



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

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

Über PEX19 als Regulator der *de novo* Peroxisomenbiogenese

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Katharina Haupenthal
aus Baden-Baden

Lübeck, 2018

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 4. Februar 2019

Zusammenfassung

Peroxisomen sind hochdynamische Organellen, deren Anzahl, Größe und Proteinausstattung an wechselnde Umweltbedingungen angepasst werden müssen. Bisherige Erkenntnisse lassen eine komplexe Biogenese vermuten, die eine vielfältige Regulation der verschiedenen Biogenesewege ermöglicht. Das Membranprotein PEX3 und das cytosolische Protein PEX19 sind wichtige Interaktionspartner bei der Peroxisomenbiogenese. Sie sind essentiell für die Vermehrung der Peroxisomen über Wachstum und Teilung sowie für deren *de novo* Biogenese. Die *de novo* Biogenese wird durch den Eintritt von PEX3 in das endoplasmatische Retikulum (ER) initiiert, was einen möglichen Regulationspunkt der *de novo* Biogenese darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde PEX19 als möglicher Regulator der *de novo* Peroxisomenbiogenese im Säuger untersucht.

In peroxisomendefizienten Δ PEX3-Zellen konnte gezeigt werden, dass die *de novo* Biogenese der Peroxisomen in komplementierten Zellen durch PEX19 konzentrationsabhängig gehemmt wird. Die Vermehrung der Peroxisomen durch Wachstum und Teilung wurde dagegen nicht von PEX19 beeinflusst. *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass die Hemmung der *de novo* Biogenese darauf beruht, dass PEX19 die Integration von PEX3 in die ER-Membran verhindert. Weiter konnte gezeigt werden, dass der gehemmte PEX3-Transport ins ER posttranslational abläuft. Dabei wurde ausgeschlossen, dass selbst unter Bedingungen, die einen cotranslationalen Proteintransport zulassen, ein Teil des PEX3 cotranslational ins ER transportiert wird. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Hemmung des PEX3-Transports ins ER über eine direkte Interaktion mit PEX19 geschieht und dabei die bekannten PEX3:PEX19-Bindungsstellen genutzt werden. Die Integration des ScPex3p in die ER-Membran der Hefe wurde ebenfalls durch ScPex19p gehemmt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Regulation der *de novo* Peroxisomenbiogenese über die Hemmung des PEX3-Transports ins ER eine konservierte Funktion von PEX19 ist.

Abstract

Peroxisomes are highly dynamic organelles whose number, size and protein content have to be adapted to changing environmental conditions. Previous findings suggest a complex biogenesis, which allows a diverse regulation of the various biogenesis pathways. The membrane protein PEX3 and the cytosolic protein PEX19 are important interaction partners in peroxisome biogenesis. They are essential for the proliferation of peroxisomes via growth and division as well as for their *de novo* biogenesis. The *de novo* biogenesis is initiated by the entry of PEX3 into the endoplasmic reticulum (ER), which represents a possible regulatory point of *de novo* biogenesis. In the present work PEX19 was investigated as a potential regulator for *de novo* peroxisome biogenesis in mammals.

In peroxisome-deficient Δ PEX3 cells it could be shown that the *de novo* biogenesis of peroxisomes is inhibited by PEX19 in a concentration-dependent manner. In contrast, the proliferation of peroxisomes by growth and division was unaffected by PEX19. *In vitro* studies revealed that the inhibition of *de novo* biogenesis occurs due to the fact that PEX19 prevents the integration of PEX3 into the ER membrane. Furthermore it could be shown that the inhibited PEX3 transport into the ER occurs posttranslationally. It was excluded that even under conditions that allow cotranslational protein transport into the ER, a part of PEX3 is transported cotranslationally. Further investigations showed that the inhibition of PEX3 transport into the ER occurs via a direct interaction with PEX19 using the known PEX3:PEX19 binding sites. Integration of ScPex3p into the ER membrane of yeast was also inhibited by ScPex19p. This indicates that PEX19 performs a conserved function in regulating the *de novo* peroxisome biogenesis by inhibiting PEX3 transport into the ER.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
1 Einleitung	1
1.1 Die Peroxisomenbiogenese	1
1.2 Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum	3
1.3 Proteintransport in die Peroxisomen	6
1.4 Die Interaktionspartner PEX3 und PEX19	6
1.5 Regulation der Peroxisomenbiogenesewege	9
1.6 Zielstellung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	11
2.2 Medien und Puffer	12
2.3 Antikörper	16
2.4 Plasmide und Nukleinsäuren	17
2.5 Herstellung der PCR-Produkte für die <i>in vitro</i> Transkription	21
2.6 Herstellung der Plasmid-DNA-Konstrukte mittels Klonierung	22
2.7 Kultivierung von Säugerzellen	32
2.7.1 Erhaltung	33
2.7.2 Kryokonservierung	33
2.7.3 Zellzählung	33
2.7.4 Transfektion	33
2.8 Herstellung von Gesamtzellextrakten	34
2.9 Mikroskopische Untersuchungen	34
2.9.1 Herstellung der Mikroskopiepräparate	34
2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie	34
2.9.3 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen	35

2.10 Herstellung rekombinanter Proteine	35
2.11 Präparation von rauen Mikrosomen.....	36
2.11.1 Präparation von rauen Mikrosomen aus dem Hund.....	36
2.11.2 Präparation von rauen Mikrosomen aus der Hefe.....	36
2.12 <i>in vitro</i> Transkription.....	37
2.13 <i>in vitro</i> Translation.....	38
2.14 <i>in vitro</i> Proteintransport	38
2.14.1 <i>in vitro</i> Translokation im Translations- und Transportansatz.....	38
2.14.2 <i>in vitro</i> Translokation von Translationsintermediaten	38
2.14.3 <i>in vitro</i> Translokation unter posttranslationalen Bedingungen	39
2.15 Nachweis des Proteintransports ins ER	39
2.15.1 Überprüfung der ER-spezifischen Glykosylierung.....	40
2.15.2 Natriumkarbonatextraktion von Membranen.....	40
2.16 TCA-Fällung.....	41
2.17 RNase-Behandlung	41
2.18 Untersuchung des PEX19-Einflusses auf die Proteintranslokation.....	41
2.19 <i>in vitro</i> Untersuchung von Proteinbindungen.....	42
2.20 Proteinauftrennung im SDS-Polyacrylamidgel	42
2.21 Immunochemische Proteindetektion im Western Blot	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Untersuchung der <i>de novo</i> Peroxisomenbiogenese in humanen Fibroblasten.....	44
3.1.1 PEX19 hemmt die <i>de novo</i> Biogenese der Peroxisomen	44
3.2 <i>in vitro</i> Untersuchungen des PEX3-Transports in die ER-Membran	54
3.2.1 PEX19 hemmt den Transport von PEX3 ins ER	54
3.2.2 Der durch PEX19 gehemmte PEX3-Transport ins ER läuft posttranslational ab....	66
3.2.3 Die Hemmung des PEX3-Transports ins ER beruht auf einer direkten PEX3:PEX19-Interaktion.....	70

3.2.4 Der Transport von Pex3p in das der ER der Hefe wird ebenfalls durch Pex19p gehemmt.....	80
4 Diskussion	82
4.1 PEX19 hemmt die <i>de novo</i> Biogenese der Peroxisomen, jedoch nicht deren Wachstum und Teilung	82
4.2 PEX19 hemmt die <i>de novo</i> Biogenese, indem es den Eintritt von PEX3 ins ER während des posttranslationalen Transports verhindert.....	84
4.3 Der posttranslationale PEX3-Transport ins ER wird durch die bekannte PEX3:PEX19-Bindung verhindert.....	86
4.4 Modell der Regulation der Peroxisomenbiogenese durch PEX19.....	87
5 Literaturverzeichnis	90
Anhang	
Abkürzungsverzeichnis.....	A1
Danksagung	A3
Selbstständigkeitserklärung	A4

1 Einleitung

Peroxisomen sind kleine Organellen mit einem Durchmesser von 100 nm bis 1 µm und von einer einfachen Membran umgeben (Titorenko & Rachubinski, 2001). Sie kommen in allen Eukaryoten vor und führen wichtige Stoffwechselfunktionen aus, wie z. B. die Wasserstoffperoxid abbauenden Katalase- und Peroxidasereaktionen, den Abbau von langkettigen und verzweigt-kettigen Fettsäuren oder die Synthese von Gallensäure und Plasmalogenen. Diese Funktionen sind eng mit dem Stoffwechsel der Mitochondrien verbunden (Islinger *et al.*, 2012; Wanders & Waterham, 2006). Die Organellen wurden 1954 als zelluläre Strukturen (*microbodies*) entdeckt und von De Duve ausführlich beschrieben, der sie aufgrund der enthaltenen Enzyme „Peroxisomen“ nannte (De Duve & Baudhuin, 1966). Sie werden seitdem intensiv in ihrer Funktion und Biogenese erforscht. Die Biogenese der Peroxisomen ist von besonderem medizinischem Interesse. Wie wichtig eine einwandfrei funktionierende Peroxisomenbiogenese für die Entwicklung und Funktion des menschlichen Körper ist, zeigt sich in den Peroxisomenbiogenese-Störungen (*Peroxisome biogenesis disorder*, PBD) wie z. B. dem Zellweger-Syndrom, der schwersten Erscheinungsform der PBDs. Bei diesen genetischen Defekten können die Patienten eines der für die Peroxisomenbiogenese essentiellen Proteine nicht bilden. Sie führen in der Regel innerhalb der ersten Lebensmonate zum Tod (Waterham *et al.*, 2016). Die Proteine, die für die Peroxisomenbiogenese zuständig sind, werden Peroxine (PEX) genannt. Zu ihnen zählen Membranproteine und cytosolische Rezeptoren für den Membranprotein- und Matrixproteinimport sowie PEX11 für die Teilung der Peroxisomen. Die Peroxine PEX3, PEX16 und PEX19 sind für die frühe Peroxisomenbiogenese im Säuger essentiell. Wenn eines dieser Proteine fehlt, können keine Peroxisomen oder peroxisomenähnlichen Organellen gebildet werden (Fujiki *et al.*, 2012; Matsuzono *et al.*, 1999; Muntau *et al.*, 2000; South & Gould, 1999).

1.1 Die Peroxisomenbiogenese

Die Peroxisomenbiogenese und die beteiligten Proteine sind im Säuger und in der Hefe weitestgehend konserviert (Girzalsky *et al.*, 2010). Es gibt heute zwei Modelle, die allgemein die Bildung von Peroxisomen beschreiben: zum einen die Biogenese durch Wachstum und Teilung bestehender Peroxisomen und zum anderen die *de novo* Biogenese über das

endoplasmatische Retikulum (ER) (Abb. 1) (Hua & Kim, 2016). Am Anfang der Peroxisomenforschung wurde zunächst eine räumliche Nähe zwischen ER und Peroxisomen gefunden und Peroxisomen wurden als Ableger des ERs betrachtet (De Duve & Baudhuin, 1966; Novikoff & Novikoff, 1972). Dies war naheliegend, da das ER der Hauptort der Membranlipidsynthese und des Proteintransports ist. Nachdem der direkte, posttranslationale Transport von peroxisomalen Membran- und Matrixproteinen in die Peroxisomen entdeckt wurde, ging man lange davon aus, dass Peroxisomen autonome Organellen sind, die sich nur durch Wachstum und Teilung vermehren können (Lazarow & Fujiki, 1985). Beim Modell von Wachstum und Teilung ist bis heute nicht gänzlich geklärt, woher die Peroxisomen ihre Membranlipide beziehen. Die Entdeckung von peroxisomendefizienten Zellen, die nach Einführen der komplementierenden cDNA Peroxisomen komplett neu bilden können, führte dazu, dass wieder das ER als Quelle der Peroxisomen postuliert wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass vom ER stammende Vesikel zur Neubildung von Peroxisomen führen (Titorenko & Mullen, 2006). Eine Beteiligung von ER-Vesikeln an der Peroxisomenbiogenese ist eine mögliche Antwort auf die Frage der Herkunft der Membranlipide. Möglicherweise spielen auch die Mitochondrien eine Rolle bei der Bildung der Peroxisomen, was in letzter Zeit wieder in den Fokus rückt (Mohanty & McBride, 2013; Sugiura *et al.*, 2017). Neuerdings wird auch die Möglichkeit eines komplexen Membraninteraktions in der Zelle und die Versorgung der Peroxisomen mit Lipiden und Proteinen über nichtvesikulären Austausch an sogenannten *contact sites* zu unterschiedlichen Membranen in Betracht gezogen (Hua & Kim, 2016; Shai *et al.*, 2016; Valm *et al.*, 2017). Unser stetig zunehmendes Wissen führt zu einer immer komplexer werdenden Antwort auf die Frage nach der Peroxisomenbiogenese. Die Biogenese durch Wachstum und Teilung der Peroxisomen und *de novo* über das ER ist dabei wahrscheinlich nur ein Teil des gesamten Mechanismus.

Abbildung 1 stellt die beiden Modelle der Peroxisomenbiogenese schematisch dar. Im ersten Modell vermehren sich die Peroxisomen, indem sie durch Matrix- und Membranproteinimport wachsen und sich teilen (Abb. 1, links). Bei der Teilung spielen PEX11 und Proteine der mitochondrialen Teilungsmaschinerie wie z. B. Drp1 und Fis1 eine Rolle (Schrader *et al.*, 2016). Im zweiten Modell, bei der *de novo* Biogenese der Peroxisomen, werden peroxisomale Proteine in das ER transportiert und schnüren in präperoxisomalen Vesikel vom ER ab (Abb. 1, rechts). Durch Matrix- und Membranproteinimport entstehen reife Peroxisomen.

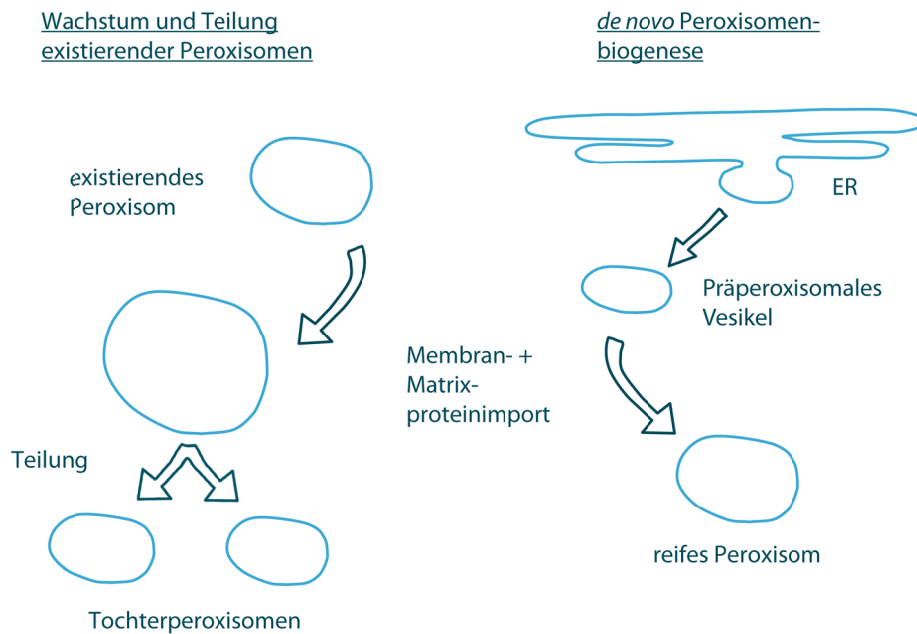


Abb. 1: Die zwei Modelle der Peroxisomenbiogenese

Bei der Vermehrung der Peroxisomen durch Wachstum und Teilung existierender Peroxisomen wachsen reife Peroxisomen, indem sie Membran- und Matrixproteine aus dem Cytosol importieren. Durch Teilung entstehen Tochterperoxisomen. Die Zelle kann Peroxisomen auch *de novo* über das ER bilden. Dabei werden peroxisomale Proteine ins ER transportiert und schnüren in präperoxisomalen Vesikel vom ER ab. Diese Vesikel reifen dann durch Membran- und Matrixproteinimport zu vollständigen Peroxisomen.

1.2 Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum

Proteine, die ihren Wirkort nicht im Cytosol haben, müssen über eine biologische Membran transportiert werden. Die meisten dieser Proteine werden über das ER zu den verschiedenen Wirkorten in der Zelle sortiert. Hierfür besitzen sie spezifische, hydrophobe Sequenzen, die die zu transportierenden Proteine zur ER-Membran adressieren. Bei sekretorischen (löslichen) Proteinen ist dies ein Signalpeptid, das in der Regel während des Transports durch den Signalpeptidasekomplex abgespalten wird. Membranproteine haben je nach Topologie eine abspaltbare Signalsequenz oder die (erste) Transmembrandomäne übernimmt die Adressierung und fungiert dann als Signalanker (Blobel & Dobberstein, 1975; Martoglio & Dobberstein, 1998; von Heijne, 1983). Der herkömmliche Proteintransport über die ER-Membran geschieht durch das Sec61-Translokon und kann auf zwei Wegen ablaufen: zum einen cotranslational während der Proteinsynthese am Ribosom und zum anderen posttranslational, also nachdem die Synthese an freien Ribosomen im Cytosol abgeschlossen ist (Abb. 2) (Gorlich *et al.*, 1992; Kalies & Hartmann, 1998). Daneben existiert ein weiterer

Transportweg für *tail-anchored* Proteine, deren Signal für den Transport in die ER-Membran in einem C-terminal gelegenen Signallanker liegt und die posttranslational und nicht über das Sec61-Translokation in die ER-Membran transportiert werden (Borgese & Fasana, 2011).

Beim cotranslationalen Transport (Abb. 2, links) beginnt die Translation der mRNA eines Transportsubstrats am freien Ribosom im Cytosol. Sobald die Signalsequenz aus dem ribosomalen Tunnel ragt, wird diese durch SRP (*signal recognition particle*) erkannt und gebunden. Durch die Bindung des Komplexes aus translatierendem Ribosom, mRNA und naszierender Peptidkette (*ribosome-nascent chain complex*, RNC) mit SRP kommt es zu einer Verlangsamung der Translation. Währenddessen findet das Targeting des RNC zum Sec61-Kanal statt. Dabei gelangt der SRP-RNC-Komplex durch Interaktion von SRP mit seinem ER-ständigen Rezeptor zur ER-Membran. Dort löst sich das rezeptorgebundene SRP vom Ribosom, das am Translokation bindet. Die Signalsequenz tritt in den Sec61-Kanal ein und wird durch Sec61 gebunden. Das nun auf dem Kanal sitzende Ribosom führt die Synthese der Polypeptidkette fort, die direkt aus dem ribosomalen Tunnel weiter durch den Kanal ins ER-Lumen geführt wird. Das abspaltbare Signalpeptid wird durch den Signalpeptidasekomplex vom Präprotein abgespalten, d. h. das Protein wird prozessiert. Das prozessierte Protein liegt nach abgeschlossener Translokation im ER-Lumen vor. Bei Membranproteinen führen die Transmembrandomänen zu einem Stopp des Transfers und werden lateral aus dem Kanal in die Membran entlassen (Park & Rapoport, 2012; Shao & Hegde, 2011; Zimmermann *et al.*, 2011).

Beim posttranslationalen Transport (Abb. 2, rechts) wird dahingegen das Protein zunächst im Cytosol an freien Ribosomen vollständig synthetisiert. Cytosolische Chaperone binden an die entstehende Polypeptidkette, um eine Faltung und Aggregation durch die hydrophoben Bereiche zu verhindern, und halten sie so in einer translokationskompetenten Form. Durch einen noch nicht vollständig geklärten Targetingmechanismus gelangen die Polypeptidketten nach der abgeschlossenen Translation zum Sec61-Kanal in der ER-Membran. Nachdem das abspaltbare Signalpeptid oder der Signallanker in den Kanal inseriert wurde, verläuft die Translokation wie beim cotranslationalen Transport. Der Unterschied dabei ist, dass nicht die Translation die treibende Kraft ist, sondern die Peptidkette durch Brown'sche Molekularbewegung durch den Kanal gelangt. Das luminaire Chaperon BiP hindert die Peptidkette daran sich ins Cytosol zurückzubewegen, indem es im ER-Lumen an sie bindet (Park & Rapoport, 2012; Zimmermann *et al.*, 2011).

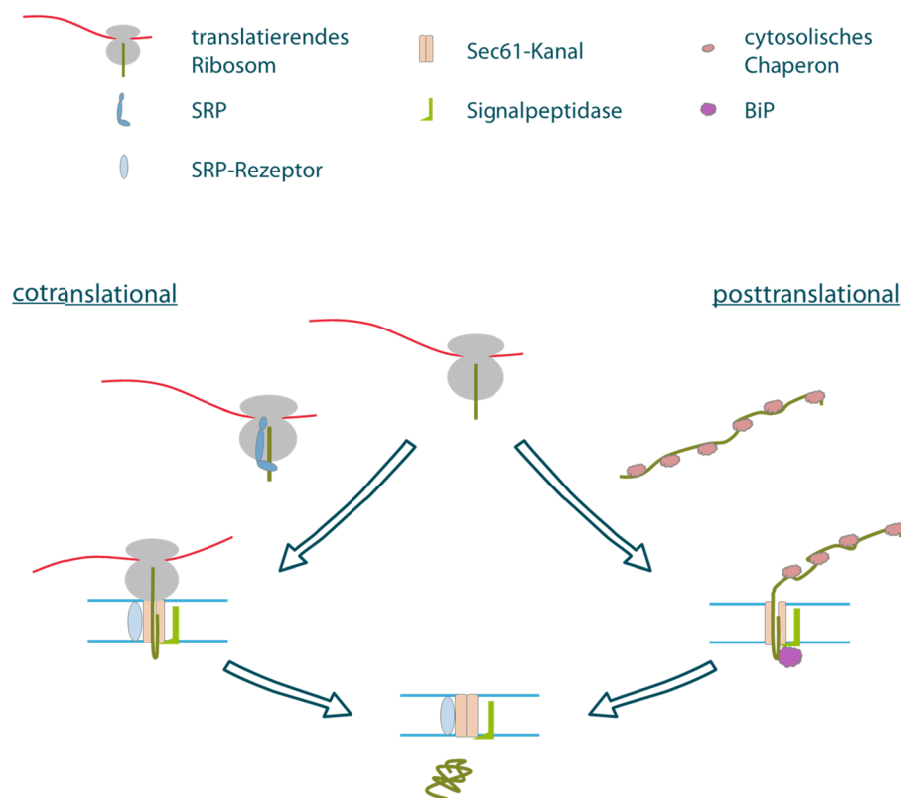


Abb. 2: Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum am Beispiel eines löslichen Proteins

Beim cotranslationalen Transport bindet SRP die aus dem Ribosom ragende Signalsequenz des Transportsubstrats und bringt den Komplex aus translatierendem Ribosom, mRNA und naszierender Kette (RNC) durch Interaktion mit seinem Rezeptor zur ER-Membran. Dort verläuft die translationsgekoppelte Translokation durch den Sec61-Kanal. Abspaltbare Signalpeptide werden durch die Signalpeptidase abgespalten. Posttranslational transportierte Proteine werden zunächst an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert. Cytosolische Chaperone binden an die Polypeptidkette und halten sie in einer transportkompetenten Form. Das Protein wird nach vollendeter Translation ribosomenunabhängig durch den Sec61-Kanal ins ER transportiert. Im ER-Lumen bindet BiP an die Polypeptidkette und verhindert so ein Zurückbewegen des Proteins. Auch hier kann das Signalpeptid durch die Signalpeptidase abgespalten werden. Nicht dargestellt: Die Transmembrandomänen eines Membranproteins führen zum Stopp des Transfers und werden lateral aus dem Kanal in die Membran entlassen.

Ins ER transportierte Proteine können ER-spezifisch modifiziert werden. Neben der erwähnten Prozessierung des Präproteins durch die Signalpeptidase tritt häufig eine N-Glykosylierung durch den Oligosaccharyltransferasekomplex auf. Dabei werden an der luminalen Seite der ER-Membran Glykosylreste kovalent mit einem Asparagin (N) im Protein verknüpft. Glykosylierte Proteine müssen dementsprechend zumindest mit ihrer Glykosylierungsstelle über die Membran ins ER reichen. Das Motiv, das eine Glykosylierungsstelle anzeigt, hat die Aminosäuresequenz Asparagin-X-Serin/Threonin

(NXS/T, X: eine beliebige Aminosäure außer Prolin) (Breitling & Aebi, 2013; Shrimal *et al.*, 2015).

1.3 Proteintransport in die Peroxisomen

Peroxisomale Membranproteine (PMP) und peroxisomale Matrixproteine werden auf unterschiedlichen Wegen in die Peroxisomen transportiert. Beim Matrixproteinimport werden die Proteine an ihrem peroxisomalen Targetingsignal (PTS) von den cytosolischen Rezeptoren PEX5 und PEX7 erkannt und gebunden. PEX5 erkennt das PTS1, ein hochkonserviertes Tripeptid, das am extremen C-Terminus liegt. Die Konsensussequenz für das PTS1 ist die Aminosäureabfolge Serin-Lysin-Leucin (SKL) (Gould *et al.*, 1989). PEX7 ist der Rezeptor für Matrixproteine mit dem PTS2, das N-terminal liegt und aus neun weniger konservierten Aminosäuren besteht. Unter Beteiligung der PMPs, die das Importomer bilden, wird das rezeptorgebundene Matrixprotein in die Peroxisomen transportiert und der cytosolische Rezeptor recycelt (Hasan *et al.*, 2013). Matrixproteine sind vor allem für den Stoffwechsel wichtige Enzyme, wie z. B die Katalase. Der Import der PMPs wird von PEX3 und PEX19 bewerkstelligt.

1.4 Die Interaktionspartner PEX3 und PEX19

PEX19 fungiert beim PMP-Import als cytosolischer PMP-Rezeptor und Chaperon. Es erkennt und bindet die im Cytosol synthetisierten PMPs an ihrem Targetingsignal für peroxisomale Membranproteine (mPTS). Das in der Peroxisomenmembran sitzende PEX3 ist der Rezeptor für PEX19. Durch die Interaktion mit PEX3 gelangt der PEX19-PMP-Komplex zu den Peroxisomen, wo das PMP in die Membran integriert wird (Abb. 3 A, links und Abb. 3 B) (Fang *et al.*, 2004; Fransen *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016; Matsuzono & Fujiki, 2006).

Das cytosolische Protein PEX19 ist aus einer N-terminalen Helix und einem globulären Proteinteil aufgebaut, die über eine flexible Region miteinander verbunden sind. Mit dieser Helix bindet PEX19 an PEX3 (Abb. 3 B) (Schmidt *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2010; Schueller *et al.*, 2010). PEX19 trägt an seinem C-Terminus ein Farnesylierungsmotiv und liegt in der Zelle teilweise farnesyliert vor (Gotte *et al.*, 1998; Matsuzono *et al.*, 1999). Die

Funktion der PEX19-Farnesylierung ist noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Arbeiten gehen davon aus, dass die Farnesylierung keine Bedeutung für die Peroxisomenbiogenese hat (Matsuzono *et al.*, 2006; Mayerhofer *et al.*, 2002; Sacksteder *et al.*, 2000; Vastiau *et al.*, 2006). Dahingegen wird neuerdings postuliert, dass die PEX19-Farnesylierung eine wichtige Funktion bei der PMP-Erkennung während des PMP-Imports in die peroxisomale Membran ausübt (Emmanouilidis *et al.*, 2017). Die direkte PEX3:PEX19-Bindung ist von der PEX19-Farnesylierung unbeeinflusst (Fransen *et al.*, 2001; Matsuzono *et al.*, 2006). PEX3 ist ein integrales Membranprotein mit einem membranspannenden Segment, das das Protein in der Membran verankert (Membrananker). Der kurze N-Terminus von PEX3 ragt in die peroxisomale Matrix, der Hauptteil des Proteins ist in einem kompakten Helixbündel gefaltet und liegt im Cytosol vor (Abb. 3 B) (Sato *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2010; Soukupova *et al.*, 1999). Auf der membranabgewandten Seite des Helixbündels liegt die Bindungstasche für die N-terminale Helix von PEX19, über die die PEX3:PEX19-Bindung hauptsächlich vermittelt wird (Hattula *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2012). In dieser Bindungstasche liegen die konservierten, für die PEX19-Bindung wichtigen Aminosäuren Leucin (L93), Alanin (A323) und Lysin (K234) (Abb. 3 B). Untersuchungen mittels isothermer Titrationskalorimetrie und funktionelle Analysen haben ergeben, dass die Mutation von L93 die PEX3:PEX19-Bindung am stärksten beeinträchtigt und zum Funktionsverlust des PEX3 in der Zelle führt (Schmidt *et al.*, 2012). Neben dem Import der PMPs führen PEX3 und PEX19 ebenso essentielle Funktionen bei der *de novo* Biogenese der Peroxisomen über das ER aus (Abb. 3 A). Dabei wird PEX3 in die ER-Membran transportiert und initiiert die *de novo* Biogenese. Unter Beteiligung von PEX19 schnürt PEX3 dann in präperoxisomalen Vesikeln ab (Abb. 3 A, rechts) (Kim *et al.*, 2006; Mayerhofer *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2012; Toro *et al.*, 2009). Auch hierbei scheinen die Aminosäuren L93 und A323 des PEX3 wichtig für die Bindung zu PEX19 zu sein (Schmidt *et al.*, 2012).

Der *de novo* Biogeneseweg der Peroxisomen über das ER wurde u. a. in peroxisomendefizienten Δ PEX3-Zellen entdeckt. Diese Zellen besitzen aufgrund einer Mutation im *PEX3*-Gen kein funktionelles PEX3-Protein, was zum Verlust der Fähigkeit zur Peroxisomenbiogenese führt. Nach genetischer Komplementation durch Transfektion mit Wildtyp-PEX3-codierender cDNA können diese Zellen PEX3 synthetisieren und innerhalb weniger Tage neue Peroxisomen bilden (Muntau *et al.*, 2000).

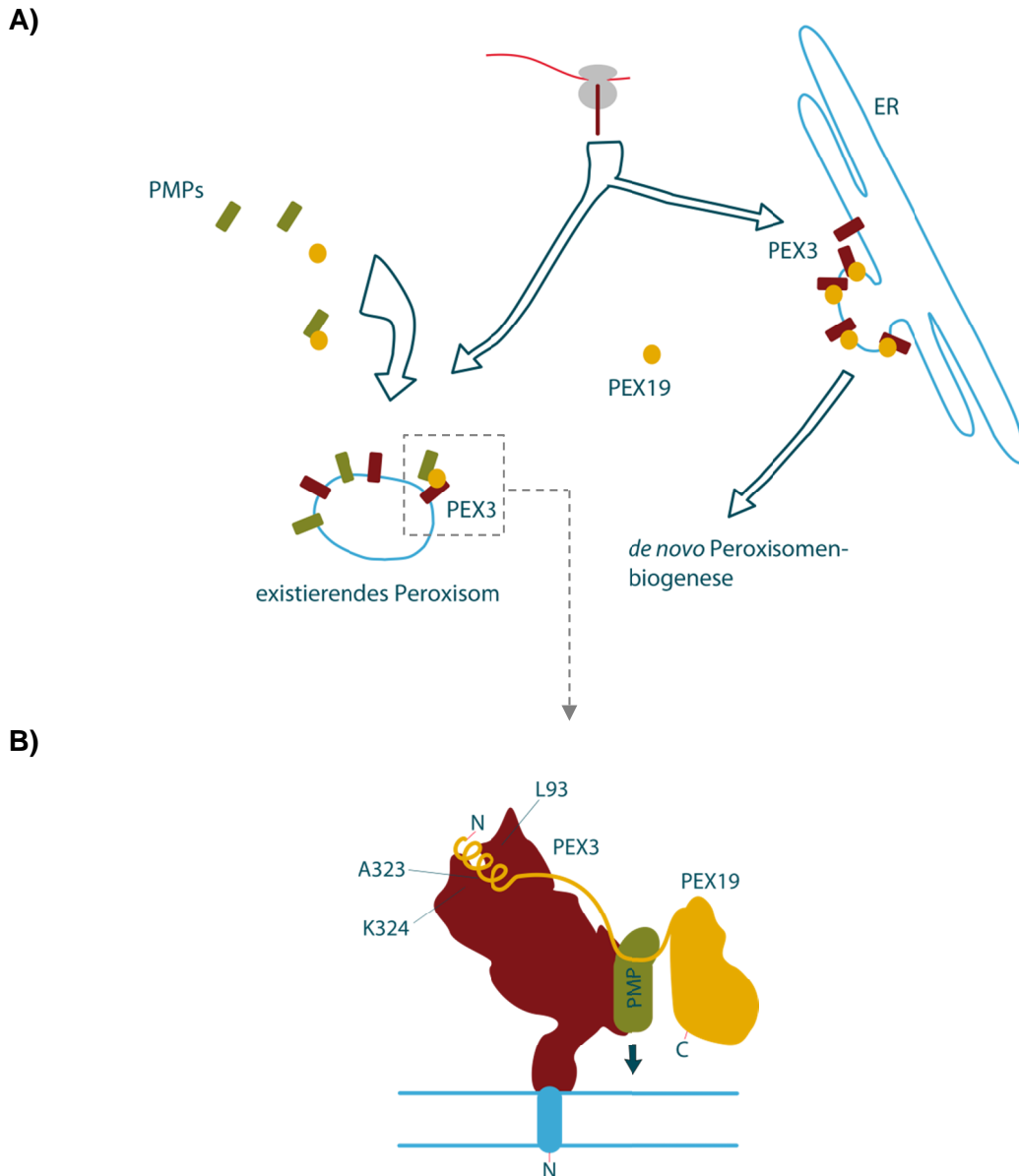


Abb. 3: Funktionen der Peroxine PEX3 und PEX19 bei der Peroxisomenbiogenese

A) Links: PEX3 und PEX19 sind für den Membranproteinimport verantwortlich. Das lösliche Protein PEX19 bindet als cytosolischer Rezeptor neu synthetisierte PMPs. Das integrale Membranprotein PEX3 agiert als Rezeptor für PEX19 in der peroxisomalen Membran. Durch Interaktion mit PEX3 gelangt der PEX19-PMP-Komplex zur Peroxisomenmembran, wo das PMP integriert wird. Rechts: PEX3 kann durch Integration in die ER-Membran die *de novo* Biogenese der Peroxisomen initiieren. Mit Hilfe von PEX19 schnürt es in präperoxisomalen Vesikeln vom ER ab. Mitte: Neu synthetisiertes PEX3 (als Komplex mit translatierendem Ribosom und mRNA dargestellt) kann indirekt über das ER oder direkt in die Peroxisomenmembran transportiert werden.

B) Modell der PEX3:PEX19-Interaktion. PEX3 ragt mit seinem kurzen N-Terminus in die peroxisomale Matrix. Der cytosolische Teil von PEX3 ist in einem Helixbündel gefaltet, auf dessen membranabgewandter Seite die Bindungstasche für PEX19 liegt. Hier sind vor allem die Aminosäuren L93, A323 und K324 für die Bindung wichtig. PEX19 bindet mit seiner N-terminalen Helix in der PEX3-Bindungstasche.

Man geht davon aus, dass PEX3 über die herkömmlichen Transportprozesse durch das Sec61-Translokon in die Membran des endoplasmatischen Retikulums gelangt (Mayerhofer *et al.*, 2016; Thoms *et al.*, 2012). Mayerhofer *et al.* (2016) untersuchten den *in vitro* Transport von humanem PEX3 in die ER-Membran und schlossen aus ihren Ergebnissen mit PEX3-Translationsintermediaten (künstlich hergestellten RNCs), dass das Volllängenprotein PEX3 über den cotranslationalen, SRP-abhängigen Transportweg zum ER transportiert wird. Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass auch ein posttranslationaler Transportweg für PEX3 ins ER existiert (Brauer, 2014; Thoms *et al.*, 2012). PEX3 übt seine Funktionen als Biogenesefaktor sowohl in der ER-Membran als auch in der Peroxisomenmembran aus. Dabei kann neu synthetisiertes PEX3 nicht nur ins ER sondern auch direkt in die Peroxisomen transportiert werden kann (Abb. 3 A, Mitte). In den meisten Arbeiten geht man davon aus, dass die PEX3-Integration in die peroxisomale Membran ohne Hilfe von PEX19 geschieht und nicht über den allgemeinen PMP-Integrationsmechanismus verläuft, also nicht von sich selbst abhängig ist (Fang *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2012). Dahingegen postulierten Matsuzaki & Fujiki (2008), dass PEX19 für den PEX3-Transport in die Peroxisomen benötigt wird. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass PEX3 im Cytosol durch die Bindung an PEX19 stabilisiert wird. Auch Schmidt *et al.* (2012) konnten diese Stabilisierung im Cytosol jedoch keine PEX19-Notwendigkeit für den PEX3-Transport in die Peroxisomen feststellen. Die Integration von PEX3 in die ER-Membran geschieht ebenfalls ohne Hilfe von PEX19 (Kim *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2012).

1.5 Regulation der Peroxisomenbiogenesewege

In welchem Ausmaß das ER an der Peroxisomenbiogenese in Wildtypzellen des Säugers beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Es gibt Ergebnisse, die zeigen, dass sich Peroxisomen hauptsächlich durch Wachstum und Teilung vermehren (Huybrechts *et al.*, 2009). Andere Studien lassen vermuten, dass das ER eine zentrale Rolle spielt und Peroxisomen überwiegend *de novo* über das ER entstehen (Kim *et al.*, 2006). In Anbetracht der Ergebnisse aus Untersuchungen von peroxisomalen Kontaktstrukturen mit anderen zellulären Membranen wird die Antwort auf die Frage der Peroxisomenbiogenese wohl weitaus komplexer ausfallen. Gerade die Anforderungen an Peroxisomen mit ihrem Fettsäurestoffwechsel und dem Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies unterliegen starken Schwankungen. Eine komplexe Peroxisomenbiogenese ermöglicht der Zelle, flexibel auf

Umweltveränderungen zu reagieren und die in vielfältigen Stoffwechselwegen wichtigen Peroxisomen in Anzahl, Größe und Proteinausstattung zu regulieren (Honsho *et al.*, 2016). Unter Beteiligung vieler zellulärer Strukturen und Proteine an der Peroxisomenbiogenese ist auch eine komplexe und vielfältige Regulation der verschiedenen Biogenesewege für die Zelle möglich.

1.6 Zielstellung der Arbeit

PEX3 ist als Membranprotein für die *de novo* Peroxisomenbiogenese über das ER essentiell, muss aber nicht zwingend über das ER zu den Peroxisomen transportiert werden. Der PEX3-Transport ins ER stellt somit einen möglichen Ansatzpunkt für die Regulation der *de novo* Biogenese dar. Vorherige Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass humanes PEX3 auch posttranslational in die ER-Membran transportiert werden kann. Außerdem gibt es Hinweise, dass es bereits im Cytosol durch PEX19 gebunden werden kann. Dies führte zu der Hypothese, dass PEX19 den Transport von PEX3 ins ER, und dadurch die *de novo* Biogenese der Peroxisomen, beeinflusst. Auf diese Weise könnte die Zelle über die PEX19-Konzentration die *de novo* Biogenese regulieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, PEX19 als möglichen Regulator der *de novo* Peroxisomenbiogenese im Säuger zu untersuchen. Die erste Frage war, ob PEX19 einen Einfluss auf die *de novo* Biogenese der Peroxisomen in humanen Zellen hat. Dazu sollte in Δ PEX3-Zellen, die erst nach genetischer Komplementation das PEX3-Protein synthetisieren und daraufhin Peroxisomen bilden können, getestet werden, ob eine hohe zelluläre PEX19-Konzentration die Entstehung der Peroxisomen beeinflusst. Im Falle einer Beeinflussung sollte in einem *in vitro* System untersucht werden, ob diese über den PEX3-Transport ins ER geschehen kann. Wenn PEX19 eine Einwirkung auf den PEX3-Transport ins ER hat, sollte geklärt werden, ob der beeinflusste Transport cotranslational oder posttranslational abläuft. Außerdem sollte untersucht werden, welche Interaktionen zwischen PEX3 und PEX19 zu einer möglichen Beeinflussung des PEX3-Transports führen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

[³⁵ S]-Methionin	Hartmann Analytik
Acrylamid-Bis (29:1)	VWR
Akzeptorpeptid Ac-NYT-NH ₂	bei GenScript synthetisiert
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
DC-Proteintest	Bio-Rad
DMEM, hoch Glucose (4,5 g/l) +L-Glutamin	Gibco
DMSO Hybri-Max (für Einfriermedium)	Sigma-Aldrich
DNA-Aufreinigungskit <i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel
DPBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Lonza
FBS (fetales Kälberserum)	Gibco
Fluoromount-G	Southern Biotech
FuGENE HD Transfektionsreagenz	Promega
Gentamicin (50 mg/ml)	Gibco
Imidazol	GERBU Biotechnik GmbH
Kaninchenretikulozytelysat, nukleasebehandelt	Promega
Mutagenesekit <i>QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Gibco
Peroxidasesubstrat <i>Western Lightning Plus ECL</i>	PerkinElmer
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific
Plasmid-Aufreinigungskit <i>NucleoSpin Plasmid</i>	Macherey-Nagel
Plasmid-Aufreinigungskit <i>PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit</i>	ThermoFisher Scientific

PMSF BioChemica	AppliChem
PNGaseF	NEB
Proteaseinhibitoren (Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin, Elastatinal, Chymostatin)	Sigma-Aldrich
Protein-Molekulargewichtsmarker <i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	ThermoFisher Scientific
Restriktionsendonukleasen	NEB und ThermoFisher Scientific (FastDigest)
RNA-Aufreinigungskit <i>NucleoSpin RNA-Clean-up</i>	Macherey-Nagel
RNasin Ribonukleaseinhibitor	Promega
T4 DNA-Ligase (<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>)	ThermoFisher Scientific
T4 Polynukleotid-Kinase	Fermentas
T7 RNA-Polymerase	Promega
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen BD Biosciences, Carl Roth, Merck, Promega, Roche, SERVA, Sigma-Aldrich oder ThermoFisher Scientific bezogen.

2.2 Medien und Puffer

1,3 M Saccharosekissen	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	50 mM	KOAc
	6 mM	Mg(OAc) ₂
	1 mM	EDTA
	1,3 M	Saccharose
	1 mM	DTT
	1x	PI-Mix
	1 µg/ml	Elastatinal

1000x Proteaseinhibitoren (PI)-Mix	1 mg/ml	Chymostatin
	1 mg/ml	Pepstatin
	10 mg/ml	Leupeptin
	10 mg/ml	Aprotinin in DMSO
2x SDS-Probenpuffer	120 mM	TRIS (pH 6,8)
	4 %	SDS
	20 %	Glycerin
	100 mM	DTT Bromphenolblau
Coomassie-Entfärbelösung	30 %	Methanol
	15 %	Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	45 %	Methanol
	15 %	Essigsäure Coomassie Brilliant R und G
DPBS ⁺	DBPS mit:	
	492 µM	MgCl ₂
	884 µM	CaCl ₂
	100 mM	HEPES (pH 7,2)
	4 %	Saccharose
Einfriermedium	DMEM mit:	
	10 %	FBS
	10 %	DMSO
LB-Agar	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
	2 %	Bacto-Agar
LB-Medium	1 %	Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	1 %	NaCl
Membranpuffer	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	1 mM	DTT
	250 mM	Sucrose

PBST	10,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	0,1 %	Tween-20 pH 7,4
Puffer A	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol pH 8 (4 °C)
Puffer B	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol pH 8 (4 °C)
Puffer C1	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol pH 8 (RT)
Puffer C2	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	100 mM	Imidazol pH 8 (RT)
Puffer H	62,5 mM	HEPES (pH 7,6)
	31,25 mM	KOAc
	6,25 mM	Mg(OAc) ₂
	1,25 mM	EDTA
	12,5 %	Glycerin
	2,5 mM	DTT
	1,25 mM	PMSF
	4 µg/ml	Chymostatin
	5 µg/ml	Pepstatin
	10 µg/ml	Leupeptin
10 µg/ml	Aprotinin	

Puffer P	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	50 mM	KOAc
	6 mM	Mg(OAc) ₂
	1 mM	EDTA
	250 mM	Saccharose
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
	1x	PI-Mix
Puffer R	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	80 mM	KOAc
	0,5 mM	Mg(OAc) ₂
	1 mM	DTT
	10 %	Glycerin
Puffer RA	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	80 mM	KOAc
	0,5 mM	Mg(OAc) ₂
	1 mM	DTT
	5,56 mM	Imidazol
	0,1 %	Tween-20
Puffer RB	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	80 mM	KOAc
	0,5 mM	Mg(OAc) ₂
	1 mM	DTT
	20 mM	Imidazol
	0,1 %	Tween-20
Puffer Z	50 mM	HEPES (pH 7,6)
	100 mM	NaCl
	1 mM	PMSF
	5 mM	β-Mercaptoethanol
	(1 %	TritonX-100)
RIPA-Puffer	50 mM	TRIS (pH 8)
	150 mM	NaCl
	1 %	NP-40
	0,5 %	Deoxycholot
	0,1 %	SDS
TBT	50 mM	TRIS (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	0,1 %	Tween-20

Tricin-Elektrophorese-Anodenpuffer	210 mM	TRIS (pH 8,9)
Tricin-Elektrophorese-Kathodenpuffer	100 mM 100 mM 0,1 %	TRIS Tricin SDS pH 8,25
TRIS-Glycin-Blotting-Puffer	25 mM 200 mM 0,1 % 20 %	TRIS Glycin SDS Methanol
TRIS-Glycin-Elektrophoresepuffer	25 mM 200 mM 0,1 %	TRIS Glycin SDS
Vollständiges Kulturmedium	DMEM mit: 10 % 50 µg/ml	FBS Gentamicin
YPD-Medium	1 % 2 % 2 %	Hefeextrakt Bactopecton Glucose

2.3 Antikörper

Kaninchen α -Sec61 α 1-Antikörper (gegen Aminosäuren 463-476) 1:1000 in PBST mit 5 % Magermilchpulver	AG Hartmann
Maus α -Aktin-Antikörper (mAbGEa) (gegen Aktin aus <i>A. thaliana</i>) 1:1500 in TBT mit 5 % Magermilchpulver	ThermoFisher Scientific
Maus α -BiP-Antikörper (40) (gegen Aminosäuren 525-628) 1:1000 in TBT mit 5 % Magermilchpulver	BD Transduction Laboratories
Maus α -GFP-Antikörper (1E4) (gegen rekombinantes GFP) 1:1000 in TBT mit 5 % Magermilchpulver	Enzo Life Sciences
Maus α -PEX19-Antikörper (32) (gegen Aminosäuren 136-254) 1:250 in TBT mit 3 % BSA	Santa Cruz Biotechnology

α -Kaninchen-Antikörper, IRDye800-gekoppelt (aus Ziege) 1:10.000 in PBST mit 5 % Magermilchpulver	Rockland Immunochemicals
α -Maus-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt (aus Kaninchen) 1:2000 in TBT mit 5 % Magermilchpulver oder 3 % BSA	Sigma-Aldrich

2.4 Plasmide und Nukleinsäuren

Plasmide für die Proteinexpression in Säugerzellen

pViro2-hygro-mcs	Ausgangsplasmid; zur Expression von zwei Proteinen unter eigenen Promotoren, mit Hygromycinresistenzgen	InvivoGen
pEGFP-N1	Vorlage für die kodierende Sequenz von EGFP	AG Kalies
pDsRed2-N1	Vorlage für die kodierende Sequenz von DsRed	AG Kalies
pEF1 α -HLA A3	Vorlage für den EF1 α -Promotor	AG Kalies
pEF	pViro mit ausgetauschtem Promotor: Abschnitt des EF1 α -Promotors (=EF-Promotor) anstelle des hFerL-Promotors (inkl. CMV-Enhancer); zweiter Promotor hFerH unverändert	diese Arbeit
pT07	pEF mit mutierter TATA-Box im EF-Promotor (=T07-Promotor)	diese Arbeit
pViro-GFP-SKL	Kodierende Sequenz für EGFP mit peroxisomalem Targetingsignal am C-Terminus (PTS1), unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit
pViro-Pex19-DsRed	Kodierende Sequenzen für humanes PEX19 unter Kontrolle des hFerL-Promotors und DsRed unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit
pViro-Pex19-GFP-SKL	Kodierende Sequenzen für PEX19 unter Kontrolle des hFerL-Promotors und GFP-SKL unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit
pT07-Pex19-GFP-SKL	Kodierende Sequenzen für PEX19 unter Kontrolle des T07-Promotors und GFP-SKL unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit

pVito-Pex19(C296S)-GFP-SKL	Kodierende Sequenzen für PEX19 mit Mutation in Farnesylierungsmotiv unter Kontrolle des hFerL-Promotors und GFP-SKL unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit
pT07-Pex3-DsRed	Kodierende Sequenzen für humanes PEX3 unter Kontrolle des T07-Promotors und DsRed unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit
pVito-19-T07-3	Kodierende Sequenzen für PEX19 unter Kontrolle des hFerL-Promotors, PEX3 unter Kontrolle des T07-Promotors und GFP-SKL unter Kontrolle des hFerH-Promotors (pVito-Pex19-GFP-SKL mit hinter dem PEX19-Polyadenylierungssignal eingefügter Expressionskassette aus T07-Promotor, 5'-UTR, PEX3-kodierender Sequenz und Polyadenylierungssignal)	diese Arbeit
pVito-T07-3	Kodierende Sequenzen für PEX3 unter Kontrolle des T07-Promotors und GFP-SKL unter Kontrolle des hFerH-Promotors; keine proteinkodierende Sequenz hinter hFerL-Promotor (pVito-19-T07-3 ohne PEX19-kodierende Sequenz)	diese Arbeit
pT07-19-3	Kodierende Sequenzen für PEX19 und PEX3 jeweils unter Kontrolle eines T07-Promotors und GFP-SKL unter Kontrolle des hFerH-Promotors	diese Arbeit

Plasmide für die heterologe Proteinexpression in *E. coli*

pProEx-HTa	Ausgangsplasmid; zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem 6xHistidin-Affinitätstag nach IPTG-Induktion, mit Ampicillinresistenzgen	Life Technologies
AnxV-pProEx-HTa	Kodierende Sequenz des humanen Annexin V	AG Kalies
HsPex19-pProEx-HTa	Kodierende Sequenz des humanen PEX19	AG Kalies

HsPex19 Δ N30-pProEx-HTa	Kodierende Sequenz von PEX19 mit N-terminaler Deletion von 30 Aminosäuren	AG Kalies
HsPex19(C296S)-pProEx-HTa	Kodierende Sequenz von PEX19 mit Mutation in Farnesylierungsmotiv	diese Arbeit
ScPex19-pProEx-HTa	Kodierende Sequenz des Pex19p aus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	diese Arbeit

Plasmide und Nukleinsäuren für die *in vitro* Transkription

bDef29-pGEM4	Ausgangsplasmid für Klonierungen im Vektor pGEM4; mit β -Globin 5'-UTR hinter T7-Promotor und Ampicillinresistenzgen (kodierende Sequenz des humanen β -Defensin 29 in Polylinker)	AG Kalies
HsPex3-pGEM4	Kodierende Sequenz des humanen PEX3	AG Kalies
NH-HsPex3-pGEM4	Kodierende Sequenz des humanen PEX3 mit N-terminalem zweifachen Glykosylierungstag (NH-Tag)	AG Kalies
NH-HsPex3 88mer/ 120mer/ 153mer/ 215mer	Kodierende Sequenzen für NH-PEX3-Verkürzungen (85 Aminosäuren +3xMethionin/ 120 AS/ 153 AS/ 215 AS); mRNA ohne Stopp-Codon	PCR-Produkte
NH-HsPex3 Δ C62	Kodierende Sequenz für ein C-terminal um 62 Aminosäuren verkürztes NH-PEX3-Protein; mRNA mit vier Stopp-Codons	PCR-Produkt
NH-HsPex3 N-Terminus	Kodierende Sequenz für den N-terminalen Teil von NH-PEX3 (Aminosäuren 1-78 +3xMethionin); mRNA mit vier Stopp-Codons	PCR-Produkt
NH-HsPex3 C-Terminus-pGEM4	Kodierende Sequenz für den cytosolischen Teil von NH-PEX3 (N-terminale Deletion von 78 Aminosäuren)	diese Arbeit
NH-HsPex3(L121N)-pGEM4	Kodierende Sequenz für NH-PEX3 mit Mutation in PEX19-Bindestelle (L121 entspricht L93 in Wildtyp-Protein)	diese Arbeit
NH-ScPex3-pGEM4	Kodierende Sequenz für Pex3p aus der Hefe <i>S. cerevisiae</i> mit N-terminalem Glykosylierungstag	(Thoms <i>et al.</i> , 2012)

ScPex22-pGEM4	Kodierende Sequenz für Pex22p aus der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	AG Kalies
NH-ScPex22-pGEM4	Kodierende Sequenz für ScPex22p mit N-terminalem Glykosylierungstag	diese Arbeit
Pex3-22-pGEM4	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre PEX3-22 aus dem N-terminalen Teil von humanem NH-PEX3 (bis 20 Aminosäuren hinter Membrananker) und dem cytosolischen Teil von ScPex22p (ab Aminosäure 21 hinter Membrananker)	diese Arbeit
Pex22-3-pGEM4	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre PEX22-3 aus dem N-terminalen Teil von NH-ScPex22p (bis 20 Aminosäuren hinter Membrananker) und dem cytosolischen Teil von humanem PEX3 (ab Aminosäure 21 hinter Membrananker)	diese Arbeit
HsPex19-pGEM4	Kodierende Sequenz des humanen PEX19	diese Arbeit
HsPex19(C296S)-pGEM4	Kodierende Sequenz des humanen PEX19 mit Mutation in Farnesylierungsmotiv	diese Arbeit
ScPex19-pGEM4	Kodierende Sequenz des Pex19p aus der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pPl-pGEM4	Kodierende Sequenz für Präprolaktin aus dem Rind	AG Kalies
pPl 86mer	Kodierende Sequenz für Präprolaktin-Verkürzung (86 Aminosäuren); mRNA ohne Stopp-Codon	PCR-Produkt
sspPI-NH-HsPex3-pGEM4	Kodierende Sequenz für die Proteinchimäre aus der Signalsequenz von Präprolaktin (Aminosäuren 1-36) und NH-PEX3	diese Arbeit
Stat-pGEM4	Kodierende Sequenz des humanen Prästatherins mit drei C-terminal angefügten Methionen	AG Kalies
ppαF-pGEM4	Kodierende Sequenz des Präpro-alpha-Faktors aus der Hefe <i>S. cerevisiae</i> mit C-terminalem 6xHistidin-Affinitätstag	AG Kalies
ppαF	Kodierende Sequenz für ppαF ohne 6xHistidin-Tag; mRNA mit 4 Stopp-Codons	PCR-Produkt

2.5 Herstellung der PCR-Produkte für die *in vitro* Transkription

NH-HsPex3 88mer/120mer/153mer/215mer

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: pGEM4 vor T7_fwd (ATGCAGCTGGCTTATCG)

HsPex3 88mer_rev (CATCATCATATGATATTGTCGTCGTGC)

120mer_rev (CAGAGCTGTGAGGCTCTC)

153mer_rev (CAGCATAACAGGTACTGTATAC)

215mer_rev (CACAGCTTGTTAATGACAG)

NH-HsPex3 Δ C62

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: pGEM4 vor T7_fwd (ATGCAGCTGGCTTATCG)

HsPex3 339-4Stopp_rev (TCATTACTATCAAGAGTTACCATGTTGC)

NH-HsPex3 N-Terminus

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: pGEM4 vor T7_fwd (ATGCAGCTGGCTTATCG)

HsPex3 81-4Stopp_rev

(TCATTACTATCACATCATCATGGCAATGTATTCTGCAGC)

pPl 86mer

PCR-Template: pPl-pGEM4

PCR-Primer: pGEM4 vor T7_fwd (ATGCAGCTGGCTTATCG)

ppL 86mer_rev (GTTGAGGGCCATGGTAATG)

pp α F

PCR-Template: pp α F-pGEM4

PCR-Primer: pGEM4 vor T7_fwd (ATGCAGCTGGCTTATCG)

aF w/oHis-4St_rev (TCATTACTATCAAGATCTGGATCCG)

2.6 Herstellung der Plasmid-DNA-Konstrukte mittels Klonierung

Für Klonierungen wurden folgende Schritte ggf. nach Herstellerangaben durchgeführt:

1. Vervielfältigung von DNA-Abschnitten in einer PCR mit der Phusion DNA-Polymerase und Aufreinigung mit dem DNA-Aufreinigungskit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*
2. Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen, Auftrennung im Agarosegel mit anschließender Aufreinigung aus dem Gel mit dem DNA-Aufreinigungskit und/oder Phosphorylierung mit der T4-Polynukleotid-Kinase
3. Ligation, gegebenenfalls mit geschnittener und aufgereinigter Plasmid-DNA, mit der T4-DNA-Ligase

Anschließend erfolgte eine Transformation in chemokompetente Bakterienzellen des *E. coli*-Stammes XL1-blue und über-Nacht-Inkubation bei 37 °C auf LB-Agarplatten unter Selektionsdruck eines Antibiotikumresistenzmarkers. Für die Plasmidpräparation aus einzelnen Transformanden wurden Einzelkolonien über Nacht in Flüssig-LB-Medium mit Antibiotikum bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Zellernte und Plasmidpräparation mit dem Aufreinigungskit *NucleoSpin Plasmid* erfolgte nach Herstellerangaben und die Elution der DNA mit Wasser. Richtige Klone wurden in einem geeigneten Restriktionsverdau ermittelt und die DNA-Sequenz durch Teilsequenzierung der Plasmid-DNA bei der Firma GATC überprüft. Für die Langzeitlagerung der Klone wurde die Flüssigkultur mit 15 % Glycerin Endkonzentration bei -80 °C eingefroren.

DNA wurde mit dem Nanodrop 2000 Spektralphotometer (Thermo Scientific) quantifiziert.

Die Mutation einzelner Basenpaare erfolgte entweder durch klassische Klonierung (s. o.) oder mit dem Mutagenesekit *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* nach Herstellerangaben.

pEF

Herstellung des Promotorfragments:

PCR-Template: pEF1 α -HLA A3

PCR-Primer: EF1 α -NcoI_fwd (ATCCATGGCTCCGGTGCCCGTCAG)
EF1 α -PvuI_rev (ATCGATCGACCTGTGTTCTGGCGGC)

Restriktionsverdau mit NcoI und PvuI

Herstellung von Vektorfragment 1 (chEF1 5'UTR bis mcs1):

PCR-Template: pVitro2-hygro-mcs

PCR-Primer: 5'UTR-PvuI_fwd (ATCGATCGTTGCCGCCAGAACACAGG)
mcs1_rev (CGGAGTTTCAAGTTGCACG)

Restriktionsverdau mit PvuI und AgeI

Herstellung von Vektorfragment 2 (mcs1 bis Hygromycinresistenzgen +EF1 pAn):

PCR-Template: pVitro2-hygro-mcs

PCR-Primer: pVitro mcs1_fwd (TTAGCGGTTCAAAGGTATC)
Hygro-NcoI_rev (GACCATGGCAGCTTTCTATGCAACCC)

Restriktionsverdau mit AgeI und NcoI

Ligation der drei Fragmente

pT07

Mutation mittels Mutagenesekit:

PCR-Template: pEF

PCR-Primer: EF-T07_fwd (GTGGGGGAGAACCGTATACCCGTGCAGTAGTCGCCGTG)
EF-T07_rev (CACGGCGACTACTGCACGGGTATACGGTTCTCCCCAC)

pVidro-GFP-SKL

Herstellung des GFP-SKL-Inserts (Einbau der SKL-kodierenden Sequenz über den Reverse-Primer):

PCR-Template: pEGFP-N1

PCR-Primer: GFP-EcoRV_fwd (GGAACGATATCACCATGGTGAGCAAGGG)

GFP-SKL-SalI_rev (GGCGTCGACTTACAGCTTGGACTTGTACAGCTCGTCC)

Restriktionsverdau des Vektors pVidro2-hygro-mcs und des Insertes mit EcoRV und SalI und Ligation

pVidro-Pex19-DsRed

Herstellung des DsRed-Inserts:

PCR-Template: pDsRed2-N1

PCR-Primer: DsRed-EcoRV_fwd (GGAACGATATCACCATGGCCTCCTC)

DsRed-SalI_rev (GGCGTCGACCTACAGGAACAGGTGGTG)

Restriktionsverdau des Vektors pVidro-Pex19-GFP-SKL (7195 bp-Fragment) und des Insertes mit EcoRV und SalI und Ligation

pVidro-Pex19-GFP-SKL

Herstellung des Pex19-Inserts:

PCR-Template: HsPex19-pGEM4

PCR-Primer: Pex19-SgrAI_fwd (AATTATCACCGGCGACCATGGCCGCC)

Pex19-BglII_rev (GGAGATCTTCACATGATCAGACACTG)

Restriktionsverdau des Vektors pVidro-GFP-SKL und des Insertes mit SgrAI und BglII und Ligation

pT07-Pex19-GFP-SKL

Herstellung von Vektorfragment 1 (PEX19- bis GFP-SKL-kodierende Sequenz):

Restriktionsverdau von pVitro-Pex19-GFP-SKL mit SgrAI und Sall (4093 bp-Fragment)

Herstellung von Vektorfragment 2 (mcs1 bis mcs2):

Restriktionsverdau von pT07 mit SgrAI und Sall (3399 bp-Fragment)

Ligation der beiden Vektorfragmente

pVitro-Pex19(C296S)-GFP-SKL

Herstellung des Pex19(C296S)-Inserts:

PCR-Template: HsPex19(C296S)-pGEM4

PCR-Primer: Pex19-SgrAI_fwd (AATTATCACCGGCGACCATGGCCGCC)

Pex19(C296S)-BglII_rev (GGAGATCTTCACATGATCAGAGACTG)

Restriktionsverdau des Vektors pVitro-GFP-SKL und des Inserts mit SgrAI und BglII und Ligation

pT07-Pex3-DsRed

Herstellung des Pex3-Inserts:

PCR-Template: HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: Pex3-SgrAI (CCGGATCACCGGCGAAGATGCTGAGGTCTGTATG)

Pex3-BglII_rev (GGAGATCTTCATTTCTCCAGTTGCTGAGG)

Restriktionsverdau des Vektors pT07 und des Inserts mit SgrAI und BglII und Ligation (=pT07-Pex3)

Restriktionsverdau der Vektoren pT07-Pex3 und pVitro-Pex19-DsRed (DsRed-Fragment, 685 bp) mit EcoRV und Sall und Ligation

pViro-19-T07-3

Herstellung Vektorfragment 1 (EM7-Promotor bis PEX19-kodierende Sequenz in mcs2):

PCR-Template: pViro-Pex19-GFP-SKL

PCR-Primer: EM7-SalI_fwd (GGCGTCGACACTGACTGTTTGACAATTAATC)
pViro mcs2_rev (CACAAATTTACAAATAAAGC)

Restriktionsverdau mit SalI und BstBI

Herstellung Vektorfragment 2 (EF1 pAn bis PEX3-kodierende Sequenz in mcs2):

PCR-Template: pT07-Pex3-DsRed

PCR-Primer: pAn-ClaI_fwd (CGCCATCGATAGCTAGATTATCCCTAATACC)
pViro mcs2_rev (CACAAATTTACAAATAAAGC)

Restriktionsverdau mit ClaI und NheI

Herstellung von Vektorfragment 3 (SV40 pAn bis GFP-SKL-kodierende Sequenz):

Restriktionsverdau von pViro-GFP-SKL mit NheI und SalI (3159 bp-Fragment)

Ligation der drei Fragmente (IRES nicht mehr enthalten)

pViro-T07-3

Herstellung Vektorfragment 1 (EM7-Promotor bis leere mcs2):

PCR-Template: pViro-GFP-SKL

PCR-Primer: EM7-SalI_fwd (GGCGTCGACACTGACTGTTTGACAATTAATC)
pViro mcs2_rev (CACAAATTTACAAATAAAGC)

Restriktionsverdau mit SalI und BstBI

Herstellung Vektorfragment 2 (EF1 pAn bis PEX3-kodierende Sequenz in mcs2):

PCR-Template: pT07-Pex3-DsRed

PCR-Primer: pAn-ClaI_fwd (CGCCATCGATAGCTAGATTATCCCTAATACC)
pViro mcs2_rev (CACAAATTTACAAATAAAGC)

Restriktionsverdau mit ClaI und NheI

Herstellung von Vektorfragment 3 (SV40 pAn bis GFP-SKL-kodierende Sequenz):
Restriktionsverdau von pVitro-GFP-SKL mit NheI und Sall (3159 bp-Fragment)

Ligation der drei Fragmente (IRES nicht mehr enthalten)

pT07-19-3

Herstellung Vektorfragment 1 (EM7-Promotor bis PEX19-kodierende Sequenz in mcs2):

PCR-Template: pT07-Pex19-GFP-SKL

PCR-Primer: EM7-Sall_fwd (GGCGTCGACACTGACTGTTTGACAATTAATC)
pVitro mcs2_rev (CACAAATTCACAAATAAAGC)

Restriktionsverdau mit Sall und BstBI

Herstellung Vektorfragment 2 (EF1 pAn bis PEX3-kodierende Sequenz in mcs2):

PCR-Template: pT07-Pex3-DsRed

PCR-Primer: pAn-ClaI_fwd (CGCCATCGATAGCTAGATTATCCCTAATACC)
pVitro mcs2_rev (CACAAATTCACAAATAAAGC)

Restriktionsverdau mit ClaI und NheI

Herstellung von Vektorfragment 3 (SV40 pAn bis GFP-SKL-kodierende Sequenz):

Restriktionsverdau von pVitro-GFP-SKL mit NheI und Sall (3159 bp-Fragment)

Ligation der drei Fragmente (IRES nicht mehr enthalten)

HsPex19(C296S)-pProEx-HTa

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis erste Base des 296. Codons von HsPex19):

PCR-Template: HsPex19-pProEx-HTa

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)
HsPex19(g1008c)_Ex_rev (ACTGTTCACTGGCACCTG)

Herstellung von Vektorfragment 2 (ab mutierter zweiter Base des 296. Codons von HsPex19 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: HsPex19-pProEx-HTa

PCR-Primer: HsPex19(g1008c)_Ex_fwd (CTCTGATCATGTGATGATGAAAGC)
PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

HsPex19 Δ N30-pProEx-HTa

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis vor HsPEX19-codierende Sequenz):

PCR-Template: HsPex19-pProEx-HTa

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)
pProEx bis TEV_rev (GGCGCCCTGAAAATAC)

Herstellung von Vektorfragment 2 (ab Codon 31 von HsPex19 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: HsPex19-pProEx-HTa

PCR-Primer: HsPex19 delta 1-30_fwd (AAAGCCAAACCCTCCC)
PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

ScPex19-pProEx-HTa

Herstellung des Pex19-Inserts:

PCR-Template: ScPex19-pGEM4

PCR-Primer: ScPex19_exp_fwd (CTGTCAGGCGCCATGAATGAAAACGAGTACG)
ScPex19_exp_rev (CGCCGAAGCTTGGCTTATTGTTGTTTGAACCG)

Restriktionsverdau des Vektors pProEx-HTa und des Inserts mit EheI und HindIII und Ligation

NH-HsPex3 C-Terminus-pGEM4 (ab Aminosäure 79)

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis Start-Codon von NH-HsPex3)

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)

pGEM4 abMet+Kozak_rev (CATGGTGGCTCGAGAGAGTCTGCCAAAG)

Herstellung von Vektorfragment 2 (NH-HsPex3 ab Codon 79 bis Ampicillinresistenzgen)

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: Pex3 ct-20_fwd (CAAGCACGACGACAATATC)

PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI (schneidet in Ampicillinresistenzgen), Phosphorylierung und Ligation

NH-HsPex3(L121N)-pGEM4

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis Codon 120 von NH-HsPex3):

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)

HsPex3(L93N)_rev (CAGAGCTGTGAGGCTCTCGGAATTC)

Herstellung von Vektorfragment 2 (NH-HsPex3 ab mutiertem Codon 121 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: HsPex3(L93N)_fwd (AACAAAAACAGGCCTTCAAACAAGC)

PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

NH-ScPex22-pGEM4

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis Codon 15 von NH-ScPex3):

PCR-Template: NH-ScPex3-pGEM4

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)
NHHs_N-Term_rev (AGAACCACCAGCAGTGGAGTTATC)

Herstellung von Vektorfragment 2 (ScPex22 ab Codon 2 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: ScPex22-pGEM4

PCR-Primer: ScPex22_fwd (CCACCACCATCAAGAAGTAG)
PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

Pex3-22-pGEM4

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis Codon 78 von NH-HsPex3):

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)
Pex3 nt+20_rev (GGCAATGTATTCTGCAGCCTCCC)

Herstellung von Vektorfragment 2 (NH-ScPex22 ab Codon 67 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: NH-ScPex22-pGEM4

PCR-Primer: Pex22 ct-20_fwd (AAAGAGAACAAAAAGGCAAGGAAGAGC)
PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

Pex22-3-pGEM4

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis Codon 66 von NH-ScPex22):

PCR-Template: NH-ScPex22-pGEM4

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)
Pex22 nt+20_rev (TACTGAATCACCTCTGGAGG)

Herstellung von Vektorfragment 2 (NH-HsPex3 ab Codon 79 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: Pex3 ct-20_fwd (CAAGCACGACGACAATATC)

PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

HsPex19-pGEM4

Herstellung des Pex19-Inserts:

PCR-Template: HsPex19-pProEx-HTa

PCR-Primer: HsPex19-pGEM4_fwd

(TATCTCGAGCCACCATGGCCGCGCTGAGGAAGGCTG)

HsPex19-pGEM4_rev (CCGCCGCGGTACCAGCTTTCATCATCACATGATCAG)

Restriktionsverdau des Vektors bDef29-pGEM4 (2907 bp-Fragment) und des Inserts mit XhoI und KpnI und Ligation

HsPex19(C296S)-pGEM4

Herstellung des Pex19(C296S)-Inserts:

PCR-Template: HsPex19(C296S)-pProEx-HTa

PCR-Primer: HsPex19-pGEM4_fwd

(TATCTCGAGCCACCATGGCCGCGCTGAGGAAGGCTG)

HsPex19-pGEM4_rev (CCGCCGCGGTACCAGCTTTCATCATCACATGATCAG)

Restriktionsverdau des Vektors bDef29-pGEM4 (2907 bp-Fragment) und des Inserts mit XhoI und KpnI und Ligation

ScPex19-pGEM4

Herstellung des Pex19-Inserts:

PCR-Template: genomische Hefe-DNA (aus *S. cerevisiae*-Stamm YTX 69, AG Kalies)

PCR-Primer: PCR_Pex19_fwd (GACCTCGAGCCACCATGAATGAAAACGAGTACG)

PCR_Pex19_rev (CTGCCGCTGGTACCTTATTGTTGTTTGCAACCG)

Restriktionsverdau des Vektors bDef29-pGEM4 (2907 bp-Fragment) und des Inserts mit XhoI und KpnI und Ligation

sspPl-NH-HsPex3-pGEM4

Herstellung von Vektorfragment 1 (Ampicillinresistenzgen bis Codon 36 von pPl):

PCR-Template: pPl-pGEM4

PCR-Primer: PvuI_fwd (GTGCTGCCATAACCATGAGTG)

pPl_ss_+6AS_rev (ATTGGGACAGACGGGGGTGGAG)

Herstellung von Vektorfragment 2 (NH-HsPex3 ab Codon 2 bis Ampicillinresistenzgen):

PCR-Template: NH-HsPex3-pGEM4

PCR-Primer: NHHs-C-TmG_fwd (CAAGATTTGCCAGGTAACG)

PvuI_rev (TCGGTCCTCCGATCGTTGTC)

Restriktionsverdau der beiden Vektorfragmente mit PvuI, Phosphorylierung und Ligation

2.7 Kultivierung von Säugorzellen

Die verwendeten Zelllinien Wildtyp (GM05756T) und Δ PEX3 (Δ PEX3T) (Schmidt *et al.*, 2012) stammen von humanen Hautfibroblasten ab und wurden freundlicherweise von Gabriele Dodt (Tübingen) zur Verfügung gestellt. Es wurden die Δ PEX3-Zellen von Patient 1 in der Originalpublikation (Muntau *et al.*, 2000) mit freundlicher Genehmigung von Ania Muntau (Hamburg) eingesetzt.

2.7.1 Erhaltung

Die Fibroblasten wurden für die Erhaltung in Zellkulturflaschen (T25 oder T75, Standard; Sarstedt) in vollständigem Kulturmedium (DMEM, supplementiert mit 10 % FBS und 50 µg/ml Gentamicin) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mittels Trypsin-EDTA-Behandlung bei 37 °C von ihrer Wachstumsunterlage abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in vollständigem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Die Zellen wurden bei der Firma GATC negativ auf Mycoplasmen getestet.

2.7.2 Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen nach Trypsinierung und Mediumzugabe bei 800 rpm für 6 min (Heraeus Christ Minifuge2) sedimentiert und in Einfriermedium (DMEM mit 10 % FBS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in einem Isopropanol-Einfrierkontainer auf -80 °C gebracht und anschließend für die Lagerung von wenigen Monaten bei -80 °C oder für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.7.3 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer.

2.7.4 Transfektion

Für die Untersuchung der Zellen nach transienter Transfektion mit Plasmid-DNA wurden die Zellen in einer Dichte von 3400 bis 7900 Zellen/cm² Wachstumsoberfläche ausgesät und zum Anwachsen für einen Tag kultiviert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit FuGENE nach Herstellerangaben mit Plasmid-DNA, die mit dem Aufreinigungskit *PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit* nach Herstellerangaben präpariert wurde und in Wasser vorlag, transfiziert. Für ein *Well* einer Zellkulturplatte (6 *Well*, Cell+; Sarstedt) wurden für die Transfektion 2 ml Kulturmedium und ein 40 µl-Transfektionsansatz aus OptiMEM, 750 ng Plasmid-DNA und 2,25 µl FuGENE verwendet. Der Transfektionsansatz wurde für 12 min bei RT inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Bei Transfektion der Zellen in einem größeren Zellkulturgefäß (T25- oder T75-Zellkulturflasche) wurden die Volumina für

Medium und Transfektionsansatz auf die Wachstumsoberfläche hochgerechnet. Nach einem Tag wurden die Zellen zur Herstellung eines Gesamtzellextrakts geerntet bzw. für die weitere Inkubation mit frischem Kulturmedium versetzt.

2.8 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung eines Gesamtzellextrakts wurden transfizierte Zellen oder Zellen aus der Erhaltung gewaschen, trypsinisiert und nach Abnahme eines Aliquots zur Zellzahlbestimmung sedimentiert. Nach Waschen mit DPBS wurde auf Eis bzw. bei 4 °C weiter gearbeitet. Das Zellpellet wurde in RIPA-Puffer mit 1x PI-Mix resuspendiert (ca. 6 µl/10⁵ Zellen; mindestens 40 µl) und zur Lyse 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 14.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) geklärt und der Überstand bei -20 °C oder für die längere Lagerung bei -80 °C gelagert. Die Konzentration des Gesamtproteins im Gesamtzellextrakt wurde mit einem detergenzkompatiblen Proteintest (DC-Proteintest) nach dem Lowry-Prinzip mit BSA als Standard nach Herstellerangaben bestimmt. Es wurden 1 bis 100 µg des Gesamtproteins im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Western Blot analysiert.

2.9 Mikroskopische Untersuchungen

2.9.1 Herstellung der Mikroskopiepräparate

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen auf Deckgläschen (22 mm x 22 mm Borosilikatglas; Roth) angezogen und wie beschrieben transfiziert. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 37 °C-warmen 4 % PFA in DPBS⁺ für 12 min bei RT fixiert, dreimal mit DPBS⁺ gewaschen und mit Fluoromount auf einem Objektträger eingedeckt.

2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Peroxisomen wurden mit exogen exprimiertem GFP-SKL markiert.

Für die Analyse der Komplementationsrate wurden die Präparate an einem Lichtmikroskop (Axiovert 200M; Zeiss) mit einem 20er Objektiv mittels Epifluoreszenz mit Filtersets für GFP

und DsRed, und mittels Lichtmikroskopie mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) mikroskopiert. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Farbkamera (DP72; Olympus).

Für die Analyse der Peroxisomenzahl wurden die Präparate an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM710; Zeiss) mikroskopiert. Mit einem 40er Öl-Objektiv wurde ein z-Stapel der GFP-Fluoreszenz einer Zelle mit 0,6 µm Schichtabstand und einer GFP-Anregung bei 488 nm aufgenommen.

2.9.3 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Für die Bestimmung der Komplementationsrate wurden in Fiji (ImageJ) (Schindelin *et al.*, 2012) die gesamten Zellen (in den DIC-Aufnahmen) und die Zellen mit cytosolischer und peroxisomaler GFP-Fluoreszenz ausgezählt. Konfluente Bereiche wurden mit mehr als 40 Zellen pro Aufnahme definiert und nicht in die Auswertung mit einbezogen. Zellen mit zehn und mehr GFP-Fluoreszenzpunkten wurden als Zellen mit Peroxisomen gewertet.

Die Peroxisomenzahl einer Zelle wurde mit der Software Fiji (ImageJ) ermittelt, indem die Maxima der GFP-Fluoreszenzintensität in den einzelnen Schichten bestimmt, in z-Ebene projiziert und anschließend die Gesamtmaxima ausgezählt wurden.

2.10 Herstellung rekombinanter Proteine

Die rekombinanten Proteine mit angefügtem 6xHistidin-Affinitätstag (Varianten des humanen rPEX19, Hefe-rPex19p und rAnxV) wurden aus dem Expressionsvektor pProEx-HTa im *E. coli*-Stamm SoluBL21 exprimiert. Die Bakterien wurden in 60-200 ml Flüssig-LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 angezogen. Die Proteinexpression wurde mit 0,6 mM IPTG für 3 h induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet (20 min bei 5500 rpm, Rotor S4180, Zentrifuge Allegra 21 R oder 15 min bei 5500 rpm, Rotor JA-14, Zentrifuge Avanti J-20 XPI; Beckman Coulter) und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet auf Eis in 4-5 ml Puffer Z (für rScPex19p und rAnxV mit 1 % TritonX-100) resuspendiert und per Ultraschall (Sonotrode MS72, Ultraschall-Homogenisator Sonoplus; Bandelin) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (10 min bei 20.000 rpm, 4 °C, Rotor MLA-80, Ultrazentrifuge Optima MAX-XP; Beckman Coulter) wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen Puffer A versetzt und bei 4 °C auf eine mit Puffer A+B (15 mM Imidazol) äquilibrierte Ni-NTA-Säule geladen, zweimal mit Puffer B

gewaschen und das rekombinante Protein mit Puffer C1 (Varianten des humanen rPEX19 und rAnxV) bzw. Puffer C2 (rScPex19p) bei RT eluiert. Die Eluate mit rScPex19p und rAnxV wurden drei- bis viermal mit je ca. 25-fachem Volumen Puffer R in einer Zentrifugeneinheit (Amicon Ultra-4; Merck Millipore) umgepuffert. Die Eluate mit den Varianten von rPEX19 wurden dreimal mit je 100-fachem Volumen Puffer R über Dialyse umgepuffert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel mit BSA-Standard. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80 °C.

2.11 Präparation von rauen Mikrosomen

2.11.1 Präparation von rauen Mikrosomen aus dem Hund

Raue Mikrosomen wurden nach Walter & Blobel (1983) aus dem Hundepankreas präpariert. Das Organ wurde nach Entnahme in 4 °C-kaltem Puffer P auf Eis transportiert und gespült und bei 4 °C weiter verarbeitet. Nach Säuberung und Zerkleinerung wurde das Gewebe mit drei Volumen Puffer P mit 1 µg/ml Elastatinal in einem Potter maschinenbetrieben homogenisiert und zur Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen, Zellkernen und anderer Membranen als raues ER für 10 min zunächst bei 3000 rpm und der Überstand anschließend nochmal bei 8100 rpm (Rotor JA-14, Avanti J-20 XPI; Beckman Coulter) und 4 °C zentrifugiert. Die Fraktion des rauen ERs im Überstand wurde durch Zentrifugation für 3,5 h bei 45.000 rpm (Rotor Type 45 Ti, Optima L-90K; Beckman Coulter) und 4 °C durch ein 1,3 M Saccharosekissen gewonnen. Das Membranpellet wurde in Membranpuffer mit 10 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Chymostatin resuspendiert und homogenisiert. Die Mikrosomensuspension wurde photometrisch quantifiziert (eine OD₂₈₀ von 50 entspricht 1 eq/µl) und bei -80 °C gelagert.

2.11.2 Präparation von rauen Mikrosomen aus der Hefe

Der *S. cerevisiae*-Stamm BY4741 (Euroscarf) wurde in 200 ml YPD-Medium bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 7,2 angezogen. Die Zellen wurden für 5 min bei 3000 rpm, 4 °C (S4180, Allegra 21 R; Beckman Coulter) geerntet und wiederholt mit 4 °C-kaltem, destilliertem Wasser resuspendiert und sedimentiert (5 min, 3000 rpm, 4 °C, S4180, Allegra 21 R; Beckman Coulter). Das Zellpellet wurde anschließend in 4 °C-kaltem Puffer H resuspendieren, mit Glasperlen durch Vortexen homogenisiert und für 10 min bei 1600 rpm

und 4 °C (S4180, Allegra 21 R; Beckman Coulter) zentrifugiert. Die rauen Mikrosomen im Überstand wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 14.000 rpm, 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) gewonnen. Das Membranpellet wurde in Membranpuffer (mit 10 % Glycerin statt Saccharose) resuspendiert und homogenisiert. Die Mikrosomensuspension wurde photometrisch quantifiziert und bei -80 °C gelagert.

2.12 *in vitro* Transkription

Für die zellfreie Proteinsynthese im Retikulozytenlysat wurde mRNA mit der T7-RNA-Polymerase *in vitro* synthetisiert. Hierzu wurde pGEM4-Plasmid-DNA hinter der entsprechenden proteincodierenden Sequenz durch Restriktionsendonuklease-Verdau geschnitten oder der entsprechende DNA-Abschnitt durch PCR vervielfältigt und mit dem DNA-Aufreinigungskit aufgereinigt.

Der 50 µl-Reaktionsansatz aus

1 µg DNA

nukleasefreiem Wasser

1x Transkriptionspuffer

0,5 mM rNTPs

10 mM DTT

0,2 mg/ml BSA

100 U RNasin

20 U T7-RNA-Polymerase

wurde zunächst für 1,5 h bei 37 °C und nach Zugabe von 20 U Polymerase und 0,5 µl 25 mM rNTPs (12,5 nmol) weitere 3,5 h inkubiert. Die mRNA wurde im Anschluss mit dem Aufreinigungskit *NucleoSpin RNA Clean-up* nach Herstellerangaben gereinigt und bei -80 °C gelagert.

2.13 *in vitro* Translation

Die *in vitro* synthetisierte mRNA wurde *in vitro* im Kaninchenretikulozytenlysat translatiert, um radioaktiv markierte Proteine herzustellen. Das Lysat wurde vor Verwendung durch Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, 4 °C, Eppendorf-Zentrifuge 5417R) von endogenen Membranen geklärt. Die Translation erfolgte für 45 min bei 25 °C im 10 µl-Translationsansatz aus

6 µl Kaninchenretikulozytenlysat

0,5-1 µl mRNA

0-0,2 µl RNasin (40 U/µl)

0,2 µl Aminosäuremix ohne Methionin

0,3-0,7 µl [³⁵S]-Methionin (0,37 MBq/µl)

1 µl Membranpuffer

0,9-2 µl Puffer R

Von den Translationsansätzen wurden 5 % (0,5 µl) auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

2.14 *in vitro* Proteintransport

2.14.1 *in vitro* Translokation im Translations- und Transportansatz

Um den Transport eines Proteins zu untersuchen, geschah die *in vitro* Translation der entsprechenden mRNA in Anwesenheit von 0,3-0,6 eq rauen Mikrosomen aus dem Hundepankreas (in Membranpuffer.)

2.14.2 *in vitro* Translokation von Translationsintermediaten

Das translatierende Ribosom liegt im Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (*ribosome-nascent chain complex*, RNC) vor. Dieser Komplex besteht aus einer naszierenden Peptidkette eines nicht fertig synthetisierten Proteins (dem Translationsintermediat), die als Peptidyl-tRNA über die mRNA mit dem Ribosom assoziiert ist. Beim cotranslationalen Transport gelangt das Translationsintermediat gebunden im RNC zur ER-Membran, wo das Ribosom mit dem Translokator interagiert und anschließend die Translation der mRNA und

Translokation der entstehenden Polypeptidkette gekoppelt ablaufen. Das Targeting des RNC zum ER und die Translokation der Polypeptidkette in die ER-Membran kann mit definierten Peptidlängen untersucht werden, indem verkürzte mRNA ohne Stopp-Codon translatiert wird. Die mRNA wird bis zum Ende gelesen, durch das fehlende Stopp-Codon bleibt jedoch die letzte tRNA mit der Polypeptidkette am letzten Codon an der A-Stelle des Ribosoms gebunden und der intakte RNC erhalten.

Zur Herstellung verkürzter mRNA wurden in die *in vitro* Transkription DNA-Fragmente eingesetzt, die über PCR hergestellt wurden und nach der gewünschten codierenden Sequenz endeten. Die RNCs wurden durch 20 min Translation dieser mRNA bei 25 °C (ohne Zugabe von Membranpuffer) hergestellt. Anschließend wurden 0,6 eq raue Mikrosomen aus dem Hund zum Ansatz hinzugefügt und durch Inkubation für 10 min auf Eis und 10 min bei 25 °C der Transport ermöglicht.

2.14.3 *in vitro* Translokation unter posttranslationalen Bedingungen

Die Translokation eines Proteins unter posttranslationalen Bedingungen wurde nach Thoms *et al.* (2012) durchgeführt. Dafür wurden die Proteine zunächst wie beschrieben (ohne Zugabe von Membranpuffer oder Mikrosomen) *in vitro* synthetisiert. Nach Inhibition der Translation mit 1 mM Cycloheximid (in DMSO) für 10 min auf Eis wurden die Ribosomen bei 70.000 rpm für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert (Rotor TLA-100, Ultrazentrifuge Optima MAX-XP; Beckman Coulter). Der Überstand wurde mit rauen Mikrosomen aus dem Hund (0,9-1,8 eq) oder aus der Hefe (0,45 eq) im 10 µl-Ansatz für 20 min auf Eis und 20 min bei 25 °C inkubiert.

2.15 Nachweis des Proteintransports ins ER

Die Translokation eines Proteins kann auf unterschiedliche Arten untersucht werden. Bei integralen Membranproteinen kann sie durch die alkaliresistente Membranintegration nachgewiesen werden. Manche Proteine werden bei der Translokation modifiziert, was sich durch ein verändertes Molekulargewicht bemerkbar macht. Viele transportierte Proteine tragen ein Signalpeptid, das bei der Translokation durch den Signalpeptidasekomplex vom Präprotein abgespalten wird (Prozessierung), wodurch eine im Gel schneller laufende Proteinspezies entsteht. Glykoproteine werden durch Glykosylierung modifiziert.

2.15.1 Überprüfung der ER-spezifischen Glykosylierung

Proteine mit N-Glykosylierungsstelle können im endoplasmatischen Retikulum modifiziert werden, indem der Oligosaccharyltransferasekomplex Glykosylgruppen an ein Asparagin (N) anhängt. Dabei entsteht eine höhermolekulare Proteinspezies, die im Gel langsamer läuft. Um diese ER-spezifische Modifikation nachzuweisen, wurde die Translokation in Anwesenheit eines Akzeptorpeptids durchgeführt oder der Transportansatz nach Translokation mit PNGaseF behandelt.

Das Akzeptorpeptid besteht aus den drei Aminosäuren des Glykosylierungsmotivs NYT (Asparagin-Tyrosin-Threonin) und verhindert kompetitiv die N-Glykosylierung anderer Proteine. Es wurde in einer Konzentration von 100-200 μM verwendet.

PNGaseF ist eine Endoglykosidase, die die N-Glykosylgruppen eines Proteins abspaltet. Für den enzymatischen Verdau wurde der Translokationsansatz mit zwei Volumen destilliertem Wasser und einem Volumen Denaturierungspuffer für 5 min bei 80 °C denaturiert und nach Herstellerangaben mit PNGaseF verdaut. Für die Negativkontrolle wurde das Enzym durch destilliertes Wasser ersetzt.

2.15.2 Natriumkarbonatextraktion von Membranen

Integrale Membranproteine sind nach dem Proteintransport mit ihren membranspannenden Segmenten in den rauen Mikrosomen verankert, was in einer alkalischen Extraktion nachgewiesen werden kann. Dabei werden periphere Membranproteine abgewaschen und die rauen Mikrosomen aufgeschlossen, die dann als Blätter vorliegen und somit ihren luminalen Inhalt freigeben (Fujiki *et al.*, 1982).

Es wurde die alkalische Extraktion nach Thoms *et al.* (2012), geringfügig verändert, durchgeführt. Nach *in vitro* Translokation wurde der Ansatz mit doppeltem Volumen Membranpuffer verdünnt (Ausgang) und zur Sedimentation der rauen Mikrosomen bei 70.000 rpm für 8 min bei 4 °C zentrifugiert (Rotor TLA-100.3, Ultrazentrifuge Optima MAX-XP; Beckman Coulter). Der Überstand wurde abgenommen und die Mikrosomen wurden in einer ersten Extraktion in 100 mM Natriumkarbonat (pH 11,5) resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die extrahierten Mikrosomen durch ein Kissen aus 200 mM Saccharose in 100 mM Natriumkarbonat (pH 11,5) bei 80.000 rpm für 23 min bei 4 °C sedimentiert (Rotor TLA-100, Ultrazentrifuge Optima MAX-XP). Dies wurde in einer

zweiten Extraktion wiederholt, wonach das Membranpellet in SDS-Probenpuffer bei 60 °C gelöst wurde. Es wurden 10 % jeder Fraktion auf einem SDS-Gel analysiert. In einem nicht-radioaktiven Versuch wurde die Freisetzung des luminalen ER-Proteins BiP in den ersten alkalischen Überstand und die Sedimentation des integralen ER-Membranproteins Sec61 α in das Pellet im Western Blot überprüft.

2.16 TCA-Fällung

Die Proteine in den Überständen aus der ersten und zweiten Natriumkarbonatextraktion wurden mit 15 % TCA für 30 min auf Eis gefällt und bei 13.200 rpm (Eppendorfzentrifuge 5414R) bei 4 °C für 60 min sedimentiert. Das Proteinpellet wurde mit -20 °C-kaltem 80 % Aceton gewaschen, nach erneuter 30-minütiger Sedimentation bei RT getrocknet und in SDS-Probenpuffer bei 60 °C gelöst.

2.17 RNase-Behandlung

Ansätze mit Translationsintermediaten und Translations- und Transportansätze (wenn angegeben) wurden nach der Translokation zum Abbau von Acyl-tRNA für 10 min bei 37 °C mit 0,5 mg/ml RNaseA behandelt.

2.18 Untersuchung des PEX19-Einflusses auf die Proteintranslokation

Der Einfluss von PEX19 auf den Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum wurde untersucht, indem der Translokationsansatz 20 nM bis 20 μ M rekombinant hergestelltes rPEX19 enthielt. Als Kontrollprotein wurde ein ebenfalls rekombinant hergestelltes, auf gleiche Weise aufgereinigtes Protein, rAnxV verwendet.

2.19 *in vitro* Untersuchung von Proteinbindungen

Für die Untersuchung der Bindung zwischen *in vitro* synthetisierten Proteinen und rPEX19 erfolgte die *in vitro* Translation in Anwesenheit von 20 μ M rekombinantem Protein. Der Translationsansatz wurde 1:10 mit Puffer RA verdünnt (Ausgang) und somit auf 5 mM Imidazol und 0,1 % Tween-20 gebracht. 100 μ l dieses Ausgangs wurden mit 10 μ l Ni-NTA-Agarose, die vor Verwendung mit Puffer RA äquilibriert wurden, in einem Gesamtvolumen von 115 μ l für 30 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 100 μ l Puffer RB (20 mM Imidazol und 0,1 % Tween-20 enthaltend) wurde mit SDS-Probenpuffer bei 60 °C eluiert. Es wurden jeweils 5 % des Ausgangs und des Eluats auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

2.20 Proteinauftrennung im SDS-Polyacrylamidgel

Für die Auftrennung von Proteinen im (diskontinuierlichen) SDS-Polyacrylamidgel wurden Proteinproben nach Laemmli (1970) in SDS-Probenpuffer denaturiert. Für die Analyse aller Proteine außer Statherin wurden die Proteinproben im TRIS-Glycin-System mit geeigneten Trenngelen (8 %, 10 %, 12,5 %, 8-15 % oder 10-20 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Für radioaktive PEX3-Proben wurden gegebenenfalls NuPAGE-Fertiggele (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Midi Gel; invitrogen) mit MES-Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Radioaktive Statherin-Proben wurden nach Schagger & von Jagow (1987) im Tricin-System mit 13 % Polyacrylamid-Trenngel analysiert.

SDS-Gele wurden für einen nachfolgenden Western Blot verwendet oder mit 15 % Essigsäure fixiert. Fixierte Gele wurden für ein Autoradiogramm gewaschen und getrocknet oder für eine Proteinfärbung mit Entfärbelösung äquilibriert und mit Coomassie gefärbt. Getrocknete, radioaktive Gele wurden für ein oder mehrere Tage auf einen *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare Life Sciences) aufgelegt, die mit einem Phosphorimager (FLA-3000; Fujifilm oder Typhoon FLA 7000; GE Healthcare Life Sciences) ausgelesen wurden. Mit Coomassie gefärbte Gele wurden nach Entfärben und Waschen an einem Odyssey-Gerät (Odyssey Infrared Imaging System; Licor) ausgelesen.

2.21 Immunochemische Proteindetektion im Western Blot

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einem Panther *Semi-Dry Electroblotter* (Owl Scientific) mit Blotting-Puffer bei 14 V für 54 min aus dem Gel auf eine Blotting-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran in TBT mit 3 % BSA oder 5 % Magermilchpulver für eine Stunde bei RT geblockt und bei 4 °C über Nacht mit spezifischen Primäantikörpern in Blocking-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBT erfolgte für 1 h bei RT die Inkubation mit spezifischen, POD- oder IR800-gekoppelten Sekundäantikörpern in Blocking-Lösung. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBT wurde das Antikörpersignal mit Peroxidasesubstrat über die Peroxidasereaktion (Kamera LAS-1000; Fujifilm) oder über die IR800-Fluoreszenz (Odyssey Infrared Imaging System; Licor) detektiert.

Für die immunochemische Detektion von Sec61 α und BiP wurde eine PVDF-Membran (Roti-Fluoro PVDF 0,2 μ M; Carl Roth) verwendet. Es wurden Nitrozellulosemembranen für die Detektion von GFP (NC Protran 0,2 μ m; Amersham) und PEX19 (NC Protran BA85, 0,45 μ m; Whatman) verwendet.

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

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der *de novo* Peroxisomenbiogenese in humanen Fibroblasten

PEX3 und PEX19 sind essentiell für die Peroxisomenbiogenese. Durch Eintritt in das ER initiiert PEX3 die *de novo* Biogenese der Peroxisomen, was einen möglichen Regulationspunkt der *de novo* Biogenese darstellt. In dieser Arbeit wurde PEX19 als möglicher Regulator der Peroxisomenbiogenese untersucht. Die erste Frage war, ob eine hohe PEX19-Konzentration in der Zelle die *de novo* Biogenese der Peroxisomen beeinflusst. Dies wurde in Zellkultur mit humanen, peroxisomendefizienten Fibroblasten, denen ein funktionelles PEX3 fehlt, untersucht. Nach genetischer Komplementation mit Pex3-cDNA können diese Δ PEX3-Zellen Peroxisomen bilden. Durch exogene PEX19-Expression wurde das Proteinlevel von PEX19 in den Zellen während der Komplementation erhöht. Ein möglicher Effekt von PEX19 auf die *de novo* Peroxisomenbiogenese wurde über die Komplementationsrate analysiert.

3.1.1 PEX19 hemmt die *de novo* Biogenese der Peroxisomen

Für die exogene Proteinexpression wurden die humanen Zellen mit dem Vektor pVito transient transfiziert. Dieser beinhaltet zwei Polylinker mit je einem, im Säuger aktiven Promotor. So können mit pVito zwei zu untersuchende Proteine mit unterschiedlichen Promotoren von einem Plasmid coexprimiert werden. Es wurden Konstrukte hergestellt, mit denen PEX19 in den transfizierten Zellen zusammen mit einem Fluoreszenzprotein als Transfektionsmarker exprimiert wurde. Dafür wurde GFP-SKL, das gleichzeitig als Peroxisomenmarker diente, verwendet. GFP-SKL ist ein modifiziertes grün fluoreszierendes Protein (GFP), das C-terminal ein peroxisomales Targetingsignal (PTS1) mit der Aminosäuresequenz SKL trägt. Durch das PTS1 wird GFP-SKL in matrixproteinimport-kompetente Peroxisomen transportiert.

Durch Verwendung verschiedener Promotoren wurde PEX19 unterschiedlich stark exogen exprimiert. Für eine hohe exogene PEX19-Expression wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das die Pex19-cDNA unter Kontrolle des hFerL-Promotors trägt (pVito-Pex19-GFP-SKL). Für eine niedrige exogene PEX19-Expression wurde der ursprüngliche hFerL-

Promotor des Vektors pVitro inklusive CMV-Enhancer durch den schwächeren T07-Promotor ausgetauscht (pT07-Pex19-GFP-SKL). Der T07-Promotor besteht aus einem Abschnitt des Promotors des Elongationsfaktors 1 α mit Mutationen in der TATA-Box (Ferreira *et al.*, 2011). Um als Kontrolle Zellen zu erhalten, die PEX19 auf endogenem Level exprimierten, wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das keine proteincodierende Sequenz hinter dem hFerL-Promotor trägt (pVitro-GFP-SKL). Für die Analyse der PEX19-Expression unter den verschiedenen Promotoren wurden die Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE mit den unterschiedlichen Pex19-Plasmiden transfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, indem die Zellen sedimentiert, einmal mit DPBS gewaschen und mit RIPA-Puffer lysiert wurden. Das Lysat wurde durch Zentrifugation geklärt und die Gesamtproteinkonzentration in einem detergentenkompatiblen Proteintest (DC-Proteintest) nach dem Lowry-Prinzip mit Hilfe eines BSA-Standards bestimmt. Es wurden unterschiedliche Mengen Gesamtprotein der Extrakte von transfizierten und nichttransfizierten Zellen auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die immunochemische Detektion im Western Blot erfolgte mit einem α -PEX19-Antikörper.

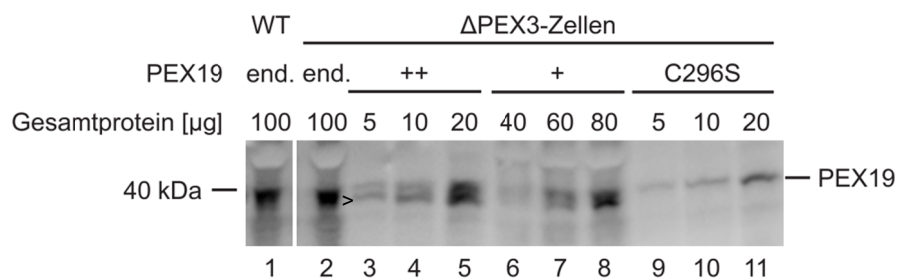


Abb. 4: Endogene und exogene PEX19-Expression in Δ PEX3-Zellen

Δ PEX3-Zellen wurden für eine hohe (++) und eine niedrige (+) exogene PEX19-Expression sowie für die exogene Expression eines mutierten PEX19-Proteins (C296S), das nicht farnesyliert werden kann, transfiziert. Ein Tag nach Transfektion wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Zellextrakte der transfizierten Zellen sowie Zellextrakte nichttransfizierter Δ PEX3- und Wildtypzellen (WT) wurden im Western Blot mit einem α -PEX19-Antikörper und einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper analysiert. Die semi-quantitative Auswertung der Signale ergab, dass die hohe exogene PEX19-Expression zu einer etwa 10-fachen Erhöhung des endogenen Levels führte. Die niedrige exogene PEX19-Expression führte zum etwa 1,5-fachen des endogenen PEX19-Levels. Es ist das repräsentative Ergebnis eines Experiments von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. WT: Wildtypzellen; end.: endogene PEX19-Expression; ++: hohe exogene PEX19-Expression; +: niedrige exogene PEX19-Expression; C296S: Expression des mutierten Proteins PEX19(C296S); >: farnesylierte Form von PEX19.

Das endogene PEX19-Level war in Wildtyp- und Δ PEX3-Zellen etwa gleich hoch (Abb. 4, Spur 1 und 2). Die exogene PEX19-Expression unter Kontrolle des hFerL-Promotors (Spur 3 bis 5) und des T07-Promotors (Spur 6 bis 8) führten in den Zellen zu einer etwa 10-fachen bzw. zu einer etwa 1,5-fachen Erhöhung des endogenen Levels. Mit dem α -PEX19-Antikörper traten zwei markante Banden im Western Blot auf. Diese stammen von der nichtmodifizierten Form sowie von der im Gel tiefer laufenden, farnesylierten Form des PEX19 (Abb. 4, >). Für die Überprüfung der PEX19-Doppelbande wurde PEX19(C296S) in den Zellen exogen exprimiert. Dieses PEX19-Protein kann aufgrund einer Mutation im Farnesylierungsmotiv nicht farnesyliert werden. Der Gesamtzellextrakt der PEX19(C296S) exprimierenden Zellen zeigte im Western Blot nur eine Bande, die von der unmodifizierten Form von PEX19 stammt und auf Höhe der oberen PEX19-Bande läuft (Spur 9 bis 11).

Um den Einfluss der PEX19-Konzentration auf die *de novo* Peroxisomenbiogenese zu untersuchen, wurden Δ PEX3-Zellen mit einem Pex19-Plasmid und einem Pex3-Plasmid cotransfiziert. Das für die genetische Komplementation cotransfizierte Pex3-Plasmid trägt die PEX3-codierende Sequenz unter Kontrolle des schwachen T07-Promotors und die Sequenz des Fluoreszenzproteins DsRed als zweiten Transfektionsmarker (pT07-Pex3-DsRed). Zwei Tage nach Transfektion wurden die auf Deckgläschen wachsenden Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern eingedeckt. Die Zellen wurden mit 20-facher Vergrößerung mit Epifluoreszenz und lichtmikroskopisch mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) mikroskopiert. Abbildung 5 A zeigt Beispielaufnahmen von Δ PEX3-Zellen mit endogener PEX19-Expression in DIC- und GFP-Fluoreszenz-Optik. Die quantitative Auswertung erfolgte in Fiji (ImageJ). Die komplementierten Zellen wurden anhand der Peroxisomenlokalisierung des GFP-SKL ermittelt und die Gesamtzellzahl im DIC-Bild bestimmt. Die Komplementationsrate wurde als Anteil der Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz an Gesamtzellen berechnet, da die cytosolische GFP- und die DsRed-Fluoreszenz aufgrund von zellulärer Autofluoreszenz hier nicht als Transfektionsmarker geeignet waren.

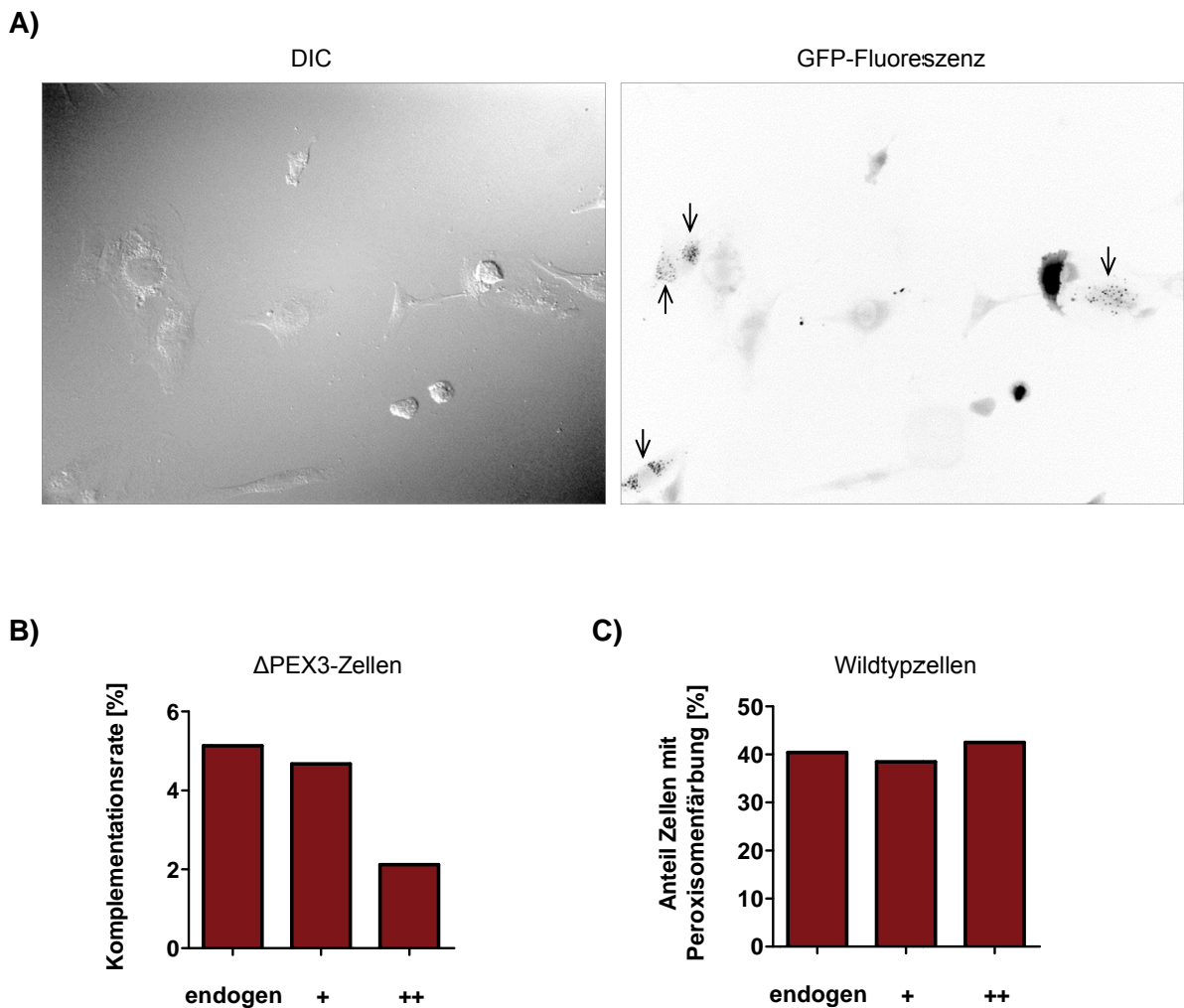


Abb. 5: Eine hohe PEX19-Konzentration beeinträchtigt die *de novo* Peroxisomenbiogenese

A) Δ PEX3-Zellen wurden für die PEX3-, GFP-SKL- und PEX19-Expression cotransfiziert, nach zwei Tagen fixiert, eingedeckt und mit 20-facher Vergrößerung mikroskopiert. Gezeigt sind eine DIC- und eine GFP-Fluoreszenzaufnahme von Zellen mit endogener PEX19-Expression. Die Pfeile in der Fluoreszenzaufnahme zeigen die Zellen mit peroxisomaler Lokalisation des GFP-SKL.

B) Die Komplementationsrate der Δ PEX3-Zellen wurde als Anteil der Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz an Gesamtzellen berechnet. Es wurden 643 (endogen), 599 (+) bzw. 566 (++) Gesamtzellen eines Experiments ausgezählt.

C) In einem Kontrollexperiment wurden Wildtypzellen für die GFP-SKL- und PEX19-Expression transfiziert und ebenfalls fixiert, eingedeckt und mikroskopiert. Es wurde der Anteil der Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz an Gesamtzellen ermittelt (analog zur Komplementationsrate der Δ PEX3-Zellen). Es wurden 903 (endogen), 603 (+) bzw. 778 (++) Gesamtzellen eines Experiments ausgezählt.

endogen: endogene PEX19-Expression; +: niedrige exogene PEX19-Expression; ++: hohe exogene PEX19-Expression.

Tatsächlich zeigte die hohe exogene PEX19-Expression einen Effekt auf die *de novo* Peroxisomenbiogenese der Zellen. Diese wurde durch PEX19 deutlich vermindert. Mit endogener PEX19-Expression zeigten 5,1 % der gesamten Zellen peroxisomale GFP-Fluoreszenz und somit eine Komplementation. Im Ansatz mit hoher exogener PEX19-Expression war dieser Zellanteil um 58 % verringert und lag nur noch bei 2,1 %. Durch die niedrige exogene PEX19-Expression war die *de novo* Peroxisomenbiogenese nicht beeinflusst. In diesem Ansatz hatten 4,7 % aller mikroskopierten Zellen GFP-gefärbte Peroxisomen was einer Abweichung um 8 % entspricht (Abb. 5 B).

Um sicher zu gehen, dass die Unterschiede in der Komplementationsrate der Δ PEX3-Zellen auf die zelluläre PEX19-Konzentration zurückzuführen ist und nicht auf anderen Effekten beruht oder methodisch bedingt ist, wurde ein Versuch mit Wildtypzellen durchgeführt. Alle Wildtypzellen besitzen Peroxisomen und die exogene PEX19-Expression sollte keinen Einfluss auf die Peroxisomenmarkierung mit GFP-SKL haben. Somit sollten unterschiedlich transfizierte Zellen gleiche Anteile mit GFP-gefärbten Peroxisomen aufweisen. Die hohe exogene PEX19-Expression führte in den Wildtypzellen ebenfalls zu einer etwa zehnfachen Erhöhung des endogenen Levels (nicht gezeigt). Wildtypzellen wurden für die GFP-SKL- und die PEX19-Expression transfiziert, zwei Tage nach Transfektion eingedeckt und mit Epifluoreszenz und DIC mikroskopiert. Die Wildtypzellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz und die Gesamtzellen wurden in Fiji (ImageJ) gezählt. Erwartungsgemäß war kein Unterschied in der Häufigkeit der Zellen mit gefärbten Peroxisomen zwischen den Zellen mit unterschiedlicher PEX19-Expression zu beobachten. Unter den drei verschiedenen PEX19-Konzentrationen zeigten 39 % bis 43 % aller Zellen peroxisomale Fluoreszenz (Abb. 5 C). Da die Wildtypzellen kaum Autofluoreszenz zeigten, wurde auch der Anteil der Zellen mit fluoreszierenden Peroxisomen an transfizierten, d. h. fluoreszierenden Zellen ermittelt. Auch hier war erwartungsgemäß kein Unterschied detektierbar und unter allen drei Bedingungen zeigten 99 % der transfizierten Zellen GFP-markierte Peroxisomen (nicht gezeigt).

Somit konnte hier in den Δ PEX3-Zellen gezeigt werden, dass eine PEX19-Überexpression während der Komplementation zu einer Hemmung der *de novo* Peroxisomenbiogenese führt.

Die Zellen, die trotz hoher zellulärer PEX19-Konzentrationen Peroxisomen bilden konnten, zeigten keine augenscheinlichen Unterschiede im Vergleich zu den peroxisomenpositiven Zellen mit niedrigen PEX19-Konzentrationen. So war zu vermuten, dass die Zellen ihre Peroxisomen nach initialer *de novo* Biogenese trotz hoher PEX19-Konzentrationen ungestört vermehren konnten. Um zu überprüfen, ob die Vermehrung der Peroxisomen über Wachstum und Teilung unbeeinflusst von der zellulären PEX19-Konzentration ist, wurde die Anzahl der Peroxisomen in komplementierten Δ PEX3-Zellen ermittelt. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben transfiziert, zwei Tage nach Transfektion fixiert und eingedeckt. Einzelne Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert, indem die GFP-Fluoreszenz in mehreren Schichten aufgenommen wurde. Zur Bestimmung der Peroxisomenzahl einer Zelle wurden die Maxima der GFP-Signalintensität in den einzelnen Schichten ermittelt und in z-Ebene projiziert. Der Bereich der Zelle mit Peroxisomen wurde markiert und darin die Anzahl der Gesamtmaxima bestimmt. Diese entspricht den gezählten Peroxisomen. Abbildung 6 A zeigt ein Beispiel einer solchen z-Projektion der GFP-Maxima. Zum Vergleich ist die z-Projektion der GFP-Fluoreszenz in den einzelnen Schichten dieser Zelle gegenüber gestellt. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Abbildung 6 B zeigt die Mittelwerte der einzelnen Peroxisomenzahlen aus beiden Experimenten mit Standardabweichung. Die Anzahl der Peroxisomen war in den komplementierten Δ PEX3-Zellen durch die exogene PEX19-Expression nicht verändert. Die Zellen besaßen etwa 80 Peroxisomen pro Zelle (Abb. 6 B). In einem Kontrollversuch wurde die Zahl der Peroxisomen in Wildtypzellen in Abhängigkeit der PEX19-Konzentration ermittelt. Auch hier zeigte sich die Biogenese der Peroxisomen unbeeinflusst von PEX19. In den Wildtypzellen lag die Zahl der Peroxisomen bei etwa 200 (Abb. 6 C). Diese Ergebnisse bedeuten, dass Wildtypzellen und komplementierte Δ PEX3-Zellen ihre bestehenden Peroxisomen unbeeinträchtigt von einer hohen zellulären PEX19-Konzentration über Wachstum und Teilung vermehren können, um ihre benötigte Peroxisomenpopulation aufzubauen und aufrechtzuerhalten. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass die *de novo* Biogenese der Peroxisomen durch hohe PEX19-Konzentrationen gestört wird.

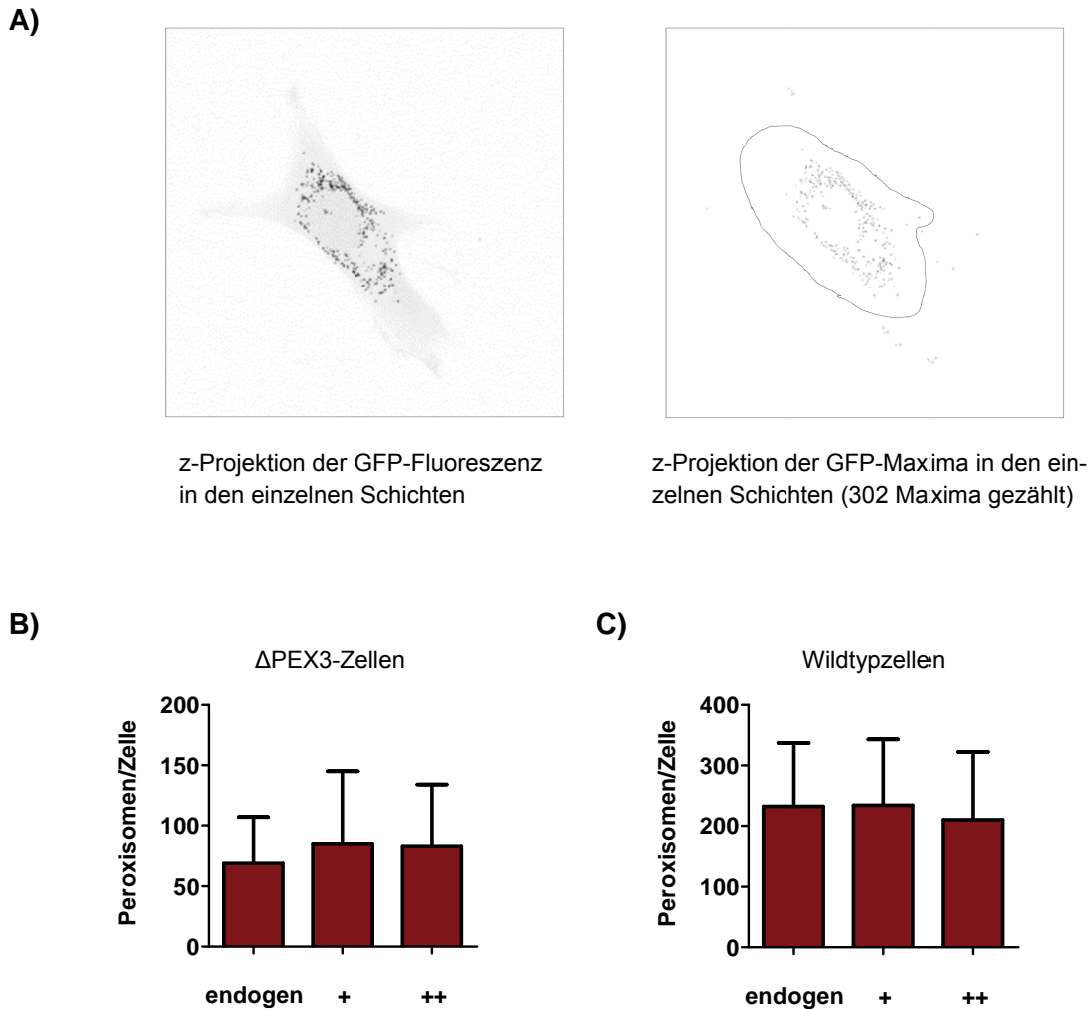


Abb. 6: Eine hohe PEX19-Konzentration hat keinen Einfluss auf die Vermehrung der Peroxisomen durch Wachstum und Teilung

GFP-SKL exprimierende Zellen wurden fixiert, eingedeckt und einzelne Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz wurden konfokal mikroskopiert. Die GFP-Fluoreszenz wurde in mehreren Schichten aufgenommen, die Maxima der GFP-Fluoreszenz wurden in den einzelnen Schichten ermittelt und in z-Ebene projiziert. Die Gesamtmaxima im Bereich der Zelle mit Peroxisomen wurden als Peroxisomen gezählt.

A) Es ist die z-Projektion der GFP-Fluoreszenz sowie die z-Projektion der GFP-Maxima in den einzelnen Schichten einer Wildtypzelle mit endogener PEX19-Expression dargestellt.

B) Es wurde die Anzahl der Peroxisomen in Δ PEX3-Zellen, die für die PEX3-, GFP-SKL- und PEX19-Expression cotransfiziert wurden, bestimmt. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Peroxisomenzahlen aus beiden Experimenten mit Standardabweichung. Insgesamt wurden 38 (endogen), 39 (+), bzw. 43 (++) Zellen ausgewertet.

C) Wildtypzellen wurden für die GFP-SKL- und PEX19-Expression transfiziert und es wurden die Peroxisomenzahlen einzelner Zellen bestimmt. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Es sind die Mittelwerte aller Peroxisomenzahlen mit Standardabweichung gezeigt. Es wurden insgesamt 53 (endogen), 48 (+), bzw. 49 (++) Einzelzellen ausgewertet. endogen: endogene PEX19-Expression; +/++: niedrige/hohe exogene PEX19-Expression.

In den bisherigen Versuchen wurden die Δ PEX3-Zellen mit den Plasmiden für die PEX3- und PEX19-Expression cotransfiziert, wobei PEX3 unter einem schwachen und PEX19 unter einem starken Promotor exprimiert wurde. Dabei startete die exogene PEX3-Expression, die für die Komplementation notwendig ist, gleichzeitig mit der exogenen PEX19-Expression. Wenn die Hemmung der *de novo* Peroxisomenbiogenese durch PEX19 konzentrationsabhängig ist, sollte der Effekt deutlicher sichtbar werden, wenn das PEX19-Level in den Zellen erhöht wird, bevor sie die Peroxisomenbiogenese starten können, d. h. bevor sie genetisch komplementiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden die zwei Plasmide für die PEX19- und für die PEX3-Expression nacheinander im Abstand von einem Tag transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Pex3-Transfektion fixiert, eingebettet und mikroskopiert. Die Komplementationsrate der Zellen wurde wie in Abbildung 5 bestimmt. Tatsächlich konnte der negative Effekt von PEX19 durch die vorgezogene exogene Expression verstärkt werden (Abb. 7). Dies war vor allem unter der niedrigen exogenen PEX19-Expression, die zu einer 1,5-fachen Erhöhung des endogenen Levels führt, sichtbar.

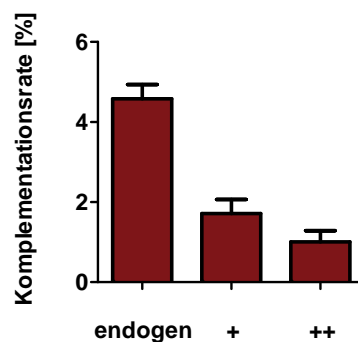


Abb. 7: Die *de novo* Biogenese der Peroxisomen wird konzentrationsabhängig und schon durch ein 1,5-fach erhöhtes PEX19-Level gehemmt

Δ PEX3-Zellen wurden zunächst für die GFP-SKL- und PEX19-Expression transfiziert. Nach einem Tag wurde das Plasmid für die niedrige exogene PEX3-Expression transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der zweiten Transfektion fixiert und eingedeckt. Wie in Abbildung 5 wurden die Zellen mit DIC und Epifluoreszenz mikroskopiert und gezählt. Die Komplementationsrate wurde als Anteil der Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz an Gesamtzellen berechnet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Darin wurden 269 und 670 (endogen), 274 und 916 (+) bzw. 371 und 995 (++) Gesamtzellen ausgezählt. endogen: endogene PEX19-Expression; +/++: niedrige/hohe exogene PEX19-Expression.

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigten von den Zellen mit endogenem PEX19-Level durchschnittlich 4,6 % der Gesamtzellen fluoreszenzmarkierte Peroxisomen. Dieser Anteil war durch ein 1,5-fach erhöhtes PEX19-Level um 63 % reduziert und die Komplementationsrate lag nur noch bei 1,7 %. Die Zellen mit einem 10-fach erhöhten PEX19-Level zeigten durchschnittlich 1 % der Gesamtzellen mit Peroxisomenfärbung, was einer Reduktion um 78 % entspricht. Im Vergleich dazu war die Reduktion der Komplementationsrate in den cotransfizierten Zellen deutlich schwächer (Abb. 5 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der *de novo* Peroxisomenbiogenese durch PEX19 konzentrationsabhängig ist und bereits eine etwa 1,5-fach erhöhte zelluläre PEX19-Konzentration die *de novo* Biogenese stark beeinträchtigt.

Um sicherzugehen, dass transfizierte Zellen beide cDNA-Sequenzen für die PEX3- und PEX19-Expression enthalten, wurden die beiden Sequenzen in einem weiteren Versuch mit einem einzigen Plasmid in die Zellen gebracht. Dafür wurden die drei Plasmide pVito-Pex19-GFP-SKL, pT07-Pex19-GFP-SKL und pVito-GFP-SKL so modifiziert, dass hinter das Pex19-Polyadenylierungssignal eine Expressionskassette aus T07-Promotor, 5'-UTR, Pex3-cDNA-Sequenz und Polyadenylierungssignal eingefügt wurde. Die Δ PEX3-Zellen wurden mit jeweils einem der drei Konstrukte transfiziert, sodass transfizierte Zellen eine PEX3-Expression (unter dem schwachen T07-Promotor) für die Komplementation, eine GFP-SKL-Expression für die Peroxisomenmarkierung und entweder die endogene, eine niedrige exogene oder eine hohe exogene PEX19-Expression aufwiesen. Die auf Deckgläschen angezogenen Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion fixiert, eingedeckt und mit 20-facher Vergrößerung wie in Abbildung 5 mikroskopiert und ausgewertet. Die Komplementationsraten lagen für die Zellen mit endogener, mit niedriger exogener und mit hoher exogener PEX19-Expression bei 2 %, 2,6 % bzw. 1,4 % der Gesamtzellen (Abb. 8 links). Die *de novo* Peroxisomenbiogenese der Δ PEX3-Zellen war also auch in diesem Versuch durch eine hohe exogene PEX19-Expression beeinträchtigt. Die Veränderung der Komplementationsrate durch die hohe exogene PEX19-Expression entspricht einer Verringerung um durchschnittlich 28 % bzw. 46 % im Vergleich zu den Zellen mit endogener bzw. mit niedriger exogener PEX19-Expression. Dabei lag der Anteil der komplementierten Zellen durch die niedrige exogene PEX19-Expression um durchschnittlich 34 % höher als in den Zellen mit endogener PEX19-Expression (Abb. 8 links). Die Unterschiede entstanden durch Schwankungen der Transfektionsrate. Die zelluläre Autofluoreszenz war in diesen Versuchen sehr gering, sodass die GFP-Fluoreszenz als Transfektionsmarker genutzt werden

konnte. Die Transfektionsrate wurde als Anteil der Zellen mit GFP-Fluoreszenz an Gesamtzellen ermittelt und schwankte in den einzelnen Experimenten zwischen den drei Präparaten um einen, 4, bzw. 10 Prozentpunkte. (n_1 : zwischen 11 % und 12 %, n_2 : zwischen 18 % und 28 % und n_3 : zwischen 17 % und 21 %; nicht gezeigt). Wird der Anteil der komplementierten Zellen nur auf die transfizierten Zellen (d. h. Zellen mit GFP-Fluoreszenz) statt auf die Gesamtzellen bezogen, zeigt die niedrige exogene PEX19-Expression keinen Effekt auf die *de novo* Peroxisomenbiogenese. Dahingegen ist der Effekt der hohen PEX19-Expression auch bei dieser Art der Analyse deutlich. Es ergibt sich in diesem Ansatz eine ca. 45 % geringere Komplementationsrate der transfizierten Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Ansätzen (Abb. 8, rechts).

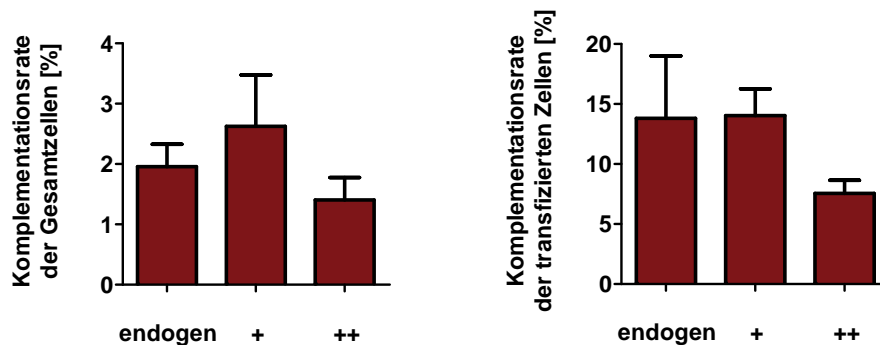


Abb. 8: Die *de novo* Biogenese der Peroxisomen wird bei der exogenen Expression der drei Proteine PEX3, PEX19 und GFP-SKL von einem Plasmid ebenfalls deutlich gehemmt

Δ PEX3-Zellen wurden für die GFP-SKL-, PEX3- und PEX19-Expression von einem Plasmid transfiziert, zwei Tage nach Transfektion fixiert, eingedeckt und wie in Abbildung 5 mikroskopiert. Die Komplementationsrate wurde als Anteil der Zellen mit peroxisomaler GFP-Fluoreszenz an Gesamtzellen (links) und an transfizierten Zellen (d. h. GFP-fluoreszierenden Zellen; rechts) berechnet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung gezeigt ($n=3$). In den einzelnen Experimenten wurden 1021, 582 und 1500 (endogen), 824, 571 und 1246 (+), bzw. 991, 575 und 1296 (++) Gesamtzellen und 110, 103 und 249 (-), 101, 134 und 257 (+) bzw. 123, 158 und 231 (++) transfizierte Zellen gezählt. endogen: endogene PEX19-Expression; +/++: niedrige/hohe exogene PEX19-Expression.

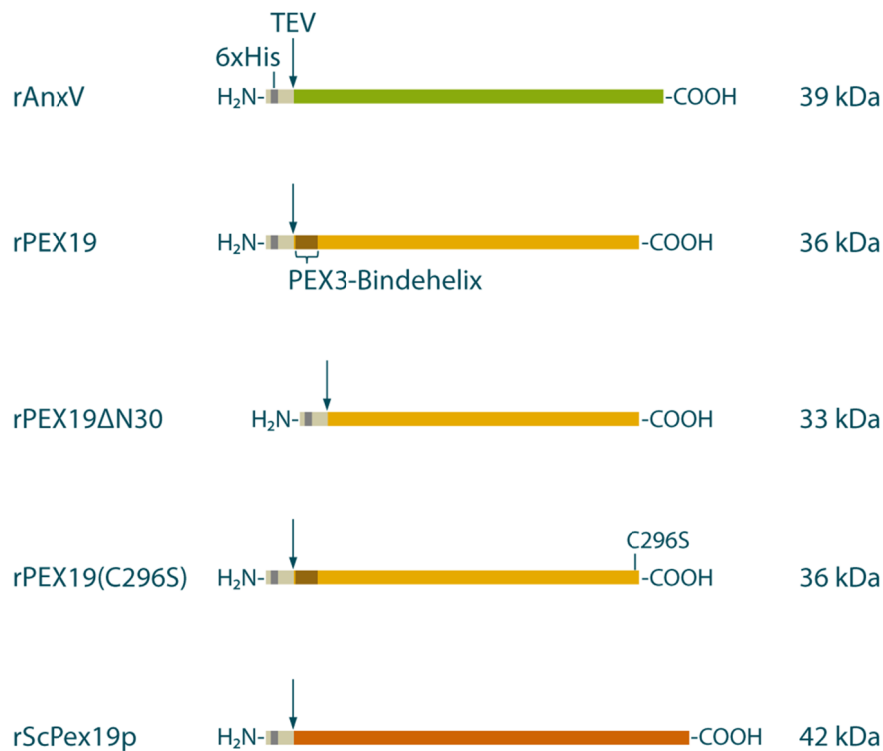
Zusammenfassend konnte in lebenden Zellen mit drei verschiedenen Versuchsansätzen gezeigt werden, dass PEX19 die *de novo* Biogenese der Peroxisomen hemmt (Abb. 5, 7 und 8). Da die *de novo* Biogenese der Peroxisomen über das ER verläuft und durch PEX3 initiiert wird, ist zu vermuten, dass PEX19 diese auf Ebene des PEX3-Transports ins ER beeinflusst.

3.2 *in vitro* Untersuchungen des PEX3-Transports in die ER-Membran

3.2.1 PEX19 hemmt den Transport von PEX3 ins ER

Um den Einfluss von PEX19 auf die Integration des Membranproteins PEX3 in die Membran des endoplasmatischen Retikulums direkt zu untersuchen, wurde PEX3 in einem zellfreien Translationsystem, dem Kaninchenretikulozytenlysat, in Anwesenheit von rauen Mikrosomen und PEX19 synthetisiert. Dafür wurde rekombinantes PEX19 (rPEX19) mit N-terminalem 6xHistidin-Affinitätstag in *E. coli* exprimiert, über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und in Puffer R umgepuffert (Abb. 9). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit Hilfe eines BSA-Standards. Pex3-mRNA wurde im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin, 1 µM rPEX19 und 0,6 eq rauen Mikrosomen aus dem Hund (RM) translatiert. Die Integration des PEX3 in die ER-Membran wurde über Karbonatextraktion nachgewiesen. Dafür wurden die rauen Mikrosomen durch Zentrifugation des Ansatzes sedimentiert und von löslichem Material im Überstand (Ü) getrennt. Das Mikrosomenpellet wurde anschließend in Natriumkarbonat (pH 11,5) resuspendiert und durch ein Saccharosekissen von dissoziiertem Material (Ü1) abgetrennt. Das Membranpellet wurde erneut in Natriumkarbonat resuspendiert und durch ein Saccharosekissen sedimentiert, wobei der zweite alkalische Überstand (Ü2) und das finale Membranpellet (P) entstand. Es wurden gleiche Anteile des Ausgangs (A) und aller Fraktionen (Ü, Ü1, Ü2 und P) über SDS-Gelelektrophorese analysiert. PEX3 war alkaliresistent mit der ER-Membran assoziiert (Abb. 10 A, Spur 10) und verhält sich somit wie ein integrales Membranprotein. In Anwesenheit von 1 µM rPEX19 konnte tatsächlich eine deutliche Verminderung der PEX3-Integration ins ER beobachtet werden (Spur 15). Im Vergleich zu den Kontrollen (Spur 10 und 20) fand sich nicht einmal halb so viel PEX3 mit den Mikrosomen im Pellet (Abb. 10 B). Als Kontrolle für ein rekombinant hergestelltes, aufgereinigtes Protein wurde Annexin V (rAnxV, Abb. 9) verwendet. Die PEX3-Integration war in Anwesenheit von 1 µM rAnxV nicht beeinflusst (Abb. 10 A, Spur 20). Um die Extraktion der hier verwendeten Mikrosomen zu überprüfen, wurde die Verteilung der ER-Proteine BiP und Sec61α in einem nichtradioaktiven Kontrollversuch mittels Western Blot untersucht. Die immunochemische Analyse der Fraktionen zeigte die Freisetzung des luminalen Proteins BiP in den ersten alkalischen Überstand und die Isolation des Membranproteins Sec61α mit den extrahierten Mikrosomen im Pellet (Abb. 10 C, Spur 3 und 5). Diese Ergebnisse zeigen, dass PEX19 die Integration des PEX3 in die ER-Membran beeinträchtigt.

A)



B)

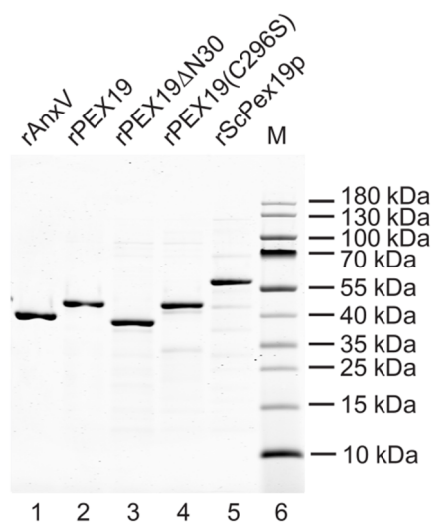
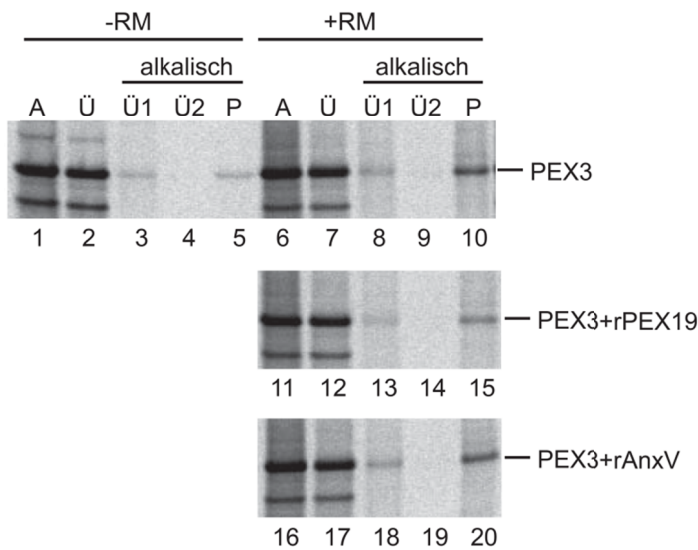


Abb. 9: Für die *in vitro* Untersuchungen wurde rekombinantes PEX19 verwendet

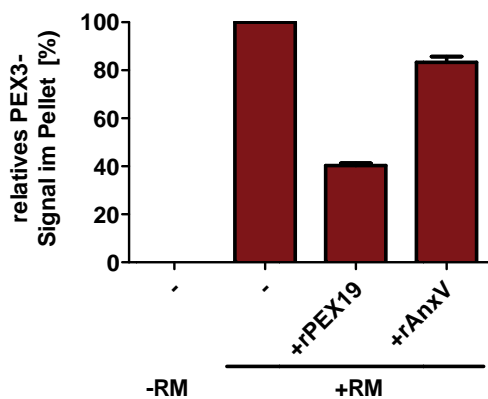
A) Schematische Darstellung der in die *in vitro* Versuche eingesetzten rekombinanten Proteine. Die Proteine wurden mit N-terminalem 6xHistidin-Affinitätstag (dunkelgrau) in *E. coli* exprimiert und enthalten eine TEV-Schnittstelle (Pfeil). Die rekombinanten Proteine wurden über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend umgepuffert. Die Molekulargewichte der Proteine sind in Kilodalton (kDa) angegeben.

B) Je 3 µg der in die Experimente eingesetzten Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. M: Molekulargewichtsmarker; rAnxV: rekombinantes Annexin V; rPEX19: rekombinantes humanes PEX19; rScPex19p: rekombinantes Pex19 aus *Saccharomyces cerevisiae*

A)



B)



C)

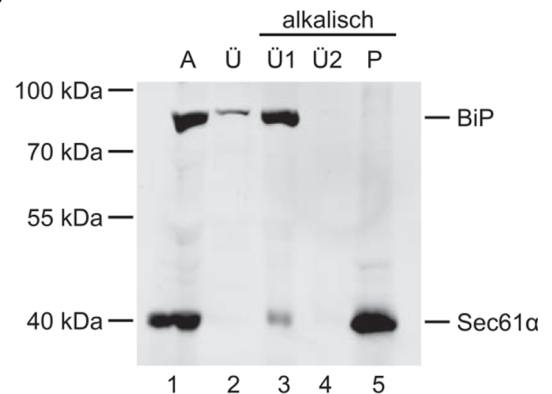


Abb. 10: PEX19 hemmt die Integration von PEX3 in die ER-Membran

A) PEX3 wurde *in vitro* im Retikulozytenlysat unter Einbau von [³⁵S]-Methionin in Anwesenheit von 0,6 eq rauen Mikrosomen (RM) aus dem Hund und 1 μM rekombinantem PEX19 (rPEX19) synthetisiert. Die rauen Mikrosomen wurden sedimentiert, wiederholt in 100 mM Natriumkarbonat (pH 11,5) resuspendiert und durch ein Saccharosekissen von dissoziiertem Material abgetrennt. Gleiche Anteile der Fraktionen (je 10 %) wurden über SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert.

B) Die PEX3-Signale im Pellet wurden relativ zum Ausgangssignal des jeweiligen Ansatzes berechnet. Der Anteil im Pellet des Ansatzes ohne Mikrosomen (-RM) wurde als Hintergrund von allen Pelletanteilen abgezogen. Der Signalanteil im Pellet des Ansatzes mit Mikrosomen (+RM) wurde dann auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Standardabweichung.

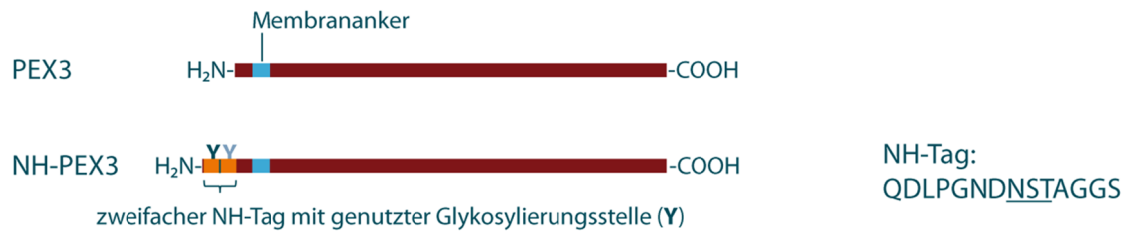
C) Die alkalische Extraktion der Membranen wurde in einem nichtradioaktiven Versuch immunochemisch überprüft. 24 eq raue Mikrosomen aus dem Hund wurden wie beschrieben extrahiert. Es wurden 20 % jeder Fraktion im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen das luminale Protein BiP und das integrale Membranprotein Sec61α analysiert.

A: Ausgang; Ü: Überstand aus der ersten Mikrosomensedimentation; Ü1: Überstand aus der ersten alkalischen Sedimentation; Ü2: Überstand aus der zweiten alkalischen Sedimentation; P: finales Membranpellet

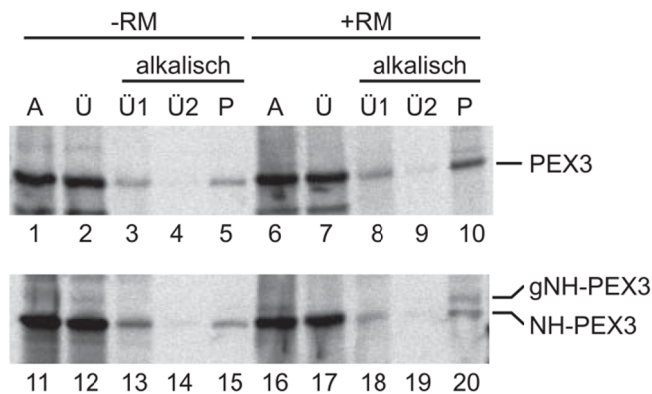
Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem hier untersuchten Transport des PEX3 um einen ER-spezifischen Transport handelt, wurde PEX3 so verändert, dass es ER-spezifisch modifiziert werden kann. Es wurde eine PEX3-Variante verwendet, die N-terminal einen diagnostischen Glykosylierungstag trägt. Der hier verwendete Glykosylierungstag besteht aus einer Aminosäuresequenz aus dem N-Terminus des reifen Influenza-A-Virus-Hämagglutinins (NH-Tag) und trägt das N-Glykosylierungsmotiv NST (Abb. 11 A) (Kragt *et al.*, 2005). PEX3 mit einer doppelten Tagsequenz (NH-PEX3, Abb. 11 A) wird effizient und nur einmal glykosyliert (Brauer, 2014). Zunächst wurde untersucht, ob sich NH-PEX3 in der Membranintegration so verhält wie das Wildtypprotein. Dafür wurden PEX3 und NH-PEX3 in Anwesenheit von radioaktivem Methionin und rauen Mikrosomen synthetisiert und ihre Integration über die alkalische Extraktion der Membranen untersucht. NH-PEX3 zeigte eine vergleichbare alkaliresistente Membranintegration wie das Wildtypprotein PEX3 (Abb. 11 B, Spur 10 und 20). NH-PEX3 wurde an seinem N-Terminus durch die rauen Mikrosomen glykosyliert (Spur 16). Das glykosylierte Protein war vollständig mit den extrahierten Mikrosomen im Pellet assoziiert (Spur 20). Das bedeutet, dass die Fraktion des glykosylierten NH-PEX3 ordentlich in die ER-Membran integriert wurde. Es wurde auch unglykosyliertes PEX3 alkaliresistent in die Membran integriert (Abb. 11 B, Spur 20). Dies hat seine Ursache vermutlich darin, dass nicht jeder translozierte N-Terminus von NH-PEX3 glykosyliert wird. Zur Überprüfung der Glykosylierung wurde NH-PEX3 in Anwesenheit von rauen Mikrosomen und 100 μ M eines Akzeptorpeptids (NYT) synthetisiert. Das Akzeptorpeptid mit der Aminosäuresequenz NYT kompetitiert die N-Glykosylierung von Proteinen, wodurch diese ER-spezifische Modifikation nachgewiesen werden kann. Die Bande des glykosylierten NH-PEX3 trat im Ansatz mit rauen Mikrosomen und Akzeptorpeptid nicht auf und wurde dadurch als ER-spezifische Glykosylierung bestätigt (Abb. 11 C, Spur 3).

Mit der PEX3-Variante mit diagnostischem Glykosylierungstag konnte nachgewiesen werden, dass PEX3 *in vitro* ER-spezifisch in die rauen Mikrosomen integriert.

A)



B)



C)

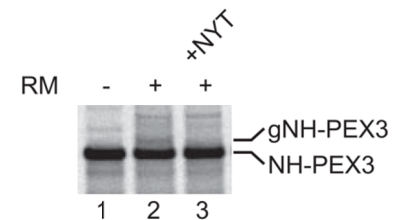


Abb. 11: NH-PEX3 wird *in vitro* alkaliresistent in die rauen Mikrosomen integriert und dabei ER-spezifisch glykosyliert

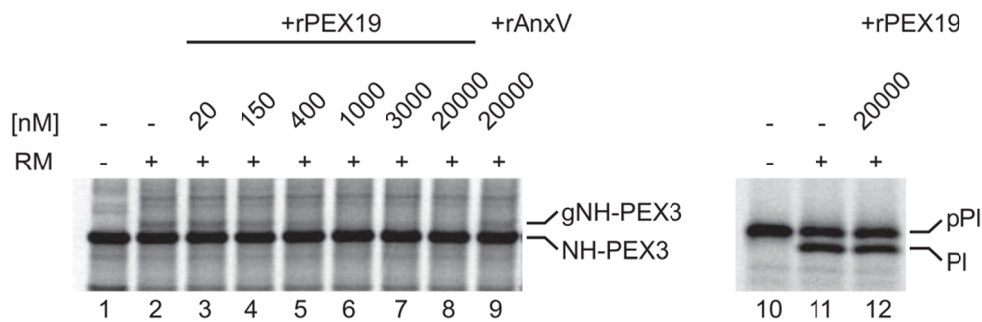
A) Schematische Darstellung des PEX3 in Wildtypform und mit N-terminal angefügtem diagnostischem Glykosylierungstag (NH-Tag). Für NH-PEX3 wurde eine zweifache Tagesequenz verwendet, die zu einer einfachen Glykosylierung (Y) des PEX3 führt. Die nicht genutzte Glykosylierungsstelle ist in grau dargestellt. Die Aminosäuresequenz des einfachen NH-Tags ist mit unterstrichenem N-Glykosylierungsmotiv angegeben.

B) Pex3- und NH-Pex3-mRNA wurde in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin und 0,6 eq rauen Mikrosomen (+RM) translatiert. Die Mikrosomen wurden anschließend alkalisch extrahiert und über SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert. Es ist das repräsentative Ergebnis eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

C) NH-PEX3 wurde in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin, 0,6 eq rauen Mikrosomen und 100 µM Akzeptorpeptid (NYT) synthetisiert. Die Ansätze wurden nach der Translokation mit RNaseA behandelt und über SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert.

A: Ausgang; Ü: Überstand aus der ersten Mikrosomensedimentation; Ü1: Überstand aus der ersten alkalischen Sedimentation; Ü2: Überstand aus der zweiten alkalischen Sedimentation; P: finales Membranpellet; gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3

A)



B)

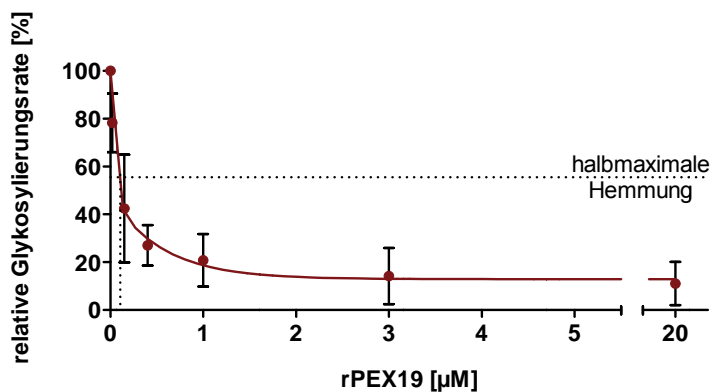


Abb. 13: Der PEX3-Transport ins ER wird schon durch geringe PEX19-Konzentrationen und dosisabhängig gehemmt

A) NH-PEX3 wurde in Anwesenheit von radioaktivem Methionin, rauen Mikrosomen und steigenden rPEX19-Konzentrationen synthetisiert. Im gleichen Experiment wurde als Kontrolle Präprolaktin (pPI) als Transportsubstrat eingesetzt.

B) Die Glykosylierungsrate wurde als Anteil des glykosylierten NH-PEX3 am gesamten NH-PEX3 im Ansatz (glykosyliert + unglykosyliert) berechnet. Das Signal auf Höhe des glykosylierten NH-PEX3 im Ansatz ohne Mikrosomen wurde vom Signal des glykosylierten NH-PEX3 in den Ansätzen mit Mikrosomen als Hintergrund abgezogen. Die Glykosylierungsrate im Ansatz ohne rPEX19 (+RM) wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4).

gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3; pPI: Präprolaktin; PI: Prolaktin

Die Glykosylierungsrate des NH-PEX3 fiel mit der niedrigsten Konzentration von 20 nM rPEX19 schon um durchschnittlich 20 % geringer aus als im Ansatz ohne rPEX19 (Abb. 13 B). Die Auswertung von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ergab im Durchschnitt eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von ca. 100 nM rPEX19. Wurden 20 µM des rekombinanten Kontrollproteins rAnxV statt rPEX19 verwendet,

konnte keine Beeinträchtigung der PEX3-Glykosylierung beobachtet werden (Abb. 13 A, Spur 9). Um auszuschließen, dass der Transport in die rauen Mikrosomen generell durch das rekombinante PEX19 beeinträchtigt wird, wurde im gleichen Experiment das sekretorische Säugerprotein Präprolaktin (pPl) als Transportsubstrat eingesetzt. pPl wird strikt cotranslational ins ER transportiert und dabei ER-spezifisch prozessiert (Abb. 13 A, Spur 11). Der cotranslationale Transport von pPl wurde durch die höchste eingesetzte rPEX19-Konzentration von 20 μ M nicht beeinflusst und der Transport ins ER an sich ist somit nicht gestört (Spur 12). Damit konnte gezeigt werden, dass PEX19 den Transport von PEX3 ins ER spezifisch und konzentrationsabhängig hemmt.

Als nächstes wurde untersucht, ob PEX19 den cotranslationalen Transport von PEX3 hemmen kann. Bisher wurde PEX3 zur Untersuchung der Translokation in Anwesenheit von rauen Mikrosomen synthetisiert. In einem solchen Translations- und Transportansatz ist der ribosomenabhängige Transport eines Proteins über die ER-Membran während der Translation prinzipiell möglich. Jedoch ist ein posttranslationaler Transport, bei dem das Protein zunächst an freien Ribosomen synthetisiert wird und erst nach der abgeschlossenen Translation zu den rauen Mikrosomen gelangt und über die Membran transloziert wird, nicht auszuschließen. Auf der einen Seite wird für PEX3 der cotranslationale Transportweg postuliert, auf der anderen Seite konnte jedoch bereits beobachtet werden, dass auch ein posttranslationaler Transport möglich ist. Es ist also nicht sicher, ob PEX3 hier im Translations- und Transportansatz tatsächlich cotranslational in die ER-Membran transloziert und dabei durch rPEX19 gehemmt werden kann. Um Aufschluss darüber zu bekommen, ob PEX19 einen cotranslationalen Transport von PEX3 hemmen kann, wurde eine PEX3-Variante untersucht, die cotranslational ins ER gezwungen wurde. Um NH-PEX3 strikt cotranslational ins ER zu zwingen, wurde die Signalsequenz (ss) von pPl vorgeschaltet (sspI-NH-PEX3; Abb. 14 A). Die mRNA für sspI-NH-PEX3 wurde *in vitro* im Translations- und Transportansatz in Anwesenheit von rauen Mikrosomen aus dem Hund translatiert. Das Protein zeigte dabei zwei höhermolekulare Banden (Abb. 14 B, Spur 5). Die anschließende Deglykosylierung durch PNGaseF bestätigte diese als glykosylierte Formen des Proteins, wobei eine von den Membranen stammende Hintergrundbande auf Höhe der mehrfach glykosylierten Form von sspI-NH-PEX3 bestehen blieb (Spur 6). Unter Verwendung des Akzeptorpeptids NYT und eines anderen Gelsystems zur Auftrennung der Proteine konnte die prozessierte Form des sspI-NH-PEX3 beobachtet werden (Abb. 14 C, Spur 2). Die PEX3-Variante mit pPl-Signalpeptid wird somit ordentlich über die ER-Membran transloziert.

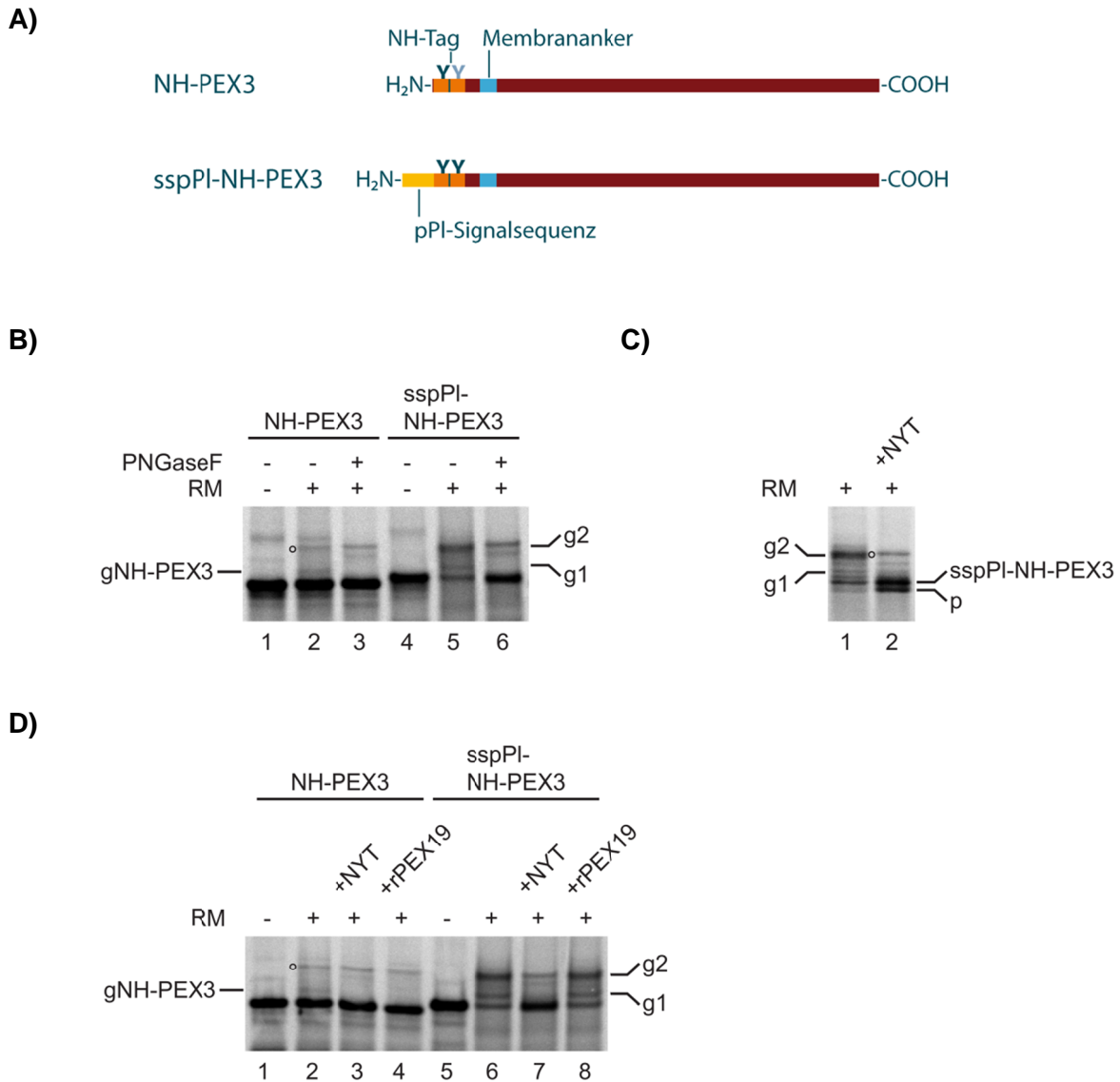


Abb. 14: Die Translokation des cotranslational ins ER gezwungenen PEX3 wird nicht durch PEX19 gehemmt

A) Schematische Darstellung der PEX3-Variante sspPI-NH-PEX3 mit angefügter pPI-Signalsequenz (in gelb). Eine der zwei Glykosylierungsstellen des doppelten NH-Tags bleibt bei NH-PEX3 ungenutzt (Y in hellgrau). sspPI-NH-PEX3 kann an beiden Glykosylierungsstellen glykosyliert werden.

B) NH-PEX3 und sspPI-NH-PEX3 wurden in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin und rauen Mikrosomen (RM) synthetisiert und anschließend mit PNGaseF verdaut. Die Ansätze wurden mit RNaseA behandelt und 5 % (NH-PEX3) bzw. 10 % (sspPI-NH-PEX3) der Ansätze wurden auf einem NuPAGE-Gel aufgetrennt.

C) sspPI-NH-PEX3 wurde in Anwesenheit von rauen Mikrosomen und 200 µM Akzeptorpeptid (NYT) synthetisiert. Die Ansätze wurden mit RNaseA behandelt und auf einem 8-15 %igem SDS-Gel aufgetrennt.

D) mRNA für sspPI-NH-PEX3 und NH-PEX3 wurde in Anwesenheit von rauen Mikrosomen und 1 µM rPEX19 bzw. 200 µM NYT translatiert. Die Ansätze wurden mit RNaseA behandelt und 5 % (NH-PEX3) bzw. 10 % (sspPI-NH-PEX3) der Ansätze wurden auf einem NuPAGE-Gel aufgetrennt. Die repräsentative Abbildung zeigt eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3; g1: einfach glykosylierte Form von sspPI-NH-PEX3; g2: zweifach glykosylierte Form von sspPI-NH-PEX3; p: prozessierte Form von sspPI-NH-PEX3; °: von den Membranen stammende Hintergrundbande

Dabei wird das Signalpeptid abgespalten und der N-Terminus der prozessierten Form von sspPI-NH-PEX3 wird einfach und mehrfach glykosyliert. Es ist davon auszugehen, dass bei dem translozierten sspPI-NH-PEX3 teilweise nur eine, wie bei NH-PEX3, und teilweise beide N-terminal angefügten Glykosylierungsstellen genutzt werden. Um zu überprüfen, ob sspPI-NH-PEX3 strikt cotranslational in die ER-Membran transportiert wird, wurde der Transport unter posttranslationalen Bedingungen getestet. Im posttranslationalen Transportansatz konnte diese PEX3-Variante nicht glykosyliert werden (nicht gezeigt). Somit kann die Translokation von sspPI-NH-PEX3 nur cotranslational ablaufen.

Um zu untersuchen, ob der Transport von sspPI-NH-PEX3 durch PEX19 gehemmt werden kann, wurde er in Anwesenheit von 1 μ M rPEX19 durchgeführt. NH-PEX3 und sspPI-NH-PEX3 wurden durch die rauen Mikrosomen glykosyliert (Abb. 14 D, Spur 2 und 6). Zur leichteren Identifizierung der Banden des glykosylierten Proteins wurde das Akzeptorpeptid verwendet. Der Transport von sspPI-NH-PEX3 wurde durch rPEX19 interessanterweise nicht beeinträchtigt und das Protein wurde unbeeinflusst von PEX19 glykosyliert (Spur 8). Dahingegen wurde die Glykosylierung von NH-PEX3 durch rPEX19 gehemmt (Spur 4). Somit kann die Translokation des PEX3, wenn diese strikt cotranslational abläuft, wahrscheinlich nicht durch PEX19 gehemmt werden.

Als nächstes wurde das Targeting von NH-PEX3-Translationsintermediaten zur ER-Membran untersucht. Im vorherigen Versuch wurde das Targeting des PEX3 durch Anhängen der Signalsequenz von pPI verändert. Das pPI-Signalpeptid tritt vor dem PEX3-Signalanker aus dem Ribosom heraus und übernimmt die Adressierung der entstehenden Polypeptidkette zum ER. Wenn jedoch PEX19 den PEX3-Transport bereits auf der Ebene des RNC-Targeting zum ER negativ beeinflusst, wäre die Hemmung bei dieser PEX3-Variante mit verändertem Targeting nicht zu beobachten. Um den Einfluss von PEX19 auf das unveränderte PEX3-Targeting zur ER-Membran zu untersuchen, wurden Versuche mit kontrolliert hergestellten Translationsintermediaten durchgeführt. Dazu wurde verkürzte mRNA *in vitro* translatiert, wobei das Fehlen eines Stopp-Codons zu einem angehaltenen RNC führte. Auf diese Weise wurden die Translationsintermediate 88mer, 120mer, 153mer und 215mer als mutmaßliche Zustände des cotranslationalen Transportprozesses hergestellt. Sie sind in Abbildung 15 A als RNC in Relation zum Volllängenprotein NH-PEX3 schematisch dargestellt. Sie sind nach der Anzahl der synthetisierten Aminosäuren benannt. Die Zählung beginnt mit dem Start-Methionin vor dem NH-Tag, der 28 Aminosäuren lang ist. Nach der Synthese wurde der Transport der Translationsintermediate durch Zugabe von rauen Mikrosomen ermöglicht.

Die Proteine wurden anschließend zur Überprüfung der Glykosylierung mit PNGaseF behandelt und, um freie Peptide ohne tRNA-Bindung zu erhalten, mit RNaseA verdaut. Die Proteine wurden anschließend über SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert. Alle untersuchten NH-PEX3-Translationsintermediate wurden in die ER-Membran transportiert und glykosyliert (Abb. 15 B, Spur 2, 5, 8 und 11 *), was durch die PNGaseF-Behandlung bestätigt wurde (Spur 3, 6, 9 und 12).

Um nun die Frage zu beantworten, ob PEX19 das Targeting und die anschließende Glykosylierung der NH-PEX3-Translationsintermediate hemmen kann, wurde die Synthese in Anwesenheit von 1 μ M rPEX19 durchgeführt. Nach anschließender Inkubation der RNCs mit rauen Mikrosomen wurden die Proteine mit RNaseA verdaut und über SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert. Wie Abbildung 15 C zeigt, hatte PEX19 keinen Effekt auf die Glykosylierung der kurzen PEX3-Peptide (Spur 6, 9, 12 und 15). Im gleichen Experiment wurden Translations- und Transportansätze mit NH-PEX3 mitgeführt. Die Glykosylierung des Volllängenproteins NH-PEX3 wurde in Anwesenheit von 1 μ M rPEX19 gehemmt (nicht gezeigt). Als Kontrollsubstrat wurde ein pPI-Translationsintermediat mit 86 Aminosäuren (pPI 86mer) verwendet. Dieses wurde durch posttranslational hinzugefügte ER-Membranen prozessiert, was zeigt, dass ein strikt cotranslational transportiertes Protein unter den gegebenen Bedingungen als Translationsintermediat in die ER-Membran transportiert werden kann (Abb. 15 C, Spur 2 #). Die ER-spezifische Prozessierung des kurzen pPI-Peptids wurde durch rPEX19 nicht beeinflusst (Spur 3 #). Somit kann PEX19 das Targeting von kurzen PEX3-Translationsintermediaten zur ER-Membran, zumindest bei den hier untersuchten Peptidlängen, nicht hemmen.

Bisher konnte gezeigt werden, dass PEX19 den *in vitro* Transport von PEX3 ins ER im Translations- und Transportansatz hemmt, diese Hemmung aber weder beim Transport einer cotranslational ins ER gezwungenen PEX3-Variante noch beim Targeting kurzer PEX3-Translationsintermediate auftritt.

3.2.2 Der durch PEX19 gehemmte PEX3-Transport ins ER läuft posttranslational ab

Da es unwahrscheinlich ist, dass PEX19 den PEX3-Transport ins ER hemmen kann, wenn dieser cotranslational abläuft, ist anzunehmen, dass die hier beobachtete Hemmung während des posttranslationalen Transports geschieht. Um dies zu untersuchen wurde zunächst getestet, ob PEX3 unter strikt posttranslationalen Bedingungen in die hier verwendeten rauen Mikrosomen aus dem Hund integrieren kann. Dafür wurde ein posttranslationaler Transport nach Thoms *et al.* (2012) durchgeführt, indem mRNA für PEX3 und NH-PEX3 *in vitro* im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin translatiert wurde. Die Translation wurde anschließend mit Cycloheximid inhibiert. Die Ribosomen wurden abzentrifugiert und der Überstand für die Proteintranslokation mit 1,8 eq rauen Mikrosomen versetzt. Nach der Translokation wurden die Mikrosomen sedimentiert und zweifach alkalisch extrahiert.

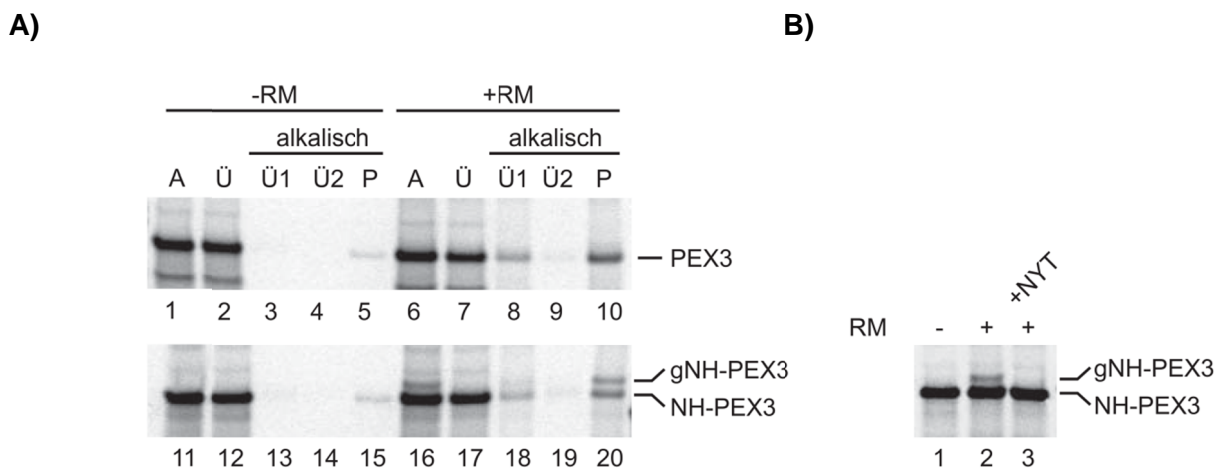


Abb. 16: PEX3 und NH-PEX3 werden posttranslational in die ER-Membran integriert

A) Pex3- und NH-Pex3-mRNA wurde im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin translatiert. Anschließend wurde die Translation mit Cycloheximid inhibiert und die Ribosomen abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die posttranslationale Translokation mit 1,8 eq rauen Mikrosomen aus dem Hund versetzt (+RM). Nach der Translokation wurden die Mikrosomen wie in Abbildung 10 alkalisch extrahiert. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

B) Nach Synthese des NH-PEX3 und Translationsinhibition sowie Ribosomendepletion wurde die posttranslationale Translokation in Anwesenheit von rauen Mikrosomen und 200 µM des Akzeptorpeptids NYT durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend über SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert. A: Ausgang; Ü: Überstand aus der ersten Mikrosomensedimentation; Ü1/Ü2: Überstand aus der ersten bzw. zweiten alkalischen Sedimentation; P: finales Membranpellet; gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3

Die Proteine PEX3 und NH-PEX3 konnten unter posttranslationalen Bedingungen alkaliresistent in die rauen Mikrosomen integrieren (Abb. 16, Spur 10 und 20). NH-PEX3 wurde posttranslational glykosyliert (Spur 16). Das glykosylierte Protein war assoziiert mit den extrahierten Membranen im Pellet wiederzufinden, wobei auch hier das transportierte NH-PEX3 nicht vollständig glykosyliert wurde (Spur 20). Die ER-spezifische Glykosylierung wurde durch das kompetitierende Akzeptorpeptid NYT bestätigt (Abb. 16 B, Spur 3). Damit wurde gezeigt, dass PEX3 unter strikt posttranslationalen Bedingungen ordentlich in die hier verwendeten rauen Mikrosomen integriert werden kann.

Um zu untersuchen, ob PEX19 diesen posttranslationalen Transport von PEX3 hemmt, wurde NH-PEX3 *in vitro* synthetisiert und der Überstand des Translationsansatzes nach Translationshemmung und Ribosomensedimentation für den posttranslationalen Transport mit rauen Mikrosomen und 1 μ M rPEX19 versetzt. Die Mikrosomen wurden anschließend sedimentiert und zweifach alkalisch extrahiert. NH-PEX3 wurde glykosyliert und alkaliresistent in die ER-Membran integriert (Abb. 17, Spur 10).

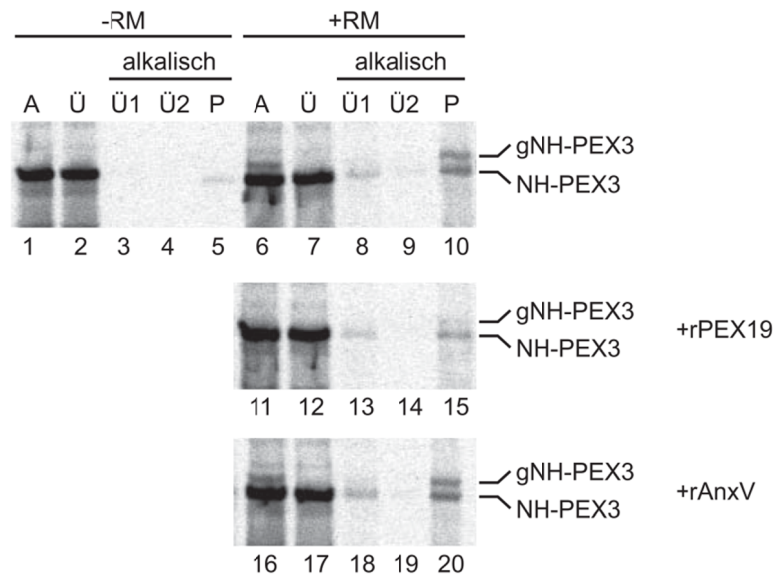


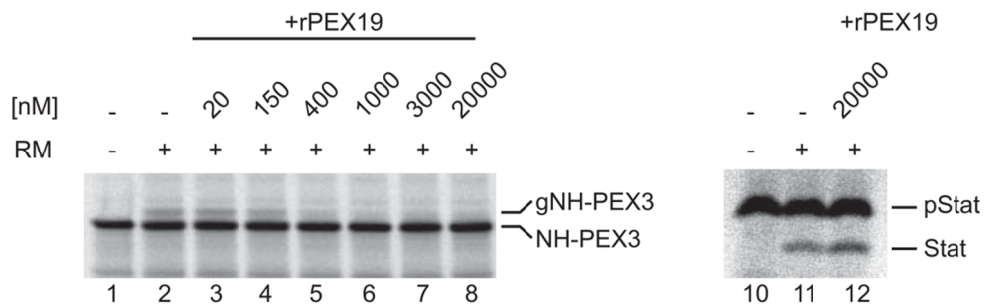
Abb. 17: PEX19 hemmt die posttranslationale Translokation von PEX3 ins ER

NH-PEX3 wurde im Retikulozytenlysat unter Einbau von radioaktiv markiertem Methionin synthetisiert und nach der Ribosomendepletion mit rauen Mikrosomen und 1 μ M rPEX19 versetzt. Die Mikrosomen wurden nach der Translokation alkalisch extrahiert. Die repräsentative Abbildung zeigt eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3

Im Ansatz mit rPEX19 zeigte sich, dass die posttranslationale NH-PEX3-Translokation durch PEX19 inhibiert wurde (Spur 15). Dabei wurde nicht nur die Glykosylierung gehemmt, sondern auch die alkaliresistente Integration von NH-PEX3 war durch PEX19 stark reduziert. Das rekombinante Kontrollprotein rAnxV hatte keinen Einfluss auf den posttranslationalen Transport von NH-PEX3 (Abb. 17, Spur 20). Somit konnte gezeigt werden, dass PEX19 den posttranslationalen und ER-spezifischen Transport von PEX3 hemmt

Im Translations- und Transportansatz zeigte rPEX19 eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die NH-PEX3-Glykosylierung, die schon bei niedrigen Konzentrationen auftrat (Abb. 13). Um zu untersuchen, ob sich die PEX19-Wirkung im posttranslationalen Transportansatz ebenso verhält, wurde der posttranslationale Transport von NH-PEX3 mit steigenden rPEX19-Konzentrationen von 20 nM bis 20 μ M durchgeführt. Dafür wurde NH-Pex3-mRNA *in vitro* translatiert und das synthetisierte Protein nach Ribosomendepletion mit rPEX19 und rauen Mikrosomen versetzt. Auch im posttranslationalen Transport wurde mit steigenden rPEX19-Konzentrationen stetig weniger NH-PEX3 glykosyliert (Abb. 18 A). Für die Auswertung wurden die radioaktiven Signale auf Höhe des unglykosylierten und glykosylierten NH-PEX3 in allen Ansätzen in ImageQuant gemessen. Die Glykosylierungsrate wurde als Anteil des glykosylierten NH-PEX3 an Gesamtsignal des NH-PEX3 im Ansatz berechnet. Der Wert der Glykosylierungsrate im Ansatz ohne Membranen wurde als unspezifischer Hintergrund von den Glykosylierungsraten der Ansätze mit Membranen abgezogen. Schon bei der geringsten Konzentration von 20 nM war die Glykosylierungsrate um durchschnittlich 14 % reduziert (Abb. 18 B). Die halbmaximale Hemmung der Glykosylierung war in sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten im Mittel mit ca. 200 nM rPEX19 erreicht. Ein Vergleich der Hemmkurven des NH-PEX3-Transports in den zwei unterschiedlichen Transportansätzen zeigte keinen Unterschied (Abb. 13 B und 18 B). Um auszuschließen, dass rPEX19 generell den posttranslationalen Transport in die rauen Mikrosomen hemmt, wurde das sekretorische Säugerprotein Prästatherin (pStat) als Substrat für den posttranslationalen Transport eingesetzt. Wie pPl wird pStat bei der Translokation ER-spezifisch prozessiert mit dem Unterschied, dass der Transport von pStat auch posttranslational ablaufen kann. Das *in vitro* synthetisierte pStat wurde durch Zugabe von rauen Mikrosomen posttranslational prozessiert (Abb. 18 A, Spur 11). pStat konnte auch unter 20 μ M rPEX19 in die ER-Membran transportiert und unbeeinflusst prozessiert werden (Spur 12).

A)



B)

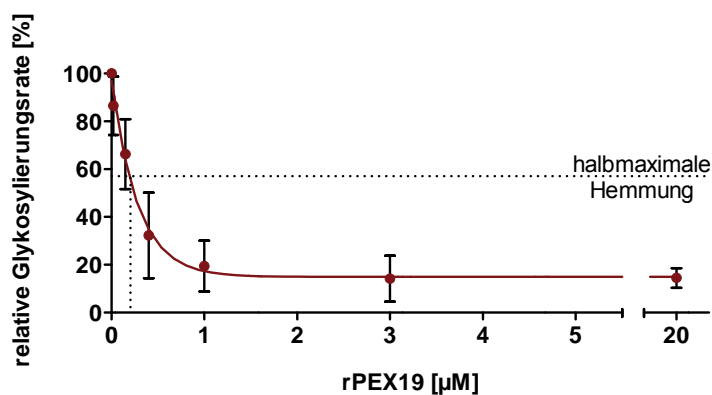


Abb. 18: Die posttranslationale PEX3-Translokation wird durch geringe PEX19-Konzentrationen und dosisabhängig gehemmt

A) NH-PEX3 wurde im Retikulozytenlysat unter Einbau von [35 S]-Methionin synthetisiert. Die Translation wurde durch Cycloheximid inhibiert und die Ribosomen wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die posttranslationale Translokation mit rauen Mikrosomen und steigenden rPEX19-Konzentrationen versetzt. Im gleichen Experiment wurde das Transportsubstrat Prästatherin (pStat) als Kontrolle eingesetzt.

B) Die Glykosylierungsrate wurde als Anteil des glykosylierten NH-PEX3 am gesamten NH-PEX3 im Ansatz (glykosyliert + unglykosyliert) berechnet. Die Glykosylierungsrate des Ansatzes ohne Mikrosomen wurde als Hintergrund von den Glykosylierungsraten der Ansätze mit Mikrosomen abgezogen. Die Glykosylierungsrate im Ansatz ohne rPEX19 (+RM) wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6).

gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3; pStat: Prästatherin; Stat: Statherin

Das bedeutet, dass PEX19 auch den posttranslationalen Proteintransport ins ER nicht generell und unspezifisch hemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Hemmung des PEX3-Transports ins ER durch PEX19 im posttranslationalen Transportansatz genauso verhält, wie im Translations- und Transportansatz. Das bedeutet, dass der durch PEX19 gehemmte PEX3-Transport im Translations- und Transportansatz posttranslational abläuft.

3.2.3 Die Hemmung des PEX3-Transports ins ER beruht auf einer direkten PEX3:PEX19-Interaktion

Als nächstes wurde untersucht, wie PEX19 den Transport von PEX3 ins ER hemmt. PEX19 und membranständiges PEX3 führen ihre gemeinsamen Funktionen durch direkte Interaktion miteinander aus. Während des posttranslationalen Transports liegt PEX3 vollständig synthetisiert als freies, eventuell schon gefaltetes Protein vor. Es ist vorstellbar, dass auch die Hemmung des Transports von PEX3 durch direkte Bindung an PEX19 vermittelt wird. Um zu untersuchen, ob das rekombinante PEX19 direkt an das *in vitro* synthetisierte, nicht-membranständige PEX3 in dem verwendeten System binden kann, wurde rPEX19 als „Köder“ genutzt und über die Bindung des 6xHistidin-Tags an Ni-NTA-Agarose isoliert. NH-Pex3- und pPl-mRNA wurde in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin und 20 μ M rPEX19 *in vitro* translatiert. Anschließend wurden die Translationsansätze mit Puffer 1:10 verdünnt und zur Bindung mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Die Bindung fand unter 5 mM Imidazol für 30 min bei 4 °C statt. Nach zweimaligem Waschen mit 20 mM Imidazol wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert. Gleiche Anteile des geladenen Ausgangs und des Eluats wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Phosphorimaging analysiert.

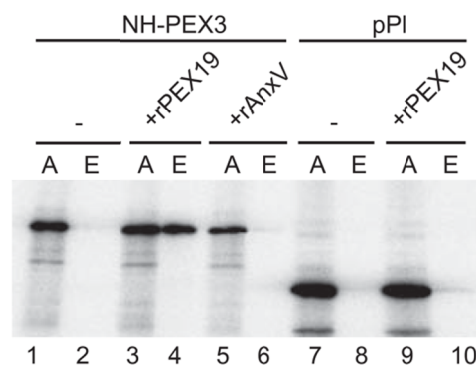
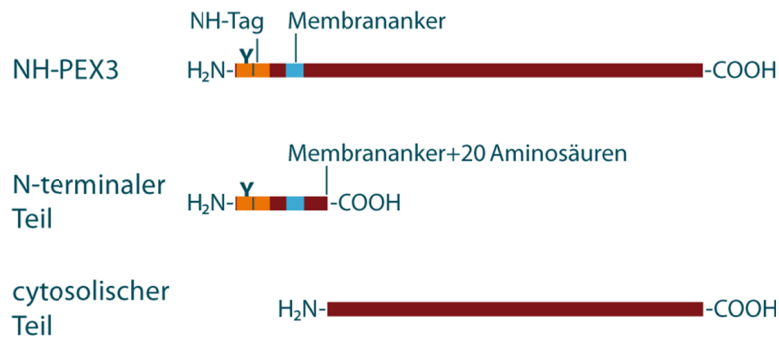


Abb. 19: Rekombinantes PEX19 und *in vitro* synthetisiertes PEX3 können direkt miteinander interagieren NH-Pex3- und pPl-mRNA wurde im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin und 20 μ M rPEX19 translatiert. Die Translationsansätze wurden mit Puffer 1:10 verdünnt und auf 5 mM Imidazol und 0,1 % Tween-20 gebracht. Die Proteine wurden zur Bindung des rPEX19 (rekombinantes PEX19 mit 6xHistidin-Tag) mit Ni-NTA-Agarose versetzt, zweimal mit 20 mM Imidazol gewaschen und anschließend mit SDS-Probenpuffer von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Es wurden jeweils 5 % des geladenen Ausgangs (A) und des Eluats (E) auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Es ist das repräsentative Ergebnis aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

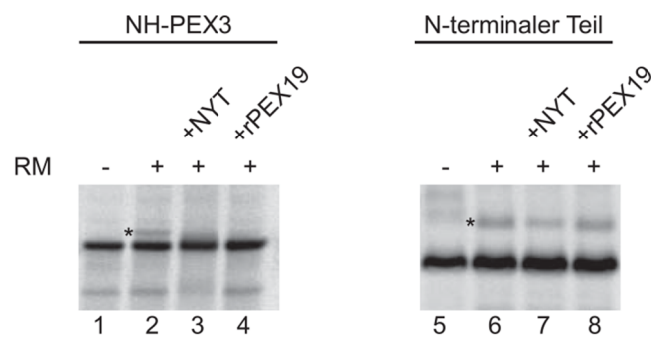
Ohne rekombinantes Protein konnte das radioaktive NH-PEX3 nicht an die Ni-NTA-Agarose binden (Abb. 19, Spur 2), wohingegen im Ansatz mit rekombinantem PEX19 durchschnittlich etwa 60 % (n=7) des Ausgangssignals von NH-PEX3 im Eluat zu finden war. NH-PEX3 hatte somit an rPEX19 gebunden (Spur 4). Mit dem rekombinanten Kontrollprotein rAnxV, das ebenfalls einen 6xHistidin-Tag trägt, war kein NH-PEX3 im Eluat und somit keine Bindung dieser Proteine detektierbar (Spur 6). Das *in vitro* translatierte Kontrollprotein pPl und rPEX19 konnten nicht miteinander interagieren und pPl wurde nicht mit rPEX19 aus dem Ansatz gezogen (Spur 10). Damit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes PEX19 in diesem System direkt und spezifisch mit *in vitro* translatiertem PEX3 interagiert.

In den bisherigen *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 1.) der PEX3-Transport ins ER durch PEX19 gehemmt wird, 2.) diese Hemmung nur während des posttranslationalen Transports von PEX3 auftritt und 3.) vermutlich auf einer direkten PEX3:PEX19-Bindung beruht. Als nächstes wurde untersucht, welche Proteinbereiche bei dieser Hemmung des posttranslationalen PEX3-Transports ins ER involviert sind und welche PEX3:PEX19-Interaktionen eine Rolle spielen. PEX3 besteht wie bereits beschrieben aus einem kurzen N-Terminus vor dem Membrananker und einem großen, cytosolischen Teil (Abb. 20 A). Um zu untersuchen, ob allein der N-terminale Teil von PEX3 durch PEX19 an der Translokation gehindert wird oder ob der cytosolische Teil von PEX3 an der Transporthemmung beteiligt ist, wurde eine verkürzte NH-PEX3-Variante, bei der der cytosolische Teil deletiert wurde, verwendet. Dieser N-terminale Teil besteht aus dem N-Terminus inklusive 20 Aminosäuren hinter dem Membrananker (Abb. 20 A). Das Vollängenprotein und der N-terminale Teil von NH-PEX3 wurden *in vitro* synthetisiert und für den posttranslationalen Transport mit rauen Mikrosomen und 1 µM rPEX19 versetzt. Wie Abbildung 20 B zeigt, wurde der N-terminale Teil posttranslational in die ER-Membran integriert und glykosyliert (Spur 6 *). Die Glykosylierung wurde durch das Akzeptorpeptid NYT kompetitiert und dadurch bestätigt. Diese Konkurrenz geschah nicht vollständig, sodass ein geringer Teil des Proteins im Ansatz mit Akzeptorpeptid glykosyliert wurde (Spur 7). In Anwesenheit von rPEX19 wurde der N-terminale Teil unverändert glykosyliert (Spur 8.). PEX19 kann also den posttranslationalen Transport des N-terminalen Teils von PEX3 allein nicht inhibieren, was vermuten lässt, dass keine Bindung des N-terminalen Teils an PEX19 möglich ist. Um dies zu überprüfen, wurde die PEX19-Bindung des N-terminalen Teils und des cytosolischen Teils (ab Aminosäure 21 hinter dem Membrananker; Abb. 20 A) von NH-PEX3 im Bindungsversuch mit Ni-NTA-Agarose untersucht.

A)



B)



C)

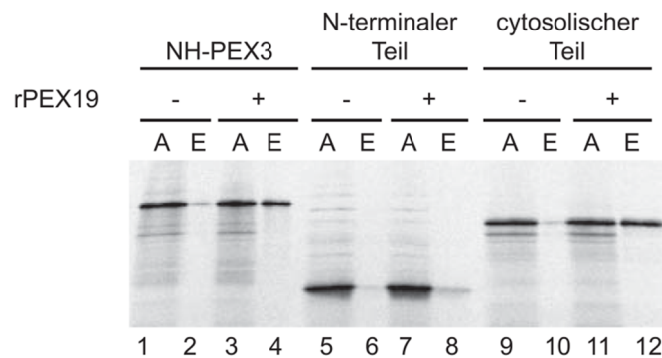


Abb. 20: An der Hemmung des PEX3-Transports ist der cytosolische Teil von PEX3 beteiligt

A) Schematische Darstellung der einzeln untersuchten PEX3 Proteinbereiche. NH-PEX3 wurde 20 Aminosäuren hinter dem Membrananker in N-terminalen Teil und cytosolischen Teil geteilt.

B) NH-PEX3 Volllängenprotein und der N-terminale Teil wurden im Retikulozytenlysat unter Einbau von [³⁵S]-Methionin synthetisiert. Nach Ribosomendepletion fand die Translokation der Proteine in Anwesenheit von rauen Mikrosomen und 1 μM rPEX19 bzw. 200 μM Akzeptorpeptid NYT statt. Es ist das repräsentative Ergebnis eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

C) Das Volllängenprotein, der N-terminale Teil und der cytosolische Teil von NH-PEX3 wurden in Anwesenheit von 20 μM rPEX19 synthetisiert. Anschließend wurde die PEX19-Bindung der synthetisierten Proteine wie in Abbildung 19 mit Ni-NTA-Agarose untersucht.

*: glykosylierte Form der Proteine; A: Ausgang; E: Eluat

Die zwei PEX3-Proteinteile und das Volllängenprotein wurden in Anwesenheit von 20 μ M rPEX19 *in vitro* synthetisiert und mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert. Tatsächlich war der N-terminale Teil von NH-PEX3 im Gegensatz zum Volllängenprotein nicht im Eluat mit PEX19 enthalten und konnte somit nicht an rPEX19 binden (Abb. 20 C, Spur 4 und 8). Dahingegen zeigte der cytosolische Teil eine etwa gleich starke PEX19-Interaktion wie NH-PEX3 (Spur 12). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion zwischen PEX19 und dem cytosolischen Teil von PEX3 bei der Hemmung des PEX3-Transports essentiell ist.

Um zu untersuchen, ob die Transporthemmung allein durch den cytosolischen Teil vermittelt wird, wurde eine Proteinchimäre aus dem cytosolischen Teil von PEX3 und einem fremden N-terminalen Membrananker verwendet. Pex22p aus der Hefe (ScPex22p) ist ähnlich aufgebaut wie das humane PEX3. Es ist ein Typ III Membranprotein mit kurzem N-Terminus, der in der peroxisomalen Matrix vorliegt. Der Hauptteil des Proteins ragt ins Cytosol (Halbach *et al.*, 2009). ScPex22p mit N-terminal angefügtem Glykosylierungstag (NH-ScPex22p, Abb. 21 A) kann effizient durch raue Mikrosomen aus dem Hund im *in vitro* posttranslationalen Transport glykosyliert werden. Es verhält sich im Transport somit wie das humane NH-PEX3, wird darin jedoch nicht durch humanes PEX19 beeinflusst (eigene Beobachtung). Dies wurde genutzt, um mit Proteinchimären die Beteiligung des cytosolischen Teils von PEX3 bei der Transporthemmung durch PEX19 zu untersuchen. NH-ScPex22p wurde wie NH-PEX3 20 Aminosäuren hinter seinem Membrananker in einen N-terminalen Teil und einen cytosolischen Teil geteilt. Der N-terminale und der cytosolische Teil von NH-PEX3 wurden mit dem jeweiligen Proteinteil von NH-ScPex22p ausgetauscht, sodass eine Chimäre aus dem N-terminalen Teil von PEX3 und dem cytosolischen Teil von ScPex22p (PEX3-22) sowie eine Chimäre aus dem N-terminalen Teil von NH-ScPex22p und dem cytosolischen Teil von PEX3 (PEX22-3) entstand (Abb. 21 A). Die Proteine wurden *in vitro* synthetisiert und für den posttranslationalen Transport mit rauen Mikrosomen und 1 μ M rPEX19 versetzt. Beide Proteinchimären wurden wie NH-PEX3 und NH-ScPex22p glykosyliert (Abb. 21 B, Spur 2, 6, 10 und 14, *), was durch das Akzeptorpeptid NYT kompetitiert wurde (Spur 3, 7, 11 und 15). Interessanterweise konnte PEX22-3, das den cytosolischen Teil von PEX3 trägt, in Anwesenheit von PEX19 nicht glykosyliert werden (Spur 16). Dahingegen war der Transport der Chimäre PEX3-22 mit dem N-terminalen Teil von PEX3 wie erwartet unbeeinflusst durch PEX19 (Spur 12).

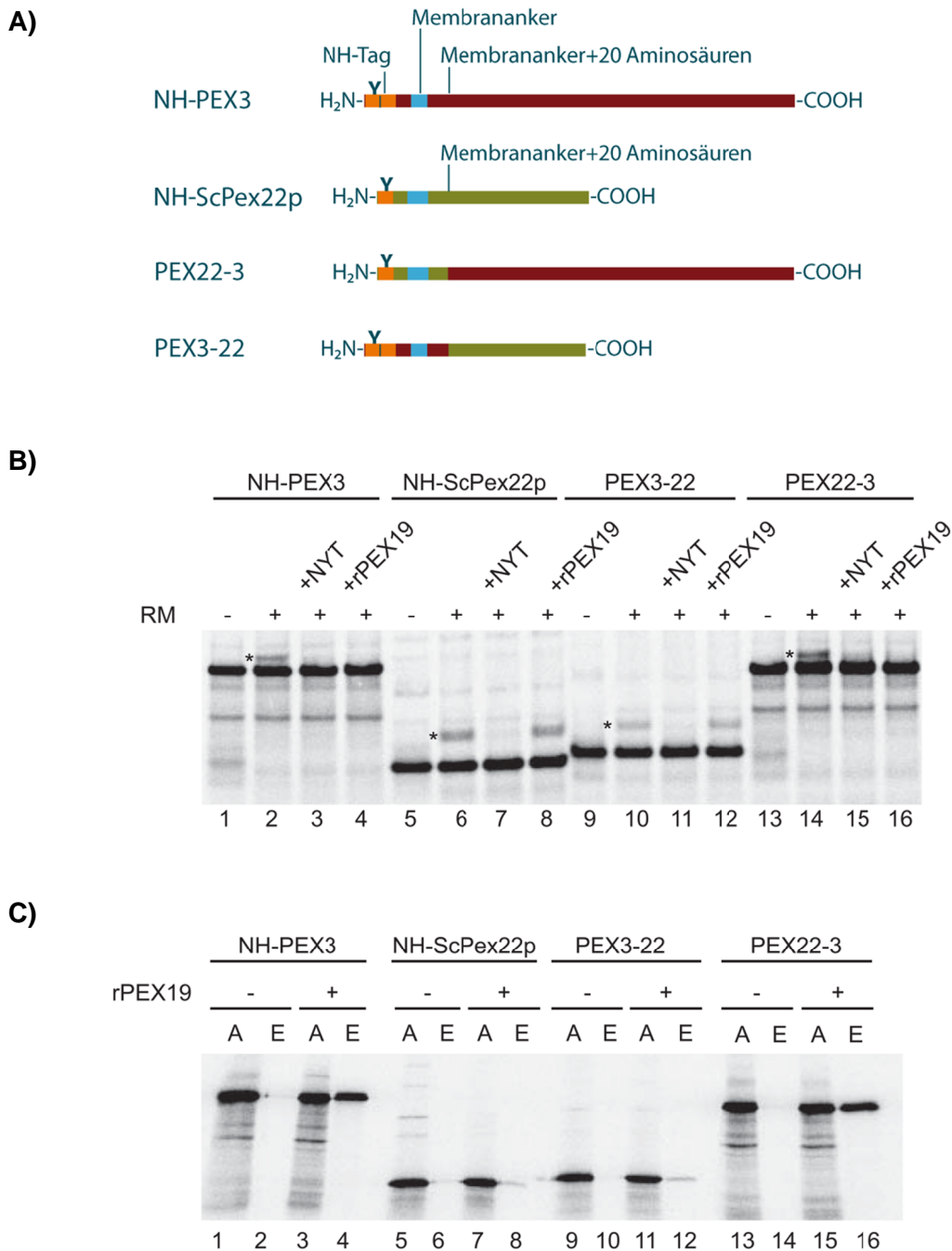


Abb. 21: Die Transporthemmung wird allein durch den cytosolischen Teil von PEX3 vermittelt

A) Schematische Darstellung der untersuchten PEX3-Chimären. NH-PEX3 und NH-ScPex22p wurden 20 Aminosäuren hinter dem Membrananker geteilt. Für die Chimären wurde der N-terminale Teil bzw. der cytosolische Teil von NH-PEX3 mit dem entsprechenden Proteinteil von NH-ScPex22p ausgetauscht.

B) Die Proteinchimären wurden in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin synthetisiert und nach der Ribosomen-depletion für die posttranslationale Translokation mit rauen Mikrosomen und 1 μM rPEX19 bzw. 100 μM Akzeptorpeptid NYT versetzt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

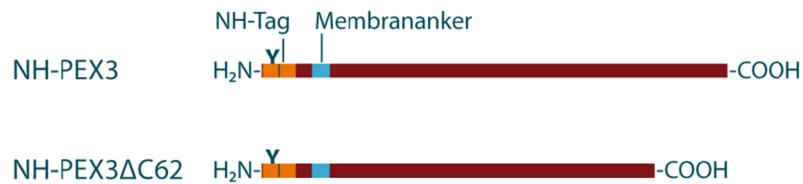
C) Die Proteine wurden in Anwesenheit von 20 μM rPEX19 im Retikulozytenlysat synthetisiert. Anschließend wurde ihre PEX19-Bindung wie in Abbildung 19 mit Ni-NTA-Agarose untersucht.

*: glykosylierte Form der Proteine; A: Ausgang; E: Eluat

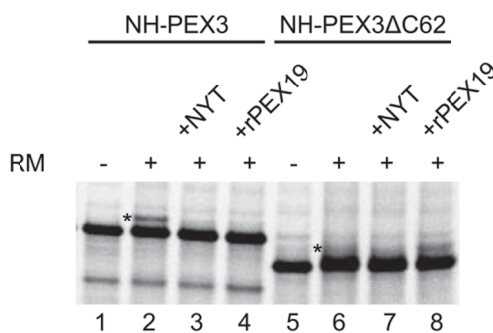
In Anwesenheit von PEX19 war die Glykosylierung von NH-PEX3 gehemmt, wohingegen NH-ScPex22p eine durch PEX19 unveränderte Glykosylierung zeigte (Spur 4 und 8). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis aus dem Bindungsversuch mit Ni-NTA-Agarose. Hier zeigte sich eine direkte Interaktion zwischen PEX22-3 (Chimäre mit dem cytosolischen Teil von PEX3) und rPEX19 (Abb. 21 C, Spur 16), die vergleichbar mit der NH-PEX3:PEX19-Bindung war (Spur 4). Dahingegen konnten NH-ScPex22p und PEX3-22 nicht an rPEX19 binden (Spur 8 und 12). Damit konnte gezeigt werden, dass der cytosolische Teil von PEX3 ausreicht, um die Hemmung des PEX3-Transports durch PEX19 zu vermitteln und diese Hemmung höchstwahrscheinlich auf einer direkten Interaktion zwischen dem cytosolischen Teil von PEX3 und PEX19 beruht.

Als nächstes wurde untersucht, ob die PEX3:PEX19-Interaktion, die zur Hemmung des PEX3-Transports ins ER führt, auf den bekannten Bindungsstellen beruht. Zunächst wurde getestet, ob der vollständige cytosolische Teil von PEX3 für die Interaktion notwendig ist. Der cytosolische Teil des in der peroxisomalen Membran integrierten PEX3 liegt gefaltet in einer kompakten Struktur aus einem Helixbündel vor. Durch C-terminale Verkürzung des NH-PEX3 um 62 Aminosäuren (NH-PEX3 Δ C62, Abb. 22, A) wurde der letzte absteigende Ast des Helixbündels aus Helix 8, 9 und 10 (Schmidt *et al.*, 2010) deletiert. Dieser beinhaltet die in der Bindungstasche liegenden Aminosäuren A323 und K324. NH-PEX3 und NH-PEX3 Δ C62 wurden *in vitro* synthetisiert und nach der Ribosomendepletion für die posttranslationale Translokation mit rauen Mikrosomen und 1 μ M rPEX19 versetzt. NH-PEX3 Δ C62 wurde dabei in die ER-Membran integriert und glykosyliert (Abb. 22 B, Spur 6 *), was durch das kompetitierende Akzeptorpeptid NYT bestätigt wurde (Spur 7). Diese Translokation fand interessanterweise unbeeinflusst von rPEX19 statt (Spur 8), während die Translokation von NH-PEX3 durch PEX19 inhibiert war (Spur 4). Durch die Aufhebung der PEX19-abhängigen Transporthemmung dieser PEX3-Variante war zu vermuten, dass auch die Bindung mit PEX19 nicht funktioniert. Dies wurde untersucht, indem die PEX3-Varianten mit 20 μ M rPEX19 im Ansatz *in vitro* synthetisiert und mit Ni-NTA-Agarose inkubiert wurden. Die über PEX19 an die Agarose gebundenen Proteine wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer eluiert. Wie Abbildung 22 C zeigt, konnte das verkürzte Protein NH-PEX3 Δ C62 tatsächlich nicht mit PEX19 interagieren (Spur 8). NH-PEX3 hatte hingegen an rPEX19 gebunden (Spur 4). Dies zeigt, dass für die PEX3:PEX19-Interaktion beim PEX3-Transport und die dadurch vermittelte Hemmung der PEX3-Integration der vollständige cytosolische Teil von PEX3 vorhanden sein muss.

A)



B)



C)

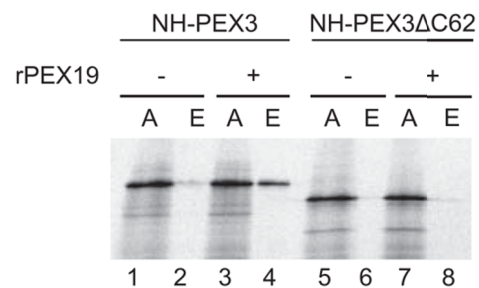


Abb. 22: Für die Hemmung des PEX3-Transports muss der vollständige cytosolische Teil von PEX3 vorhanden sein

A) Schematische Darstellung der untersuchten, C-terminal um 62 Aminosäuren verkürzten PEX3-Variante.

B) NH-PEX3ΔC62 wurde *in vitro* unter Einbau von [³⁵S]-Methionin synthetisiert und für die posttranslationale Translokation mit rauen Mikrosomen und 1 μM rPEX19 bzw. 200 μM Akzeptorpeptid NYT versetzt. Es ist das repräsentative Ergebnis aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

C) Die Proteine wurden in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin und 20 μM rPEX19 synthetisiert und mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde gebundenes Material mit SDS-Probenpuffer eluiert.

*: glykosyliertes Protein; A: Ausgang; E: Eluat

Mit den C-terminalen 62 Aminosäuren von PEX3 wurde ein Teil der Bindungstasche für die N-terminale Helix von PEX19 deletiert. Die Ergebnisse mit NH-PEX3ΔC62 lassen vermuten, dass die Bindung dieser PEX19-Helix für die Hemmung des PEX3-Transports wichtig ist. Um dies zu untersuchen, wurde eine Variante des rekombinanten PEX19 hergestellt, bei der die vollständige N-terminale Bindehelix deletiert wurde (rPEX19ΔN30, Abb. 9). NH-PEX3 wurde *in vitro* translatiert und der posttranslationalen Transport in Anwesenheit von 1 μM rPEX19ΔN30 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass rPEX19ΔN30 im Gegensatz zu rPEX19 tatsächlich keine hemmende Wirkung auf die NH-PEX3-Glykosylierung ausübt (Abb. 23 A). Es war zu vermuten, dass diese rPEX19-Variante das *in vitro* synthetisiert PEX3 auch nicht binden kann. Dies wurde im Bindungsversuch mit Ni-NTA-Agarose bestätigt. NH-PEX3 war

nicht im Eluat mit rPEX19 Δ N30 enthalten (Abb. 23 B). NH-PEX3 konnte also mit der rPEX19-Variante ohne N-terminale Bindehelix *in vitro* nicht interagieren. Dies zeigt, dass die N-terminale Helix des PEX19 wichtig für Hemmung des posttranslationalen PEX3-Transports und die PEX3-Bindung ist.

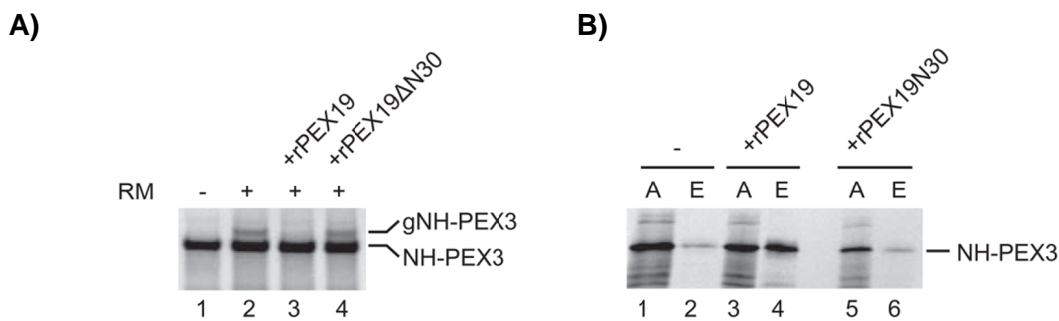


Abb. 23: Die Hemmung des PEX3-Transports wird durch die N-terminale Helix von PEX19 vermittelt

A) Es wurde eine Variante des rekombinanten PEX19 verwendet, bei der die N-terminale PEX3-Bindehelix deletiert wurde (rPEX19 Δ N30, s. Abb. 9). NH-PEX3 wurde im Retikulozytenlysat unter Einbau von [35 S]-Methionin synthetisiert und für die posttranslationale Translokation mit rauen Mikrosomen und 1 μ M rPEX19 oder 1 μ M rPEX19 Δ N30 versetzt. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

B) NH-PEX3 wurde in Anwesenheit von 20 μ M rPEX19 oder rPEX19 Δ N30 im Retikulozytenlysat synthetisiert. Anschließend wurde die PEX19-Bindung mit Ni-NTA-Agarose untersucht.
gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3; A: Ausgang; E: Eluat

Es ist zu vermuten, dass PEX19 mit seiner N-terminalen Helix PEX3 in der bekannten Bindungstasche bindet und dies zur Transporthemmung führt. Deshalb wurde der Einfluss der für die bekannte PEX19-Bindung wichtigsten Aminosäure in dieser Bindungstasche, L93, untersucht. Dafür wurde ein entsprechend mutiertes NH-PEX3(L121N) hergestellt (Abb. 24 A; die Zählung der Aminosäuren beginnt mit dem Start-Methionin vor dem NH-Tag, der 28 Aminosäuren lang ist). mRNA für NH-PEX3 und NH-PEX3(L121N) wurde *in vitro* translatiert. Nach der Ribosomendepletion wurde der Überstand mit radioaktiv markiertem PEX3 für den posttranslationalen Transport mit rauen Mikrosomen und steigenden rPEX19-Konzentrationen versetzt.

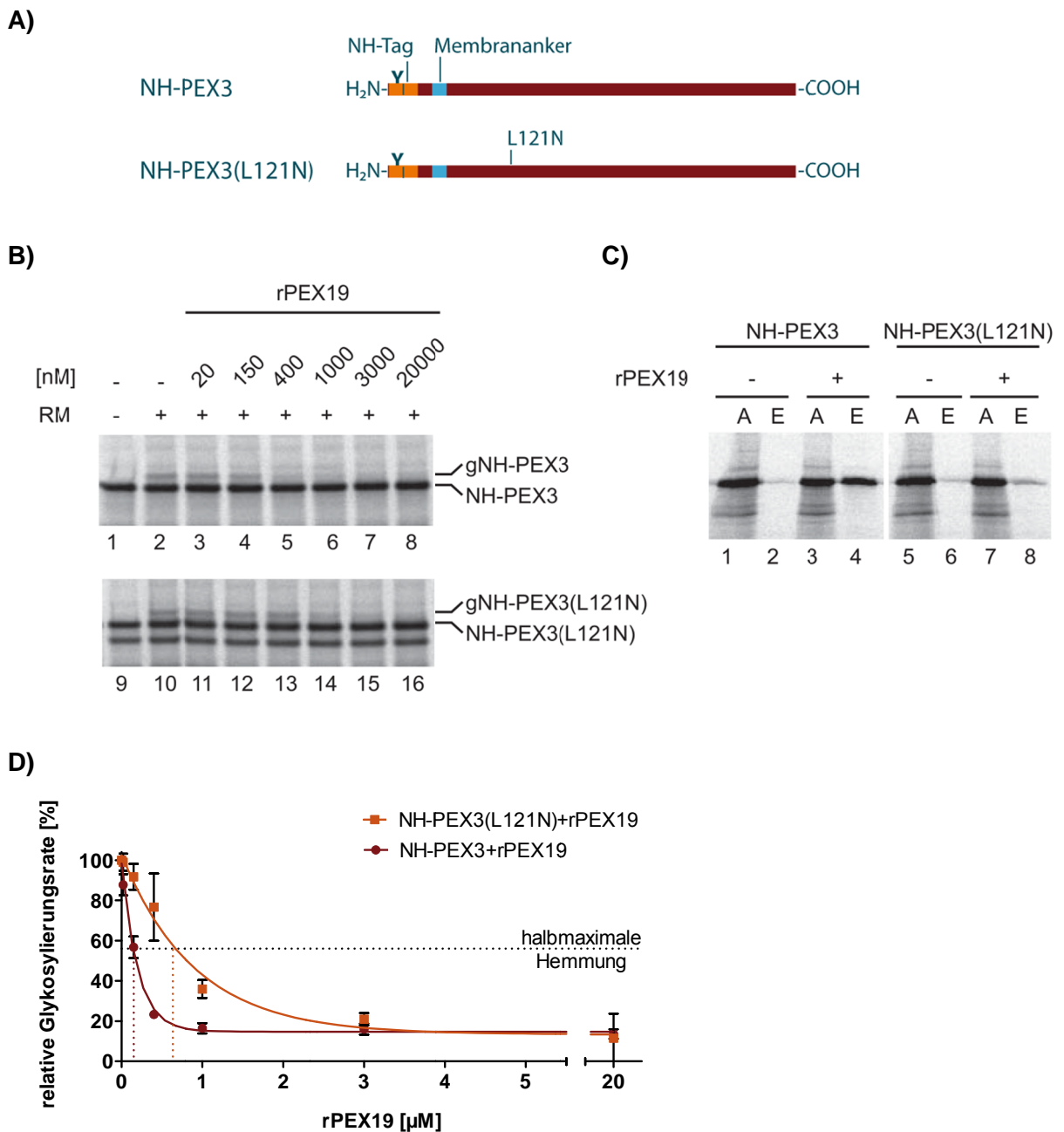


Abb. 24: Eine Punktmutation in der bekannten PEX19-Bindungstasche von PEX3 vermindert die Hemmung des PEX3-Transports

A) Schematische Darstellung des verwendeten PEX3-Proteins mit mutierter PEX19-Bindestelle.

B) NH-PEX3 und NH-PEX3(L121N) wurden *in vitro* in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin synthetisiert und für den posttranslationalen Transport mit rauen Mikrosomen und steigenden rPEX19-Konzentrationen versetzt.

C) Die Proteine wurden *in vitro* in Anwesenheit von 20 µM rPEX19 synthetisiert. Die PEX19-Bindung der synthetisierten Proteine wurde wie in Abbildung 19 mit Ni-NTA-Agarose untersucht.

D) Die relative Glykosylierungsrate der beiden PEX3-Varianten wurde wie in Abbildung 18 berechnet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n=2).

gNH-PEX3: glykosyliertes NH-PEX3; gNH-PEX3(L121N): glykosyliertes NH-PEX3(L121N); A: Ausgang; E: Eluat

NH-PEX3(L121N) wurde durch die rauen Mikrosomen glykosyliert (Abb. 24 B, Spur 10). Mit zunehmender rPEX19-Konzentration nahm auch die Glykosylierungsrate dieser PEX3-Variante ab (Abb. 24 B, Spur 11 bis 16). Interessanterweise war dieser Hemmeffekt des PEX19 jedoch wesentlich schwächer als bei NH-PEX3 (Spur 3 bis 8). Während die NH-PEX3-Glykosylierung bereits mit 400 nM rPEX19 sichtlich reduziert war (Spur 5), war eine Reduzierung der NH-PEX3(L121N)-Glykosylierung erst mit 1 μ M deutlich sichtbar (Spur 14). Die Auswertung von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ergab für die Glykosylierung von NH-PEX3(L121N) eine mittlere inhibitorische Konzentration von ca. 650 nM rPEX19, die deutlich über der IC_{50} von ca. 150 nM rPEX19 für die NH-PEX3-Glykosylierung lag (Abb. 24 D). Übereinstimmend mit den Translokationsergebnissen zeigte NH-PEX3(L121N) im Bindungsversuch mit Ni-NTA-Agarose eine deutlich schlechtere Bindung zu rPEX19 im Vergleich zu NH-PEX3 (Abb. 24 C). Somit ist die Aminosäure L93 des PEX3 auch bei der hier beobachteten PEX19-Bindung wichtig und hat dadurch Einfluss auf die Hemmung des PEX3-Transports durch PEX19. Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, dass die direkte Interaktion zwischen der bekannten Bindungstasche des PEX3 und der N-terminalen Bindungshelix des PEX19 zur Hemmung des posttranslationalen *in vitro* Transports von PEX3 ins ER führt. PEX3 scheint dabei zumindest teilweise gefaltet zu sein.

Bei der direkten Bindung zwischen PEX3 und PEX19 spielt die Farnesylierung von PEX19 keine Rolle (Fransen *et al.*, 2001; Matsuzono *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob die PEX19-Farnesylierung auch bei der beobachteten Transporthemmung verzichtbar ist, wurde eine Variante des rekombinanten PEX19 mit mutierter Farnesylierungsstelle verwendet (rPEX19(C296S), Abb. 9). Falls rPEX19 im Retikulozytenlysat farnesyliert wird, wird dies durch die Mutation verhindert. In den Untersuchungen des posttranslationalen PEX3-Transports konnte beobachtet werden, dass rPEX19(C296S) den Transport von PEX3 ins ER genauso stark hemmt wie rPEX19 (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die PEX19-Farnesylierung bei der Hemmung des PEX3-Transports ins ER, die durch die bekannte PEX3:PEX19-Bindung verursacht wird, nicht notwendig ist.

Zusammenfassend konnte in den Untersuchungen mit humanem PEX3 und PEX19 gezeigt werden, dass PEX19 den posttranslationalen PEX3-Transport in das endoplasmatische Retikulum hemmt und so die *de novo* Biogenese der Peroxisomen herunterreguliert.

3.2.4 Der Transport von Pex3p in das ER der Hefe wird ebenfalls durch Pex19p gehemmt

Die Peroxisomenbiogenese durch Wachstum und Teilung und *de novo* unter Beteiligung des ERs ist stark konserviert. Es ist deshalb vorstellbar, dass die Hemmung des PEX3-Transports ins ER durch PEX19 ebenfalls ein konservierter Mechanismus ist. Um dies zu prüfen, wurde der Transport von ScPex3p in das ER der Hefe *S. cerevisiae* untersucht. Zunächst wurde der posttranslationale Transport einer ScPex3p-Variante mit N-terminalem, diagnostischen Glykosylierungstag (NH-ScPex3p) in die verwendeten rauen Mikrosomen der Hefe getestet.

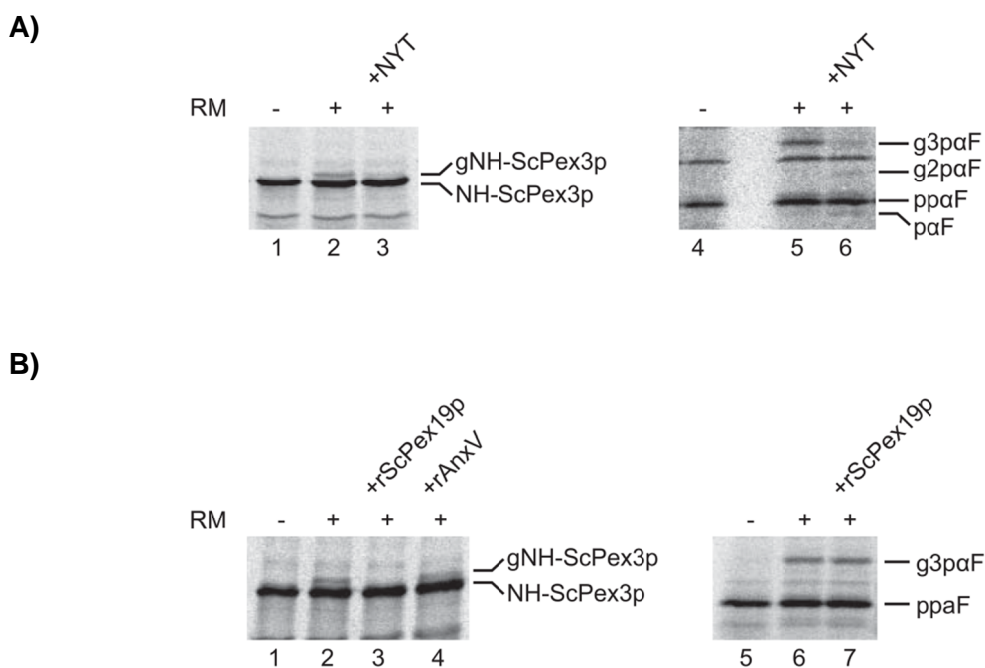


Abb. 25: In der Hefe wird ebenfalls die posttranslationale Pex3p-Translokation durch Pex19p gehemmt

A) Die Hefeproteine Pex3p mit N-terminaler diagnostischer Glykosylierungsstelle (NH-ScPex3p) und Präpro-alpha-Faktor (ppαF) wurden im Retikulozytenlysat synthetisiert und dabei radioaktiv markiert. Nach Translationsinhibition und Ribosomendepletion wurden die Proteine für den posttranslationalen Transport mit 0,45 eq rauen Mikrosomen aus der Hefe versetzt. Zur Überprüfung der Glykosylierung fand die Translokation zusätzlich in Anwesenheit von 100 μM Akzeptorpeptid NYT statt.

B) NH-ScPex3p und ppαF wurden im Retikulozytenlysat synthetisiert und für den posttranslationalen Transport mit rauen Mikrosomen aus der Hefe und 1 μM rekombinantem ScPex19p (s. Abb. 9) versetzt.

gNH-ScPex3p: glykosyliertes NH-ScPex3p; ppαF: Präpro-alpha-Faktor; pαF: Pro-alpha-Faktor; g2pαF: zweifach glykosylierte Form des Pro-alpha-Faktors; g3pαF: dreifach glykosylierte Form des Pro-alpha-Faktors

Dafür wurde NH-ScPex3p *in vitro* im Retikulozytenlysat unter Einbau von radioaktiv markiertem Methionin synthetisiert und nach Translationsinhibition und Ribosomendepletion mit 0,45 eq rauen Mikrosomen aus der Hefe versetzt. NH-ScPex3p wurde dabei in die ER-Membran transportiert und glykosyliert (Abb. 25 A, Spur 2). Die Glykosylierung wurde durch Konkurrenz mit dem Akzeptorpeptid bestätigt (Spur 3). Als Kontrollsubstrat für den posttranslationalen Transport wurde das sekretorische Hefeprotein Präpro-alpha-Faktor (pp α F) verwendet, das während der Translokation ins ER prozessiert und mehrfach glykosyliert wurde (Abb. 25 A, Spur 5 und 6). Für die Untersuchung des Effekts von Pex19p wurde die posttranslationale Translokation in Anwesenheit von rekombinant hergestelltem Pex19p aus der Hefe (rScPex19p, Abb. 9) durchgeführt. Interessanterweise konnte auch hier ein deutlicher Hemmeffekt von Pex19p auf den Pex3p-Transport beobachtet werden. Die Glykosylierung von NH-ScPex3p wurde durch 1 μ M rScPex19p fast vollständig gehemmt (Abb. 25 B, Spur 3). Diese Transporthemmung war spezifisch für Pex3p und Pex19p. Das rekombinante Kontrollprotein rAnxV hatte keinen Einfluss auf die NH-ScPex3p-Glykosylierung (Spur 4) und pp α F wurde unbeeinflusst von rScPex19p transloziert und glykosyliert (Spur 7.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass PEX19 eine konservierte Funktion darin ausübt, den posttranslationalen Transport von PEX3 in das endoplasmatische Retikulum zu verhindern und so die *de novo* Biogenese der Peroxisomen herunterzuregulieren.

4 Diskussion

Peroxisomen sind hochdynamische Organellen, deren Anzahl, Größe und Proteinausstattung an wechselnde Umweltbedingungen angepasst werden müssen (Honsho *et al.*, 2016). Bisherige Erkenntnisse lassen eine komplexe Biogenese vermuten, die eine vielfältige Regulation der verschiedenen Biogenesewege ermöglicht. Gemäß aktuellen Modellen können sich Peroxisomen durch Wachstum und Teilung bestehender Peroxisomen vermehren und *de novo* über das ER entstehen (Hua & Kim, 2016). PEX3 und PEX19 sind in beiden Biogenesewegen wichtige Interaktionspartner. Sie sind für den PMP-Import in die Peroxisomen zuständig und tragen somit zum Wachstum der Peroxisomen bei (Liu *et al.*, 2016). PEX3 initiiert außerdem die *de novo* Biogenese der Peroxisomen am ER, von dem es unter Beteiligung von PEX19 in präperoxisomalen Vesikeln abschnürt (Schmidt *et al.*, 2012). Da es jedoch nicht zwingend über das ER zu den Peroxisomen transportiert werden muss, stellt der PEX3-Transport ins ER einen möglichen Ansatzpunkt zur Regulation der *de novo* Biogenese dar. Vorherige Arbeiten lassen vermuten, dass für PEX3 ein posttranslatonaler Transportweg ins ER existiert und PEX3 außerdem bereits im Cytosol von PEX19 gebunden werden kann (Brauer, 2014; Matsuzaki & Fujiki, 2008; Schmidt *et al.*, 2012; Thoms *et al.*, 2012). Dies führte zu der Hypothese, dass PEX19 den PEX3-Transport ins ER beeinflusst und darüber die *de novo* Biogenese reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde PEX19 als möglicher Regulator der *de novo* Peroxisomenbiogenese untersucht.

4.1 PEX19 hemmt die *de novo* Biogenese der Peroxisomen, jedoch nicht deren Wachstum und Teilung

Zunächst wurden Versuche in peroxisomendefizienten Δ PEX3-Zellen durchgeführt. Durch exogene Expression wurde das zelluläre PEX19-Level während der Komplementation der Zellen erhöht. Es konnte erstmals gezeigt, dass PEX19 die *de novo* Biogenese der Peroxisomen in komplementierten Δ PEX3-Zellen hemmt (Abb. 5). Durch Verwendung unterschiedlich starker Promotoren und einer zeitlichen Versetzung der PEX19-Expression zur komplementierenden PEX3-Expression konnte weiter gezeigt werden, dass diese Hemmung von der Konzentration des PEX19 abhängig ist. Durch eine vorgezogene PEX19-Expression wurde das erhöhte PEX19-Level bereits vor der Komplementation in den Zellen

hergestellt. In diesen Zellen war die *de novo* Biogenese der Peroxisomen so stark beeinträchtigt, dass nur noch wenige peroxisomenpositive Zellen unter ihnen zu finden waren (Abb. 7). Diejenigen Zellen, die jedoch Peroxisomen bilden konnten, zeigten eine vergleichbare Peroxisomenzahl wie die Zellen, die PEX19 endogen exprimierten (nicht gezeigt). Die Anzahl lag wie in den cotransfizierten Zellen bei etwa 80 Peroxisomen pro Zelle (Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellen nach erfolgreicher, initialer *de novo* Biogenese ihre Peroxisomenpopulation trotz hoher PEX19-Konzentration aufbauen und aufrechterhalten können. Daraus lässt sich schließen, dass PEX19 die initiale *de novo* Biogenese der Peroxisomen in Δ PEX3-Zellen beeinträchtigt und diese hierdurch langsamer abläuft, die Peroxisomenbiogenese über Wachstum und Teilung jedoch nicht durch hohe PEX19-Konzentrationen gestört wird. Auch in Wildtypzellen konnten sich die Peroxisomen ungestört von einer hohen PEX19-Konzentration vermehren (Abb. 6). Da sich die humanen Fibroblasten unter Zellkulturbedingungen einmal am Tag teilen, müssen sie für die Aufrechterhaltung einer konstanten Peroxisomenpopulation auch ihre Peroxisomen innerhalb von 24 Stunden mindestens verdoppeln. Die tatsächliche Anzahl der neu zu bildenden Peroxisomen liegt in kultivierten Zellen noch höher. In CHO-Zellen wurde für Peroxisomen eine Halbwertszeit von etwa zwei Tagen ermittelt (Huybrechts *et al.*, 2009). Huybrechts *et al.* (2009) zeigten, dass sich Peroxisomen in Wildtypzellen über Wachstum und Teilung vermehren, wohingegen Kim *et al.* (2006) aus ihren Ergebnissen schlossen, dass neue Peroxisomen hauptsächlich *de novo* über das ER entstehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Erkenntnis von Huybrechts *et al.* (2009) und die allgemeine Annahme, dass die Peroxisomenbiogenese in Wildtypzellen maßgeblich über Wachstum und Teilung abläuft. Die Wildtypzellen hatten im Mittel 200 Peroxisomen, was ein normaler Wert für kultivierte Zellen ist (Aranovich *et al.*, 2014; Huybrechts *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Valm *et al.*, 2017). Es war auffällig, dass die Anzahl der Peroxisomen innerhalb eines Ansatzes großen Schwankungen unterlegen war (Abb. 6). Aus den Ergebnissen von Huybrechts *et al.* (2009) lässt sich erkennen, dass hohe Schwankungen der Peroxisomenzahl auch in CHO-Zellen zu beobachten sind. Die Schwankungen können unter anderem dadurch entstehen, dass die Zellen nicht synchronisiert sind und sich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden. Vor der Zellteilung werden die Peroxisomen der Mutterzelle verdoppelt und bei der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt (Jongsma *et al.*, 2015; Wiemer *et al.*, 1997). Direkt nach der Zellteilung haben die zwei Tochterzellen natürlicherweise durchschnittlich halb so viele Peroxisomen wie ihre Mutterzelle.

4.2 PEX19 hemmt die *de novo* Biogenese, indem es den Eintritt von PEX3 ins ER während des posttranslationalen Transports verhindert

Nachdem in Δ PEX3-Zellen gezeigt wurde, dass PEX19 einen negativen Einfluss auf die *de novo* Biogenese der Peroxisomen hat, wurde der mögliche Mechanismus der Hemmung untersucht. Es wurde vermutet, dass PEX19 die *de novo* Biogenese hemmt, indem es PEX3 im Cytosol bindet und dessen Eintritt ins ER verhindert. In *in vitro* Versuchen mit rekombinantem PEX19 konnte gezeigt werden, dass der PEX3-Transport ins ER in einem Translations- und Transportansatz durch PEX19 tatsächlich vermindert wird. In diesem Translations- und Transportansatz ist generell ein cotranslationaler sowie posttranslationaler Transport von Proteinen ins ER möglich. Bisherige Untersuchungen lassen vermuten, dass PEX3 über beide Transportwege ins ER transportiert werden kann. Deshalb wurde getestet, ob der durch PEX19 gehemmte PEX3-Transport cotranslational oder posttranslational abläuft. Der mögliche Einfluss von PEX19 auf einen cotranslationalen PEX3-Transport wurde mit einer cotranslational ins ER gezwungenen PEX3-Variante und mit PEX3-Translationsintermediaten untersucht. In diesen Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass PEX19 den PEX3-Transport ins ER hemmen kann, wenn dieser cotranslational abläuft. Dahingegen konnte unter strikt posttranslationalen Bedingungen gezeigt werden, dass PEX3 in die ER-Membran integriert wird und PEX19 diese Integration verhindert. Dabei waren die Hemmkurven in beiden Transportansätzen vergleichbar. Die IC_{50} lag im Translations- und Transportansatz bei 100 nM und im posttranslationalen Transportansatz bei 200 nM PEX19. Mayerhofer *et al.* (2016) untersuchten den PEX3-Transport ins ER mit Translationsintermediaten. Sie konnten zeigen, dass die kurzen, ribosomengebundenen PEX3-Peptide mit SRP interagieren, sobald der Membrananker aus dem Ribosom ragt. Außerdem fanden sie heraus, dass eine Interaktion dieser Translationsintermediate mit Sec61 in der ER-Membran nur in Anwesenheit von SRP stattfinden kann. Aus diesen Ergebnissen schlossen sie, dass das Volllängenprotein PEX3 nur cotranslational ins ER transportiert werden kann. Sie testeten nicht, ob ein posttranslationaler Transport von PEX3 möglich ist. Dagegen weisen Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe darauf hin, dass für PEX3 auch ein posttranslationaler Transportweg existiert. (Brauer, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass PEX19 den posttranslationalen PEX3-Transport ins ER hemmt. Unter Bedingungen, unter denen beide Transportwege möglich sind, tritt diese Hemmung, gleichermaßen auf wie unter strikt posttranslationalen Bedingungen. Ein im Translations- und Transportansatz stattfindender cotranslationaler Transport wäre durch PEX19 jedoch nicht gehemmt. Dies

wäre im Vergleich der Hemmkurven in beiden Transportansätzen sichtbar. Ein cotranslatinaler Transport von PEX3 kann somit ausgeschlossen werden. Das bedeutet, dass PEX3 auch unter Bedingungen, die prinzipiell einen cotranslatinalen Proteintransport zulassen, ausschließlich posttranslatinal in die ER-Membran transportiert wird.

PEX3-Varianten, die durch Vorschalten des Signalpeptids von Präprolaktin oder Präcalreticulin über das ER geleitet werden, sind in der Lage peroxisomendefiziente Δ PEX3-Zellen zu komplementieren (Aranovich *et al.*, 2014; Toro *et al.*, 2009). Da das Vorschalten der pPI-Signalsequenz das PEX3 *in vitro* in den cotranslatinalen Transportweg zwingt, ist es wahrscheinlich, dass dies auch in der Zelle zum cotranslatinalen PEX3-Transport führt. Mit einer PEX3-Variante, die in der Zelle cotranslatinal ins ER transportiert wird, könnte der hier postulierte Regulationsmechanismus der *de novo* Peroxisomenbiogenese in lebenden Zellen überprüft werden. Die Translokation von PEX3 kann während eines cotranslatinalen Transports nicht durch PEX19 gehemmt werden. So dürfte die *de novo* Peroxisomenbiogenese in Zellen, die ein solches PEX3-Protein exprimieren, von der zellulären PEX19-Konzentration unbeeinflusst sein. Außerdem ist anzunehmen, dass das endogene PEX19 in Δ PEX3-Zellen bereits ausreicht, um den PEX3-Transport ins ER in gewissem Maße zu hemmen. Demnach müsste die Expression eines cotranslatinal ins ER transportierten PEX3 in Δ PEX3-Zellen zu einer verbesserten *de novo* Biogenese der Peroxisomen führen. Ob Zellen mit einem cotranslatinal ins ER transportierten PEX3 schneller komplementiert werden als mit Wildtyp-PEX3, wurde in den bisherigen Arbeiten nicht untersucht.

Bisher ist für Membranproteine des Säugers, außer für *tail-anchored* Proteine, kein posttranslatinaler Transport in das endoplasmatische Retikulum beschrieben worden (Shao & Hegde, 2011). Der strikt posttranslatinale Transport stellt somit eine Besonderheit für das peroxisomale Protein PEX3 dar. Durch den posttranslatinalen Transport des PEX3, sowohl zu den Peroxisomen als auch zum ER, ist eine Regulation durch PEX19, welchen Transportweg neu synthetisiertes PEX3 nimmt, erst möglich (Abb. 14 und 15). Das Pex3p der Hefe teilt mit humanem PEX3 die Besonderheit, dass es posttranslatinal in die Membran des endoplasmatischen Retikulums transportiert wird (Brauer, 2014; Thoms *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Gemeinsamkeit und der im Säuger und in der Hefe konservierten Peroxisomenbiogenese liegt die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit beobachtete Regulation der Peroxisomenbiogenese durch PEX19 ein konservierter Mechanismus ist. Deshalb wurde *in vitro* untersucht, ob die Hemmung des ScPex3p-Transports in das ER der

Hefe durch ScPex19p ebenso auftritt wie im untersuchten Säugersystem. Tatsächlich konnte auch im Hefesystem eine Hemmung beobachtet werden (Abb. 25), was ein Hinweis darauf ist, dass diese Funktion des PEX19 konserviert ist. Die Transporthemmung beruht in der Hefe wahrscheinlich ebenfalls auf einer direkten Pex3p:Pex19p-Bindung. Die zwei Hefeproteine zeigten eine spezifische Interaktion im *in vitro* System, die vergleichbar zu der der Säugerproteine war (nicht gezeigt). Es bleibt zu untersuchen, ob dies auch in Hefezellen zu einer gehemmten *de novo* Biogenese der Peroxisomen führt und ob die Regulation der *de novo* Biogenese durch PEX19 konserviert ist.

4.3 Der posttranslationale PEX3-Transport ins ER wird durch die bekannte PEX3:PEX19-Bindung verhindert

Beim posttranslationalen Transport liegt PEX3 vollständig synthetisiert im Cytosol vor und ist dadurch vollständig für PEX19 zugänglich. In Untersuchungen des *in vitro* Transports und der Proteinbindung konnte gezeigt werden, dass die direkte Interaktion zwischen PEX3 und PEX19 zur Inhibierung des posttranslationalen PEX3-Transports ins ER führt. Dabei wird die Bindung durch die bekannten Bindestellen im cytosolischen Teil von PEX3 und in der N-terminalen Helix von PEX19 vermittelt. PEX19 zeigte im PEX3-Transport eine IC_{50} von etwa 150 nM, was ein Hinweis darauf ist, dass die hier relevante PEX3:PEX19-Bindung eine zu bisherigen Messwerten vergleichbare Affinität hat. Die bisher gemessenen Dissoziationskonstanten der PEX3:PEX19-Bindung liegen im unteren nanomolaren bis mikromolaren Bereich (Pinto *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2010).

Die N-terminale PEX19-Helix bindet allein mit hoher Affinität an PEX3 (Schmidt *et al.*, 2012). Untersuchungen mit der N-terminalen Helix und dem Volllängenprotein lassen weitere, die Bindung zu PEX3 unterstützende Interaktionen im PEX19 C-Terminus vermuten. Kurze N-terminale Peptide von PEX19, die die Bindehelix beinhalten, zeigten geringere Affinitäten zu PEX3 als das Volllängenprotein (Sato *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2010). Hattula *et al.* (2014) untersuchten die PEX3:PEX19-Bindung über Wasserstoff-Deuterium-Austauschmessungen mittels Massenspektrometrie und schlossen aus ihren Ergebnissen auf eine kooperative Bindung. Demzufolge wird höchstwahrscheinlich die initiale Bindung durch die N-terminale Helix von PEX19 mit der Bindungstasche auf der membranabgewandten Seite des Helixbündels von PEX3 vermittelt. Dies führt anschließend zu Konformations-

änderungen im C-Terminus von PEX19 und einer Bindung zu PEX3 mit höherer Affinität. Es ist denkbar, dass diese kooperative Bindung auch bei der Hemmung des PEX3-Transports ins ER relevant ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass der globuläre Teil von PEX19 den Transport sterisch hindert. Dies könnte mit einer Proteinchimäre, in der der globuläre Teil von PEX19 durch ein anderes globuläres Protein ersetzt ist, untersucht werden. Hierfür könnte die N-terminale Helix mit C-terminal angefügtem GFP verwendet werden. Wenn diese Proteinchimäre ausreichend an PEX3 bindet, könnte sie in den *in vitro* Transport von PEX3 eingesetzt werden und Aufschluss über die Funktion des globulären Proteinteils von PEX19 bei der Hemmung des PEX3-Transport ins ER geben.

4.4 Modell der Regulation der Peroxisomenbiogenese durch PEX19

In komplementierten Δ PEX3-Zellen konnte hier gezeigt werden, dass PEX19 die *de novo* Biogenese der Peroxisomen in humanen Zellen hemmt. Des Weiteren wurde in *in vitro* Translokationsstudien der Mechanismus dieser Hemmung geklärt. Dabei bindet PEX19 über die bekannten Bindungsstellen an neu synthetisiertes PEX3 im Cytosol, bevor dieses posttranslational in die ER-Membran integrieren und dort die *de novo* Biogenese initiieren kann. Δ PEX3-Zellen besitzen kein funktionelles PEX3-Protein, wodurch diese Zellen keine Peroxisomen bilden können (Muntau *et al.*, 2000). Es ist zu vermuten, dass die Signalwege für die Peroxisomenbiogenese in den Zellen aufgrund der fehlenden Peroxisomen angeschaltet sind. Ihr PEX19-Level entspricht dabei etwa dem der Wildtypzellen (Abb. 4). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Zelle ihre absolute PEX19-Konzentration nicht herunter reguliert, wenn die *de novo* Biogenese hoch reguliert werden soll. Da für die Bindung des PEX3 im Cytosol freies PEX19 benötigt wird, ist es denkbar, dass die *de novo* Biogenese über die Konzentration des freien PEX19 reguliert wird. In einem hypothetischen Modell wird ein sich selbst regulierendes Gleichgewicht zwischen den zwei Peroxisomenbiogenesewegen vorgeschlagen (Abb. 26). Demnach ist die Konzentration an freiem PEX19 in der Zelle unter normalen Wachstumsbedingungen hoch. Neu synthetisiertes PEX3 wird größtenteils durch PEX19 gebunden, dadurch am Eintritt ins ER gehindert, und integriert stattdessen direkt in die peroxisomale Membran. Geringe Mengen an PEX3 finden den Weg über das ER zu den Peroxisomen (Abb. 26, 1.).

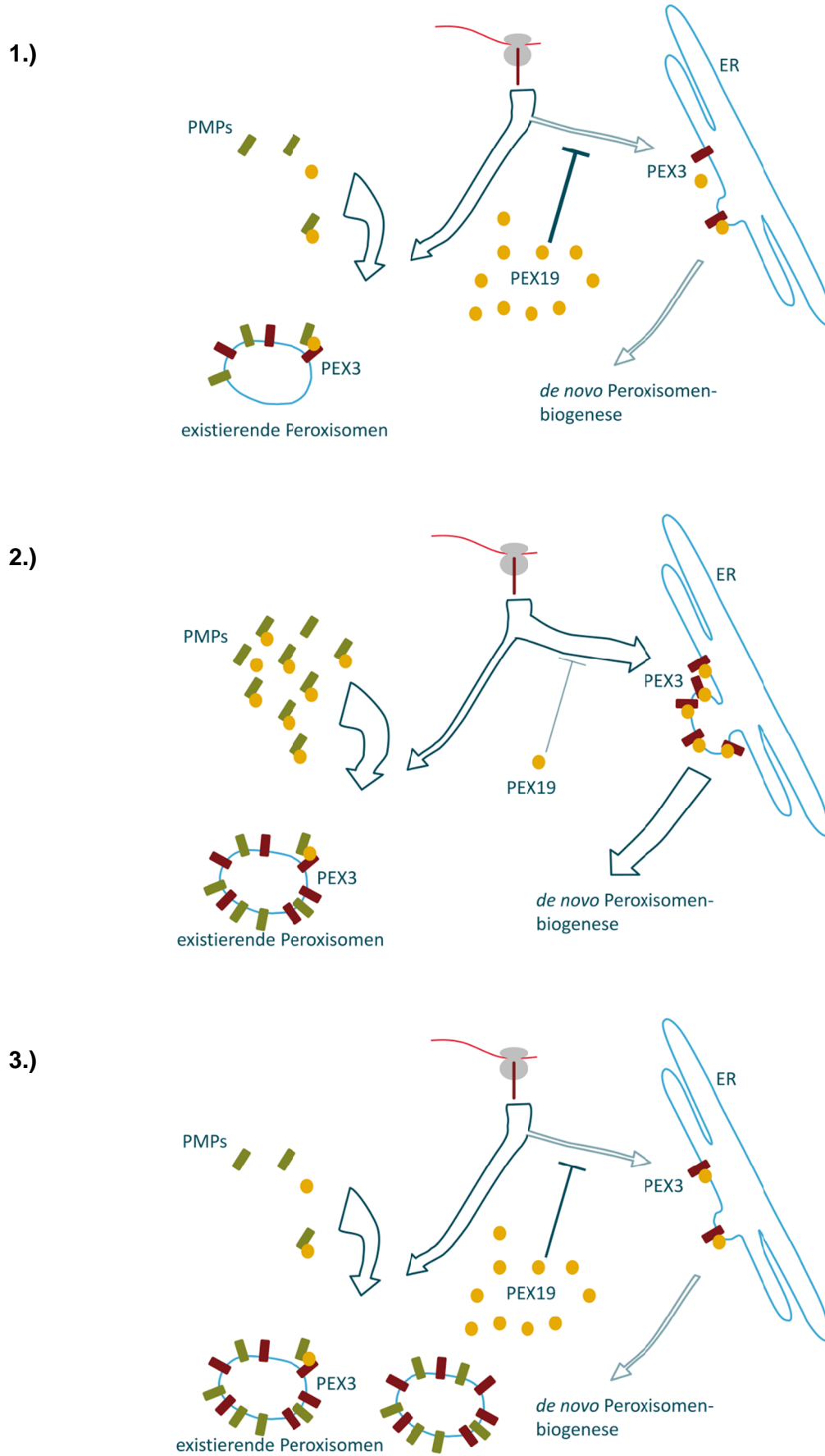


Abb. 26: Modell Regulation der Peroxisomenbiogenese durch PEX19 (Erläuterung s. Text)

Treten nun Bedingungen auf, unter denen die Zelle eine stark erhöhte Anzahl an Peroxisomen benötigt, wird PEX19 in seinen vielfältigen Funktionen beschäftigt und gebunden. Zum Beispiel werden PMPs in höherem Ausmaß synthetisiert, sodass mehr PEX19 in der PMP-Bindung benötigt wird. Für die Abschnürung präperoxisomaler Vesikel wird PEX19 zum ER rekrutiert. Insgesamt sinkt dadurch die Konzentration an freiem PEX19 und weniger des neu synthetisierten PEX3 liegt PEX19-gebunden vor. Dies öffnet den ER-Weg für PEX3, das nun überwiegend in die ER-Membran integriert und die *de novo* Biogenese der Peroxisomen induziert (Abb. 26, 2.). Nachdem die Zelle die benötigten Peroxisomen vermehrt hat, tritt wieder ein Grundzustand ein, in dem PEX19 nur geringfügig beschäftigt ist, wieder vorwiegend frei im Cytosol vorliegt und durch Bindung den PEX3-Transport ins ER hemmt (Abb. 26, 3.). Auf diese Weise ist es der Zelle möglich, schnell auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren, die mehr Peroxisomen erfordern.

5 Literaturverzeichnis

Aranovich A, Hua R, Rutenberg AD, Kim PK (2014): PEX16 contributes to peroxisome maintenance by constantly trafficking PEX3 via the ER. *J Cell Sci* 127, 3675-3686.

Blobel G, Dobberstein B (1975): Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67(3), 835-851.

Borgese N, Fasana E (2011): Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta* 1808(3), 937-946.

Brauer I (2014): Über den Transport von peroxisomalen Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum. In Institut für Biologie, Universität zu Lübeck (Dissertationsschrift).

Breitling J, Aebi M (2013): N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(8), a013359.

De Duve C, Baudhuin P (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological reviews* 46(2), 323-357.

Emmanouilidis L, Schutz U, Tripsianes K, Madl T, Radke J, Rucktaschel R, Wilmanns M, Schliebs W, Erdmann R, Sattler M (2017): Allosteric modulation of peroxisomal membrane protein recognition by farnesylation of the peroxisomal import receptor PEX19. *Nature communications* 8, 14635.

Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ (2004): PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164(6), 863-875.

Ferreira JP, Peacock RW, Lawhorn IE, Wang CL (2011): Modulating ectopic gene expression levels by using retroviral vectors equipped with synthetic promoters. *Systems and synthetic biology* 5(3-4), 131-138.

Fransen M, Wylin T, Brees C, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP (2001): Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol Cell Biol* 21(13), 4413-4424.

Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982): Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93(1), 97-102.

Fujiki Y, Yagita Y, Matsuzaki T (2012): Peroxisome biogenesis disorders: molecular basis for impaired peroxisomal membrane assembly: in metabolic functions and biogenesis of peroxisomes in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822(9), 1337-1342.

Girzalsky W, Saffian D, Erdmann R (2010): Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta* 1803(6), 724-731.

Gorlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA (1992): A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71(3), 489-503.

Gotte K, Girzalsky W, Linkert M, Baumgart E, Kammerer S, Kunau WH, Erdmann R (1998): Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18(1), 616-628.

Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989): A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108(5), 1657-1664.

Halbach A, Rucktaschel R, Rottensteiner H, Erdmann R (2009): The N-domain of Pex22p can functionally replace the Pex3p N-domain in targeting and peroxisome formation. *J Biol Chem* 284(6), 3906-3916.

Hasan S, Platta HW, Erdmann R (2013): Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front Physiol* 4, 261.

Hattula K, Hirschberg D, Kalkkinen N, Butcher SJ, Ora A (2014): Association between the Intrinsically Disordered Protein PEX19 and PEX3. *PLoS one* 9(7), e103101.

Honsho M, Yamashita S, Fujiki Y (2016): Peroxisome homeostasis: Mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1863(5), 984-991.

Hua R, Kim PK (2016): Multiple paths to peroxisomes: Mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1863(5), 881-891.

- Huybrechts SJ, Van Veldhoven PP, Brees C, Mannaerts GP, Los GV, Franssen M (2009): Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. *Traffic* 10(11), 1722-1733.
- Islinger M, Grille S, Fahimi HD, Schrader M (2012): The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol* 137(5), 547-574.
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ (2004): PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164(1), 57-67.
- Jongsma ML, Berlin I, Neefjes J (2015): On the move: organelle dynamics during mitosis. *Trends in cell biology* 25(3), 112-124.
- Kalies K-U, Hartmann E (1998): Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER) Two similar routes with different modes. *European Journal of Biochemistry* 254(1), 1-5.
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U, 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(4), 521-532.
- Kragt A, Voorn-Brouwer T, van den Berg M, Distel B (2005): Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a *Saccharomyces cerevisiae* pex3Delta strain. *J Biol Chem* 280(40), 34350-34357.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.
- Lazarow PB, Fujiki Y (1985): Biogenesis of peroxisomes. *Annual review of cell biology* 1, 489-530.
- Liu Y, Yagita Y, Fujiki Y (2016): Assembly of Peroxisomal Membrane Proteins via the Direct Pex19p-Pex3p Pathway. *Traffic* 17(4), 433-455.
- Martoglio B, Dobberstein B (1998): Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in cell biology* 8(10), 410-415.
- Matsuzaki T, 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(7), 1275-1286.

- Matsuzono Y, Fujiki Y (2006): In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p. *J Biol Chem* 281(1), 36-42.
- Matsuzono Y, Kinoshita N, Tamura S, Shimozawa N, Hamasaki M, Ghaedi K, Wanders RJ, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y (1999): Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5), 2116-2121.
- Matsuzono Y, Matsuzaki T, Fujiki Y (2006): Functional domain mapping of peroxin Pex19p: interaction with Pex3p is essential for function and translocation. *J Cell Sci* 119(Pt 17), 3539-3550.
- Mayerhofer PU, Bano-Polo M, Mingarro I, Johnson AE (2016): Human peroxin PEX3 is co-translationally integrated into the ER and exits the ER in budding vesicles. *Traffic* 17(2), 117-130.
- Mayerhofer PU, Kattenfeld T, Roscher AA, Muntau AC (2002): Two splice variants of human PEX19 exhibit distinct functions in peroxisomal assembly. *Biochemical and biophysical research communications* 291(5), 1180-1186.
- Mohanty A, McBride HM (2013): Emerging roles of mitochondria in the evolution, biogenesis, and function of peroxisomes. *Front Physiol* 4, 268.
- Muntau AC, Mayerhofer PU, Paton BC, Kammerer S, Roscher AA (2000): Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G. *American journal of human genetics* 67(4), 967-975.
- Novikoff PM, Novikoff AB (1972): Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *J Cell Biol* 53(2), 532-560.
- Park E, Rapoport TA (2012): Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys* 41, 21-40.
- Pinto MP, Grou CP, Alencastre IS, Oliveira ME, Sa-Miranda C, Fransen M, Azevedo JE (2006): The import competence of a peroxisomal membrane protein is determined by Pex19p before the docking step. *J Biol Chem* 281(45), 34492-34502.

- Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Liu Y, Gould SJ (2000): PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* 148(5), 931-944.
- Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, Nakano H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H (2010): Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *EMBO J* 29(24), 4083-4093.
- Schagger H, von Jagow G (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166(2), 368-379.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, *et al.* (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9(7), 676-682.
- Schmidt F, Dietrich D, Eylestein R, Groemping Y, Stehle T, Dodt G (2012): The role of conserved PEX3 regions in PEX19-binding and peroxisome biogenesis. *Traffic* 13(9), 1244-1260.
- Schmidt F, Treiber N, Zocher G, Bjelic S, Steinmetz MO, Kalbacher H, Stehle T, Dodt G (2010): Insights into peroxisome function from the structure of PEX3 in complex with a soluble fragment of PEX19. *J Biol Chem* 285(33), 25410-25417.
- Schrader M, Costello JL, Godinho LF, Azadi AS, Islinger M (2016): Proliferation and fission of peroxisomes - An update. *Biochim Biophys Acta* 1863(5), 971-983.
- Schueller N, Holton SJ, Fodor K, Milewski M, Konarev P, Stanley WA, Wolf J, Erdmann R, Schliebs W, Song YH, *et al.* (2010): The peroxisomal receptor Pex19p forms a helical mPTS recognition domain. *Embo J* 29(15), 2491-2500.
- Shai N, Schuldiner M, Zalckvar E (2016): No peroxisome is an island - Peroxisome contact sites. *Biochim Biophys Acta* 1863(5), 1061-1069.
- Shao S, Hegde RS (2011): Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 25-56.

Shrimal S, Cherepanova NA, Gilmore R (2015): Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Seminars in cell & developmental biology* 41, 71-78.

Soukupova M, Sprenger C, Gorgas K, Kunau WH, Dodt G (1999): Identification and characterization of the human peroxin PEX3. *Eur J Cell Biol* 78(6), 357-374.

South ST, Gould SJ (1999): Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol* 144(2), 255-266.

Sugiura A, Mattie S, Prudent J, McBride HM (2017): Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes. *Nature* 542(7640), 251-254.

Thoms S, Harms I, Kalies KU, Gartner J (2012): Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic* 13(4), 599-609.

Titorenko VI, Mullen RT (2006): Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J Cell Biol* 174(1), 11-17.

Titorenko VI, Rachubinski RA (2001): The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(5), 357-368.

Toro AA, Araya CA, Cordova GJ, Arredondo CA, Cardenas HG, Moreno RE, Venegas A, Koenig CS, Cancino J, Gonzalez A, *et al.* (2009): Pex3p-dependent peroxisomal biogenesis initiates in the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry* 107(6), 1083-1096.

Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J (2017): Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* 546(7656), 162-167.

Vastiau IM, Anthonio EA, Brams M, Brees C, Young SG, Van de Velde S, Wanders RJ, Mannaerts GP, Baes M, Van Veldhoven PP, *et al.* (2006): Farnesylation of Pex19p is not essential for peroxisome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63(14), 1686-1699.

von Heijne G (1983): Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European journal of biochemistry / FEBS* 133(1), 17-21.

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

Wanders RJ, Waterham HR (2006): Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763(12), 1707-1720.

Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJ (2016): Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1863(5), 922-933.

Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, Subramani S (1997): Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol* 136(1), 71-80.

Zimmermann R, Eyrich S, Ahmad M, Helms V (2011): Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808(3), 912-924.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalente
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetales Kälberserum
fwd	<i>forward</i> , Richtungsbezeichnung bei PCR-Primern
GFP/eGFP	grünfluoreszierendes Proteine/ <i>enhanced GFP</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M/ μ M/nM	Molar/Mikromolar/Nanomolar (Einheiten für Stoffmengenkonzentration)
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
mPTS	PTS für Membranproteine
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NP-40	Tergitol NP-40
PBD	Peroxisomenbiogenese-Störung (<i>peroxisome biogenesis disorder</i>)
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion

PEX	Peroxin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Proteaseinhibitor
PMP	peroxisomales Membranprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppαF	Präpro-alpha-Faktor
pPl	Präprolaktin
PTS	peroxisomales Targetingsignal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rAnxV	rekombinantes Annexin V
rev	<i>reverse</i> , Richtungsbezeichnung bei PCR-Primern
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RM	raue Mikrosomen
RNC	Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (<i>ribosome-nascent chain complex</i>)
rNTPs	Ribonukleosidtriphosphat
rPEX19	rekombinantes Peroxin 19
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKL	Aminosäuresequenz Serin-Lysin-Leucin
SRP	<i>signal recognition particle</i>
ss	Signalsequenz
TBT	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Einzyeinheit
UTR	untranslatierte Region
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Enno Hartmann bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Biologie anfertigen zu können und für sein Interesse und die Unterstützung für diese Arbeit.

Ich danke Herrn PD Dr. Kai-Uwe Kalies für die Vergabe dieses interessanten Themas und für seine Unterstützung während der gesamten Zeit, die vor allem durch seine kritische Betrachtung zum Vorrankommen des Projekts, guten Ergebnissen und meiner wissenschaftlichen Weiterentwicklung beitrug.

Frau Prof. Dr. Gabriele Dodt danke ich für die Überlassung der humanen Zellen.

Bei Frau Prof. Dr. Christine Klein und ihren Mitarbeitern Dr. Aleksandar Rakovic und Victor Krajka aus dem Institut für Neurogenetik bedanke ich mich für die Nutzung des Laser-Scanning-Mikroskops sowie für die technische Unterstützung und interessante Gespräche.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter König aus dem Institut für Anatomie für die Nutzung des Epifluoreszenzmikroskops.

Herrn Prof. Dr. Norbert Tautz danke ich für die Gutachtertätigkeit.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Biologie und des Isotopenlabors für technische und nichttechnische Hilfe, das Interesse an meiner Arbeit und die vielen fachlichen und nichtfachlichen Gespräche, die mich in manchen Situationen zum Durchhalten motiviert haben. Zudem danke ich Katja Andruleit für die unermüdliche Klonierungshilfe vor allem bei den pVitro-Klonierungen.

Vielen Dank an Sebastian, meine Familie und Freunde für das Zuhören, die Ermutigungen, den Rückhalt und jegliche andere Unterstützung.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Lübeck, den 29. Oktober 2018

Katharina Haupenthal