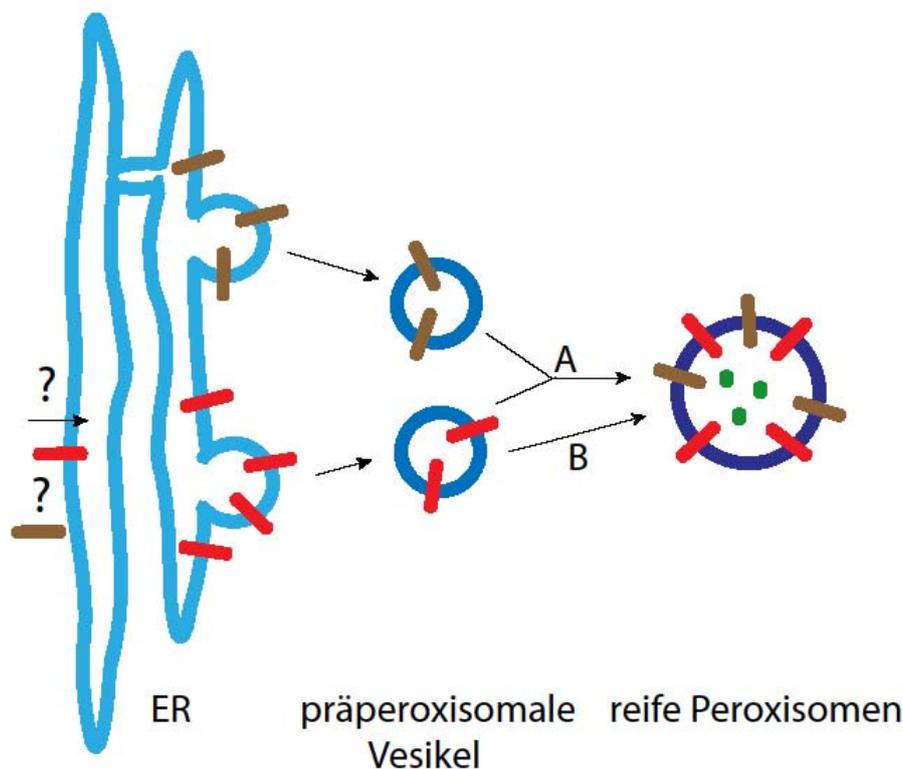


Abb. 1-6: Modell des indirekten Proteintransportweges über das ER zu den Peroxisomen Peroxisomale Membranproteine (PMP) können auf einem indirekten Transportweg zu den Peroxisomen gelangen. Zunächst müssen die PMP dafür in die ER-Membran integrieren. Die PMP werden daraufhin zu *exit sites* im ER sortiert. Von diesen *exit sites* schnüren sich präperoxisomale Vesikel mit PMP ab. Es bestehen zwei Hypothesen zum Verhalten der präperoxisomalen Vesikel. Die erste Hypothese geht von der Fusion unterschiedlicher Vesikel aus, die zusammen ein reifes Peroxisom bilden (A). Die zweite Hypothese geht von einer Fusion präperoxisomaler Vesikel mit reifen Peroxisomen aus.

Der indirekte Transportweg wird zurzeit stark diskutiert. Zunächst einmal wird angezweifelt, ob dieser Transportweg überhaupt *in vivo* in der Bäckerhefe genutzt wird, wenn Peroxisomen in der Zelle vorhanden sind. Ergebnisse zum indirekten Proteintransport wurden bisher hauptsächlich unter Δ Pex3p- oder Δ Pex19p-Bedingungen beobachtet. Der *knockout* von Pex3p oder Pex19p führt dazu, dass keine Peroxisomen mehr in der Zelle detektiert werden (Götte *et al.*, 1998; Hettema *et al.*, 2000). Nach der erneuten Expression von Pex3p bzw. Pex19p bildet die Zelle Peroxisomen *de novo*. Für diesen Prozess konnte mehrfach eine

Beteiligung des ER nachgewiesen werden (Hoepfner *et al.*, 2005; van der Zand *et al.*, 2010). Außerdem ist für den indirekten Proteintransportweg noch nicht geklärt, ob er ein genereller PMP-Transportweg ist oder doch nur Klasse II PMP über diesen Weg zu den Peroxisomen gelangen können. Weiterführend stellen sich Fragen nach den Sortierungsmechanismen der PMP im ER und dem Verhalten der präperoxisomalen Vesikel. Aber besonders wichtig wäre es, Informationen über die Integration der PMP in die ER-Membran zu erhalten, da dies der erste Schritt ist und ohne diese Integration kein Transport zu den Peroxisomen über das ER stattfinden kann. Bisher zeigten Kragt *et al.* (2005) eine ER-spezifische Glykosylierung einer Glykosylierungsmutante des ScPex3p *in vitro*. Darüber hinaus beobachteten Hoepfner *et al.* (2005) eine Kollokalisierung eines ScPex3p-YFP mit dem ER *in vivo* unter Δ Pex3p-Bedingungen. Diese Ergebnisse deuten eine mögliche Integration des Wildtyp-Pex3p in die ER-Membran an, zeigen aber keine direkte Integration des ScPex3p. Desweiteren konnte bisher für kein anderes PMP der Hefe eine Integration in die ER-Membran beobachtet werden. Dementsprechend ist über die Integration der PMP weder bekannt, ob sie co- oder posttranslational abläuft, noch, ob energieverbrauchende Proteine an dieser Integration beteiligt sind. Werden bei der Integration von PMP membranständige Proteine der ER-Membran genutzt, die auch an anderen, bekannten Integrationsmechanismen beteiligt sind? In dem Modell zum indirekten Proteintransport wird zurzeit ausschließlich der Weg von peroxisomalen Membranproteinen beschrieben. Beobachtungen zum Verhalten des mit YFP getaggten Matrixproteins ScPex8p werfen jedoch die Frage auf, ob möglicherweise auch dieses Matrixprotein in der Bäckerhefe über den indirekten Proteintransportweg zu den Peroxisomen gelangen kann (van der Zand *et al.*, 2012). Hierfür wäre es erforderlich, dass ScPex8p die ER-Membran durchqueren kann. Eine dafür geeignete Signalsequenz konnte bisher in ScPex8p nicht identifiziert werden.

Auch im Säuger können möglicherweise peroxisomale Membranproteine über einen indirekten Transportweg zu den Peroxisomen gelangen (Kim und Mullen, 2013). Hier ist der Weg über das ER jedoch noch weniger untersucht als in der Bäckerhefe.

Toro *et al.* (2009) sahen eine Kollokalisierung eines HsPEX3-GFP mit dem ER *in vivo*. Im Gegensatz dazu beobachteten Matsuzaki und Fujiki (2008), dass eine HsPEX3-Myc-Mutante *in vitro* nur in peroxisomale Membranen integrierte und nicht in ER-Membranen. Damit sind die Angaben widersprüchlich, ob HsPEX3 zur Integration in die ER-Membran fähig ist. Dieser Widerspruch zeigt zusätzlich auf, dass noch nicht geklärt ist, inwieweit der indirekte Proteintransport zu den Peroxisomen in unterschiedlichen Arten evolutionär konserviert abläuft.

1.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Peroxisomen besitzen keine DNA. Die Matrix- und Membranproteine der Peroxisomen sind kernkodiert und müssen während oder nach der Synthese zu den Peroxisomen gelangen. Der direkte Transportweg von peroxisomalen Matrixproteinen und Membranproteinen ist detailliert bekannt. Der indirekte Transportweg von peroxisomalen Membranproteinen birgt dagegen noch viele offene Fragen, besonders über den initialen Schritt der Integration in die ER-Membran ist bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit soll der Transport von peroxisomalen Membranproteinen in die ER-Membran in einem *in vitro*-System analysiert werden. Als Erstes wird das Verhalten des PMP Pex3 untersucht. Hierbei wird nicht nur die Variante der Bäckerhefe (ScPex3p) verwendet, sondern auch das Homolog aus dem Menschen (HsPEX3) wird in die Untersuchungen einbezogen, da gerade für dieses Protein sehr widersprüchliche Angaben über eine mögliche Integration in ER-Membranen existieren. Um zu untersuchen, ob andere Klasse II und auch Klasse I PMP in die ER-Membran integrieren können, wird weitergehend die Integration der PMP ScPex22p und ScPex13p in Mikrosomen der Hefe getestet. Für das Matrixprotein ScPex8p wurde die Möglichkeit eines indirekten Transportweges über das ER postuliert, deswegen soll für ScPex8p die Fähigkeit zur Translokation über die ER-Membran überprüft werden.

Wenn für die getesteten Proteine eine Translokation in die ER-Membran beobachtet werden kann, ist geplant diesen Prozess genauer zu charakterisieren. Dazu gehört es herauszufinden, ob die Integration/Translokation co- bzw. posttranslational stattfindet. Außerdem wird untersucht, inwieweit an den beobachteten Prozessen energieverbrauchende Proteine beteiligt sind. Darüber hinaus soll getestet werden, ob bekannte Translokationssysteme der ER-Membran, wie z.B. der Sec61-Kanal oder das Get-System an den Transportprozessen beteiligt sind. Die Konserviertheit der ER-Membranintegration der PMP wurde noch nicht untersucht. Mit den beiden homologen Pex3-Proteinen aus Bäckerhefe und Mensch kann überprüft werden, inwiefern die Integration in ER-Membranen durch Membrankomponenten anderer Arten übernommen werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz/Herkunft
Rosetta2(DE3) pLacI	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLacIpRARE2 [Cam ^R]	Novagen
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-</i> F'[<i>proAB+ lacIq lacZ ΔM15 Tn10 (tet^r)</i>]	Bullock <i>et al.</i> (1987) Stratagene

2.1.2 Hefestämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz/Herkunft
BY4741	MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1998) erhältlich bei EUROSCARF
Δget1,2	MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0,</i> Δget1::KanR, Δget2::NatR	Schuldiner <i>et al.</i> (2008)
Δget3	MATa, <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0,</i> Δget3::KanR	Schuldiner <i>et al.</i> (2008)
YTX66	MATa, <i>sec6l-2, ura3, trpl-1, ade2-1,</i> <i>pep4-3</i>	Biederer <i>et al.</i> (1996)
YUE04	haploid SEC62-TEVPROA- <i>kanMX4</i> , SEC63-PROA- <i>kanMX4</i> , SSS1-6xHA- <i>K.I.TRPI</i> , Δ <i>ssh1::K.I.LEU2</i> , <i>ura3-52,1, his3-Δ200, lys2-801, GAL</i>	Dissertation N. Danzenbächer (2010) Institut für Biologie, Universität zu Lübeck

2.1.3 Nukleinsäuren

Proteinbezeichnung	Vektor	Modifikation des Wildtypproteins	Referenz/Herkunft
20HsPEX3	pGEM4a	eine Glykosylierungsstelle N- terminal angefügt	Sven Thoms, Göttingen
24ScPex3p	pGEM4a	eine Glykosylierungsstelle N- terminal angefügt	Thoms <i>et al.</i> (2012)

26HsPEX3	pGEM4a	eine Glykosylierungsstelle N-terminal angefügt	diese Arbeit
34/20HsPEX3	pGEM4a	zwei Glykosylierungsstellen N-terminal angefügt	diese Arbeit
6xHis-HRa	pProEXHTa	Fusionsprotein: Hexahistidin N-terminal und Heprezeptor A (HRa) C-terminal	Bachelorarbeit F. Degenhardt (2009), Institut für Biologie, Universität zu Lübeck
6xHis-HsPEX16-P-HRa	pProEXHTa	Fusionsprotein: Hexahistidin N-terminal, HsPEX16 Isoform 1, Peptid: 132-221 aa und Heprezeptor A (HRa) C-terminal	diese Arbeit
Cytochrom B5	pcDNA5/FRT/V5-His Topo	zwei Glykosylierungsstellen C-terminal angefügt, S119C	Rabu <i>et al.</i> (2008)
HsPEX3	pGEM4a	unmodifiziert	Sven Thoms, Göttingen
Luziferase	-	nicht bekannt	mRNA von Promega (L4960)
ppaF	pGEMBP1	Hexahistidin C-terminal	Kalies <i>et al.</i> (1998)
ScPex13p	pGEM4a	unmodifiziert	diese Arbeit
ScPex22p	pGEM4a	unmodifiziert	diese Arbeit
ScPex3p	pGEM4a	unmodifiziert	Thoms <i>et al.</i> (2012)
ScPex8p	pGEM4a	unmodifiziert	diese Arbeit
Sec22p	-	zwei Glykosylierungsstellen C-terminal angefügt	Schuldiner <i>et al.</i> (2008)

2.1.4 primäre Antikörper

Protein	antigene Sequenz	Referenz/Herkunft
BIP	nicht bekannt	BD Biosciences
HsPEX16	132-346 aa	Proteintech
Kar2p	N-Terminus	Santa Cruz Biotech
Katalase	C-Terminus	Santa Cruz Biotech

Sec61p	CLVPGFSDLM (C-terminal)	Panzner <i>et al.</i> (1995a)
Sec61 α	CKEQSEVGS MGALLF (C-terminal)	Görlich <i>et al.</i> (1993)

Die primären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1 : 1.000 in 1X TBT mit 5 % fettfreiem Magermilchpulver verwendet (Ausnahme Katalase: 1 : 200).

2.1.5 sekundäre Antikörper

Name	Beschreibung	Anwendung	Referenz/Herkunft
α -goat IgG (<i>whole molecule</i>)	Ziege IgG, ganzes Molekül; Meerrettich Peroxidase Konjugat	1 : 8.000 in 1X TBT mit 5 % Magermilchpulver	Sigma
α -mouse IgG IRDye800	Maus IgG, ganzes Molekül; Konjugat mit Fluorophor IRDye800, Emissionswellenlänge 800 nm	1 : 10.000 in 1X PBST	Rockland Immunochemicals
α -rabbit IgG (<i>whole molecule</i>)	Kaninchen IgG, ganzes Molekül; Meerrettich Peroxidase Konjugat	1 : 5.000 in 1X PBS mit 5 % Magermilchpulver	Sigma
α -rabbit IgG IRDye800	Kaninchen IgG, ganzes Molekül; Konjugat mit Fluorophor IRDye800, Emissionswellenlänge 800 nm	1 : 10.000 in 1X PBST	Rockland Immunochemicals

2.1.6 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
26HsPEX3 fwd	TCCACTGCTGGTGGTTCTCTG
34/20HsPEX3 fwd	CAAGATTTGCCAGGTAACG
Halbvektor rev	AGAACCACCAGCAGTGGAGTTATC
Pex13 fwd	CAATCTCGAGCCACCATGTCATCCACAGCAG
Pex13 rev	TCATGAGCTCTCTAGTGTGTACGCGTTTC
PEX16 fwd	ATTAGGCGCCAAGGCTGGCCTCCAGACTTC
PEX16 rev	ATTAGGCGCCCTCTGCGATGGTCTCCTG
Pex22 fwd	CAATCTCGAGCCACCATGCCACCACCATCAAG
Pex22 rev	TCATGAGCTCTTTAATTGCATAAAGTGTC

Pex8 fwd	CAATCTCGAGCCACCATGTTTGATCATGACGTC
Pex8 rev	TCATGGTACCTCTATAATTTAGAAGATTGAC
PvuI fwd	GTGCTGCCATAACCATGAGTG
PvuI rev	TCGGTCCTCCGATCGTTGTC
Sec22p fwd	GGGGGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCATACACAAT ATAAACGATTGCCACC
Sec22p rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATCTACACTGTTGTTATCAGT CGGGCTCAATCAACTGTTTTATTAGAAAATGG

2.1.7 Medien und Puffer

Blotting Puffer

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol; der pH-Wert wurde nicht eingestellt.

Blocking Puffer

5 % (w/v) Magermilchpulver in 1X PBS

DNA-Ladepuffer (5X)

60 % (w/v) Saccharose in 1X TAE-Puffer, Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer für Tris-Glycin-Gele

25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS; der pH-Wert wurde nicht eingestellt.

Elektrophoresepuffer für NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % Gele

50 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 50 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 7,3)

Endo H-Puffer

100 mM Natriumcitrat (pH 5,5), 20 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Glukose

20 % (w/v) Glukose. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

Homogenisationspuffer für Hefemikrosomen (5X)

250 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 50 % (v/v) Glycerin, 125 mM Kaliumacetat, 25 mM Magnesiumacetat, 5 mM EDTA

Kissenpuffer für Säugermikrosomen

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 50 mM Kaliumacetat, 6 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 1,6 M Saccharose, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1X PI-Mix, 1 µg/ml Elastatinal; PI-Mix und Elastatinal wurden frisch zugegeben.

LB-Agar (autoklaviert)

LB-Medium, 2 % (w/v) Bacto-Agar

Lysogeny Broth (LB) – Medium (autoklaviert)

1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Natriumchlorid

Membranpuffer

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 250 mM Sucrose, 1 mM DTT

Mercaptoethanol-SDS-Lösung

1 % (v/v) Mercaptoethanol, 0,5 % (w/v) SDS

Natriumcarbonat-Sucrosekissen

100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5), 200 mM Sucrose

PBS (1X)

137 mM Natriumchlorid, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid (pH 7,4)

PBST (1X)

137 mM Natriumchlorid, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 10,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid, 0,1 % Tween-20 (pH 7,4)

Proteaseinhibitoren (PI-Mix; 1.000X)

5 mg/ml Pepstatin, 4 mg/ml Chymostatin, 10 mg/ml Aprotinin, 10 mg/ml Leupeptin; die Verdünnung erfolgte in DMSO

Proteasepuffer

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 250 mM Saccharose, 140 mM Kaliumacetat, 3 mM Magnesiumacetat

Puffer A für Säugermikrosomen

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 50 mM Kaliumacetat, 6 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1X PI-Mix, 1 µg/ml Elastatinal; PI-Mix und Elastatinal wurden frisch zugegeben.

Puffer I0

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid (pH 8,0)

Puffer I10

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8,0)

Puffer I20

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol (pH 8,0)

Puffer I100

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 100 mM Imidazol (pH 8,0)

Puffer I250

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 250 mM Imidazol (pH 8,0)

Resuspensionspuffer zur Überexpression

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 700 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 % (v/v) Triton-X 100

SDS-Probenpuffer (2X)

120 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 4 % SDS, 20 % Glycerin, Bromphenolblau

TAE-Puffer (50X)

2 M Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM EDTA, 5,7 % (v/v) Eisessig

TBT (10X)

500 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M Natriumchlorid, 1 % (w/v) Tween-20

Verdünnungspuffer zur Ultrazentrifugation

50 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 80 mM Kaliumacetat, 2 mM Magnesiumacetat

YPD-Agar

YP-Medium mit 2 % (w/v) Bacto-Agar; die Lösung wurde autoklaviert, vor dem Gießen der Platten wurden 2 % (w/v) Glukose zugegeben

YPD-Medium

YP-Medium, 2 % (w/v) Glukose

YP-Medium (autoklaviert)

1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bacto-Pepton

2.1.8 Antibiotika, Chemikalien und Enzyme

35S-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/mmol)	Hartmann Analytik
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
Apyrase	Sigma
Bacto-Agar	BD
Bacto-Pepton	BD
BSA	New England Biolabs
Cycloheximid	Sigma
dNTPs	Roche
ECL-Reagenzien	PerkinElmer
Endoglykosidase H (Endo H)	New England Biolabs
<i>FastAP</i> Alkalische Phosphatase	Fermentas
<i>FastDigest</i> Restriktionsendonukleasen (EheI, KpnI, PvuI, SacI, XhoI)	Fermentas
<i>GeneRuler DNA Ladders</i> 1kb	Fermentas
Geneticin	Gibco
Glukose	Merck
Hefeextrakt	BD
Hexokinase	Sigma
Nourseothricin	Sigma
<i>PAGE Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific
<i>Phusion High Fidelity</i> DNA Polymerase (inkl. 5X HF-Puffer)	Thermo Scientific
Polyacrylamid (29:1)	Amresco
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen (KpnI, NheI)	New England Biolabs
Retikulozytenlysat aus Kaninchenblut (nukleasebehandelt) (inkl. Aminosäure-Mix ohne Methionin bzw. Cystein)	Promega
RNase-Inhibitor RNasin	Promega

T4 DNA Ligase (inkl. Ligationspuffer)	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase (inkl. Phosphorylierungspuffer)	Thermo Scientific
T7 RNA Polymerase (inkl. Transkriptionspuffer)	Promega
Trichloressigsäure	Roth
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Trypton	BD
Tween-20	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma

2.1.9 Kits und Materialien

AIDA <i>Image Analyzer</i> Software Version 3.52	Raytest
Glaspotter	Whatman
<i>Imaging Plates</i>	Fuji/Raytest
Ni ²⁺ -NTA-Säulenmaterial	Qiagen
NucleoSpin Gel und PCR <i>Clean-up</i>	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin RNA <i>Clean-up</i>	Macherey-Nagel
NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % Gele	Invitrogen
Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren 2	Sartorius

2.1.10 Geräte

Allegra 2IR Zentrifuge	Beckman Coulter
Avanti J-20 XPI Zentrifuge	Beckman Coulter
<i>Bead Beater</i>	Roth
<i>Criterion Cell</i> für NuPAGE Gele	Biorad
Eraser	Raytest
Feinwaage A1205-D1	Sartorius Analytic
Gelapparatur Horizon 58	Life Technologie
Geldokumentation Intas <i>Gel iX Imager</i>	Intas
Geltrockner Model 583	Biorad
Kamera LAS-1000	Fuji
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
<i>Odyssey Infrared Imaging System</i>	Licor
Optima L-90K Zentrifuge	Beckman Coulter
PCR <i>Sprint Thermal Cycler</i>	Thermo Scientific
<i>Phosphoimager</i> FLA-3000	Fujifilm/Raytest
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
<i>Power Supply</i> PS 9009	Gibco BRL
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschall Sonoplus	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima	Beckman Coulter

Werkbank Lamin Air HB 2448
Western Blot Apparatur Panther
Zentrifuge 5415 D

Heraeus Instruments
Owl Scientific
Eppendorf

2.2 NOMENKLATUR UND SCHREIBWEISE DER PROTEINE

Die Peroxine wurden in dieser Arbeit nach den Richtlinien der einheitlichen Nomenklatur für peroxisomale Biogenese-Faktoren bezeichnet (Distel *et al.*, 1996). Teilweise wird in dieser Arbeit generell über die Proteine berichtet, also nicht bezogen auf einen speziellen Organismus. Dabei erfolgt keine spezielle Schreibweise. Wenn es aber um das Protein eines speziellen Organismus geht, wird anhand der Schreibweise der Organismus verdeutlicht. Besonders um eine Verwechslung von Pex3-Proteinen entgegen zu wirken, wurden bei den Peroxinen die Zusätze Hs für *Homo sapiens* und Sc für *Saccharomyces cerevisiae* vor den Proteinamen gesetzt (Distel *et al.*, 1996).

Bei menschlichen Proteinen wurden zusätzlich die Richtlinien für humane Gennomenklatur beachtet (Hester *et al.*, 2002) und bei Hefeproteinen die Richtlinien des Komitees für genetische Nomenklatur berücksichtigt (*Genetic nomenclature guide* 1998). Aus dieser Kombination ergibt sich für humanes PEX3 die Schreibweise HsPEX3 und für das Hefeprotein ScPex3p.

Für Proteine aus Säugetieren gibt es keine generellen Richtlinien zur Schreibweise, weshalb bei diesen Proteinen auf gängige Schreibweisen zurückgegriffen wurde.

2.3 KLONIERUNGEN UND BAKTERIENKULTUR

2.3.1 Klonierungsstrategie “Halbvektoren” für HsPEX3-Glykosylierungsmutanten

Um die *in vitro* Integration des HsPEX3 in ER-Membranen anhand von N-Glykosylierung zu untersuchen, wurden drei Glykosylierungsmutanten des HsPEX3 verwendet. Auf der Grundlage des Konstrukts 20HsPEX3 wurden die zwei weiteren Glykosylierungsmutanten 26HsPEX3 und 34/20HsPEX3 generiert (Schema siehe Abb. 2-1). Diese Proteine unterscheiden sich darin, dass sie unterschiedlich lange Distanzen zwischen Glykosylierungsstelle und Membrananker besitzen. Bei dem Konstrukt 20HsPEX3 beträgt die Distanz zwischen der Glykosylierungsstelle und dem Membrananker 20 Aminosäuren, während bei 26HsPEX3 26 Aminosäuren zwischen Glykosylierungsstelle und Membrananker liegen. Die Mutante 34/20HsPEX3 besitzt zwei Glykosylierungsstellen am N-Terminus. Die erste Glykosylierungsstelle weist eine Distanz von 34 Aminosäuren zum Membrananker auf, während die zweite Glykosylierungsstelle nur 20 Aminosäuren vom Membrananker entfernt ist.

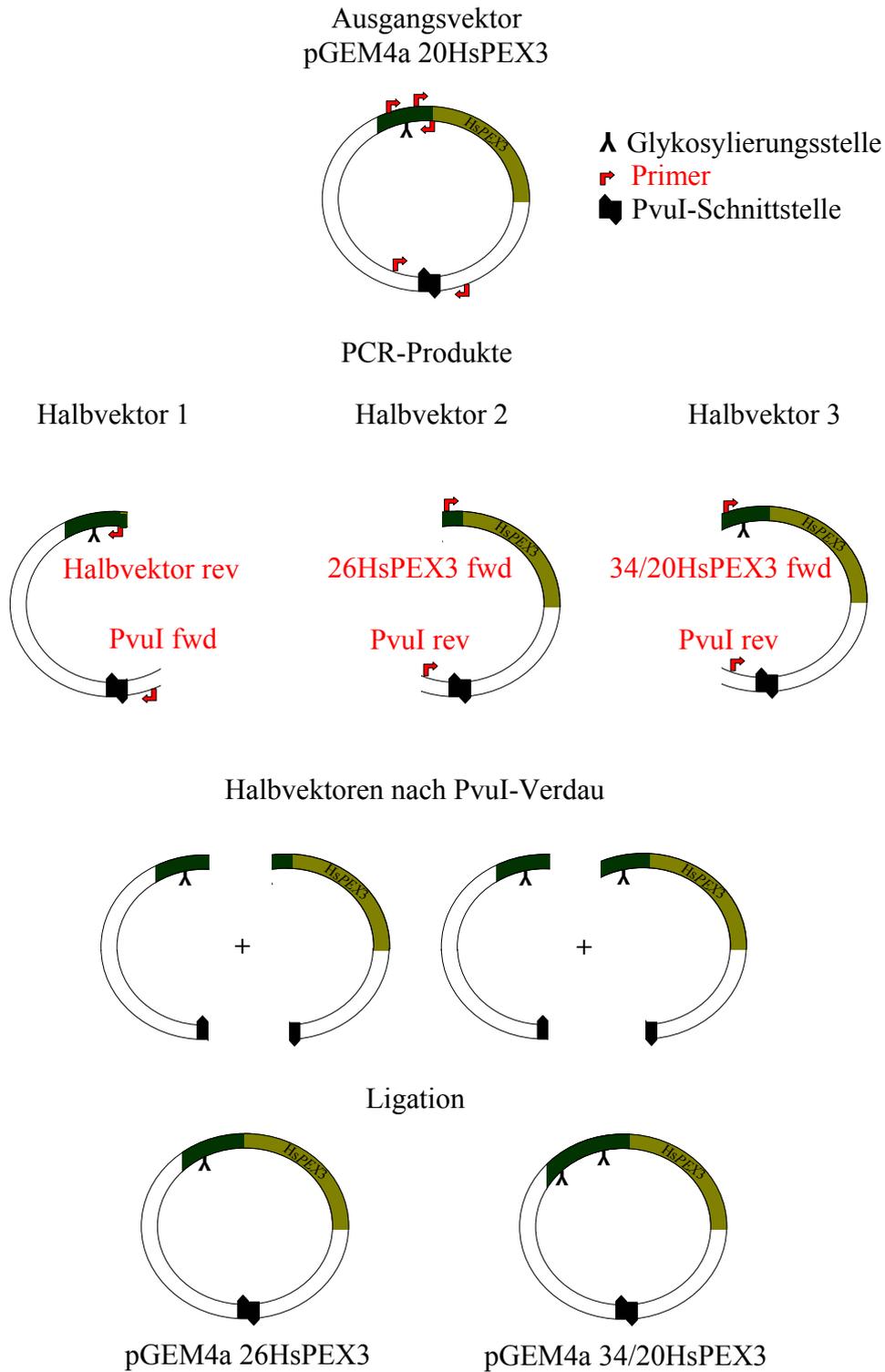


Abb. 2-1: Schema der Klonierungsstrategie „Halbvektoren“ für HsPEX3-Mutanten Der Ausgangsvektor pGEM4a 20HsPEX3 wurde für die Produktion von Halbvektoren genutzt. Diese Halbvektoren besitzen an einem Ende unterschiedliche Abschnitte der 20HsPEX3-Mutante und am anderen Ende jeweils eine PvuI-Schnittstelle. Die Halbvektoren wurden mit PvuI verdaut, um an je einem Ende ein *sticky end* zu erzeugen. Abschliessend wurden die Halbvektoren gerichtet ligiert und somit die Mutanten 26HsPEX3 und 34/20HsPEX3 erstellt.

Mit dem Ausgangsvektor pGEM4a 20HsPEX3 wurden drei unabhängige PCR durchgeführt. Jede dieser PCR führte zur Synthese eines halben Vektors. Halbvektor 1 wurde mit Hilfe der Primer Halbvektor rev und PvuI fwd synthetisiert, während Halbvektor 2 und Halbvektor 3 mit der Kombination 26HsPEX3 fwd bzw. 34/20HsPEX3 fwd und PvuI rev erstellt wurden. Alle Halbvektoren besaßen an einem Ende einen Teil der 20HsPEX3-Sequenz und am anderen Ende eine PvuI-Schnittstelle. Das Ende mit dem Teil der 20HsPEX3-Sequenz wies ein *blunt end* auf. Um eine gerichtete Ligation durchführen zu können, wurden die Halbvektoren nun PvuI geschnitten, so dass am anderen Ende der Halbvektoren *sticky ends* entstanden. Halbvektor 1 konnte dann mit Halbvektor 2 ligiert werden, so dass 26HsPEX3 entstand, während die Ligation von Halbvektor 1 mit Halbvektor 3 zu 34/20HsPEX3 führte.

2.3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Für die PCR zur Halbvektorsynthese wurde die Polymerase *Phusion High Fidelity* verwendet. Sie produziert Produkte mit *blunt ends* und weist eine sehr geringe Fehlerquote auf. Die unmodifizierten Primer wurden bei MWG bestellt und synthetisiert.

Halbvektor	Primer A	Primer B	Annealingtemperatur
Halbvektor 1	PvuI fwd	Halbvektor rev	60 °C
26HsPEX3-Halbvektor 2	26HsPEX3 fwd	PvuI rev	61 °C
34/20HsPEX3-Halbvektor 3	34/20HsPEX3 fwd	PvuI rev	57 °C

PCR-Ansatz

5X HF-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer A (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer B (10 pmol/µl)	2,5 µl
DNA <i>template</i> pGEM4a 20HsPEX3 (2,5 ng/µl)	2,5 µl
<i>Phusion HF</i> (2 U/µl)	0,375 µl
ddH ₂ O	31,125 µl

PCR Zyklen

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	99 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	20 sec	Zykluswiederholung: 20
Annealing	xx °C	20 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	

Elongation 72 °C 10 min
Endtemperatur 4 °C

Nach der PCR wurden die entstandenen DNA-Fragmente mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll für PCR *Clean-up*. Die Halbvektoren wurden mit 5 mM Tris-HCl (pH 8) eluiert.

2.3.1.2 PvuI-Restriktionsverdau

Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden mit der Restriktionsendonuklease PvuI geschnitten. Dafür wurde die gesamte DNA mit 2 µl Enzym (2 *FastDigest Units*) unter Zugabe des *FastDigest* Puffers für 50 min bei 37 °C verdaut. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit nach dem Protokoll zur Aufreinigung aus Agarosegelen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 5 mM Tris-HCl (pH 8).

2.3.1.3 Phosphorylierung

Die Halbvektoren wurden am freien 5'-OH-Ende der Ribose phosphoryliert, um die folgende Ligation zu ermöglichen. Dazu wurde die T4 Polynukleotidkinase verwendet. 10 Units der Polynukleotidkinase wurden in 20 µl Ansatz verwendet. Pro Halbvektor wurden jeweils 50 ng pro Ansatz eingesetzt. Die Halbvektorkombinationen wurden bereits während der Phosphorylierung zusammen inkubiert. Als Puffer diente der Ligationspuffer der T4 DNA-Ligase. Die Phosphorylierung wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt.

2.3.1.4 Ligation

Die Ligation erfolgte im Anschluss an die Phosphorylierung. Die phosphorylierten Halbvektoren lagen bereits im Ligationspuffer und in korrekter Kombination vor. 5 Units T4 DNA Ligase wurden zu den Halbvektoren (je 25 ng) zugegeben und bei Raumtemperatur für 30 min ligiert.

2.3.2 Klonierung von *ScPex8*, *ScPex13* und *ScPex22* in den Transkriptionsvektor *pGEM4a*

Um die DNA-Sequenzen von *ScPex8*, *ScPex13* und *ScPex22* für eine *in vitro* Transkription verwenden zu können, mussten die Sequenzen in den Transkriptionsvektor *pGEM4a* kloniert werden. Für die proteinkodierenden Sequenzen von *ScPex8p*, *ScPex13p* und *ScPex22p* wurden dazu jeweils Primer entworfen, die Restriktionsschnittstellen an die Sequenzen anfügen. Es wurden Restriktionsschnittstellen gewählt, die auch in der *multiple cloning site* des Zielvektors *pGEM4a* vorhanden sind. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit diesen Restriktionsenzymen verdaut und dadurch *sticky ends* erhalten. Der Zielvektor *pGEM4a* wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten. Abschließend konnten die Inserts in den Zielvektor *pGEM4a* gerichtet ligiert werden.

2.3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Für die PCR wurde mit der Polymerase *Phusion High Fidelity* durchgeführt. Die unmodifizierten Primer wurden bei MWG bestellt und synthetisiert.

PCR-Produkt	Primer A	Primer B	Annealingtemperatur
ScPex8	Pex8 fwd	Pex8 rev	50 °C
ScPex13	Pex13 fwd	Pex13 rev	57 °C
ScPex22	Pex22 fwd	Pex22 rev	52 °C

PCR-Ansatz

5X <i>HF</i> -Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer A (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer B (10 pmol/µl)	2,5 µl
DNA <i>template</i> (2,5 ng/µl)	2 µl
<i>Phusion HF</i> (2 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	31,5 µl

PCR Zyklen

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	98 °C	1,5 min	
Denaturierung	98 °C	15 sec	Zykluswiederholung: 30
Annealing	xx °C	30 sec	
Elongation	72 °C	25 sec	
Elongation	72 °C	10 min	
Endtemperatur	4 °C		

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll für PCR *Clean-up*. Die PCR-Fragmente wurden mit 5 mM Tris-HCl (pH 8) eluiert.

2.3.2.2 Restriktionsverdau

Die aufgereinigten PCR-Fragmente und der Zielvektor pGEM4a wurden mit je zwei Restriktionsendonukleasen gleichzeitig verdaut. Dafür wurde von den PCR-Fragmenten jeweils die gesamte DNA mit je 4 µl der zwei Restriktionsendonukleasen (je 4 *FastDigest Units*) kombiniert. Die Fragmente wurden in *FastDigest* Puffer für 30 min bei 37 °C verdaut.

Der Zielvektor pGEM4a wurde ebenfalls mit XhoI/KpnI bzw. XhoI/SacI doppelverdaut. Dafür wurden pro Mikrogramm Vektor je 1 µl (1 *FastDigest Unit*) Enzym verwendet. Der Verdau erfolgte in *FastDigest* Puffer für 5 min bei 37 °C.

Restriktionsenzyme

ScPex8	XhoI und KpnI
ScPex13	XhoI und SacI
ScPex22	XhoI und SacI

Die geschnittenen DNA-Fragmente und die Zielvektoren wurden in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit nach dem Protokoll zur Aufreinigung aus Agarosegelen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 5 mM Tris-HCl (pH 8).

2.3.2.3 Ligation

Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:4 in der Ligation eingesetzt, wobei von dem Vektor je 50 ng verwendet wurden. Von der T4 DNA Ligase wurden 5 Units zugegeben und die Plasmide bei Raumtemperatur für 40 min in Ligationspuffer ligiert.

2.3.3 Klonierung von HsPEX16-Peptid in den Expressionsvektor pProExHTaHRa

Um den Gehalt von peroxisomalen Membranen in den ER-Membranpräparationen zu analysieren, sollte ein Antikörper gegen HsPEX16 verwendet werden. Für den Antikörper gegen HsPEX16 musste eine Positivkontrolle erstellt werden. Dafür wurde ein Teil des Proteins HsPEX16, gegen den der Antikörpers gerichtet ist, verwendet. Die Peptidregion des Antigens umfasst die Aminosäuren 132 – 346 des Proteins. In diesem Abschnitt des Proteins sind jedoch Transmembrandomänen enthalten, die dazu führen könnten, dass das Protein nur schwer aufgereinigt und verwendet werden kann. Deshalb wurde nur die DNA-Sequenz für ein Peptid, das von Aminosäure 132 bis 221 geht, ausgewählt. Um dieses Peptid aufzureinigen zu können, sollte seine Sequenz in den Expressionsvektor pProExHTa kloniert werden. Zusätzlich sollte das zu exprimierende Protein eine Größe besitzen, die auf den in dieser Arbeit verwendeten Gradientengelen (10-20 % Tris-Glycin Polyacrylamid) gut aufgetrennt wird. Deshalb wurde ein Vektor ausgewählt, der bereits die DNA-Sequenz eines löslichen Proteins enthielt. Das Protein sollte zum einen bereits erfolgreich aufgereinigt worden sein und zum anderen die Größe des Gesamtproteins auf insgesamt 20 – 50 kDa bringen. Aus diesem Grund wurde der Vektor pProExHTa mit der DNA-Sequenz des Proteins Heparinrezeptor A (HRa) verwendet.

Die DNA-Sequenz des HsPEX16-Peptids wurde *in frame* in den Expressionsvektor pProExHTa zwischen die Hexahistidinsequenz und die Sequenz des Heprezeptor A kloniert. EheI-Schnittstellen wurden dafür *in frame* durch PCR an die DNA-Sequenz des HsPEX16-Peptids angefügt. Das PCR-Produkt und der Zielvektor wurden anschliessend mit EheI verdaut und schliesslich ligiert. Durch abschliessende Sequenzierung wurde sicher gestellt, dass das Insert korrekt eingebaut wurde.

2.3.3.1 Polymerasekettenreaktion

PCR-Ansatz

5X HF-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer PEX16 fwd (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer PEX16 rev (10 pmol/µl)	2,5 µl
DNA <i>template</i> HsPEX16 (5 ng/µl)	5 µl
DMSO	1,5 µl
<i>Phusion HF</i> (2 U/µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	27,25 µl

PCR Zyklen

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	30 sec	Zyklenwiederholung: 30
Annealing	61 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	10 min	
Endtemperatur	4 °C		

Die DNA-Fragmente wurden mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit aufgereinigt und mit 5 mM Tris-HCl (pH 8) eluiert.

2.3.3.2 Restriktionsverdau

Die aufgereinigten PCR-Fragmente und der Zielvektor pProExHTaHRa wurden mit EheI geschnitten. Dafür wurde 1 µg der PCR-Fragmente mit 5 µl EheI (5 *FastDigest Units*) versetzt. Von dem Vektor wurde 1 µg mit 1 µl EheI inkubiert. Die DNA wurde jeweils in *FastDigest* Puffer für 30 min bei 37 °C verdaut.

Das DNA-Fragment und der Zielvektor wurden in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit

nach dem Protokoll zur Aufreinigung aus Agarosegelen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 5 mM Tris-HCl (pH 8).

2.3.3.3 Dephosphorylierung

Für eine erfolgreiche Ligation musste zunächst der Vektor dephosphoryliert werden. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde die *FastAP* Alkalische Phosphatase verwendet. 420 ng der Vektor-DNA wurden mit 1 Unit *FastAP* Alkalische Phosphatase in *FastDigest* Puffer für 10 min bei 37 °C dephosphoryliert. Anschliessend wurde die Phosphatase für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

Das Insert wurde mit T4 Polynukleotidkinase behandelt. 85 ng Insert-DNA wurden dafür mit 1 Unit der Polynukleotidkinase und 20 pmol ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert und danach die Polynukleotidkinase für 10 min bei 75 °C inaktiviert (Die Polynukleotidkinasebehandlung des Inserts war überflüssig, da dieses bereits phosphoryliert war. Die Durchführung wird nur zur Vollständigkeit der Angaben angeführt).

2.3.3.4 Ligation

Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:2 in der Ligation eingesetzt, wobei von dem Vektor 125 ng verwendet wurden. Von der T4 DNA Ligase wurde 1 Unit zugegeben und die Plasmide für 30 min bei Raumtemperatur in Ligationspuffer ligiert.

2.3.4 Plasmid-Transformation in *E. coli*

Chemokompetente *E. coli* XL1-*Blue* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Zellen wurden 1-2 µl Plasmid-DNA oder Ligationsprodukt hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 1 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 1 min, danach wurde der Ansatz für 1 min auf Eis erneut abgekühlt. Zu den transformierten Zellen wurden 900 µl LB-Medium pipettiert und die Zellen wurden bei 37 °C und 800 rpm für 60 min vorinkubiert. Anschließend wurden die XL1-*Blue* Zellen in zwei verschiedenen Konzentrationen (z.B.: 1/10 und 9/10) auf Selektivagarplatten (mit 0,1 mg/ml Ampicillin) ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.3.5 Kultivierung der Bakterien

E. coli XL1-*Blue* wurde in LB-Medium oder auf LB-Agar bei 37 °C angezogen. Das LB-Medium und der LB-Agar enthielten jeweils das Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration: 0,1 mg/ml). Für die Lagerung wurden die *E.coli* in LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogen und mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % Glycerin versetzt. Anschliessend wurden sie mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Überexpression und Ni²⁺-NTA-Aufreinigung von 6xHis-HsPEX16-P-HRa

Um den Gehalt von peroxisomalen Membranen in den ER-Membranpräparationen zu analysieren, sollte ein Antikörper gegen HsPEX16 verwendet werden. Für Versuche mit dem Antikörper gegen HsPEX16 ist eine Positivkontrolle notwendig. Für diese Positivkontrolle wurde zunächst das Plasmid pProExHTa 6xHis-PEX16-P-HRa hergestellt (siehe 2.3.3). Auf Grundlage dieses Plasmids kann die Positivkontrolle 6xHis-PEX16-P-HRa überexprimiert und aufgereinigt werden.

Zunächst wurde eine Vorkultur von *E. coli* Rosetta2(DE3)pLacI mit pProExHTa 6xHis-PEX16-P-HRa in LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Davon wurde eine Hauptkultur (200 ml) in LB_{Amp} mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C kultiviert. Dann erfolgte die Induktion der Genexpression mit 0,6 mM IPTG und die Bakterien wurden weitere 3 Stunden bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden anschliessend durch Sedimentation geerntet (Beckman Coulter Rotor JA14, 5.500 rpm, 20 min, 4 °C) und in 20 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall (Sonoplus, Sonotrode KE76, 6x 30 Sekunden mit 30 Sekunden Pause) und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Optima, MLA80, 25.000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand mit löslichen Proteinen wurde im Verhältnis 1:1 mit Puffer I10 vermischt. Die Ni²⁺-NTA-Säule musste zur Vorbereitung equilibriert werden. Dazu wurde ein 1:1 Gemisch aus Puffer I10 und Puffer I20 verwendet (zehn Säulenvolumen). Dann wurde der Zellextrakt auf diese equilibrierte Ni²⁺-NTA-Säule gegeben. Anschliessend wurde die Säule mit zehnfachem Säulenvolumen Puffer I20 zweimal gewaschen. Danach wurden die Proteine zweimal mit einem Säulenvolumen Puffer I100 und zweimal mit einem Säulenvolumen Puffer I250 eluiert. Diese Eluate wurden zusammengeführt, gegen Puffer I0 (130faches Volumen) über Nacht bei 4 °C dialysiert und mittels Vivaspin Zentrifugalkonzentrator 2 nach dem Vivaspinprotokoll aufkonzentriert (Ausschlussgrenze: 3 kDa; Allegra 2IR, Rotor S4180, 4.700 rpm, 4 °C).

2.4 LINEARES SEC22 DNA-KONSTRUKT

Das Sec22-Gen war nicht in einem Plasmid enthalten, sondern auf einem linearen DNA-Abschnitt, der wie folgt aufgebaut war (siehe auch Schuldiner *et al.*, 2008):



Abb. 2-2: Aufbau lineares Sec22 DNA-Konstrukt Das DNA-Konstrukt von Sec22p enthält zunächst einen T7-Promoter zur RNA Transkription, gefolgt von der Sequenz der 5'-untranslatierten Region (UTR) des präpro-alpha Faktors. Dann folgt die Sequenz für Sec22p mit einer Sequenz für zwei Glykosylierungsstellen am 3'-Ende (im Protein dann am C-Terminus). Daraufhin folgt die Sequenz der 3'-untranslatierten Region des präpro-alpha Faktors und die Kodierung eines PolyA-Schwanzes.

Der DNA-Abschnitt wurde durch eine PCR vervielfältigt, mit dem PCR *Clean-up* Kit aufgereinigt und in der *in vitro* Transkription verwendet.

PCR-Ansatz

5X <i>HF</i> -Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer Sec22p fwd	2 µl
Primer Sec22p rev	2 µl
lineare Sec22-DNA	0,5 µl
<i>Phusion HF</i> (2 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	33,5 µl

PCR Zyklen

	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	Zykluswiederholung: 10
Annealing	62 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	Zykluswiederholung: 20
Annealing	65 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	10 min	
Endtemperatur	4 °C		

2.5 *IN VITRO* TRANSKRIPTION

Ca. 3-4 µg der Plasmid-DNA wurden für eine *in vitro* Transkription linearisiert. Das Restriktionsenzym wurde so gewählt, dass das Plasmid maximal 200 bp nach der proteinkodierenden Sequenz geschnitten wurde. Für die Restriktionsenzyme wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet (z.B. für *NheI* Puffer 2 von NEB) und gegebenenfalls BSA zugefügt. Der Restriktionsverdau erfolgte für 3 h bei 37 °C mit je 20-60 Units Enzym. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid mit dem Nucleospin Gel und PCR *Clean-up* Kit nach dem Protokoll zum PCR *Clean-up* aufgereinigt und in zweimal 25 µl ddH₂O eluiert. Die Konzentration der beiden Elutionen wurde am Photometer ermittelt. Dafür wurden 2 µl Eluat in 98 µl ddH₂O gegeben und in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm

vermessen. Eine optische Dichte von 1 ($OD_{260} = 1$) entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA. Anhand dieser Formel kann die Konzentration des Plasmids berechnet werden. Außerdem wurde die Linearisierung des Plasmids durch Auftrennung auf einem Agarosegel (1 %) kontrolliert.

Um mRNA zu transkribieren wurde 1 μg linearisiertes Plasmid oder Sec22p-Konstrukt verwendet. Neben der T7 RNA-Polymerase (20-40 U) und dem dazu gehörenden Transkriptionspuffer wurden 0,5 mM rNTPs, 10 mM DTT und 0,2 mg/ml BSA sowie 100 U RNasin zugegeben. Die Transkription erfolgte bei 37 °C über 4 Stunden, nach der Hälfte der Zeit wurden erneut die oben genannten Mengen RNA-Polymerase und rNTPs zugegeben. Abschließend wurde die mRNA mit dem Nucleospin RNA *Clean-up* Kit aufgereinigt, die mRNA in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt und das Ergebnis kontrolliert.

2.6 *IN VITRO* TRANSLATION

Die *in vitro* Translation fand im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [^{35}S]- radioaktiv markiertem Methionin für 45 min bei 25 °C statt. Zuvor wurden mögliche Membranen aus dem Retikulozytenlysat durch Zentrifugation entfernt (Eppendorf 5417 R, 14.000 rpm, 10 min, 4 °C). Ein Ansatz mit 10 μl Gesamtvolumen setzte sich aus 6 μl Retikulozytenlysat, 0,2 μl Aminosäuremix ohne Methionin (je Aminosäure 1 mM), 0,5 μl radioaktiv markiertem Methionin (0,17 MBq), 0,5 μl mRNA und Membranpuffer zusammen.

2.7 INTEGRATIONS- UND TRANSPORTASSAYS

Zur *in vitro* Integration von Membranproteinen bzw. Translokation von sekretorischen Proteinen wurden die Proteine in Anwesenheit von Mikrosomen aus rauem ER synthetisiert. Dabei sind der Ansatz und die Durchführung ansonsten identisch zur *in vitro* Translation (siehe 2.6). Von den Mikrosomen aus rauem ER wurden je nach Membranart zwischen 0,2 eq bis 0,5 eq Mikrosomen zu jedem Ansatz zugegeben. Die ER-Mikrosomen in Membranpuffer ersetzen hierbei den Membranpuffer, so dass das Gesamtvolumen von 10 μl erhalten blieb.

2.8 POSTTRANSLATIONALE INTEGRATIONS- UND TRANSPORTASSAYS

Für die posttranslationale Integration wurden die Proteine zunächst in Abwesenheit von Mikrosomen synthetisiert (siehe 2.6). Die Translation der mRNA wurde durch Zugabe von 1 mM Cycloheximid gestoppt und die Ribosomen durch Zentrifugation sedimentiert (Beckman Coulter Optima Ultrazentrifuge, Rotor TLA100, 20-30 min, 70.000 rpm). Der erhaltene Überstand mit den Proteinen wurde für posttranslationale Integration mit 3-5 eq Mikrosomen für zunächst 20 min bei 4 °C und dann 20 min bei 25 °C inkubiert.

2.9 ALKALIEXTRAKTION DER ER-MEMBRANEN

Die Alkaliextraktion wurde in Anlehnung an Whitley *et al.* (1996) durchgeführt. Wurde die Translation in Anwesenheit einer geringen Menge an Mikrosomen (0,2-0,5 eq) durchgeführt, mussten nach Abschluss der Integration „zusätzliche Mikrosomen“ (auch *Tracer*-Membranen genannt; 8,8 eq) zur Verbesserung der Sedimentation zugegeben werden. Bei posttranslationaler Integration wurden bereits ausreichend Mikrosomen verwendet, so dass auf weitere Mikrosomen verzichtet werden konnte und nur Membranpuffer zugegeben wurde. Zügig nach der Zugabe wurden die Mikrosomen in der Ultrazentrifuge Optima (Beckman Coulter) mit dem Rotor TLA100.3 für 5 min bei 70.000 rpm bei 4 °C sedimentiert. Die Membranpellets wurden in 100 µl 100mM Na₂CO₃ (pH 11,5) resuspendiert und bei dem Einsatz von Hefemembranen für 20 min bei 4 °C inkubiert. Wenn Schweinemembranen verwendet wurden, betrug die Inkubationszeit bei 4 °C nur 15 min. Die Proben wurden anschliessend über ein 50 µl Natriumcarbonat-Sucrosekissen geschichtet und für 20 min (Hefe) bzw. 30 min (Schwein) ultrazentrifugiert (TLA100, 80.000 rpm, 4 °C). Diese Natriumcarbonatbehandlung wurde zweimal durchgeführt, dabei wurden Überstand S2 und S3 erhalten und am Ende der Behandlung die Pelletfraktion P. Die Überstände S2 und S3 wurden anschliessend mit Trichloressigsäure gefällt (siehe TCA-Fällung, 2.11.1). Alle Fraktionen wurden abschließend in SDS-Probenpuffer gegeben.

2.10 HEXOKINASE/APYRASE-BEHANDLUNG

Für die Untersuchung der posttranslationalen Integration der Proteine wurde die mRNA *in vitro* translatiert, die Translation mit Cycloheximid gestoppt und die Ribosomen depletiert (siehe 2.8).

Bei der Hexokinase-Behandlung wurde der Proteinansatz mit 0,04 U/µl Hexokinase (frisch angesetzt) und 10 mM Glukose versetzt und für 15 min bei 25 °C inkubiert. Die Hefemikrosomen wurden mit 0,09 U/eq Hexokinase und 10 mM Glukose versetzt und die Schweinemembranen mit 0,16 U/eq Hexokinase und 10 mM Glukose. Die Inkubation dauerte 15 min bei 25 °C.

Bei der Apyrase-Behandlung wurde der Proteinansatz mit 0,1 U/µl Apyrase für 15 min bei 25 °C behandelt und die Mikrosomen mit 0,19 U/eq Apyrase. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 15 min bei 25 °C.

2.11 METHODEN ZUR AUFKONZENTRIERUNG

2.11.1 Trichloressigsäure-Fällung

Die Proben wurden bis zu einer Endkonzentration von 15 % mit 40 %iger (v/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde für 60 min bei 14.000 rpm (4 °C) in der Eppendorf-Zentrifuge 5417 R sedimentiert. Dann wurden die Überstände abgenommen und verworfen und das Pellet mit 500 µl kaltem

80 %igem (v/v) Aceton gewaschen. Nach erneuter Sedimentation (30 min, 14.000 rpm, 4 °C) und Entfernung der Überstände wurden die Pellets getrocknet und anschliessend in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.11.2 Ammoniumsulfatfällung

Zur Aufkonzentrierung der Proteine und Abtrennung von Globin wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt. Nach der Zugabe von Ammoniumsulfat (Endkonzentration: 60 %) wurde für 10 min bei 4 °C gefällt und anschliessend für 45 min bei 14.000 rpm (4 °C) in der Eppendorf-Zentrifuge 5417 R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 100 µl 60%igem Ammoniumsulfat resuspendiert und erneut zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417 R, 45 min, 14.000 rpm, 4 °C). Das finale Pellet wurde abschließend in SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE resuspendiert.

2.12 ENDOGLYKOSIDASE-BEHANDLUNG

Die Endoglykosidase H (Endo H)-Behandlung erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Kragt *et al.* (2005). Die *in vitro* synthetisierten Proteine wurden zunächst mit Ammoniumsulfat gefällt (siehe 2.11.2) oder in Verdünnungspuffer ultrazentrifugiert (TLA 100.3, Optima, 10 min, 70.000 rpm, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in einer Mercaptoethanol-SDS-Lösung gelöst und anschliessend bei 99 °C für 5 min denaturiert. Der Ansatz wurde nun aufgeteilt und eine Hälfte nur mit Endo H-Puffer *mock* behandelt, während die zweite Hälfte Endo H-Puffer mit 5 Units Endo H erhielt. Die Inkubation beider Proben lief über Nacht bei 30 °C. Um die Endoglykosidase zu inaktivieren, wurden die Proben erneut bei 99 °C 5 min lang erhitzt. Dann wurden die Proben zur Aufkonzentrierung mit TCA gefällt (siehe 2.11.1) oder in 400 µl Verdünnungspuffer ultrazentrifugiert (TLA 100.3, Optima, 10 min, 70.000 rpm, 4 °C). Das TCA-Pellet bzw. das Membranpellet wurde abschliessend in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.13 PROTEASESCHUTZEXPERIMENT

Die Lokalisation der Proteine konnte nach der Translokation anhand eines Proteaseschutzexperiments untersucht werden. Dazu wurde eine Hälfte der Probe mit 500 µg/ml Protease (Proteinase K) behandelt und die zweite Hälfte mit Proteasepuffer *mock* behandelt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Verdau mit 1-10 mM PMSF abgestoppt. Nach 5 min Inkubation mit PMSF wurden die Proben mit Ammoniumsulfat gefällt (siehe 2.11.2).

2.14 SDS-PAGE UND WESTERN BLOT

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurde zur Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Dafür wurden die Proteine zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 60 °C denaturiert. Es wurden

Gradientengele (10-20 % Tris-Glycin Polyacrylamid; später nur Gradientengele genannt) und NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % Gele (später nur NuPAGE Gele genannt) verwendet. Die Polyacrylamid-Gele wurden nach der Auftrennung zunächst mit Essigsäure (15 %) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert, gewässert und anschliessend im Geltrockner getrocknet. Dann wurden die Gele zur Auswertung der radioaktiven Signale auf *Imaging Plates* für bis zu zehn Tage exponiert. Die entstandenen Autoradiogramme wurden mit dem *Phosphoimager* FLA-3000 ausgelesen und mit der Software *AIDA Image Analyzer* ausgewertet.

Für WesternBlot-Analysen wurde das ungetrocknete SDS-Gel nach der Elektrophorese in einem *semi dry* System mit PVDF-Membran verwendet. Die Übertragung der Proteine auf die Blotmembran erfolgte bei 2 mA/cm^2 für 54 min. Die PVDF-Membran wurde zuvor mit Methanol aktiviert und dann der Blot unter Verwendung von Blotting Puffer durchgeführt. Danach wurde die PVDF-Membran mit Blocking Puffer bei Raumtemperatur für eine Stunde blockiert und anschliessend über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit dem primären Antikörper inkubiert (Konzentrationen und genutzte Puffer siehe 2.1.4). Die Inkubation mit sekundärem Antikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Es wurden sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper mit einer Emission im Infrarotbereich und peroxidasegekoppelte Antikörper verwendet (Konzentrationen und Ansatz siehe 2.1.5). Die Analyse der Signale wurde bei fluoreszenzgekoppelten Antikörpern am *Odyssey Infrared Imaging System* durchgeführt, während peroxidasegekoppelte Antikörper mit je 1 ml ECL-Substanzen (*enhanced chemiluminescence*; Luminol und Oxidationsreagenz) behandelt wurden und anschliessend an der CCD-Kamera LAS-1000 detektiert wurden.

2.15 MEMBRANPRÄPARATIONEN

2.15.1 Membranpräparationen aus Hefezellen

Die Hefen wurden vor der Mikrosomenpräparation zunächst auf YPD-Agar bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert. Die Hefestämme $\Delta\text{get1,2}$ und Δget3 wurden durch Zugabe von Nourseothricin (0,1 mg/ml) und Geneticin (0,15 mg/ml) auf YPD-Agar vorselektiert. Für die Mikrosomenpräparationen wurden die Hefen in YPD-Medium kultiviert. Zur Präparation aus großen Volumina (6 l) wurden zunächst über mehrere Vorkulturen die entsprechende Hefe in YPD-Medium angezogen und bei einer optischen Dichte (600 nm) zwischen 2 und 4 durch Zentrifugation (Avanti J-20 XPI, JLA-8.100, 10 min, 8.000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) geerntet. Das Hefepellet wurde danach mit sterilem Wasser ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) resuspendiert und der Zentrifugationsschritt analog der Ernte getätigt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Anschliessend wurde das Hefepellet in Homogenisationspuffer resuspendiert und mittels *BeadBeater* (Glaskugeln) aufgeschlossen. Danach wurden mittels Zentrifugation zunächst Zelltrümmer und Zellkerne (Pellet) entfernt (Avanti J-20 XPI, Rotor JA18, 10 min, 3.000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand wurde dann erneut zentrifugiert (Optima L-90K, Rotor 45Ti, 15 min, 8.000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der entstandene Überstand weiter verwendet. Zum Schluß wurden dann die ER-Mikrosomen sedimentiert (Optima L-90K, Rotor 45Ti, 35 min, 25.000 rpm, 4

°C). Das entstandene Pellet wurde in Membranpuffer resuspendiert und im Ansatz mit 2 % SDS bei 280 nm quantifiziert. Eine optische Dichte von 50 bei 280 nm entspricht einer Konzentration von 1 eq/μl (Walter und Blobel, 1983).

Für die Präparation aus kleinen Volumina (ml-Bereich) wurden die Hefen zunächst geerntet (Allegra 2IR, Rotor S4180, 5 min, 3.000 rpm, 4 °C), einmal mit sterilem Wasser (4 °C) resuspendiert und erneut sedimentiert. Der Aufschluss der Hefen erfolgte in kaltem Homogenisationspuffer mit Proteaseinhibitoren (PI-Mix). In Anwesenheit von Glaskugeln wurden die Hefen durch Vortexen aufgeschlossen (4x 30 sec) und zwischendurch immer auf Eis gekühlt. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation (Allegra 2IR, Rotor S4180, 10 min, 1.600 rpm, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde für eine weitere Zentrifugation (5417 R, 20 min, 14.000 rpm, 4 °C) verwendet und das erhaltene Pellet in Membranpuffer resuspendiert und quantifiziert.

2.15.1.1 Membranpräparation nach YTX66-shift

Um in der Hefe YTX66 (*sec61-2*) das temperatursensitive Sec61p zu depletieren, musste die Hefe bei 37 °C inkubiert werden. Um ER-Mikrosomen zum Vergleich zu erhalten, wurde die Hefe zunächst bei 30 °C kultiviert. Zum Zeitpunkt T0 wurde ein Teil der Hefen abgenommen und bei 4 °C gelagert, der Rest der Kultur wurde halbiert. Die eine Hälfte wuchs weiterhin bei permissiven 30 °C, während die andere Hälfte bei restriktiven 37 °C angezogen wurde. Nach 4,5 Stunden wurden alle drei Kulturen aufgearbeitet (siehe Membranpräparation für kleine Volumina, 2.15.1).

2.15.2 Membranpräparationen aus Hunde- und Schweinepankreas

Für die Präparation von ER-Mikrosomen aus Säugetierzellen wurde das Pankreas verwendet (dt. Bauchspeicheldrüse). Das Protokoll wurde in Anlehnung an Walter und Blobel (1983) durchgeführt. Das Pankreas wurde zunächst ganz fein zerschnitten und dann in Puffer A (4 °C) mit einem Glaspotter (Homogenisator) mechanisch homogenisiert. Anschliessend wurde das Homogenisat zentrifugiert (Optima L-90K, JA-14, 10 min, 3.000 rpm, 4 °C) und Zelltrümmer dadurch abgetrennt (Pellet). Die Homogenisation wurde noch einmal wiederholt und der Überstand wurde noch einmal zentrifugiert (Optima L-90K, JA-14, 10 min, 8.100 rpm, 4 °C). Der davon erhaltene Überstand wurde ein letztes Mal durch einen Kissenpuffer ultrazentrifugiert (Optima L-90K, Rotor Ti45, 3,5 Stunden, 45.000 rpm, 4 °C) und das erhaltene Membranpellet in Membranpuffer resuspendiert und quantifiziert.

3 ERGEBNISSE

3.1 PEX3-PROTEINE INTEGRIEREN *IN VITRO* IN ER-MEMBRANEN

Die Hypothese des indirekten Proteintransports zu den Peroxisomen besagt, dass peroxisomale Membranproteine (PMP) über das ER zu den Peroxisomen gelangen können. Der Einbau von PMP in die ER-Membran konnte bisher nur durch indirekte Methoden wie z.B. *in vivo* Kolokalisation unter Verwendung von modifizierten Proteinen dargestellt werden. In dieser Arbeit wird zunächst der Einbau des viel untersuchten ScPex3p *in vitro* getestet. Um die Integration des Wildtyp-ScPex3p zu untersuchen, wurde die ScPex3-mRNA *in vitro* im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von radioaktivem [³⁵S]-Methionin und Mikrosomen aus der Hefe translatiert. Die Mikrosomen sind eine Fraktion aus Hefezellen, die größtenteils raue ER-Membranen enthält. Um die Sedimentation und die Detektion der Membranen im Verlauf der Behandlung zu verbessern, wurden nach der Translation „zusätzliche Mikrosomen“ (auch *Tracer*-Membranen genannt) zugegeben (Abb. 3-1 A, Spur 1 T, *total fraction*). Aus dem Ansatz wurden unmittelbar danach die Membranen durch Ultrazentrifugation isoliert. Der Überstand S1 wurde abgenommen und verwahrt. Das erhaltene Membranpellet wurde mit 0,1 M Natriumcarbonat (pH 11,5) behandelt. Die Behandlung erfolgte für 20 min bei 4° C. Durch die Alkalibehandlung (nach Fujiki *et al.*, 1982) sollen periphere Membranproteine und luminale Proteine sowie mögliche zytosolische Verunreinigungen von den ER-Membranen abgetrennt werden. Diese Proteine werden im Überstand S2 der anschließenden Sedimentation angereichert. Integrale Membranproteine verbleiben dagegen im Membranpellet. Die Behandlung des entstandenen Membranpellets mit Natriumcarbonat und die Ultrazentrifugation wurden ein zweites Mal wiederholt, wobei das finale, alkaliresistente Membranpellet P und ein dritter Überstand S3 erhalten wurden. Zum Vergleich wurde die mRNA des ScPex3p auch in Abwesenheit von Mikrosomen *in vitro* translatiert. Diesem Ansatz wurden ebenfalls „zusätzliche Mikrosomen“ zugefügt, die Membranen sedimentiert und dann das isolierte Membranpellet zweimal mit Natriumcarbonat (pH 11,5) behandelt und sedimentiert. Der Ausgang T, der Überstand S1 und das finale Pellet P wurden mit SDS-Probenpuffer vermischt, während die Überstände S2 und S3 zunächst mit Trichloressigsäure gefällt wurden, bevor die erhaltenen Pellets in SDS-Probenpuffer resuspendiert wurden. Alle Fraktionen wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt und das Gel mittels Autoradiogramm an einem *Phosphoimager* analysiert. Die anschließende semiquantitative Auswertung erfolgte mit der Software *AIDA Image Analyzer* (Version 3.52), dabei wurden die Intensitäten der radioaktiven Signale auf dem Autoradiogramm ermittelt. Um die Signale auch bei unterschiedlichen Translationsmengen miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte des Ausgangs T auf 100 % gesetzt und die anderen Signale prozentual dazu dargestellt (Abb. 3-1 B).

Erstaunlicherweise wurden circa 50 % ScPex3p alkaliresistent in den Mikrosomen detektiert (Abb 3-1 A, Spur 10). Im Gegensatz dazu wurde in dem Kontrollansatz nur eine geringe Menge an ScPex3p (ca. 10 %) im Pellet gefunden (Spur 5). Diese Beobachtungen legen nahe, dass ein deutlicher Anteil an ScPex3p *in vitro* in die verwendeten Mikrosomen integriert wurde. Um diese Aussage treffen zu können, muss die Effizienz der Membranextraktion überprüft werden.

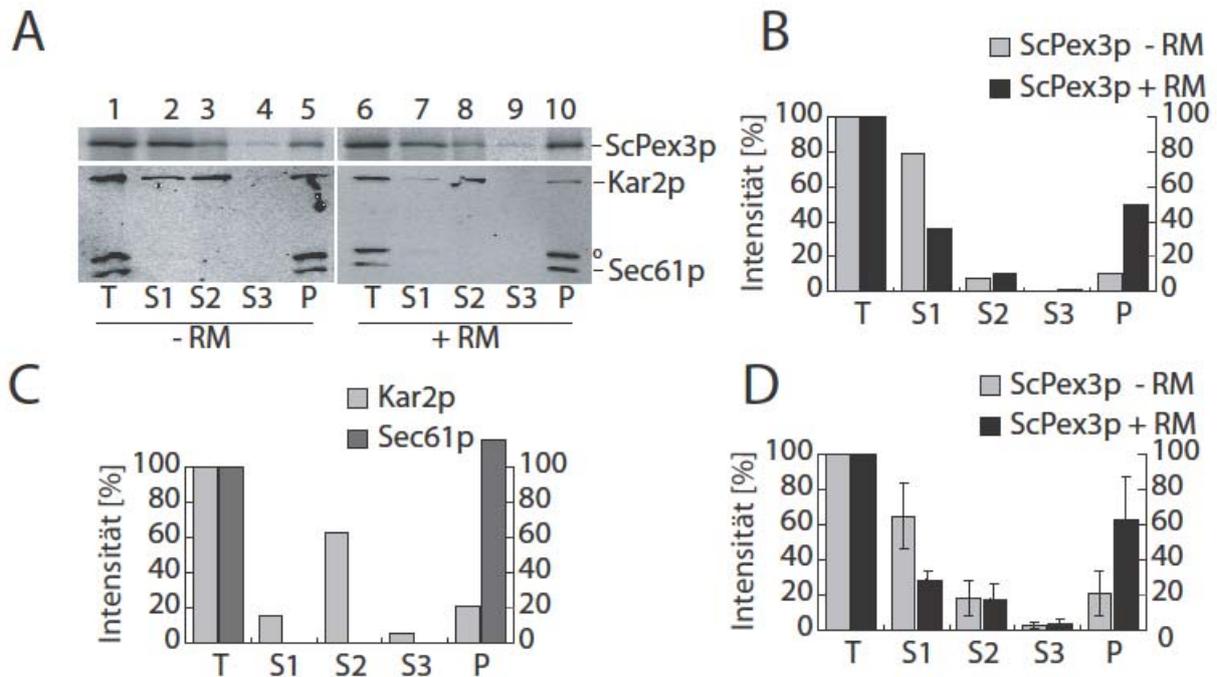


Abb. 3-1: ScPex3p wird *in vitro* in Mikrosomen integriert **A)** ScPex3p wurde in Retikulozytenlysat unter Zugabe von [³⁵S]-Methionin synthetisiert (*total fraction*, T). Die Translation fand in Anwesenheit von Mikrosomen (RM) aus Hefe statt. Zur besseren Sedimentation wurden zu dem Ansatz nach der Translation weitere Mikrosomen zugegeben. Der Ansatz wurde sofort ultrazentrifugiert und der Überstand abgenommen (*supernatant* 1, S1). Das erhaltene Pellet wurde in 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) resuspendiert und erneut pelletiert. Diese Alkalibehandlung wurde zweimal durchgeführt und jeweils der Überstand abgetrennt (S2 und S3). Das finale Pellet (P) und die anderen Fraktionen wurden auf Gradientengelen aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch ein Autoradiogramm bzw. durch Western Blot mit Antikörpern gegen Kar2p und Sec61p. Mit dem Kreissymbol ° sind Signale von Sec62p-Protein A markiert. Die ER-Mikrosomen stammen aus einer Hefe (YUE04), bei der ein ProteinA-Tag an das Protein Sec62p angefügt wurde. Sec62p-Protein A wurde durch die sekundären Antikörper detektiert. **B)** und **C)** Autoradiogramm und Western Blot wurden quantifiziert und die prozentualen Signalintensitäten dargestellt. Die Signale der Fraktion T (*total fraction*) wurden auf 100 % gesetzt. **D)** Der Versuch wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt und in diesem Diagramm Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Versuche dargestellt.

Um die Effizienz der Membranextraktion zu überprüfen, wurden gleiche Proben mittels SDS-PAGE und anschliessendem Western Blot mit Antikörpern gegen Sec61p und Kar2p analysiert (Abb. 3-1 A, untere Abbildung). Der Western Blot wurde ebenfalls mit der Software *AIDA Image Analyzer* quantifiziert. Dazu wurde anhand einer Eichreihe aus drei verschiedenen Konzentrationen der Mikrosomen zunächst kontrolliert, ob ein linearer Zusammenhang zwischen den Signalen der sekundären Antikörper und der ansteigenden Konzentration der Mikrosomen bestand. Dann wurde die Intensität der Signale des

Integrationsansatzes (Spur 6-10) ermittelt und analog der ScPex3p-Werte in einem Diagramm anteilig an Ausgang T (= 100 %) prozentual dargestellt (Abb. 3-1 C).

Es zeigt, wie erwartet, dass das ER-Membranprotein Sec61p vollständig in der Pelletfraktion P zu finden war (Spur 10), während nur geringe Mengen an luminalem Kar2p im Pellet gefunden werden konnten. Ein Großteil von Kar2p konnte aus dem ER-Lumen entfernt werden. Die erfolgreiche Membranextraktion kann anhand der erhaltenen Proteinverteilung bestätigt werden und somit auch die Integration des ScPex3p. Die verwendeten rauen Membranen wurden aus der Hefe YUE04 präpariert. YUE04 besitzt ein ProteinA-Tag am Membranprotein Sec62p (°). Das ProteinA-Tag wurde von den sekundären Antikörpern detektiert und ist deshalb auf dem Western Blot ebenfalls sichtbar. Auch hier erkennt man, dass das Membranprotein Sec62p nur im Pellet detektiert wurde. Die Integration des ScPex3p in Hefemikrosomen wurde in vier unabhängigen Versuchen getestet. Von den quantifizierten Signalen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und in einem Diagramm (Abb. 3-1 D) dargestellt. Alle Versuche zeigten, dass ScPex3p integriert wurde.

Um auszuschliessen, dass es sich um eine Integration in andere Membranen als ER-Membranen handelt, wurde eine Glykosylierungsmutante des ScPex3p verwendet (24ScPex3p). Diese Glykosylierungsmutante besitzt eine Glykosylierungsstelle am N-Terminus. Der Abstand zwischen Glykosylierungsstelle und Membrananker beträgt 24 Aminosäuren. Die Glykosylierungsstelle kann nur N-glykosyliert werden, wenn sie sich im ER-Lumen befindet. 24ScPex3p wurde im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von Mikrosomen (RM) der Hefe und radioaktivem Methionin synthetisiert. Anschliessend wurden die Ansätze mit Ammoniumsulfat gefällt und halbiert. Die eine Hälfte eines Ansatzes wurde mit der Endoglykosidase Endo H inkubiert und die andere Hälfte *mock* behandelt. Endo H entfernt spezifisch Zuckerreste von N-glykosylierten Proteinen. Zum Abschluss wurden die Proben mit TCA gefällt und auf einem Gradientengel aufgetrennt. Das sekretorische Protein präpro-alpha Faktor diente als Kontrolle.

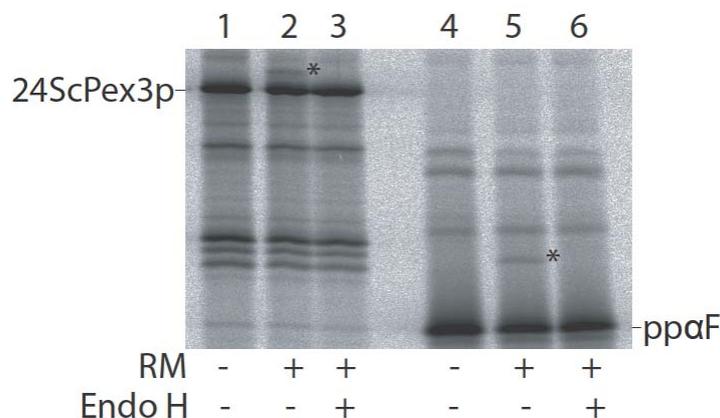


Abb. 3-2: 24ScPex3p wird nach *in vitro* ER-Integration glykosyliert Die mRNA der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p und des sekretorischen Proteins ppaF wurden *in vitro* im Retikulozytenlysat-System mit [³⁵S]-Methionin translatiert. Die Translation fand in Anwesenheit von ER-Mikrosomen (+RM) aus Hefe statt. Die Ansätze wurden danach mit Ammoniumsulfat gefällt und dann

aufgeteilt. Eine Hälfte wurde *mock* behandelt (Spur 2 und 5), die andere Hälfte wurde mit der Endoglykosidase Endo H behandelt (Spur 3 und 6). Danach wurden die Proben mit TCA gefällt. Als Kontrolle wurden beide Proteine auch ohne Membranen im Ansatz synthetisiert und danach analog zu den anderen Ansätzen behandelt. Die Proben wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt. Endo H entfernt spezifisch N-Glykosylierung von Proteinen. Die glykosylierten Formen von 24ScPex3p und ppαF sind mit einem Stern (*) markiert.

In Anwesenheit von Mikrosomen wurde eine neue, radioaktive Proteinbande oberhalb der Bande des 24ScPex3p sichtbar (Abb. 3-2, Spur 2 *). Eine N-Glykosylierung würde das Gesamtgewicht des 24ScPex3p um ca. 2,5 kDa erhöhen und das glykosylierte Protein würde damit auf gleicher Höhe wie die neue Proteinbande laufen. Durch Endo H-Behandlung verschwindet die neue Proteinbande und belegt damit, dass es sich tatsächlich um N-glykosyliertes 24ScPex3p handelte (Abb. 3-2, Spur 3). Auch das sekretorische Kontrollprotein ppαF wurde erfolgreich in den Hefemikrosomen N-glykosyliert (Abb. 3-2, Spur 5 *). Präpro-alpha Faktor besitzt drei Glykosylierungsstellen, weshalb das Gesamtgewicht des glykosylierten Proteins um ca. 7,5 kDa erhöht wurde. Die Effizienz der Glykosylierung von 24ScPex3p und ppαF war vergleichbar. Für beide Proteine kann mit den gezeigten Daten ausgesagt werden, dass die Proteinabschnitte mit den Glykosylierungsstellen im ER-Lumen waren. Durch diesen Versuch kann nicht geschlussfolgert werden, dass glykosyliertes 24ScPex3p in Form eines Membranproteins in den ER-Membran vorliegt und nur der N-Terminus in das ER-Lumen ragt. Dazu muss die Mutante im Alkaliassay getestet werden. Die mRNA des 24ScPex3p wurde dafür *in vitro* im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin translatiert und danach die ER-Membranen mit Natriumcarbonat (pH 11,5) extrahiert. Der Versuch wurde ansonsten wie oben bereits beschrieben durchgeführt.

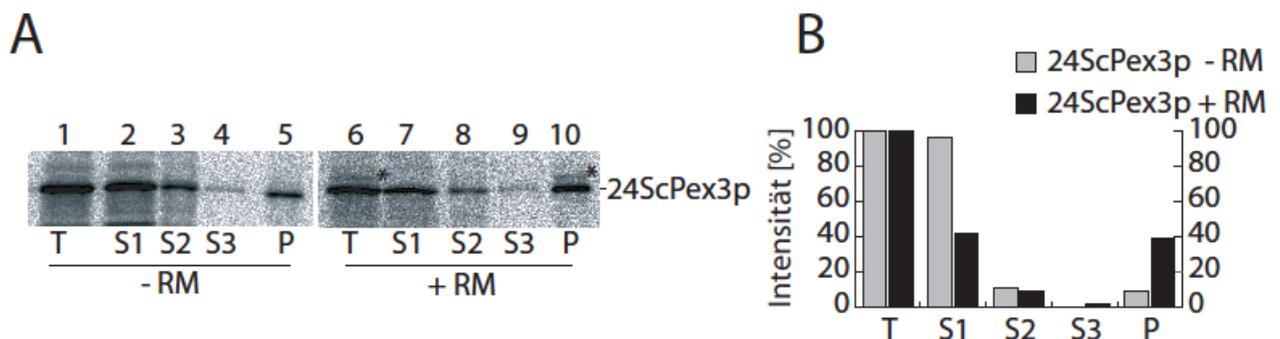


Abb. 3-3: 24ScPex3p wird genau wie ScPex3p in ER-Membranen integriert A) 24ScPex3p wurde *in vitro* synthetisiert. Zur besseren Sedimentation der Membranen wurden weitere Membranen zugegeben und zügig im Anschluß sedimentiert. Dann erfolgte zweimal eine Natriumcarbonatbehandlung und Membransedimentation. Die Überstände S2 und S3 wurden TCA gefällt. Alle Fraktionen wurden in SDS-Probenpuffer gelöst und auf einem Gradientengel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels Autoradiogramm. B) Die radioaktiven Signale wurden anteilig an T (100%) in einem Diagramm dargestellt.

Ausschließlich alkaliresistentes 24ScPex3p wurde glykosyliert, d.h. das glykosylierte 24ScPex3p ragt mit dem N-Terminus in das ER-Lumen und verhält sich gleichzeitig wie ein integrales Membranprotein (Abb. 3-3 A, Spur 10). Aber auch unglykosyliertes 24ScPex3p war alkaliresistent, das bedeutet, dass es möglicherweise integriert wurde, aber nicht erfolgreich glykosyliert. Zusammenfassend zeigen die bisherigen Daten, dass ScPex3p unter

den verwendeten Bedingungen *in vitro* in ER-Membranen integriert. Die Integration konnte mit unmodifiziertem ScPex3p nachgewiesen werden. Daneben konnte durch die Verwendung der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p sichergestellt werden, dass es sich hierbei tatsächlich um Integration in ER-Membranen handelte.

Als nächstes sollte unter gleichen Bedingungen die Integration des humanen PEX3 untersucht werden. Derzeit bestehen für HsPEX3 sehr widersprüchliche Angaben darüber, ob es in ER-Membranen integrieren kann. Um die Frage der ER-spezifischen Integration zu klären, sollten Glykosylierungsmutanten des HsPEX3 konstruiert werden. Glykosylierungsmutanten können die oben gestellte Frage beantworten, da bereits mit der Glykosylierungsmutante des Hefe-Pex3p gezeigt werden konnte, dass N-glykosyliertes Pex3p gleichzeitig auch integriert war. Auf der einen Seite sollte das Wildtypprotein des HsPEX3 bei der Konstruktion so wenig wie nötig modifiziert werden. Auf der anderen Seite bedarf es eines Mindestabstandes zwischen Membrananker und Glykosylierungsstelle zur erfolgreichen Glykosylierung. Die Oligosaccharyltransferase kann die Glykosylierungsstelle des integrierten Proteins eventuell nicht erreichen und glykosylieren, wenn der Abstand zu gering ist (Nilsson *et al.*, 1993).

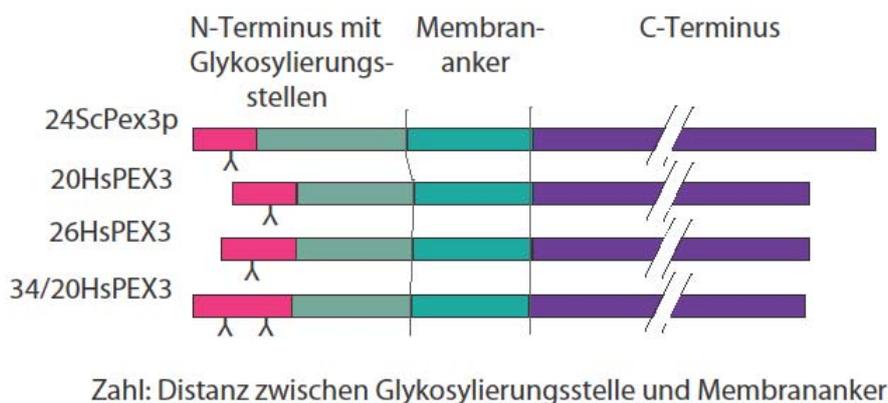


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der Glykosylierungsmutanten des ScPex3p und des HsPEX3. Bei 24ScPex3p beträgt der Abstand zwischen Glykosylierungsstelle und Beginn des Membranankers 24 aa. Für HsPEX3 wurden drei Glykosylierungsmutanten hergestellt. 20HsPEX3 besitzt einen Abstand von 20 Aminosäuren, bei 26HsPEX3 beträgt der Abstand 26 Aminosäuren und 34/20HsPEX3 besitzt zwei Glykosylierungsstellen mit den Abständen von 20 bzw. 34 Aminosäuren zum Membrananker. In hellgrün ist der N-Terminus des Wildtypproteins dargestellt. Die artifizielle Sequenz mit Glykosylierungsstelle ist rosa gezeichnet. Die C-Termini der Proteine (lila) sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Um möglichst beide Bedingungen einhalten zu können, wurden drei verschiedene Mutanten konstruiert. Die erste Mutante besaß einen Abstand von 20 Aminosäuren zwischen Membrananker und Glykosylierungsstelle (20HsPEX3). Bei der zweiten Mutante wurde der Abstand auf 26 Aminosäuren erhöht (26HsPEX3). Die dritte Mutante enthielt aufgrund von einer Verdopplung der angefügten Sequenz zwei Glykosylierungsstellen (34/20HsPEX3). Bei dieser Mutante betrug der Abstand zwischen Membrananker und der Stelle zur Glykosylierung 34 Aminosäuren bzw. 20 Aminosäuren (Überblick siehe Abb. 3-4). Die

Wahrscheinlichkeit, dass dieses Protein bei einer Integration auch glykosyliert wird, ist damit am größten.

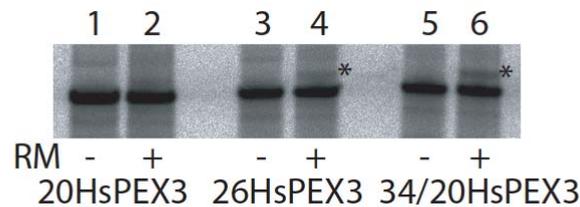


Abb. 3-5: Die Glykosylierungsmutanten des HsPEX3 werden nach der Integration glykosyliert
 Drei Mutanten des HsPEX3 mit unterschiedlichem Abstand zwischen Glykosylierungsstelle am N-Terminus und Membrananker wurden *in vitro* im Retikulozytenlysat unter Einbau von [³⁵S]-Methionin synthetisiert. Die Synthese fand teilweise in Anwesenheit von ER-Mikrosomen (RM) vom Hund statt. Die Proben wurden auf einem NuPAGE Gel aufgetrennt. Glykosylierte Proteine sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die drei Mutanten wurden im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von rauen ER-Membranen aus Hundepankreas und [³⁵S]-Methionin *in vitro* synthetisiert, anschliessend in SDS-Probenpuffer gelöst und auf einem NuPAGE Gel aufgetrennt. Von dem SDS-Gel wurde ein Autoradiogramm erstellt.

Überraschenderweise erreichten die N-Termini der HsPEX3-Glykosylierungsmutanten das ER-Lumen, dies ist bei 26HsPEX3 und 34/20HsPEX3 durch eine deutliche Glykosylierung zu erkennen (Abb. 3-5, Spur 4 und 6 *). Die Glykosylierungsbande des 20HsPEX3 war nur sehr schwach sichtbar (Spur 2) und die Mutante 34/20HsPEX3 wurde erkennbar nur einfach glykosyliert. Das lässt vermuten, dass ein Abstand von 20 Aminosäuren zwischen Membrananker und Glykosylierungsstelle in diesen Proteinen zu kurz zur effizienten Glykosylierung ist. Die Glykosylierungseffizienz nahm mit der Erhöhung des Abstands zwischen Membrananker und Glykosylierungsstelle zu. Die N-Glykosylierung der Mutanten wurde durch Deglykosylierung mittels Endoglykosidase bestätigt (nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ScPex3p und überraschenderweise auch HsPEX3 unter den gewählten Bedingungen *in vitro* in ER-Membranen integrieren.

3.1.1 Auch andere PMP integrieren *in vitro* in Mikrosomen

Um zu überprüfen, ob es sich um einen generellen Integrationsmechanismus handelt, soll die Integration weiterer PMP untersucht werden. Als Erstes wurde die Klasse II PMP ScPex22p ausgewählt. ScPex22p weist einen N-terminalen Membrananker auf und spielt eine Rolle beim Transport der Matrixproteine in die Peroxisomen.

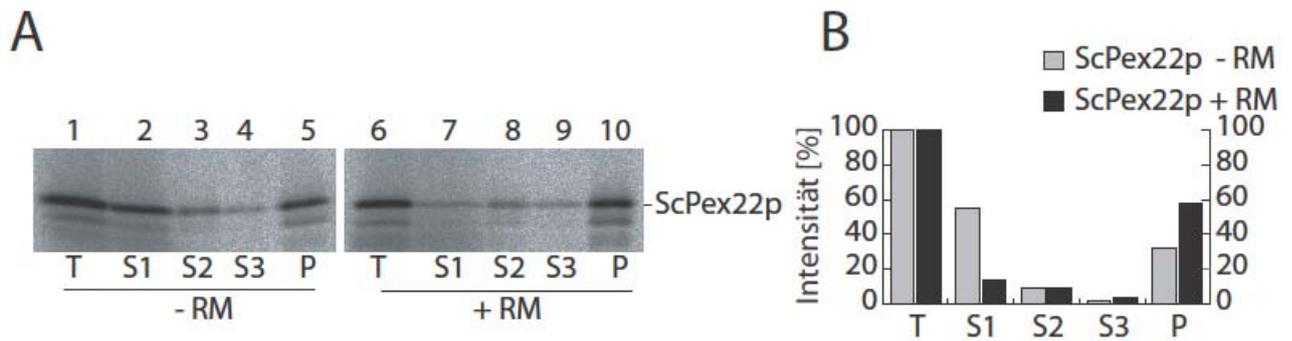


Abb. 3-6: Integration des ScPex22p *in vitro* **A)** Die mRNA des ScPex22p wurde *in vitro* in Anwesenheit (Spur 6) von Mikrosomen der Hefe translatiert. ScPex22p wurde durch Einbau von [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Anschliessend wurden Mikrosomen als Sedimentationshilfe zugefügt und die Ansätze zentrifugiert. Der entstandene Überstand (*supernatant* 1, S1) wurde verwahrt und das Pellet zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) behandelt. Nach jeder Behandlung wurde das Pellet weiter verwendet und der Überstand (S2, S3) zurückbehalten. Das finale Pellet (P) wurde mit dem Ausgang (T) und den drei Überständen auf einem Gradientengel aufgetrennt. Die Radioaktivität der Proteine wurde mittels *Phosphoimaging* analysiert. **B)** Das Autoradiogramm wurde quantifiziert, indem die Fraktion T auf 100 % gesetzt wurde und die anderen Werte anteilig daran berechnet wurden.

Die ScPex22-mRNA wurde im Retikulozytenlysat in Anwesenheit (+RM) von Mikrosomen der Hefe und radioaktivem Methionin translatiert. Anschliessend wurden “zusätzliche Mikrosomen” zugegeben, um die Sedimentation der Mikrosomen zu verbessern. Danach wurden die Mikrosomen sedimentiert und es wurden ein Membranpellet und der Überstand S1 erhalten. Das Membranpellet wurde mit 0,1 M Natriumcarbonat (pH 11,5) extrahiert und der Überstand S2 verwahrt. Durch eine weitere Alkalibehandlung und Ultrazentrifugation wurden der Überstand S3 und das finale Membranpellet P erhalten. Zur Kontrolle wurde die gesamte Prozedur auch für ScPex22p durchgeführt, das ohne Anwesenheit von Mikrosomen im Retikulozytenlysat synthetisiert wurde. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und davon ein Autoradiogramm erstellt. Die Signale auf dem Autoradiogramm wurden semiquantitativ ausgewertet und in Abb. 3-6 B prozentual zu T (100 %) dargestellt. Durch die Anwesenheit von Mikrosomen während der Translation wurde über die Hälfte des ScPex22p in den Membranen detektiert (ca. 60 %, Abb. 3-6 A; Spur 10). Aber auch in Abwesenheit von Mikrosomen synthetisiertes ScPex22p sedimentierte in größeren Mengen mit den Membranen (ca. 30 %, Abb. 3-6 A; Spur 5). Dennoch liegt ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Ansätzen vor, so dass man schlussfolgern kann, dass ScPex22p *in vitro* alkaliresistent in die Mikrosomen eingebaut wurde. Eine mögliche Erklärung für die hohen, alkaliresistenten ScPex22p-Signale wäre, dass ScPex22p in beiden Ansätzen in die *Tracer*-Membranen integrierte.

Die beiden bisher getesteten peroxisomalen Membranproteine Pex3p und ScPex22p besaßen mit einem N-terminalen Membrananker einen sehr ähnlichen Aufbau. Um die Allgemeingültigkeit der Integration in die Mikrosomen weiter zu prüfen, wurde ein peroxisomales Membranprotein mit abweichender Topologie ausgesucht. ScPex13p besitzt

zwei Transmembrandomänen, beide sind weit vom N-Terminus entfernt. Das zu untersuchende Protein ScPex13p ist ein Klasse I PMP und Teil des Translokationsapparates in der peroxisomalen Membran.

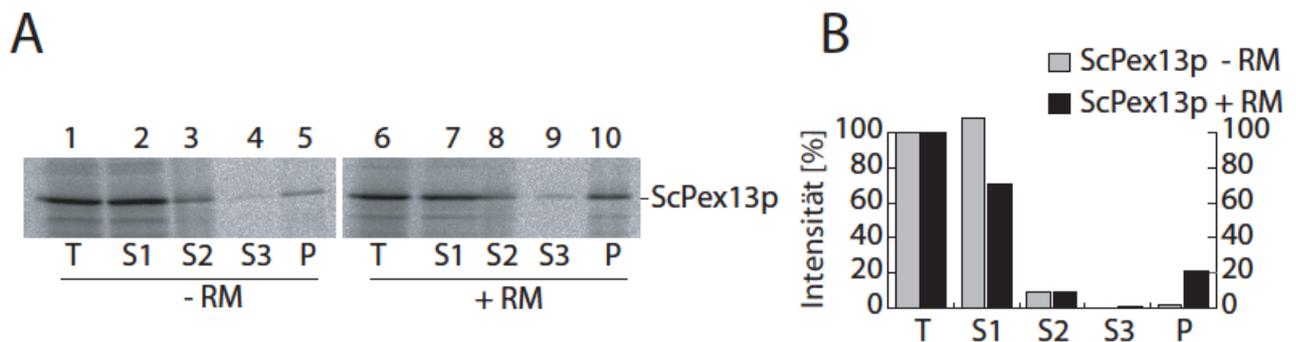


Abb. 3-7: ScPex13p integriert in Mikrosomen *in vitro* A) ScPex13p wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von Mikrosomen und [³⁵S]-Methionin synthetisiert. Anschliessend wurden *Tracer*-Membranen zugefügt und die Mikrosomen und die *Tracer*-Membranen durch Natriumcarbonatbehandlung extrahiert. Alle erhaltenen Fraktionen wurden in SDS-Probenpuffer resuspendiert und auf einem Gradientengel aufgetrennt. B) Die radioaktiven Signale von ScPex13p wurden quantifiziert und prozentual an T in einem Diagramm wiedergegeben.

Die *in vitro* Translation der mRNA des ScPex13p erfolgte im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von Hefemikrosomen und radioaktivem Methionin. Die darauf folgende Zugabe von *Tracer*-Membranen, Membransedimentation und Membranextraktion mittels Natriumcarbonat erfolgten wie in 3.1. ausführlich beschrieben. ScPex13p wurde zur Kontrolle in Abwesenheit von Mikrosomen synthetisiert und danach ebenfalls nach Zugabe von “zusätzlichen Mikrosomen” mit Natriumcarbonat behandelt. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gradientengel aufgetrennt und an einem *Phosphoimager* analysiert (Abb. 3-7 A). Die Abbildung 3-7 B zeigt die semiquantitativen, radioaktiven ScPex13p-Signale, die prozentual zu Ausgang T dargestellt wurden. In diesem Versuch wurden ca. 20 % ScPex13p alkaliresistent im Membranpellet detektiert (Abb. 3-7 Spur 10), während in der Kontrolle nur minimale Mengen mit den Mikrosomen detektiert wurden (Spur 5). Daraus folgt, dass interessanterweise auch ScPex13p *in vitro* in die Mikrosomen integrierte. Somit konnten peroxisomale Membranproteine mit unterschiedlichen Topologien *in vitro* alkaliresistent in Mikrosomen integrieren, was auf einen generellen Integrationsmechanismus für peroxisomale Membranproteine in die ER-Membran hindeutet.

3.2 MATRIXPROTEIN SCPEX8P TRANSLOZIERT *IN VITRO* NICHT IN ER-MEMBRANEN

Bisher wurde der indirekte Transportweg über das ER nur für Membranproteine und nicht für Matrixproteine postuliert. Eine Ausnahme stellt das Matrixprotein ScPex8p dar, denn van der Zand *et al.* (2010) zeigten *in vivo* eine ScPex8p-Mutante, die mit dem ER kolokalisierte bevor sie zu den Peroxisomen gelangte. Das Matrixprotein ScPex8p besitzt zwei peroxisomale Targetingsignale, kann aber auch ohne diese Signale zu den Peroxisomen gelangen.

Besonders interessant ist, dass ScPex8p dagegen jedoch keine Signalsequenz für einen Transport in das ER-Lumen besitzt. In dieser Arbeit soll deshalb geprüft werden, ob ScPex8p *in vitro* trotzdem unter den verwendeten Bedingungen in Mikrosomen translozieren kann.

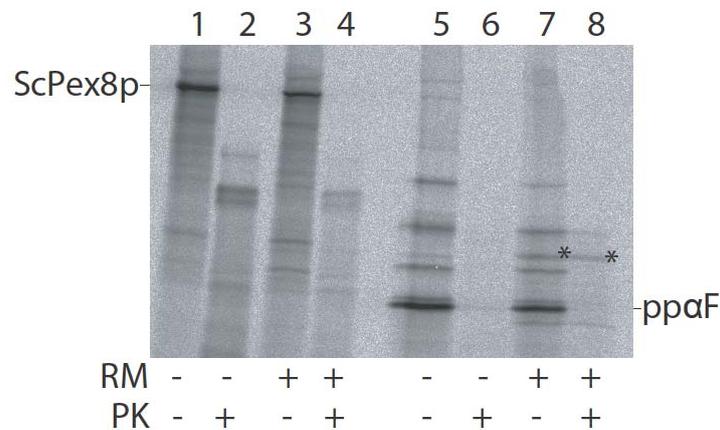


Abb. 3-8: ScPex8p ist nicht proteasegeschützt Die mRNA des ScPex8p und des sekretorischen Proteins präpro-alpha Faktor (ppαF) wurden *in vitro* translatiert und dabei die Proteine radioaktiv markiert. Ein Teil der Translation fand in Anwesenheit von ER-Mikrosomen statt (Spur 3 und 7). Von allen Ansätzen wurde die Hälfte mit 500 µg/ml Proteinase K (PK) verdaut, um eine Translokation durch Proteaseresistenz zu überprüfen. Die Proben wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt. Glykosylierter αF wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

ScPex8p wurde dafür in Anwesenheit (+RM) von Mikrosomen *in vitro* im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin synthetisiert. Danach wurde der Translationsansatz aufgeteilt, ein Teil wurde mit der Protease Proteinase K verdaut und der zweite Teil mit Proteasepuffer *mock* behandelt. Zur Kontrolle wurde die mRNA des sekretorischen Proteins präpro-alpha Faktor ebenfalls *in vitro* translatiert und der Ansatz auf gleiche Weise behandelt. Von beiden Proteinen wurden auch Ansätze ohne Mikrosomen mitgeführt. Der präpro-alpha Faktor wurde in Anwesenheit von Mikrosomen prozessiert und glykosyliert (Abb. 3-8, Spur 7 *). Die glykosylierte Form des pαF war zusätzlich, wie erwartet, vor dem Verdau durch Protease geschützt (Spur 8). Dieser Proteaseschutz kann nur beobachtet werden, wenn pαF zuvor in das Lumen transloziert wurde. Im Gegensatz dazu war ScPex8p nicht vor dem Verdau durch die Protease geschützt, lediglich ein unvollständiger Abbau durch die Protease ist zu beobachten (Abb. 3-8, Spur 2 und 4). ScPex8p wurde unter diesen *in vitro* Bedingungen also nicht in die Mikrosomen transloziert.

Für ScPex8p sollte untersucht werden, ob es trotzdem in Interaktion mit den Mikrosomen tritt, da ScPex8p als peripheres Membranprotein zumindest generell mit Membranen interagieren kann.

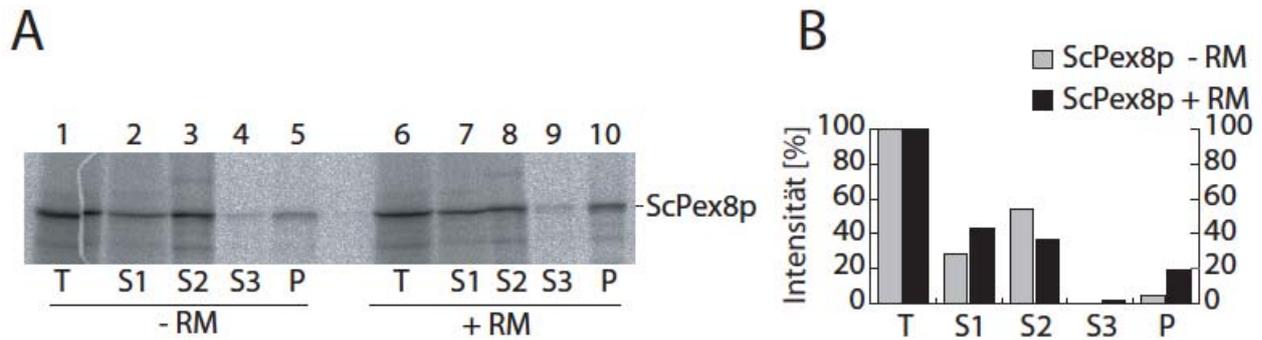


Abb. 3-9: Das Matrixprotein ScPex8p lagert sich teilweise alkaliresistent an die Mikrosomen an
A) ScPex8-mRNA wurde in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin und Mikrosomen im Retikulozytenlysat translatiert (Spur 6). Nach der Translation wurden *Tracer*-Membranen zur besseren Sedimentation zugefügt. Der Ansatz wurde zentrifugiert und dann wurde der Überstand abgetrennt (S1). Das Membranpellet wurde zweimal in 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) resuspendiert und anschliessend sedimentiert. Dadurch wurden die Überstände S2, S3 und das finale Pellet P erhalten. Die Proben wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde eine Translation der ScPex8-mRNA ohne Mikrosomen mitgeführt. **B)** Zur Darstellung der Proteinverteilung auf dem Autoradiogramm wurden die Ausgangssignale T auf 100 % gesetzt und die weiteren Werte prozentual zu T berechnet.

Die mRNA des ScPex8p wurde im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin und Mikrosomen (+RM) translatiert. Zur besseren Sedimentation der Mikrosomen wurden weitere Mikrosomen zu dem Ansatz dazu gegeben und die Membranen sedimentiert. Der unbehandelte Überstand S1 wurde vom Membranpellet abgetrennt. Das Membranpellet wurde anschliessend zweimal mit Natriumcarbonat behandelt und erneut sedimentiert, die dabei entstehenden Alkaliüberstände (S2, S3) und das finale Membranpellet P wurden verwahrt. Ein Kontrollansatz des synthetisierten ScPex8p ohne Mikrosomen wurde mitgeführt. Das finale Membranpellet (P) und alle weiteren Fraktionen wurden auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen. Die Proteinsignale wurden später auf dem Autoradiogramm quantifiziert. Um die Verteilung der Proteine bei unterschiedlichen Translationsmengen vergleichen zu können, wurden die Ausgangssignale (T) auf 100 % gesetzt und die anderen Fraktionen anteilig daran dargestellt (Abb. 3-9 B).

Überraschenderweise interagierte ScPex8p teilweise alkaliresistent mit den ER-Membranen (Abb. 3-9, Spur 10), d.h. ScPex8p verhielt sich teilweise wie ein integrales Membranprotein. Die Effizienz der Alkaliextraktion wurde überprüft und zeigte die erwartete Segregation von Kar2p und Sec61p (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Membranproteinen wurde eine größere Menge des ScPex8p durch Alkalibehandlung abgetrennt (Spur 8), was auf eine Interaktion mit den Membranen hindeutet. In Abb. 3-8 wurde gezeigt, dass ScPex8p nicht in die Mikrosomen hinein translozieren konnte. Die Ergebnisse lassen zusammen genommen auf eine Anlagerung des ScPex8p auf der zytosolischen Seite der Mikrosomen schliessen.

3.2.1 *Luziferase interagiert nicht alkaliresistent mit den Mikrosomen*

Um zu klären, ob auch andere Matrixproteine ein ähnliches Verhalten wie ScPex8p aufweisen, sollte ein weiteres Matrixprotein auf alkaliresistente Anlagerung an die

Mikrosomen untersucht werden. Dafür wurde das Protein Luziferase ausgewählt. Luziferase ist ein viel untersuchtes Matrixprotein der Peroxisomen. Es stammt aus Leuchtkäfern und katalysiert eine chemische Reaktion, bei der Licht entsteht. Luziferase besitzt ein PTS1 (*peroxisomal targeting signal 1*) am C-Terminus.

Auch die mRNA der Luziferase wurde im Retikulozytenlysat *in vitro* in Anwesenheit von Mikrosomen der Hefe (+RM) und radioaktivem Methionin translatiert. Zur besseren Sedimentation der Mikrosomen wurden anschliessend „zusätzliche Mikrosomen“ zugefügt (T). Danach wurden die Mikrosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert und vom Überstand S1 abgetrennt. Dann wurde das Mikrosomenpellet (P) durch zweimalige Natriumcarbonatbehandlung (pH 11,5) extrahiert (abgetrennte Überstände S2 und S3), genau wie in Kapitel 3.1. beschrieben. Die Verteilung der radioaktiven Proteinsignale wurde auf einem Autoradiogramm analysiert und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3-10 B).

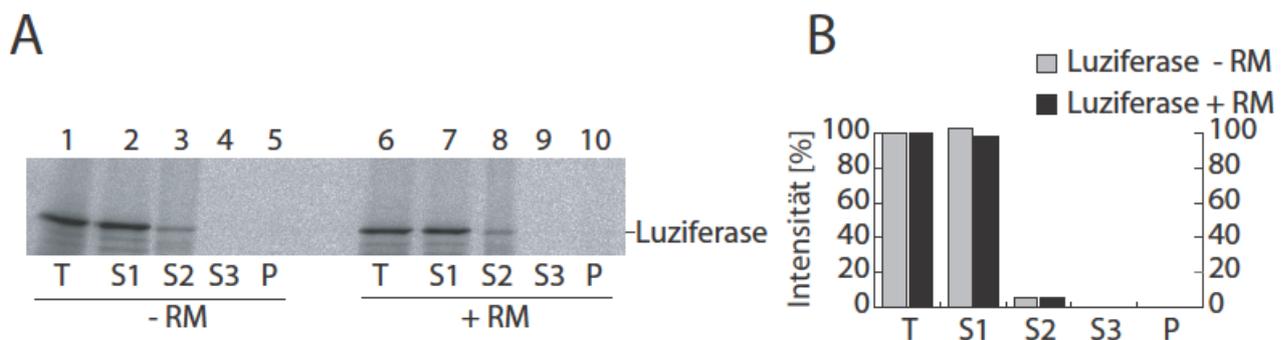


Abb. 3-10: Luziferase verhält sich nicht alkaliresistent. **A)** Das Protein Luziferase wurde in Anwesenheit (Spur 6) von Mikrosomen aus Hefe in Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin synthetisiert. Dann wurden *Tracer*-Membranen zugegeben und die Membranen sedimentiert. Danach wurden die Mikrosomen durch Natriumcarbonatbehandlung extrahiert. Diese Behandlung wurde zweimal durchgeführt. Nach jeder Zentrifugation wurden Überstände erhalten (S1, S2, S3) und am Ende ein finales Membranpellet (P). Ein Ansatz Luziferase ohne Mikrosomen wurde zur Kontrolle mitgeführt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf einem Gradientengel analysiert und **B)** das erhaltene Autoradiogramm quantifiziert, wobei die Ausgangssignale (T) des Proteins auf 100 % gesetzt wurden.

Die Luziferase zeigte keinen Unterschied in der Proteinverteilung zwischen der Kontrolle (Abb. 3-10, -RM) und dem Ansatz mit Mikrosomen (+RM). Es wurde keine Luziferase im Membranpellet (P) detektiert, was besagt, dass das Protein Luziferase sich nicht alkaliresistent verhielt im Gegensatz zu ScPex8p.

Zusammenfassend konnte für das Matrixprotein ScPex8p keine proteasegeschützte Translokation in Mikrosomen gezeigt werden, trotzdem wurde ein alkaliresistentes Verhalten des ScPex8p beobachtet. Diese Daten sprechen zusammengefasst für eine Anlagerung des ScPex8p an die zytosolische Seite der Mikrosomen. Für das Matrixprotein Luziferase wurde dagegen keine alkaliresistente Anlagerung an Mikrosomen *in vitro* nachgewiesen. Die Ergebnisse beider Matrixproteine sprechen gegen die Existenz eines indirekten Proteintransportweges von Matrixproteinen über das ER.

3.3 ALLE PMP KÖNNEN POSTTRANSLATIONAL INTEGRIEREN

In dieser Arbeit konnte für die peroxisomalen Membranproteine bisher Integration in ER-Membranen gezeigt werden. Mechanismen zur Integration können generell einen co- oder posttranslationalen Ablauf haben. Mit posttranslationaler Integration wird in dieser Arbeit eine translations- und ribosomenunabhängige Integration bezeichnet. Das bisher verwendete *in vitro*-System bietet die einzigartige Möglichkeit posttranslationale Integration isoliert betrachten zu können. Zunächst sollte dafür die Hemmung der Translation durch Cycloheximid getestet werden. Cycloheximid hemmt die Translation indem das Ribosom daran gehindert wird, auf der mRNA weitergleiten zu können. Zuerst wurde ein Ansatz aus Retikulozytenlysat und [³⁵S]-Methionin mit 1 mM Cycloheximid behandelt. Anschliessend wurde 34/20HsPEX3-mRNA zugefügt und der Ansatz zur *in vitro* Translation für 45 min bei 25 °C inkubiert. Parallel dazu wurde ein *mock*-behandelter Ansatz mitgeführt. Während in Abwesenheit von Cycloheximid das 34/20HsPEX3 synthetisiert wurde (Abb. 3-11 A, Spur 1), wurde die Translation durch 1 mM Cycloheximid vollständig inhibiert (Spur 2).

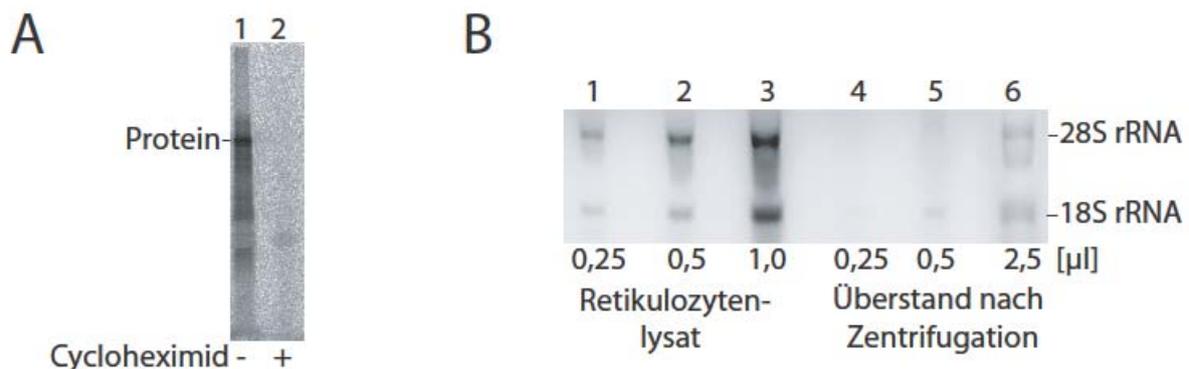


Abb. 3-11: Posttranslationale Bedingungen zur Charakterisierung der ER-Integration von peroxisomalen Membranproteinen **A) Hemmung der Translation durch Cycloheximid** Die mRNA des 34/20HsPEX3 wurde in Anwesenheit (Spur 2) und Abwesenheit (Spur 1) von 1 mM Cycloheximid (Translationshemmer) im Retikulozytenlysat-System translatiert. **B) Ribosomendepletion durch Ultrazentrifugation** Retikulozytenlysat wurde für 20 min bei 70.000 rpm ultrazentrifugiert (Optima, Rotor TLA100, 4 °C), danach wurde der Überstand zügig abgenommen und in Probenpuffer mit SDS (1-10 %) denaturiert. Unbehandeltes Retikulozytenlysat (Spur 1-3) und der Überstand nach Ultrazentrifugation (Spur 4-6) wurden in verschiedenen Konzentrationen auf ein Agarosegel aufgetragen und die rRNA mit Ethidiumbromid angefärbt.

Als Zweites wurde getestet, inwieweit die Ribosomen entfernt werden können. Dazu wurden die Ribosomen aus dem Retikulozytenlysat durch Ultrazentrifugation depletiert. Zur Auswertung des Ribosomengehaltes wurden das Retikulozytenlysat vor der Zentrifugation sowie der entstandene Überstand nach der Zentrifugation auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 3-11 B). Die ribosomale 18S und 28S rRNA wurden durch Ethidiumbromid angefärbt und die Signale mit der Software *AIDA Image Analyzer* quantifiziert. Die semiquantitative

Auswertung ergab, dass weniger als zehn Prozent der 18S rRNA und 28S rRNA nach der Zentrifugation im Überstand vorhanden waren, also mehr als 90 % der rRNA depletiert wurden. Eine umfangreiche Depletion von Ribosomen konnte damit erzielt werden.

Als Erstes sollte nun für ScPex3p überprüft werden, ob bei der Kombination der oben gezeigten Maßnahmen eine posttranslationale Integration in ER-Membranen möglich ist. Zunächst wurde ScPex3p in Abwesenheit von Mikrosomen im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin synthetisiert, dann wurde 1 mM Cycloheximid zugefügt und die Ribosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Der Überstand mit ScPex3p wurde zu Mikrosomen der Hefe gegeben und diese posttranslational miteinander inkubiert.

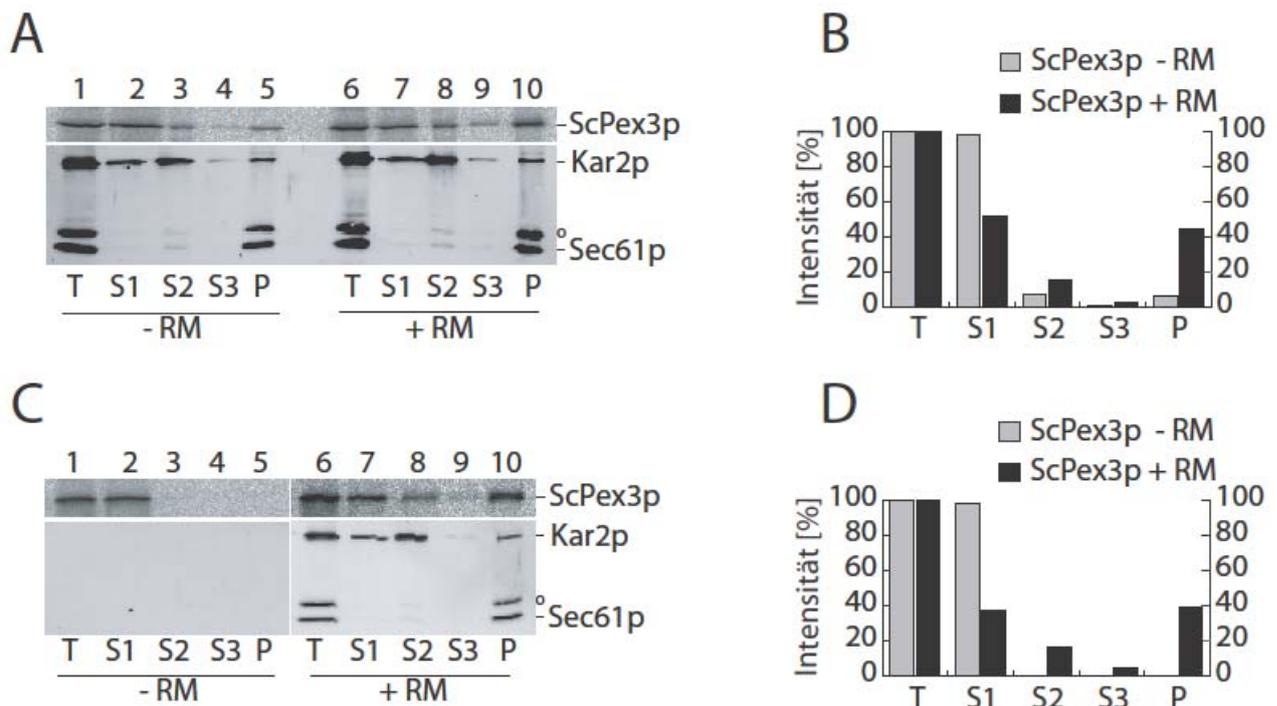


Abb. 3-12: Posttranslationale *in vitro* Integration des ScPex3p A) + C) Die ScPex3-mRNA wurde ausschließlich in Abwesenheit von Mikrosomen im Retikulozytenlysat unter Zugabe von [³⁵S]-Methionin translatiert. Anschliessend wurde die Translation durch 1 mM Cycloheximid und Depletion von Ribosomen durch Ultrazentrifugation gestoppt. Danach wurde ScPex3p mit Mikrosomen der Hefe bei 4 °C und dann bei 25 °C für je 20 min inkubiert. Den Proben von A) wurden weitere Mikrosomen als Sedimentationshilfe zugefügt, den Proben von C) nur Membranpuffer. Zügig danach wurden die Membranen sedimentiert. Lösliches ScPex3p im Überstand (S1) wurde vom Membranpellet abgetrennt. Das Pellet wurde dann zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) resuspendiert und erneut sedimentiert. Nach jeder Sedimentation wurden die Proben in Überstand (S2, S3) und Pellet aufgetrennt und das Pellet weiter verwendet. Die Proben wurden zur Analyse auf ein Gradientengel gegeben (obere Reihe) bzw. die Effizienz der Membranextraktion mittels Western Blot mit Antikörpern gegen das ER-Membranprotein Sec61p und das luminale ER-Protein Kar2p überprüft. Membranprotein Sec62-ProtA (°) wurde zusätzlich durch die sekundären Antikörper detektiert. B) + D) Die ScPex3p-Signale von den Autoradiogrammen der SDS-Gele aus A) und C) (obere Reihe) sind als prozentuale Intensitäten in den Diagrammen dargestellt. Die Signale der Fraktion T (*total fraction*) wurden auf 100 % gesetzt und die anderen Werte anteilig daran berechnet.

Da die Mikrosomen erst nach der Translation zugefügt wurden, konnte eine höhere Menge Mikrosomen eingesetzt werden, ohne dass eine Hemmung der Translation zu befürchten war. Die größere Menge an eingesetzten Mikrosomen führte dazu, dass der Einsatz von *Tracer-*

Membranen vermutlich überflüssig geworden war. Um diesen Tatbestand zu prüfen, wurde einmal auf *Tracer*-Membranen verzichtet (Abb. 3-12 C, T) und zur Kontrolle einmal „zusätzliche Mikrosomen“ (8,8 eq, Abb. 3-12 A, T) zugefügt. Vor der Alkalibehandlung wurden die Mikrosomen in beiden Ansätzen zunächst sedimentiert und der Überstand S1 von den Mikrosomen abgetrennt. Dann wurde das erhaltene Membranpellet mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) resuspendiert, für 20 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert. Erhalten wurden ein Überstand (S2) und ein Membranpellet. Dieses Membranpellet wurde erneut mit Natriumcarbonat behandelt und sedimentiert (Überstand S3 und Membranpellet P). Zur Kontrolle wurden Ansätze mit *in vitro* synthetisiertem ScPex3p ohne Zugabe von Mikrosomen zur posttranslationalen Integration mitgeführt. Alle Fraktionen wurden schliesslich auf Gradientengelen aufgetrennt. Zur Analyse wurden von den SDS-Gelen Autoradiogramme erstellt (Abb. 3-12 A und C, obere Spalte). Die radioaktiven ScPex3p-Signale wurden quantifiziert und als prozentuale Signale anteilig an T (100 %) dargestellt (Abb. 3-12 B und D).

Erneut konnte nahezu die Hälfte von ScPex3p im alkaliresistenten Membranpellet detektiert werden (44 %, Abb. 3-12 A, Spur 10), während ohne Mikrosomen nur ein geringer Teil ScPex3p mit den „zusätzlichen Mikrosomen“ sedimentierte (5 %, Abb. 3-12 A, Spur 5). Dies deutet überraschenderweise daraufhin, dass ScPex3p posttranslational in die Mikrosomen integrierte. Wurden keine *Tracer*-Membranen vor der Alkalibehandlung zugefügt, ergab sich das gleiche Ergebnis, ScPex3p scheint posttranslational in die Mikrosomen integriert worden zu sein (39 %, Abb. 3-12 C, Spur 10). Um dies schlussfolgern zu können, muss die Effizienz der Alkaliextraktion überprüft werden. Alle Fraktionen wurden dafür auf einem SDS-Gel aufgetrennt und dieses Gel für eine Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Sec61p und Kar2p verwendet (Abb. 3-12 A und C, untere Spalte). Es zeigte sich, dass die ER-Membranproteine Sec61p und Sec62p (°) während der Alkaliextraktion nahezu vollständig im Pellet verblieben. Ein Großteil von Kar2p wurde dagegen durch die Alkalibehandlung von den Membranen abgetrennt (Abb. 3-12 A und C, untere Spalte, Spur 7, 8 und 9). Eine erfolgreiche Alkaliextraktion wurde mit und ohne *Tracer*-Membranen beobachtet, damit zeigt sich, dass die *Tracer*-Membranen bei diesem posttranslationalen Integrationsversuch überflüssig waren. Die erfolgreiche Alkaliextraktion wiederum belegt, dass ScPex3p posttranslational in die Mikrosomen integrierte.

Mit der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p sollte weiterführend geprüft werden, ob die ER-spezifische Glykosylierung posttranslational stattfinden kann. Die mRNA des 24ScPex3p wurde dazu *in vitro* im Retikulozytenlysat mit radioaktivem Methionin translatiert und anschliessend die Translation mit 1 mM Cycloheximid inhibiert und die Ribosomen im Ansatz depletiert. Es wurden dann Hefemikrosomen zugefügt und das Ganze inkubiert. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde danach mit der Endoglykosidase Endo H behandelt und die andere Hälfte *mock* behandelt. Zur Kontrolle wurde der posttranslationale Integrationsassay mit 24ScPex3p auch ohne Mikrosomen durchgeführt. Die Proben wurden danach auf einem SDS-Gel aufgetrennt und am *Phosphoimager* analysiert.

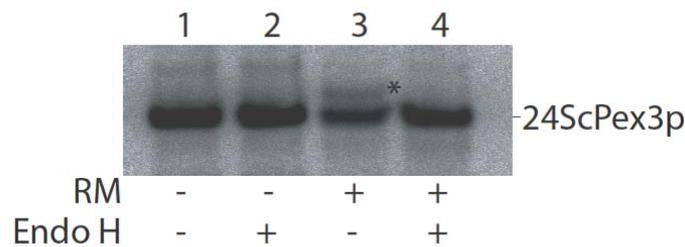


Abb. 3-13: Die ER-spezifische Glykosylierung des 24ScPex3p kann auch posttranslational erfolgen
 Die mRNA der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p wurde *in vitro* translatiert und das Protein durch [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Translation wurde anschliessend durch 1 mM Cycloheximid und Depletion der Ribosomen inhibiert. 24ScPex3p wurde nun mit Mikrosomen (BY4741) inkubiert. Dieser Ansatz wurde danach aufgeteilt und ein Teil mit Endoglykosidase (Endo H) und der andere Teil *mock* behandelt. Alle Proben wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt und davon ein Autoradiogramm erstellt. Die Bande des glykosylierten 24ScPex3p ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

24ScPex3p konnte posttranslational in ER-Membranen glykosyliert werden (Abb. 3-13, Spur 3*). Die N-Glykosylierung wurde durch Endo H-Behandlung entfernt und damit verifiziert. Bereits in Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass glykosyliertes 24ScPex3p gleichzeitig in die ER-Membranen integriert war (Abb. 3-3). Mit den hier erhaltenen Daten ist ScPex3p eines von wenigen Membranproteinen mit N-terminalem Membrananker, für das bisher eine posttranslationale Integration in ER-Membranen aus der Hefe gezeigt werden konnte.

Die Komponenten des Get-Weges im Säuger sind vollständig konserviert, während der Sec-Komplex für die posttranslationale Translokation sekretorischer Proteine im Säuger einen anderen Aufbau als der Sec-Komplex in der Hefe besitzt. Durch den veränderten Aufbau im Säuger könnte vermutet werden, dass gegebenenfalls andere Proteine als in der Hefe den Sec-Komplex nutzen. Deshalb sollte getestet werden, ob HsPEX3 auch im Säuger posttranslational integriert werden kann. Die mRNA des Wildtypproteins HsPEX3 wurde zunächst *in vitro* im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin translatiert, dann die Translation mit 1 mM Cycloheximid inhibiert und abschließend die Ribosomen durch Ultrazentrifugation entfernt. Dann wurden überwiegend aus rauem ER bestehende Mikrosomen aus dem Pankreas eines Schweins (*Sus scrofa*) hinzugegeben. Nach Abschluss der Inkubation wurde ein Anteil (T) abgenommen und für die spätere Gelelektrophorese verwahrt. Der Rest wurde zunächst einmal unbehandelt ultrazentrifugiert. Der Überstand S1 wurde abgenommen, während das Pellet mit 0,1 M Natriumcarbonat (pH 11,5) resuspendiert und nach der Inkubation erneut sedimentiert wurde. Diese Natriumcarbonatextraktion wurde insgesamt zweimal wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein weiterer Ansatz des HsPEX3 ohne Mikrosomen mitgeführt. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert. Die radioaktiven Signale von HsPEX3 wurden in einem Diagramm anteilig an Ausgang T dargestellt (Abb. 3-14 B).

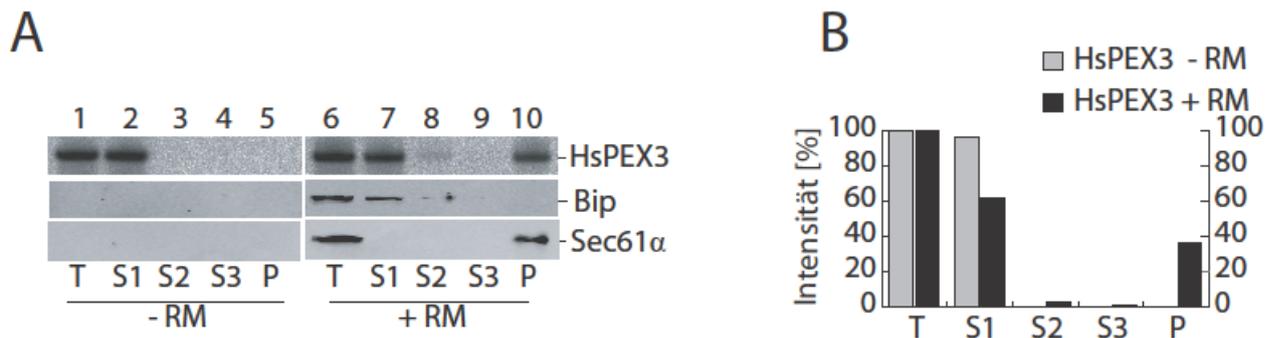


Abb. 3-14: HsPEX3 kann *in vitro* posttranslational in Mikrosomen integrieren **A)** Das humane Protein HsPEX3 wurde im Retikulozytenlysat-System mit radioaktivem Methionin synthetisiert und die Translation danach mit 1 mM Cycloheximid und Depletion der Ribosomen durch Ultrazentrifugation inhibiert. Nachfolgend wurde HsPEX3 mit Mikrosomen vom Schwein (+RM) inkubiert. Der Ansatz (T, *total fraction*; Spur 6) wurde danach ultrazentrifugiert, der Überstand (S1) verwahrt und das Membranpellet weiter behandelt. Die Behandlung erfolgte zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) und abschließender Sedimentation. Dadurch wurden zwei weitere Überstände (S2 und S3) und ein finales Membranpellet erhalten (P). Eine Kontrolle ohne Mikrosomen wurde gleich behandelt. Die Proben wurden auf zwei NuPAGE Gelen aufgetrennt. Das erste Gel wurde durch ein Autoradiogramm analysiert, mit dem zweiten Gel wurde die Effizienz der Membranextraktion mittels Western Blot mit Antikörpern gegen das Membranprotein Sec61α und das luminale BIP geprüft. **B)** Die Verteilung des HsPEX3 durch die Membranextraktion wurde in einem Diagramm dargestellt. Die Intensität der Proteinsignale auf dem Radiogramm wurde prozentual zu T (100 %) dargestellt.

Auch HsPEX3 konnte erstaunlicherweise posttranslational in Mikrosomen integrieren. Die Integration wird dadurch deutlich, dass ein hoher Anteil des HsPEX3 alkaliresistent im Membranpellet gefunden wurde (Abb. 3-14 A, Spur 10). Im Gegensatz dazu wurde kein HsPEX3 in Abwesenheit von Mikrosomen im Pellet detektiert (Abb. 3-14 A, Spur 5), sondern HsPEX3 nahezu vollständig im Überstand S1 gefunden (Abb. 3-14 A, Spur 2). Die Effizienz der Membranextraktion wurde mittels Western Blot mit Antikörpern gegen Sec61α und BIP (Homolog zu Kar2p) geprüft. Während Sec61α, als Membranprotein der ER-Membranen, nach der Alkalibehandlung wie erwartet nur im Pellet zu finden war, wurde BIP von den ER-Membranen abgetrennt. Es stellte sich heraus, dass die Membranextraktion erfolgreich war. Damit könnte HsPEX3 das erste Säugermembranprotein mit N-terminalem Membrananker sein, das posttranslational in ER-Membranen des Schweins integrieren kann. Um diese Aussage treffen zu können, sollte überprüft werden, ob die hier zum ersten Mal genutzten ER-Mikrosomen aus Schweinepankreas potentiell mit Peroxisomen oder peroxisomalen Membranen verunreinigt sind. Dazu wurden die ER-Mikrosomen vom Schwein mittels Western Blot und Antikörpern gegen das peroxisomale Matrixprotein Katalase und das peroxisomale Membranprotein PEX16 untersucht.

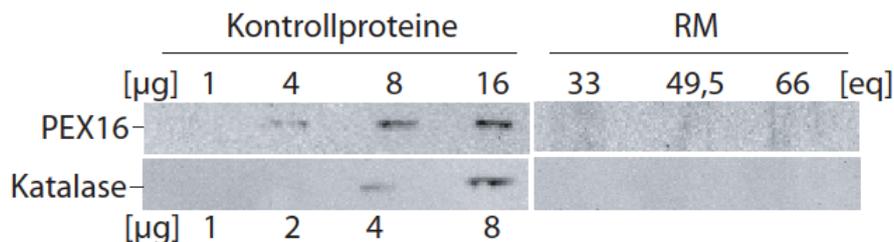


Abb. 3-15: Eine peroxisomale Kontamination der Mikrosomen vom Schwein ist nicht zu detektieren Unterschiedliche Mengen [eq] an Mikrosomen vom Schwein wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt und mittels Western Blot gegen Katalase und PEX16 analysiert. Katalase ist ein Protein aus der Matrix der Peroxisomen und PEX16 ein peroxisomales Membranprotein. Als Positivkontrolle für den Katalaseantikörper wurde Katalase vom Rind und für den Antikörper gegen HsPEX16 ein Fusionsprotein mit enthaltenem Peptid von HsPEX16 verwendet.

Die Nachweisgrenze der Antikörper wurde mit verschiedenen Mengen der Positivkontrollen auf einem Gradientengel ermittelt (Abb. 3-16). Für den Antikörper gegen Katalase wurde als Positivkontrolle Katalase vom Rind verwendet. Katalase gehört zu den mengenmäßig häufigsten Proteinen der reifen Peroxisomen, so dass auch kleinste Kontaminationen detektiert werden sollten. Für den Antikörper gegen PEX16 wurde ein Fusionsprotein benutzt (2.3.3). Das Fusionsprotein beinhaltet einen Teil der immunogenen Sequenz gegen die der HsPEX16-Antikörper gebildet wurde.

Beide Antikörper detektierten die Positivkontrollen erfolgreich. Während erstaunlicherweise keine Signale in den Mikrosomen nachgewiesen werden konnten, damit erfolgte die beobachtete Integration des Wildtyp-HsPEX3 höchstwahrscheinlich nicht in peroxisomale Membranen sondern in andere Membranen. Um abschliessend zu klären, ob es sich hierbei um ER-Membranen handelt, wurde die Glykosylierungsmutante 34/20HsPEX3 verwendet. Die mRNA des 34/20HsPEX3 wurde in Abwesenheit von Membranen im Retikulozytenlysat translatiert und das entstehende 34/20HsPEX3 durch Einbau von radioaktivem Methionin markiert. Dann wurde die Translation durch Cycloheximid inhibiert und die Ribosomen durch Ultrazentrifugation depletiert. 34/20HsPEX3 wurde posttranslational mit Mikrosomen aus dem Schweinepankreas inkubiert. Eine Hälfte davon wurde danach mit der Endoglykosidase Endo H behandelt, die andere Hälfte wurde *mock* behandelt. Als Kontrollproteine dienen Glykosylierungsmutanten der *tail-anchored* Proteine Cytochrom B5 (CytB5) und Sec22p. Alle Proteine wurden zur Kontrolle auch ohne Mikrosomen inkubiert und eine Hälfte der Ansätze mit Endo H behandelt.

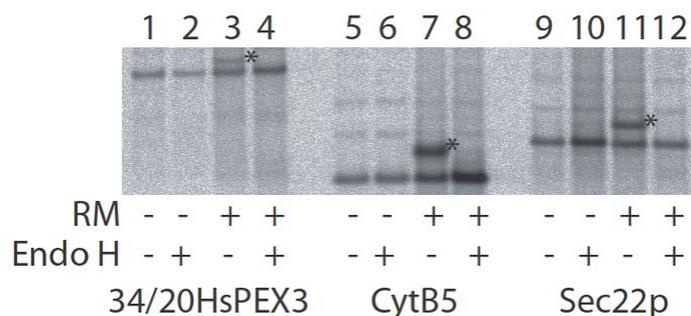


Abb. 3-16: Die posttranslationale Glykosylierung des 34/20HsPEX3 bestätigt die *in vitro* Integration spezifisch in die ER-Membranen. Die mRNA der Mutante 34/20HsPEX3 wurde *in vitro* translatiert. Die Translation fand in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin und in Abwesenheit von Mikrosomen statt. Danach wurde mit 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion durch Ultrazentrifugation die Translation inhibiert. 34/20HsPEX3 wurde zur Integration zusammen mit Mikrosomen vom Schwein inkubiert (+RM). Der Ansatz wurde anschliessend aufgeteilt und eine Hälfte mit der Endoglykosidase Endo H und die andere Hälfte *mock* behandelt. Zur Kontrolle wurden Glykosylierungsmutanten der *tail-anchored* Proteine Cytochrom B5 (CytB5) und Sec22p sowie Ansätze aller synthetisierten Proteine ohne Mikrosomen mitgeführt. Alle Proben wurden auf einem NuPAGE Gel aufgetrennt und davon ein Autoradiogramm erstellt. Glykosylierte Proteine sind mit einem Stern (*) markiert.

Neben der erwarteten Glykosylierung der beiden Kontrollproteine wurde auch 34/20HsPEX3 posttranslational in Anwesenheit von Schweinemikrosomen glykosyliert (Abb. 3-15, Spur 3, 7 und 11 *). Alle drei N-glykosylierten Proteine wurden unter Zugabe von Endo H erfolgreich deglykosyliert (Spur 4, 8 und 12). Die Glykosylierung des 34/20HsPEX3 zeigt, dass der N-Terminus des 34/20HsPEX3 in diesem Versuch posttranslational in die ER-Membranen gelangte. Für glykosyliertes 34/20HsPEX3 wurde weitergehend beobachtet, dass es genau wie 24ScPex3p (Abb. 3-3) alkaliresistent in Mikrosomen integrierte (Daten nicht gezeigt). Damit kann zusammengefasst werden, dass die posttranslationale Integration des HsPEX3 spezifisch in die ER-Membranen erfolgte.

Um die Frage beantworten zu können, ob die peroxisomalen Membranproteine ScPex22p und ScPex13p möglicherweise über einen anderen oder den gleichen Integrationsablauf wie ScPex3p in die Mikrosomen integrieren, wurden auch ScPex22p und ScPex13p auf die Fähigkeit zur posttranslationalen Integration untersucht. Dazu wurden die Proteine zunächst *in vitro* im Retikulozytenlysat mit radioaktivem Methionin synthetisiert. Dann wurden die Ansätze mit 1 mM Cycloheximid behandelt und die Ribosomen durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Die erhaltenen Überstände wurden danach mit Mikrosomen inkubiert und anschliessend die Mikrosomen wie zuvor durch eine Alkaliextraktion (siehe 2.9) mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert.

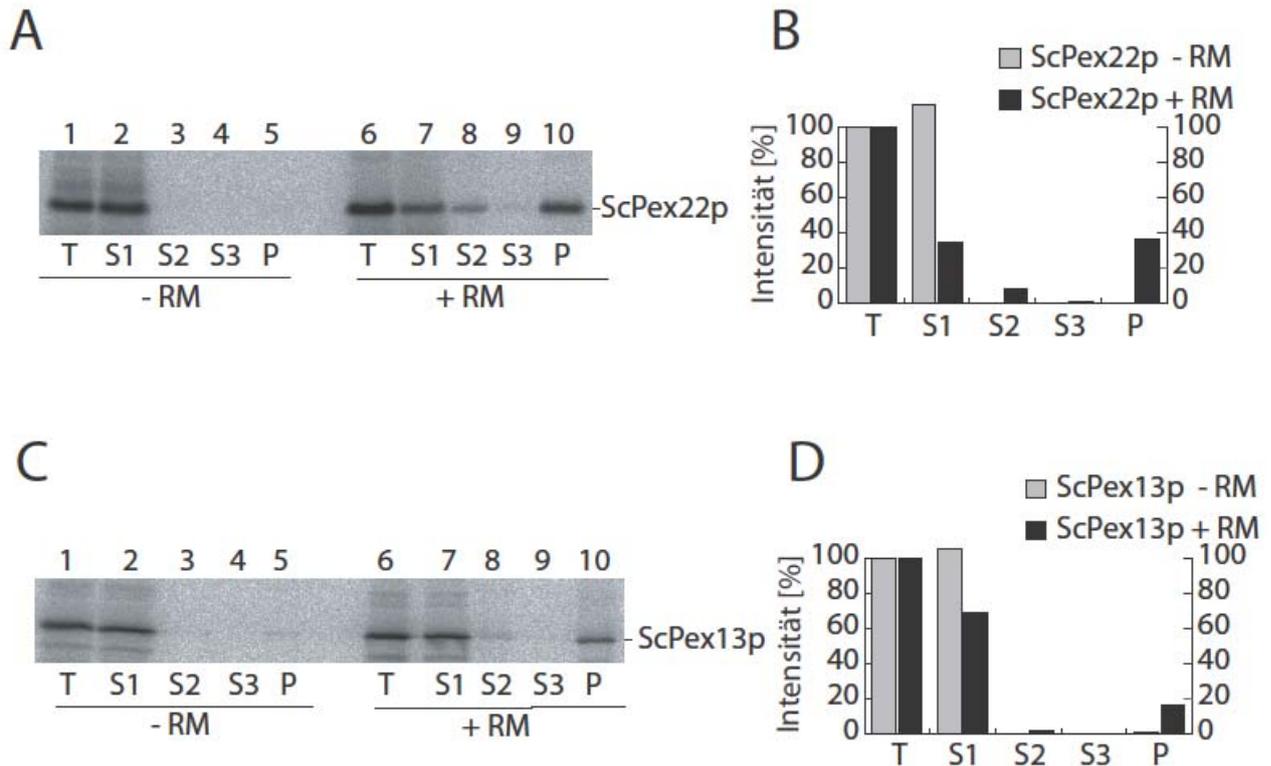


Abb. 3-17: Posttranslationale Integration von ScPex22p und ScPex13p in Mikrosomen A) + C) Die mRNA des ScPex22p (A) und des ScPex13p (B) wurden *in vitro* translatiert, die Translationen mit Cycloheximid gestoppt und die Ribosomen depletiert. Dann wurden beide Proteine mit Mikrosomen der Hefe versetzt und inkubiert. Anschliessend wurden die Mikrosomen sedimentiert und der Überstand S1 abgenommen. Das Pellet wurde zweifach mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert (2.9). Für beide Proteine wurden auch Ansätze ohne Mikrosomen mitgeführt. Die Fraktionen wurden abschliessend auf Gradientengelen aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert. B) + D) Die radioaktiven Proteinsignale des ScPex22p und des ScPex13p wurden anteilig an Ausgang T in Diagrammen dargestellt.

Zur Kontrolle wurden parallel dazu ScPex22p- und ScPex13p-Ansätze ohne Mikrosomen behandelt. Die Fraktionen wurden auf Gradientengelen aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert. Die semiquantitative Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte mit der Software *AIDA Image Analyzer* und die Werte wurden danach anteilig an T (*total fraction*) in Diagrammen dargestellt (Abb. 3-17 B und D).

Nach posttranslationaler Gabe von Mikrosomen war ein deutlicher Teil des ScPex22p alkaliresistent, während ohne Mikrosomen kein ScPex22p im Pellet gefunden wurde (Abb. 3-17 A, Spur 5 und 10). Dieses Ergebnis zeigt, dass ScPex22p posttranslational in Hefemikrosomen integrieren konnte. Das gleiche Verhalten wurde erstaunlicherweise auch für ScPex13p beobachtet (Abb. 3-17 C, Spur 5 und 10), bei posttranslationaler Mikrosomengabe verhielt sich das Protein ScPex13p *in vitro* teilweise alkaliresistent, was auf eine posttranslationale Integration des ScPex13p in die Mikrosomen schliessen lässt. Für ScPex3p wurde ER-spezifische Integration in die Mikrosomen nachgewiesen (Abb. 3-2 und 3-3), das lässt vermuten, dass in diesem Versuch ScPex22p und ScPex13p auch in ER-Membranen integrierten.

Zusammenfassend konnten alle getesteten peroxisomalen Membranproteine, unabhängig aus welcher Spezies, posttranslational in Mikrosomen integrieren. Mit den Glykosylierungsmutanten von ScPex3p und HsPEX3 wurde die ER-Spezifität der posttranslationalen Integration durch N-Glykosylierung bestätigt. Mit den gezeigten Daten konnte eine erste Beschreibung des Integrationsablaufes der peroxisomalen Membranproteine in die ER-Membran getätigt werden.

3.4 DIE POSTTRANSLATIONALE INTEGRATION DES PEX3P IST ERKENNBAR ENERGIEABHÄNGIG

Die Umstände der posttranslationalen Integration der PMP in die ER-Membran sollten weiter charakterisiert werden. Die meisten gesteuerten Integrationswege in die ER-Membran finden in Abhängigkeit von Energie statt. Hierbei sind energieverbrauchende Proteine beteiligt. Als nächstes sollte deshalb die Energieabhängigkeit der posttranslationalen Integration des ScPex3p getestet werden. Die mRNA des ScPex3p wurde in Abwesenheit von Mikrosomen im Retikulozytenlysat translatiert und das entstehende ScPex3p durch Einbau von [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Danach wurde die Translation durch 1 mM Cycloheximid inhibiert und die Ribosomen depletiert. Dann wurden ScPex3p und die Mikrosomen getrennt voneinander mit Hexokinase und Glukose inkubiert. Hexokinase phosphoryliert Hexosen am C6-Atom, z.B. Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Das Phosphat dafür wird von ATP abgespalten, so dass ADP entsteht. Dies sollte dazu führen, dass schon vor Beginn der Integration ATP-depletierte Bedingungen vorlagen. Das ScPex3p wurde mit 0,04 U/μl Hexokinase behandelt und die Mikrosomen mit 0,09 U/eq. Dann wurden die beiden behandelten Ansätze zusammengegeben.

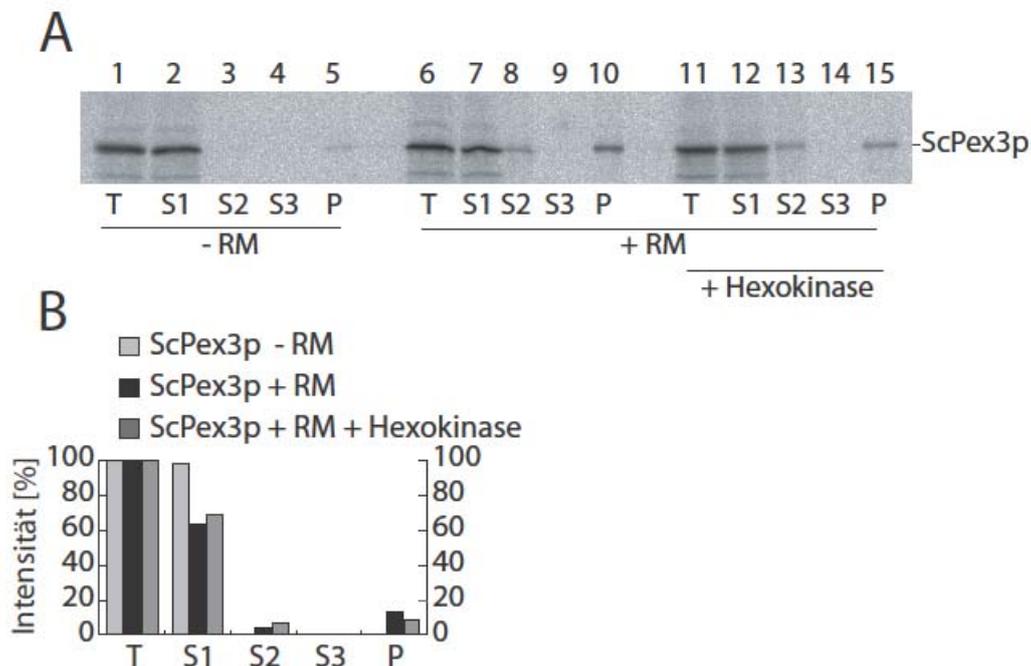


Abb. 3-18: Die posttranslationale Integration des ScPex3p ist energieabhängig A) ScPex3p wurde im Retikulozytenlysat mit radioaktivem Methionin synthetisiert. Nach Inhibition der Translation durch 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion durch Ultrazentrifugation wurde ScPex3p mit 0,04 U/μl Hexokinase behandelt. Parallel dazu wurden Mikrosomen mit 0,09 U/eq Hexokinase inkubiert. Dann wurden beide Ansätze zur Integration zusammengegeben. Danach wurde eine Probe davon abgenommen (*total fraction*, T), der Ansatz wurde sedimentiert und dann der Überstand abgetrennt (*supernatant*, S1). Anschliessend wurde das Membranpellet zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) extrahiert, daraus ergaben sich zwei weitere Überstände (S2, S3) und das finale Membranpellet (P). Auch ScPex3p ohne Mikrosomen und ein *mock*-behandelter Integrationsansatz wurden zur Kontrolle mitgeführt. Alle Fraktionen wurden auf einem

Gradientengel aufgetrennt und die radioaktiven Proteinsignale mit einem Autoradiogramm visualisiert. **B)** Die Signale des Autoradiogramms wurden mit der Software AIDA von Licor quantifiziert und die Intensität der Signale prozentual zu T (100 %) im Diagramm dargestellt.

Nach posttranslationaler Inkubation wurden die Mikrosomen sedimentiert und der Überstand S1 abgetrennt. Danach wurde das erhaltene Membranpellet zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) behandelt und erneut sedimentiert. Daraus ergaben sich zwei weitere Überstände (S2 und S3) sowie das finale Membranpellet P. Zur Kontrolle wurden *mock*-behandeltes ScPex3p und *mock*-behandelte Mikrosomen zusammengefügt sowie ScPex3p ohne Mikrosomen mitgeführt. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und davon ein Autoradiogramm erstellt. Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung sind prozentual an Ausgang T dargestellt (*total fraction*, 100 %; Abb. 3-18 B).

Unter ATP-depletierten Bedingungen wurde erstaunlicherweise prozentual weniger ScPex3p in die Mikrosomen integriert als ohne ATP-Depletion (Abb. 3-18, Spur 10 und 15). Gleichzeitig wurde mehr ScPex3p im Überstand S1 detektiert (Spur 7 und 12). Damit wird deutlich, dass die posttranslationale Integration des ScPex3p abhängig von Energie ist. Inwieweit durch die eingesetzte Menge an Hexokinase die ATP-Menge im System vollständig depletiert wurde, wurde nicht überprüft. Fest steht jedoch, dass bei geringeren ATP-Mengen die posttranslationale Integration des ScPex3p vermindert wurde. Um sicher zu gehen, dass die beobachtete, energieabhängige Integration ER-spezifisch war, sollte die posttranslationale Glykosylierung des 24ScPex3p auf Energieabhängigkeit getestet werden.

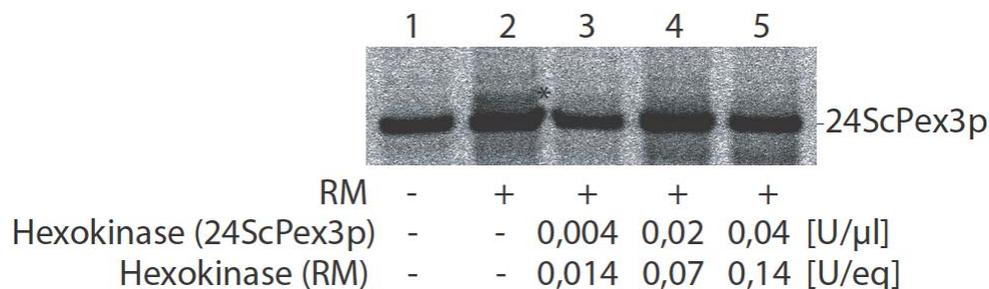


Abb. 3-19: Die posttranslationale Glykosylierung des 24ScPex3p erfolgt energieabhängig Die mRNA der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p wurde im Retikulozytenlysat translatiert und danach die Translation durch Behandlung mit 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion vollständig inhibiert. 24ScPex3p wurde dann mit unterschiedlichen Mengen Hexokinase inkubiert (0,04 U/μl; 0,02 U/μl und 0,004 U/μl). Gleichzeitig wurden ER-Mikrosomen mit ebenfalls drei unterschiedlichen Konzentrationen Hexokinase behandelt (0,14 U/eq; 0,07 U/eq und 0,014 U/eq). Dann wurden die mit der niedrigsten Menge an Hexokinase behandelten Mikrosomen und 24ScPex3p zusammengegeben. Auch mit den anderen Hexokinasekonzentrationen behandeltes 24ScPex3p und Mikrosomen wurden entsprechend kombiniert. Nach der Inkubation wurden die Proben gefällt und auf einem Gradientengel analysiert. Der Stern (*) kennzeichnet die glykosylierte Form von 24ScPex3p.

24ScPex3p wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin synthetisiert. Anschliessend wurde 24ScPex3p mit unterschiedlichen Konzentrationen Hexokinase inkubiert. Es wurden 0,04 U/μl, 0,02 U/μl und 0,004 U/μl Hexokinase eingesetzt. Parallel

dazu wurden Hefemikrosomen mit den Konzentrationen 0,14 U/eq, 0,07 U/eq bzw. 0,014 U/eq Hexokinase behandelt. Dann wurden jeweils 24ScPex3p und Mikrosomen mit den geringsten Konzentrationen Hexokinase zusammengegeben. Auch die anderen Ansätze wurden dementsprechend kombiniert. Integrationsansätze ohne Mikrosomen und mit *mock*-behandelten Mikrosomen wurden mitgeführt. Die Proben wurden danach in SDS-Probenpuffer gelöst und auf einem Gradientengel aufgetrennt.

Nachdem 24ScPex3p in Anwesenheit von Mikrosomen glykosyliert wurde (Abb. 3-19, Spur 2), war bereits mit der geringsten Konzentration Hexokinase kaum noch glykosyliertes 24ScPex3p zu sehen (Spur 3). Durch Behandlung mit der höchsten Konzentration an Hexokinase (0,04 U/μl Hexokinase im Retikulozytenlysat und Mikrosomen behandelt mit 0,14 U/eq Hexokinase) konnte kein 24ScPex3p mehr glykosyliert werden (Spur 5). Die ER-spezifische Glykosylierung des 24ScPex3p ging unter ATP-depletierten Bedingungen vollständig zurück. In Kapitel 3.1, Abb. 3-3 wurde belegt, dass glykosyliertes 24ScPex3p gleichzeitig alkaliresistent in den ER-Membranen integriert war. Dadurch ergibt sich für diesen Versuch in Kombination mit der vorherigen Beobachtung (Abb. 3-18; Rückgang der alkaliresistenten Integration von ScPex3p *in vitro* unter ATP-depletierten Bedingungen), dass die *in vitro* Integration des ScPex3p in ER-Membranen ATP benötigt.

Generell ist die posttranslationale Integration von Membranproteinen in die ER-Membran des Säugers bisher sehr wenig untersucht, deshalb sollte die Energieabhängigkeit der posttranslationalen Integration des HsPEX3 untersucht werden. Die Untersuchung erfolgt aber auch, um den Ablauf der Integration des HsPEX3 im Säugersystem weiter charakterisieren zu können. Dazu wurde die HsPEX3-mRNA *in vitro* im Retikulozytenlysat mit radioaktivem Methionin translatiert und die Translation anschliessend durch Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Dann wurde der Ansatz mit synthetisiertem HsPEX3 mit 0,04 U/μl Hexokinase behandelt, während die Schweinemikrosomen mit 0,16 U/eq Hexokinase inkubiert wurden.

Das ATP-depletierte HsPEX3 und die Mikrosomen wurden zur translationsunabhängigen Integration zusammengegeben. Danach wurden die Proben zunächst ultrazentrifugiert und der Überstand S1 abgetrennt. Dann wurde eine zweifache Alkaliextraktion mit 0,1 M Natriumcarbonat durchgeführt (2.9). Als Kontrolle wurde *mock*-behandeltes HsPEX3 mit *mock*-behandelten Mikrosomen zusammengegeben. Als zweite Kontrolle wurde HsPEX3 ohne Mikrosomen mitgeführt. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, quantifiziert und als prozentuale Intensitäten zu T dargestellt (Abb. 3-20).

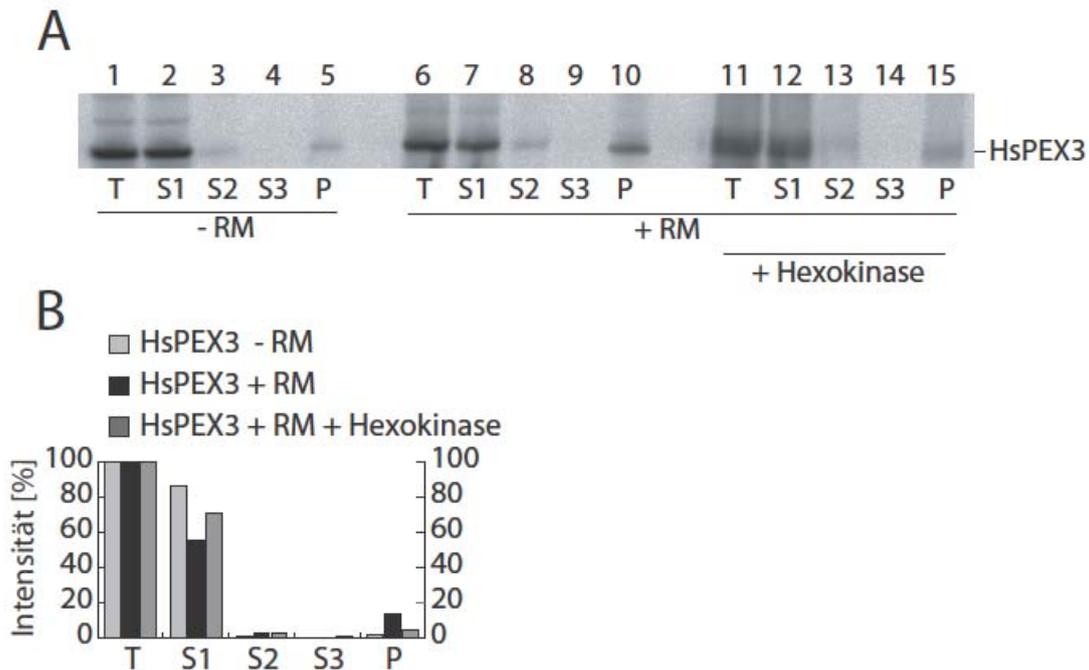


Abb. 3-20: Die posttranslationale Integration des HsPEX3 ist energieabhängig **A)** Die mRNA des HsPEX3 wurde im Retikulozytenlysat unter Einbau von radioaktivem Methionin translatiert. Zur Untersuchung der posttranslationalen Integration wurde zunächst die Translation durch 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion durch Zentrifugation gestoppt. Um die Energieabhängigkeit der Integration zu testen, wurden zunächst HsPEX3 und die Mikrosomen vom Schwein mit Hexokinase (Hexo) behandelt und dann zusammengegeben. Von dem Ansatz wurde zunächst ein Teil abgenommen (T, *total fraction*) und der Rest ultrazentrifugiert. Das Membranpellet wurde vom Überstand (S1) abgetrennt und zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) extrahiert. Dabei wurden zwei Alkaliüberstände (S2, S3) und ein finales Pellet (P) gewonnen. Außerdem wurde HsPEX3 (*mock*-behandelt) einerseits ohne Mikrosomen (-RM) und andererseits mit *mock*-behandelten Mikrosomen (+RM) mitgeführt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf einem NuPAGE Gel aufgetrennt. **B)** Die Signale auf dem Autoradiogramm des SDS-Gels wurden quantifiziert und anteilig an T (100 %) dargestellt.

Die Integration des HsPEX3 wurde durch ATP-Depletion verhindert, da durch die Behandlung mit Hexokinase kaum noch integriertes HsPEX3 sichtbar war (Abb. 3-20, Spur 15). Gleichzeitig wurde wie erwartet anteilig mehr HsPEX3 im Überstand S1 detektiert (Spur 12). Die posttranslationale Integration des HsPEX3 in Schweinemikrosomen war somit energieabhängig. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass ein ähnlicher Integrationsmechanismus wie bei der ScPEX3p-Integration genutzt werden könnte.

Mit dem 34/20HsPEX3-Konstrukt wurde weiterführend getestet, ob die energieabhängige, posttranslationale Glykosylierung ER-spezifisch erfolgte. Die Synthese des 34/20HsPEX3 und die Translationsinhibition wurden wie zuvor mit dem HsPEX3-Konstrukt durchgeführt. Dann wurden je drei unterschiedliche Konzentrationen Hexokinase verwendet. Das synthetisierte 34/20HsPEX3 wurde mit 0,04 U/ μ l, 0,02 U/ μ l bzw. 0,004 U/ μ l Hexokinase versetzt, während den Schweinemikrosomen 0,16 U/eq, 0,08 U/eq bzw. 0,016 U/eq Hexokinase zugefügt wurde. Dann wurde mit der größten Menge Hexokinase (0,04 U/ μ l) behandeltes 34/20HsPEX3 und mit 0,16 U/eq Hexokinase behandelte Mikrosomen zusammengegeben und auch die anderen Ansätze dementsprechend kombiniert und inkubiert.

Mock-behandeltes 34/20HsPEX3 wurde zur Kontrolle auch ohne Mikrosomen und mit *mock*-behandelten Mikrosomen mitgeführt. Anschliessend wurden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert.

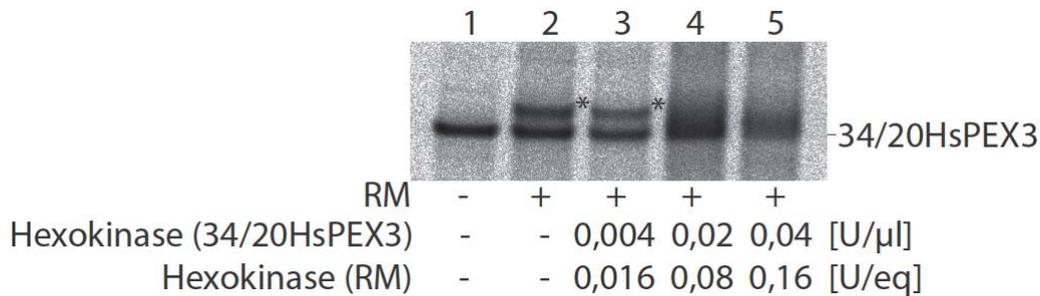


Abb. 3-21: 34/20HsPEX3 wird posttranslational in Anwesenheit von ER-Mikrosomen energieabhängig glykosyliert Die mRNA des 34/29HsPEX3 wurde translatiert und dann die Translation inhibiert. Die Hexokinasebehandlung erfolgte wie zuvor bei HsPEX3, nur dass drei verschiedene Konzentrationen verwendet wurden. 34/20HsPEX3 wurde mit 0,04 U/μl; 0,02 U/μl bzw. 0,004 U/μl Hexokinase behandelt und die Mikrosomen mit 0,16 U/eq; 0,08 U/eq bzw. 0,016 U/eq Hexokinase. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem NuPAGE-Gel aufgetrennt.

Durch posttranslationale Gabe von *mock*-behandelten Schweinemembranen wurde 34/20HsPEX3 deutlich glykosyliert (Abb. 3-21, Spur 2). Der Anteil an glykosyliertem 34/20HsPEX3 nahm mit steigender Menge Hexokinase ab, was zeigt, dass die posttranslationale Glykosylierung des 34/20HsPEX3 energieabhängig war. Durch Einsatz der größten Menge an Hexokinase (0,04 U/μl Hexokinase im Retikulozytenlysat und Mikrosomen behandelt mit 0,16 U/eq Hexokinase) wurde die Glykosylierung des 34/20HsPEX3 sogar vollständig inhibiert (Spur 5). Wie zuvor bereits erwähnt, war glykosyliertes 34/20HsPEX3 gleichzeitig in die ER-Membranen integriert, genau wie auch für glykosyliertes 24ScPex3p beobachtet worden war (Abb. 3-3). In Kombination mit den bereits bekannten Ergebnissen zeigt das jetzige Resultat, dass die ER-spezifische Integration des 34/20HsPEX3 energieabhängig ist.

Das peroxisomale Membranprotein ScPex22p weist den gleichen Aufbau wie ScPex3p auf, auch hier sollte die Energieabhängigkeit der posttranslationalen Integration des ScPex22p unter Einfluss der gleichen Konzentration an Hexokinase untersucht werden. Die mRNA des ScPex22p wurde im Retikulozytenlysat unter Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin translatiert. Anschliessend wurde die weitere Translation durch Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Ein Teil des ScPex22p wurde mit 0,04 U/μl Hexokinase inkubiert, während Mikrosomen mit 0,09 U/eq Hexokinase versetzt wurden. ScPex22p und Mikrosomen wurden anschliessend zur Integration zusammengegeben. Danach wurden die Mikrosomen sedimentiert und der Überstand abgetrennt (S1). Das Membranpellet wurde mit 0,1 M Natriumcarbonat behandelt, erneut sedimentiert und der Überstand abgenommen (S2). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt und der Überstand S3 sowie das Membranpellet P

erhalten. Zur Kontrolle wurden einerseits *mock*-behandelte Mikrosomen zu ScPex22p gegeben und andererseits ScPex22p ohne Mikrosomen inkubiert. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und danach quantifiziert (Abb. 3-22 B).

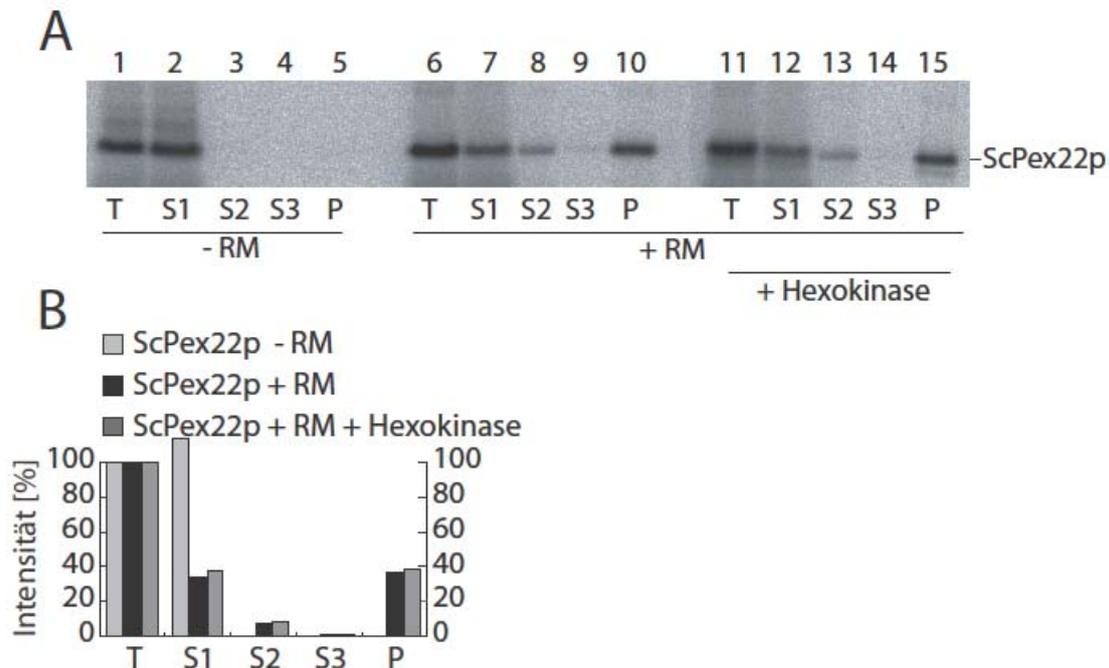


Abb. 3-22: Die posttranslationale Integration des ScPex22p wurde durch ATP-Depletion nicht beeinflusst A) ScPex22p wurde zunächst *in vitro* im Retikulozytenlysat synthetisiert, weitere Translation wurde durch Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Dann wurde ScPex22p mit 0,04 U/ μ l Hexokinase inkubiert, parallel dazu erfolgte die Inkubation von Mikrosomen mit 0,09 U/eq Hexokinase. Anschliessend wurden beide Ansätze zusammengegeben. Nach der Inkubation (T, *total fraction*) wurde der Ansatz zunächst sedimentiert und der Überstand verwahrt (S1). Das erhaltene Membranpellet wurde einer zweifachen Alkaliextraktion unterzogen (2.9). *Mock*-behandeltes ScPex22p wurde auch ohne Mikrosomen und mit *mock*-behandelten Mikrosomen mitgeführt. Alle Fraktionen wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt und B) das Autoradiogramm des Gradientengels quantifiziert und in einem Diagramm dargestellt. Dazu wurde die Intensität der Ausgangsfraction T auf 100 % gesetzt und die anderen Fraktionen prozentual dazu dargestellt.

Der Einsatz der Hexokinase verminderte die Integrationsrate des ScPex22p überraschenderweise nicht. Ca. 40 % des ScPex22p wurde in die ER-Membranen integriert, unabhängig davon, ob ATP durch Hexokinasebehandlung depletiert wurde oder keine Depletion durchgeführt worden war (Abb. 3-22 A, Spur 10 und 15). Der Bedarf an Energie zur posttranslationalen Integration variiert zwischen ScPex3p und ScPex22p, denn die Effizienz der ScPex22p-Integration wurde unter gleichen ATP-depletierten Bedingungen nicht beeinflusst. Dies deutet daraufhin, dass die an der posttranslationalen Integration des ScPex3p beteiligten, energieabhängigen Proteine in geringerem Umfang oder möglicherweise gar nicht an der ScPex22p-Integration beteiligt sind.

ScPex13p besitzt zwei hydrophobe Transmembrandomänen, deren Integrationskompetenz im wässrigen Zytosol erhalten bleiben muss, um posttranslational in die ER-Membran integrieren

zu können. Zu guter Letzt sollte deshalb für ScPex13p untersucht werden, ob die posttranslationale Integration energieabhängig ist. Zunächst wurde dafür der Einfluss der Hexokinase auf die alkaliresistente Integration getestet. ScPex13p wurde im Retikulozytenlysat mit radioaktivem Methionin synthetisiert und danach die Translation durch Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Dann wurden für ScPex13p und Hefemikrosomen die gleichen Konzentrationen an Hexokinase wie zuvor bei ScPex3p und ScPex22p verwendet und die anschließende Behandlung des kombinierten Ansatzes mit zweifacher Alkaliextraktion gleichermaßen durchgeführt (2.9). Zur Kontrolle wurde ScPex13p auch ohne Mikrosomen und mit *mock*-behandelten Mikrosomen mitgeführt. Alle Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteinsignale wurden quantifiziert und als prozentuale Intensitäten bezogen auf T (100 %) in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3-23 B).

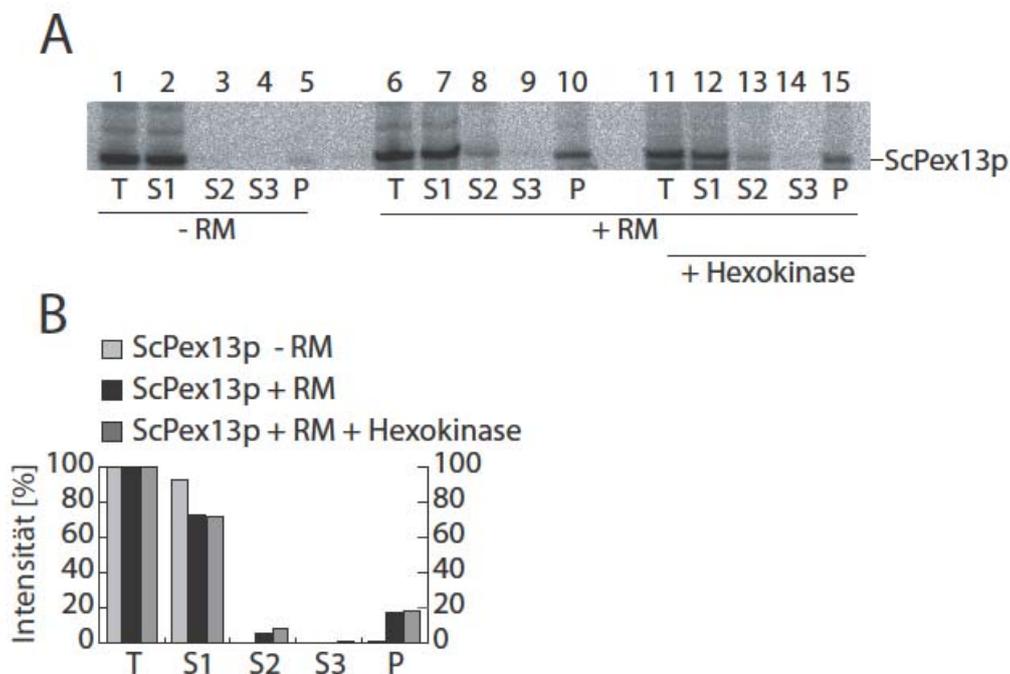


Abb. 3-23: Die posttranslationale Integration des ScPex13p wurde durch ATP-Depletion nicht beeinflusst **A)** ScPex13p wurde zunächst im Retikulozytenlysat synthetisiert und dann die *in vitro* Translation durch Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. ScPex13p wurde danach mit 0,04 U/ μ l Hexokinase inkubiert. Zeitgleich wurden ER-Mikrosomen mit 0,09 U/eq Hexokinase zur ATP-Depletion inkubiert. Anschliessend wurde ScPex13p mit den Mikrosomen zusammengefügt. Nach der Integration wurden die Mikrosomen sedimentiert und ein erster Überstand (S1) abgenommen. Es folgte eine zweifache Alkaliextraktion (2.9), wobei zwei weitere Überstände (S2, S3) und ein finales Membranpellet (P) erhalten wurden. Zum Vergleich wurde *mock*-behandeltes ScPex13p ohne Mikrosomen und ScPex13p mit *mock*-behandelten Membranen mitgeführt. Alle Fraktionen wurden zur Analyse auf ein Gradientengel aufgetragen. **B)** Das entstandene Autoradiogramm wurde quantifiziert und die Daten in einem Diagramm dargestellt. Der Ausgang T (*total fraction*) wurde dazu jeweils auf 100 % gesetzt und die anderen Fraktionen anteilig daran dargestellt.

Hierbei konnte jedoch erstaunlicherweise kein Einfluss auf die Integration des ScPex13p beobachtet werden, genau wie zuvor bei ScPex22p. Unter ATP-depletierten Bedingungen

wurde prozentual genau soviel ScPex13p alkaliresistent im Pellet detektiert wie in *mock*-behandelte Mikrosomen integrierte (Abb. 3-23, Spur 10 und 15).

Um die Energieabhängigkeit der Integration mit einer weiteren, unabhängigen Methode zu testen, wurde Apyrase verwendet. Apyrase ist eine ATP-Diphosphatase, die die Dephosphorylierung von ATP und anderen NTP (Nukleosidtriphosphate) zu Nukleosidmonophosphaten und freiem Phosphat katalysiert. Apyrase verwendet ausschließlich Nukleosidphosphate als Substrat, so dass eine gezieltere Depletion als bei Hexokinase möglich sein sollte. Die Proteine ScPex13p, ScPex22p und 24ScPex3p wurden mit 0,1 U/ μ l Apyrase behandelt und die Hefemikrosomen mit 0,19 U/eq Apyrase. Auch dieser zweite, unabhängige Versuch zeigte jedoch keine deutliche Energieabhängigkeit der alkaliresistenten, posttranslationalen Integration von ScPex13p und ScPex22p in Hefemembranen. Im Gegensatz dazu wurde erneut beobachtet, dass die Glykosylierung von 24ScPex3p durch ATP-Depletion zurückging (Daten nicht gezeigt). Somit konnte auch mit dem Einsatz der Apyrase kein Nachweis erbracht werden, dass die posttranslationale Integration von ScPex13p und ScPex22p energieabhängig ist. Der Test bestätigte aber, dass die ER-Integration von ScPex3p unter gleichen Bedingungen beeinflusst wurde.

Zusammenfassend konnte für die Pex3-Konstrukte aus Hefe und Säuger gezeigt werden, dass die posttranslationale Integration spezifisch in die ER-Membranen energieabhängig ist. Dies spricht für eine Beteiligung von energieverbrauchenden Proteinen an der posttranslationalen Integration in die ER-Membran. Im Gegensatz dazu konnte für ScPex22p und ScPex13p unter gleichen Bedingungen überraschenderweise keine Energieabhängigkeit der posttranslationalen *in vitro* Integration beobachtet werden. Dadurch lässt sich ableiten, dass die posttranslationale Integration des ScPex22p und des ScPex13p *in vitro* entweder energieunabhängig ist oder zumindest unter gleichen Bedingungen weniger Energie benötigt als die Integration des ScPex3p.

3.5 DIE POSTTRANSLATIONALE INTEGRATION IST SEC61P-ABHÄNGIG UND NICHT ABHÄNGIG VON GET1P UND GET2P

Als nächstes sollte untersucht werden, welche ER-Membranproteine an der Integration von peroxisomalen Membranproteinen beteiligt sein könnten. Für sekretorische Proteine ist bekannt, dass sie energieabhängig und posttranslational durch den heptameren Sec-Komplex in das ER-Lumen der Hefe transloziert werden. Sec61p besitzt in diesem Komplex eine zentrale Rolle und ist gleichzeitig essentiell für das Überleben der Hefe. Um Hinweise darüber zu erhalten, ob die Integration des 24ScPex3p Sec61p-abhängig sein könnte, wurde die Hefe YTX66 (*sec61-2*) verwendet. YTX66 besitzt eine Punktmutation im SEC61-Gen (G213D). Diese Punktmutation führt zu einem temperatursensitiven *knockdown* von Sec61p, d.h. das Protein wird unter restriktiven Bedingungen sehr schnell abgebaut (Vashist und Ng, 2001). Unter permissiven Bedingungen findet der Abbau dagegen wesentlich langsamer statt und Sec61p ist dabei vollständig funktionsfähig. Es wurden drei verschiedene Mikrosomen-Präparationen von der Hefe YTX66 erstellt (2.15.1.1). Die erste Präparation erfolgte von einer Flüssigkultur zum Zeitpunkt T=0 („T0“). Danach wurde die Kultur aufgeteilt und ein Teil inkubierte bei der permissiven Temperatur von 30 °C („30 °C“) und der andere Teil der Kultur inkubierte bei der restriktiven Temperatur von 37 °C („37 °C“) für 270 min. Danach wurden die ER-reichen Mikrosomen präpariert (2.15.1.1). Mittels Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Sec61p wurde der Sec61p-Gehalt der ER-Mikrosomen ermittelt. Der Sec61p-Gehalt der ER-Mikrosomen „T0“ wurde auf 100 % gesetzt. Im Vergleich dazu besaßen die ER-Mikrosomen „30 °C“ 75 % an Sec61p bei gleichen eq-Mengen und die *knockdown*-Mikrosomen „37 °C“ lediglich 20 % Sec61p. Diese drei Mikrosomenpräparationen wurden im posttranslationalen Integrationsassay mit 24ScPex3p verwendet.

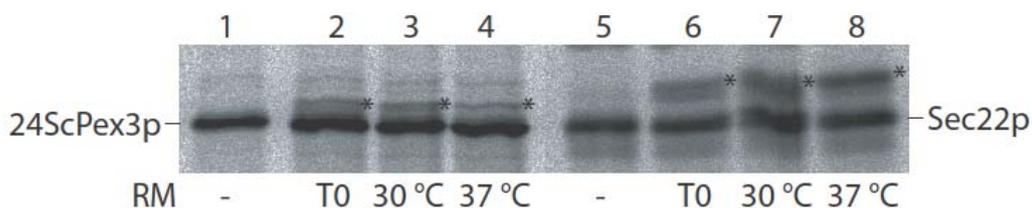


Abb. 3-24: Die Integration des 24ScPex3p ist Sec61p-abhängig Aus der Hefe YTX66 (*sec61-2*) mit einem temperatursensitiven *knockdown* von Sec61p wurden ER-Mikrosomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten präpariert. Ein Teil der Hefe wurde zum Zeitpunkt T0 präpariert, danach wurde die Kultur geteilt und ein Teil bei 30 °C und der andere Teil bei restriktiven 37 °C für weitere 270 min inkubiert und anschließend präpariert. Der Sec61p-Gehalt der ER-Mikrosomen sank auf 75 % („30 °C“) bzw. 20 % („37 °C“) des Ausgangswertes („T0“). Die mRNA des 24ScPex3p wurde *in vitro* translatiert und die Translation durch Cycloheximid und Ribosomendepletion unterbunden. Dann wurde 24ScPex3p für 12 min bei 4 °C und nochmal 10 min bei 25 °C mit den ER-Mikrosomen inkubiert (je 0,5 eq). Das *tail-anchored* Protein Sec22p wurde zur Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Proben auf einem Gradientengel aufgetrennt und analysiert. Glykosylierte Proteine sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die 24ScPex3-mRNA wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat unter Einbau von radioaktivem Methionin translatiert und anschliessend die Translation mittels 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Dann wurde der 24ScPex3p-Ansatz aufgeteilt und mit den drei unterschiedlichen YTX66-Mikrosomen (T0, 30 °C, 37 °C; je 0,5 eq) für 12 min bei 4 °C und anschliessend für 10 min bei 25 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Get-abhängige *tail-anchored* Protein Sec22p und ein Ansatz des 24ScPex3p ohne Mikrosomen mitgeführt. Die Ansätze wurden abschliessend in 400 µl Verdünnungspuffer ultrazentrifugiert (TLA 100.3, Optima, 10 min, 70.000 rpm, 4 °C) und die erhaltenen Pellets in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proteine wurden dann auf einem Gradientengel aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert.

Während die Glykosylierung des Sec22p nicht von der Sec61p-Depletion vermindert wurde (Abb. 3-24, Spur 8), sank die Glykosylierungseffizienz des 24ScPex3p überraschenderweise durch die Depletion von Sec61p (Abb. 3-24, Spur 4). Die anteilige Glykosylierung des 24ScPex3p ging um ein Drittel zurück, während bei Sec22p die anteilige Glykosylierung sogar zunahm. Vergleicht man zusätzlich die anteilige Glykosylierungsrate des 24ScPex3p durch T0-Mikrosomen und 30 °C-Mikrosomen (Spur 2 und 3) so ist bereits hier ein geringer Rückgang zu beobachten, der auf eine Sec61p-Depletion zurückgeführt werden könnte. In einem vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass glykosyliertes 24ScPex3p auch gleichzeitig eingebaut war (Abb. 3-3) und damit die Glykosylierung dem Einbau gleichgesetzt werden kann. Daraus ergibt sich, dass die Integration des 24ScPex3p Sec61p-abhängig zurück ging und 24ScPex3p vermutlich durch den Sec-Komplex in die ER-Membran integriert wird.

Bisher wurde energieabhängige, posttranslationale Integration von Membranproteinen lediglich im Get-Weg beschrieben. Deshalb sollte zusätzlich die Frage geklärt werden, ob posttranslationale 24ScPex3p-Integration auch abhängig von Proteinen des Get-Weges stattfinden kann. Um die Beteiligung der Get-Proteine an der Integration des 24ScPex3p zu untersuchen, wurden ER-Mikrosomen von Hefen verwendet, die keinerlei Kopien einzelner Get-Komponenten aufweisen. Ausgehend von der Ursprungshefe BY4741 war eine Doppelmutante mit *knockout* der Gene GET1 und GET2 (Δ get1,2) und eine weitere Mutante mit *knockout* des Gens GET3 (Δ get3) durch Schuldiner *et al.* (2008) generiert worden. Get1p und Get2p sind membranständige Proteine des Get-Weges, während Get3p ein zytosolisches Protein ist. Alle drei Hefen wurden unter gleichen Bedingungen angezogen und die ER-Mikrosomen aus kleinem Volumen mittels differentieller Ultrazentrifugation präpariert (2.15.1).

24ScPex3p wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin synthetisiert, dann mit Cycloheximid die Translation inhibiert und die Ribosomen depletiert. Darauffolgend wurde je ein Teil des 24ScPex3-Ansatzes mit den Wildtyp-Membranen (WT) und den beiden *knockout*-Membranen inkubiert. Danach wurden die Ansätze erneut aufgeteilt, ein Teil wurde mit der Endoglykosidase Endo H und der zweite Teil *mock* behandelt. Als Kontrollprotein wurde Sec22p verwendet (Abb. 3-25, Spur 9-16). Sec22p ist ein *tail-anchored* Protein, das

abhängig von Get1p, Get2p und Get3p posttranslational in die ER-Membran integriert. Alle Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert.

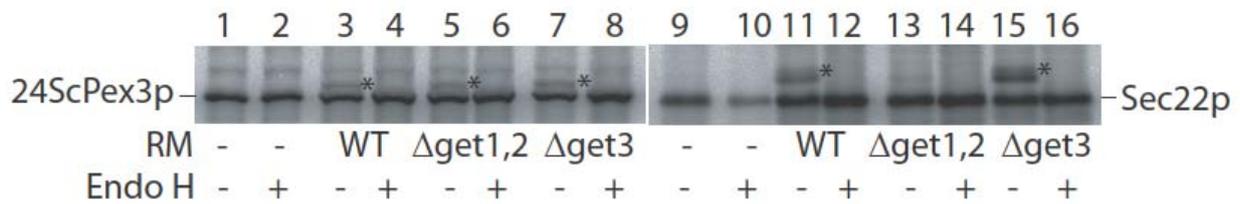


Abb. 3-25: Die Integration des 24ScPex3p ist nicht Get1p- und Get2p-abhängig Die Glykosylierungsmutante 24ScPex3p wurde *in vitro* im Retikulozytenlysatsystem unter Einbau von radioaktivem Methionin synthetisiert. Die Translation wurde durch 1 mM Cycloheximid und durch Ribosomendepletion durch Ultrazentrifugation gestoppt. 24ScPex3p wurde anschliessend posttranslational mit unterschiedlichen Mikrosomen inkubiert. Die Mikrosomen aus Δ get1,2-Hefe enthielten kein Get1p und Get2p und die Δ get3-Mikrosomen kein Get3p im Gegensatz zu den Mikrosomen der Ursprungshefe (WT). Abschliessend wurden die Ansätze aufgeteilt und eine Hälfte der Proteine mit einer Endoglykosidase (Endo H) behandelt. Die Proben wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt. Das Get-abhängige *tail-anchored* Protein Sec22p wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Einfachglykosylierung von 24ScPex3p und die Zweifachglykosylierung von Sec22p wurden mit einem Stern gekennzeichnet (*).

24ScPex3p wurde posttranslational in ER-Membranen glykosyliert, die kein Get1p und Get2p enthielten (Abb. 3-25 Spur 5). Auch in ER-Membranen ohne Get3p konnte 24ScPex3p integrieren (Spur 7). Die Glykosylierung des 24ScPex3p wurde jeweils mit Endoglykosidase-Behandlung verifiziert (Spur 4, 6 und 8). Sec22p konnte dagegen nicht erkennbar in Membranen ohne Get1p und Get2p integrieren (Spur 13). Damit wird belegt, dass die posttranslationale Integration des 24ScPex3p nicht abhängig von Get1p und Get2p war im Gegensatz zu der Integration von Sec22p. Unerwartet war, dass Sec22p genau wie 24ScPex3p in Δ get3-Membranen glykosyliert wurde (Spur 15). In dem für die Translation verwendeten Retikulozytenlysatsystem war höchstwahrscheinlich TRC40 vorhanden. TRC40 ist das homologe Protein des Get3p in Säugetieren und kann die Funktion des Get3p vollständig substituieren (persönliche Nachricht von Prof. Stephen High).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass 24ScPex3p unabhängig von Get1p und Get2p posttranslational in ER-Membranen integrieren kann (Spur 5). Ob an der Integration des 24ScPex3p Get3p beteiligt ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Wie bei Sec22p beobachtet, könnte der GET3 *knockout* durch TRC40 substituiert werden. Im Gegensatz zur Sec22p-Integration wurde jedoch die posttranslationale Integration des 24ScPex3p durch Sec61p-Depletion vermindert. Hiermit konnte die posttranslationale Integration des 24ScPex3p weiterführend als Sec61p-abhängig charakterisiert werden.

3.6 DIE ER-INTEGRATION DES PEX3P IST EVOLUTIONÄR KONSERVIERT

In den bereits gezeigten Versuchen schien die posttranslationale und energieabhängige Integration von ScPex3p und HsPEX3 in Hefe- bzw. Säugermikrosomen sehr ähnlich. Es sollte deshalb weitergehend untersucht werden, ob die Integrationsabläufe soweit konserviert sind, dass sie durch Komponenten der jeweils anderen Mikrosomen durchgeführt werden könnten. Zunächst sollte untersucht werden, ob das evolutionär „höhere“ humane PEX3 auch in vermeintlich „einfachere“ Mikrosomen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) posttranslational und energieabhängig integrieren kann. Für die HsPEX3-Integration sowohl in die Peroxisomenmembran (Matsuzaki und Fujiki, 2008), also auch in die ER-Membran (Toro *et al.*, 2009) wurde bisher eine essentielle Rolle von HsPEX16 postuliert. In *Saccharomyces cerevisiae* wurde bislang jedoch kein funktionales Homolog zu HsPEX16 gefunden (Kim und Mullen, 2013). Eine Integration in Bäckerhefemikrosomen wäre demnach ein Indiz dafür, dass HsPEX3 unabhängig von PEX16 in ER-Membranen integrieren kann.

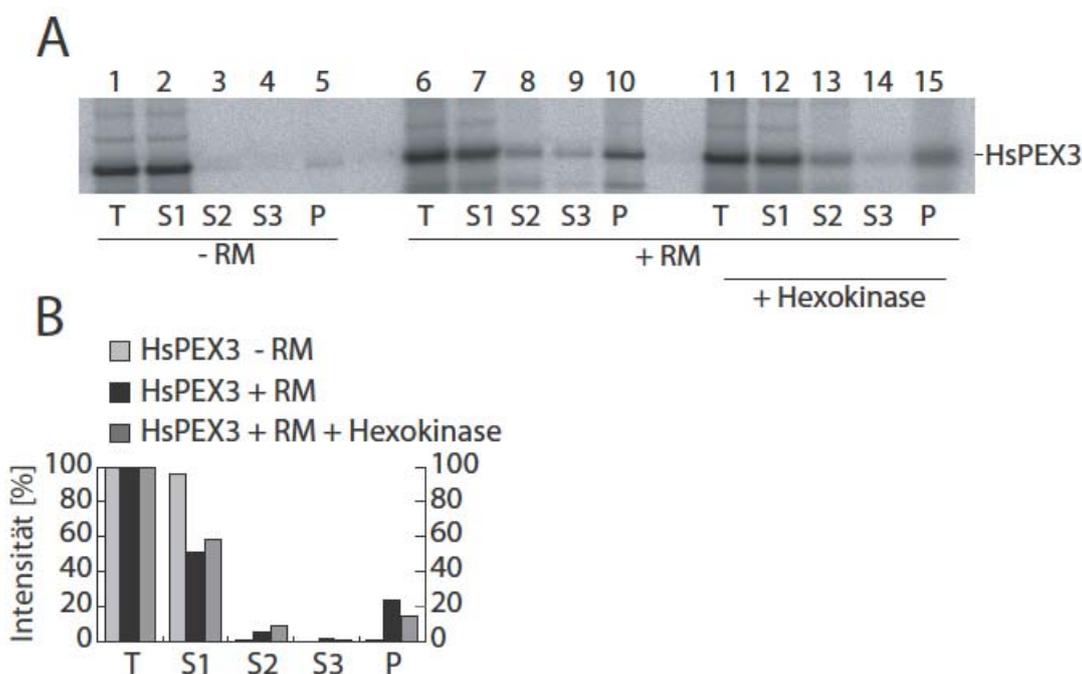


Abb. 3-26: HsPEX3 kann energieabhängig, posttranslational in Hefemembranen integrieren A) HsPEX3 wurde *in vitro* synthetisiert und durch [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Anhand von 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion wurde eine cotranslationale Integration unterbunden. Der HsPEX3-Ansatz wurde zunächst mit 0,04 U/μl Hexokinase ATP-depletiert. Auch ER-Mikrosomen wurden mit 0,13 U/eq Hexokinase behandelt und schliesslich beides zusammengegeben. Zur Membranextraktion durch Alkali wurde der Ansatz (T, *total fraction*) zunächst sedimentiert und der Überstand (S1) abgenommen. Danach wurde das Membranpellet zweimal mit 100 mM Natriumcarbonat (pH 11,5) behandelt und sedimentiert. Es entstanden dadurch zwei weitere Überstände (S2, S3) und ein finales Membranpellet (P). Zum Vergleich wurde HsPEX3 auch ohne Mikrosomen (-RM) und mit *mock*-behandelten Mikrosomen (+RM) inkubiert. Die Proben wurden auf

einem NuPAGE Gel aufgetrennt, **B**) das Autoradiogramm quantifiziert und die Daten in einem Diagramm als prozentuale Signalintensität an T (100 %) gezeigt.

Dazu wurde die mRNA des HsPEX3 *in vitro* translatiert und die Translation mit Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Danach wurde HsPEX3 mit 0,04 U/ μ l Hexokinase inkubiert. Die Hefemikrosomen wurden parallel mit 0,13 U/eq Hexokinase behandelt. Dann wurde der HsPEX3-Ansatz mit Mikrosomen zusammengegeben. Anschliessend wurden die Mikrosomen sedimentiert und der Überstand abgenommen (S1). Das Membranpellet wurde im Anschluss zweimal mit 0,1 M Natriumcarbonat extrahiert (2.9). Die nötigen Kontrollen wurden mitgeführt und alle Fraktionen auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Ein Diagramm stellt die radioaktiven Signale des HsPEX3 anteilig an T (100 %) dar (Abb. 3-26 B).

Ohne ATP-Depletion integrierte ein deutlicher Anteil des HsPEX3 alkaliresistent in die Hefemikrosomen (Abb. 3-26 A, Spur 10), während unter ATP-depletierten Bedingungen die anteilige Menge an integriertem HsPEX3 zurückging (Spur 15). Damit wurde gezeigt, dass HsPEX3 energieabhängig und posttranslational in Hefemikrosomen integrieren konnte. Die ER-Spezifität dieser Integration wurde mit der Glykosylierungsmutante 34/20HsPEX3 belegt, sie wurde energieabhängig und posttranslational in Hefemikrosomen glykosyliert (Daten nicht gezeigt).

Damit konnte gezeigt werden, dass der Integrationsablauf des HsPEX3 in ER-Membranen soweit evolutionär konserviert ist, dass die Integration durch die Komponenten der Hefe übernommen werden konnten. Sogar die bisher bestimmten Eigenschaften (posttranslational und energieabhängig) der HsPEX3-Integration blieben in ER-Membranen der Hefe erhalten und sind somit evolutionär konserviert. Durch die erfolgreiche Integration stellte sich erstaunlicherweise heraus, dass HsPEX3 ohne PEX16 integriert werden konnte.

Abschliessend sollte die Fähigkeit zur posttranslationalen *in vitro* Integration des ScPex3p in Schweinemikrosomen untersucht werden und zusätzlich die Energieabhängigkeit dieser Integration überprüft werden. Die Versuchsdurchführung wurde in diesem Kapitel bereits beschrieben, im Unterschied dazu wird hier die Integration des Pex3p der Hefe in Schweinemikrosomen getestet.

Es stellte sich heraus, dass auch in dieser Kombination ScPex3p alkaliresistent posttranslational in Mikrosomen aus dem Schwein integrieren konnte (Abb. 3-27, Spur 10). Der Einbau des ScPex3p wurde durch ATP-Depletion fast vollständig inhibiert (Spur 15), so dass die Energieabhängigkeit der Integration ebenfalls beobachtet werden konnte. Mit der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p wurde zusätzlich die ER-Spezifität der Integration durch posttranslationale Glykosylierung belegt. Auch die Energieabhängigkeit der Glykosylierung konnte beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

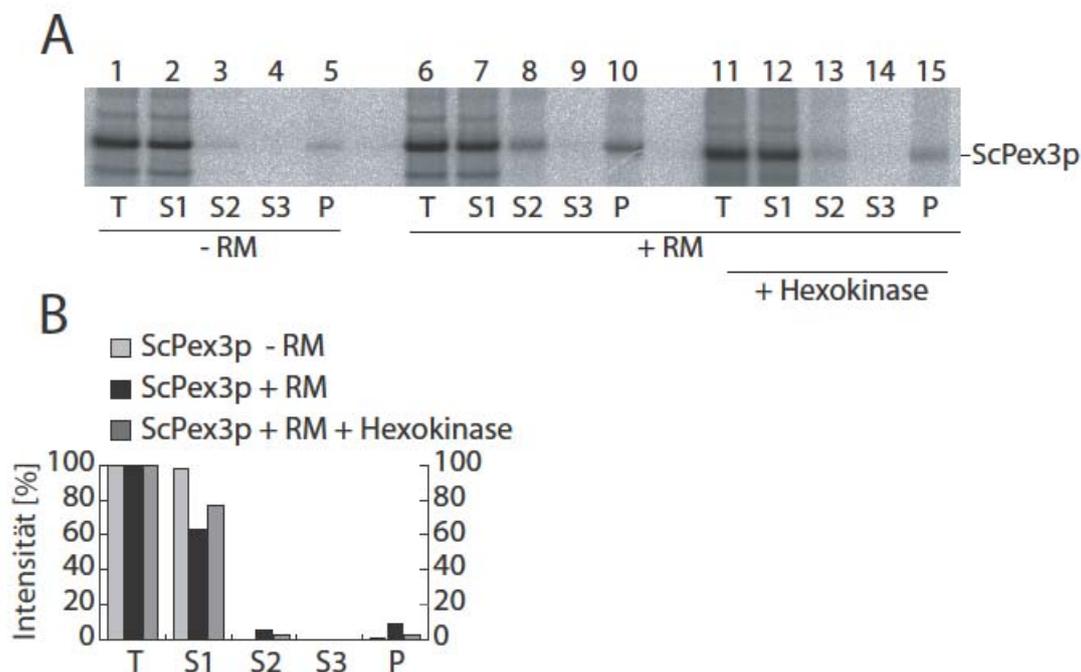


Abb. 3-27: ScPex3p kann energieabhängig, posttranslational in Säugermikrosomen integrieren A) Die mRNA des ScPex3p wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat mit [³⁵S]-Methionin translatiert. Die Translation wurde durch 1 mM Cycloheximid und Ribosomendepletion inhibiert. Danach wurde ScPex3p mit 0,04 U/μl Hexokinase und ER-Mikrosomen vom Schwein mit 0,16 U/eq Hexokinase inkubiert. Dann wurde beides zusammengefügt. Von dem Ansatz wurde danach eine Probe verwahrt (T, *total fraction*) und der Rest des Ansatzes ultrazentrifugiert. Der entstandene Überstand (S1) wurde abgenommen und das Membranpellet einer zweifachen Alkaliextraktion (2.9) unterzogen. Daneben wurden auch *mock*-behandelte Mikrosomen mit ScPex3p und ScPex3p ohne Mikrosomen (-RM) mitgeführt. Alle Fraktionen wurden abschliessend auf ein NuPAGE Gel gegeben. **B)** Das Autoradiogramm des Gels wurde quantifiziert und die prozentualen Signalintensitäten anteilig an T (100 %) dargestellt.

Zusammenfassend konnten die Komponenten der Schweinemikrosomen beide ScPex3p-Konstrukte posttranslational und energieabhängig in die ER-Membranen integrieren. Die Fähigkeit zur energieabhängigen, posttranslationalen Integration blieb umgekehrt auch für die HsPEX3-Konstrukte in ER-Membranen der Bäckerhefe erhalten. Damit zeigen die Daten dieses Kapitels, dass die Integration des Pex3 soweit evolutionär konserviert ist, dass die Komponenten entferntverwandter Arten die Integration von Pex3 übernehmen können. Zusätzlich ist der Ablauf der Integration des Pex3 soweit konserviert, dass sogar die bisherigen Eigenschaften der Integration erhalten geblieben sind. Beide Pex3-Proteine konnten posttranslational und nur in Abhängigkeit von Energie in die ER-Membranen integrieren.

4 DISKUSSION

Da Peroxisomen keine DNA besitzen, müssen alle peroxisomalen Proteine nach der Synthese zu den Peroxisomen gelangen. Für peroxisomale Membranproteine ist ein Modell zur direkten Integration in die peroxisomale Membran bekannt, aber auch ein indirekter Proteintransport über das ER zu den Peroxisomen wird postuliert. Über den indirekten Proteintransportweg über das ER ist bisher wenig bekannt, besonders fehlen Detailinformationen über die Integration der PMP in die ER-Membran. Es existieren z.B. für das humane PEX3 widersprüchliche Angaben, ob es in die ER-Membran integrieren kann. Weitergehend ist nicht geklärt, ob nur Klasse I PMP oder auch Klasse II PMP in die ER-Membran eingebaut werden können. Für Matrixproteine wurde bereits ein Importsystem in der peroxisomalen Membran beschrieben, dennoch gibt es Hinweise, dass das Matrixprotein ScPex8p möglicherweise über das ER zu den Peroxisomen gelangen könnte.

Falls eine Translokation der getesteten Proteine in die ER-Membran beobachtet werden kann, sollte der Vorgang näher beschrieben werden. Eine Beschreibung beinhaltet, ob die Integration/Translokation co- bzw. posttranslational stattfindet und, ob energieverbrauchende Proteine daran beteiligt sind. Weitergehend sollte untersucht werden, ob bekannte Translokationssysteme der ER-Membran an der Translokation in die ER-Membran beteiligt sind. Eine vergleichende Untersuchung des Integrationsverhaltens der beiden homologen Pex3-Proteine aus Bäckerhefe und Mensch könnte klären, inwieweit der Integrationsablauf konserviert ist.

4.1 PEROXISOMALE MEMBRANPROTEINE INTEGRIEREN IN DIE ER-MEMBRAN

Der Einbau des peroxisomalen Membranproteins ScPex3p in die ER-Membran konnte durch alkaliresistente *in vitro* Integration des unmodifizierten Wildtypproteins nachgewiesen werden. Durch die Verwendung des Wildtypproteins kann ausgeschlossen werden, dass das Verhalten des ScPex3p aufgrund von Modifikationen verändert wurde. Die ER-Spezifität der Integration wurde für ScPex3p durch eine N-Glykosylierungsmutante gezeigt. N-Glykosylierung durch die Oligosaccharyltransferase (OST) tritt ausschließlich im ER-Lumen auf (Spiro, 2002). Für die Glykosylierungsmutante 24ScPex3p konnte eine erfolgreiche N-Glykosylierung beobachtet werden. Zusätzlich wurde in Kombination gezeigt, dass der N-Terminus des 24ScPex3p im ER-Lumen glykosyliert wurde und 24ScPex3p gleichzeitig alkaliresistent in die ER-Membran eingebaut war.

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit beobachtete Hoepfner (Hoepfner *et al.*, 2005) mit einer ScPex3p-YFP-Mutante *in vivo* eine Kollokalisierung mit dem ER, bevor das Protein die Neubildung von Peroxisomen einleitete. Diese Beobachtung wiederum belegt, dass PMP die ins ER geleitet wurden, später Peroxisomen bilden können, also funktional bleiben und nicht fehlgeleitet wurden. Thoms *et al.* (2012) zeigten, dass eine Glykosylierungsmutante aus

ScPex3p und CFP *in vivo* in Δ Pex3-Hefezellen neue Peroxisomen bilden konnte, also ebenfalls seine Funktion behielt. Auch andere ScPex3p-Mutanten gelangten über das ER zu den Peroxisomen. Ein Konstrukt mit Signalpeptid und *FLAG-tag* beispielsweise wurde nach ER-Prozessierung in den Peroxisomen detektiert (Kragt *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu konnte aber auch für eine Glykosylierungsmutante des ScPex3p nach Glykosylierung im ER nicht gezeigt werden, dass sie das ER verlassen und zu den Peroxisomen gelangen kann (Kragt *et al.*, 2005). Zipor *et al.* behaupteten, dass mRNA-Targeting eine signifikante Rolle in der Kontrolle von Proteinlokalisierung spielen könnte. Bei Untersuchungen zur Lokalisation der mRNA in der Zelle war die mRNA des ScPex3 die einzige von 50 untersuchten peroxisomalen mRNA, die bevorzugt am ER lokalisierte (Zipor *et al.*, 2009).

ScPex3p besitzt also die Fähigkeit in die ER-Membran zu integrieren und es deuten mehrere Untersuchungen daraufhin, dass dieses Protein nach der Integration in die ER-Membran über den indirekten Proteintransportweg zu den Peroxisomen gelangen kann.

Nicht nur ScPex3p, sondern auch das humane PEX3 konnte in dieser Arbeit in ER-Membranen integrieren. Diese Aussage stützt sich auf die Beobachtung, dass Glykosylierungsmutanten des HsPEX3 erfolgreich in ER-Membranen aus Hunde- und Schweinepankreas glykosyliert wurden. Die posttranslational zugegebenen Schweinemikrosomen wurden auf Kontaminationen mit Peroxisomen und peroxisomalen Membranen untersucht. Es konnte weder Katalase noch PEX16 in den Mikrosomen vom Schwein detektiert werden (Abb. 3-15), eine Verunreinigung der Mikrosomen mit Peroxisomen oder peroxisomalen Membranen konnte damit nicht beobachtet werden. Das spricht für eine Integration des HsPEX3 in die ER-Membran und nicht in die Peroxisomenmembran.

Toro *et al.* (2009) konnten *in vivo* Kollokalisierung von humanem PEX3 mit dem ER zeigen. HsPEX3-GFP wurde in humanen Fibroblasten von Patienten mit Zellweger-Syndrom (durch Mutation in HsPEX3) exprimiert. Während der Expression lokalisierte HsPEX3-GFP zunächst mit dem ER, bevor es neue Peroxisomen bildete. Sie verwendeten auch eine Glykosylierungsmutante des HsPEX3 in gesunden humanen Fibroblasten, die scheinbar glykosyliert wurde und schlussfolgerten, dass auch in diesen Zellen HsPEX3 zunächst zum ER gelangte. Unterstützend zu diesen Daten wurde für HsPEX3 gezeigt, dass es im Gegensatz zu den meisten anderen PMP PEX19-unabhängig zu den Peroxisomen gelangen kann (Jones *et al.*, 2004).

Dagegen konnte in anderen Studien kein HsPEX3 im ER detektiert werden. Nach subzellulären Fraktionierungen konnte kein deutliches HsPEX3-Antikörpersignal in Fraktionen detektiert werden, die gleichzeitig durch Signale der Mikrosomenmarker Esterase bzw. NADPH-Cytochrom Reduktase gekennzeichnet waren (Ghaedi *et al.*, 2000; South *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigten Matsuzaki und Fujiki (2008 und Fujiki *et al.*, 2012), dass HsPEX3 nicht in die ER-Membran sondern PEX19-abhängig in die peroxisomale Membran integrierte. Eine HsPEX3-Myc-Mutante wurde in *in vitro* Importassays mit verschiedenen Organellenfraktionen in Anwesenheit von HsPEX19 inkubiert. Die Organellenfraktionen

waren: 1) Peroxisomen mit HsPEX16-HA, 2) Peroxisomen, 3) Mitochondrien und raue Mikrosomen, 4) glatte Mikrosomen. Das meiste HsPEX3-Myc wurde nach Zentrifugation mit den Peroxisomen gefunden, die aus Zellen, die HsPEX16-HA zusätzlich stabil exprimierten, aufgereinigt wurden. Mit diesen Daten wurde auf eine direkte Integration abhängig von HsPEX19 und HsPEX16 geschlossen. Diese Aussage steht im Widerspruch zu der Hypothese von Jones *et al.* (2004), die einen PEX19-unabhängigen Transport beobachteten. Auf der anderen Seite wurde von Matsuzaki und Fujiki eine Mischfraktion aus Mitochondrien und rauem ER verwendet. In dieser Mischfraktion aus Mitochondrien und rauem ER könnten die Mitochondrien einen inhibierenden Effekt auf den Einbau in die ER-Membran besitzen. Es gäbe noch eine weitere mögliche Interpretation der Daten in Bezug zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Die Hypothese dazu wäre, dass HsPEX19 einen regulatorischen Einfluss auf die Integration des HsPEX3 besitzt, so dass HsPEX3 in Abwesenheit des HsPEX19 in ER-Membranen integrieren kann, während in Anwesenheit des HsPEX19 ein Einbau in die ER-Membran verhindert wird. Weiterhin ist anzumerken, dass die Fraktion mit größtem Sec61 β -Signal, also der wahrscheinlich größten Menge an rauen Mikrosomen, nicht auf HsPEX3-Myc-Import getestet wurde.

Der Einbau des HsPEX3 in die ER-Membran wurde in dieser Arbeit gezeigt, während andere Arbeitsgruppen einen Transport des HsPEX3 vom ER zu den Peroxisomen beobachten konnten. Die Entscheidung über welchen Transportweg HsPEX3 zu den Peroxisomen gelangt, könnte möglicherweise durch das Peroxin PEX19 reguliert werden, dessen Anwesenheit eventuell einen Einbau in die ER-Membranen verhindert und damit zu einem direkten Einbau in die Peroxisomenmembran führt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ScPex22p *in vitro* alkaliresistent in Mikrosomen der Hefe integriert wurde. Übereinstimmend damit sahen Halbach *et al.* (2009) *in vivo* in Δ Pex19-Hefezellen, dass ein Großteil des ScPex22p-GFP und des ScPex3p-GFP mit dem ER oder in der Nähe des ER akkumulierten und schlossen daraus, dass ScPex3p und ScPex22p den gleichen Targetingweg besitzen könnten. Außerdem zeigten sie, dass das Targeting des ScPex22p genau wie das Targeting des ScPex3p ohne ScPex19p erfolgen kann. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass die N-Termini von ScPex3p und ScPex22p funktional austauschbar sind. Diese Ergebnisse deuten an, dass auch ScPex22p die Fähigkeit zur Integration in die ER-Membran besitzt und unterstützen damit die Erkenntnisse dieser Arbeit. Untersuchungen zum mRNA-Targeting des ScPex22p dagegen führten zu keiner signifikanten Kollokalisierung der mRNA mit den Peroxisomen oder dem ER. Die Kollokalisierung mit den Peroxisomen (22 %) lag nicht über den Kollokalisationswerten von mitochondrialer mRNA mit den Peroxisomen (Zipor *et al.*, 2009).

Mit dem in dieser Arbeit beobachteten Einbau des ScPex22p in die ER-Mikrosomen zeigt sich, dass neben ScPex3p ein weiteres Klasse II PMP integriert wurde und damit den indirekten Proteintransportweg zu den Peroxisomen nutzen könnte.

Die alkaliresistente *in vitro* Integration des Wildtypproteins ScPex13p in Mikrosomen wurde in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt. Die Beobachtung der Integration eines Klasse I PMP in ER-reiche Mikrosomen war sehr überraschend, weil für diese Proteine bisher eine Pex19p-abhängige Integration in peroxisomale Membranen postuliert wurde.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen in dieser Arbeit konnten van der Zand *et al.* (2010) *in vivo* eine Kolo-kalisation eines ScPex13p-YFP mit dem ER beobachten, bevor das Protein in den Peroxisomen zu detektieren war. Fransen *et al.* (2004) verwendeten eine ScPex13p-Mutante, die nicht mehr an Pex19p binden konnte. Sie zeigten, dass diese Mutante aber trotzdem nach 24 Stunden integriert in die Peroxisomenmembran vorgefunden werden konnte. Halbach *et al.* (2009) wiederum untersuchten, ob auch die ScPex19p-abhängige mPTS des ScPex13p das Targeting des ScPex3p übernehmen könnte. Sie fusionierten einen Teil des ScPex13p vor den C-Terminus des ScPex3p. Dieses Konstrukt wurde genau wie ScPex3p-GFP zunächst teilweise im ER und später an den Peroxisomen detektiert, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass auch ScPex13p via ER zu den Peroxisomen gelangen kann. Fransen *et al.* (2001) beobachteten in diesem Zusammenhang für das humane PEX13 in Verkürzungsstudien, dass es mehrere Targetingsignale enthält. HsPEX13-Konstrukte konnten teilweise in PEX19-Abhängigkeit und teilweise unabhängig von einer vorangegangenen PEX19-Bindung zu den Peroxisomen gelangen. Unabhängig davon kamen auch Jones *et al.* (2001) durch Untersuchungen mit verkürzten PEX13-Konstrukten zu dem Schluß, dass HsPEX13 mehrere, unabhängige Targetingsignale enthält, die einen Transport zu den Peroxisomen gewährleisten.

Rottensteiner *et al.* (2004) beobachteten, dass es in Abwesenheit der Pex19p-Bindungsstelle teilweise zu Lokalisationen des ScPex13p ins ER kam. Sie interpretierten diese Beobachtungen jedoch als Fehllokalisationen und kamen zu dem Schluß, dass ScPex13p ScPex19p-abhängig und ScPex3p-abhängig direkt zu den Peroxisomen gelangt. Dazu passend ist die Beobachtung von Zipor *et al.* (2009), dass ScPex13-mRNA bevorzugt (78 %) an Peroxisomen lokalisierte.

Demgegenüber kann aber auch für ScPex13p - genau wie zuvor für HsPEX3 - postuliert werden, dass die direkte Integration des ScPex13p in die peroxisomale Membran abhängig von der ScPex19p-Bindung ist und, dass es einen zweiten Proteintransportweg für das ScPex13p gibt, der mit einer Pex19p-unabhängigen Integration in die ER-Membran beginnt. Zusätzlich zeigt der erfolgreiche Einbau des ScPex3p in ER-reiche Mikrosomen, dass möglicherweise auch Klasse I PMP über den indirekten Proteintransportweg über das ER zu den Peroxisomen gelangen können.

Die Beobachtungen dieser Arbeit zur Integration von peroxisomalen Membranproteinen in die ER-Membran werden unterstützt durch alle Beobachtungen, die präperoxisomales *vesicle budding* vom ER zeigten (van der Zand *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2010; Tam *et al.*, 2005). Da die Bildung von peroxisomalen Vorläufervesikeln am ER bedingt, dass zumindest ein Teil der peroxisomalen Membranproteine zuvor in die ER-Membran integrierte.

Bei den peroxisomalen Vesikeln soll es sich nicht um COPI- oder COPII-Vesikel handeln (South *et al.*, 2000; Voorn-Brouwer *et al.*, 2001) und damit der Weg nicht über den Golgi-Apparat führen. Van der Zand *et al.* (2012) postulierten eine heterologe Fusion von peroxisomalen Vorläufervesikeln, die zur Komplementierung der Matrixproteinimport-Maschinerie führte. Während andere Theorien Fusionen von Vorläufervesikeln mit reifen Peroxisomen beinhalten (Lam *et al.*, 2010). Der Kontakt vom ER zu den Peroxisomen durch Vesikeltransport kann damit auch den Fund von ER-Membranproteinen in den Peroxisomen erklären (Islinger *et al.*, 2006).

Über lange Zeit wurden Peroxisomen genau wie Mitochondrien und Chloroplasten nicht zum Endomembransystem gezählt. Das Endomembransystem umfasst die Zellkompartimente, welche durch Vesikeltransport miteinander verbunden sind. Durch die Beobachtungen zum Vesikeltransport zwischen ER und Peroxisomen können die Peroxisomen möglicherweise zum Endomembransystem hinzugezählt werden.

Motley und Hetteema (2007) beobachteten, dass *de novo* Biogenese von Peroxisomen im Verhältnis zu *growth and division* ein sehr langsamer Prozess ist, der teilweise langsamer als die Zellteilung bei Hefen ist. Daraus folgerten sie, dass Peroxisomen der Hefe hauptsächlich über Wachstum und Teilung vervielfältigt werden müssten. Im Gegensatz dazu wurde in humanen Zelllinien beobachtet, dass Peroxisomen überwiegend *de novo* gebildet wurden (Kim *et al.*, 2006). Die Bedeutung der *de novo* Biogenese wird, wie an diesen widersprüchlichen Daten klar wird, derzeit noch kontrovers diskutiert. Dagegen kann über den Transport der PMP zu den Peroxisomen aber bereits festgelegt werden, dass einige PMP über zwei unterschiedliche Wege zu den Peroxisomen gelangen können. Bei dem einen Weg spielt die Integration in die ER-Membran eine Rolle.

Lazarow und Fujiki (1985) postulierten, dass PMP an freien Ribosomen synthetisiert werden und danach posttranslational in eine Membran eingebaut werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen nicht dagegen, dass alle PMP auch posttranslational direkt in peroxisomale Membranen integrieren können. Zumindest für die Klasse II PMP, für die keine Pex19p-Bindung an das mPTS gezeigt werden konnte, existiert aber derzeit kein aktuelles Modell, das den direkten Transport zur peroxisomalen Membran beschreiben könnte. Dennoch beobachteten Matsuzono und Fujiki (2006), dass das Klasse II PMP HsPEX16 und das HsPEX26 *in vitro* HsPEX19- und ATP-abhängig zu den Peroxisomen gelangten und alkaliresistent in die Peroxisomen integrierten. Sie schlussfolgerten dadurch, dass alle PMP diesen Weg nehmen würden. Direkten Einbau in die peroxisomale Membran sahen auch Diestelkötter und Just (1993). Sie beobachteten, dass PMP22 (PXMP2) und PAF1 (PEX2) *in vitro* subtilisingeschützt in Peroxisomen aus Rattenleber integrieren konnten. Diese Integration sollte im Gegensatz zur Translokation des HsPEX16 in die Peroxisomenmembran energieunabhängig stattfinden. PMP22 ist ein Protein mit mehreren Transmembrandomänen und besitzt somit Abschnitte, die nach der Integration im Zytosol verbleiben. Abschnitte im Zytosol sollten eigentlich für die Protease erreichbar sein, trotzdem wurde gezeigt, dass das

Protein nach dem Subtilisinverdau in seiner vollen Länge erhalten blieb. Ebenso ist anzumerken, dass dieser Assay nicht für weitere Untersuchungen verwendet wurde. Zusammenfassend bleibt derzeit ungeklärt, ob alle PMP oder nur die PMP der Klasse I direkt in die peroxisomale Membran integrieren können. Generell kann gesagt werden, dass die wenigen, bisherigen Informationen über den Integrationsmechanismus in die Peroxisomenmembran widersprüchlich und der Mechanismus der Integration noch nicht im Detail erforscht ist. Im Gegensatz dazu mehren sich die Informationen zur ER-Integration der PMP und darüber hinaus deutet sich an, dass nicht nur Klasse II PMP sondern auch Klasse I PMP (ScPex13p) über das ER zu den Peroxisomen gelangen können. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass das Abschnüren der präperoxisomalen Vesikel am ER ScPex19p-abhängig sein könnte (Lam *et al.*, 2010; van der Zand *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011). Solch eine Beteiligung des ScPex19p am Proteintransport der PMP zu den Peroxisomen stellt möglicherweise die Funktion des ScPex19p als zytosolischer Rezeptor der PMP und damit auch das Modell des direkten Proteintransportweges zu den Peroxisomen in Frage.

4.2 PEROXISOMALE MEMBRANPROTEINE KÖNNEN

POSTTRANSLATIONAL IN ER-MEMBRANEN INTEGRIEREN

Nachdem gezeigt wurde, dass ScPex3p, HsPEX3, ScPex22p und ScPex13p alkaliresistent in die ER-reichen Mikrosomen integrieren konnten, wurde der Ablauf der Integration weiter charakterisiert. Überraschenderweise fand *in vitro* eine posttranslationale Integration der peroxisomalen Membranproteine in ER-Membranen statt, d.h. eine Integration weitestgehend unabhängig von Translation und in Abwesenheit von Ribosomen.

Die posttranslationale Integration von zwei Transmembrandomänen kann eine besondere Schwierigkeit darstellen, deshalb ist es nicht verwunderlich, dass für die ScPex13p-Integration eine verringerte Effizienz im Gegensatz zur ScPex22p-Integration unter gleichen Bedingungen beobachtet werden konnte (Abb. 3-7). Eine andere Möglichkeit der Erklärung wäre, dass der Signalanker des ScPex13p im Gegensatz zum Signalanker des ScPex22p eine geringere Affinität zu einer putativen Bindungsstelle an der ER-Membran besitzt. Falls zytosolische Chaperone ScPex13p und ScPex22p integrationskompetent halten, könnte ScPex13p auch andere Chaperone oder größere Mengen an Chaperonen benötigen, so dass diese Chaperone limitierend auf die Integration wirken könnten.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine ScPex3p, HsPEX3, ScPex22p und ScPex13p wurden bis auf die hier präsentierten Daten (Thoms *et al.*, 2012) noch keine Untersuchungen in Bezug auf den Ablauf der Integration in die ER-Membran veröffentlicht (Titorenko und Mullen, 2006; Kim und Mullen, 2013).

Van der Zand *et al.* (2010) testeten *in vivo* die Effekte von einer Sec62p- und Sec63p-Depletion u.a. auf den Transport eines ScPex13p-YFP. Sie verwiesen darauf, dass durch die Depletionen die co- und die posttranslationale Integration gestört werden, da Young *et al.* (2001) eine Beteiligung von Sec63p am cotranslationalen Transport in Hefe nachwies und

Sec62p ausschließlich für den posttranslationalen Transport benötigt wird. Die Ergebnisse von van der Zand zeigten einen Einfluß der Depletionen auf die Kolokalisation des ScPex13p-YFP mit dem ER und decken sich dadurch mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten. In dieser Arbeit wurde die direkte Abhängigkeit der Integration des 24ScPex3p von Sec61p gezeigt und die Abhängigkeit der Integration von Sec62p und Sec63p durch Beobachtung der posttranslationalen Integration aller getesteten PMP indirekt belegt. Im Gegensatz dazu beobachteten van der Zand *et al.* die direkte Abhängigkeit der Kolokalisation des ScPex13p-YFP von Sec62p und Sec63p *in vivo* und schlussfolgerten damit die Beteiligung des Sec61-Kanals an dem Einbau des ScPex13p-YFP in die ER-Membran.

Zusammengefasst kann aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass die posttranslationale Integration der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wahrscheinlich auch *in vivo* stattfinden kann.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Karnik und Trelease (2007) *in vivo* ein posttranslationales Targeting von Pex16 aus *Arabidopsis thaliana*. Für die peroxisomale Ascorbat Peroxidase wurde ebenfalls eine posttranslationale *in vitro* Integration in die ER-Membran beobachtet (Mullen *et al.*, 1999). Bei diesem Protein handelt es sich jedoch um ein *tail-anchored* Protein, welches aufgrund der Orientierung des C-terminalen Membranankers gar nicht translationsabhängig integrieren könnte.

Die posttranslationale Integration der getesteten PMP stimmt mit der Beobachtung von Lazarow und Fujiki soweit überein, dass die PMP an freien Ribosomen synthetisiert werden und danach posttranslational integrieren (Lazarow und Fujiki, 1985). Lazarow und Fujiki vermuteten nur, dass diese posttranslationale Integration in die peroxisomale Membran stattfindet. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die posttranslationale Integration in ER-Membranen erfolgen kann. Es kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die PMP auch posttranslational in peroxisomale Membranen integrieren können. Gegensätzlich zu den Daten dieser Arbeit wirken auch die Ergebnisse von Kim *et al.* (2006) zur Integration des HsPEX16 in die ER-Membranen *in vitro*. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Daten für HsPEX3 konnte HsPEX16 ausschließlich cotranslational in die ER-Membranen integrieren.

Es ist überraschend, dass ausser *tail-anchored* Proteinen weitere Membranproteine posttranslational in die ER-Membran integriert werden können. Diese Art der Integration ist noch zusätzlich erstaunlich, da diese Membranproteine teilweise einen N-terminalen Membrananker besitzen (ScPex3p, HsPEX3 und ScPex22p) und ein Modell zur posttranslationalen Integration von Membranproteinen mit N-terminalem Membrananker im Gegensatz zur Translokation weder in Hefe noch im Säuger bisher bekannt war (Shao und Hegde, 2011b). Es könnte sogar vermutet werden, dass diese posttranslationale Integration eine Eigenart speziell von PMP ist, da bereits für Pex16 aus *Arabidopsis thaliana* ein posttranslationales Targeting gezeigt wurde. Auf jeden Fall führt ein posttranslationales Targeting der PMP an die ER-Membran dazu, dass eine Regulation zwischen dem direkten und dem indirekten Proteintransportweg, wie in dieser Arbeit bereits vorgeschlagen wurde,

mit z.B. Pex19p nur bei einer posttranslationalen Integration, nicht jedoch bei einer cotranslationalen Integration in die ER-Membran möglich wäre.

4.3 DIE PEROXISOMALEN MEMBRANPROTEINE BENÖTIGEN UNTERSCHIEDLICHE MENGEN AN ENERGIE ZUR POSTTRANSLATIONALEN INTEGRATION

Die posttranslationale Integration des ScPex3p in ER-Membranen wurde in dieser Arbeit als energieabhängig charakterisiert. Da bisher keine Daten zur posttranslationalen Integration des ScPex3p veröffentlicht wurden, wurde dementsprechend auch die Energieabhängigkeit dieser Integration von anderen Arbeitsgruppen noch nicht untersucht. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass auch die posttranslationale Glykosylierung der Glykosylierungsmutante 24ScPex3p abhängig von Energie war. Für die N-Glykosylierung wird die Oligosaccharidkette an membrangebundenem Dolichol größtenteils im Zytosol synthetisiert, bevor sie im ER-Lumen im Ganzen durch die Oligosaccharyltransferase an das Protein angeheftet wird. Die Energie für die Übertragung auf das Protein wird durch eine energiereiche Pyrophosphatbindung zwischen Dolichol und Saccharidkette geliefert (Johnson *et al.*, 2008). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die ATP-Depletion einen Einfluss auf die Übertragung der Oligosaccharidkette hat. Die ATP-Depletion beeinflusst auch bei 24ScPex3p nur die Integration des Proteins.

Die posttranslationale Translokation des sekretorischen Proteins präpro-alpha Faktor ist ebenfalls energieabhängig (Rothblatt und Meyer, 1986; Waters und Blobel, 1986). In dieser Arbeit wurde auch die energieabhängige posttranslationale Translokation des präpro-alpha Faktors in Hefemembranen untersucht (Daten nicht gezeigt). Dafür wurden gleiche Konzentrationen an Hexokinase wie für ScPex3p verwendet. Es wurde festgestellt, dass diese Translokation deutlich stärker gehemmt wurde als die Integration des ScPex3p. Die Translokation des präpro-alpha Faktors benötigte also mehr ATP als die Integration des ScPex3p.

Für das humane PEX3 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die posttranslationale Integration in ER-Membranen vom Schwein energieabhängig war. Diese energieabhängige ER-Integration konnte mit der Mutante 30/24HsPEX3 bestätigt werden.

Unter gleichen Bedingungen konnte zusätzlich beobachtet werden, dass die Translokation des sekretorischen Proteins Histatin 3 deutlich empfindlicher gegenüber ATP-Depletion war als die Integration des HsPEX3. Für das *tail-anchored* Protein Cytochrom B5 konnte dagegen ein wesentlich schwächerer Rückgang der Integration in Säugermembranen unter dem Einfluss von gleichen Konzentrationen an Hexokinase nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass in Säugermembranen die Translokation eines sekretorischen Proteins mehr Energie benötigte, als die Integration des HsPEX3. Die Integration des *tail-anchored* Protein Cytochrom B5 dagegen benötigte weitaus weniger Energie.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass sekretorische Proteine generell weniger Energie zur Translokation als Pex3p zur Integration benötigen.

Welche energieverbrauchenden Faktoren könnten jeweils eine Rolle spielen?

Generell deutet die Abhängigkeit von energieverbrauchenden Prozessen auf die Beteiligung von Proteinen hin. Es wäre naheliegend, dass diese Proteine Chaperone sind, da Chaperone bei vielen Transportprozessen eine Rolle spielen. Die Interaktion der Chaperone mit ihren Substratproteinen ist ATP-abhängig (Bukau und Horwich, 1998). An der posttranslationalen Translokation sekretorischer Proteine über den Sec61-Kanal sind zytosolische und luminalen Chaperonen beteiligt (Ngosuwan *et al.*, 2003; Buchberger *et al.*, 2010; Gething *et al.*, 1999). Nimmt man an, dass die posttranslationale Integration von ScPex3p und HsPEX3 analog zur Sec61-abhängigen Translokation von sekretorischen Proteinen stattfindet, dann wären Hsp70/Hsc40-Chaperone im Zytosol an der Integration der peroxisomalen Membranproteine beteiligt (Ngosuwan *et al.*, 2003). Eine Beteiligung des luminalen Kar2p/BIP an der Integration für Membranproteine gilt dagegen als sehr unwahrscheinlich. Dementsprechend werden für die Integration der peroxisomalen Membranproteine eventuell keine luminalen Chaperone benötigt. Dieser Umstand könnte eine Erklärung dafür sein, dass die untersuchten PMP weniger Energie zur posttranslationalen Integration benötigten als die sekretorischen Proteine zur Translokation.

Es kann weitergehend darüber spekuliert werden, dass weitere Proteine eine Rolle beim Targeting der Pex3-Proteine zur ER-Membran spielen. Für kleine sekretorische Proteine, die posttranslational in das ER translozieren können, konnte ein TRC40-abhängiger (Homolog zu Get3p) Transport zum Sec61-Kanal gefunden werden (Johnson *et al.*, 2012). Eine calmodulinabhängige Translokation ins ER wurde ebenfalls für kleine sekretorische Proteine gezeigt, die posttranslational transloziert werden können (Shao und Hegde, 2011a). Beide Proteine könnten möglicherweise auch bei der Integration von peroxisomalen Membranproteinen in die ER-Membran beteiligt sein. Andere Chaperone könnten ebenfalls bei der Integration von peroxisomalen Membranproteinen eine Rolle spielen und den Schutz des hydrophoben Membranankers im Zytosol übernehmen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit belegen, dass die posttranslationale Integration des ScPex22p und des ScPex13p nicht durch die eingesetzte Konzentration an Hexokinase beeinflusst wurden. Der Einsatz von Apyrase führte auch zu keinem signifikanten Rückgang der posttranslationalen Integration des ScPex13p und des ScPex22p.

Es wurde nicht geprüft wie viel ATP durch diese Behandlung depletiert wurde und somit kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie viel ATP übrig geblieben ist. Man kann davon ausgehen, dass die ATP-Menge mit den Membranchargen und der Herkunft der Membranen sowie der Menge an ATP im Retikulozytenlysat variieren kann. Dagegen enthält das Retikulozytenlysat jedoch ein energieregenerierendes System, das aus Phosphokreatin und Phosphokreatinkinase besteht und aus ADP wieder ATP generiert. Es arbeitet damit praktisch gegen die Depletion an. Es wurde aber auch gezeigt, dass die gleiche Menge an

Hexokinase ausreichend war, um die Integration des ScPex3p in die gleichen Hefemembranen zu vermindern (Apyrase ebenfalls). Davon kann abgeleitet werden, dass die Integration von ScPex22p und ScPex13p weniger Energie benötigte als die Integration des ScPex3p. Das *tail-anchored* Protein Cytochrom B5 benötigt für die posttranslationale Integration in ER-Membranen ebenfalls sehr wenig Energie im Gegensatz zu anderen *tail-anchored* Proteinen wie z. B. Synaptobrevin 2 und Sec61 β (Kim *et al.*, 1997; Yabal *et al.*, 2003; Kutay *et al.*, 1995, Abell *et al.*, 2004). Brambillasca *et al.* (2006) postulierte, dass diese Fähigkeit auf die moderate Hydrophobizität der Transmembrandomäne von Cytochrom B5 zurückzuführen sei. Wurden vier Aminosäuren in der Transmembrandomäne gegen hydrophobere Aminosäuren ausgetauscht, so wurde die unassistierte Integration des Cytochrom B5 komplett inhibiert. Die Hydrophobie oder Hydrophilie einer Sequenz kann durch die Hydropathie nach Kyte und Doolittle (1982) berechnet werden, z.B. durch GRAVY-Berechnung (*grand average of hydropathicity*). Ein positiver Wert bezeichnet eine hydrophobe Sequenz, während ein negativer Wert die Sequenz als hydrophil beschreibt.

Tab. 4-1: GRAVY-Werte der Transmembrandomänen von Membranproteinen Die Berechnung der GRAVY-Werte erfolgte nach Kyte und Doolittle (1982). Ein positiver Wert bezeichnet eine hydrophobe Sequenz, während ein negativer Wert die Sequenz als hydrophil beschreibt.

Protein	Transmembrandomäne	GRAVY-Wert
CytB5	WWTNWWIPAICAVAVALMYRLY	1,14
HsPEX3	CIFLGTVLGGVYILG	2,03
ScPex13p TMD1	LIESLIGAVTGFAQML	1,47
ScPex13p TMD2	PLLFFLMAVFGFPYLLN	1,74
ScPex22p	LGIVGTIAVVLVTSYYIY	1,68
ScPex3p	VLISLTGIAALFTTGSVVVFFV	2,22

Schaut man sich nun die Hydropathie von den einzelnen Transmembrandomänen (TMD) im Vergleich an (Tab. 4-1), so sieht man, dass die TMD von ScPex13p und ScPex22p weniger hydrophob sind als die von ScPex3p und HsPEX3. Die TMD sind aber auch hydrophober als die TMD von Cytochrom B5. Die schwächere Hydrophobizität wäre eine mögliche Begründung dafür, dass ScPex13p und ScPex22p weniger Energie für die Integration benötigten als Pex3p.

Eine andere Vorstellung wäre, dass Pex3p als essentielles Protein bereits in den ER-Membranen vorhanden ist. Die Integration von weiteren PMP in die ER-Membran könnte dann begünstigt sein, so dass weniger Energie nötig ist. Diese These ist reine Spekulation, könnte aber mit einer positiven Integration der PMP in ER-Membranen aus Pex3 *knockout*-Hefen widerlegt werden.

Da für ScPex22p und ScPex13p keine N-Glykosylierungsmutanten hergestellt wurden, kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass eventuell kein Abschnitt der Proteine in das ER-

Lumen gelangte und sich die Proteine damit lediglich alkaliresistent an die ER-Membranen anlagerten. Eine Anlagerung würde keine Energie benötigen. Versuche mit Glykosylierungsmutanten könnten dies aufklären.

4.4 DIE PEX3P-INTEGRATION IST SEC61-ABHÄNGIG UND NICHT ABHÄNGIG VON GET1P UND GET2P

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine partielle Sec61p-Depletion zum Rückgang der Glykosylierung des 24ScPex3p führte. Um Sec61-abhängige Effekte auf die Integration des 24ScPex3p beobachten zu können, wurde in dieser Arbeit die Menge an Sec61p auf ca. 20 % der Ausgangsmenge depletiert. Zusätzlich wurden deutlich weniger Membranen als in den Versuchen zuvor verwendet und zu allerletzt auch noch die Zeit zur Integration stark verkürzt, damit ein Unterschied zu sehen war. Bei Gabe von großen Mengen an ER-Mikrosomen oder bei geringer zeitlicher Limitation konnte dieser Rückgang nicht beobachtet werden, da die Menge an Sec61-Kanälen in Bezug zur Substratmenge ein gewisses Niveau unterschreiten muss, um einen Sec61-spezifischen Unterschied sichtbar machen zu können. Die Depletion auf 20% war noch zu gering dafür, um unter den bisher in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen einen Effekt zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Der Rückgang der Glykosylierung in dem hier gezeigten Versuch kann ein direkter oder ein indirekter Effekt der Sec61p-Depletion sein. Indirekte Effekte wie z.B., dass die OST-Menge aufgrund der Sec61-Mutation abnimmt oder die OST nicht mehr über den Sec61-Kanal in das ER-Lumen transloziert werden kann und damit die Proteine im ER nicht mehr glykosylieren kann, können durch die Beobachtungen zu Sec22p ausgeschlossen werden. Durch die Sec61-Depletion wurde die Glykosylierung des Sec22p nämlich nicht behindert.

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit stehen die Daten von Thoms *et al.* (2012), die zeigen, dass die peroxisomale Neogenese in Sec61-defizienten Hefezellen blockiert wurde. Sie beobachteten, dass in Hefezellen mit der gleich temperatursensitiven Sec61-Depletionsmutante (*sec61-2*) Peroxisomen zunächst detektiert werden konnten. Dann ersetzten sie den ScPex3p-Promoter in diesen Hefezellen mit einem galaktoseinduzierten Promoter. Sie sahen in Kombination mit der temperatursensitiven Sec61-Depletionsmutante, dass die peroxisomale Neogenese in diesen Zellen im Gegensatz zur Neogenese in Wildtypzellen deutlich verlangsamt war. In dieser *sec61-2*-Mutante war die Translokation von sekretorischen Proteinen bereits bei permissiver Temperatur beeinflusst (Deshaies und Schekman, 1987), was auf eine Beeinflussung der Translokation auch unter permissiven Bedingungen schließen lässt. Deshalb war es nicht verwunderlich, dass eine Verlangsamung der Neogenese bereits bei Galaktoseinduktion unter permissiven Bedingungen beobachtet wurde. Der Sec61-abhängige Rückgang der peroxisomalen Neogenese wurde unabhängig bestätigt, indem eine Hefe verwendet wurde, bei der die Sec61-Expression durch einen doxycyclinabhängigen Promoter runterreguliert werden konnte (*tet-off* System). Beobachtungen mit dieser Hefe zeigten ebenfalls, dass weniger ScPex3p in das ER gelangte,

nachdem Sec61p herunter reguliert wurde. Dazu wurde eine Glykosylierungsmutante des ScPex3p in den oben beschriebenen Hefen verwendet und ein Sec61-abhängiger Rückgang der Glykosylierungsrate nachgewiesen (Thoms *et al.*, 2012).

Für posttranslationale Sec61-abhängige Translokation von sekretorischen Proteinen in Hefe ist erwiesen, dass der heptamere Sec-Komplex, bestehend aus Sec61-Komplex und Sec62/63-Komplex nötig ist (Panzner *et al.*, 1995a). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Integration der peroxisomalen Membranproteine posttranslational und Sec61p-abhängig stattfinden konnte. Falls der gleiche Komplex wie für sekretorische Proteine genutzt wird, wäre die Integration ebenfalls abhängig von Sec62p und Sec63p. Diese Abhängigkeit wurde zumindest für ein ScPex13p-YFP-Konstrukt *in vivo* bereits durch van der Zand *et al.* (2010) gesehen.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten South *et al.* (2001), dass Sec61p nicht in der peroxisomalen Biogenese involviert ist. South *et al.* untersuchten die Abhängigkeit der *de novo* Biogenese vom Sec61-Kanal im ER, und konkreter, ob ScPex3p durch den Sec61-Kanal in die ER-Membran integriert wird und danach Peroxisomen bilden kann. Dazu verwendeten sie eine kältesensitive Sec61-Hefemutante (Schekman, Pilon *et al.*, 1998), die bei 17 °C bestimmte Modellproteine nicht mehr ins ER importierte. Unter diesen Bedingungen war die peroxisomale Biogenese nach 20 bzw. 40 Stunden nach der Expression des ScPex3p (galaktoseinduziert aufgrund eines Galaktosepromoters) nicht signifikant beeinflusst.

In den *in vivo* Versuchen von South *et al.* wurde zunächst einmal eine andere Sec61-Mutante (*sec61-11*) als in dieser Arbeit verwendet, was eine Ursache für abweichende Ergebnisse sein könnte. Sie haben eine Mutante verwendet, die ihrer Aussage nach die „früheste“ und stärkste Blockierung der Proteintranslokation von den untersuchten Modellproteinen bewirkte. Auf welchen Grundlagen diese Blockierung beruht, ist nicht bekannt. Ebenfalls wurde nicht genannt, wie stark der Sec61-Gehalt in dieser Hefe zu den beobachteten Zeitpunkten depletiert war. Ob ähnlich restriktive Depletionsbedingungen wie in dieser Arbeit *in vitro* erzeugt wurden, auch *in vivo* erzeugt werden können, kann nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich darf man nicht erwarten, dass die *de novo* Biogenese der Peroxisomen durch partielle Sec61-Depletion komplett inhibiert werden kann. Eine partielle Sec61-Depletion kann auch immer nur zu einem Rückgang der peroxisomalen Biogenese führen, wie von Thoms *et al.* (2012) beobachtet wurde. Hinzu kommt, dass ein zu lang gewählter Beobachtungszeitraum diesen Rückgang retuschieren kann, was bei South *et al.* (2001) möglicherweise stattgefunden haben kann.

Andererseits könnte in dieser „frühen“ Phase der Blockierung auch die Interaktion von Chaperonen oder Targetingproteinen mit dem Sec61-Kanal beeinflusst sein. Über die Beteiligung von zytosolischen Chaperonen oder Targetingproteinen bei der PMP-Integration ist noch nichts bekannt. Die in dieser Arbeit gezeigte Energieabhängigkeit der Integration lässt vermuten, dass zytosolische Chaperone bei der Integration von ScPex3p und HsPEX3 beteiligt sind. Diese Chaperone könnten jedoch von den zytosolischen Chaperonen der

verwendeten Modellproteine oder auch generell der sekretorischen Proteine abweichen. Wenn die PMP im Gegensatz zu den Modellproteinen unterschiedliche Faktoren zur Integration in dieser „frühen“ Phase benötigen, kann das Ergebnis abweichen, d.h. die Integration der PMP mit Hilfe dieser Chaperone/Targetingproteine muss nicht beeinflusst sein.

Damit bestehen mehrere Erklärungsansätze, die die scheinbar widersprüchlichen Daten durch South *et al.* (2001) mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen vereinbaren lassen.

South *et al.* (2001) zeigten auch für den Ssh1-Komplex, dass dieser keinen Einfluss auf die peroxisomale Biogenese hat. Der trimere Sec61-Komplex besitzt in *Saccharomyces cerevisiae* ein Homolog, den Ssh1-Komplex. Dieser Ssh1-Komplex ist nicht essentiell (Finke *et al.*, 1996). Es wurde eine Hefe mit *Ssh1p-knockout* verwendet und auch hier war keine signifikante Beeinflussung der peroxisomalen Biogenese zu sehen. Für den Ssh1-Komplex wurde postuliert, dass dieser nur cotranslationale Substrate translozieren kann und, dass diese sich von den Substraten für den Sec61-Komplex unterscheiden könnten (Finke *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass ScPex3p in dieser Arbeit posttranslational integrieren konnte, spricht damit gegen eine Beteiligung des Ssh1-Komplexes an der Integration.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die in dieser Arbeit getesteten PMP der Bäckerhefe über den heptameren Sec-Komplex posttranslational in die ER-Membran integriert werden können, während das humane PEX3 eventuell einen Translokationskomplex verwendet, der aus dem Sec61-Kanal und weiteren Komponenten besteht, zu denen jedoch möglicherweise keine homologen Proteine für Sec71p und Sec72p gehören.

Ein weiterer Eintrittsort in die ER-Membran bildet das Get-System. Get1p und Get2p-abhängige Integration konnte bisher nur für *tail-anchored* Proteine beobachtet werden, d.h. Proteine, die einen Membrananker am C-Terminus besitzen (Schuldiner *et al.*, 2008). 24ScPex3p hat einen N-terminalen Membrananker (Höfeld *et al.*, 1991, Thoms *et al.*, 2012) und ist damit kein typisches Substrat für den Get-Weg. Dementsprechend konnte für 24ScPex3p auch gezeigt werden, dass die posttranslationale Integration nicht abhängig von den membranständigen Proteinen Get1p und Get2p stattfindet. Im Gegensatz dazu konnte für Sec22p die Abhängigkeit bestätigt werden (Abb. 3-25). Ebenfalls beobachtet wurde, dass das sekretorische Protein präpro-alpha Faktor in Δ get1,2-Mikrosomen translozieren konnte und damit keine indirekte Beeinflussung des heptameren Sec61-Komplexes vorlag (Daten nicht gezeigt).

Wahrscheinlich werden nicht alle PMP den Sec61-Kanal nutzen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ScPex3p Get1p und Get2p nicht benötigt, aber peroxisomale *tail-anchored* Proteine wie ScPex15p und peroxisomale Ascorbat Peroxidase könnten diese Membranproteine zur Integration in die ER-Membran nutzen, so dass eine Beteiligung dieser Proteine an der peroxisomalen *de novo* Biogenese nicht ausgeschlossen werden sollte.

4.5 EVOLUTIONÄRE KONSERVIERTHEIT DER INTEGRATION DES PEX3P

HsPEX3 konnte in dieser Arbeit *in vitro* in ER-Membranen aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) integrieren. Die Integration konnte posttranslational in Abhängigkeit von Energie stattfinden, genau wie zuvor in Säugermembranen beobachtet. Ebenso konnte die Integration des ScPex3p posttranslational und energieabhängig in ER-Membranen vom Säuger stattfinden. Erfolgreiche Integrationen zeigten auch die Glykosylierungsmutanten 24ScPex3p und 34/20HsPEX3 unter gleichen Bedingungen. Damit konnten zum einen die Komponenten der Hefemembranen bzw. Schweinemembranen die Integration des HsPEX3 bzw. ScPex3p übernehmen und zum anderen blieben sogar die Abläufe der Integrationen von ScPex3p und HsPEX3 in allen untersuchten Parametern erhalten. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Integration des HsPEX3 genau wie bei ScPex3p unabhängig von WRB und CAML (humane Homologe zu Get1p und Get2p; Vilardi *et al.*, 2011), dafür aber abhängig von Sec61 α ist (Homolog zu Sec61p; Hartmann *et al.*, 1994).

Gegen diese Konserviertheit sprechen Daten zur HsPEX16-Abhängigkeit der HsPEX3-Integration. HsPEX3 konnte in dieser Arbeit in Säugermembranen integrieren, in denen kein PEX16 detektiert werden konnte (Abb. 3-15). Und es konnte gezeigt werden, dass HsPEX3 *in vitro* in ER-Membranen aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) integrieren konnte.

Für die Integration des HsPEX3 in peroxisomale Membranen wurde bisher eine essentielle HsPEX16-Abhängigkeit beschrieben (Matsuzaki und Fujiki, 2008). Toro *et al.* (2009) beobachteten, dass HsPEX3-GFP in Zellen mit HsPEX16-Mutation ausschließlich in Mitochondrien zu finden war. Sie folgerten, dass die ER-Integration des HsPEX3 ebenfalls abhängig von HsPEX16 sein muss. Für HsPEX16 wurde bisher aber kein funktionales Homolog in Hefe gefunden (Kim und Mullen, 2013). Zusammengefasst sprechen die beiden Ergebnisse dieser Arbeit gegen eine essentielle Rolle von PEX16 bei der Integration des HsPEX3 in ER-Membranen. Andererseits wäre es aber auch durchaus möglich, dass der PEX16-Gehalt in den Schweinemikrosomen unter der Detektionsgrenze lag und gleichzeitig die Funktion des PEX16 in der Bäckerhefe von einem anderen Protein übernommen wurde.

Die Funktion des HsPEX16 ist bisher nicht eindeutig geklärt, bisher wurde eine Funktion bei der Integration des HsPEX3 in Membranen postuliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen diese Funktion zumindest bezogen auf die Integration in die ER-Membran bezweifeln. Eine Vermutung wäre, dass HsPEX16 im Menschen eine Funktion bei der präperoxisomalen Vesikelbildung am ER besitzen könnte, aber dies wäre derzeit nicht mit der Beobachtung durch Toro *et al.* (2009) vereinbar. Somit kann nicht abschließend geklärt werden, inwiefern HsPEX16 eine Rolle in der peroxisomalen Biogenese übernimmt.

Gegen die hier gemachten Beobachtungen sprechen ausserdem Kim und Mullen (2013; auch: Titorenko und Mullen, 2006), sie interpretierten die bisher auseinandergelassenen Beobachtungen in unterschiedlichen Spezies so, dass sie die peroxisomale Biogenese nicht in

einem Modell darstellten. Sie differenzierten zwischen der peroxisomalen Biogenese in Säugetieren, Hefe und Pflanzen. Matsuzaki und Fujiki (2008) beobachteten im Säuger ausschließlich direkte Integration in die peroxisomale Membran. Sie postulierten dennoch, dass die Mechanismen der Integration des Pex3p in anderen Spezies anders sein könnten. Auch wenn veröffentlichte *in vivo* Daten teilweise große Übereinstimmungen mit den hier präsentierten Daten aufweisen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* zusätzliche Faktoren das Verhalten der Proteine verändern könnten. Generell sprechen die hier erhobenen *in vitro* Daten, die keinerlei Unterschiede in der ER-Integration des Pex3p in Hefe und Säuger zeigen konnten, aber gegen die oben genannten Unterschiede zwischen den Arten und für eine evolutionäre Konserviertheit der ER-Integration, wenn nicht sogar der peroxisomalen Biogenese.

4.6 MATRIXPROTEIN SCPEX8P TRANSLOZIERT *IN VITRO* NICHT DURCH DIE ER-MEMBRAN

In dieser Arbeit wurde ScPex8p nicht proteasegeschützt in ER-Mikrosomen transloziert, während das sekretorische Protein präpro-alpha Faktor in die ER-Mikrosomen translozieren konnte und vor Verdau durch die Protease geschützt war. ScPex8p besitzt sechs putative N-Glykosylierungsstellen mit der Peptidsequenz NXT. Gegen eine *in vitro* Translokation des ScPex8p spricht, dass keine N-Glykosylierung des ScPex8p in diesem System beobachtet werden konnte, denn eine N-Glykosylierung im ER-Lumen wäre bei erfolgreicher Translokation möglich gewesen. Dagegen, dass transloziertes ScPex8p möglicherweise nicht vor Proteaseverdau geschützt werden konnte, spricht darüber hinaus die Beobachtung, dass der glykosylierte pro-alpha Faktor unter gleichen Bedingungen vor dem Verdau geschützt war.

ScPex8p agierte zum Teil alkaliresistent mit den ER-Membranen im Alkaliassay. Da ScPex8p keine Transmembrandomäne besitzt (Berechnung nach Tusnady und Simon, 1998 und 2001), könnte die alkaliresistente Fraktion kein alkaliresistenter Einbau, sondern stattdessen eine Anlagerung an die Membran sein. Diese Anlagerung kann generell in oder außerhalb der Mikrosomen stattgefunden haben. Zusammen mit den Ergebnissen des Proteaseschutzexperimentes spricht diese Beobachtung für eine Anlagerung ausserhalb der Mikrosomen. Periphere Membranproteine können sich alkaliresistent verhalten, ein Beispiel dafür ist Sec72p (Dissertation Christian Unger, 2000). Der GRAVY-Wert für das Gesamtprotein ScPex8p ist ein positiver Wert (0,15), d.h. dass ScPex8p ein hydrophobes Protein ist, das sich durch diesen Charakter eventuell an die Membran anlagern muss. Im Gegensatz dazu sind die Gesamtsequenzen von ScPex3p, HsPEX3, Cytochrom B5 und überraschenderweise auch Sec72p negativ, d.h. die Proteine sind in der Summe hydrophil. Im Einklang zu den Ergebnissen dieser Arbeit beobachteten Zipor *et al.* (2009), dass Pex8-mRNA bevorzugt an den Peroxisomen lokalisierte.

Unsere Ergebnisse stehen dagegen im Kontrast zu den Beobachtungen von van der Zand *et al.* (2010). Van der Zand *et al.* zeigten eine salzresistentes (1 M NaCl) und Proteinase K-geschütztes ScPex8p-YFP-Konstrukt, das sich durch Alkalibehandlung eines kruden Organellenpellets von den Membranen abtrennen lässt, wie es auch für Kar2p beobachtet wurde. Van der Zand verwendeten ein ScPex8p-YFP-Konstrukt bei dem das C-terminale YFP das PTS1-Signal maskierte und dadurch eventuell das Verhalten des Proteins verändert sein könnte (Wang *et al.*, 2004). Durch die Maskierung des PTS1-Signals könnte eventuell ein direkter Transport zu den Peroxisomen verhindert werden oder die Maskierung führt möglicherweise zu einer Fehltranslokation in das ER-Lumen. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass ScPex8p auch ohne PTS1 zu den Peroxisomen gelangen konnte (Deckers *et al.*, 2010). Hierbei wurde jedoch nicht im Speziellen der Weg untersucht, d.h. ob das Protein ohne PTS1 über das ER oder direkt zu den Peroxisomen gelangte. Auch generell wissen wir nicht, ob das Protein möglicherweise über beide Wege zu den Peroxisomen gelangen kann. Deshalb kann nicht gesagt werden, ob eine Maskierung das Verhalten des Proteins verändern kann. Es könnte aber sein, dass nur der PTS1-unabhängige Weg von ScPex8p über das ER geht. Und durch die Maskierung wurde dieser Weg bevorzugt, während in den Versuchen dieser Arbeit das PTS1-Signal nicht maskiert war und dadurch möglicherweise die ER-Translokation verhindert wurde.

Demgegenüber könnten für eine Translokation des ScPex8p ins ER andere Faktoren essentiell sein als für die Translokation von sekretorischen Proteinen. Wenn diese Faktoren im System nicht vorhanden waren, könnte deshalb eventuell keine Translokation in dieser Arbeit beobachtet worden sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass ScPex8p nicht in das ER transloziert wurde und daher eventuell nur durch die peroxisomale Membran transloziert wird. Girzalsky *et al.* (2006) vermuteten, dass auch periphere Membranproteine und damit auch ScPex8p Pex19p-abhängig sein könnten. ScPex8p besitzt im Widerspruch dazu aber eine PTS1 und sogar zusätzlich eine Sequenz, die große Ähnlichkeit zum PTS2 besitzt (RAX₅QL anstatt RLX₅QL). Es wurde außerdem gefunden, dass das PTS1 von ScPex8p an Pex5p binden kann (Rehling *et al.*, 2000). Damit existieren derzeit viele Hypothesen für den Weg von ScPex8p zu den Peroxisomen. a) direkter Transport in Abhängigkeit von Pex5p (und Translokationsapparat) b) direkter Transport in Abhängigkeit von Pex7p (und Translokationsapparat) c) direkter Transport in Abhängigkeit von Pex19p (und Pex3p) oder d) indirekter Transport mit Beteiligung des ER.

Für den Import von Matrixproteinen ist Pex8p essentiell (Rehling *et al.*, 2000). Würde ScPex8p ausschließlich über den Translokationsapparat in die Peroxisomenmatrix gelangen, wäre der Import abhängig von sich selbst. Dieser Umstand wäre möglich, solange man davon ausging, dass Peroxisomen sich ausschließlich durch Teilung vermehrten und somit immer Pex8p in dem Peroxisom vorhanden war und dann weitere Moleküle transloziert werden konnten. Vor dem Hintergrund, dass Peroxisomen *de novo* gebildet werden können, ist dieser Mechanismus aber nicht mehr haltbar, d.h. es ist ein anderer Transportweg zu erwarten, der

unabhängig vom gesamten Translokationsapparat in der Peroxisomenmembran Pex8p in die Matrix transportiert. Dieser Transportweg könnte über das ER führen, hierfür sprechen derzeit nur die Daten von van der Zand *et al.* (2010). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Translokation des ScPex8p in die Peroxisomen lediglich abhängig von ScPex14p und ScPex5p ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit und andere Daten sprechen zusammengefasst dafür, dass ScPex8p nicht in das ER-Lumen translozieren kann und damit auch nicht über das ER und danach in präperoxisomalen Vesikeln zu den Peroxisomen gelangen kann, sondern nach der Synthese direkt zu den Peroxisomen transportiert wird.

Das Matrixprotein Luziferase wies in dieser Arbeit keine alkaliresistente Interaktion mit den Mikrosomen auf im Gegensatz zum Matrixprotein ScPex8p. Damit wurde gezeigt, dass nicht alle Matrixproteine sich alkaliresistent an Membranen anlagern, sondern ScPex8p als peripheres Matrixprotein wahrscheinlich eine Ausnahme darstellt. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse des ScPex8p und der Luziferase nicht für die Existenz eines indirekten Proteintransportweges von Matrixproteinen über das ER.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Da alle peroxisomalen Proteine kernkodiert sind, müssen sie nach der Synthese im Zytosol zu den Peroxisomen gelangen. Neben dem Modell eines direkten Transportweges zu den Peroxisomen existiert für peroxisomale Membranproteine (PMP) ein Modell, das einen indirekten Proteintransportweg über das ER zu den Peroxisomen formuliert. Der indirekte Proteintransportweg wird zurzeit stark diskutiert. Über den ersten Schritt dieses Transportweges, also über die Integration der PMP in die ER-Membran, ist bisher besonders wenig bekannt. Für das humane PEX3 existieren z.B. derzeit sehr widersprüchliche Angaben über eine mögliche ER-Integration. Aktuell besteht darüber hinaus die Frage, ob neben Klasse II PMP auch Klasse I PMP in die ER-Membran integrieren können und, ob das peroxisomale Matrixprotein ScPex8p über die ER-Membran translozieren kann und damit über das ER zu den Peroxisomen gelangen könnte.

In dieser Arbeit konnte die alkaliresistente *in vitro* Integration des PMP ScPex3p in ER-Membranen der Bäckerhefe gezeigt werden. Unter gleichen Bedingungen konnte auch die ER-spezifische *in vitro* Integration des humanen PEX3 in Säugermikrosomen beobachtet werden. Die beobachteten, alkaliresistenten Integrationen der PMP ScPex22p und ScPex13p weisen weitergehend darauf hin, dass der indirekte Proteintransportweg über das ER nicht nur von Klasse II PMP genutzt werden könnte, da mit ScPex13p auch ein Klasse I PMP in die ER-Mikrosomen integriert werden konnte. Das Matrixprotein ScPex8p konnte dagegen nicht proteasegeschützt in ER-Mikrosomen translozieren, was gegen einen indirekten Proteintransportweg für ScPex8p zu den Peroxisomen spricht.

Die Charakterisierung der PMP-Integrationen zeigte überraschenderweise, dass die getesteten PMP die Fähigkeit zur posttranslationalen Integration in die ER-Membran besitzen. Für diese posttranslationale Integration des ScPex3p und des HsPEX3 konnte eine Abhängigkeit von energieverbrauchenden Proteinen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu benötigten die posttranslationalen Integrationen des ScPex22p und des ScPex13p deutlich weniger Energie. Darüber hinaus konnte mit einer Glykosylierungsmutante des ScPex3p gezeigt werden, dass die posttranslationale Integration in die ER-Membran über den Sec61-Kanal erfolgte. Dagegen wurde eine essentielle Beteiligung der membranständigen Transportproteine Get1p und Get2p der ER-Membran ausgeschlossen.

Mit der Integration des HsPEX3 in ER-Membranen der Hefe konnte abschließend belegt werden, dass die Integration dieses Säugerproteins durch die Komponenten in der ER-Membran der Hefe durchgeführt werden konnte. Die Integration des ScPex3p in Säugermembranen wurde ebenfalls beobachtet. Diese Daten weisen auf einen evolutionär konservierten Integrationsmechanismus hin und unterstützen damit das Modell eines evolutionär konservierten Proteintransportweges der PMP über das ER zu den Peroxisomen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abell, B.M., Pool, M.R., Schlenker, O., Sinning, I., and High, S. (2004). Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J* 23, 2755-2764.
- Awe, K., Lambert, C., and Prange, R. (2008). Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett* 582, 3179-3184.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 15, 2069-2076.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67, 835-851.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M., and Borgese, N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J Cell Biol* 175, 767-777.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Soffientini, P., Stefanovic, S., Makarow, M., Hegde, R.S., and Borgese, N. (2005). Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J* 24, 2533-2542.
- Brodsky, J.L., Goekeler, J., and Schekman, R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9643-9646.
- Buchberger, A., Bukau, B., and Sommer, T. (2010). Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell* 40, 238-252.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M., and Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques*, 376-378.
- Carvalho, A.F., Pinto, M.P., Grou, C.P., Alencastre, I.S., Fransen, M., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2007). Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J Biol Chem* 282, 31267-31272.
- Colombo, S.F., Longhi, R., and Borgese, N. (2009). The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. *J Cell Sci* 122, 2383-2392.

- Connolly, T., Rapiejko, P.J., and Gilmore, R. (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* 252, 1171-1173.
- Corsi, A.K., and Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 30299-30302.
- Crowley, K.S., Reinhart, G.D., and Johnson, A.E. (1993). The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101-1115.
- D'Arrigo, A., Manera, E., Longhi, R., and Borgese, N. (1993). The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways. *J Biol Chem* 268, 2802-2808.
- Danzenbächer, N. (2010). Untersuchungen zur Ribosomenbindung an zwei verschiedene Populationen des Sec61-Komplexes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In Institut für Biologie (Universität zu Lübeck).
- Deckers, M., Emmrich, K., Girzalsky, W., Awa, W.L., Kunau, W.H., and Erdmann, R. (2010). Targeting of Pex8p to the peroxisomal importomer. *Eur J Cell Biol* 89, 924-931.
- Degenhardt, F. (2009). Rekombinante Herstellung des PNAC-assoziierten Proteins Calreticulin sowie der Heprezeptoren A und AB. In Institut für Biologie (Universität zu Lübeck).
- Denic, V. (2012). A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends Biochem Sci* 37, 411-417.
- Deshaies, R.J., and Schekman, R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 105, 633-645.
- Deshaies, R.J., and Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 109, 2653-2664.
- Diestelkötter, P., and Just, W.W. (1993). In vitro insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* 123, 1717-1725.
- Distel, B., Erdmann, R., Gould, S.J., Blobel, G., Crane, D.I., Cregg, J.M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J.M., Just, W.W., *et al.* (1996). A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol* 135, 1-3.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M.O., Schekman, R., and Képès, F. (1994). SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J Biol Chem* 269, 27478-27485.
- Fang, Y., Morrell, J.C., Jones, J.M., and Gould, S.J. (2004). PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 863-875.

- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., and Sommer, T. (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J* *15*, 1482-1494.
- Fransen, M., Vastiau, I., Brees, C., Brys, V., Mannaerts, G.P., and Van Veldhoven, P.P. (2004). Potential role for Pex19p in assembly of PTS-receptor docking complexes. *J Biol Chem* *279*, 12615-12624.
- Fransen, M., Wylin, T., Brees, C., Mannaerts, G.P., and Van Veldhoven, P.P. (2001). Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol Cell Biol* *21*, 4413-4424.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., and Lazarow, P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* *93*, 97-102.
- Fujiki, Y., Yagita, Y., and Matsuzaki, T. (2012). Peroxisome biogenesis disorders: molecular basis for impaired peroxisomal membrane assembly: in metabolic functions and biogenesis of peroxisomes in health and disease. *Biochim Biophys Acta* *1822*, 1337-1342.
- Gething, M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* *10*, 465-472.
- Ghaedi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Matsuzono, Y., and Fujiki, Y. (2000). The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* *11*, 2085-2102.
- Girzalsky, W., Hoffmann, L.S., Schemenewitz, A., Nolte, A., Kunau, W.H., and Erdmann, R. (2006). Pex19p-dependent targeting of Pex17p, a peripheral component of the peroxisomal protein import machinery. *J Biol Chem* *281*, 19417-19425.
- Girzalsky, W., Saffian, D., and Erdmann, R. (2010). Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta* *1803*, 724-731.
- Glover, J.R., Andrews, D.W., and Rachubinski, R.A. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10541-10545.
- Gogala, M., Becker, T., Beatrix, B., Armache, J.P., Barrio-Garcia, C., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2014). Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature* *506*, 107-110.
- Gould, S.G., Keller, G.A., and Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* *105*, 2923-2931.
- Gouveia, A.M., Reguenga, C., Oliveira, M.E., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2000). Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein. *J Biol Chem* *275*, 32444-32451.
- Grunau, S., Schliebs, W., Linnepe, R., Neufeld, C., Cizmowski, C., Reinartz, B., Meyer, H.E., Warscheid, B., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2009). Peroxisomal targeting of PTS2 pre-import complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* *10*, 451-460.

- Görlich, D., and Rapoport, T.A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-630.
- Götte, K., Girzalsky, W., Linkert, M., Baumgart, E., Kammerer, S., Kunau, W.H., and Erdmann, R. (1998). Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 616-628.
- Halbach, A., Rucktäschel, R., Rottensteiner, H., and Erdmann, R. (2009). The N-domain of Pex22p can functionally replace the Pex3p N-domain in targeting and peroxisome formation. *J Biol Chem* 284, 3906-3916.
- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M.R., Sinning, I., and Beckmann, R. (2006). Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* 312, 745-747.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87, 721-732.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T.A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367, 654-657.
- Hettema, E.H., Girzalsky, W., van Den Berg, M., Erdmann, R., and Distel, B. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J* 19, 223-233.
- High, S., and Abell, B.M. (2004). Tail-anchored protein biosynthesis at the endoplasmic reticulum: the same but different. *Biochem Soc Trans* 32, 659-662.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P., and Tabak, H.F. (2005). Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122, 85-95.
- Höhfeld, J., Veenhuis, M., and Kunau, W.H. (1991). PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *J Cell Biol* 114, 1167-1178.
- Islinger, M., Lüers, G.H., Zischka, H., Ueffing, M., and Völkl, A. (2006). Insights into the membrane proteome of rat liver peroxisomes: microsomal glutathione-S-transferase is shared by both subcellular compartments. *Proteomics* 6, 804-816.
- Jackson, R.C., and Blobel, G. (1977). Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5598-5602.
- Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., and Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell*, 5. edn (New York: Garland Science).
- Johnson, N., Vilardi, F., Lang, S., Leznicki, P., Zimmermann, R., and High, S. (2012). TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci* 125, 3612-3620.

- Jones, J.M., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2001). Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* *153*, 1141-1150.
- Jones, J.M., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2004). PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* *164*, 57-67.
- Kalies, K.U., Rapoport, T.A., and Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* *141*, 887-894.
- Karnik, S.K., and Trelease, R.N. (2007). Arabidopsis peroxin 16 trafficks through the ER and an intermediate compartment to pre-existing peroxisomes via overlapping molecular targeting signals. *J Exp Bot* *58*, 1677-1693.
- Kim, P.K., Janiak-Spens, F., Trimble, W.S., Leber, B., and Andrews, D.W. (1997). Evidence for multiple mechanisms for membrane binding and integration via carboxyl-terminal insertion sequences. *Biochemistry* *36*, 8873-8882.
- Kim, P.K., and Mullen, R.T. (2013). PEX16: a multifaceted regulator of peroxisome biogenesis. *Front Physiol* *4*, 241.
- Kim, P.K., Mullen, R.T., Schumann, U., and Lippincott-Schwartz, J. (2006). The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol* *173*, 521-532.
- Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., and Distel, B. (2005). Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a *Saccharomyces cerevisiae* pex3Delta strain. *J Biol Chem* *280*, 34350-34357.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B., and Rapoport, T.A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* *14*, 217-223.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* *157*, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lakkaraju, A.K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J.L., Taunton, J., and Strub, K. (2012). Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell* *23*, 2712-2722.
- Lam, S.K., Yoda, N., and Schekman, R. (2010). A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 21523-21528.
- Lazarow, P.B. (2006). The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1599-1604.

- Lazarow, P.B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530.
- Lyman, S.K., and Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88, 85-96.
- Ma, C., Agrawal, G., and Subramani, S. (2011). Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* 193, 7-16.
- Ma, C., Hagstrom, D., Polley, S.G., and Subramani, S. (2013). Redox-regulated cargo binding and release by the peroxisomal targeting signal receptor, Pex5. *J Biol Chem* 288, 27220-27231.
- Ma, C., and Subramani, S. (2009). Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *IUBMB Life* 61, 713-722.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.
- Matsuzaki, T., and Fujiki, Y. (2008). The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *J Cell Biol* 183, 1275-1286.
- Matsuzono, Y., and Fujiki, Y. (2006). In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p. *J Biol Chem* 281, 36-42.
- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R., and Erdmann, R. (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol* 12, 273-277.
- Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T.A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* 13, 3973-3982.
- Motley, A.M., and Hettema, E.H. (2007). Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J Cell Biol* 178, 399-410.
- Mullen, R.T., Lisenbee, C.S., Miernyk, J.A., and Trelease, R.N. (1999). Peroxisomal membrane ascorbate peroxidase is sorted to a membranous network that resembles a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 11, 2167-2185.
- Muntau, A.C., Roscher, A.A., Kunau, W.H., and Dodt, G. (2003). The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. *Eur J Cell Biol* 82, 333-342.
- Müsch, A., Wiedmann, M., and Rapoport, T.A. (1992). Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69, 343-352.
- Nair, D.M., Purdue, P.E., and Lazarow, P.B. (2004). Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 167, 599-604.

- Ngosuwan, J., Wang, N.M., Fung, K.L., and Chirico, W.J. (2003). Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278, 7034-7042.
- Nilsson, I.M., and von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 268, 5798-5801.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T.A. (1995a). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81, 561-570.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T.A. (1995b). Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 31-40.
- Park, E., and Rapoport, T.A. (2012). Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys* 41, 21-40.
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D., and Schekman, R. (1998). Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 9, 3455-3473.
- Platta, H.W., El Magraoui, F., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2007). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J Cell Biol* 177, 197-204.
- Platta, H.W., Hagen, S., and Erdmann, R. (2013). The exportomer: the peroxisomal receptor export machinery. *Cell Mol Life Sci* 70, 1393-1411.
- Pool, M.R., Stumm, J., Fulga, T.A., Sinning, I., and Dobberstein, B. (2002). Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science* 297, 1345-1348.
- Rabu, C., Wipf, P., Brodsky, J.L., and High, S. (2008). A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 283, 27504-27513.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B., and Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* 65, 271-303.
- Rapoport, T.A., Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B., and Staeck, O. (1999). Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380, 1143-1150.
- Rehling, P., Skaletz-Rorowski, A., Girzalsky, W., Voorn-Brouwer, T., Franse, M.M., Distel, B., Veenhuis, M., Kunau, W.H., and Erdmann, R. (2000). Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor pex5p. *J Biol Chem* 275, 3593-3602.

- Rothblatt, J.A., and Meyer, D.I. (1986). Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro-alpha-factor in vitro can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. *EMBO J* 5, 1031-1036.
- Rottensteiner, H., Kramer, A., Lorenzen, S., Stein, K., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., and Erdmann, R. (2004). Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol Biol Cell* 15, 3406-3417.
- Scheele, G.A. (1980). Biosynthesis, segregation, and secretion of exportable proteins by the exocrine pancreas. *Am J Physiol* 238, G467-477.
- Schlenstedt, G., Gudmundsson, G.H., Boman, H.G., and Zimmermann, R. (1990). A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem* 265, 13960-13968.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H.D., Schwappach, B., and Weissman, J.S. (2008). The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134, 634-645.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2011a). A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell* 147, 1576-1588.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2011b). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 25-56.
- Singer, S.J., Maher, P.A., and Yaffe, M.P. (1987). On the transfer of integral proteins into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1960-1964.
- South, S.T., Baumgart, E., and Gould, S.J. (2001). Inactivation of the endoplasmic reticulum protein translocation factor, Sec61p, or its homolog, Ssh1p, does not affect peroxisome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12027-12031.
- South, S.T., Sacksteder, K.A., Li, X., Liu, Y., and Gould, S.J. (2000). Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* 149, 1345-1360.
- Spiro, R.G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R-56R.
- Stokes, V. (2012). Nachweis und Charakterisierung des post-translationalen Transports kleiner Proteine in das Endoplasmatische Retikulum des Säugers. In Institut für Biologie (Lübeck: Universität zu Lübeck).
- Takagaki, Y., Radhakrishnan, R., Wirtz, K.W., and Khorana, H.G. (1983). The membrane-embedded segment of cytochrome b5 as studied by cross-linking with photoactivatable phospholipids. II. The nontransferable form. *J Biol Chem* 258, 9136-9142.
- Tam, Y.Y., Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., and Rachubinski, R.A. (2005). Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 34933-34939.

- Thoms, S., Harms, I., Kalies, K.U., and Gärtner, J. (2012). Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic* *13*, 599-609.
- Titorenko, V.I., and Mullen, R.T. (2006). Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J Cell Biol* *174*, 11-17.
- Toikkanen, J., Gatti, E., Takei, K., Saloheimo, M., Olkkonen, V.M., Söderlund, H., De Camilli, P., and Keränen, S. (1996). Yeast protein translocation complex: isolation of two genes SEB1 and SEB2 encoding proteins homologous to the Sec61 beta subunit. *Yeast* *12*, 425-438.
- Toro, A.A., Araya, C.A., Córdova, G.J., Arredondo, C.A., Cárdenas, H.G., Moreno, R.E., Venegas, A., Koenig, C.S., Cancino, J., Gonzalez, A., *et al.* (2009). Pex3p-dependent peroxisomal biogenesis initiates in the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *J Cell Biochem* *107*, 1083-1096.
- Tusnády, G.E., and Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* *283*, 489-506.
- Tusnády, G.E., and Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* *17*, 849-850.
- Unger, C. (2000). Analyse funktioneller Domänen von SEC71 und SEC72 im posttranslationalen Translokationsprozeß von *Saccharomyces cerevisiae* (Humboldt-Universität zu Berlin).
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* *427*, 36-44.
- van der Zand, A., Braakman, I., and Tabak, H.F. (2010). Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* *21*, 2057-2065.
- van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I., and Tabak, H.F. (2012). Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* *149*, 397-409.
- Vashist, S., Kim, W., Belden, W.J., Spear, E.D., Barlowe, C., and Ng, D.T. (2001). Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol* *155*, 355-368.
- Vilardi, F., Lorenz, H., and Dobberstein, B. (2011). WRB is the receptor for TRC40/Asn1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci* *124*, 1301-1307.
- Vogel, J.P., Misra, L.M., and Rose, M.D. (1990). Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol* *110*, 1885-1895.
- Voorn-Brouwer, T., Kragt, A., Tabak, H.F., and Distel, B. (2001). Peroxisomal membrane proteins are properly targeted to peroxisomes in the absence of COPI- and COPII-mediated vesicular transport. *J Cell Sci* *114*, 2199-2204.

- Wain, H.M., Bruford, E.A., Lovering, R.C., Lush, M.J., Wright, M.W., and Povey, S. (2002). Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* *79*, 464-470.
- Walter, P., and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 7112-7116.
- Walter, P., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* *91*, 557-561.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* *96*, 84-93.
- Walton, P.A., Hill, P.E., and Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* *6*, 675-683.
- Wang, X., McMahon, M.A., Shelton, S.N., Nampaisansuk, M., Ballard, J.L., and Goodman, J.M. (2004). Multiple targeting modules on peroxisomal proteins are not redundant: discrete functions of targeting signals within Pmp47 and Pex8p. *Mol Biol Cell* *15*, 1702-1710.
- Waters, M.G., and Blobel, G. (1986). Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J Cell Biol* *102*, 1543-1550.
- Whitley, P., Grahn, E., Kutay, U., Rapoport, T.A., and von Heijne, G. (1996). A 12-residue-long poly-leucine tail is sufficient to anchor synaptobrevin to the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* *271*, 7583-7586.
- Wickner, W.T., and Lodish, H.F. (1985). Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* *230*, 400-407.
- Yabal, M., Brambillasca, S., Soffientini, P., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Makarow, M. (2003). Translocation of the C terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. *J Biol Chem* *278*, 3489-3496.
- Young, B.P., Craven, R.A., Reid, P.J., Willer, M., and Stirling, C.J. (2001). Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *EMBO J* *20*, 262-271.
- Zipor, G., Haim-Vilmovsky, L., Gelin-Licht, R., Gadir, N., Brocard, C., and Gerst, J.E. (2009). Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 19848-19853.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Enno Hartmann danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion im Institut für Biologie an der Universität zu Lübeck anfertigen zu können, sowie für sein aufrichtiges Interesse an meiner Arbeit und für seine andauernde Unterstützung.

Mein Dank gilt PD Dr. Kai-Uwe Kalies für die Vergabe des interessanten Themas, die Gutachtertätigkeit, die gute Betreuung während der gesamten Zeit und fürs Bier.

Bei Prof. Dr. Tautz möchte ich mich für die Gutachtertätigkeit bedanken.

Ich danke besonders Ralf Erdmann, Wolfgang Girzalsky, Sven Thoms, Stephen High, Blanche Schwappach, Vlad Denic, Irene Coin und Martin van der Laan für schnelle Antworten und unkomplizierte Überlassung von Hefen, DNA, Plasmiden, Antikörpern, Substanzen und Protokollen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Biologie und des Isotopenlabors für das sehr gute Arbeitsklima und die Unterstützung bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Eik und meinen Eltern für ihre Liebe, ihr Vertrauen und die Kraft, die sie mir gegeben haben.

Danke !

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Imke Brauer geb. Harms, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Lübeck, den

Imke Brauer geb. Harms

