



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus dem Institut für Biologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. E. Hartmann**

„Pex8 und sein Weg ins Peroxisom“

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Frauke Kerlin
aus Salzwedel

Lübeck, 2023

1. Berichtstatter/Berichtstatterin: PD. Dr. Kai-Uwe Kalies
2. Berichtstatter/Berichtstatterin: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.07.2023

Inhalt

Zusammenfassung	6
Abstract	7
1. Einleitung.....	8
1.1 Peroxisomen.....	8
1.2 Peroxine	8
1.3 Biogenese von Peroxisomen.....	9
1.4 Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum	12
1.5 Peroxisomale Targetingsignale.....	14
1.6 Import von Matrixproteinen.....	14
1.7 Pex8p	18
1.8 Zielsetzung	20
2. Material & Methoden.....	21
2.1 Geräte	21
2.2 Chemikalien, Enzyme & Kits.....	21
2.3 Mikroorganismen	22
2.3.1 Bakterien	22
2.3.2 Hefen	23
2.4 Plasmide und Nukleinsäuren	24
2.5 Oligonukleotide	26
2.6 Antikörper	27
2.7 Quantitative analytische Methoden.....	27
2.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	27
2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.8 Herstellung von Plasmid-DNA mittels Klonierung.....	28
2.8.1 Polymerasekettenreaktion.....	28
2.8.2 Restriktionsverdau	28
2.8.3 Phosphorylierung.....	28
2.8.4 Ligation	28

2.8.5	Transformation in <i>E. coli</i> und Plasmidpräparation	29
2.9	Zellkultur und zellbiologische Methoden.....	29
2.9.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	29
2.9.1.1	Medien und Wachstumsbedingungen	29
2.9.1.2	Anlegen von Dauerkulturen	29
2.9.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	29
2.9.2.1	Medien und Wachstumsbedingungen	29
2.9.2.2	Anlegen von Dauerkulturen	31
2.9.2.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	31
2.9.2.4	Ölsäure-Wachstumstest.....	32
2.9.2.5	Mechanischer Aufschluss mittels Glasperlen und PNGase F-Verdau	32
2.9.2.6	Enzymatischer Aufschluss mittels Zymolyase und Proteinase K -Verdau.....	33
2.10	Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.10.1	Präparation von Mikrosomen aus Hefezellen.....	34
2.10.2	Präparation von Mikrosomen aus Hund	35
2.10.3	<i>In vitro</i> Transkription	36
2.10.4	<i>In vitro</i> Translation.....	37
2.10.5	Co-translationaler Transportassay	37
2.10.6	Proteinase K -Verdau	38
2.10.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.10.8	Immunochemische Proteindetektion im Western Blot	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	FLAG-getaggte Varianten des Pex8p können <i>PEX8</i> -Knockout komplementieren.....	40
3.2	Pex8p wird <i>in vivo</i> nicht glykosyliert.....	44
3.3	Pex8p wird <i>in vitro</i> nicht in raue Hefemembranen transportiert	46
3.4	Glykosylierungsstellen des Pex8p können modifiziert werden	51
3.5	α F_Pex8 kann Knockout des <i>PEX8</i> komplementieren.....	55
3.6	Pex8p mit Signalsequenz wird <i>in vivo</i> nicht mehrfach glykosyliert.....	57
3.7	Mutationen im postulierten PTS2 haben keinen Effekt auf die Bildung von Peroxisomen	59

3.8	Deletion des putativen PTS2 sorgt für Verlust von funktionalen Peroxisomen.....	61
3.9	Deletion des Nonapeptids hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des Pex8p	62
4.	Diskussion	65
4.1	Pex8p wird nicht in das endoplasmatische Retikulum transportiert	65
4.1.1	Pex8p wird nicht glykosyliert.....	65
4.1.2	Glykosylierungsstellen des Pex8p können prinzipiell genutzt werden.....	66
4.1.3	Pex8p wird direkt in Peroxisomen importiert.....	67
4.2	Postuliertes PTS2 im Pex8p ist nicht für das <i>Targeting</i> verantwortlich	71
5.	Literaturverzeichnis	75
6.	Anhang.....	86
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	86
6.2	Tabellenverzeichnis.....	87
6.3	Abbildungsverzeichnis	88
6.4	Danksagung	89

Zusammenfassung

Nach wie vor ist die Biogenese von Peroxisomen nicht vollständig untersucht. Neben dem Model von Wachstum und Teilung rückt das endoplasmatische Retikulum (ER) als Quelle der peroxisomalen Membranproteine (PMP) immer weiter in den Fokus. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass alle PMPs zunächst in das ER transportiert werden. Von dort erfolgt der Weitertransport in die Peroxisomen. Auch für das an der luminalen Seite der Peroxisomenmembran vorliegende periphere Membranprotein Pex8p wird postuliert, dass es zu den Peroxinen gehört, die den Weg über das ER gehen. Obwohl Pex8p beide bekannten peroxisomalen Targetingsignale (PTS) trägt und keine ER-spezifische Signalsequenz besitzt, soll es zunächst ins ER importiert werden. Interessanterweise besitzt das Peroxin jedoch sieben mögliche Glykosylierungsstellen, die im Lumen des ERs modifiziert werden könnten. Vor diesem Hintergrund sollte genauer untersucht werden, ob die vorhandenen Glykosylierungsstellen tatsächlich glykosyliert werden. Dazu wurde zunächst *in vivo* untersucht, ob eine glykosylierte Form des Pex8p nachgewiesen werden kann. Dabei zeigte sich, dass kein glykosyliertes Pex8p in den Zellen vorliegt. *In vitro* Untersuchungen lieferten jedoch die Erkenntnis, dass die Glykosylierungsstellen des Peroxins prinzipiell modifiziert werden können, wenn das Protein mit Hilfe einer ER-spezifischen Signalsequenz ins ER gezwungen wird. Dies spricht dafür, dass es keinen ER-Import von Pex8p gibt. Somit konnte gezeigt werden, dass Pex8p nicht zu den Peroxinen gehört, die zunächst in das endoplasmatische Retikulum transportiert werden.

Pex8 ist das bisher einzige bekannte Peroxin, das beide bekannten peroxisomalen Targetingsignale trägt. Es ist bekannt, dass das C-terminale PTS1 des Pex8p für das *Targeting* des Proteins nicht essentiell ist. Mutanten ohne das C-terminale Tripeptid liegen nach wie vor funktional in Peroxisomen vor. Bezüglich des postulierten PTS2 ist nicht klar, ob das Signal eine Rolle im Transport des Pex8p zu den Peroxisomen spielt. Es ist lediglich bekannt, dass die ersten 112 Aminosäuren des Peroxins ausreichen, um ein Reporterprotein in Peroxisomen zu dirigieren. Ob dabei das mögliche PTS2 das *Targeting* übernimmt, ist nicht geklärt. Basierend darauf sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob das potentielle PTS2 ein essentielles Targetingsignal darstellt. Punktmutationen innerhalb des PTS2 zeigten keinerlei Defekt in der Bildung von Peroxisomen. Die Deletion des gesamten Nonapeptids hingegen führte dazu, dass sich keine importfähigen Peroxisomen ausbilden konnten. Dies konnte unabhängig von der Anwesenheit des C-terminalen PTS1 beobachtet werden. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die fehlende Neogenese der Organellen bei der Deletion des PTS2 eher auf einen Funktionsverlust zurückzuführen ist und weniger auf eine Fehllokalisierung des Peroxins. Durch einen Proteaseverdau konnte diese These untermauert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Pex8p ohne das postulierte PTS2 nach wie vor in peroxisomalen Strukturen, den *ghosts*, nachgewiesen werden kann. Auch bei zusätzlicher Deletion des PTS1 kann keine Fehllokalisierung des Peroxins festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass das PTS2 wichtig für die Ausübung der Funktion des Pex8p ist und nicht für dessen *Targeting* in die Peroxisomen.

Abstract

The biogenesis of peroxisomes is still not fully understood. In addition to the model of growth and division, the endoplasmic reticulum (ER) is increasingly coming into focus as the source of peroxisomal membrane proteins (PMPs). Thus, it has been hypothesized that all PMPs are first transported into the ER. From there, onward transport into the peroxisomes occurs. The peripheral membrane protein Pex8p, which is present at the luminal side of the peroxisomal membrane, is also postulated to be one of the peroxins that travel via the ER. Although Pex8p carries both known peroxisomal targeting signals (PTS) and does not have an ER-specific signal sequence, it is thought to be imported into the ER. Interestingly, however, this peroxin has seven possible glycosylation sites that can be modified in the ER lumen. With this in mind, it should be investigated in more detail whether the glycosylation sites present can actually be glycosylated. To this end, we first examined *in vivo* whether a glycosylated form of Pex8p could be detected. This showed that no glycosylated Pex8p was present in the cells. However, *in vitro* studies provided evidence that the glycosylation sites of peroxin can be modified when the protein is forced into the ER using an ER-specific signal peptide. Taken together, the results show that there is no import of Pex8p into the endoplasmic reticulum.

Pex8 is the only known peroxin to date that carries both known peroxisomal targeting signals. It is known that the C-terminal PTS1 of Pex8p is not essential for targeting the protein. Mutants lacking the C-terminal tripeptide are still functionally present in peroxisomes. Regarding the postulated PTS2, it is not clear whether the signal plays a role in the transport of Pex8p to peroxisomes. It is only known that the N-terminal region of the peroxin is sufficient to direct a reporter protein into peroxisomes. Whether the possible PTS2 does the targeting in this process has not been clarified. Based on this, this work aimed to investigate whether the potential PTS2 is an essential targeting signal. Point mutations within PTS2 did not show any defect in peroxisome formation. Deletion of the entire nonapeptide, on the other hand, resulted in the failure to form importable peroxisomes. This was observed independently of the presence of the C-terminal PTS1. This suggests that the lack of organelle neogenesis upon deletion of PTS2 is due to a loss of function rather than mislocalization of peroxin. Protease digestion was used to support this hypothesis. It could be shown that Pex8p can still be detected in peroxisomal *ghosts* without the postulated PTS2. Even when PTS1 is additionally deleted, there is no mislocalization of the peroxin. This suggests that PTS2 is important for exerting the function of Pex8p and not for its targeting to peroxisomes.

1. Einleitung

1.1 Peroxisomen

Peroxisomen sind Organellen eukaryotischer Zellen, die von einer einfachen Membran umschlossen sind. Diese wurden in den 1950er Jahren zuerst beobachtet und als „*microbodies*“ bezeichnet (Bernhard and Rouiller, 1956). Durch Untersuchungen von De Duve and Baudhuin (1966) konnten den Organellen erstmals Funktionen zugeordnet werden. Man stellte fest, dass H_2O_2 -produzierende Oxidasen und die Katalase in den *microbodies* nachgewiesen werden können. Dies führte dazu, dass die neuen Organellen als Peroxisomen bezeichnet worden sind. Mittlerweile sind eine Reihe metabolischer Funktionen der Peroxisomen bekannt. So spielen die Organellen zum Beispiel eine wichtige Rolle in der α - und β -Oxidation von Fettsäuren. Während in menschlichen Zellen nur der Abbau von langkettigen Fettsäuren peroxisomal abläuft (Lazarow and De Duve, 1976), konnten Kunau et al. (1988) zeigen, dass die β -Oxidation von Fettsäuren in niederen Pilzen ausschließlich in Peroxisomen stattfindet. In den letzten Jahren konnten den Peroxisomen weitere Funktionen zugeordnet werden. So stellte man fest, dass der Beginn der Plasmalogenbiosynthese in Peroxisomen stattfindet (Hajra and Bishop, 1982) und dass peroxisomale Proteine an der Biosynthese von Cholesterin und Gallensäure beteiligt sind (Biardi and Krisans, 1996; Krisans, 1992). Auch der Metabolismus des Prostaglandins findet unter Mitwirkung peroxisomaler Proteine statt (Schepers et al., 1988). Als Antwort auf veränderte Umgebungsbedingungen kann die Zahl der Peroxisomen pro Zelle ebenso wie die Größe und der Proteingehalt der Organellen variieren (Nunnari and Walter, 1996).

1.2 Peroxine

Das zunehmende Verständnis bezüglich der umfangreichen Funktionen der Peroxisomen sorgte dafür, dass auch die Biogenese der Organellen weiter in den Fokus der Forschung rückte. So konnten Gene identifiziert werden, die für die Biogenese der Organellen von Bedeutung sind. Beobachtungen von Veenhuis et al. (1987) zeigten, dass die Anzucht von *S. cerevisiae* auf Ölsäure die Proliferation von Peroxisomen induziert. Dies führte dazu, dass durch Erdmann et al. (1989) erstmals eine Methode entwickelt wurde, um Mutanten mit peroxisomalen Defekten zu isolieren. Die Proteine, die für die Biogenese von Peroxisomen essentiell sind, werden heute als Peroxine bezeichnet, die durch sogenannte *PEX*-Gene kodiert sind (Distel et al., 1996). Die Peroxine spielen eine Rolle bei der Assemblierung der Organellen, ebenso wie bei der Teilung und Vermehrung. Neben den isolierten Hefeproteinen sind mittlerweile auch in anderen Organismen verschiedene Peroxine identifiziert worden.

Da Peroxisomen im Menschen essentiell sind, haben Defekte innerhalb der Peroxine hier teilweise drastische Folgen. So führen Dysfunktionen in den Peroxisomen zu schweren Erkrankungen, die als „*Peroxisome Biogenese Disorders*“ (PBD) bezeichnet werden. Diese umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen, die alle auf einem Defekt innerhalb der Peroxisomen beruhen. Ein Beispiel ist das Zellweger-Syndrom, bei dem der Proteinimport in die Organellen gestört ist. Dies hat zur Folge, dass die Krankheit immer letal verläuft.

Anders als im Menschen sind Peroxisomen in Hefen nicht essentiell. Lediglich bei der Kultivierung in speziellem Medium ist es erforderlich, dass Peroxisomen vorliegen und die angebotene Kohlenstoffquelle verstoffwechseln können. Die Deletion von Peroxinen zeigt sich in Hefen durch unterschiedliche Phänotypen. So gibt es Peroxine, wie Pex3, deren Deletion zu einem vollständigen Verlust der Peroxisomenpopulation führt (Höhfeld et al., 1991). Defekte in anderen Peroxinen, wie z.B. Pex8, zeigen sich darin, dass sogenannte *ghosts* vorliegen (Rehling et al., 2000). Dies sind leere Hüllen der Peroxisomen, die nicht in der Lage sind, peroxisomale Matrixproteine zu importieren. Der Verlust von funktionalen Peroxisomen sorgt dafür, dass die Hefen nicht mehr in der Lage sind ein Medium mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Sie sind daher in diesem Medium nicht vital. Durch das Wiedereinbringen der Peroxine ist dieser Effekt jedoch komplementierbar. Es kommt zu Neubildung von Peroxisomen, sodass die Hefen in der Lage sind im entsprechenden Medium zu wachsen.

1.3 Biogenese von Peroxisomen

Nach der Entdeckung der Peroxisomen ging man zunächst davon aus, dass die Organellen durch Abknospungen vom endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen. Grundlage dieser Vermutung war die enge morphologische Nähe der Organellen. Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden sorgte im Laufe der Jahrzehnte dafür, dass das Modell der Biogenese der Peroxisomen überarbeitet wurde. So konnte gezeigt werden, dass peroxisomale Matrix- und Membranproteine im Zytosol an freien Ribosomen synthetisiert werden. Anschließend erfolgt der post-translationale Import der Proteine in die Peroxisomen. Durch den Import der Proteine kommt es zum Wachstum der Organellen, die sich bei Erreichen einer bestimmten Größe in Tochterperoxisomen teilen. Dieses Modell schließt eine Neubildung der Organellen gänzlich aus. Es setzt voraus, dass in jeder Zelle zu jeder Zeit mindestens ein Peroxisom vorliegen muss (Lazarow and Fujiki, 1985) (siehe Abbildung 1 A).

Bei dem beschriebenen Modell bleibt jedoch die Frage offen, was die Quelle der peroxisomalen Membran ist und ob wirklich alle peroxisomalen Proteine aus dem Zytosol importiert werden. Hinweise auf eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums lieferte die Arbeit von Bodnar and Rachubinski (1991). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein 51 kDa großes peroxisomales Membranprotein (PMP) post-translationale in das endoplasmatische Retikulum inseriert werden kann. Die Beteiligung des ERs an der Biogenese von Peroxisomen führte zur Entwicklung eines

weiteren Modells. Dieses geht von Peroxisomen als semi-autonome Organellen aus. Demnach erfolgt der Import von peroxisomalen Matrixproteinen direkt aus dem Zytosol in die Peroxisomen. Peroxisomale Membranproteine hingegen werden zunächst ins ER transportiert. Am ER kommt es anschließend zum Abschnüren von Vesikeln, die dann wiederum mit Peroxisomen fusionieren. Dieses Modell wird gestützt durch verschiedene Arbeiten, die zeigen, dass Pex3p zunächst in Foci an der ER-Membran vorliegt (Hoepfner et al., 2005; Kragt et al., 2005a; Tam et al., 2005). Unter Beteiligung von Pex19p kommt es dann zum Weitertransport in Peroxisomen. Die Daten zeigten, dass der Weg über das ER zumindest von diesem PMP genutzt wird. Wenige Jahre später untersuchte die Gruppe um van der Zand eine Reihe von weiteren peroxisomalen Membranproteinen und konnte für die untersuchten PMPs ebenfalls zeigen, dass diese zunächst ins ER transportiert werden und anschließend zu Peroxisomen gelangen (van der Zand et al., 2010). Basierend auf den Ergebnissen postulierte die Arbeitsgruppe, dass die meisten, wenn nicht sogar alle PMPs erst ins endoplasmatische Retikulum inseriert werden. Der Weitertransport zu Peroxisomen erfolgt dann unter Beteiligung von Pex3p und Pex19p.

Neben dem Modell der semi-autonomen Organellen muss es außerdem eine *de novo* Entstehung der Peroxisomen geben. Durch die Deletion von *PEX*-Genen kommt es zum Verlust der Peroxisomenpopulation. Die Wiedereinführung der deletierten Gene sorgt für eine *de novo* Entstehung der Organellen. Im Rahmen der Neubildung der Peroxisomen geht man auch davon aus, dass das endoplasmatische Retikulum die Quelle der Membranen ist. Unter Beteiligung von Pex3p und Pex19p kommt es demnach zum Abknospen von sogenannten präperoxisomalen Vesikeln. Neuere Daten zeigen, dass sich am ER zwei Arten von Vesikeln abknospen, die jeweils einen Teil der für den peroxisomalen Proteinimport notwendigen Proteine enthalten. Durch heterotypische Fusion der Vesikel entstehen dann Peroxisomen, die in der Lage sind peroxisomale Matrixproteine zu importieren (van der Zand et al., 2012) (siehe Abbildung 1 B).

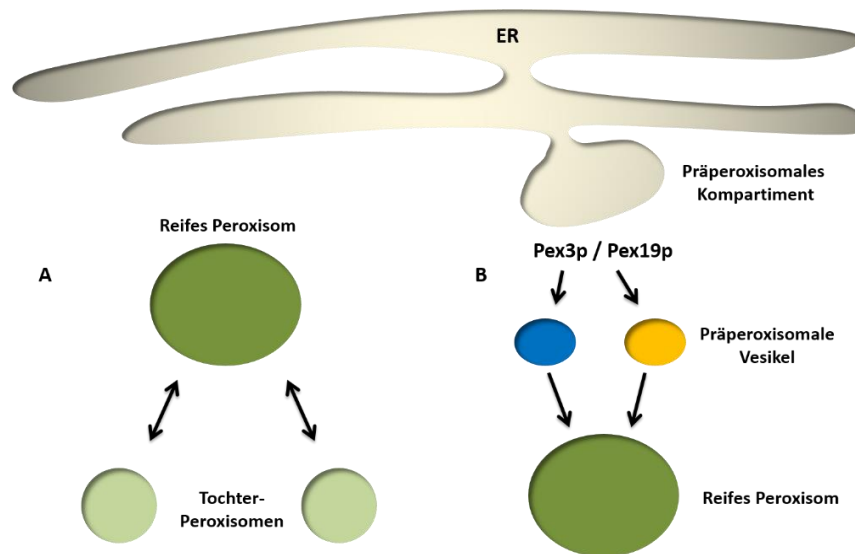


Abbildung 1 Modelle zur Biogenese von Peroxisomen

A Das Model „Wachstum & Teilung“ geht davon aus, dass reife Peroxisomen durch den Import peroxisomaler Matrix- und Membranproteine wachsen. Ist eine bestimmte Größe erreicht, kommt es zur Teilung der Organelle. Die daraus resultierenden Tochterperoxisomen sind wiederum in der Lage Proteine zu importieren und dadurch an Größe zuzunehmen.

B Das „*de novo*“ Model hingegen geht davon aus, dass peroxisomale Membranproteine zunächst ins endoplasmatische Retikulum (ER) translozieren. Es kommt zur Bildung eines sogenannten präperoxisomalen Kompartiments, von dem sich unter Beteiligung von Pex3p und Pex19p zwei Arten von präperoxisomalen Vesikeln abschnüren. Nach erfolgter heterotypischer Fusion kommt es zur Bildung reifer Peroxisomen, die wiederum in der Lage sind peroxisomale Proteine zu importieren.

Die aufgestellte Hypothese, dass alle PMPs den Weg über das ER nehmen, steht in Kontrast zu bisher erzielten Ergebnissen bezüglich des Imports von peroxisomalen Membranproteinen. Für viele PMPs wurde bereits vor Jahrzehnten festgestellt, dass diese ein sogenanntes „*membrane peroxisomal targeting signal*“ (mPTS) tragen. Dieses besteht aus einem Cluster von positiv geladenen Aminosäuren, die von einem oder zwei Transmembransegmenten flankiert sind (Dyer et al., 1996; Jones et al., 2001; Rottensteiner et al., 2004). Basierend auf dem Vorhandensein des mPTS erfolgte die Einteilung der PMPs in zwei Klassen. Klasse 1 beinhaltet dabei Proteine, die ein mPTS tragen und direkt aus dem Zytosol in Peroxisomen importiert werden (Rottensteiner et al., 2004; Van Ael and Fransen, 2006). Dabei dient Pex19p als Rezeptor und bindet neu synthetisierte PMPs im Zytosol (Götte et al., 1998). Durch die Bindung an Pex19p wird das PMP importkompetent gehalten, bis es zur Peroxisomenmembran gelangt. An der Membran dient Pex3p als Dockingfaktor (Fang et al., 2004; Hettema et al., 2000). Im Komplex mit einem Cargo ist die Affinität des Pex19p zu Pex3p deutlich erhöht, wodurch die Bindung begünstigt wird (Pinto et al., 2006).

Membranproteine der Klasse 2 besitzen kein Targetingsignal und benötigen kein Pex19p (Jones et al., 2004). Bekannte Vertreter der Klasse 2 stellen Pex3p und Pex22p dar (Halbach et al., 2009).

Die Proteine der Klasse 2 werden vermutlich zunächst in das endoplasmatische Retikulum importiert (Hoepfner et al., 2005; Kragt et al., 2005a). Im Falle des Pex3p ist dies in Hefen bereits gezeigt worden (Thoms et al., 2012). Allerdings gibt es im Säuger widersprüchliche Daten. Hier wird für Pex3p zum einen postuliert, dass es direkt in Peroxisomen importiert wird (Matsuzaki and Fujiki, 2008). Andererseits deuten Daten der Arbeitsgruppe um Kim et al. (2006) daraufhin, dass Pex3p zunächst ins ER transportiert wird. In beiden Fällen scheint das Peroxin Pex16p essentiell zu sein. Dieses Protein ist in Hefen bisher nicht gefunden worden.

Mit ihrer Hypothese, dass zunächst alle PMPs ins ER importiert werden, heben van der Zand et al. (2010) die bisherige Einteilung der PMPs auf.

1.4 Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum

Der Import von sekretorischen Proteinen ins endoplasmatische Retikulum erfolgt durch das Sec61-Translokon in der ER-Membran. Dabei kann die Translokation sowohl co- als auch post-translational erfolgen (Kalies and Hartmann, 1998). In beiden Fällen tragen die zu transportierenden Proteine spezifische abspaltbare Signalsequenzen. Diese umfassen 15 bis 30 Aminosäuren. Der hydrophobe Kern des Signals ist dabei umgeben von positiv geladenen Aminosäuren und einer polaren C-terminalen Region (von Heijne, 1982, 1984).

Im Falle des co-translationalen Transports sind die Elongation der Polypeptidkette und der Transport ins Lumen des ERs miteinander gekoppelt. Das *signal recognition particle* (SRP) bindet das Signalpeptid, sobald dieses das Ribosom verlässt (Walter and Blobel, 1981a, b; Walter et al., 1981). Die Bindung des SRP an das Signalpeptid sorgt dafür, dass es zum Translationsarrest kommt (Walter and Blobel, 1980). Der Komplex aus dem Ribosom, der naszierenden Kette und dem SRP gelangt dann an den Sec61-Kanal in der ER-Membran. Durch die Bindung des SRP an seinen membranständigen Rezeptor wird dieser Arrest anschließend wieder aufgehoben (Connolly and Gilmore, 1989). Die Translation des Polypeptids erfolgt dann direkt in das Lumen des ERs sobald das Ribosom den Kanal gebunden hat.

Beim post-translationalen Proteinimport binden Chaperone die bereits vollständig translatierte Polypeptidkette im Zytosol. Durch diese Bindung wird die Kette translokationskompetent gehalten (Chirico et al., 1988; Deshaies et al., 1988). Der Sec-Komplex in der ER-Membran, bestehend u.a. aus Sec62 und Sec63, erkennt und bindet anschließend die Signalsequenz des Proteins. Sec63 interagiert dann mit dem luminalen Chaperon Kar2p, wodurch der Import der Peptidkette ins Lumen gewährleistet wird. Eine Rückwärtsbewegung der Polypeptidkette wird durch die Anlagerung von Kar2p verhindert (Vogel et al., 1990). Diese Art des Transports wird auch als „molekulare Ratsche“ bezeichnet.

Auch klassische Membranproteine mit einer oder mehreren Transmembrandomänen können co-translational über den Sec61-Komplex in die ER-Membran integriert werden. Sobald eine Transmembrandomäne während der Translokation den Sec61-Kanal erreicht, verbleibt diese

zunächst im Kanal. Dieser bildet anschließend ein laterales *gate*, sodass die Transmembrandomäne in die Membran entlassen wird (Martoglio et al., 1995; Singer et al., 1987). Ebenso werden alle folgenden Transmembrandomänen in die Membran entlassen bis das Membranprotein vollständig translatiert und integriert in der ER-Membran vorliegt. Für Pex3p konnte gezeigt werden, dass es über den Sec61-Kanal ins ER transportiert wird. Das Peroxin trägt eine Transmembrandomäne, die als Signal für den ER-Import dient (Thoms et al., 2012).

Die Integration von Membranproteinen kann auch über den sogenannten EMC-Komplex erfolgen (*ER membrane protein complex*) (Jonikas et al., 2009). Dieser Komplex besteht in den meisten Eukaryoten aus neun Untereinheiten. Eine bekannte Funktion des Proteinkomplexes ist die Insertaseaktivität. Diese spielt eine Rolle bei der Insertion von Proteinen mit einer wenig hydrophoben C-terminalen Transmembrandomäne. Auch die Integration von polytopen Transmembranproteinen, deren erste Helix mit dem N-Terminus ins Lumen zeigt, wird vermutlich durch den EMC vermittelt (Chitwood and Hegde, 2019; Guna et al., 2018). Dabei wird vermutet, dass es zu einer Destabilisierung der Lipidschicht kommt, wodurch die Transmembrandomäne inserieren kann (Chitwood and Hegde, 2019; Hegde, 2022).

Proteine mit einem C-terminalen Membrananker werden auch als „*tail anchored*“-Proteine bezeichnet. Diese gelangen über den sogenannten GET-Komplex (*guided entry for tail-anchored proteins*) in die Membran des ERs. Diese Art der Translokation ist besonders gut in *S. cerevisiae* beschrieben. Nach vollständiger Synthese des zu integrierenden Proteins bindet zunächst Sgt2p den Membrananker des Proteins. Somit wird eine Aggregation im Zytosol verhindert. Im Komplex mit Get4p und Get5p ermöglicht Sgt2p den Transfer zur ATPase Get3p. An der ER-Membran kommt es anschließend zur Interaktion von Get3p mit den membranständigen Proteinen Get1p und Get2p. Durch die Hydrolyse von ATP wird das „*tail-anchored*“-Protein vom Get3p freigegeben und kann in die Membran integriert werden (Denic, 2012; Schuldiner et al., 2008). Auch für Peroxine mit einem C-terminalen Membrananker konnte beobachtet werden, dass sie diesen Weg in das Lumen des ERs verwenden. So konnte z.B. für Pex15p und Pex26p gezeigt werden, dass diese Peroxine über den GET-Weg in das endoplasmatische Retikulum importiert werden und anschließend der Transport zu Peroxisomen erfolgt (Buentzel et al., 2015; Elgersma et al., 1997).

Während oder nach erfolgter Translokation kommt es im Lumen des endoplasmatischen Retikulums zur Prozessierung der ER-spezifischen Signalpeptide. Die N-terminale Signalsequenz wird dabei durch den Signalpeptidasekomplex (SPC) abgespalten (Dalbey and Von Heijne, 1992; Evans et al., 1986). Neben der Prozessierung kann mit der N-Glykosylierung eine weitere post-translationale Modifikation im Lumen des ERs erfolgen. Dabei werden Glykosylreste durch die Oligosaccharyltransferase (OST) kovalent auf ein Asparagin innerhalb der Proteine übertragen (Chen et al., 2001; Silberstein and Gilmore, 1996). Das Asparagin befindet sich dabei im Motiv N-X-(S/T) (Breitling and Aebi, 2013).

1.5 Peroxisomale Targetingsignale

Für die Sortierung von peroxisomalen Matrixproteinen sind zwei verschiedene peroxisomale Targetingsignale (PTS) verantwortlich. Die Vielzahl der Matrixproteine trägt das sogenannte peroxisomale Targetingsignal 1 (PTS1). Dieses befindet sich am C-Terminus der Proteine und umfasst 12 Aminosäuren, wobei lediglich das letzte Tripeptid stark konserviert ist (Gould et al., 1987; Neuberger et al., 2004). Die Konsensussequenz dieser drei Aminosäuren lautet (S/A/C)-(K/R/H)-(L/A) (Gould et al., 1989; Lametschwandner et al., 1998). Das Anfügen dieser drei Aminosäuren an zytosolische Proteine genügt, um diese in Peroxisomen zu dirigieren (Gould et al., 1989). Die Erkennung des Signals erfolgt über den im Zytosol vorliegenden Rezeptor Pex5p. Dieser besitzt eine Tetratricopeptid-Domäne (TPR-Domäne), worüber die Bindung des Matrixproteins erfolgt (Van der Leij et al., 1993). Neben Pex5p wurde in *S. cerevisiae* mit Pex9p ein weiterer PTS1-Rezeptor identifiziert. Dieser wird jedoch nur exprimiert, wenn die Hefen auf Ölsäure wachsen müssen (Effelsberg et al., 2016).

Neben dem PTS1 gibt es ein weiteres peroxisomales Targetingsignal, welches sich nahe dem N-Terminus der Proteine befindet. Dieses peroxisomale Targetingsignal 2 (PTS2) ist ein Nonapeptid innerhalb der ersten 20 Aminosäuren der Proteine. Die Sequenz des Signals wird mit folgender Konsensussequenz beschrieben: (R/K)-(L/V/I/Q)-XX-(L/V/H/I/Q)-(L/S/G/A/K)-X-(H/Q)-(L/A/F) (de Hoop and Ab, 1992; Petriv et al., 2004). PTS2-tragende Proteine werden vom frei vorliegenden Rezeptor Pex7p im Zytosol erkannt. Dabei bildet das PTS2 eine amphiphatische Helix, die vom Rezeptor erkannt werden kann (Kunze et al., 2011; Pan et al., 2013). Neben dem Rezeptor Pex7p werden für den Import von PTS2-tragenden Cargos zusätzliche Co-Rezeptoren benötigt. In *S. cerevisiae* erfüllen die Proteine Pex18p und Pex21p diese Aufgabe (Purdue et al., 1998) – in anderen Hefen übernimmt Pex20p diese Funktion (Schliebs and Kunau, 2006).

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine tragen eines der bekannten peroxisomalen Targetingsignale. Bisher ist mit Pex8p lediglich ein Matrixprotein gefunden worden, das vermutlich beide PTS trägt (Rehling et al., 2000).

1.6 Import von Matrixproteinen

Peroxisomen importieren ihre Matrixproteine, unabhängig ob diese ein PTS1 oder PTS2 tragen, post-translational aus dem Zytosol. Der Import der Proteine erfolgt dabei über das sogenannte Importomer (siehe Abbildung 2). Dieses besteht aus dem Dockingkomplex, welcher für den Import von Proteinen verantwortlich ist und dem RING-Finger-Komplex (RING = *really interesting new gene*), welcher den Export der Rezeptoren möglich macht. Beide Proteinkomplexe sind in der Peroxisomenmembran lokalisiert. In *S. cerevisiae* sind aktuell 19 Peroxine bekannt, die direkt am Import von Matrixproteinen in Peroxisomen beteiligt sind (Hasan et al., 2013).

Sobald das Cargo an den PTS-Rezeptor gebunden hat, gelangt der Komplex an die peroxisomale Membran. Dort kommt es zur Bindung an den Dockingkomplex, der aus den beiden Peroxinen Pex13p und Pex14p besteht (Kiel et al., 2006). Pex14p ist dabei vermutlich der initiale Bindungspartner des beladenen Rezeptors (Hasan et al., 2013). Es ist jedoch auch bekannt, dass Pex13p ebenso mit den PTS-Rezeptoren interagiert (Grunau et al., 2009). Neben den beiden genannten Peroxinen weist der Dockingkomplex in Hefen mit Pex17p ein weiteres Protein auf. Dieses ist mit Pex14p assoziiert, interagiert aber scheinbar nicht mit Pex5p (Azevedo and Schliebs, 2006). Nachdem die beladenen PTS-Rezeptoren an die Peroxisomenmembran gelangt sind, erfolgt die Translokation des Rezeptor-Cargo-Komplexes in die Organelle. Dabei gibt es zum einen die Theorie, dass es zur Bildung einer transienten Pore kommt (Erdmann and Schliebs, 2005; Grou et al., 2009), wobei Pex5p mit Lipiden der Membran zu interagieren scheint und daraufhin seine Topologie verändert (Gouveia et al., 2003; Gouveia et al., 2000). Auch für den Import von PTS2-tragenden Matrixproteinen wird vermutet, dass es zur Bildung einer transienten Pore kommt. Diese wird dabei vermutlich vom Co-Rezeptor Pex18p gebildet (Montilla-Martinez et al., 2015). Die entstehende Pore muss dabei in beiden Fällen so groß sein, dass gefaltete und Co-Faktor gebundene Proteine importiert werden können (Léon et al., 2006a). Ein alternatives Model geht davon aus, dass sich die Rezeptoren zwischen dem Zytosol und dem Lumen der Organellen bewegen. Das Model wird gestützt durch die Beobachtungen von Dammai and Subramani (2001), dass der N-Terminus des PTS1-Rezeptors Pex5p während des Imports von Cargos im Lumen der Peroxisomen vorliegt. Neueste Daten liefern Hinweise darauf, dass Pex5p in einem gefalteten Zustand komplett über die Peroxisomenmembran transportiert wird und es dort zur Entlassung des Cargos kommt. Anschließend kommt es zur Entfaltung und zum Rücktransport des Rezeptors (Skowyra and Rapoport, 2022). Im Fall des PTS2-Imports wird vermutet, dass Pex18p vom heterotrimeren Komplex aus Pex18p, Pex7p und dem Cargo freigelassen wird, wodurch Rezeptor und Cargo voneinander getrennt werden (Pan et al., 2013). Dabei ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob die Dissoziation des Komplexes innerhalb der Peroxisomen erfolgt oder bereits an der peroxisomalen Membran im Bereich der gebildeten Pore.

Neben dem Einfluss der PTS-Rezeptoren bei der Trennung von Rezeptor und Cargo wird auch eine Beteiligung vom intraperoxisomalen Protein Pex8p vermutet. In *H. polymorpha* wurde beobachtet, dass das Peroxin die Bindung zwischen Cargo und Rezeptor schwächen kann (Wang et al., 2003). Neben der Beteiligung von anderen Peroxinen wird vermutet, dass auch die veränderten Umgebungsbedingungen zwischen Zytosol und Peroxisomenlumen dafür sorgen, dass das Cargo entlassen wird (Wang et al., 2003).

Sobald das Cargo im Lumen der Peroxisomen vorliegt, kommt es zum Recycling der PTS-Rezeptoren. Der für den Export verantwortliche Komplex des Importomers ist der sogenannte RING-Finger-Komplex. Dieser wird von den Peroxinen Pex2p, Pex10p und Pex12p gebildet (Agne et al., 2003). In *S. cerevisiae* bildet Pex8p eine Brücke zwischen dem Docking- und dem RING-Finger-Komplex (Agne et al., 2003). In *P. pastoris* hingegen scheint Pex3p diese Funktion zu

übernehmen (Hazra et al., 2002). Das Recycling der Rezeptoren wird durch Ubiquitinylierungen vermittelt. Daran sind die Peroxine Pex4p und Pex22p beteiligt (Platta et al., 2007). Des Weiteren besitzen die Peroxine des RING-Finger-Komplexes Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Platta et al., 2009; Platta et al., 2007). Am PTS1-Rezeptor Pex5p kommt es zu einer Monoubiquitinylierung, welche als Signal für den Export des Rezeptors aus dem Peroxisom dient (Kragt et al., 2005b). Unter Beteiligung der AAA-ATPasen Pex1p und Pex6p kommt es zur Hydrolyse von ATP, wodurch der Export ermöglicht wird (Fujiki et al., 2012; Miyata and Fujiki, 2005). Neben der Monoubiquitinylierung kann Pex5p auch mehrfach modifiziert werden. Die auftretende Polyubiquitinylierung markiert das Protein für den proteasomalen Abbau im Rahmen der Qualitätskontrolle der Zellen (Kiel et al., 2005; Platta et al., 2004). Auch für den Importweg von PTS2-tragenden Matrixproteinen wurde eine Ubiquitinylierung des Rezeptors beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass der Co-Rezeptor Pex18p aus *S.cerevisiae* ubiquitinyliert wird (Purdue and Lazarow, 2001). Ähnlich wie bei Pex5p kann auch hier sowohl eine Mono- als auch eine Polyubiquitinylierung stattfinden (Léon et al., 2006b; Liu and Subramani, 2013). In *P.pastoris* wurde zudem eine Ubiquitinylierung des Rezeptors Pex7p beobachtet (Hagstrom et al., 2014). Insgesamt ist jedoch der PTS2-Importweg und dabei vor allem das Recycling der Rezeptoren weniger gut untersucht. Daher ist in Abbildung 2 lediglich der PTS1-Importweg in Hefen schematisch dargestellt.

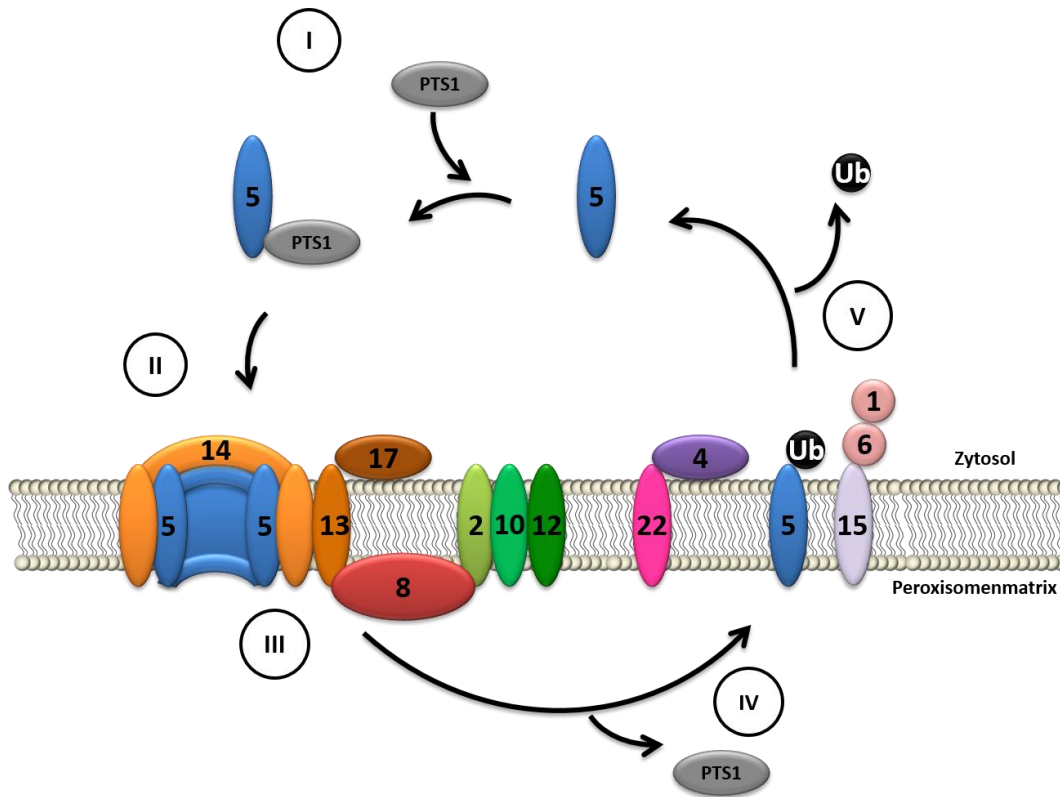


Abbildung 2 Import von PTS1-tragenden Matrixproteinen in Hefen

Peroxisomale Matrixproteine werden an freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert und anschließend post-translational in Peroxisomen importiert. I) Der PTS1-Rezeptor Pex5p erkennt das peroxisomale Matrixprotein über das PTS1 im Zytosol. II) Der Komplex aus Rezeptor und Cargo gelangt zur Peroxisomenmembran und bindet dort den Docking-Komplex (Pex13p, Pex14p und Pex17p). Es wird vermutet, dass die Bindung zwischen dem Docking-Komplex und beladenem Pex5p zur Bildung einer transienten Pore führt. III) Das Cargo gelangt in das peroxisomale Lumen über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus. IV) Im Lumen der Peroxisomen erfolgt die Trennung von Rezeptor und Cargo. Dabei spielt vermutlich Pex8p eine Rolle. Pex8p bildet eine Brücke zwischen dem Docking-Komplex und dem für den Export zuständigen RING-Finger-Komplex. Dieser wird von den Peroxinen Pex2p, Pex10p und Pex12p gebildet. IV) Eine Monoubiquitinylierung des PTS-Rezeptors markiert diesen für den Export ins Zytosol. An dieser Proteinmodifikation sind die Proteine Pex4p und Pex22p beteiligt. Außerdem besitzen die Peroxine des RING-Finger-Komplexes ebenfalls Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Der Export des Rezeptors wird durch die AAA-ATPasen Pex1p und Pex6p ermöglicht. Diese sind über Pex15p an der Peroxisomenmembran verankert. Nach dem Export erfolgt die De-Ubiquitinylierung des Rezeptors, wodurch er für einen weiteren Import von Cargos zur Verfügung steht.

1.7 Pex8p

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Peroxin Pex8 aus *S. cerevisiae*. Varianten des Pex8p wurden bisher lediglich in Hefen und filamentösen Pilzen gefunden. Zwischen den Proteinen der verschiedenen Hefen besteht jedoch nur eine geringe Konservierung (Eckert and Erdmann, 2003). Pex8p aus *S. cerevisiae* (ScPex8p) umfasst 589 Aminosäuren. Die Struktur des Proteins ist noch nicht aufgeklärt. Es ist jedoch auffällig, dass das Protein über eine hohe Gesamthydrophobizität verfügt. Außer einem vorhergesagten Leucin-Zipper-Motiv an Position 253-274 gibt es keine weiteren bekannten Strukturmerkmale. Eine Besonderheit des Peroxins ist jedoch, dass es Sequenzen trägt, die beide peroxisomalen Targetingsignale widerspiegeln. So findet man am extremen C-Terminus des Proteins das bekannte PTS1 mit dem Tripeptid „SKL“. Nahe des N-Terminus des Proteins fällt zudem ein Bereich auf, der ein PTS2 darstellen könnte (Position 103–112). Die entsprechende Aminosäuresequenz ähnelt sehr stark der Konsensussequenz eines PTS2, passt jedoch nicht vollständig. Des Weiteren ist die Lokalisation des Nonapeptids eher ungewöhnlich für ein PTS2. Die bisher bekannten PTS2-tragenden Peroxine tragen das Signal innerhalb der ersten 20 Aminosäuren. Pex8p wäre das einzig bekannte Peroxin, das beide Targetingsignale trägt. Neben den Sequenzen der Targetingsignale werden im Pex8p zwei mögliche Bindestellen für Pex19p postuliert (Rottensteiner et al., 2004). Ob über diese Positionen tatsächlich eine Interaktion beider Proteine erfolgt, ist nicht genauer untersucht.

Hefen mit einer Deletion des *PEX8*-Gens sind nicht in der Lage auf Ölsäure-haltigem Medium zu wachsen. Dies bedeutet, dass diese Hefen keine funktionellen Peroxisomen bilden und somit die Ölsäure nicht als Kohlenstoffquelle nutzen können. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen lediglich sogenannte *ghosts*- membranöse Strukturen, die jedoch keine vollständigen Organellen sind. Darüber hinaus konnte man eine Fehllokalisierung von peroxisomalen Matrixproteinen im Zytosol feststellen. Betroffen davon sind die Importwege beider peroxisomalen Targetingsignale (Rehling et al., 2000). Diese Beobachtungen sind die Grundlage dafür, dass man davon ausgeht, dass Pex8p eine Rolle im Import von Matrixproteinen spielt und eher keine Funktion in der Membranbiogenese der Organellen übernimmt.

Bezüglich der Funktion des Pex8p gibt es nach wie vor jedoch keine eindeutige Klärung. Es ist bekannt, dass das Protein in *S. cerevisiae* als peripheres Membranprotein an der Innenseite der Peroxisomenmembran vorliegt. Dort scheint es die beiden Subkomplexe des Importomers zu verbinden (Agne et al., 2003). Neben dieser Funktion wird basierend auf Daten aus *H. polymorpha* und *P. pastoris* ebenso postuliert, dass Pex8p eine Rolle bei der Dissoziation von Rezeptor und Cargo im Lumen der Peroxisomen einnimmt (Ma et al., 2013; Wang et al., 2003). Es wird vermutet, dass es durch die Bindung an den PTS1-Rezeptor Pex5p eine Konformationsänderung einleitet, wodurch das Cargo freigelassen wird. Neueste Daten aus *Xenopus laevis* liefern hingegen Hinweise darauf, dass es durch eine Modifikation am Pex5p zur Entfaltung des Rezeptors im Lumen der Peroxisomen kommt, wodurch das Cargo freigelassen wird. In diesem Organismus ist bisher kein

Pex8p-Homolog gefunden worden. Daher scheint hier die Trennung von Rezeptor und Cargo einem anderen Mechanismus zu folgen (Skowyra and Rapoport, 2022).

Neben der noch nicht vollständig geklärten Frage nach der Funktion von Pex8p ist es ebenso unklar, wie das Protein in die Peroxisomen gelangt. Das mögliche Vorhandensein beider peroxisomalen Targetingsignale legt einen direkten Import über die bekannten Rezeptoren in die Organellen nah. Untersuchungen von Rehling et al. (2000) konnten jedoch bereits zeigen, dass auch ScPex8p mit einer C-terminalen Deletion des PTS1 korrekt in Peroxisomen importiert werden kann und dort seine Funktion ausübt. Es wäre vorstellbar, dass die Deletion des PTS1 durch das mögliche PTS2 kompensiert werden kann. Rehling et al. (2000) beobachteten außerdem, dass die ersten 112 Aminosäuren des ScPex8p ausreichen, um ein Kontrollprotein in Peroxisomen zu dirigieren. Dies spricht dafür, dass innerhalb dieses Fragmentes ein peroxisomales Targetingssignal vorhanden ist. Ob es sich dabei um das vermutete PTS2 handelt, wurde nicht genauer untersucht.

Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass Pex8p in *S. cerevisiae* mit den PTS-Rezeptoren Pex5p und Pex7p interagiert. Auffällig dabei ist, dass die Bindung an Pex5p unabhängig vom PTS1 erfolgt (Deckers et al., 2010; Schulz, 2004). Auch die Bindung an Pex7p scheint nicht dem klassischen Konzept des Matrixproteinimports zu entsprechen. So erfolgt die Bindung beider Proteine unabhängig von den beiden bekannten Co-Rezeptoren Pex18p und Pex21p. Darüber hinaus konnte bisher nicht gezeigt werden, ob das putative PTS2 des Pex8p die Bindestelle an den Rezeptor darstellt (Deckers et al., 2010). Hefestämme, die eine Deletion der PTS-Rezeptoren aufweisen, zeigen einen gestörten Import von peroxisomalen Matrixproteinen. Pex8p konnte in diesen Deletionsstämmen jedoch in den peroxisomalen *ghosts* nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Peroxin sich nicht wie ein klassisches peroxisomales Matrixprotein verhält, da es unabhängig von den bekannten Matrixproteinrezeptoren in die Organellen importiert wird. Eine Erklärung dafür könnten die Ergebnisse von van der Zand et al. (2010) darstellen. Die Arbeitsgruppe hat in einer umfangreichen Versuchsreihe mehrere peroxisomale Membranproteine auf einen möglichen ER-Transport untersucht. Auch die Lokalisation von Pex8p wurde im Rahmen der Arbeit analysiert. Dieses Peroxin stellt zwar kein klassisches Membranprotein dar, doch auch für dieses Protein wurden Hinweise auf einen ER-Import gefunden. Durch die Colokalisation mit ER-spezifischen Markern konnte gezeigt werden, dass die PMPs (inkl. Pex8p) aus dem Zytosol zunächst ins endoplasmatische Retikulum importiert werden und erst anschließend in Peroxisomen gebracht werden. Dieses Ergebnis ist zum einen etwas unerwartet, da Pex8p kein ER-spezifisches Targetingssignal trägt und auch kein Membranprotein darstellt. Andererseits könnte der Import ins ER eine Erklärung dafür liefern, dass Pex8p mit den PTS-Rezeptoren eher untypisch interagiert. Sollte Pex8p zunächst ins ER importiert werden, wäre es denkbar, dass die vorhanden PTS lediglich für die Ausübung der Funktion des Peroxins, die Trennung von Rezeptor und Cargo im Lumen der Organellen, benötigt werden und keine Funktion im Transport in die Peroxisomen haben.

1.8 Zielsetzung

Van der Zand et al. (2010) stellten die Hypothese auf, dass alle peroxisomalen Membranproteine zunächst ins endoplasmatische Retikulum importiert werden und es anschließend zum Weitertransport in die Peroxisomen kommt. Unter den untersuchten Peroxinen befand sich auch Pex8p. Dieses Peroxin liegt als peripheres Membranprotein im Inneren der Peroxisomen vor. Des Weiteren besitzt es keine ER-spezifische Signalsequenz. Interessanterweise befinden sich in der Sequenz des Pex8p jedoch sieben mögliche Glykosylierungsstellen, die im Lumen des endoplasmatischen Retikulums modifiziert werden könnten. Vor diesem Hintergrund soll untersucht werden, ob eine Glykosylierung des Pex8p *in vivo* beobachtet werden kann. Diese ER-spezifische Modifikation würde eindeutig für eine Translokation des Pex8p ins ER sprechen. Sollte keine Glykosylierung festzustellen sein, soll im Weiteren *in vitro* untersucht werden, ob die vorhergesagten Glykosylierungspositionen prinzipiell durch die Oligosaccharyltransferase modifiziert werden können bzw. ob eine Verbesserung der Glykosylierungsmotive zu einer Glykosylierung führen würde. Neben einer eventuell auftretenden Glykosylierung soll ebenso die Resistenz gegenüber externen Proteasen als Indikator für einen möglichen ER-Import genutzt werden.

Das Peroxin Pex8p trägt vermutlich beide bekannten peroxisomalen Targetingsignale. Es ist bekannt, dass für den Transport des Peroxins zu den Peroxisomen das C-terminale PTS1 nicht essentiell ist. Basierend auf der Aminosäuresequenz wird vermutet, dass sich im N-terminalen Bereich des Pex8p das zweite bekannte Targetingsignal, das PTS2, befindet. Da jedoch weder die Konsensussequenz noch die Position des möglichen Signals zu den bisher bekannten PTS2-tragenden Peroxinen passt, ist es nicht klar, ob es sich dabei wirklich um ein Targetingsignal handelt. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob man dem vorhergesagten Signal eine Funktion im *Targeting* des Pex8p zuordnen kann. Dazu sollen Hefestämme generiert werden, die Varianten des Pex8p exprimieren, in denen das PTS2 mutiert oder deletiert ist. Über die Fähigkeit zur Bildung von funktionalen Peroxisomen sollen Rückschlüsse darüber gezogen werden, ob die Pex8p-Varianten korrekt in den Organellen vorliegen und dort ihre Funktion ausüben können. Des Weiteren soll ein Proteaseverdau zeigen, ob die Veränderungen innerhalb des PTS2 einen Einfluss auf die Lokalisation des Peroxins haben.

2. Material & Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Gerät	Hersteller
5402	Eppendorf
5414R	Eppendorf
5415D	Eppendorf
5424	Eppendorf
Allegra™ 21C	Beckman Coulter
Avanti™ J-20 XPI	Beckman Coulter
Bead Beater®	
Eraser	Raytest
Kamera LAS 1000	Fujifilm
NanoDrop™ 2000	ThermoFisher Scientific
Optima™ L-90K	Beckmann
Optima™ MAX-XP	Beckmann
PCR Cycler Biometra Trio	Analytic Jena
Phosphoimager Typhoon FLA-7000	Fujifilm
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Western Blot Apparatur Panther	Owl Scientific

2.2 Chemikalien, Enzyme & Kits

Tabelle 2 Chemikalien, Enzyme & Kits

Chemikalie, Enzym, Kit	Hersteller
[³⁵ S]-Methionin	Hartmann Analytik
40% Acrylamid-Bis (29:1)	Amresco
Akzeptorpeptid Ac-NYT-NH ₂	bei GenScript synthetisiert
Aminosäuren (Adeninsulfat, Uracil, L-Tryptophan, L-Histidin-HCL, L-Leucin, L-Lysin)	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Carl Roth
Bacto™-Agar	BD Life Science
Bacto™-Pepton	BD Life Science
Bacto™-Trypton	BD Life Science

DNA-Aufreinigungskit <i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean up</i>	Macherey-Nagel
Difco™ Hefe Extrakt	BD Life Science
Difco™ Hefe-Stickstoff-Basis	BD Life Science
Difco™ Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfate	BD Life Science
Kaninchenretikulozytelysat, Nuklease behandelt , inklusive Aminosäuremix ohne Methionin	Promega
Ölsäure	Applichem
Peroxidasesubstrat Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer
Plasmid-Aufreinigungskit <i>NucleoSpin® Plasmid</i>	Macherey-Nagel
PMSF BioChemica	AppliChem
PNGase F	New England Biolabs® (NEB)
Proteaseinhibitoren (Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin, Elastatinal, Chymostatin)	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roche & Carl Roth
Protein-Molekulargewichtsmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific
Q5® Site-directed Mutagenesis Kit	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB & ThermoFisher Scientific (Fast Digest)
RNA-Aufreinigungskit <i>NucleoSpin® RNA-Clean-up</i>	Macherey-Nagel
RNasin® Ribonukleaseinhibitor	Promega
S7 Fusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Biozym
T4 DNA-Ligase (Rapid DNA Ligation Kit)	ThermoFisher Scientific
T4 Polynukleotid-Kinase	ThermoFisher Scientific
T7 RNA-Polymerase	Promega
Tween 40	Sigma-Aldrich

2.3 Mikroorganismen

2.3.1 Bakterien

Tabelle 3 verwendeter Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E.coli</i> XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene

2.3.2 Hefen

Tabelle 4 verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Eingefügtes Plasmid	Quelle
UTL7A	Mat α		AG Erdmann, Bochum
	<i>Ura3-52; trp1; leu2-3, 112</i>		
UTL7A Δ Pex8	Mat a		AG Erdmann, Bochum
	<i>Ura3-52; trp1; pex8::LEU2</i>		
YTX69	Diploid Mat a/ α		AG Hartmann
	<i>His3-11,-15; Leu2-3, -112 ; trp1-1 ; Ura3-1 ; ade2-1 ; can1-100</i>		
YFK1	UTL7A Δ Pex8	pFK_ScPex8	diese Arbeit
YFK7	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8	diese Arbeit
YFK43	UTL7A Δ Pex8	pFK_ScPex8_L111T	diese Arbeit
YFK13	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_L111T	diese Arbeit
YFK6	UTL7A Δ Pex8	pFK_ScPex8 Δ PTS2	diese Arbeit
YFK10	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8 Δ PTS2	diese Arbeit
YFK21	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8 Δ PTS2 Δ PTS1	diese Arbeit
YFK28	UTL7A Δ Pex8	pFK_ppaF_SS_+8AS_ScPex8	diese Arbeit
YFK24	UTL7A Δ Pex8	pFK_ppaF_SS_+8AS_FLAG_ScPex8	diese Arbeit
YFK32	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_L111T Δ PTS1	diese Arbeit
YFK35	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_N107D	diese Arbeit
YFK54	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_N107D Δ PTS1	diese Arbeit
YFK40	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_L108P	diese Arbeit
YFK57	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_L108P Δ PTS1	diese Arbeit
YFK73	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_R103G	diese Arbeit
YFK75	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_R103G Δ PTS1	diese Arbeit
YFK74	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_Q110D	diese Arbeit
YFK76	UTL7A Δ Pex8	pFK_FLAG_ScPex8_Q110D Δ PTS1	diese Arbeit
YFK18	UTL7A	pFK_Spc3_FLAG	diese Arbeit

2.4 Plasmide und Nukleinsäuren

Tabelle 5 Plasmide für die *in vitro* Transkription

Name	Eigenschaft	Quelle
pGEM4_ppαF	Kodierende Sequenz des Präpro-Alphafaktors aus der Hefe <i>S.cerevisiae</i> mit C-terminalem 6x Histidin-Affinitätstag	AG Kalies
pGEM4_ScPex8	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i>	Kausch (2013)
pGEM4_ScPex8_L111T	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> mit einer Punktmutation an Position 111 zur Verbesserung einer möglichen Glykosylierungsstelle	Kausch (2013)
pGEM4_ppαF_SS_ScPex8	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und ScPex8p	Kausch (2013)
pGEM4_ppαF_SS_ScPex8_L111T	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und ScPex8p mit einer Punktmutation an Position 111	Kausch (2013)

Tabelle 6 Plasmide für Proteinexpression in *S.cerevisiae*

Name	Eigenschaft	Quelle
pFK_ScPex8	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> unter der Kontrolle des Cup-Promotors im Hefe-Shuttle-Vektor mit Ampicilin-Resistenzgen und URA3-Auxotrophiemarker	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag	diese Arbeit
pFK_ScPex8_L111T	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit Punktmutation an Position 111	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_L111T	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 111	diese Arbeit
pFK_ppαF_SS_ScPex8	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und ScPex8p im Hefe-Shuttle-Vektor	diese Arbeit
pFK_ppαF_SS_FLAG_ScPex8	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und ScPex8p im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag	diese Arbeit

pFK_pp α F_SS_ScPex8_L111T	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz des Präpro-Alpha-faktors und ScPex8p im Hefe-Shuttle-Vektor mit Punktmutation an Position 111	diese Arbeit
pFK_pp α F_SS_FLAG_ScPex8_L111T	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz des Präpro-Alpha-faktors und ScPex8p im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 111	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_R103G	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 103	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_N107D	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 107	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_L108P	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 108	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_Q110D	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 110	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_R103G Δ SKL	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 103 und Deletion des C-terminalen PTS1	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_N107D Δ SKL	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 107 und Deletion des C-terminalen PTS1	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_L108P Δ SKL	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 108 und Deletion des C-terminalen PTS1	diese Arbeit

pFK_FLAG_ScPex8_Q110DASKL	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 110 und Deletion des C-terminalen PTS1	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8_L111TASKL	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> im Hefe-Shuttle-Vektor mit FLAG-Affinitätstag und Punktmutation an Position 111 und Deletion des C-terminalen PTS1	diese Arbeit
pFK_ScPex8ΔPTS2	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> mit Deletion des putativen PTS2 an Position 103 bis 111	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8ΔPTS2	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> mit FLAG-Affinitätstag und Deletion des putativen PTS2 an Position 103 bis 111	diese Arbeit
pFK_FLAG_ScPex8ΔPTS2ΔPTS1	Kodierende Sequenz des Pex8p aus <i>S.cerevisiae</i> mit FLAG-Affinitätstag, Deletion des putativen PTS2 an Position 103 bis 111 und Deletion des C-terminalen PTS1	diese Arbeit
pFK_Spc3_FLAG	Kodierende Sequenz des Spc3 aus <i>S.cerevisiae</i> mit FLAG-Affinitätstag	diese Arbeit
pNCS1	Vorlage für Vektor-Backbone des pFK	AG Schmidt

2.5 Oligonukleotide

Die Synthese und Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon.

Tabelle 7 verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
AhdI_fwd	ATGGTAAGCCCTCCCGTATC
AhdI_rev	CAGTGAGGCACCTATCTCAG
fwd_AP_XmaI	GGCCCGGGAAAAATGAGATTCCTTC
fwd_ScPex8_XmaI	GGCCCGGGAAAAATGTTTGATCATGACGTCG
rev_ScPex8_NcoI	GGCCATGGTACCTCTATAATTTAGAAGATTG
fwdQC_FLAG_ScPex8	GATGATGATAAATTTGATCATGACGTCTGAATATC
revQC_FLAG_ScPex8	ATCTTTATAATCCATTTTTCCCGGGGGATC
fwdQC_FLAG_aF_SS_ScPex8	GATGATGATAAAGCTCCAGTCTTTGATCATGAC
revQC_FLAG_aF_SS_ScPex8	ATCTTTATAATCAGCTAATGCCGAGGATGC
fwd_FLAG_ScPex8_XmaI	GGCCCGGGAAAAATGGATTATAAAG
revPex8-SKlkpn	CTGGTACCGACTAAGATTGACTTGATAAGACCGTTGTG

fwd_Spc3_FLAG	GATGATGATAAATAGACTAGTCTTTGCTCTC
rev_Spc3_FLAG	ATCTTTATAATCAACTTTGTTTTTATTTTCCACG
fwd_ScPex8_PTS2_L zu P	ACGTGGAACCCTTCACAGTTG
rev_ScPex8_PTS2_L zu P	GGCTCGGTGAGATTGCGAA
fwd_ScPex8_R103G	GGAGCCACGTGGAACCTTTCACAG
rev_ScPex8_R103G	GTGAGATTGCGAAAACAGCATTC
fwd_ScPex8_Q110D	ACTTGATGGTTTTGGATGGTGTACTAG
rev_ScPex8_Q110D	CTGAAAGGTTCCACGTGGCTCG

2.6 Antikörper

Tabelle 8 verwendete Antikörper

Antikörper	Epitop	Herkunft
<u>primäre Antikörper</u>		
FLAG®-M2	Tag DYKDDDDK, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich
DECR2	Gesamtes Protein, Homolog in <i>S.cerevisiae</i> SPS19	Proteintech
GAPDH	Gesamtes Protein; ABIN1715163	antikoerper-online.de
<u>sekundäre Antikörper</u>		
rabbit-IgG	Gesamtes Protein, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich
Mouse-IgG	Gesamtes Protein, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Sigma-Aldrich

2.7 Quantitative analytische Methoden

2.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Mengen der Proteinlösung auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran getropft. Anschließend erfolgte die Färbung mit Amido Black. Als Referenz diente eine Proteinlösung mit bekannter Konzentration.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Nanodrop™ bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 ca. 50 µg doppelsträngiger DNA oder 40 µg RNA. Der Quotient 260/280 sollte zwischen 1,8 und 2 liegen und ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure.

2.8 Herstellung von Plasmid-DNA mittels Klonierung

2.8.1 Polymerasekettenreaktion

Für die Vervielfältigung der gewünschten DNA-Abschnitte wurde die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) angewendet. Dafür wurde die S7 Fusion Polymerase von Biozym eingesetzt. Diese weist eine sehr geringe Fehlerrate auf und generiert glatte Enden an den DNA-Fragmenten. Die PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde das 3-Schritt-Protokoll verwendet.

Die Mutation einzelner Aminosäuren oder der Einbau einer Aminosäureabfolge erfolgte unter Verwendung des „Q5 Site-directed mutagenesis Kit“ der Firma New England Biolabs® nach Herstellerangaben.

2.8.2 Restriktionsverdau

Nach Überprüfung der PCR-Produkte im Agarosegel erfolgte die Aufreinigung der Produkte mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kits* von Macherey-Nagel. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau der Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsnukleasen der Firmen New England Biolabs® oder ThermoFisher Scientific. Der Verdau erfolgte nach Herstellerangaben. Nach der Auftrennung im Agarosegel erfolgte die Aufreinigung aus dem Gel unter Verwendung des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kits*.

2.8.3 Phosphorylierung

Die T4-Polynukleotidkinase (PNK, ThermoFisher Scientific) phosphoryliert die freien 5'OH-Enden der DNA-Fragmente, wodurch deren Ligation ermöglicht wird.

Ein 25 µl PNK-Ansatz enthielt 100 ng der geschnittenen DNA-Fragmente und 10 U PNK. Der Ansatz wurde im *Rapid Ligation Buffer* nach Zugabe von 1 mM ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 min bei 75 °C.

2.8.4 Ligation

Die Ligation der jeweiligen DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des *Rapid Ligation Kit* von ThermoFisher Scientific nach Herstellerangaben.

2.8.5 Transformation in *E. coli* und Plasmidpräparation

Nach der Calciumchlorid-Methode von Cohen et al. (1972) hergestellte chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden mit der generierten Plasmid-DNA transformiert.

Mittels alkalischer Lyse wurde die Plasmid-DNA anschließend mit Hilfe des *NucleoSpin® Plasmid Kits* von Macherey-Nagel isoliert. Zur Überprüfung der präparierten DNA wurde ein Testverdau mit Restriktionsnukleasen durchgeführt. Nach der Auswertung der Spaltprodukte im Agarosegel wurde die DNA durch die Firma GATC Biotec AG sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Clone Manager Suite 7 Software* (Sci Ed Software).

2.9 Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.9.1 Kultivierung von *E. coli*

2.9.1.1 Medien und Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung der *E. coli* Bakterien erfolgte je nach Bedarf auf Festagarmedium oder in Flüssigkulturen bei 37 °C. Transformanden wurden unter Selektionsdruck mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) angezogen.

Die Medien wurden bei 120 °C für 20 min autoklaviert.

LB (Lysogeny-Broth) –Medium (Miller)		LB-Agarplatten	
1 % (w/v)	Bacto™ -Trypton		LB-Medium
0,5 % (w/v)	Hefextrakt	2 % (w/v)	Bacto™-Agar
1 % (w/v)	NaCl		

2.9.1.2 Anlegen von Dauerkulturen

Je 5 bis 7 ml LB-Medium, mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml Ampicillin versetzt, wurden mit Zellmaterial angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Zur Anfertigung von Dauerkulturen wurden die Übernachtskulturen mit Glycerin bis zu einer finalen Konzentration von 15 % versetzt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei – 80 °C.

2.9.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

2.9.2.1 Medien und Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* Stämmen auf Festagarmedium und in Flüssigkulturen erfolgte bei 30 °C. Je nach Fragestellung variierten die zugesetzten Kohlenstoffquellen.

Die Zelldichte der Kulturen wurde mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine OD von 1 entspricht hierbei ca. 3×10^7 Zellen pro ml Kultur.

Auxotrophe Bedingungen wurden nach Ausubel et al. (1989) eingehalten.

Prototrophien wurden auf SD-Festagarmedium nach Ausstrich von Zellmaterial durch 2-4 tägige Inkubation bei 30 °C überprüft.

Die Medien wurden bei 120 °C für 20 min autoklaviert.

SD-Medium

0,1 % Hefeextrakt
0,17 % (w/v) YNB
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
3 % Aminosäure-Mix (s.u.)
pH 6,0 mit KOH

Rytka-Medium

0,1 % Hefeextrakt
0,17 % (w/v) YNB
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
3 % Aminosäure-Mix (s.u.)
0,1 % (w/v) Glucose
0,1 % (v/v) Ölsäure
0,05 % (w/v) Tween 40
pH 6,0 mit KOH

YPD-Medium

1 % Hefeextrakt
2 % (w/v) Pepton
2 % (w/v) Glucose

Aminosäure-Mix

0,02 mg/ml Adeninsulfat
0,02 mg/ml Uracil
0,02 mg/ml L-Tryptophan
0,02 mg/ml L-Histidin HCL
0,03 mg/ml L-Leucin
0,03 mg/ml L-Lysin

YNBG-Medium

0,1 % Hefeextrakt
0,17 % (w/v) YNB
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
0,3 % (w/v) Glucose
3 % Aminosäure-Mix (s.u.)
pH 6,0 mit KOH

YNBO-Medium

0,1 % Hefeextrakt
0,17 % (w/v) YNB
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
3 % Aminosäure-Mix (s.u.)
0,1 % (v/v) Ölsäure
0,05 % (w/v) Tween 40 (Flüssigkultur)
0,5 % (w/v) Tween 40 (Agarplatten)
pH 6,0 mit KOH

Selektionsmedium

0,67 % (w/v) YNB
2 % (w/v) Glucose
3 % Aminosäure-Mix

Bei der Anzucht der Hefezellen wurde jeweils jene Komponente weggelassen, auf deren Prototrophie selektiert wurde.

Feste Medien enthielten 2 % (w/v) Agar.

2.9.2.2 Anlegen von Dauerkulturen

Unter sterilen Bedingungen wurde Festagarmedium beimpft, 2 Tage bei 30 °C kultiviert und je nach Stamm mehrere Wochen bei 4 °C gelagert. Um Hefestämme über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurden Zellen aus einer stationär gewachsenen Flüssigkultur im Verhältnis 1:2 mit 80 %igem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.9.2.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation basiert auf dem Protokoll von Gietz et al. (1995). Eine Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes diente zur Inokulation einer 20 ml Kultur auf eine $OD_{600} = 0,1$. Diese Hauptkultur wurde kultiviert, bis eine optische Dichte von 0,5 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (3 min, RT, 1100x g, A-4-44) und einmal mit sterilem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1,5 ml LiOAc/TE-Lösung aufgenommen und die Suspension erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspendierung in 180 µl LiOAc/TE-Lösung. Die Zellen wurden dann mit 8 µl denaturierter Lachssperma-DNA-Lösung sowie ca. 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nachdem zur Suspension 1 ml PEG-Lösung gegeben wurde, erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 30 °C und 300 rpm. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C und 300 rpm. Die gesamte Suspension wurde auf Selektionsmedium ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Aufgrund der hohen Koloniedichte erfolgte ein Verdünnungsausstrich.

LiOAc-/TE-Lösung

0,1 M LiOAc, 1-fach TE-Puffer

Frisch aus 1 M LiOAc-Stammlösung und 10-fach TE-Puffer angesetzt

PEG-Lösung

40 % (w/v) PEG4000, 0,1 M LiOAc, 1-fach TE-Puffer

Frisch aus 1 M LiOAc-Stammlösung, 50 % (w/v) PEG4000-Stammlösung und 10-fach TE-Puffer angesetzt

Lachssperma-DNA-Lösung

10 mg/ml, Sigma D9156-5X1ml

2.9.2.4 Ölsäure-Wachstumstest

Nach Kultivierung in einer YNBG^{0,3%}-Flüssigkultur unter Glucose-reprimierenden Bedingungen für 24 Stunden bei 30 °C wurden die Hefen in sterilem Wasser aufgenommen und in verschiedenen Verdünnungen auf YNBO-Agar aufgetragen (relative Zellzahl 2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4). Nach 5 bis 7 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde die Verwertung der Ölsäure überprüft. Alternativ wurde das Wachstumsverhalten in Ölsäure-haltigem Flüssigmedium überprüft. Hierzu wurde die relative Zellzahl anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt.

2.9.2.5 Mechanischer Aufschluss mittels Glasperlen und PNGase F-Verdau

Zu geernteten und gewaschenen Zellen wurde 1 Volumen 1,25x Homogenisierungspuffer gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glasperlen bis die Suspension trocken erschien. Der Zellaufschluss erfolgte durch wiederholtes Mischen mit einem Vortex (3x 1min). Zur Kühlung der Proben erfolgte nach jedem Mischen eine 30 sekündige Pause auf Eis. Anschließend wurde erneut 1,25x Homogenisierungspuffer hinzugegeben. Pro 50 ml Kultur wurden 2,5 ml des Puffers eingesetzt. Die Proben wurden zur Abtrennung des Zelldebris für 10 min bei 459x g (Allegra C1015) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde anschließend bei 186000x g für 20 min bei 4 °C im TLA55 zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet wurde in Membranpuffer resuspendiert und anschließend photometrisch vermessen.

Durch den sich anschließenden PNGase F-Verdau sollte eine eventuell auftretende Glykosylierung untersucht werden. Die Denaturierung der Membranen und der Verdau mit PNGase F erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers New England Biolabs®. In den Verdau wurden 10 eq der Membranen eingesetzt. Die Definition eines Äquivalents wurde dabei von Walter and Blobel (1983) übernommen. Ein Äquivalent (eq) Mikrosomen ist dabei definiert als die Menge an Membranen, die bei 280 nm eine optische Dichte von 50 aufweist.

Die Proben des enzymatischen Verdau wurden abschließend mittels SDS-PAGE (siehe 2.10.7) und Western Blot (siehe 2.10.8) analysiert.

5x Homogenisierungspuffer (5x HG)

250 mM	HEPES-KOH pH7,6
125 mM	KoAc
25 mM	Mg(OAc) ₂
5 mM	Na ₂ EDTA-NaOH
50 %	Glyzerin
	ddH ₂ O

1,25x Homogenisierungspuffer (1,25x HG)

1/4	5x HG
2,5 mM	DTT
1,25 mM	PMSF (in EtOH)
1/1000	PI-Mix
	ddH ₂ O

1x Homogenisierungspuffer (1x HG)

1/5	5x HG
2 mM	DTT
1 mM	PMSF (in EtOH)
1/1000	PI-Mix
	ddH ₂ O

Membranpuffer

50 mM	HEPES-KOH pH 7,6
1 mM	DTT
250 mM	Sucrose
	ddH ₂ O

PI-Mix

4 mg/ml	Chymostatin
5 mg/ml	Pepstatin
10 mg/ml	Leupeptin
10 mg/ml	Aprotinin

2.9.2.6 Enzymatischer Aufschluss mittels Zymolyase und Proteinase K -Verdau

Eingefrorene Zellpellets der entsprechenden Hefen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 ml/g DTT-Puffer versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 30 °C und 180 rpm erfolgte eine Sedimentation bei 4000x g für 5 min bei 4 °C (A-4-44). Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Die resuspendierten Pellets wurden anschließend in 7 ml/g 30 °C warmen Zymolyase-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 U/g Zymolyase 100T erfolgte die Inkubation für 3 Stunden bei 30 °C und 180 rpm, wodurch die Sphäroblastierung der Hefen erfolgte. Durch Messung der optischen Dichte bei 800 nm wurde die enzymatische Reaktion verfolgt. Im Verlauf der Inkubation sollte die optische Dichte deutlich sinken. Die entstandenen Sphäroblasten wurden bei 1500x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert (A-4-44) und zweimal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 2 ml/g Aufschlusspuffer aufgenommen und 20x im engen Dounce-Homogenisator mechanisch aufgeschlossen. Bei 1200x g für 5 min bei 4 °C wurden anschließend Zelltrümmer pelletiert. Der resultierende Überstand ist der sogenannte post-nukleäre Überstand (PNS). Aus diesem Überstand wurde durch Zentrifugation bei 25000x g für 15 min bei 4 °C im TLA100.3 Rotor ein Organellenpellet gewonnen. Das entstandene Pellet wurde in Aufschlusspuffer resuspendiert und es erfolgte eine

grobe Abschätzung der Gesamtproteinmenge mittels Dot Blot. In den sich anschließenden Proteinase K-Verdau wurden 100 µg Gesamtprotein eingesetzt. Diese wurden mit 0,2 mg/ml Proteinase K versetzt. Parallel wurde ein Ansatz mit zusätzlich 1 % Triton X-100 mitgeführt. Das Detergenz löst die Membranen auf, wodurch die Proteine frei zugänglich für die Protease vorliegen. Der Verdau erfolgte für 20 min auf Eis und wurde durch die Zugabe von 10 mM PMSF gestoppt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben mit TCA präzipitiert. Dazu wurden die Proben mit 15 % TCA für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 14000 rpm für 30 min bei 4 °C sedimentiert. Das Proteinpellet wurde mit -20 °C kaltem 80 % igem Aceton gewaschen. Nach erneuter Sedimentation für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C wurden die Pellets getrocknet. Anschließend wurden die Pellets im SDS-Probenpuffer bei 95 °C und 180 rpm gelöst. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.10.7) und Western Blot (siehe 2.10.8).

DTT-Puffer (pH 9,4)

0,1 M TrisHCl
10 mM DTT

Zymolyase-Puffer

1,2 M Sorbitol
20 mM Kpi-Puffer

Kpi-Puffer

1 M K_2HPO_4 mit 1 M KH_2PO_4 auf pH 7,4

Proteasepuffer

50 mM HEPES-KOH (pH 7,6)
250 mM Sucrose
140 mM Kaliumacetat
3 mM Magnesiumacetat

Aufschlusspuffer

5 mM MES pH 6
1 mM Na_2 -EDTA
1 mM KCl
0,10 % Ethanol p.a.

2.10 Proteinbiochemische Methoden**2.10.1 Präparation von Mikrosomen aus Hefezellen**

Die verwendeten Hefen lagen auf YPD- bzw. Selektionsplatten vor. Nach zwei Vorkulturen im kleineren Volumen wurde die Hauptkultur angeimpft. Dazu wurde die optische Dichte der zweiten Vorkultur bei 600 nm bestimmt. Die Hauptkultur wurde dann mit einer optischen Dichte von 0,05 – 0,1 beimpft und inkubiert. Die Hauptkultur umfasste 6x 1 L YPD und wurde solange kultiviert bis eine optische Dichte von 2–4 erreicht wurde. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 15344x g für 14 min bei 4 °C im JA-14 Rotor. Die entstandenen Zellpellets wurden anschließend mit kaltem, sterilen ddH₂O gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden in 100 ml 1,25x Homogenisierungspuffer (HG) resuspendiert und in den großen Bead Beater-Aufsatz überführt.

Mit weiteren 100 ml 1x HG wurden eventuelle Pelletreste ebenfalls in den Bead Beater-Aufsatz überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 6x 1min pulsen mit je 1 min Pause. Nach dem Zellaufschluss wurde der Überstand in Zentrifugationsgefäße überführt und die Glasbeads mit 60 ml 1x HG gewaschen. Der gesammelte Überstand wurde im C0650 bei 1000x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die daraus resultierenden Überstände wurden anschließend wiederum im C0650 bei 7512x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die finale Zentrifugation der Überstände erfolgte im Type 45Ti mit 72660x g für 35 min bei 4 °C. Die entstandenen Pellets enthielten die Hefemikrosomen. Diese wurden in 20 ml Membranpuffer aufgenommen. Mit Hilfe eines Photometers wurde bestimmt, wie viel Membranäquivalente erhalten wurden.

5x Homogenisierungspuffer (5x HG)

250 mM	HEPES-KOH pH7,6
125 mM	KoAc
25 mM	Mg(OAc) ₂
5 mM	Na ₂ EDTA-NaOH
50 %	Glyzerin

1,25x Homogenisierungspuffer (1,25x HG)

1/4	5x HG
2,5 mM	DTT
1,25 mM	PMSF (in EtOH)
1/1000	PI-Mix

1x Homogenisierungspuffer (1x HG)

1/5	5x HG
2 mM	DTT
1 mM	PMSF (in EtOH)
1/1000	PI-Mix

Membranpuffer

50 mM	HEPES-KOH pH 7,6
2 mM	DTT
10 %	Glyzerin
1/10000	PI-Mix

PI-Mix

4 mg/ml	Chymostatin
5 mg/ml	Pepstatin
10 mg/ml	Leupeptin
10 mg/ml	Aprotinin

2.10.2 Präparation von Mikrosomen aus Hund

Raue Mikrosomen wurden entsprechend nach Walter and Blobel (1983) aus dem Hundepankreas präpariert. Das Organ wurde nach Entnahme in kaltem Puffer P gespült und bei 4 °C weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde gesäubert, zerkleinert und anschließend mit 3 Volumen Puffer P mit 1 µg/ml Elastatinal in einem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert. Zur Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zellkernen und anderer Organellen erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 1381x g und 4 °C (JA-14). Der daraus resultierende Überstand wurde bei 10000x g für 10 min bei 4 °C erneut zentrifugiert. Die Fraktion des rauen ERs im Überstand

wurde durch Zentrifugation für 3,5 h bei 235418x g (Type 45Ti) und 4 °C durch ein 1,3 M Sucrosekissen erhalten. Das Membranpellet wurde in Membranpuffer mit 10 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Chymostatin resuspendiert. Die Mikrosomen wurden anschließend photometrisch quantifiziert und bei -80 °C gelagert.

Puffer P

50 mM	HEPES-KOH (pH 7,6)
50 mM	KOAc
6 mM	Mg(OAc) ₂
1 mM	Na ₂ -EDTA
250 mM	Sucrose
1 mM	DTT
0,5 mM	PMSF
1 x	PI-Mix

PI-Mix (1000x)

1 mg/ml	Chymostatin
1 mg/ml	Pepstatin
10 mg/ml	Leupeptin
10 mg/ml	Aprotinin in DMSO

Membranpuffer

50 mM	HEPES-KOH (pH 7,6)
1 mM	DTT
250 mM	Sucrose

2.10.3 *In vitro* Transkription

Für die Proteinsynthese im Retikulozytenlysat wurde die mRNA mit der T7-RNA Polymerase *in vitro* synthetisiert. Dazu wurden die pGEM4-Plasmide hinter der codierenden Sequenz durch Restriktionsendonukleaseverdau linearisiert und mit dem DNA-Aufreinigungskit gereinigt.

Der 50 µl Transkriptionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

1 µg	Linearisiertes Plasmid
1x	<i>Transcription Buffer</i>
0,5 mM	rNTPs (jeweils)
10 mM	DTT
0,2 mg/ml	BSA
100 U	RNasin
20 U	T7-Polymerase

Weitere 20 U T7-RNA-Polymerase und 12,5 nmol rNTPs wurden nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C zugesetzt. Es folgt eine weitere Inkubation bei 37 °C für 150 min.

Anschließend wird die mRNA mit dem *NucleoSpin® RNA Clean-up Kit* der Firma Machery & Nagel aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 50 µl RNase-freiem H₂O. Anschließend erfolgte die Lagerung der mRNA bei -80 °C.

2.10.4 *In vitro* Translation

Für die zellfreie Proteinsynthese wurde Retikulozytenlysat aus Kaninchenblut verwendet. Um das Lysat zunächst von Membranen und aggregierten Proteinen zu klären, erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 20817x g bei 4 °C (5417R).

Der 10 µl Translationsansatz enthielt:

6 µl	Retikulozytenlysat
0,2 µl	Aminosäuremix ohne Methionin (jeweils 1 mM)
0,5 µl	³⁵ S-Methionin (entspricht 0,1 MBq)
8 U	RNasin
0,5 µl bzw. 1 µl	mRNA

Der Translationsansatz wurde für 45 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 2.10.7) und die Auswertung mittels Phosphoimaging.

2.10.5 Co-translationaler Transportassay

Beim co-translationalen Transportassay wurde der Translationsansatz zusätzlich mit Mikrosomen versetzt. Dabei wurden 0,3 eq Hundemikrosomen bzw. 0,4 eq Hefemikrosomen eingesetzt. Die Translation und der Transport in die Mikrosomen erfolgten für 45 min bei 25 °C. Je nach Fragestellung enthielt der Transportansatz außerdem 100 µM des Akzeptorpeptids NYT. Dieses verhindert eine auftretende N-Glykosylierung der Proteine im Transportansatz. Im verwendeten Assay ist prinzipiell auch eine post-translationale Translokation möglich.

Daran angeschlossen wurde der Proteinase K-Verdau (siehe 2.10.6) durchgeführt. Mittels SDS-PAGE (siehe 2.10.7) erfolgte abschließend die Auftrennung der Proteine. Durch Phosphoimaging erfolgte die Auswertung des Assays.

2.10.6 Proteinase K -Verdau

Zu jeweils 5 µl des Transportansatzes wurden 5 µl der Proteinase K (1 mg/ml) in Proteasepuffer gegeben. Als Kontrolle wurde der restliche Transportansatz mit Proteasepuffer behandelt. Die Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Zugabe von gesättigtem PMSF für 5 min auf Eis gehemmt.

Proteasepuffer

50 mM	HEPES-KOH (pH 7,6)
250 mM	Sucrose
140 mM	KOAc
3 mM	Mg(OAc) ₂

2.10.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach einer Denaturierung in SDS-Probenpuffer erfolgte die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970). Für die Analyse der Proteine wurden Proben im Tris-Glycin-System mit geeigneten Trenngelen (10 %, 12,5 %, 8-15 %) aufgetrennt.

SDS-Gele wurden für einen sich anschließenden Western Blot (siehe 2.10.8) verwendet oder mit 15 % Essigsäure fixiert. Fixierte Gele wurden gewaschen und getrocknet. Es folgte ein Autoradiogramm. Radioaktive Gele wurden auf einen Storage Phosphor Screen (GE Healthcare Life Sciences) exponiert. Diese wurden mit dem Phosphoimager ausgelesen.

Elektrophoresepuffer

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,10 %	SDS

SDS-Probenpuffer (2x)

120 mM	Tris – HCl pH 6,8
4 %	SDS
20 %	Glyzerin
100 mM	DTT
	Bromphenolblau

2.10.8 Immunochemische Proteindektetion im Western Blot

Der Transfer, der durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Blotting-Membran erfolgte in einem Semi-Dry Electroblotter mit Blottingpuffer bei 14 V und 2 mA/cm² für 54 min. Anschließend wurde die Membran in TBT mit 5 % Magermilchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBT erfolgte die Inkubation mit spezifischen, Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBT wurde das Antikörpersignal mit Peroxidasesubstrat über die Peroxidase-reaktion (Kamera LAS-1000, Fujifilm) detektiert. Der Antikörper gegen das FLAG-Tag ist bereits Peroxidase gekoppelt. Daher erfolgt nach dreimaligem Waschen mit TBT direkt die Auswertung über die Peroxidase-reaktion. Ein Zweitantikörper ist in diesem Fall nicht notwendig.

Als Blottingmembran wurden entweder PVDF-Membranen (PVDF 0,2 µm; BioRad) oder Nitrozellulosemembranen (NC Protran 0,2 µm; BioRad) verwendet.

Die Auswertung der SDS-Gele und Western Blots erfolgte entweder mit der Software AIDA (1D, Version 3.52; Raytest) oder ImageQuant TL (1D, Version 8.1; GE Healthcare Life Sciences).

Blottingpuffer

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,10 %	SDS
20 %	Methanol

TBT

50 mM	Tris – HCl pH 7,5
150 mM	NaCl
0,10 %	Tween 20

3. Ergebnisse

3.1 FLAG-getaggte Varianten des Pex8p können *PEX8*-Knockout komplementieren

Wie genau Pex8p in Peroxisomen gelangt, ist nach wie vor nicht vollständig untersucht. Das Peroxin trägt vermutlich beide bekannten peroxisomalen Targetingsignale, wodurch ein direkter Import in die Peroxisomen wahrscheinlich erscheint. Interessanterweise wird für Pex8p andererseits postuliert, dass es zunächst ins endoplasmatische Retikulum (ER) importiert wird. Von dort erfolgt der Weitertransport zu den Peroxisomen. Pex8p liegt als peripheres Membranprotein an der Innenseite der Peroxisomenmembran vor und trägt keine ER-spezifischen Targetingsignale. In der Sequenz des Peroxins befinden sich jedoch sieben mögliche Glykosylierungsstellen, die im Lumen des ERs modifiziert werden könnten. Basierend darauf soll zunächst geprüft werden, ob *in vivo* eine Glykosylierung des Pex8p beobachtet werden kann. Eine glykosylierte Form des Peroxins wäre ein Hinweis darauf, dass es tatsächlich ins ER importiert worden ist.

Um eine mögliche Glykosylierung des Pex8p *in vivo* zu untersuchen, mussten zunächst verschiedene Konstrukte hergestellt werden. Zum einen wurde eine Punktmutation an Position 111 eingefügt. Durch den Aminosäureaustausch von Leucin zu Threonin wird eine mögliche Glykosylierungsposition verbessert, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer N-Glykosylierung deutlich erhöht wird. Des Weiteren ist es nötig, einen Proteintag zum Nachweis des Pex8p zu verwenden, da die Herstellung eines Antikörpers gegen verschiedene Peptidsequenzen des Peroxins keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde das FLAG-Tag direkt hinter das Start-Methionin des Proteins kloniert. Dies soll die Detektion des Proteins im Western Blot ermöglichen. Für die Herstellung der Konstrukte wurden Hefe-Shuttle-Vektoren verwendet, bei denen sich die jeweilige kodierende Sequenz des *PEX8* unter Kontrolle des Cup-Promotors befand. Des Weiteren befindet sich im verwendeten Vektor die kodierende Sequenz des *URA3*-Gens, wodurch eine Selektion der transformierten Hefen möglich ist.

Die hergestellten Konstrukte sind in Abbildung 3 zu sehen.

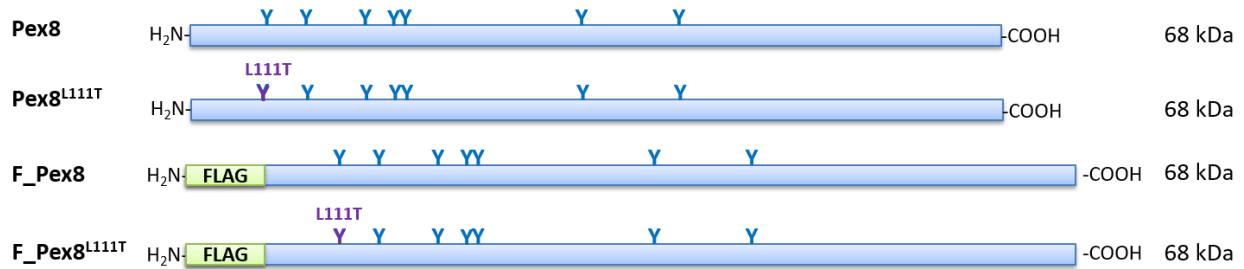


Abbildung 3 generierte Konstrukte des Pex8

Schematische Darstellung der generierten Konstrukte. Die Molekulargewichte der entsprechenden Proteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Mögliche Glykosylierungspositionen sind mit einem „Y“ markiert.

Pex8 = Pex8p aus *S. cerevisiae*; Pex8^{L111T} = Pex8p mit Punktmutation L111T zur Verbesserung einer Glykosylierungsposition; F_Pex8 = Pex8p mit N-terminal angefügtem FLAG-Tag; F_Pex8^{L111T} = Pex8p mit N-terminal angefügtem FLAG-Tag und Punktmutation L111T

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die generierten Konstrukte einen Knockout des *PEX8*-Gens komplementieren können. Dazu wurden die entsprechenden Varianten des *PEX8* in einen Hefestamm transformiert, bei dem das *PEX8*-Gen durch den *LEU*-Auxotrophiemarker ersetzt worden ist. Dieser Deletionsstamm ist demnach nicht in der Lage Pex8p herzustellen. Dies zeigt sich darin, dass keine funktionalen Peroxisomen gebildet werden können. Das sorgt dafür, dass Ölsäure als Kohlenstoffquelle von diesen Hefen nicht verstoffwechselt werden kann.

Um zu überprüfen, ob die generierten Konstrukte die Deletion des *PEX8* komplementieren können, sollte daher zunächst das Wachstum im Ölsäuremedium untersucht werden. Kommt es zur Komplementation des Knockouts können sich Peroxisomen bilden, sodass die generierten Hefen ein deutliches Wachstum zeigen sollten. Nach einer Vorkultivierung in Minimalmedium (YNBG^{0,3%}) wurde zunächst die Zellzahl der Hefekultur bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Zellzahlen erstellt. Die Verdünnungen der Hefen wurden auf Ölsäure-Festmedium getropft und mehrere Tage bei 30 °C kultiviert. Das Vorhandensein von funktionalen Peroxisomen zeigt sich durch die Koloniebildung der Hefen. Das Ergebnis der Kultivierung der generierten Hefestämme ist Abbildung 4 zu entnehmen.

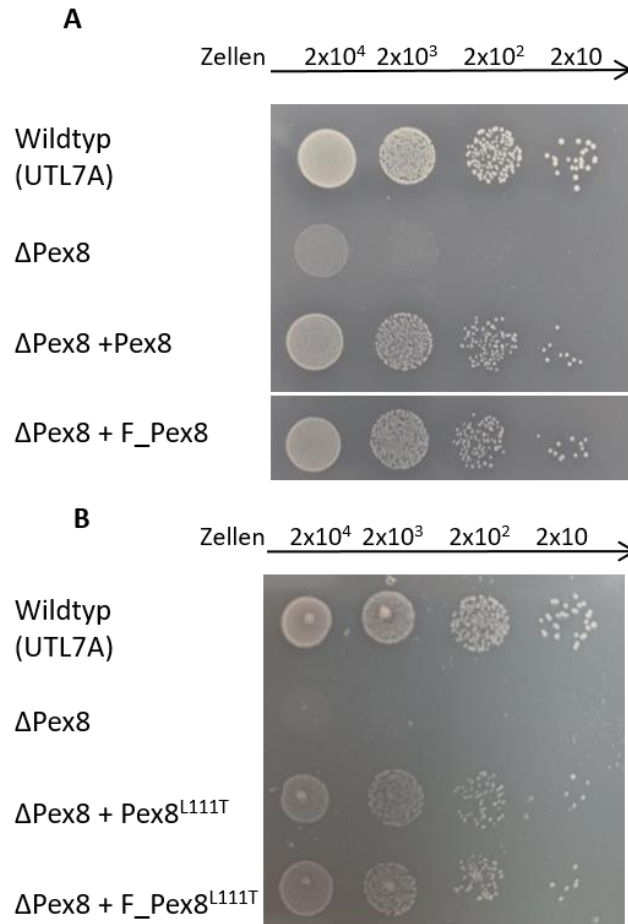


Abbildung 4 FLAG-getaggtes Pex8p kann Knockout des *PEX8* komplementieren

Die generierten Hefestämme wurden zunächst im Minimalmedium vorkultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl der Kultur. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurden verschiedene Verdünnungen mit definierten Zellzahlen hergestellt. Diese wurden auf Ölsäure-Festagarmedium getropft und anschließend mehrere Tage bei 30 °C kultiviert.

In Abbildung 4 A und B ist zu erkennen, dass die neu generierten Hefestämme in der Lage sind das Ölsäuremedium zu verwerten. Die deutliche Koloniebildung zeigt, dass die eingefügten Pex8p-Varianten den Knockout komplementieren können. Sowohl die wiedereingebrachte Wildtyp-Sequenz des Pex8p, als auch alle anderen generierten Konstrukte sorgen für die Bildung von funktionalen Peroxisomen. Dabei hat die Punktmutation an Position 111 keinen Einfluss auf die Bildung der Organellen. Auch das Einfügen des FLAG-Tags scheint die Neubildung der Peroxisomen nicht zu beeinflussen.

Wie erwartet zeigt auch der verwendete Wildtyp-Hefestamm (UTL7A) eine deutliche Koloniebildung nach Kultivierung im Ölsäuremedium. Im Gegensatz dazu wird bei dem *PEX8*-Deletionsstamm deutlich, dass kein Pex8p vorliegt, wodurch kein Wachstum im verwendeten Medium möglich ist.

Um das beobachtete Ergebnis aus Abbildung 4 abzusichern, wurde zusätzlich das Wachstum der Hefestämme in Flüssigkulturen untersucht. Dazu erfolgte zunächst die Kultivierung im Minimalmedium. Nach der Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Photometer wurden Flüssigkulturen des Ölsäuremediums mit einer definierten Zellzahl inokuliert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Hefen über den angegebenen Zeitraum. Zu den angegebenen Zeiten wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt. Ein Anstieg der OD deutet daraufhin, dass die Hefen in der Lage sind die Ölsäure zu verwerten. Dies ist nur der Fall, wenn die eingebrachten Konstrukte den Knockout des *PEX8* komplementieren können. Das Ergebnis der Kultivierung im Flüssigmedium ist Abbildung 5 zu entnehmen.

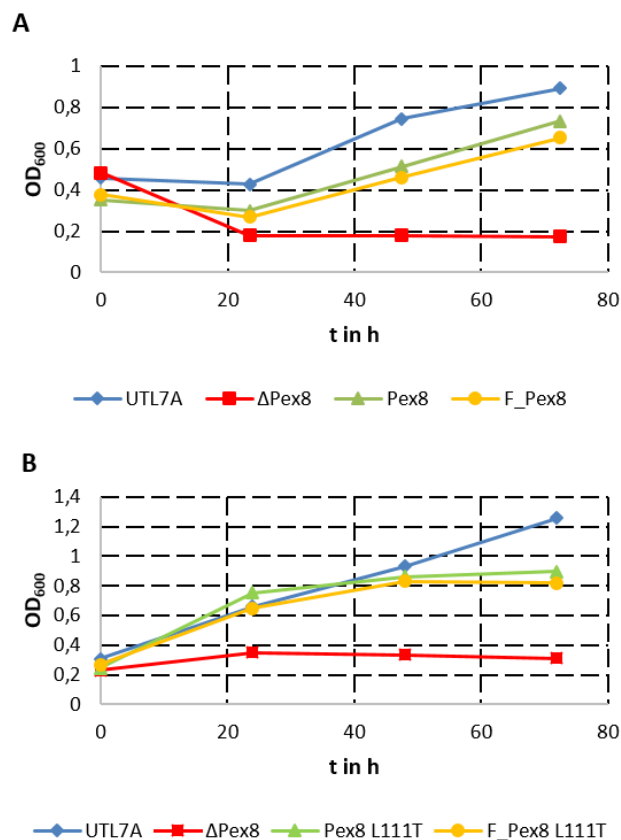


Abbildung 5 Generierte Hefestämme können Peroxisomen bilden

Die generierten Hefestämme wurden zunächst im Minimalmedium vorkultiviert. Anschließend wurde eine Flüssigkultur mit Ölsäuremedium (YNBO) mit einer bestimmten Zellzahl inokuliert. Die Kulturen wurden über den angegebenen Zeitraum kultiviert. Zu definierten Zeiten wurde die optische Dichte der Kulturen ermittelt und im Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass der verwendete Wildtypstamm UTL7A ein deutliches Wachstum im Ölsäuremedium aufweist. Wie erwartet ist dies beim Deletionsstamm nicht der Fall. Hier kommt es zu keinem Anstieg der optischen Dichte. Lediglich, wenn Varianten des Pex8p eingebracht werden, kommt es zu einem Anstieg der Kurven. Dabei ist, wie bereits in Abbildung 4 beobachtet, das Wachstum unabhängig von der eingefügten Punktmutation oder dem verwendeten FLAG-Tag. Es fällt jedoch auf, dass die optische Dichte der Kulturen nicht das Niveau des Wildtypstammes erreicht. Dies lässt sich vermutlich mit den unterschiedlichen Promotoren erklären. Der endogene Pex8p-Promotor sorgt vermutlich für eine höhere Expression des Peroxins als der im Shuttle-Vektor vorhandene Cup-Promotor.

Die Ergebnisse der Abbildungen 4 und 5 machen deutlich, dass die generierten Konstrukte des Pex8p für weitere Untersuchungen verwendet werden können. Es zeigt sich, dass weder die Punktmutation zur Verbesserung der Glykosylierungsposition noch der Einbau des FLAG-Tags die Bildung von Peroxisomen beeinflusst.

3.2 Pex8p wird *in vivo* nicht glykosyliert

Nachdem gezeigt wurde, dass die generierten Konstrukte aus Abbildung 3 in der Lage sind, den Knockout des *PEX8* zu komplementieren, sollte im Folgenden untersucht werden, ob *in vivo* eine glykosylierte Form des Pex8p nachgewiesen werden kann. Dazu wurden die entsprechenden Hefestämme zunächst im Ölsäuremedium kultiviert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe von Glasbeads. Nach der Abtrennung von unaufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern wurde ein Membranenpellet generiert. Die erhaltenen Membranen wurden photometrisch vermessen und anschließend in den PNGase F – Verdau eingesetzt. Nach einer initialen Denaturierung der Membranen erfolgte die Inkubation mit PNGase F. Dieses Enzym spaltet spezifisch Glykosylierungen von Proteinen ab. Dadurch kommt es zu einer Verringerung des Molekulargewichts der untersuchten Proteine. Eine einfache N-Glykosylierung entspricht dabei etwa einem Größenunterschied von 2,5 kDa. Die Proben des enzymatischen Verdaus wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Dabei wurde ein Antikörper eingesetzt, der gegen das verwendete FLAG-Tag gerichtet ist. Dieser ist bereits mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und kann mittels Chemolumineszenz ausgewertet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 6 zu sehen.

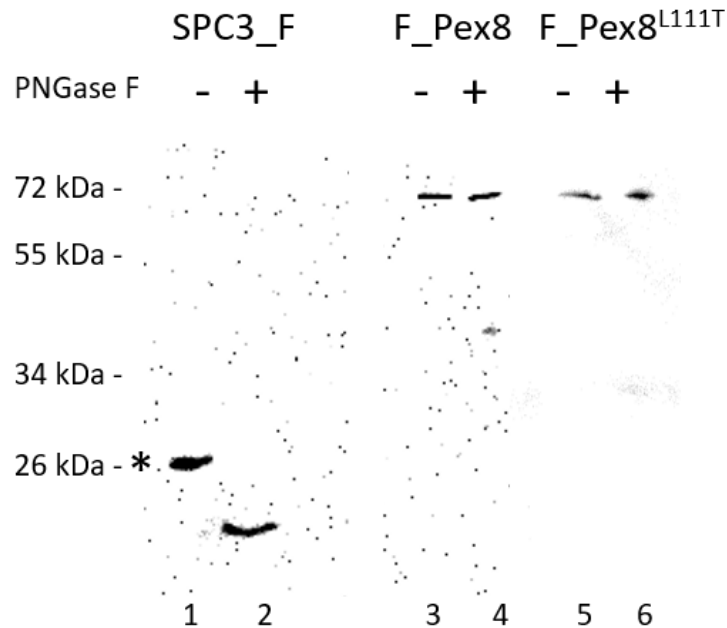


Abbildung 6 Pex8p wird *in vivo* nicht glykosyliert

YNBO-Kulturen der verwendeten Hefen wurden mit Hilfe von Glasbeads aufgeschlossen. Das gewonnene Membranenpellet wurde zunächst denaturiert und anschließend mit PNGase F behandelt. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer erfolgte die Denaturierung der Proben. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot unter Verwendung eines gegen das FLAG-Tag gerichteten Antikörpers. Der Antikörper ist bereits Peroxidase gekoppelt und kann mittels Chemolumineszenz ausgewertet werden. Die glykosylierte Form des SPC3 ist mit * markiert.

SPC3_F = SPC3 mit C-terminal angefügtem FLAG-Tag, F_Pex8 = Pex8p mit N-terminal angefügtem FLAG-Tag; F_Pex8^{L111T} = Pex8p mit N-terminal angefügtem FLAG-Tag und Punktmutation L111T

In Abbildung 6 wird deutlich, dass es *in vivo* zu keiner Glykosylierung des Pex8p kommt. Der Einsatz der PNGase F sorgt für keine Verringerung des Molekulargewichts der untersuchten Pex8p-Varianten (Spur 4 und 6). Auch mit optimierter Glykosylierungsposition kommt es demnach nicht zur Glykosylierung des Proteins.

Um sicherzustellen, dass im verwendeten Assay prinzipiell eine Abspaltung von Glykosylierungen erfolgen kann, wurde ein Hefestamm mitgeführt, der eine FLAG-getaggte Variante des SPC3 exprimiert. Das Protein befindet sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und wird dort mehrfach glykosyliert. Bei Zugabe der PNGase F ist hier eindeutig eine Verringerung des Molekulargewichts zu beobachten (Spur 2). Diese ist auf das Abspalten der Glykosylierungen zurückzuführen.

Die Tatsache, dass keine glykosylierte Form des Pex8p beobachtet werden kann, kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann dies bedeuten, dass es zu keinem Import des Peroxins ins ER kam und somit auch keine Glykosylierung erfolgte. Zum anderen ist es auch nicht auszuschließen, dass sich Pex8p zwar im Lumen des ERs befunden hat, jedoch nicht modifiziert wurde.

3.3 Pex8p wird *in vitro* nicht in raue Hefemembranen transportiert

In Abbildung 6 zeigt sich, dass keine glykosylierte Form des Pex8p *in vivo* beobachtet werden kann. Es wäre möglich, dass die vorhergesagten möglichen Glykosylierungsstellen im Lumen des ERs nicht modifiziert werden können. Um zu überprüfen, ob eine N-Glykosylierung des Pex8p prinzipiell erfolgen kann, sollte im Weiteren ein etabliertes *in vitro* Transportsystem verwendet werden. Im zellfreien Retikulozytenlysat aus Kaninchen erfolgt die Markierung der translatierten Proteine mit Hilfe von [³⁵S]–Methionin. Durch die Zugabe von rauen ER-Membranen aus der Hefe wird eine Translokation der Proteine ermöglicht. Diese kann sowohl co- als auch post-translational erfolgen. Im Lumen der verwendeten Mikrosomen können anschließend post-translational Modifikationen erfolgen. Zum einen kann es zur Abspaltung der ER-Signalsequenzen kommen, wodurch das Molekulargewicht der Proteine leicht abnimmt. Zum anderen können N-Glykosylierungen erfolgen, die für eine Erhöhung des Molekulargewichts sorgen. Durch die Anwendung des Akzeptortripeptids NYT kann eine auftretende Glykosylierung verhindert werden. Dies soll dazu dienen zu überprüfen, ob glykosylierte Formen der entsprechenden Proteine vorlagen. Nach erfolgter Translation und Translokation erfolgt die Auftrennung der Proben mittels SDS-Gelelektrophorese. Anschließend erfolgt die Auswertung über Phosphoimaging. Die verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 7 dargestellt. Das Ergebnis der *in vitro* Translokation ist Abbildung 8 zu entnehmen.

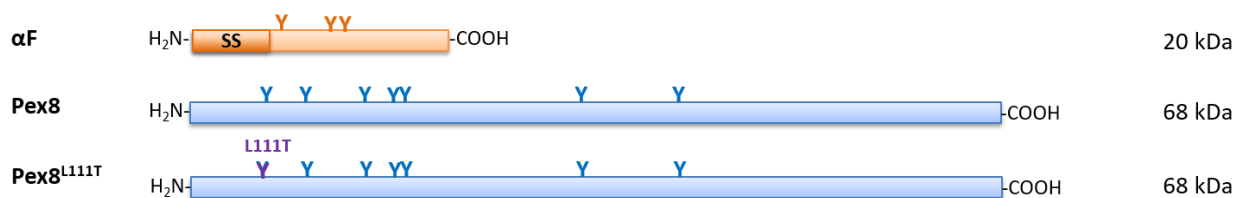


Abbildung 7 Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte

Schematische Darstellung der eingesetzten Konstrukte. Die Molekulargewichte der Proteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben. Mögliche Glykosylierungspositionen sind mit einem „Y“ markiert.

αF = Präpro-Alphafaktor Pex8 = Pex8p aus *S. cerevisiae*; Pex8^{L111T} = Pex8p mit Punktmutation L111T zur Verbesserung einer möglichen Glykosylierungsposition

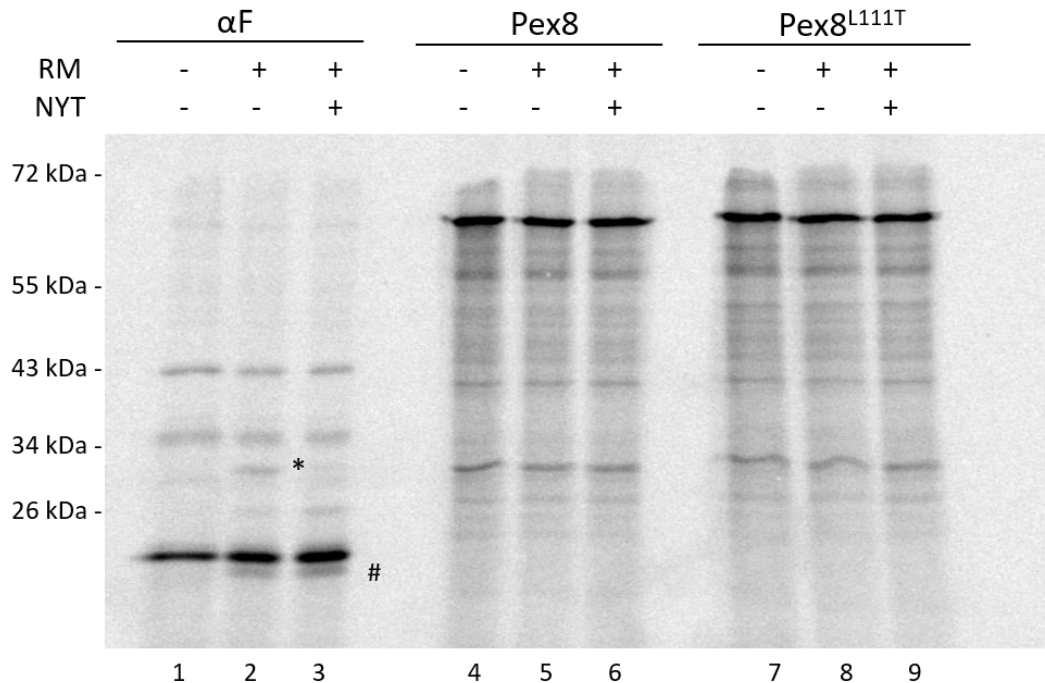


Abbildung 8 Pex8p wird *in vitro* bei Zugabe von Hefemembranen nicht glykosyliert

Die mRNA der zu untersuchenden Konstrukte wurde *in vitro* in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin translatiert. Die Translokation der Proteine fand zum Teil in Anwesenheit von rauen ER-Membranen und des Akzeptortripeptids NYT statt, welches eine auftretende Glykosylierung inhibiert.

Die prozessierte (#) und glykosylierte (*) Form des Alphafaktors sind gekennzeichnet. Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Phosphoimaging. RM = raue Membranen; NYT = Akzeptortripeptid

Abbildung 8 zeigt, dass es zu keiner Glykosylierung des Pex8p nach Zugabe von Membranen kommt. Im verwendeten System kommt es zur Translation des Proteins, welches eine Größe von ca. 68 kDa aufweist. Bei Zugabe von rauen ER-Membranen (Spur 5 und 8) kommt es zu keiner Bande mit einem höheren Molekulargewicht. Die Verbesserung einer möglichen Glykosylierungsposition hat demnach keinen Effekt. Die Anwendung des Tripeptids NYT sorgt dementsprechend für keine Veränderung der Banden (Spur 6 und 9). Dies ist bei beiden untersuchten Pex8p-Varianten der Fall.

Dass im verwendeten System prinzipiell eine Translokation von Proteinen in die Membranen des ERs möglich ist, zeigt das Kontrollprotein Präpro-Alphafaktor. Dieses Protein weist im unmodifizierten Zustand eine Größe von ca. 20 kDa auf. Bei Zugabe von ER-Membranen der Hefe kommt es zur mehrfachen Glykosylierung des Proteins, welches sich in einer deutlichen Erhöhung des Molekulargewichts widerspiegelt (Spur 2 mit * gekennzeichnet). Neben der Glykosylierung ist in Spur 2 außerdem die prozessierte Form des Alpha-Faktors zu erkennen, welche leicht unterhalb des unmodifizierten Proteins läuft (mit # gekennzeichnet). Durch die

Anwendung des Tripeptids NYT nimmt das Signal der glykosylierten Form deutlich ab und es ist lediglich die unmodifizierte und die prozessierte Form des Proteins zu beobachten (Spur 3). Auch ohne auftretende Glykosylierung könnte es dennoch zum Import der Pex8p-Varianten in die rauen Membranen gekommen sein. Um dies zu untersuchen, wurde ein Proteinase K - Verdau durchgeführt. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine zunächst im Retikulozytenlysat translatiert. Die Markierung erfolgt erneut mittels [³⁵S]-Methionin. Ein Teil der Ansätze enthielt raue Membranen aus der Hefe, sodass eine Translokation möglich war. Anschließend wurde die Hälfte der Ansätze mit Proteinase K behandelt. Diese Protease kann alle Proteine abbauen, die sich nicht in einem membranumschlossenen Raum befinden haben. Importierte Proteine sind demnach vor dem Abbau geschützt. Der Verdau mit Proteinase K wurde mit Hilfe von PMSF gestoppt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE. Die Auswertung erfolgte erneut mit Hilfe von Phosphoimaging. Das Ergebnis des Verdau ist in Abbildung 9 zu sehen.

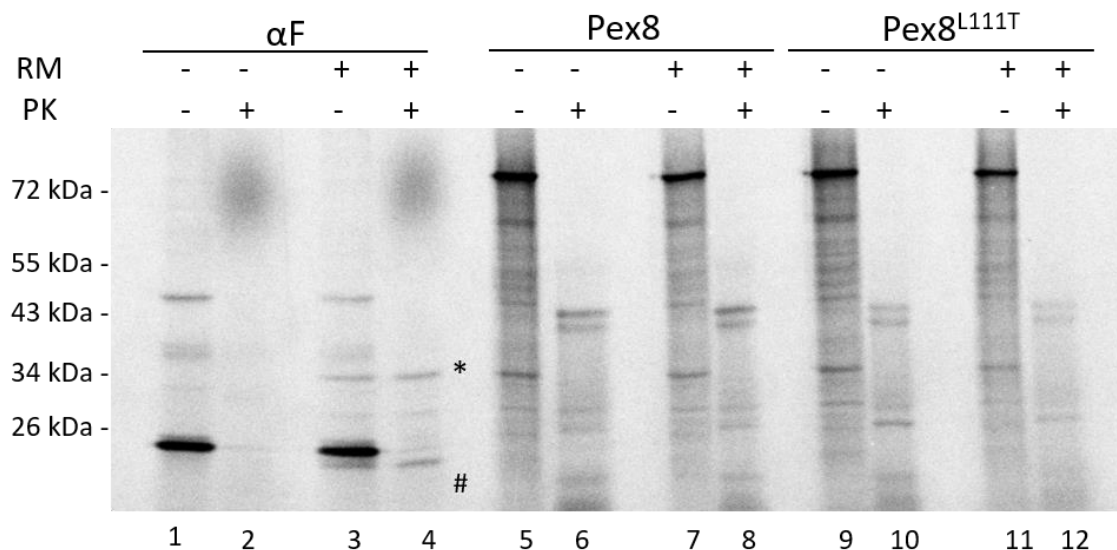


Abbildung 9 Varianten des Pex8p werden nicht in raue Membranen transportiert

Die Synthese der Proteine erfolgte im Retikulozytenlysat. ER-Membranen aus der Hefen ermöglichen eine Translokation der Proteine. Im Anschluss an die mögliche Translokation wurde ein Teil der Ansätze mit Proteinase K behandelt. Dieser Verdau wurde mit Hilfe von PMSF gestoppt. Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Phosphoimaging.

Die prozessierte (#) und glykosylierte (*) Form des Präpro-Alphafaktors sind gekennzeichnet. RM = raue Membranen; PK = Proteinase K

In Abbildung 9 wird deutlich, dass Pex8p nicht in raue Membranen der Hefe transportiert worden ist. Bei Zugabe von Proteinase K kommt es zum Abbau des Proteins (Spur 8 und 12). Lediglich Fragmente von ca. 40 kDa werden von der Protease nicht abgebaut. Diese Fragmente kann man jedoch auch beobachten, wenn sich keine rauen Membranen im Ansatz befunden haben. Dies deutet daraufhin, dass es sich vermutlich um proteaseresistente Fragmente des Peroxins handelt und nicht um eine vollständig transportierte Form des Pex8p.

Erneut dient der Präpro-Alphafaktor als Kontrolle für den verwendeten Assay. Befinden sich keine Membranen im Ansatz, kommt es zum vollständigen Abbau des Proteins (Spur 2). Bei Zugabe von rauen Membranen kann hier erneut die auftretende Glykosylierung und Prozessierung beobachtet werden (Spur 3). Die zugegebene Protease ist nicht in der Lage diese modifizierten Formen des Alphafaktors abzubauen, da diese sich im Lumen der Mikrosomen befinden. Lediglich die unmodifizierte und nicht-transportierte Form des Proteins wird durch die Proteinase K abgebaut (Spur 4).

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass es zu keinem Import von Pex8p ins ER kommt. Weder im verwendeten *in vitro* System noch unter *in vivo* Bedingungen konnten Hinweise gewonnen werden, die einen Import ins ER bedeuten würden. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob eine Glykosylierung des Peroxins prinzipiell erfolgen könnte.

Um zu überprüfen, ob die vorhergesagten Glykosylierungspositionen modifiziert werden können, soll Pex8p daher gezielt ins Lumen des ERs gezwungen werden. Dafür wurde die ER-spezifische Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors vor Pex8 kloniert. Man geht davon aus, dass dies dazu führt, dass das Protein ins ER transportiert wird. Dort kann dann eine Glykosylierung der möglichen Positionen erfolgen. Um zu überprüfen, ob eine Glykosylierung am Pex8p erfolgen kann, soll erneut die Variante mit der Punktmutation L111T mitgeführt werden.

Die generierten Konstrukte sind in Abbildung 10 A dargestellt. Erneut wird das Retikulozytenlysat verwendet, um eine auftretende Modifikation zu beobachten. Die Markierung der zu untersuchenden Proteine erfolgt durch [³⁵S] - Methionin. Durch die Zugabe von rauen Membranen der Hefe wird eine Translokation ermöglicht. Das Akzeptortripeptid NYT dient erneut als Inhibitor einer möglichen Glykosylierung. Die Analyse des Translokationsansatzes erfolgt mittels SDS-Gelelektrophorese und Phosphoimaging.

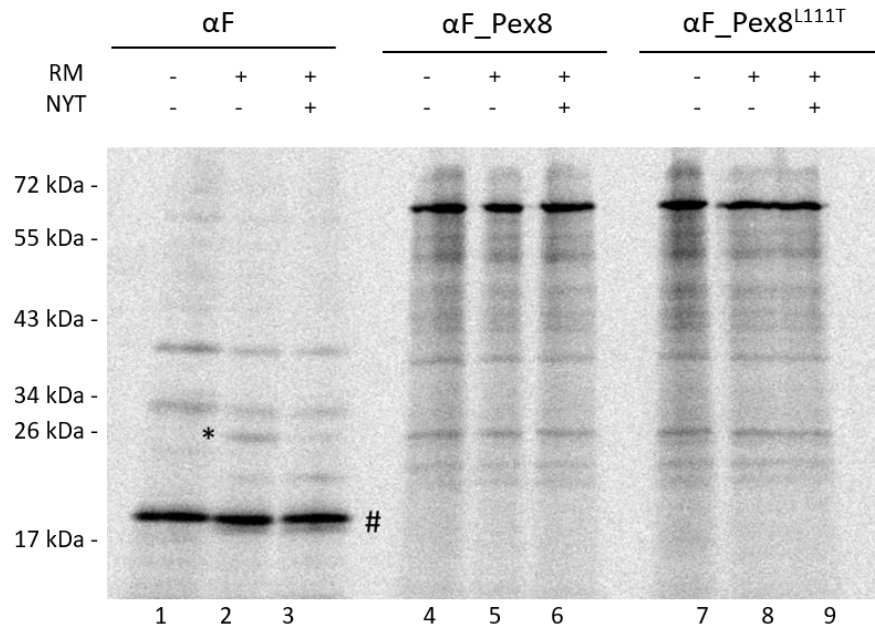
A**B**

Abbildung 10 αF_Pex8p wird bei Verwendung von Hefemembranen nicht glykosyliert

A Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors ist in orange dargestellt. Mögliche Glykosylierungspositionen sind mit einem „Y“ gekennzeichnet. Die Molekulargewichte der Proteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

αF = Präpro-Alphafaktor, αF_Pex8 = Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors kombiniert mit Pex8p, αF_Pex8^{L111T} = Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors kombiniert mit Pex8p mit Punktmutation L111T zur Verbesserung einer möglichen Glykosylierungsposition

B Die mRNAs der zu analysierenden Proteine wurden *in vitro* mit radioaktiv markiertem Methionin translatiert. In Anwesenheit von rauen Membranen aus der Hefe und dem Akzeptorpeptid NYT fand die Translokation der Proteine statt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und Phosphoimaging. Die prozessierte (#) und glykosylierte (*) Form des Alphafaktors sind gekennzeichnet. RM = raue Membranen; NYT = Akzeptortripeptid

Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass Pex8p mit vorgeschalteter Signalsequenz nicht glykosyliert wird. Beide generierten Varianten des Peroxins weisen bei Zugabe von rauen Hefemembranen keine weiteren Proteinbanden auf, die auf eine glykosylierte Form der Proteine schließen lassen würde (Spur 5 und 8). Auch die Verbesserung einer Glykosylierungsposition führt unerwarteter Weise zu keiner Modifikation des Proteins. Die Zugabe des Tripeptids NYT sorgt daher für keine Veränderung der beobachteten Proteinbanden. Interessanterweise kann auch keine Prozessierung des Proteins beobachtet werden. Unabhängig von den möglichen Glykosylierungspositionen sollte es zur Abspaltung der Signalsequenz bei Zugabe von rauen Membranen kommen. Dies ist bei beiden Konstrukten nicht zu erkennen.

Erneut wurde das Hefeprotein Präpro-Alphafaktor mitgeführt. In Spur 2 ist zu erkennen, dass eine Translokation in die verwendeten Membranen prinzipiell möglich ist. Es kommt zur Prozessierung der Signalsequenz und zur Glykosylierung des Proteins. Diese Glykosylierung kann durch das NYT vollständig unterbunden werden. Es fällt jedoch auf, dass die Transporteffizienz im verwendeten System nicht besonders hoch zu sein scheint. Lediglich ein geringer Teil des translatierten Proteins wird modifiziert und demnach transportiert. Die geringe Transporteffizienz der verwendeten Membranen könnte eine Erklärung dafür sein, dass bei den Varianten des Pex8p keine Prozessierung zu beobachten ist. Auch die fehlende Glykosylierung der Mutante mit verbesserter Glykosylierungsposition könnte damit erklärt werden.

3.4 Glykosylierungsstellen des Pex8p können modifiziert werden

Abbildung 10 sollte dazu dienen zu untersuchen, ob die Glykosylierungspositionen des Pex8p genutzt werden können. Aufgrund der scheinbar schlechten Transporteffizienz der verwendeten Membranen ist es nicht möglich, darüber eine Aussage zu treffen. Vor diesem Hintergrund sollen im Weiteren Membranen aus dem Hund verwendet werden. Es ist bekannt, dass der Präpro-Alphafaktor sehr effizient in diese Membranen translozieren kann. Das Protein wird dabei hocheffizient prozessiert und glykosyliert.

Unter Verwendung dieser Membranen wurden Translokationsexperimente durchgeführt. Dabei wurden neben den Varianten des Pex8p mit vorgeschalteter Signalsequenz auch die beiden Varianten des Pex8p ohne Signalsequenz mitgeführt. Erneut erfolgte die Translation im Retikulozytenlysate. Ein Teil der Ansätze wurde mit rauen Hundemembranen versetzt. Durch den Einsatz des Akzeptortripeptids sollte erneut eine mögliche Glykosylierung unterbunden werden. Die Ansätze wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte über Phosphoimaging.

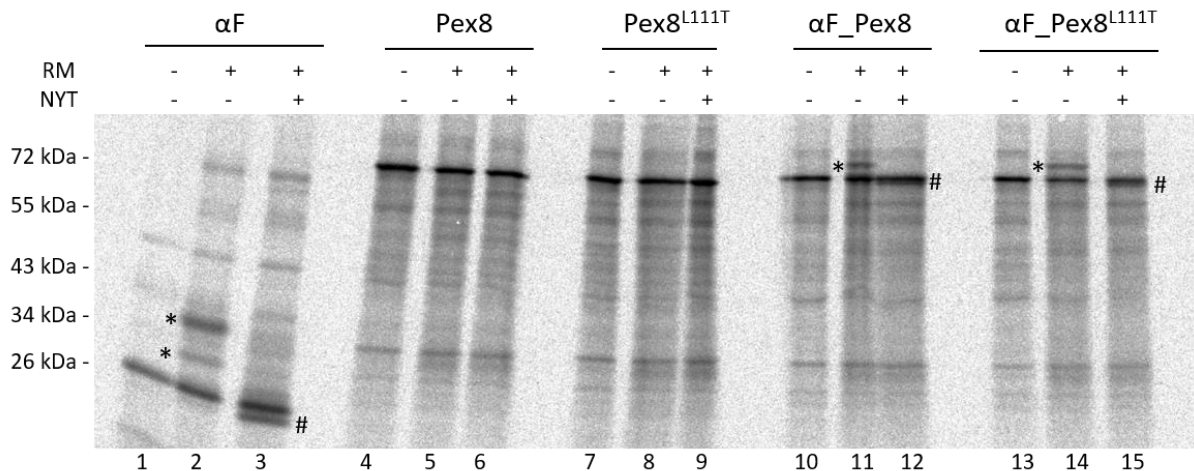


Abbildung 11 Glykosylierungsstellen des Pex8p können genutzt werden

Die mRNAs der zu untersuchenden Proteine wurden *in vitro* in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin translatiert. Die Translokation der Proteine fand in Anwesenheit von rauen Hundemembranen und des Akzeptortripeptides NYT statt. Die prozessierten (#) und glykosylierten (*) Formen der Proteine sind gekennzeichnet. Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Phosphoimaging. RM = raue Membranen; NYT = Akzeptortripeptid

Abbildung 11 wird deutlich, dass es zu einer Glykosylierung des Pex8p mit vorgeschalteter Signalsequenz kommt. Bei Zugabe von rauen Hundemembranen kommt es zu einer weiteren Proteinbande oberhalb des translatierten Proteins (Spur 11 und 14 mit * gekennzeichnet). Diese Bande tritt auch bei dem Konstrukt mit verbesserter Glykosylierungsposition auf. Durch die Anwendung des Tripeptids verschwindet diese Bande. Somit handelt sich dabei eindeutig um eine glykosylierte Form der Proteine (Spur 12 und 15). Die vorhandenen Positionen können also im Lumen des ERs modifiziert werden, ohne dass sie durch eine Mutation verbessert werden müssen. Neben der Glykosylierung ist bei den Konstrukten mit Signalsequenz außerdem eine prozessierte Form zu beobachten. Diese ist bei Zugabe von Membranen zu erkennen, wenn durch das NYT eine Glykosylierung unterbunden wird (Spur 12 und 15 mit # gekennzeichnet).

In Abbildung 11 zeigt sich außerdem, dass Pex8p ohne Signalsequenz nicht glykosyliert wird. Beide Varianten des Peroxins weisen nach Zugabe von Membranen keine Veränderungen auf. Auch die Anwendung des Tripeptids ist hier ohne Effekt. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus Abbildung 8.

Bei den beobachteten glykosylierten Formen der Pex8p-Varianten (Abbildung 11, Spur 11 und 14 mit * gekennzeichnet) handelt es sich höchstwahrscheinlich nicht um eine 7fache Glykosylierung. Die Glykosylierungspositionen innerhalb des Pex8p weisen alle ein ähnliches Potential auf, sodass man vermuten könnte, dass alle Stellen mit einer gleichen Wahrscheinlichkeit modifiziert werden. Eine mögliche Erklärung für diese scheinbar nicht vollständige Glykosylierung des Pex8p könnte sein, dass der Transport dieser generierten Konstrukte nicht ausreichend effizient abläuft. Bei den

Konstrukten in Abbildung 10 A wurde die Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor eingesetzt. Dabei wurden lediglich die Aminosäuren verwendet, die bis zur Prozessierungsposition vorliegen. Somit ist die Umgebung dieser Prozessierungsstelle durch die folgenden Aminosäuren des Pex8p verändert worden. Möglichweise behindert dies den vollständigen Transport des generierten Proteins. Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Signalsequenz die Glykosylierung der Konstrukte verbessert, wurden weitere Varianten generiert. Dabei wurde die Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor um acht Aminosäuren erweitert. Innerhalb dieser befindet sich die erste Glykosylierungsposition des Alphafaktor. Somit steigt die Zahl der möglichen Glykosylierung. Die entsprechenden Konstrukte sind in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

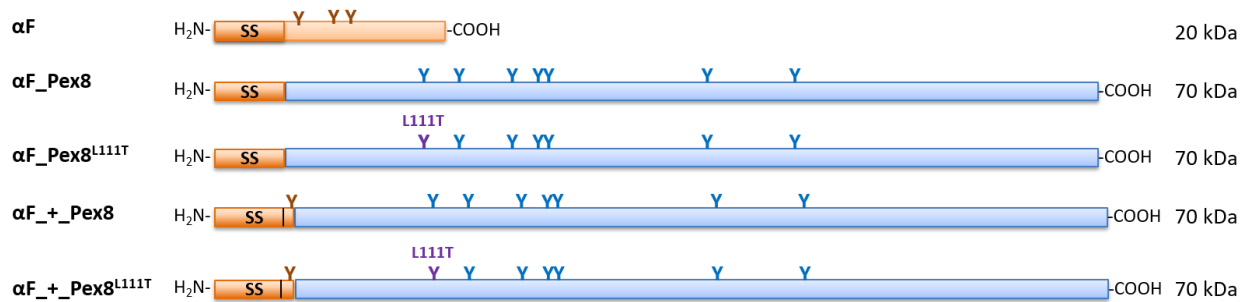


Abbildung 12 verwendete Konstrukte aus Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor und Pex8p

Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Die Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor ist in orange dargestellt. Mögliche Glykosylierungspositionen sind mit einem „Y“ gekennzeichnet. Die Molekulargewichte der Proteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben. αF = Präpro-Alphafaktor, αF_Pex8 = Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor kombiniert mit Pex8p, αF_Pex8^{L111T} = Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor kombiniert mit Pex8p mit Punktmutation L111T, αF+_Pex8 = verlängerte Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor kombiniert mit Pex8p, αF+_Pex8^{L111T} = verlängerte Signalsequenz des Präpro-Alphafaktor kombiniert mit Pex8p mit Punktmutation L111T

Die in Abbildung 12 dargestellten Konstrukte wurden im *in vitro* Transportassay eingesetzt. Erneut wurden raue Membranen des Hundes verwendet, um eine Translokation zu ermöglichen. Das Tripeptid NYT dient zur Identifizierung von glykosylierten Formen der Proteine. Das Ergebnis der Translokation ist Abbildung 13 zu entnehmen.

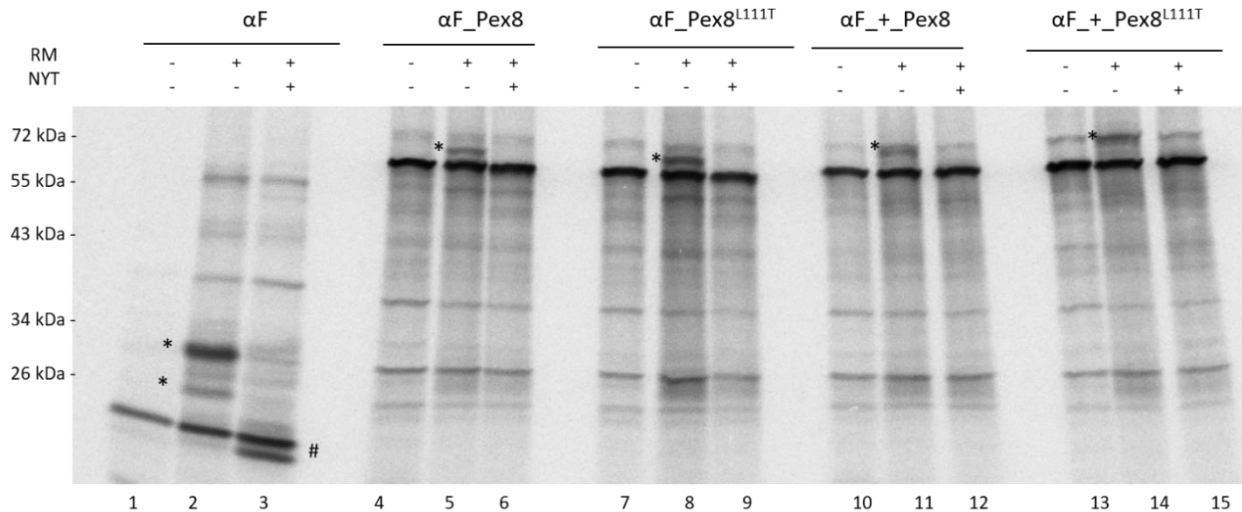


Abbildung 13 Chimäre aus α F-Signalsequenz und Pex8p werden mehrfach glykosyliert

Die Proteine wurden *in vitro* in Anwesenheit von [35 S]-Methionin hergestellt. Die Translokation der Proteine fand in Anwesenheit von rauen Hundemembranen und des Akzeptortripeptides NYT statt. Die prozessierten (#) und glykosylierten (*) Formen der Proteine sind gekennzeichnet. Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Phosphoimaging. RM = raue Membranen; NYT = Akzeptortripeptid

In Abbildung 13 zeigt sich, dass durch die Verlängerung der Signalsequenz die Glykosylierung der Konstrukte zunimmt. Bei Zugabe von rauen Membranen ist eine deutliche Bande oberhalb des unmodifizierten Proteins zu beobachten (Spur 11 und 14 mit * gekennzeichnet). Im Vergleich zu den Konstrukten ohne Verlängerung fällt auf, dass diese glykosylierte Form höher läuft, als die beobachtete Glykosylierung in Spur 5 und 8. Dabei ist es nicht klar, ob die zusätzlich eingefügte Glykosylierungsstelle des Präpro-Alphafaktors genutzt wird oder ob durch die Verlängerung der Signalsequenz weitere Positionen des Pex8p modifiziert werden. Es scheint jedoch erneut nicht notwendig zu sein, dass die Punktmutation L111T das Potential einer möglichen Glykosylierungsposition verbessert. Durch das Tripeptid NYT kann die Glykosylierung der Proteine vollständig unterbunden werden. Eine Prozessierung der Signalsequenz ist bei allen Varianten des Pex8p nicht zu beobachten. Dies ist vermutlich in der schlechten Auftrennung im entsprechenden Gelbereich begründet.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass es keinen Import von Pex8p ins ER gibt. *In vivo* konnte keine Glykosylierung des Peroxins beobachtet werden (Abbildung 6). Mit Hilfe eines *in vitro* Assays konnte jedoch gezeigt werden, dass die vorhandenen Glykosylierungspositionen im Pex8p prinzipiell genutzt werden können, wenn sie sich im Lumen des ERs befinden (Abbildung 11 und Abbildung 13). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob es überhaupt einen Weg für Pex8p vom endoplasmatischen Retikulum zum Peroxisom gibt.

3.5 $\alpha F_{_}Pex8$ kann Knockout des *PEX8* komplementieren

Um zu überprüfen, ob Pex8p *in vivo* überhaupt aus dem ER in Peroxisomen gelangen kann, wurde das Konstrukt mit vorgeschalteter verlängerter Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors in den *PEX8*-Deletionsstamm transformiert. Für eine spätere eventuell notwendige Detektion im Western Blot wurde außerdem ein Konstrukt generiert, welches das FLAG-Tag zwischen der verlängerten Signalsequenz und Pex8p exprimiert. Die verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 14 dargestellt.

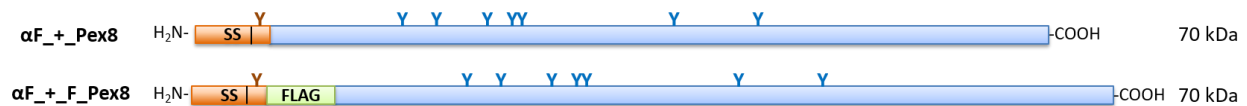


Abbildung 14 verwendete Konstrukte aus Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und Pex8p

Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. Mögliche Glykosylierungspositionen sind mit einem „Y“ markiert. Die verlängerte Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors ist in orange dargestellt. Mögliche Glykosylierungspositionen sind mit einem „Y“ gekennzeichnet. Die Molekulargewichte der Proteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben. $\alpha F_{_}Pex8$ = verlängerte Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors kombiniert mit Pex8p, $\alpha F_{_}F_{_}Pex8$ = verlängerte Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors kombiniert mit Pex8p und FLAG-Tag

Mit Hilfe von Wachstumstests im Ölsäuremedium soll mit den erstellten Konstrukten untersucht werden, ob der Knockout des *PEX8* komplementiert werden kann. Sollte kein Weg vom ER zum Peroxisomen für Pex8p existieren, sollten die generierten Hefen nicht in der Lage sein funktionale Peroxisomen zu bilden und könnten somit in dem angebotenen Medium nicht wachsen.

Nach Transformation in den Deletionsstamm erfolgte zunächst die Vorkultivierung in Minimalmedium. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Zellzahlen erstellt. Diese wurden auf Festagarmedium getropft und inkubiert. Des Weiteren wurde die Vorkultur verwendet um eine Flüssigkultur mit Ölsäuremedium zu inokulieren. Die Kulturen wurden bei 30 °C kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt. Das Ergebnis der Wachstumstests ist Abbildung 15 zu entnehmen.

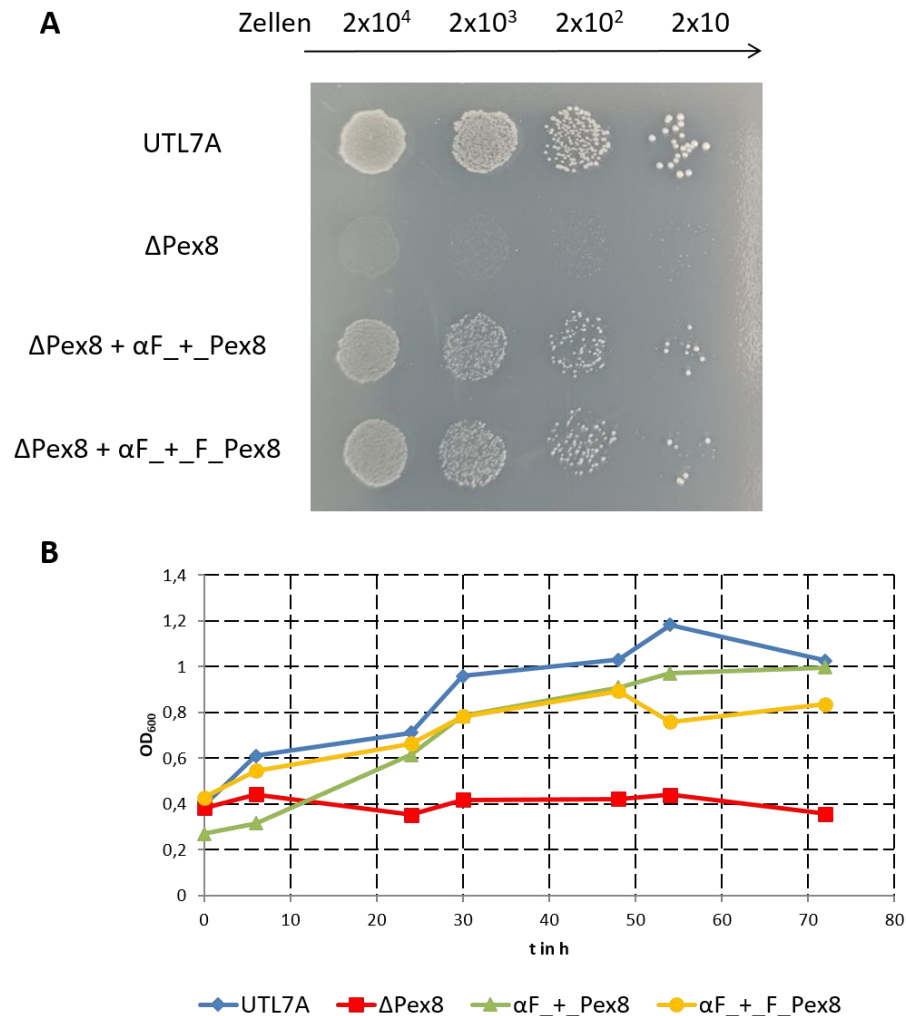


Abbildung 15 Pex8p mit vorgeschalteter Signalsequenz kann PEX8-Knockout komplementieren

- A** Die verwendeten Hefestämme wurden zunächst in Minimalmedium kultiviert. Anschließend wurde eine definierte Zellzahl eingestellt. Verdünnungen der verwendeten Hefen wurden auf Festagarmedium mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle pipettiert. Es erfolgte die Inkubation bei 30 °C.
- B** Mit Hilfe der Vorkultur wurde eine Flüssigkultur inokuliert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die optische Dichte der Kultur ermittelt und gegen die Zeit im Diagramm aufgetragen.

Wie in Abbildung 15 zu erkennen, können die generierten Konstrukte überraschenderweise den Knockout des *PEX8* komplementieren. Bei der Kultivierung im Festagarmedium (Abbildung 15 A) zeigt sich bei beiden Varianten des Pex8p mit Signalsequenz eine eindeutige Koloniebildung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Kultivierung im Flüssigmedium. In Abbildung 15 B kommt es zu einem Anstieg der optischen Dichte der Kulturen. Dies bedeutet, dass die generierten Hefen in der Lage sind funktionale Peroxisomen zu bilden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass α F_Pex8p durch die angefügte Signalsequenz in das

endoplasmatische Retikulum importiert wurde und anschließend der Weitertransport zu den peroxisomalen Membranstrukturen (*ghosts*) erfolgte. Dies würde bedeuten, dass es einen Weg für Pex8p vom ER zu den Peroxisomen gibt. Eine andere Erklärung wäre jedoch, dass die verwendete Signalsequenz nicht ausreicht um Pex8p ins ER zu dirigieren. Stattdessen erfolgt ein direkter Import in die peroxisomalen *ghosts*. Um zu klären, auf welchem Weg das Konstrukt αF_{Pex8p} in die peroxisomalen Membranen gelangt ist, soll im Weiteren das Auftreten einer Glykosylierung *in vivo* untersucht werden. Wenn αF_{Pex8p} zunächst ins ER importiert wurde, sollte dort eine Glykosylierung erfolgt sein, die mit Hilfe eines PNGase F – Verdau untersucht werden kann.

3.6 Pex8p mit Signalsequenz wird *in vivo* nicht mehrfach glykosyliert

Die Komplementation des *PEX8*-Knockouts in Abbildung 15 lässt vermuten, dass es einen Weg für Pex8p vom endoplasmatischen Retikulum zu den Peroxisomen gibt. Demnach kommt es zunächst zum Import ins ER und anschließend zum Weitertransport in die Peroxisomen. Im Lumen des ERs sollten die Glykosylierungspositionen des Pex8p modifiziert werden. Dass die möglichen Positionen prinzipiell genutzt werden können, konnte in Abbildung 11 bereits eindeutig gezeigt werden.

Als Nachweis einer *in vivo* erfolgten Glykosylierung wurde erneut ein PNGase F – Verdau durchgeführt. Dazu wurden zunächst die generierten Hefestämme kultiviert und anschließend mit Hilfe von Glasbeads aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wurde ein Membranenpellet generiert, welches in den Verdau eingesetzt wurde. Nach initialer Denaturierung der Membranen erfolgte die Inkubation mit PNGase F. Dabei kommt es zur Abspaltung von Glykosylierungen, wodurch sich das Molekulargewicht der Proteine um wenige Kilodalton verringert. Die Proben des Verdau wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot analysiert. Das eingefügte FLAG-Tag ermöglicht dabei die Detektion des Proteins. Mit Hilfe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers gegen das Proteintag können die Signale über Chemolumineszenz analysiert werden. Das Ergebnis des PNGase F – Verdau ist Abbildung 16 zu entnehmen.

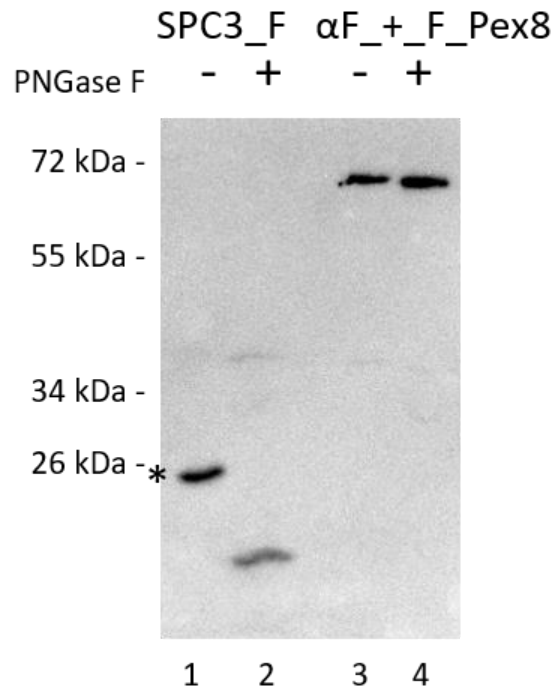


Abbildung 16 αF_Pex8p wird *in vivo* nicht glykosyliert

Mit Hilfe von Glasbeads wurden die kultivierten Hefen aufgeschlossen. Nach Abtrennung von unaufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern wurde ein Membranpellet gewonnen. Dieses wurde zunächst denaturiert und anschließend mit PNGase F behandelt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben im SDS-Polyacrylamidgel und die Analyse mittels Western Blot. Dabei wurde ein Peroxidasegekoppelter Antikörper gegen das FLAG-Tag verwendet. Die glykosylierte Form des SPC3 ist mit * markiert. SPC3_F = SPC3 mit C-terminal angefügtem FLAG-Tag, αF+_F_Pex8 = verlängerte Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors kombiniert mit Pex8p und FLAG-Tag

Erneut dient ein Hefestamm, der eine getaggte Variante des SPC3 exprimiert, als Kontrolle. Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass das SPC3 glykosyliert vorlag. Diese Glykosylierung wurde durch die PNGase F entfernt, sodass das Molekulargewicht des Proteins abnahm (Spur 2). Außerdem zeigt sich in Abbildung 16, dass das Protein αF_Pex8p *in vivo* überraschenderweise nicht glykosyliert vorliegt. Das detektierte Proteinsignal bleibt unverändert bei Zugabe der PNGase F (Spur 3 und 4). Somit liegt keine Glykosylierung vor, die abgespalten werden kann. Dies bedeutet, dass es *in vivo* keinen Import des Proteins ins ER gibt. Die vorgeschaltete Signalsequenz reicht demnach nicht aus, um Pex8p ins ER zu dirigieren. Innerhalb des Peroxins befinden sich vielmehr Targetingsignale für den direkten Import in die Peroxisomen, die stärker sind als die ER-Signalsequenz. Diese sollen im Weiteren genauer untersucht werden.

3.7 Mutationen im postulierten PTS2 haben keinen Effekt auf die Bildung von Peroxisomen

In der Aminosäuresequenz des Pex8p ist am extremen C-Terminus das Tripeptid „SKL“ zu finden, welches die klassische Sequenz des peroxisomalen Targetingsignals 1 (PTS1) darstellt. Bezüglich Pex8p konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion des Tripeptids jedoch keinen Effekt auf den Import des Peroxins hat (Rehling et al., 2000). Ein Konstrukt mit der C-terminalen Deletion kann einen *PEX8*-Knockout komplementieren. Dies lässt vermuten, dass innerhalb des Peroxins ein weiteres Targetingsignal vorliegt. Für Pex8p wurde in der Literatur bereits postuliert, dass es möglicherweise ein peroxisomales Targetingsignal 2 trägt. Dieses Signal ist ein Nonapeptid mit einer geringer konservierten Sequenz als das PTS1. In Hefen sind bisher lediglich zwei Proteine identifiziert worden, die dieses Targetingsignal tragen (Glover et al., 1994b; Jung et al., 2010). Als mögliches PTS2 wird ein Nonapeptid an Position 103 bis 112 postuliert (Rehling et al., 2000). Eine nähere Untersuchung dieser Sequenz erfolgte jedoch nicht.

Vor diesem Hintergrund sollte im Weiteren mit Hilfe von Punktmutation untersucht werden, ob das postulierte Nonapeptid wichtig für das *Targeting* des Pex8p ist. Anhand der Konsensussequenz des Signals (Tabelle 9) wird deutlich, dass einige Positionen des Signals weniger stark konserviert sind als andere. Daher ist es zu erwarten, dass Mutationen an verschiedenen Positionen einen unterschiedlich starken Einfluss auf den Import des Peroxins haben. So ist bekannt, dass das Einfügen eines Prolins innerhalb des Nonapeptids für den vollständigen Verlust der Importfähigkeit sorgt (Petriv et al., 2004). Die für die Rezeptorerkennung notwendige Helix kann sich durch die Mutation nicht mehr ausbilden, wodurch das Signal nicht mehr erkannt werden kann. Veränderungen in der Sequenz an einer weniger stark konservierten Stelle sollten den Import des Pex8p eher nicht beeinflussen. Dies wäre bei der Variante N107D der Fall. Bei allen anderen Mutationen handelt es sich um konservierte Aminosäuren, sodass es hierbei durchaus zu erwarten ist, dass die Bildung von Peroxisomen eingeschränkt wird.

Tabelle 9 Konsensussequenz des PTS2 und generierte Punktmutationen im Pex8p

PTS2	R/K	L/V/I/Q	X	X	L/V/H/I/Q	L/S/G/A/K	X	H/Q	L/A/F
Pex8p	R	A	T	W	N	L	S	Q	L
Mutation	R103G				N107D	L108P		Q110D	L111T

Da Pex8p zusätzlich das PTS1 am C-Terminus trägt, ist nicht auszuschließen, dass dieses Signal den Effekt der Mutationen im PTS2 kompensiert. Um sicherzustellen, dass das Tripeptid keinen Einfluss auf den Transport des Pex8p zu Peroxisomen hat, wurden zusätzlich Varianten des Peroxins kloniert, die neben den Mutationen im PTS2 zusätzlich eine Deletion des PTS1 aufweisen. Die generierten Varianten des Pex8p mit Punktmutationen innerhalb des PTS2 wurden zunächst mit Hilfe der Shuttle-Vektoren in den *PEX8*-Deletionsstamm transformiert. Anschließend wurden die generierten Hefen auf ihre Fähigkeit hin untersucht Ölsäure zu verwerten. Dazu diente erneut eine Vorkultur in Minimalmedium. Nach Erstellung der Verdünnungsreihe wurden definierte Zellzahlen auf das Ölsäuremedium gegeben und inkubiert. Das Ergebnis der Kultivierung ist Abbildung 17 zu entnehmen.

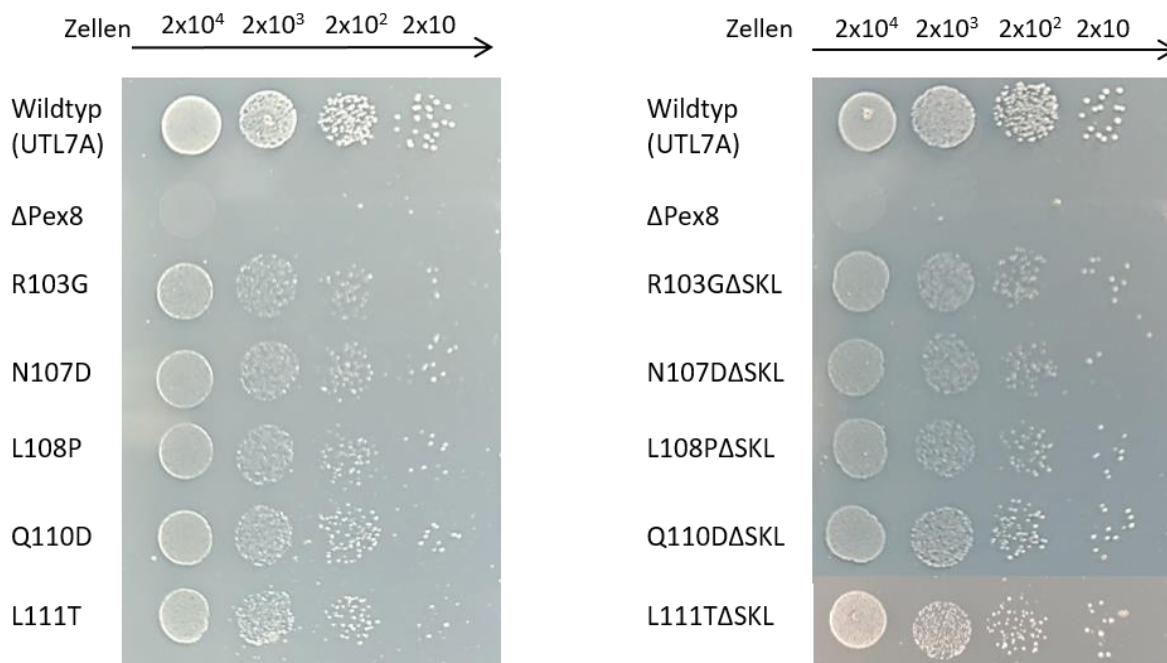


Abbildung 17 Punktmutationen im PTS2 haben keinen Effekt

Die hergestellten Mutanten des Pex8p wurden in den Deletionsstamm transformiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung in Minimalmedium. Diese Vorkultur wurde auf eine definierte Zellzahl gebracht und anschließend in den angegebenen Zellzahlen auf Ölsäure-Festagarmedium gebracht und kultiviert.

In Abbildung 17 wird deutlich, dass keine der eingefügten Mutationen einen erkennbaren Effekt auf die Bildung von Peroxisomen hat. Alle untersuchten Mutanten weisen eine deutliche Koloniebildung im Festagarmedium auf. Dies bedeutet, dass alle Varianten des Pex8p korrekt in die Peroxisomen transportiert werden konnten und dort funktional vorliegen. Dies ist gerade bei der Mutation L108P eher unerwartet. Es ist bekannt, dass das PTS2 eine α -Helix bildet, die wiederum vom PTS-Rezeptor erkannt wird (Pan et al., 2013; Petriv et al., 2004). Durch das

Einfügen der Aminosäure Prolin ist es nicht möglich, dass sich eine Helix ausbilden kann. Somit kann keine Erkennung durch den Rezeptor erfolgen.

Auch durch die zusätzliche Deletion des PTS1 kommt es zu keiner Inhibierung der Peroxisomenbildung.

3.8 Deletion des putativen PTS2 sorgt für Verlust von funktionalen Peroxisomen

In Abbildung 17 wird deutlich, dass das Einfügen von einzelnen Punktmutationen im möglichen PTS2 keinen Effekt auf die Bildung von Peroxisomen hat. Möglicherweise sind die verwendeten Mutationen nicht drastisch genug, um das *Targeting* nachhaltig zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurde im Weiteren das gesamte Nonapeptid deletiert. Dazu wurden Konstrukte generiert, die eine Deletion der Aminosäuren 103 bis 112 aufweisen. Um auch hier sicherzustellen, dass das C-terminale PTS1 nicht das *Targeting* übernimmt, wurden zusätzlich Konstrukte generiert, die eine Deletion des PTS1 aufweisen. Für eine später eventuell notwendige Detektion der Proteine wurden außerdem Varianten mit FLAG-Tag kloniert. Dieser befindet sich direkt nach dem Start-Methionin des Pex8p. Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Konstrukte in den *PEX8*-Deletionsstamm transformiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung im Ölsäuremedium, um zu untersuchen, ob sich funktionale Peroxisomen bilden können. Das Ergebnis dieser Kultivierung ist in Abbildung 18 dargestellt.

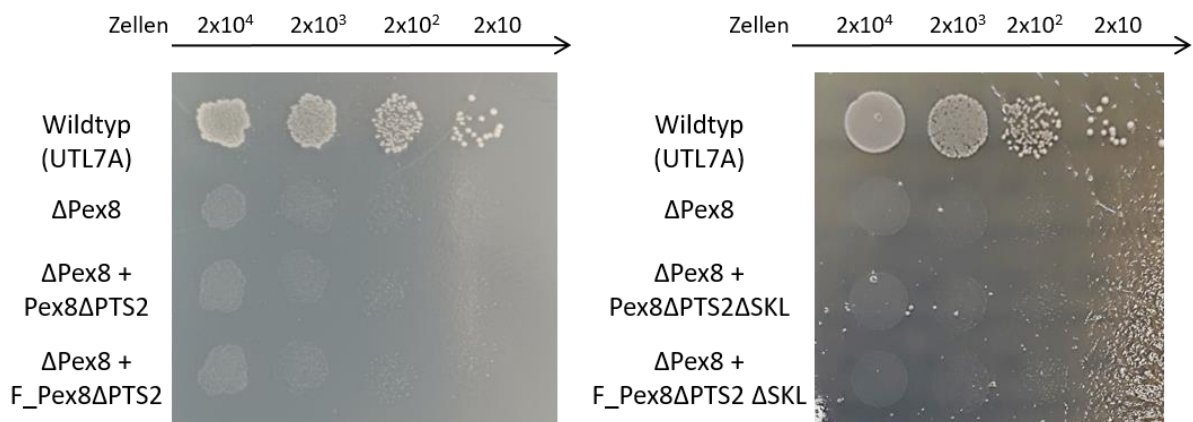


Abbildung 18 Pex8p kann nach Deletion des PTS2 den *PEX8*-Knockout nicht komplementieren

Die generierten Hefen wurden zunächst in Minimalmedium kultiviert. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden angegebene Verdünnungen der Hefen hergestellt und auf Festagarmedium gebracht. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 30 °C.

Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass die generierten Hefen nicht in der Lage sind die Ölsäure zu verwerten. Ähnlich wie beim Deletionsstamm liegt demnach keine Form des Pex8p vor, die die Bildung von Peroxisomen ermöglicht. In den Zellen befinden sich nur leere Membranhüllen, die sogenannten *ghosts*, die nicht in der Lage sind peroxisomale Matrixproteine zu importieren. Dabei scheint es keinen Unterschied zu machen, ob das C-terminale PTS1 vorhanden ist oder nicht.

Die fehlende Komplementation des *PEX8*-Knockouts kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann die Deletion des möglichen PTS2 das *Targeting* der Pex8p-Variante zu den peroxisomalen Strukturen stören. Somit kann Pex8p nicht mehr an seinen Wirkort gelangen, wodurch sich keine importfähigen Peroxisomen bilden können. Zum anderen ist es vorstellbar, dass die Variante des Pex8p ohne PTS2 durchaus zu den *ghosts* gebracht wird. Dort kann sie jedoch durch die Deletion der neun Aminosäuren ihre Funktion nicht mehr erfüllen. Es wird vermutet, dass Pex8p eine Rolle in der Trennung von Rezeptor und Cargo im Lumen der Peroxisomen spielt. Ist diese Trennung nicht sichergestellt, hat dies Auswirkungen auf den Import von peroxisomalen Matrixproteinen, wodurch keine funktionalen Peroxisomen vorliegen. Die Beobachtungen aus Abbildung 17 deuten darauf hin, dass die Sequenz des möglichen PTS2 nicht so stark konserviert ist, wie bei anderen bekannten peroxisomalen Proteinen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es nicht für das *Targeting* des Pex8p benötigt wird. Stattdessen dient es unter Umständen als Kompetitor für die Rezeptor-Cargo-Interaktion im Lumen der Peroxisomen, sodass es zur Ablösung des importierten Matrixproteins kommen kann.

Wenn die Deletion des PTS2 sich lediglich auf die Funktionalität des Pex8p auswirkt, sollte die Lokalisation des Peroxins nicht beeinflusst sein. Es müsste sich demnach nach wie vor in den *ghosts* befinden, kann den Import von Matrixproteinen jedoch nicht sicherstellen. Im Weiteren soll daher untersucht werden, ob Pex8p auch ohne mögliches PTS2 in den peroxisomalen Strukturen nachgewiesen werden kann.

3.9 Deletion des Nonapeptids hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des Pex8p

Die Ergebnisse aus Abbildung 17 und Abbildung 18 deuten darauf hin, dass das postulierte PTS2 eventuell keine Rolle im *Targeting* des Pex8p spielt. Daher soll im Weiteren untersucht werden, ob die Mutanten des Peroxins dennoch in die *ghosts* importiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass eine Variante des Pex8p mit deletiertem PTS2 den *PEX8*-Knockout nicht komplementieren kann. Es liegen aber dennoch *ghosts* vor. Sollte das PTS2 wichtig für die Funktionalität des Pex8p sein, sollte sich das veränderte Peroxin dennoch in diesen Membranhüllen befinden. Um dies zu untersuchen wurde ein Proteaseverdau durchgeführt. Dazu wurden die Hefestämme, die bereits in Abbildung 18 eingesetzt worden sind, zunächst in Selektionsmedium kultiviert. Neben diesen Stämmen wurde außerdem die Wildtyp-Hefe UTL7A

mitgeführt. Dieser Stamm ist in der Lage funktionale Peroxisomen zu bilden und ermöglicht es somit die Lokalisation des peroxisomalen Matrixproteins SPS19 zu untersuchen. Auch für die Analyse der Lokalisation des zytosolischen Proteins GAPDH wurde der Wildtypstamm eingesetzt. An die Kultivierung der Hefen schloss sich die Sphäroblastierung mit Hilfe von Zymolyase an. Durch den Zellaufschluss im Glaspotter wurde ein post-nukleärer Überstand und ein Organellenpellet gewonnen. Dieses Pellet wurde in den Verdau mit Proteinase K eingesetzt. Der Verdau wurde mit Hilfe von PMSF gestoppt. Durch die zusätzliche Anwendung von Triton X-100 wurden die Membranen aufgelöst, wodurch alle Proteine frei zugänglich vorliegen. Das Detergenz allein sollte keinen Einfluss auf die Lokalisation der untersuchten Proteine haben. Die Proben des Verdau wurden anschließend mit TCA gefällt und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mit einem Western Blot. Dabei wurden, neben dem Peroxidase-gekoppelten FLAG-Antikörper, außerdem Antikörper gegen die Proteine SPS19 und GAPDH verwendet. Nach der Inkubation mit entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern erfolgte die Auswertung mittels Chemolumineszenz. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 gezeigt.




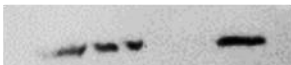

	PK	-	+	+	-	nachgewiesenes Protein	Stammhintergrund
	Tx-100	-	-	+	+		
A						F_Pex8ΔPTS2	ΔPex8
B						F_Pex8ΔPTS2ΔPTS1	ΔPex8
C						SPS19	Wildtyp
D						F_Pex8	ΔPex8
E						GAPDH	Wildtyp
		1	2	3	4		

Abbildung 19 Pex8p mit deletiertem PTS2 liegt in peroxisomalen Strukturen vor

Die verwendeten Hefestämme wurden zunächst in Selektionsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Sphäroblastierung durch Zymolyase. Nach dem Aufschluss im Glaspotter wurde der post-nukleäre Überstand und ein Organellenpellet gewonnen. Das Pellet wurde für den Verdau mit Proteinase K eingesetzt. Durch die Anwendung von Triton X-100 wurden die Membranen aufgeschlossen, wodurch die Proteine für die Protease zugänglich werden. Die Ansätze wurde anschließend mit TCA gefällt und auf dem Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen die gekennzeichneten Proteine verwendet. Ansatz E enthielt neben dem Organellenpellet zusätzlich Hefezytosol. PK = Proteinase K, TX-100 = Triton X-100

In Abbildung 19 A wird deutlich, dass sich Pex8p mit deletiertem PTS2 innerhalb der *ghosts* befindet. Das Protein ist im verwendeten Organellenpellet eindeutig nachweisbar, auch wenn die Proteinase K eingesetzt wird (Spur 2). Es kommt lediglich zum vollständigen Abbau des Proteins, wenn die Membranstrukturen durch Triton X-100 aufgelöst werden und die Proteine somit frei vorliegen. Um sicherzustellen, dass das C-terminale PTS1 keinen Effekt auf die Lokalisation des Pex8p hat, wurde zusätzlich ein Konstrukt analysiert, welches keines der bekannten peroxisomalen Targetingsignale trägt. Sowohl das postulierte PTS2 als auch das bekannte PTS1 wurden deletiert. Abbildung 19 B ist zu entnehmen, dass sich jedoch auch diese Variante des Pex8p innerhalb von Membranhüllen befindet. Auch nach Zugabe der Proteinase K ist das Protein im Pellet nachweisbar. Dies spricht eindeutig dafür, dass es ein weiteres Signal innerhalb des Pex8p geben muss, welches den Transport in die Organellen gewährleistet.

Die Lokalisation des peroxisomalen Matrixproteins SPS19 dient als Kontrolle für den durchgeführten Verdau. SPS19 liegt im Innern der Peroxisomen vor und ist daher wie erwartet in Abbildung 19 C nachweisbar, auch wenn die Protease eingesetzt worden ist. Lediglich das Auflösen der Organellen mit Triton X-100 sorgt dafür, dass SPS19 abgebaut werden kann.

Des Weiteren wurde die Lokalisation von FLAG-getagtem Pex8p untersucht. Dieses ist bis auf das Anfügen des Protein-Tags unverändert und sollte demnach innerhalb der Peroxisomen vorliegen. Dieser generierte Hefestamm ist in der Lage importfähige Peroxisomen zu bilden. In Abbildung 19 D wird deutlich, dass sich das Protein wie erwartet vor der Protease geschützt in den Peroxisomen befindet und nicht abgebaut werden kann. Durch die zusätzliche Anwendung des Detergenz kommt es zur Freisetzung des Proteins und somit zum vollständigen Abbau.

Eine weitere Kontrolle ist in Abbildung 19 E zu sehen. Hierbei wurde das Organellenpellet zusätzlich mit Hefezytosol versetzt. Mit dem Nachweis des zytosolischen Proteins GAPDH sollte sichergestellt werden, dass die verwendete Proteinase K nicht durch die enthaltenen Organellen in ihrer Funktionalität beeinflusst ist und freie Proteine tatsächlich abbauen kann. Mit dem entsprechenden Antikörper ist das zytosolische Protein im Ansatz ohne Protease eindeutig nachweisbar. Durch die Zugabe der Protease kommt es wie erwartet zum vollständigen Abbau des Proteins (Spur 2). Dies zeigt, dass die enthaltenen Organellen keinen Einfluss auf die Protease haben und frei vorliegende Proteine wie erwartet vollständig abgebaut werden können.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das postulierte PTS2 im Pex8p keine essentielle Rolle im *Targeting* des Peroxins spielt. Auch ohne das Nonapeptid kommt es zum Transport des Pex8p in peroxisomale Strukturen. Dass das C-terminale PTS1 das *Targeting* sicherstellt, wurde ausgeschlossen. Das bedeutet, dass sich innerhalb des Pex8p ein weiteres bisher unbekanntes Signal befinden muss, das den Transport zu den Peroxisomen gewährleistet. Des Weiteren zeigte sich, dass das vermutete PTS2 wichtig für die Funktion des Pex8p zu sein scheint. Trotz korrektem *Targeting* in die Peroxisomen kommt es nicht zur Ausbildung von funktionalen Peroxisomen. Dies deutet darauf hin, dass der Import von weiteren Matrixproteinen in die Organellen gestört ist, wodurch keine Organellen gebildet werden können.

4. Diskussion

4.1 Pex8p wird nicht in das endoplasmatische Retikulum transportiert

4.1.1 Pex8p wird nicht glykosyliert

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Pex8p tatsächlich zu den Peroxinen gehört, die zunächst ins endoplasmatische Retikulum transportiert werden. Die Arbeitsgruppe um van der Zand et al. (2010) untersuchte für eine Reihe von peroxisomalen Membranproteinen (PMP), ob diese in das ER transportiert werden und anschließend in Peroxisomen gelangen. Für die untersuchten PMPs konnte eine Colokalisation mit Komponenten des ER-Translokons festgestellt werden. Daraus schlussfolgerte man, dass es einen Import der Proteine ins ER geben muss. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass alle PMPs zunächst ins ER transportiert werden.

Unter den untersuchten Proteinen befand sich auch Pex8p. Das insgesamt stark hydrophobe Protein liegt im Innern der Peroxisomen vor und besitzt keine Transmembrandomänen. Des Weiteren befindet sich in der Sequenz des Pex8p keine ER-spezifische Signalsequenz. Neben den Sequenzen für vermutlich beide bekannten peroxisomalen Targetingsignale trägt das Peroxin interessanterweise jedoch sieben mögliche Glykosylierungsstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst *in vivo* untersucht, ob man eine Glykosylierung des Pex8p nachweisen kann. Dazu wurde eine FLAG-getaggte Variante des Peroxins in den *PEX8*-Deletionsstamm transformiert und anschließend auf eine mögliche Glykosylierung hin untersucht. Dabei wurde eine Variante des Pex8p mitgeführt, die eine verbesserte Glykosylierungsposition besitzt. Mit Hilfe einer Punktmutation sollte hierbei die Wahrscheinlichkeit einer Modifizierung deutlich erhöht werden. Es zeigte sich jedoch, dass keine glykosylierte Form des Pex8p nachgewiesen werden kann (Abbildung 6). Der Wildtyp ebenso wie die generierte Mutanten liegen nicht glykosyliert vor. Neben dem *in vivo* Ansatz wurde außerdem unter *in vitro* Bedingungen untersucht, ob es zu einer Glykosylierung des Pex8p kommt. Auch im zellfreien Translationssystem zeigte sich keine glykosylierte Form des Pex8p (Abbildung 8).

In bisherigen Untersuchungen zum Pex8p wurde eine mögliche Glykosylierung des Proteins nicht untersucht. Rehling et al. (2000) charakterisierten als Erstes das Hefeprotein und fanden heraus, dass es sich um ein essentielles Protein für die Bildung von Peroxisomen handelt. Ihre Untersuchungen zeigten, dass Pex8p innerhalb eines membranumschlossenen Raumes vorliegt und daher nicht durch eine Protease abgebaut werden kann. Man schloss daraus, dass Pex8p innerhalb der Peroxisomen vorliegt. Ob es sich dabei um eine glykosylierte Form des Proteins handelt, wurde nicht analysiert. Ähnliche Beobachtungen machten auch van der Zand et al. (2010). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Pex8p sich innerhalb von Membranen befindet. Erneut konnte beobachtet werden, dass eine extern zugegebene Protease das Peroxin nicht abbauen kann. Die Arbeitsgruppe schloss in diesem Fall jedoch daraus, dass Pex8p innerhalb des

ERs vorliegt und nicht in den Peroxisomen. Auch hier wurde jedoch nicht untersucht, ob es zu einer Glykosylierung des Proteins im ER gekommen ist.

Zusammengenommen zeigen die Daten dieser Arbeit, dass es zu keiner Glykosylierung des Pex8p in Hefen kommt. Dies deutet daraufhin, dass Pex8p nicht ins endoplasmatische Retikulum transportiert wird. Vielmehr scheint es einen direkten Import in die Peroxisomen zu geben.

4.1.2 Glykosylierungsstellen des Pex8p können prinzipiell genutzt werden

Zusätzlich wurde untersucht, ob die möglichen Glykosylierungspositionen des Pex8p prinzipiell genutzt werden könnten, wenn sich das Protein im ER befindet. Um dies zu untersuchen, wurde die Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors vor Pex8p kloniert, um das Peroxin ins ER zu zwingen. Mit Hilfe von *in vitro* Translokationsexperimenten wurde zunächst unter Verwendung von ER-Membranen aus der Hefe untersucht, ob es zur Nutzung der Glykosylierungspositionen kommt. Es zeigte sich, dass dies nicht der Fall ist. Auch mit vorgeschalteter Signalsequenz war keine Glykosylierung des Pex8p zu beobachten (Abbildung 10). Es fiel jedoch auf, dass die Translokationseffizienz der verwendeten Hefemembranen insgesamt eher schlecht ist. Auch das Kontrollprotein Präpro-Alphafaktor wird nur sehr schwach glykosyliert. Daher lässt sich keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob eine Glykosylierung des Pex8p prinzipiell erfolgen könnte. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Transportversuche mit Hundemembranen durchgeführt. Es ist bekannt, der Präpro-Alphafaktor im direkten Vergleich zu Hefemembranen deutlich effizienter in Hundemembranen transportiert wird. Dort erfolgt die mehrfache Glykosylierung des Proteins und die Prozessierung des Signalpeptids (Stokes, 2012). Bei Verwendung der Membranen aus dem Hund konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zur Glykosylierung des Pex8p kommen kann (Abbildung 11). Das Vorliegen einer glykosylierten Form des Peroxins zeigt eindeutig, dass die vorhandenen Glykosylierungspositionen prinzipiell genutzt werden können. Dabei ist es nicht notwendig die Positionen durch Punktmutationen zu verbessern. Um den Transport noch zu optimieren wurde außerdem die verwendete Signalsequenz um wenige Aminosäuren verlängert. Dadurch wurde die Prozessierungsposition der Signalsequenz nicht verändert, wodurch der Import effizienter erfolgen sollte. Es zeigte sich, dass die Verlängerung des Signalpeptids zu einer zunehmenden Glykosylierung der Pex8p-Variante führt (Abbildung 13).

Der Prozess der N-Glykosylierung ist hoch komplex und hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Dies zeigt sich in dem Fakt, dass 35% aller möglichen Glykosylierungsstellen im ER nicht modifiziert werden oder lediglich mit einer sehr geringen Effizienz (Petrescu et al., 2004). Neben dem Glykosylierungsmotiv N-X-T/S selbst haben auch die benachbarten Aminosäuren und die Position des Motivs innerhalb des Proteins und somit die Zugänglichkeit der Position einen Einfluss auf die Glykosylierung (Kasturi et al., 1997; Mellquist et al., 1998). Des Weiteren bestimmt das Vorhandensein von ausreichend Glykosyl-Resten die Glykosylierungsrate der

Proteine (Roitsch and Lehle, 1989). Durch die Verwendung von Membranen des Hundes konnte eindeutig gezeigt werden, dass mehrere Glykosylierungspositionen des Pex8p tatsächlich glykosyliert werden können, wenn sie im Lumen der rauen ER-Membranen vorliegen. Bei Translokationsexperimenten mit Hefemembranen hingegen konnte überraschenderweise keine Glykosylierung beobachtet werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch bei der Verwendung von Hefemembranen eine Glykosylierung erfolgen könnte. Vermutlich weisen die verwendeten Membranen lediglich eine zu geringe Glykosylierungsrate auf.

4.1.3 Pex8p wird direkt in Peroxisomen importiert

Mit Hilfe von *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die vorhandenen Glykosylierungspositionen innerhalb des Pex8p prinzipiell genutzt werden können. Durch die Verwendung einer ER-Signalsequenz konnte das Peroxin ins ER dirigiert werden. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob das Konstrukt aus der Signalsequenz des Präpro-Alpha-faktors und Pex8p einen *PEX8*-Knockout komplementieren kann. Eine Komplementation setzt voraus, dass es einen Weg für α F_Pex8p aus dem endoplasmatischen Retikulum zu den Peroxisomen gibt und die verwendete Signalsequenz nicht zu einer Fehllokalisierung des Proteins im ER führt. Lediglich bei korrekter Lokalisation des α F_Pex8p im Lumen der Peroxisomen könnten funktionale Peroxisomen gebildet werden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das Konstrukt aus Signalsequenz und Pex8p in der Lage ist den *PEX8*-Knockout zu komplementieren (Abbildung 15). Dies zeigt eindeutig, dass das *Targeting* zu den Peroxisomen durch das Signalpeptid nicht behindert worden ist. Des Weiteren scheint auch die Funktion des Pex8p nicht beeinflusst zu sein. Die generierten Hefen sind eindeutig in der Lage importfähige Peroxisomen zu bilden. Dabei kann Pex8p auf zwei unterschiedlichen Wegen in die Organellen gelangt sein. Zum einen ist es vorstellbar, dass es zunächst zum Import ins ER gekommen ist. Von dort erfolgte dann der weitere Transport in die peroxisomalen Strukturen, sodass sich importfähige Peroxisomen bilden konnten. Zum anderen ist es jedoch auch möglich, dass es zum direkten Import in die *ghosts* gekommen ist und die verwendete Signalsequenz keinen ER-Import vermitteln konnte. Um zu untersuchen, ob es zu einem Import ins ER gekommen ist, wurde ein PNGase F-Verdau durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vorhandenen Glykosylierungspositionen des Pex8p prinzipiell genutzt werden können. Daher sollte auch *in vivo* eine Glykosylierung des Peroxins zu beobachten sein, wenn dieses sich im ER befunden hat. Erstaunlicherweise konnte keine Glykosylierung des Proteins α F_Pex8p beobachtet werden (Abbildung 16).

Die fehlende Glykosylierung kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die verwendete Signalsequenz des Präpro-Alpha-faktors *in vivo* nicht ausreicht, um Pex8p ins ER zu dirigieren. Über Jahrzehnte ging man davon aus, dass jede Signalsequenz in der Lage ist Proteine ins endoplasmatische Retikulum zu dirigieren (Blobel and Dobberstein,

1975a, b). Diese Theorie wurde in den letzten Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen deutlich eingeschränkt. So konnte bei Untersuchungen in Bakterien, Hefen und Säugerzellen gezeigt werden, dass Proteine mit intrinsisch ungeordneten Bereichen („*intrinsic disordered domains*“, IDD) oder β -Faltblattkonformationen trotz starken Signalsequenzen sehr ineffizient über das Sec61 Translokon transportiert werden können. Dieses Phänomen lässt sich durch das Einfügen von Sequenzen, die zu α -Helices führen, aufheben. Verschiedene Studien wurden dazu unter anderem mit dem Prionprotein durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die vorhandenen unstrukturierten Bereiche von α -Helices umgeben sein müssen, damit eine Translokation erfolgen kann (Gonsberg et al., 2017; Miesbauer et al., 2009; Pfeiffer et al., 2013). Im Falle des Pex8p kann der Einfluss von IDDs jedoch eher ausgeschlossen werden. In der Sequenz des Peroxins werden keine ungeordneten Domänen vorhergesagt (Erdos et al., 2021). Vielmehr fällt die insgesamt starke Hydrophobizität des Proteins auf. Untersuchungen von Zhang et al. (2018) deuten darauf hin, dass auch diese Proteineigenschaft eine Rolle beim ER-Import spielt. Ihre Daten zeigten, dass sekretierte Proteine insgesamt eine deutlich geringere Hydrophobizität aufweisen als nicht-sekretierte Proteine. Die Untersuchungen basieren auf der Analyse von Säugerproteinen. Es ist jedoch vorstellbar, dass auch in Hefen die Hydrophobizität der Proteine von Bedeutung ist.

Das humane Apolipoprotein B (ApoB) ist ein Beispiel dafür, wie die Hydrophobizität eines Proteins den Import ins ER beeinflussen kann. Obwohl ApoB eine Signalsequenz trägt, wird es nur teilweise ins endoplasmatische Retikulum importiert und glykosyliert (Davis et al., 1990). In der Sequenz des Proteins fallen diverse hydrophobe Bereiche auf, die zu kurz für Transmembransegmente sind (Furukawa et al., 1992). Es ist denkbar, dass sich diese Bereiche negativ auf den ER-Import auswirken. Bisher ist es jedoch nicht vollständig geklärt, ob dies der Fall ist oder ob ein anderer Mechanismus den vollständigen Import hemmt (Chuck and Lingappa, 1992; Pease et al., 1995). Unter Umständen ist es auch die hydrophobe Natur des Pex8p, die dafür sorgt, dass der Import ins ER nicht erfolgen kann. Untersuchungen aus der AG Kalies stützen diese These. In der Sequenz des Pex8p wurden dabei zwei besonders stark hydrophobe Bereiche identifiziert, die zu kurz für Transmembrandomänen sind. Die beiden Bereiche scheinen den Import ins ER zu hemmen. So zeigen Konstrukte, in denen diese Bereiche deletiert wurden, *in vitro* einen effizienteren Import in raue Membranen als der Wildtyp (Alexandra Schatt, persönliche Mitteilung).

Neben anderen Faktoren hat auch die Signalsequenz einen Einfluss darauf, ob und wie ein Protein ins ER importiert wird. So ist mittlerweile bekannt, dass die Hydrophobizität der Signalsequenz Einfluss darauf hat, ob ein Protein co- oder post-translational importiert wird. Stark hydrophobe Sequenzen haben eine deutlich höhere Affinität zum SRP, wodurch der co-translationale Weg bevorzugt wird (Ng et al., 1996). Im Falle des Präpro-Alphafaktors ist bekannt, dass dieser sowohl co- als auch post-translational importiert werden kann. Dies ist vermutlich darin begründet, dass die Signalsequenz des Proteins eher weniger stark hydrophob ist. Es ist vorstellbar, dass dadurch die Affinität zum SRP nicht stark genug ist um den co-translationalen Import des α F_Pex8p zu

ermöglichen. Sollte dies der Fall sein, müsste eine post-translationale Translokation erfolgen. Diese setzt voraus, dass das vollständig translatierte Protein durch die Anlagerung von zytosolischen Chaperonen zunächst translokationskompetent gehalten wird. Anschließend muss es zum Sec-Komplex in der ER-Membran gelangen, wo der Import erfolgt. Es ist bekannt, dass peroxisomale Matrixproteine zunächst ebenfalls im Zytosol vollständig translatiert werden und anschließend post-translational ins Peroxisomen importiert werden. Für diesen Import binden die zytosolisch vorliegenden Rezeptoren Pex5p und Pex7p (mit den Co-Rezeptoren) die Proteine und bringen sie zur peroxisomalen Membran. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch Pex8p zunächst im Zytosol translatiert wird. Möglicherweise ist dann die Bindung zu den peroxisomalen Proteinen effizienter als die zu den Chaperonen, die den ER-Import ermöglichen sollen. Somit wird möglicherweise der Import ins ER unterbunden und der Transport zu den Peroxisomen bevorzugt.

Im Falle des Pex8p fällt außerdem auf, dass im generierten Protein αF_{Pex8p} Targetingsignale verschiedener Organellen vorliegen. Neben der ER-spezifischen Signalsequenz am N-Terminus befindet sich am extremen C-Terminus das PTS1. Obwohl bekannt ist, dass dieses Tripeptid im *Targeting* des Pex8p nicht essentiell ist, ist es nicht auszuschließen, dass dennoch eine Konkurrenz zwischen den Signalen herrscht. Neben dem PTS1 wird im N-terminalen Bereich des Pex8p ein PTS2 vermutet. Dieses befindet sich an Position 103 bis 112 und könnte von Bedeutung für den Transport zu den Peroxisomen sein. Bislang wurde dies jedoch nicht genauer untersucht. Es ist lediglich bekannt, dass die ersten 112 Aminosäuren des Pex8p ausreichen, um ein Reporterprotein in Peroxisomen zu bringen (Rehling et al., 2000). Dies deutet stark daraufhin, dass sich innerhalb dieser Sequenz ein Targetingsignal befindet. Bei dem Konstrukt αF_{Pex8p} ist demnach die Signalsequenz für den ER-Import direkt gefolgt von einer Sequenz, die den peroxisomalen Import einleitet. In wieweit sich diese verschiedenen Signale direkt beeinflussen ist nicht klar. Bei einer vollständigen Translation im Zytosol wären die Signale aber bereits zugänglich und könnten daher durchaus den ER-Import direkt beeinflussen.

Neben dem Import ins endoplasmatische Retikulum ist auch der mögliche Export zu betrachten. Sollte Pex8p zunächst im ER vorliegen, muss es einen Weitertransport zu den peroxisomalen Strukturen geben. Man geht davon aus, dass peroxisomale Membranproteine zunächst ins ER importiert werden und sich dort in einem sogenannten prä-peroxisomalen Kompartiment innerhalb des ERs sammeln (Hoepfner et al., 2005; Kragt et al., 2005a). Von dort kommt es zum Abschnüren von zwei Vesikelpopulationen. Dabei enthalten die Vesikel jeweils eine Hälfte der Proteine des Importomers. Erst nach heterotypischer Fusion dieser Vesikel entstehen importfähige Peroxisomen (van der Zand et al., 2012). Diese Vesikelbildung setzt voraus, dass die peroxisomalen Proteine im ER korrekt sortiert werden. Welche Proteine sich in den verschiedenen Vesikeln befinden und wie die Sortierung erfolgt, ist bislang nicht vollständig untersucht. Des Weiteren wurde bisher nicht untersucht, ob auch Pex8p in einer dieser Vesikelpopulation nachgewiesen werden kann.

Die erzielten Ergebnisse deuten stark daraufhin, dass es keinen Import des Pex8p ins ER gibt. Somit gibt es auch keinen Transport vom ER zu den Peroxisomen. Dies steht im Kontrast zu den veröffentlichten Daten von van der Zand et al. (2010). Hier kommt es zu einer Colokalisation der Signale von fluoreszenzmarkiertem Pex8p mit ebenfalls markiertem Sec63. Eine direkte Interaktion beider Proteine konnte dabei nicht gezeigt werden. Dennoch schlussfolgerte die Arbeitsgruppe daraus, dass Pex8p über den Sec-Komplex ins ER transportiert wird. Diese unterschiedlichen Hypothesen lassen sich möglicherweise durch unterschiedliches experimentelles Vorgehen erklären. Die Arbeitsgruppe hat in ihrer Studie mehrere peroxisomale Proteine mit einem C-terminalen Fluoreszenztag versehen. Durch die Verwendung der Fluoreszenzproteine als Nachweismittel steigt das Molekulargewicht der untersuchten Proteine teilweise enorm an. Im Falle des Pex8p wird die gesamte Proteingröße um ca. 40% erhöht, sobald der Tag angefügt wurde. Auch die Position des Fluoreszenzproteins ist höchstwahrscheinlich nicht optimal gewählt. Am extremen C-Terminus des Peroxins befindet sich das PTS1, welches durch den Tag eventuell maskiert wird. Zwar ist bekannt, dass das *Targeting* des Pex8p auch durch eine Deletion des terminalen Tripeptids nicht gestört ist (Rehling et al., 2000), jedoch ist mittlerweile auch gezeigt worden, dass das Anfügen eines solch großen Proteintags vermutlich doch Einfluss auf das Verhalten des Proteins in der Zelle hat. So konnten Wroblewska et al. (2017) zeigen, dass eine C-terminal getaggte Variante des Pex8p fehllokalisiert im Zytosol vorlag, wohingegen eine N-terminal markierte Form des Proteins in Peroxisomen gefunden werden konnte.

Als weiteres Zeichen für einen Import ins endoplasmatische Retikulum wird angeführt, dass das markierte Pex8p vor Proteasen geschützt im ER vorliegt. Bei dem durchgeführten Assay wurde jedoch ein Organellenpellet verwendet, von dem nicht genau gezeigt wurde, welche Organellen enthalten sind. Daher wäre es auch durchaus denkbar, dass die proteaseresistente Population von Pex8p innerhalb der Peroxisomen vorlag und nicht im endoplasmatischen Retikulum. Eine im ER möglicherweise auftretende mehrfache Glykosylierung des Peroxins wurde im Rahmen der Studie nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vorhandenen Glykosylierungspositionen des Pex8p prinzipiell glykosyliert werden können, wenn sie im ER vorliegen. Die Tatsache, dass allerdings weder *in vitro* noch *in vivo* eine Glykosylierung des Peroxins beobachtet werden konnte, zeigt eindeutig, dass es zu keinem Import des Pex8p ins ER gibt. Somit muss die aufgestellte Hypothese von van der Zand et al. (2010) korrigiert werden. Pex8p zählt offensichtlich nicht zu den Peroxinen, die zunächst ins ER transportiert werden.

4.2 Postuliertes PTS2 im Pex8p ist nicht für das *Targeting* verantwortlich

Da der Import ins ER mit den hier gezeigten Daten ausgeschlossen werden kann, muss es einen direkten Import von Pex8p ins Peroxisom geben. Für diesen Import scheint das C-terminale peroxisomale Targetingsignal nicht essentiell zu sein (Rehling et al., 2000). Es wäre denkbar, dass ein weiteres Signal im vorderen Bereich des Proteins die Targetingfunktion übernimmt. Ein möglicher Kandidat ist das postulierte PTS2 an Position 103 bis 112. Die Sequenz dieses Nonapeptids stimmt nicht vollständig mit der bekannten Konsensussequenz überein und ist auch eher ungewöhnlich weit vom N-Terminus des Proteins entfernt. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass in Hefen lediglich zwei PTS2-tragende Proteine bekannt sind und die Konsensussequenz des Signals daher hauptsächlich auf den Sequenzen von Säugerproteinen basiert (Kunze, 2020). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass Punktmutationen innerhalb des möglichen PTS2 die Erkennung des Signals beeinträchtigen können. Untersuchungen von Petriv et al. (2004) zeigten, dass bestimmte Aminosäureaustausche innerhalb des PTS2 durchaus kompensiert werden können. Andere hingegen haben einen starken Einfluss auf die Signalerkennung, wodurch der Import in die Peroxisomen gestört wird. Dabei spielt sowohl die Position der Aminosäure innerhalb des Signals als auch die ausgetauschte Aminosäure selbst eine Rolle. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden verschiedene Mutationen innerhalb des postulierten PTS2 im Pex8p eingefügt, die das *Targeting* durchaus negativ beeinflussen sollten. Erstaunlicherweise zeigten jedoch alle untersuchten Mutanten keinen erkennbaren Defekt in der Bildung von Peroxisomen (Abbildung 17). Auch eine Variante des Pex8p mit eingefügtem Prolin kann einen Knockout vom *PEX8* komplementieren. Dies ist besonders unerwartet, da diese Aminosäure eine Helixbildung des Signals unterbindet. Es ist jedoch bekannt, dass PTS2-Signale eine helikale Konformation einnehmen und so vom Rezeptor Pex7p erkannt werden (Pan et al., 2013). Im Falle des Pex8p liegt neben dem möglichen PTS2 zusätzlich noch das C-terminale PTS1 vor. Es wäre vorstellbar, dass dieses Tripeptid das *Targeting* des Peroxins sicherstellt, wenn das PTS2 nicht mehr vollständig funktional vorliegt. Durch die zusätzliche Deletion des PTS1 konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Auch ohne PTS1 konnten die Mutanten des Pex8p funktionale Peroxisomen bilden. Dies setzt voraus, dass das *Targeting* der Varianten korrekt erfolgt ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die untersuchten Punktmutationen eventuell nicht drastisch genug waren. Um dies zu überprüfen wurde im Weiteren das komplette mögliche Signal deletiert. Hierbei zeigte sich, dass diese Variante des Pex8p nicht in der Lage ist den Knockout zu komplementieren. Die generierten Hefen zeigen eindeutig kein Wachstum im Ölsäuremedium (Abbildung 18). Diese Beobachtung kann verschiedene Ursachen haben. So kann die Deletion zum einen dafür gesorgt haben, dass der Transport in die vorliegenden peroxisomalen *ghosts* nicht mehr korrekt ablaufen kann. Neben dem *Targeting* kann sich die Deletion jedoch auch auf die Funktion des Pex8p auswirken. Es wird postuliert, dass Pex8p für die Dissoziation von Rezeptor und Cargo im Lumen der Peroxisomen

verantwortlich ist (Ma et al., 2013; Wang et al., 2003). Dabei ist es vorstellbar, dass die peroxisomalen Targetingsignale des Pex8p als Kompetitor zum importierten Cargo fungieren und nicht für das *Targeting* des Pex8p verantwortlich sind.

Sollte das postulierte PTS2 lediglich für die Ausübung der Funktion des Pex8p von Bedeutung sein, sollte die Lokalisation des Peroxins durch die Deletion des Peptids nicht verändert sein. Pex8p müsste sich demnach in den *ghosts* befinden, kann den Import von Matrixproteinen jedoch nicht sicherstellen. Wenn das PTS2 doch für den Transport des Pex8p verantwortlich ist, sollte das Peroxin fehllokalisiert im Zytosol zu finden sein. Um die Lokalisation des Peroxins zu untersuchen, wurde zunächst ein Organellenpellet der generierten Hefestämme präpariert. Dieses wurde anschließend mit Proteinase K verdaut. Proteine, die sich innerhalb von membranumschlossenen Räumen befinden, sollten im Organellenpellet nachgewiesen werden können. Des Weiteren sollte die eingesetzte Protease nicht in der Lage sein diese Proteine abzubauen. Im Gegensatz dazu können frei vorliegende Proteine durch die Proteinase K vollständig abgebaut werden und sind somit nicht mehr nachzuweisen. Die Ergebnisse des Proteaseverdaus zeigten eindeutig, dass Pex8p mit einer Deletion der Aminosäuren 103 bis 112 nach wie vor in membranösen Strukturen vorliegt (Abbildung 19). Das veränderte Protein ist im Organellenpellet nachweisbar und wird durch die Protease nicht vollständig abgebaut. Lediglich das Auflösen der Membranen durch Triton X-100 macht das Protein für die Proteinase K zugänglich, wodurch es zum Abbau kommt. Basierend auf dieser Beobachtung kann daher festgestellt werden, dass auch ohne das mögliche PTS2 ein *Targeting* in die peroxisomalen *ghosts* erfolgt. Es kommt jedoch nicht zur Bildung von funktionalen Peroxisomen. Dies bedeutet, dass lediglich die Funktion des Pex8p gestört ist, nicht jedoch der Transport zu den *ghosts*. Erneut wurde eine Variante des Pex8p in den Deletionsstamm transformiert, die weder das PTS1 noch das PTS2 besitzt. Auch dieses Protein kann im Organellenpellet nachgewiesen werden. Durch die Protease kommt es auch hier nicht zum Abbau des Peroxins. Dies zeigt, dass auch Pex8p Δ PTS1 Δ PTS2 korrekt in die peroxisomalen Strukturen importiert wird, obwohl es keines der bekannten peroxisomalen Targetingsignale trägt. Bei dem durchgeführten Proteaseverdaus ist wie bereits erwähnt kein vollständiger Abbau der Varianten des Pex8p zu beobachten. Es fällt jedoch auf, dass die Signalstärke beim Einsatz der Protease im Vergleich zum unbehandelten Ansatz abnimmt. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Deletion des Nonapeptids im N-terminalen Bereich des Proteins vermutlich die Struktur des Pex8p verändert. Somit ist der Import in die *ghosts* möglicherweise weniger effizient. Die Tatsache, dass jedoch ein Anteil des Pex8p durch die Protease nicht abgebaut werden kann, zeigt, dass das reine *Targeting* durch die Deletion nicht vollständig gehemmt ist. Nach wie vor kann das Peroxin zu den peroxisomalen Strukturen gelangen und importiert werden. Es findet keine Fehllokalisation im Zytosol statt.

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine tragen eines der beiden bekannten peroxisomalen Targetingsignale. Der Import dieser PTS-tragenden Proteine ist sehr gut untersucht. Die zirkulierenden Rezeptoren erkennen die Targetingsignale und binden die Cargos. Anschließend

wird der Rezeptor-Cargo-Komplex zur Peroxisomenmembran dirigiert und es erfolgt der Import des Cargos. Im Falle des Pex8p ist bekannt, dass auch dieses Peroxin mit den bekannten Rezeptoren interagieren kann. Es fällt jedoch auf, dass diese Interaktion nicht über die peroxisomalen Targetingsignale vermittelt wird. So konnte gezeigt werden, dass eine Variante des Pex8p ohne C-terminales PTS1 nach wie vor mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p interagiert (Schulz, 2004). Dementsprechend muss die Bindung der Peroxine über andere Proteinbereiche erfolgen. Des weiteren beobachteten Deckers et al. (2010), dass es zur Bindung von Pex8p an den PTS2-Rezeptor Pex7p kommt auch wenn die für den Import benötigten Co-Rezeptoren Pex18p und Pex21p nicht vorliegen. Dies deutet darauf hin, dass auch hier die Interaktion nicht für den bekannten Import in die Peroxisomen benötigt wird. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Lokalisation des Pex8p scheinbar nicht verändert wird, wenn beide PTS-Rezeptoren deletiert werden. Nach wie vor konnte eine Interaktion des Pex8p mit Proteinen des Importomers in der peroxisomalen Membran beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass Pex8p nicht über die beiden bekannten PTS-Importwege in die Peroxisomen gelangt. Ein möglicher anderer Weg in die Peroxisomen stellt der sogenannte „piggy-back“-Import dar. Dieser wurde bisher bei peroxisomalen Matrixproteinen beobachtet, die kein PTS tragen. Dabei kommt es zur Komplexbildung mit einem PTS1-tragenden Peroxin und anschließend zum gemeinsamen Import (Glover et al., 1994a; McNew and Goodman, 1994; van der Klei and Veenhuis, 2006). Basierend auf dem Wissen über Pex8p und dessen Interaktionen mit anderen Proteinen ist dieser Importweg jedoch eher unwahrscheinlich. Der „piggy-back“-Import setzt voraus, dass der klassische Matrixproteinimport in Peroxisomen stattfinden kann. Für Pex8p konnte aber wie bereits erwähnt gezeigt werden, dass auch ohne vorhandene Rezeptoren der Import in peroxisomale Strukturen erfolgt. Vor diesem Hintergrund erscheint es naheliegender, dass sich im N-terminalen Bereich des Peroxins ein weiteres Signal befindet, das das *Targeting* des Proteins vermittelt. Erste Hinweise lieferten Rehling et al. (2000) mit der Beobachtung, dass die ersten 112 Aminosäuren des Pex8p ein Reporterprotein in Peroxisomen bringen kann. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte dieser Bereich nun etwas näher eingegrenzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das postulierte PTS2 an Position 103 bis 112 keine Rolle im *Targeting* des Pex8p spielt. Somit muss sich innerhalb der ersten 102 Aminosäuren des Peroxins eine Sequenz befinden, die den Transport zu den Peroxisomen sicherstellt. Weitere Untersuchungen dieses Proteinbereichs sollten demnach dazu führen, dass ein weiteres bisher unbekanntes Targetingsignal identifiziert werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass das vermutete PTS2 innerhalb des Pex8p keine Rolle im *Targeting* des Proteins spielt. Es wurde deutlich, dass Veränderungen innerhalb des Nonapeptids vermutlich die Funktion des Pex8p beeinflussen. Dabei können einzelne Punktmutationen im Peptid offensichtlich kompensiert werden. Kommt es jedoch zur Deletion des gesamten Nonapeptids, ist vermutlich keine Trennung von Rezeptor und Cargo im Lumen der Peroxisomen mehr möglich. Dass Pex8p beim Import von peroxisomalen Matrixproteinen

von Bedeutung ist, deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten. Bereits bei der Charakterisierung des Peroxins wurde vermutet, dass es wichtig für den Import von Matrixproteinen ist. Man stellte fest, dass sich bei einer Deletion des *PEX8* nach wie vor die sogenannten peroxisomalen *ghosts* bilden können. Die Bildung der peroxisomalen Membran war demnach nicht beeinflusst. Es wurde jedoch beobachtet, dass peroxisomale Matrixproteine fehllokalisiert im Zytosol vorlagen (Rehling et al., 2000). Welche Funktion Pex8p im Matrixproteinimport erfüllt, wurde zu diesem Zeitpunkt nicht genauer untersucht. In den folgenden Jahren stellte man fest, dass Pex8p in *S. cerevisiae* beide Subkomplexe des peroxisomalen Importomers verbindet. An der Innenseite der Peroxisomenmembran bildet das Peroxin eine Art Brücke zwischen den Proteinkomplexen und stellt vermutlich darüber den Import der Matrixproteine sicher (Agne et al., 2003). Neben der Funktion der Verbindung beider Komplexe wurde außerdem postuliert, dass Pex8p eine Rolle bei der Dissoziation von Rezeptor und Cargo spielt. In der Hefe *H. polymorpha* konnte beobachtet werden, dass Pex8p in der Lage ist das Cargo vom Rezeptor zu trennen (Ma et al., 2013; Wang et al., 2003). Es wäre vorstellbar, dass die peroxisomalen Targetingsignale des Pex8p dazu dienen die Bindung zwischen Rezeptor und Cargo zu schwächen, wodurch es zur Ablösung des Cargos im Lumen der Peroxisomen kommt. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Aminosäuresequenz des PTS2 nicht vollständig zur Konsensussequenz passt. Durch die variabelere Sequenz ist mehr Flexibilität bezüglich der zu trennenden Cargos möglich. Zum anderen könnte dies erklären, warum die eingefügten Punktmutationen im PTS2 keinen Effekt zeigten. Möglicherweise ist die gesamte Sequenz recht variabel, wodurch einzelne Mutationen einfacher toleriert werden.

Vorstellbar wäre auch, dass Pex8p für die Trennung von Rezeptor und Cargo auch darüber sorgt, dass es eine Konformationsänderung des PTS-Rezeptors induziert. Dies sorgt dafür, dass die Bindung zwischen Cargo und Rezeptor geschwächt wird. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass im Hefe-Two-Hybrid-System eine Bindung von Pex8p zum Pex5p beobachtet werden konnte, die jedoch nicht über die bekannten Bindestellen von Rezeptor und Cargo vermittelt wird. Neueste Untersuchungen deuten ebenfalls daraufhin, dass eine Konformationsänderung des Rezeptors für die Ablösung des Cargos essentiell ist. Daten aus *Xenopus laevis* zeigen, dass es im Lumen der Peroxisomen zur Konformationsänderung des Pex5p kommt, wodurch das Cargo freigelassen wird. Der Rezeptor wird anschließend ins Zytosol exportiert (Skowyra and Rapoport, 2022). In Anbetracht dessen, dass Pex8p bisher lediglich in Hefen gefunden wurde, ist es durchaus vorstellbar, dass die Trennung von Rezeptor und Cargo in Organismen ohne Pex8p einem anderen Mechanismus folgt.

5. Literaturverzeichnis

Agne, B., Meindl, N.M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Girzalsky, W., and Kunau, W.H. (2003). Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* 11, 635-646.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (1989). *Current protocols in molecular biology* Wiley Interscience. New York.

Azevedo, J.E., and Schliebs, W. (2006). Pex14p, more than just a docking protein. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1574-1584.

Bernhard, W., and Rouiller, C. (1956). Microbodies and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 2, 355-360.

Biardi, L., and Krisans, S.K. (1996). Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. *J Biol Chem* 271, 1784-1788.

Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975a). 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.

Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975b). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* 67, 852-862.

Bodnar, A.G., and Rachubinski, R.A. (1991). Characterization of the integral membrane polypeptides of rat liver peroxisomes isolated from untreated and clofibrate-treated rats. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 69, 499-508.

Breitling, J., and Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013359.

Buentzel, J., Vilardi, F., Lotz-Havla, A., Gartner, J., and Thoms, S. (2015). Conserved targeting information in mammalian and fungal peroxisomal tail-anchored proteins. *Scientific reports* 5, 17420.

Chen, X., VanValkenburgh, C., Liang, H., Fang, H., and Green, N. (2001). Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 2411-2416.

Chirico, W.J., Waters, M.G., and Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810.

Chitwood, P.J., and Hegde, R.S. (2019). The Role of EMC during Membrane Protein Biogenesis. *Trends Cell Biol* 29, 371-384.

- Chuck, S.L., and Lingappa, V.R. (1992). Pause transfer: a topogenic sequence in apolipoprotein B mediates stopping and restarting of translocation. *Cell* 68, 9-21.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- Connolly, T., and Gilmore, R. (1989). The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57, 599-610.
- Dalbey, R.E., and Von Heijne, G. (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends Biochem Sci* 17, 474-478.
- Dammai, V., and Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105, 187-196.
- Davis, R.A., Thrift, R.N., Wu, C.C., and Howell, K.E. (1990). Apolipoprotein B is both integrated into and translocated across the endoplasmic reticulum membrane. Evidence for two functionally distinct pools. *J Biol Chem* 265, 10005-10011.
- De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-357.
- de Hoop, M.J., and Ab, G. (1992). Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J* 286 (Pt 3), 657-669.
- 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.
- Denic, V. (2012). A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends Biochem Sci* 37, 411-417.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., and Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.
- 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.
- Dyer, J.M., McNew, J.A., and Goodman, J.M. (1996). The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J Cell Biol* 133, 269-280.

- Eckert, J.H., and Erdmann, R. (2003). Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147, 75-121.
- Effelsberg, D., Cruz-Zaragoza, L.D., Schliebs, W., and Erdmann, R. (2016). Pex9p is a new yeast peroxisomal import receptor for PTS1-containing proteins. *J Cell Sci* 129, 4057-4066.
- Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W.B., Distel, B., Subramani, S., and Tabak, H.F. (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* 16, 7326-7341.
- Erdmann, R., and Schliebs, W. (2005). Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 738-742.
- Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D., and Kunau, W.H. (1989). Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5419-5423.
- Erdos, G., Pajkos, M., and Dosztanyi, Z. (2021). IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic acids research* 49, W297-W303.
- Evans, E.A., Gilmore, R., and Blobel, G. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 581-585.
- 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.
- Fujiki, Y., Nashiro, C., Miyata, N., Tamura, S., and Okumoto, K. (2012). New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p during peroxisome biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 145-149.
- Furukawa, S., Sakata, N., Ginsberg, H.N., and Dixon, J.L. (1992). Studies of the sites of intracellular degradation of apolipoprotein B in Hep G2 cells. *J Biol Chem* 267, 22630-22638.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355-360.
- Glover, J.R., Andrews, D.W., and Rachubinski, R.A. (1994a). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10541-10545.
- Glover, J.R., Andrews, D.W., Subramani, S., and Rachubinski, R.A. (1994b). Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo. *J Biol Chem* 269, 7558-7563.

- Gonsberg, A., Jung, S., Ulbrich, S., Origi, A., Ziska, A., Baier, M., Koch, H.G., Zimmermann, R., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2017). The Sec61/SecY complex is inherently deficient in translocating intrinsically disordered proteins. *J Biol Chem* 292, 21383-21396.
- 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.
- 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.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., and Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108, 1657-1664.
- Gouveia, A.M., Guimaraes, C.P., Oliveira, M.E., Reguenga, C., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2003). Characterization of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, using a cell-free in vitro import system. *J Biol Chem* 278, 226-232.
- 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.
- Grou, C.P., Carvalho, A.F., Pinto, M.P., Alencastre, I.S., Rodrigues, T.A., Freitas, M.O., Francisco, T., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2009). The peroxisomal protein import machinery--a case report of transient ubiquitination with a new flavor. *Cell Mol Life Sci* 66, 254-262.
- 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.
- Guna, A., Volkmar, N., Christianson, J.C., and Hegde, R.S. (2018). The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase. *Science* 359, 470-473.
- Hagstrom, D., Ma, C., Guha-Polley, S., and Subramani, S. (2014). The unique degradation pathway of the PTS2 receptor, Pex7, is dependent on the PTS receptor/coreceptor, Pex5 and Pex20. *Mol Biol Cell* 25, 2634-2643.
- Hajra, A.K., and Bishop, J.E. (1982). Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway. *Ann N Y Acad Sci* 386, 170-182.
- Halbach, A., Rucktaschel, 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.
- Hasan, S., Platta, H.W., and Erdmann, R. (2013). Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front Physiol* 4, 261.

- Hazra, P.P., Suriapranata, I., Snyder, W.B., and Subramani, S. (2002). Peroxisome remnants in pex3delta cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes. *Traffic* 3, 560-574.
- Hegde, R.S. (2022). The Function, Structure, and Origins of the ER Membrane Protein Complex. *Annu Rev Biochem* 91, 651-678.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jonikas, M.C., Collins, S.R., Denic, V., Oh, E., Quan, E.M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J.S., *et al.* (2009). Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 323, 1693-1697.
- Jung, S., Marelli, M., Rachubinski, R.A., Goodlett, D.R., and Aitchison, J.D. (2010). Dynamic changes in the subcellular distribution of Gpd1p in response to cell stress. *J Biol Chem* 285, 6739-6749.
- Kalies, K.U., and Hartmann, E. (1998). Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)-two similar routes with different modes. *Eur J Biochem* 254, 1-5.
- Kasturi, L., Chen, H., and Shakin-Eshleman, S.H. (1997). Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem J* 323 (Pt 2), 415-419.
- Kausch, F. (2013). About the transport of Pex8 into the endoplasmic reticulum. In Institute of Biology (Lübeck).
- Kiel, J.A., Emmrich, K., Meyer, H.E., and Kunau, W.H. (2005). Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. *J Biol Chem* 280, 1921-1930.

Kiel, J.A., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2006). PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic* 7, 1291-1303.

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. (2005a). Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a *Saccharomyces cerevisiae* pex3Delta strain. *J Biol Chem* 280, 34350-34357.

Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., and Distel, B. (2005b). The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells. *J Biol Chem* 280, 7867-7874.

Krisans, S.K. (1992). The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 358-364.

Kunau, W.H., Buhne, S., de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U., and Thieringer, R. (1988). Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochemical Society transactions* 16, 418-420.

Kunze, M. (2020). The type-2 peroxisomal targeting signal. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* 1867, 118609.

Kunze, M., Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Ma, J., Eck, T., Braverman, N., Schmid, J.A., Eisenhaber, F., and Berger, J. (2011). Structural requirements for interaction of peroxisomal targeting signal 2 and its receptor PEX7. *J Biol Chem* 286, 45048-45062.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J., and Hartig, A. (1998). The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* 273, 33635-33643.

Lazarow, P.B., and De Duve, C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2043-2046.

Lazarow, P.B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530.

Léon, S., Goodman, J.M., and Subramani, S. (2006a). Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1552-1564.

- Léon, S., Zhang, L., McDonald, W.H., Yates, J., Cregg, J.M., and Subramani, S. (2006b). Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *J Cell Biol* 172, 67-78.
- Liu, X., and Subramani, S. (2013). Unique requirements for mono- and polyubiquitination of the peroxisomal targeting signal co-receptor, Pex20. *J Biol Chem* 288, 7230-7240.
- 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.
- Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J., and Dobberstein, B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81, 207-214.
- 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.
- McNew, J.A., and Goodman, J.M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* 127, 1245-1257.
- Mellquist, J.L., Kasturi, L., Spitalnik, S.L., and Shakin-Eshleman, S.H. (1998). The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 37, 6833-6837.
- Miesbauer, M., Pfeiffer, N.V., Rambold, A.S., Muller, V., Kiachopoulos, S., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2009). alpha-Helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 284, 24384-24393.
- Miyata, N., and Fujiki, Y. (2005). Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol Cell Biol* 25, 10822-10832.
- Montilla-Martinez, M., Beck, S., Klumper, J., Meinecke, M., Schliebs, W., Wagner, R., and Erdmann, R. (2015). Distinct Pores for Peroxisomal Import of PTS1 and PTS2 Proteins. *Cell reports* 13, 2126-2134.
- Neuberger, G., Kunze, M., Eisenhaber, F., Berger, J., Hartig, A., and Brocard, C. (2004). Hidden localization motifs: naturally occurring peroxisomal targeting signals in non-peroxisomal proteins. *Genome biology* 5, R97.
- Ng, D.T., Brown, J.D., and Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, 269-278.
- Nunnari, J., and Walter, P. (1996). Regulation of organelle biogenesis. *Cell* 84, 389-394.

- Pan, D., Nakatsu, T., and Kato, H. (2013). Crystal structure of peroxisomal targeting signal-2 bound to its receptor complex Pex7p-Pex21p. *Nature structural & molecular biology* 20, 987-993.
- Pease, R.J., Leiper, J.M., Harrison, G.B., and Scott, J. (1995). Studies on the translocation of the amino terminus of apolipoprotein B into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 7261-7271.
- Petrescu, A.J., Milac, A.L., Petrescu, S.M., Dwek, R.A., and Wormald, M.R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 14, 103-114.
- Petriv, O.I., Tang, L., Titorenko, V.I., and Rachubinski, R.A. (2004). A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J Mol Biol* 341, 119-134.
- Pfeiffer, N.V., Dirndorfer, D., Lang, S., Resenberger, U.K., Restelli, L.M., Hemion, C., Miesbauer, M., Frank, S., Neutzner, A., Zimmermann, R., *et al.* (2013). Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. *EMBO J* 32, 1036-1051.
- Pinto, M.P., Grou, C.P., Alencastre, I.S., Oliveira, M.E., Sá-Miranda, C., Fransen, M., and Azevedo, J.E. (2006). The import competence of a peroxisomal membrane protein is determined by Pex19p before the docking step. *J Biol Chem* 281, 34492-34502.
- Platta, H.W., El Magraoui, F., Bäumer, B.E., Schlee, D., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2009). Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Mol Cell Biol* 29, 5505-5516.
- 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., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2004). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem J* 384, 37-45.
- Purdue, P.E., and Lazarow, P.B. (2001). Pex18p is constitutively degraded during peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* 276, 47684-47689.
- Purdue, P.E., Yang, X., and Lazarow, P.B. (1998). Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* 143, 1859-1869.
- 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.
- Roitsch, T., and Lehle, L. (1989). Structural requirements for protein N-glycosylation. Influence of acceptor peptides on cotranslational glycosylation of yeast invertase and site-directed mutagenesis around a sequon sequence. *Eur J Biochem* 181, 525-529.

- 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.
- Schepers, L., Casteels, M., Vamecq, J., Parmentier, G., Van Veldhoven, P.P., and Mannaerts, G.P. (1988). Beta-oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E2 in rat liver peroxisomes and mitochondria. *J Biol Chem* 263, 2724-2731.
- Schliebs, W., and Kunau, W.H. (2006). PTS2 co-receptors: diverse proteins with common features. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1605-1612.
- 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.
- Schulz, K. (2004). Untersuchungen zur Funktion von Pex8p im peroxisomalen Matrixproteinimport der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Freie Universität Berlin).
- Silberstein, S., and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J* 10, 849-858.
- 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.
- Skowyra, M.L., and Rapoport, T.A. (2022). PEX5 translocation into and out of peroxisomes drives matrix protein import. *Mol Cell* 82, 3209-3225 e3207.
- 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).
- 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.
- Van Ael, E., and Fransen, M. (2006). Targeting signals in peroxisomal membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1629-1638.
- van der Klei, I.J., and Veenhuis, M. (2006). PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1794-1800.

Van der Leij, I., Franse, M.M., Elgersma, Y., Distel, B., and Tabak, H.F. (1993). PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11782-11786.

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.

Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.H., and Harder, W. (1987). Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 3, 77-84.

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.

von Heijne, G. (1982). Signal sequences are not uniformly hydrophobic. *J Mol Biol* 159, 537-541.

von Heijne, G. (1984). Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells. *EMBO J* 3, 2315-2318.

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. (1981a). 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. (1981b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 551-556.

Walter, P., and Blobel, G. (1983). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* 96, 84-93.

Walter, P., Ibrahimi, I., and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* 91, 545-550.

Wang, D., Visser, N.V., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2003). Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 278, 43340-43345.

Wroblewska, J.P., Cruz-Zaragoza, L.D., Yuan, W., Schummer, A., Chuartzman, S.G., de Boer, R., Oeljeklaus, S., Schuldiner, M., Zalckvar, E., Warscheid, B., *et al.* (2017). *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Pex3 contain membrane vesicles that harbor a subset of peroxisomal membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* 1864, 1656-1667.

Zhang, J., Chai, H., Guo, S., Guo, H., and Li, Y. (2018). High-Throughput Identification of Mammalian Secreted Proteins Using Species-Specific Scheme and Application to Human Proteome. *Molecules* 23.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMC	<i>ER membrane protein complex</i>
eq	Äquivalente
ER	endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GET	<i>guided entry for tail-anchored proteins</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG	Homogenisierungspuffer
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M / mM / μ M	Molar / Millimolar / Mikromolar
Mg(Oac) ₂	Magnesiumacetat
mPTS	peroxisomales Targetingsignal von Membranproteinen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
OST	Oligosaccharyltransferase
PBD	<i>Peroxisomal biogenesis disorders</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PEX	Peroxin
PI	Proteaseinhibitor
PK	Proteinase K
PMP	peroxisomales Membranprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PNS	post-nukleärer Überstand
PTS	peroxisomales Targetingsignal

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RM	raue Membranen
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPC	Signapeptidasekomplex
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TPR	Tetratricopeptid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte	21
Tabelle 2 Chemikalien, Enzyme & Kits	21
Tabelle 3 verwendeter Bakterienstamm.....	22
Tabelle 4 verwendete Hefestämme.....	23
Tabelle 5 Plasmide für die <i>in vitro</i> Transkription.....	24
Tabelle 6 Plasmide für Proteinexpression in <i>S.cerevisiae</i>	24
Tabelle 7 verwendete Oligonukleotide	26
Tabelle 8 verwendete Antikörper	27
Tabelle 9 Konsensussequenz des PTS2 und generierte Punktmutationen im Pex8p	59

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Modelle zur Biogenese von Peroxisomen.....	11
Abbildung 2 Import von PTS1-tragenden Matrixproteinen in Hefen	17
Abbildung 3 generierte Konstrukte des Pex8.....	41
Abbildung 4 FLAG-getaggtetes Pex8p kann Knockout des <i>PEX8</i> komplementieren.....	42
Abbildung 5 Generierte Hefestämme können Peroxisomen bilden	43
Abbildung 6 Pex8p wird <i>in vivo</i> nicht glykosyliert	45
Abbildung 7 Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte	46
Abbildung 8 Pex8p wird <i>in vitro</i> bei Zugabe von Hefemembranen nicht glykosyliert	47
Abbildung 9 Varianten des Pex8p werden nicht in raue Membranen transportiert.....	48
Abbildung 10 α F_Pex8p wird bei Verwendung von Hefemembranen nicht glykosyliert.....	50
Abbildung 11 Glykosylierungsstellen des Pex8p können genutzt werden	52
Abbildung 12 verwendete Konstrukte aus Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und Pex8p	53
Abbildung 13 Chimäre aus α F-Signalsequenz und Pex8p werden mehrfach glykosyliert.....	54
Abbildung 14 verwendete Konstrukte aus Signalsequenz des Präpro-Alphafaktors und Pex8p	55
Abbildung 15 Pex8p mit vorgeschalteter Signalsequenz kann <i>PEX8</i> -Knockout komplementieren	56
Abbildung 16 α F_Pex8p wird <i>in vivo</i> nicht glykosyliert.....	58
Abbildung 17 Punktmutationen im PTS2 haben keinen Effekt.....	60
Abbildung 18 Pex8p kann nach Deletion des PTS2 den <i>PEX8</i> -Knockout nicht komplementieren	61
Abbildung 19 Pex8p mit deletiertem PTS2 liegt in peroxisomalen Strukturen vor.....	63

6.4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Enno Hartmann für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Biologie anfertigen zu können.

Bei Herrn PD Dr. Kai-Uwe Kalies bedanke ich mich für die Vergabe des spannenden Themas und für seine Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor und beim Verfassen dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz, der sich bereit erklärt hat als Gutachter diese Arbeit zu prüfen.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Girzalsky und der AG Erdmann möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Hefestämme und die entsprechenden Kultivierungsprotokolle bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie und des Isotopenlabors für stets freundliche Hilfe, sei es technischer oder privater Natur. Die vielen netten Gespräche, das Interesse an meiner Arbeit und euer stets offenes Ohr haben mich stets zum Durchhalten motiviert.

Ein besonders Dank gilt dabei Alexandra Schatt. Ohne dich wäre diese Arbeit vielleicht nie zum Ende gekommen. Du warst immer für mich da, in guten und in schwierigen Zeiten. Vermutlich konnte niemand so gut mitfühlen wie du.

Auch bei Susanne Allan möchte ich mich besonders bedanken. Sie hat unermüdlich Konstrukte kloniert und immer genau den Überblick behalten, wenn ich diesen mal kurz aus den Augen verloren hatte.

Auch bei Katja Andruleit möchte ich mich besonders bedanken. Viele Klonierungen wurden von ihr durchgeführt und haben mir sehr geholfen.

Bei den Hefefachleuten Petra Nielsen und Prof. Dr. Christian Schmidt möchte ich mich für ihre unermüdliche Hilfe bedanken. Meine Kulturen sind vermutlich dank Petra immer besonders schön geworden.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Besonders mein Mann und meine Kinder mussten meine Launen nur allzu oft ertragen und haben mich dennoch stets motiviert durchzuhalten.

DANKE!!!!