

**Funktionsstudien mit dem *in situ*  
mono-ubiquitinierten peroxisomalen  
Importrezeptor PEX5**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Vera Hagmann geb. Sippel  
aus Stuttgart

Tübingen  
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

3. Dezember 2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gabriele Dodt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dirk Schwarzer

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:  
„Funktionsstudien mit dem *in situ* mono-ubiquitinierten peroxisomalen Importrezeptor PEX5“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Tübingen, den 11. November 2015



Man muss das Unmögliche versuchen, um das Mögliche zu erreichen.  
Hermann Hesse



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
------------------------------	-----------

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
----------------------------	------------

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>viii</b>
------------------------------	-------------

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
---------------------	----------

1.1 Die Entdeckung und Funktionen von Peroxisomen . . . . .	1
---	---

1.2 Der Import peroxisomaler Matrixproteine . . . . .	1
---	---

1.2.1 Das peroxisomale Targetingsignal (PTS) peroxisomaler Matrixproteine . . . . .	3
---	---

1.2.2 Der PTS1-Rezeptor PEX5 . . . . .	3
--	---

1.2.3 Der PTS2-Rezeptor PEX7 . . . . .	4
--	---

1.3 Der peroxisomale Dockingkomplex . . . . .	5
---	---

1.3.1 Die Membraninsertion von PEX5 und Translokation des Cargos . . . . .	6
--	---

1.4 Markierung von PEX5 für den Export und die Rolle der RING-Finger-Proteine . . . . .	7
---	---

1.4.1 Ubiquitinierung . . . . .	8
---------------------------------	---

1.4.2 Die RING-Finger Proteine PEX2, PEX10, PEX12 . . . . .	9
---	---

1.5 Der Export von mono-ubiquitiniertem PEX5 . . . . .	9
--	---

1.6 Der Exportkomplex . . . . .	10
---------------------------------	----

1.6.1 Allgemeines zu AAA+-ATPasen . . . . .	10
---	----

1.6.2 Der PEX1/PEX6-Komplex . . . . .	11
---------------------------------------	----

1.6.2.1 Die AAA+-ATPase PEX1 . . . . .	11
--	----

1.6.2.2 Die AAA+-ATPase PEX6 . . . . .	11
--	----

1.6.2.3 Strukturelle Aspekte der AAA+-ATPasen PEX1 und PEX6 . . . . .	12
---	----

1.6.3 Das peroxisomale Membranprotein PEX26 . . . . .	13
---	----

1.7 Deubiquitinierung von mUb-PEX5 . . . . .	13
--	----

1.8 Mono-ubiquitiniertes PEX5 als Grundlage weiterer Studien für den Export . . . . .	13
---	----

1.9 Ein Überblick über die Klickchemie . . . . .	14
--	----

1.9.1 Cycloaddition von Aziden und Alkinen . . . . .	14
--	----

1.9.2 Chemische Modifizierung von PEX5 zu einem PEX5-Azid . . . . .	16
---	----

1.9.2.1 Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine . . . . .	16
--	----

1.9.3 Chemische Modifizierung von Ubiquitin zu einem Ubiquitin-Alkin . . . . .	17
--	----

1.10 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	19
---------------------------------------	----

<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>20</b>
-----------------------------------	-----------

2.1 Verwendete Reagenzien und Puffer . . . . .	20
--	----

2.1.1 Medien, Puffer und Reagenzien . . . . .	20
---	----

2.1.2 Plasmide, Antikörper und Oligonukleotide . . . . .	22
--	----

2.1.3	Verwendete Organismen . . . . .	24
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	25
2.2.1	Herstellung elektrokompetenter Bakterien . . . . .	25
2.2.2	Transformation elektrokompetenter Bakterien . . . . .	25
2.2.3	Agarosegelelektrophorese . . . . .	26
2.2.4	Plasmid-Mini-Präparation . . . . .	26
2.2.5	Plasmid-Midi-Präparation . . . . .	26
2.2.6	Sequenzierung von Plasmiden . . . . .	27
2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	27
2.2.8	Ortsspezifische Mutagenese (site-directed mutagenesis) . . . . .	28
2.2.9	Klonierung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD . . . . .	28
2.2.9.1	Linearisierung des Vektors . . . . .	28
2.2.9.2	Oligonukleotid-Hybridisierung . . . . .	28
2.2.9.3	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	29
2.2.10	Messung von Konzentrationen mittels Nanodrop . . . . .	29
2.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	30
2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	30
2.3.1.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford . . . . .	30
2.3.1.2	BCA-Protein-Assay . . . . .	30
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	30
2.3.3	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Gelen . . . . .	31
2.3.4	Western Blot . . . . .	32
2.3.5	Herstellung von post-nukleärem Überstand (PNS) aus Mausleber . . . . .	32
2.3.6	Importassay . . . . .	33
2.4	Proteinexpression von rekombinanten Proteinen . . . . .	33
2.4.1	Expression von rekombinantem PEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD . . . . .	34
2.4.2	Einbau von p-Azidophenylalanin (AzF) in PEX5C11TAG mittels „Nonsense“-Suppression . . . . .	34
2.4.3	Kleine Testexpressionen . . . . .	35
2.5	Proteinaufschluss und -aufreinigung . . . . .	35
2.5.1	Aufschluss und Aufreinigung von rPEX5L und rPEX5C11AzF . . . . .	36
2.5.2	Aufreinigung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	37
2.5.3	Aufschluss von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD und Generierung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	38
2.5.4	Gelfiltration von rekombinanten Proteinen . . . . .	39
2.6	Analyse von Protein-Proteininteraktionen anhand von Koimmunpräzipitationen und Pull-down Versuchen . . . . .	40
2.6.1	<i>In vitro</i> Proteinexpression mittels „Transcription and Translation“ (TnT) . . . . .	41
2.6.2	Koimmunpräzipitation und Pull-down Versuch . . . . .	41
2.6.3	Autoradiographie von Proteinproben nach Koimmunpräzipitation und Pull-down Versuch . . . . .	42
2.7	Proteinanalyse . . . . .	42
2.7.1	Limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	42

2.7.2	CD-Spektrum . . . . .	43
2.7.3	Massenspektrometrie (MS) . . . . .	43
2.7.4	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) . . . . .	43
2.8	Zellbiochemische Methoden . . . . .	44
2.8.1	Kultivierung von Fibroblastenzellen . . . . .	44
2.8.2	Herstellung von Proteinpellets . . . . .	45
2.8.3	Zytoplastenextraktion aus $\Delta$ PEX5 Fibroblastenzellen . . . . .	46
2.8.4	Elektroporation von Fibroblastenzellen . . . . .	46
2.8.5	Vorbereitung der Proben zur Immunfluoreszenzmikroskopie . . . . .	47
2.9	Chemische Methoden . . . . .	48
2.9.1	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	<i>In situ</i> mono-Ubiquitinierung von humanem peroxisomalen Importrezeptor PEX5 . . . . .	50
3.1.1	Generierung von rekombinantem PEX5C11AzF mittels Einbau der unnatürlichen Aminosäure p-Azidophenylalanin (AzF) . . . . .	51
3.1.1.1	Expression von rPEX5C11AzF in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure AzF . . . . .	52
3.1.1.2	Optimierung der Expressionsbedingungen von rPEX5C11AzF . . . . .	54
3.1.1.3	Aufreinigungen von rPEX5L und rPEX5C11AzF über Affinitätschromatographie . . . . .	54
3.1.2	Generierung eines Ubiquitin-Alkins . . . . .	56
3.1.3	Das abgespaltene Strep-Ub( $\Delta$ GG) ist ein Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	60
3.1.4	<i>In situ</i> Klickreaktion von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin mittels Klickchemie . . . . .	61
3.1.4.1	Die Ausbeute der Klickreaktion wird durch Harnstoff nicht erhöht . . . . .	62
3.1.4.2	Ascorbinsäure als Reduktionsmittel und die Zugabe von SDS steigern die Klickeffizienz erheblich . . . . .	63
3.1.4.3	Molares Mengenverhältnis rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin von 1:3 und eine längere Reaktionsdauer steigern die Klickausbeute . . . . .	65
3.1.5	Gewinnung von sauberem rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	66
3.1.6	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist ein mUb-PEX5C11AzF . . . . .	67
3.1.6.1	PEX5-Antikörper erkennen sowohl rPEX5C11AzF als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	67
3.2	Funktions- und Interaktionsstudien von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	68
3.2.1	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet keine PTS1-Proteine, jedoch den PEX7-PTS2-Proteinkomplex . . . . .	69
3.2.1.1	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet nicht an PTS1-Proteine . . . . .	69
3.2.1.2	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann den PEX7-PTS2-Proteinkomplex binden . . . . .	71

3.2.2	Integration von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die peroxisomale Membran	73
3.2.2.1	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) komplementiert $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nicht für den PTS1-Proteinimport	73
3.2.2.2	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) komplementiert $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen für den PTS2-Proteinimport	76
3.2.2.3	Abbau von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nach Elektroporation in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen	77
3.2.2.4	Import von Thiolase in die Peroxisomen im Importassay	78
3.2.3	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) und die peroxisomale Exportmaschinerie	82
3.2.3.1	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet an PEX26	82
3.2.3.2	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet an die Exportmaschinerie besser als rPEX5L	84
3.2.3.3	Der PEX1/PEX6-Komplex bindet an rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) besser als PEX1 und PEX6 einzeln	84
3.2.4	Die rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bindung zu PEX14 ist durch die Exportproteine nicht beeinträchtigt	85
3.2.4.1	Die Dockingproteine PEX13 und PEX14 binden sowohl an rPEX5L als auch an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	85
3.2.4.2	Die PEX14-Bindung zu rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wird durch den Exportkomplex nicht beeinflusst	87
3.2.4.3	Die PEX26-Bindung an rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nimmt in Anwesenheit von PEX14 und PEX1/PEX6 zu	87
3.2.5	PEX14 bindet an PEX26	88
3.2.6	rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) verstärkt die Bindung von PEX26 an PEX6	90
3.2.7	Mutationen im Tyrosin-Loop beeinflussen die Bindung des PEX1/PEX6-Komplexes an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	92
3.2.8	Strukturelle Untersuchungen von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	93
3.2.8.1	Limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	94
3.2.8.2	Der N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist stabil	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Strukturelle Umlagerungen in rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) können PTS1-Bindung verhindern	98
4.2	Die Import- und Exportfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	100
4.2.1	Die Importfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	101
4.2.2	Der Export von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) aus der peroxisomalen Membran	102
4.2.3	Eine Deubiquitinierung von mUb-PEX5 ist nicht zwingend erforderlich	102
4.3	Die Funktionalität von PEX14 und der Exportproteine im Export von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	104
4.3.1	Die Rolle von PEX14 in Bezug auf den Export von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	104
4.3.2	Der Export durch die Exportproteine	106
4.4	Das Modell von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in der peroxisomalen Biogenese	107

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>6 Abstract</b>	<b>112</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>126</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Import peroxisomaler Matrixproteine . . . . .	2
1.2	Huisgen Cycloaddition und CuAAC . . . . .	15
1.3	Inteinfusionsstrategie . . . . .	17
3.1	Primärstruktur von humanem PEX5 . . . . .	51
3.2	Schematische Darstellung zur Gewinnung von rPEX5C11AzF . . . . .	52
3.3	Expression von rPEX5C11AzF in Abhängigkeit von AzF . . . . .	53
3.4	Kinetik der rPEX5C11AzF-Expression . . . . .	54
3.5	Aufreinigung von rPEX5L und rPEX5C11AzF . . . . .	55
3.6	Gelfiltrationschromatographie von rPEX5L . . . . .	56
3.7	Proteinalignment von Ubiquitin aus verschiedenen eukaryontischen Organismen . . . . .	57
3.8	Schematische Darstellung zur Gewinnung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	58
3.9	Gewinnung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	59
3.10	ESI-MS-Analyse von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	60
3.11	Klickreaktion von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	62
3.12	Klickreaktion mit Harnstoff . . . . .	63
3.13	Klickreaktion mit den Reduktionsmitteln TCEP und Ascorbinsäure . . . . .	64
3.14	Kinetik und molare Mengenverhältnisse . . . . .	65
3.15	Aufreinigung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	66
3.16	Immundetektion nach Klickreaktion . . . . .	68
3.17	Pull-down Versuch mit $^{35}$ S-GFP-PTS1 . . . . .	70
3.18	Pull-down Versuch mit $^{35}$ S-PEX7 und $^{35}$ S-Thiolase-myc . . . . .	72
3.19	Lokalisation von EGFP-PTS1 in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nach Elektroporation mit rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	74
3.20	Lokalisation von EGFP-PTS1 in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nach Elektroporation mit rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	75
3.21	Lokalisation der endogenen Thiolase in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen . . . . .	76
3.22	Abbau der rekombinanten Proteine in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen . . . . .	78
3.23	Importassay mit $^{35}$ S-PEX5L . . . . .	79
3.24	Importassay mit $^{35}$ S-PEX5L und $^{35}$ S-Thiolase/ $^{35}$ S-PEX7 . . . . .	81
3.25	Pull-down Versuch mit den Exportproteinen . . . . .	83
3.26	Pull-down Versuch mit den Docking- und Exportproteinen . . . . .	86
3.27	PEX14 bindet an PEX26 . . . . .	89
3.28	Koimmunpräzipitation mit $\alpha$ -FLAG-PEX6 . . . . .	91
3.29	CD-Spektrum von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG), rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin . . . . .	93
3.30	Limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	95
3.31	Massenspektrometrische Analyse der limitierten Proteolyse . . . . .	96
4.1	Modell von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) . . . . .	108

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Medien, Puffer und Reagenzien . . . . .	20
2.2	Verwendete Plasmide . . . . .	22
2.3	Verwendete Antikörper . . . . .	23
2.4	Oligonukleotide . . . . .	24
2.5	Verwendete Bakterienstämme . . . . .	24
2.6	Verwendete Fibroblastenzelllinien . . . . .	25
2.7	PCR-Programm für PEX1, PEX5 und PEX6 . . . . .	27
2.8	Zusammensetzung der SDS-Gele . . . . .	31
2.9	Verwendete Spannungen bei SDS-Gelelen . . . . .	31
2.10	Protokoll zur Elution von rPEX5L und rPEX5C11AzF von der Ni <sup>2+</sup> -Säule	36
2.11	Protokoll zur Elution von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) von der Ni <sup>2+</sup> -Säule . . . .	37
2.12	Protokoll zur Elution von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) von der <i>Strep-Tactin</i> <sup>®</sup> -Säule	37
2.13	Protokoll zum Aufschluss von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD mit Ultraschall	38
2.14	Angaben zur präparativen Gelfiltration . . . . .	40
2.15	Angaben zur Messung eines CD-Spektrums . . . . .	43
2.16	Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien . . . . .	44
2.17	Parameter zur Elektroporation . . . . .	47
3.1	Komplementationsraten für den PTS1- und PTS2-Proteinimport in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen . . . . .	77

# Abkürzungsverzeichnis

AAA	„ATPases associated with a wide range of cellular activities“
aaRS	aminoacyl-tRNA-Synthetase
Amp	Ampicilin
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
AzF	p-Azidophenylalanin
BSA	bovine serum albumin
Cam	Chloramphenicol
CBD	chitin binding domain
CD	circular dichroism
CG	complementation group
CuAAC	copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxy ribonucleic acid
DUB	de-ubiquitinating enzyme
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	electrospray ionisation
FCS	fetal calf serum
(E)GFP	(enhanced) green fluorescent protein
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	horse-raddish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MS	Massenspektrometrie
mUb-PEX5	mono-ubiquitiniertes PEX5
OD	Optische Dichte
PBD	peroxisome biogenesis disorder
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEX	Peroxin
<i>PEX</i>	Gen für ein Peroxin
PNS	post-nuclear supernatant
PTS	peroxisomal targeting sequence

---

PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	rounds per minute
(t)RNA	(transfer) ribonucleic acid
SCP2	sterol carrier protein 2
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SRH	second region of homology
TAG	Ambercodon
TBE	Tris-borate-EDTA
TBS	Tris-buffered-saline
TBTA	Tris(benzyltriazolymethyl)amine
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TnT	Transcription/Translation
TPR	tetratricopeptide repeat
UAA	unnatural amino acid
Ub( $\Delta$ GG)	Ubiquitin, dessen letzten zwei Glycine deletiert sind
WB	Western Blot



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entdeckung und Funktionen von Peroxisomen

Peroxisomen wurden erstmals als „Microbodies“ im Jahre 1954 in Mausnieren von Rhodin charakterisiert. Weitere Beschreibungen der Peroxisomen folgten in Leberepithelzellen von Rouiller und Bernhard (1956), in Pflanzen von Porter und Caulfield (1958) und durch Mollenhauer im Jahre 1966 [Tolbert and Essner, 1981]. Der Name „Peroxisom“ wurde von de Duve geprägt. Die Organellen beinhalten zum einen Oxidasen, die Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduzieren und weisen zum anderen große Mengen an Katalase auf. Die Katalase ist in der Lage, das angefallene Wasserstoffperoxid zu Wasser zu reduzieren und dieses unschädlich zu machen [De Duve and Baudhuin, 1966]. Peroxisomen sind in ihrer Form oval und haben einen Durchmesser von 0,1 bis 1  $\mu\text{m}$  [Bosh, 1992]. Sie sind ubiquitär und von einer einfachen Membran umgeben. Die metabolischen Funktionen von Peroxisomen sind unterschiedlich und abhängig von Spezies, Zelltyp und Umweltfaktoren. Neben der bereits erwähnten Bedeutung der Katalase übernehmen Peroxisomen auch eine zentrale Rolle in der Fettsäureoxidation. In allen eukaryontischen Organismen findet in den Peroxisomen die Oxidation von Fettsäuren statt. Eine Ausnahme bilden die Säuger, die Fettsäuren auch in Mitochondrien abbauen können. Dabei bewerkstelligen Peroxisomen in Säugern insbesondere die  $\beta$ -Oxidation von langen und sehr langkettigen Fettsäuren und die  $\alpha$ -Oxidation verzweigtkettiger Fettsäuren. Weitere Funktionen der Peroxisomen im Menschen sind die Cholesterolsynthese [Hodge et al., 1991], sowie Schritte der Gallensäuresynthese und die ersten Schritte der Synthese von Etherlipiden, den Plasmalogenen [Wanders, 2004]. In einigen filamentösen Pilzen tragen die Peroxisomen zur Biosynthese von Penicillin bei [Müller et al., 1991, Meijer et al., 2010], in Pilzen und Pflanzen auch zur Synthese von Biotin [Magliano et al., 2011, Tanabe et al., 2011]. Die Peroxisomen in Pflanzenblättern beinhalten viele Enzyme, die wichtig für die Photorespiration sind. Proteine, die für die peroxisomale Biogenese von Bedeutung sind, werden Peroxine (PEX) bezeichnet [Distel et al., 1996], die entsprechenden Gene *PEX*-Gene. Bisher wurden insgesamt 34 verschiedene Peroxine beschrieben [Islinger et al., 2012]).

## 1.2 Der Import peroxisomaler Matrixproteine

Peroxisomen besitzen keine eigene DNA, daher sind alle peroxisomalen Proteinkomponenten in der nuklearen DNA kodiert. Peroxisomale Matrixproteine werden im Zytosol an freien Ribosomen synthetisiert und post-translational in die Peroxisomen importiert. Der Import der peroxisomalen Matrixproteine wird durch zwei zytosolische Rezeptorproteine PEX5 und PEX7 bewerkstelligt (Für Reviews siehe [Girzalsky et al., 2009, Brown and Baker, 2003]). Die Rezeptorproteine durchlaufen

einen Zyklus, der in mehrere Schritte unterteilt werden kann (siehe auch Abb. 1.1):

- (a) Erkennung peroxisomaler Matrixproteine (Cargo) im Zytosol durch die Rezeptorproteine PEX5 bzw. PEX7
- (b) Bindung des Rezeptor-Cargo-Komplexes an die peroxisomale Membran
- (c) Translokation des Cargos in das peroxisomale Lumen
- (d) Markierung von PEX5 für den Export
- (e) Export von mono-ubiquitiniertem PEX5 aus der peroxisomalen Membran
- (f) Deubiquitinierung von mono-ubiquitiniertem PEX5

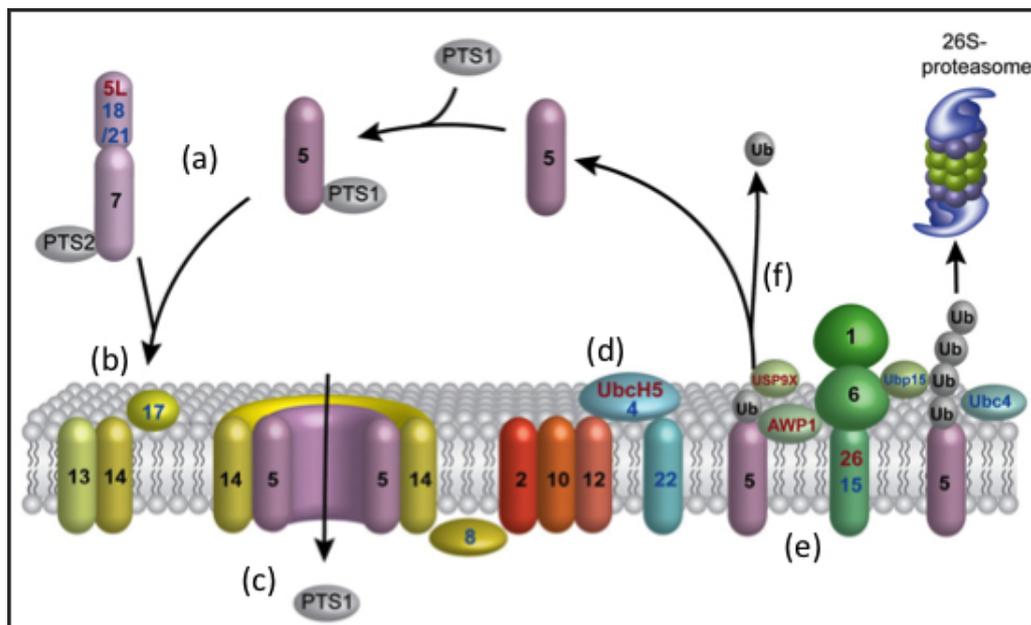


Abbildung 1.1: **Import peroxisomaler Matrixproteine.** Die PTS1-Cargoproteine bzw. der PEX7-PTS2-Komplex werden im Zytosol von PEX5 erkannt (a) und zur peroxisomalen Membran transportiert. Nach der Interaktion mit dem Dockingkomplex (b) wird PEX5 in die peroxisomale Membran inseriert und gleichzeitig das Cargo in die peroxisomale Matrix freigelassen (c). PEX5 wird durch die Beteiligung der RING-Finger-Proteine mono-ubiquitiniert (d) und mit Hilfe des Exportkomplexes aus der peroxisomalen Membran gezogen (e). Nach der Deubiquitinierung kann PEX5 einen neuen Zyklus beginnen (f). Das Schaubild fasst den Importzyklus von PEX5 in Hefen und Menschen zusammen. Proteine mit schwarzen Zahlen kommen sowohl in Hefen als auch im Menschen vor, Proteine in Hefen sind mit blauen Zahlen, Proteine im Menschen sind mit roten Zahlen gekennzeichnet. Modifiziert nach [Nagotu et al., 2012].

Der Import der peroxisomalen Matrixproteine ist ein ATP-unabhängiger Schritt. Der Export ist jedoch energieabhängig und wird durch die peroxisomale Exportmaschinerie, dem Exportomer bewerkstelligt (siehe Review [Platta et al., 2013]).

Die vorliegende Arbeit geht zum einen auf die Gewinnung von mono-ubiquitiniertem PEX5 (mUb-PEX5) ein. Der Erhalt von mUb-PEX5 erfolgt chemisch mit Hilfe der Klickchemie. Basierend auf das hergestellte mUb-PEX5 wird die Funktionalität von diesem Protein untersucht und beschrieben. Zum besseren Verständnis der funktionalen Eigenschaften von PEX5 soll in den nachfolgenden Kapiteln näher auf die einzelnen Schritte und Komponenten des Matrixproteinimportes sowie des Importzyklus von PEX5 eingegangen werden. Anschließend folgt ein kurzer Überblick über die chemische Herstellung von mUb-PEX5.

### **1.2.1 Das peroxisomale Targetingsignal (PTS) peroxisomaler Matrixproteine**

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen ein evolutionär konserviertes C-terminales Tripeptid der Sequenz Serin-Lysin-Leucin oder Variationen davon mit der Konsensussequenz -(SAC)-(KRH)-(KM). Diese Aminosäuresequenz wird auch als „peroxisomal targeting signal 1“ (PTS1) bezeichnet. PTS1-Proteine werden im Zytosol nach ihrer Synthese an freien Ribosomen von dem peroxisomalen Proteinrezeptor PEX5 erkannt und zur peroxisomalen Membran dirigiert (siehe Review [Brown and Baker, 2003]).

Lametschwandtner *et al* zeigten mit Hilfe eines Yeast-two-Hybrid Systems, dass der PTS1-Rezeptor eine große Variationsbreite an unterschiedlichen C-terminalen Tripeptiden binden kann. Dadurch ist das PTS1 nicht nur durch die drei C-terminalen Aminosäuren begrenzt, sondern schließt die acht vorgelagerten Aminosäuren mit ein. Der Rezeptor bindet mit hoher Affinität die Konsensus-Tripeptid-Sequenz [Lametschwandtner et al., 1998].

Wenige peroxisomale Proteine beherbergen statt des C-terminalen Tripeptids ein N-terminales, abspaltbares Nonapeptid mit der meist verwendeten Konsensussequenz -R-(LVIQ)-X-X-(LVIH)-(LSGA)-X-(HQ)-(LA)- (für Review siehe [Girzalsky et al., 2009]). Dieses Peptid wird auch als „peroxisomal targeting signal 2“ (PTS2) bezeichnet und von dem Korezeptor PEX7 erkannt. Die lange Spleißvariante von PEX5 im Menschen (PEX5L, siehe dazu auch das nächste Kapitel) interagiert mit PEX7 und transportiert den PEX7-PTS2-Komplex zur peroxisomalen Membran [Otera et al., 2000, Dodt et al., 2001]. Peroxisomale Proteine mit einer PTS2-Sequenz sind die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase [Erdmann, 1994] und Phytanoyl-CoA-Hydroxylase (PAHX) (siehe Review [Jansen et al., 2004]).

### **1.2.2 Der PTS1-Rezeptor PEX5**

Der peroxisomale Matrixproteinrezeptor PEX5 ist ein monomerisches Protein [Costa-Rodrigues et al., 2005], das im Zytosol neu synthetisierte peroxisomale Matrixproteine erkennt und an sie bindet. Studien in Eierstockzellen von Hamstern (Chinese hamster ovary, CHO) und menschlichen Fibroblastenzellen zeigen, dass in Säugern

zwei verschiedene Spleißvarianten des PEX5 Transkriptes existieren, eine kurze Form (PEX5S) und eine lange Form (PEX5L). Diese beiden Proteine unterscheiden sich in einem zusätzlichen Exon, in PEX5L dem Exon 8, das aus 37 Aminosäuren besteht [Dodt et al., 1995, Braverman et al., 1998, Otera et al., 1998]. Beide Spleißvarianten sind in der Lage, PTS1-Proteine zu binden. Die Fähigkeit hingegen an PEX7 und somit indirekt an PTS2-Proteine zu binden hat jedoch nur PEX5L [Dodt et al., 2001]. Biochemische und strukturelle Studien haben gezeigt, dass die C-terminale Domäne von PEX5 aus insgesamt sieben Wiederholungen eines Tetratricopeptids (tetratricopeptide repeat, TPR) besteht, die eine hohe Affinität zur PTS1-Sequenz aufweisen [Brocard et al., 1994, Terlecky et al., 1995, Dodt et al., 1995, Gatto et al., 2000b, Klein et al., 2001]. Eine Kristallstruktur des humanen PEX5 mit einem PTS1-Peptid zeigt, dass die TPR-Domäne aus zwei Clustern besteht (TPR 1-3 und TPR 5-7), welche nahezu das PTS1-Peptid umschließen [Gatto et al., 2000b]. TPR4 hingegen bildet eine Art Drehachse, die wahrscheinlich nicht in der PTS1-Bindung involviert ist [Klein et al., 2001]. Das TPR selbst ist ein zurückgebildetes, aus 34 Aminosäuren bestehendes Motiv, das zu 50 % aus  $\alpha$ -Helices und aus wenigen bis keinen  $\beta$ -Faltblättern besteht. Das TPR ist unter Proteinen weit verbreitet und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen sowie den Aufbau von Multiproteinkomplexen [Blatch and Lässle, 1999]. PEX5 ist ein nicht globuläres Protein mit einem ungefalteten N-Terminus [Carvalho et al., 2006]. In diesem Bereich weist PEX5L (Aminosäuren 115-315) sieben Pentapeptide mit der Konsensussequenz WXXXF/Y auf. Die aromatischen Pentapeptide sind für die Interaktion von PEX5 mit dem peroxisomalen Membranprotein PEX14 essentiell (für Review siehe [Azevedo and Schliebs, 2006]). Anhand von biochemischen und strukturellen Studien konnte gezeigt werden, dass PEX5 auch in der Lage ist, neben PEX14 und PTS1-Proteinen an viele weitere Proteine zu binden: PEX13 [Otera et al., 2002], PEX12, einem RING-Finger Protein [Chang et al., 1999], PEX7 [Rehling et al., 1996, Braverman et al., 1997, Matsumura et al., 2000, Dodt et al., 2001] und in Hefen an PEX8 [Brown and Baker, 2003]. PEX5 nimmt eine duale Funktion ein. Frühe Studien kamen zu dem Ergebnis, dass PEX5 hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und nur eine kleine Fraktion im Peroxisom zu finden ist [Dodt and Gould, 1996].

### 1.2.3 Der PTS2-Rezeptor PEX7

Der peroxisomale Matrixprotein-Korezeptor PEX7 bindet über sein Tryptophan-Aspartamsäure (WD) 40-Motiv das N-terminale Nonapeptid der PTS2-Proteine [Marzioch et al., 1994]. Eine Interaktion dieser beiden Proteine konnte in Yeast-two-Hybrid Versuchen gezeigt werden. PEX7 kann den Importprozess nicht alleine bewerkstelligen und benötigt daher Hilfsproteine. In *S. cerevisiae* interagiert PEX7 mit PEX18 und PEX21, die trotz ihrer geringen Aminosäuresequenzhomologie funktionell redundant sind. In Zellen, in denen PEX18 und PEX21 fehlen, ist kein PTS2-Proteinimport zu beobachten. Dies legt nahe, dass PEX18/PEX21 PEX7 zum Peroxisom dirigieren [Purdue et al., 1998]. In *Yarrowia lipolytica* [Titorenko et al., 1998], *Pichia pastoris* [Léon et al., 2006], *Hansenula polymorpha* [Otzen et al., 2005] und

*Neurospora crassa* [Sichting et al., 2003] fungiert PEX20 als Hilfsprotein. In Säugern und Pflanzen sind weder PEX18, PEX21 noch PEX20 vorhanden. Der PTS2-vermittelte Import wird im Menschen durch die lange Spleißvariante PEX5L [Matsumura et al., 2000, Dodt et al., 2001] und in Pflanzen durch PEX5 bewerkstelligt [Woodward and Bartel, 2005].

### 1.3 Der peroxisomale Dockingkomplex

Nachdem die Rezeptorproteine im Zytosol an ihr Cargo gebunden haben, wird der Rezeptor-Cargo-Komplex zur peroxisomalen Membran transportiert. PEX5 stellt durch die Interaktion mit dem Dockingkomplex den initialen Kontakt mit der peroxisomalen Membran her [Albertini et al., 1997, Will et al., 1999].

Der Dockingkomplex besteht aus den Peroxinen PEX13 und PEX14. In manchen Organismen werden zusätzliche Proteine wie PEX17 in *S. cerevisiae* [Huhse et al., 1998, Agne et al., 2003], PEX33 in filamentösen Pilzen [Managadze et al., 2010] oder PEX13.2 in *Trypanosoma brucei* [Brennan et al., 2012] benötigt.

PEX13 wurde als erstes Protein aus dem Dockingkomplex in *S. cerevisiae* identifiziert [Erdmann and Blobel, 1996]. Es ist ein integrales Membranprotein, das zwei Transmembrandomänen besitzt, wobei beide Termini zum Zytosol ausgerichtet sind. Der C-Terminus ist mit einer SH3-Domäne ausgestattet [Erdmann and Blobel, 1996, Toyama et al., 1999]. Die SH3-Domäne besteht aus kleinen nichtkatalytischen Proteinmodulen und umfasst ungefähr 50 Aminosäuren. Sie erkennt prolinreiche Motive (PXXP) und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen [Cohen et al., 1995].

PEX14 ist ein membrangebundenes Protein mit einer molaren Masse von 41 kDa [Shimizu et al., 1999]. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass PEX14 nicht nur integral [Brocard et al., 1997], sondern auch peripher [Albertini et al., 1997] an der Außenseite der peroxisomalen Membran vorkommen kann.

In Yeast-two-Hybrid Versuchen konnte gezeigt werden, dass PEX14 sowohl mit PEX5, PEX7, PEX13 [Albertini et al., 1997] als auch mit *Sc*PEX17 [Huhse et al., 1998] interagieren kann. Über das N-terminale PEX5-Bindemotiv in PEX14 (Aminosäure 31-70) findet im Menschen die PEX5-PEX14-Bindung statt [Itoh and Fujiki, 2006]. Der N-Terminus von PEX14 weist zudem ein prolinreiches Motiv PXXP auf, mit dem PEX14 in der Lage ist, an die SH3-Domäne von PEX13 zu binden [Albertini et al., 1997]. Im Menschen findet zuerst eine Interaktion zwischen PEX5 und PEX14 statt. Diese Interaktion wird später zu einem großen Komplex mit PEX13 erweitert [Miyata and Fujiki, 2005]. PEX7 interagiert ebenfalls über PEX5L zuerst mit PEX14 [Mukai and Fujiki, 2006]. Anschließend bindet der Cargo-PEX7-Komplex an PEX13, unabhängig von PEX5L [Mukai and Fujiki, 2006, Natsuyama et al., 2012].

### 1.3.1 Die Membraninsertion von PEX5 und Translokation des Cargos

Die peroxisomalen Matrixproteine werden post-translational durch die PTS-Rezeptoren zum Peroxisom transportiert. Im Gegensatz zu den Mitochondrien, Chloroplasten und dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), die ihre Proteine aus dem Zytosol in einem ungefalteten Zustand importieren, erlaubt die peroxisomale Importmaschinerie die Translokation von voll-gefalteten, Kofaktor-gebundenen, sogar oligomeren Proteinen durch die peroxisomale Membran (Für Review siehe [Kim and Hettema, 2015]). Eine interessante Frage ist, wie dieser Prozess bewerkstelligt werden kann. Der Import von Proteinen in ein Organell aus der Umgebung ist ein wichtiger Vorgang in der Zelle.

Für die Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran und den Import peroxisomaler Matrixproteine gibt es derzeit mehrere Modelle. Das erste Modell setzt die Anwesenheit von Kanälen oder Poren voraus, durch die der Import stattfinden kann. Die Öffnung darf während einer Translokation gerade so groß und weit sein, um zwar den Import der Proteine zu gewährleisten, jedoch den Austausch weiterer gelöster Substanzen zwischen Zytosol und Organell so gering wie möglich zu halten. In Bezug auf die Translokation peroxisomaler Proteine wurde ein Modell einer dynamischen transienten Pore entwickelt [Erdmann and Schliebs, 2005]. Der Cargo-beladene Importrezeptor interagiert zunächst mit dem Dockingkomplex. Demnach bilden PEX5 und PEX14 in der peroxisomalen Membran einen Ionen-basierenden Kanal aus, der sich im Durchmesser an den zytosolischen Rezeptor-Cargo-Komplex anpassen kann [Meinecke et al., 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass ein nicht verformbares Goldpartikel mit einer Größe von 9 nm durch die peroxisomale Membran transportiert werden kann [Walton et al., 1995].

Das zweite Modell geht von einem Export-abhängigen Importmodell aus. Demnach bindet Cargo-beladenes PEX5 an den Dockingkomplex. Nach der Ausbildung einer transienten Pore aus PEX14 und PEX5 wird das Cargo durch die peroxisomale Membran transloziert und in das Lumen freigelassen. Die Freisetzung des Cargos ist demnach mit dem ATP-abhängigen Export von PEX5 aus der Membran gekoppelt (für Review siehe [Grimm et al., 2012]).

In einem dritten Modell ist die Docking- und Translokationsmaschinerie (DTM), die aus PEX13, PEX14 und den RING-Finger-Proteinen besteht, involviert. Das Cargo-beladene PEX5 bindet über seinen N-Terminus an den Dockingkomplex PEX13/PEX14. Es wird angenommen, dass PEX5 selbst die Cargoproteine durch die peroxisomale Membran in das Lumen transloziert. Während des transienten Durchganges von Cargo-beladenem PEX5 durch die peroxisomale Membran erlangt PEX5 eine transmembrane Struktur. Nur ein kleines Fragment des N-terminalen PEX5 ragt ins Zytosol, wohingegen sich ein Großteil von PEX5 in das peroxisomale Lumen erstreckt. Die Insertion von PEX5 in die Membran und Translokation des Cargos in das peroxisomale Lumen setzt die Interaktion des N-Terminus von PEX5 und der DTM voraus (siehe auch Review [Grou et al., 2009a]).

Die genaue Vorgehensweise, wie das Cargo in das Lumen der Peroxisomen freigelassen wird, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es wird vermutet, dass in Säugern der N-Terminus von PEX14 und in *P. pastoris* PEX8 involviert ist

[Freitas et al., 2011, Ma et al., 2009]. PEX8 ist ein intraperoxisomales Peroxin in Hefen, das den Dockingkomplex (PEX13, PEX14, PEX17) mit dem RING-Finger-Komplex (PEX2, PEX10, PEX12) verbindet. Es ist essentiell für den peroxisomalen Matriximport, die genaue molekulare Funktion ist bisher unbekannt [Agne et al., 2003].

## 1.4 Markierung von PEX5 für den Export und die Rolle der RING-Finger-Proteine

Im Zuge der Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran kann eine Translokation des Cargos in das peroxisomale Lumen gewährleistet werden. Es gibt zwei Gründe, weshalb PEX5 aus der Membran wieder entlassen werden muss. Erstens wird PEX5 wieder für einen neuen Zyklus gebraucht, um weitere peroxisomale Matrixproteine in das Peroxisom zu transportieren. Zweitens würde in der Annahme einer transienten Pore die Permeabilität mit zunehmender Zahl von Poren verloren gehen. Wie die nachfolgenden Schritte genau ablaufen, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Es hat sich herausgestellt, dass eine ATP-abhängige Ubiquitinierung von PEX5 eine Voraussetzung für dessen Export ist [Oliveira et al., 2003, Platta et al., 2007, Carvalho et al., 2007]. PEX5 existiert in zwei unterschiedlichen Ubiquitinierungszuständen. Zum einen kann es mono-ubiquitiniert werden und fördert somit den Export, zum anderen führt eine poly-Ubiquitinierung zu einer Degradation von PEX5.

Die mono-Ubiquitinierung von PEX5 findet an einem konservierten Cystein am N-Terminus statt (Position 6 in *S. cerevisiae* und Position 11 im Menschen) [Platta et al., 2004, Carvalho et al., 2007] und wird in Hefen durch das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) PEX4 (Ubc10p) bzw. der UbcH5 a/b/c-Familie im Menschen katalysiert. Die Ubiquitinierung von PEX5 basiert auf einer Thioesterbildung zwischen dem Ubiquitin und dem konservierten Cystein. Dieser Schritt findet nach der Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran und Freilassung des Cargos in das peroxisomale Lumen statt [Alencastre et al., 2009]. Die PEX5-mono-Ubiquitinierung ist auch abhängig von der Anwesenheit der konservierten RING-Finger Proteine PEX2, PEX10 und PEX12 (siehe Review [Platta et al., 2014]). PEX12 ist eine E3-Ubiquitinligase, die in *S. cerevisiae* für die PEX4-abhängige mono-Ubiquitinierung verantwortlich ist und somit einen zentralen Bestandteil des Rezeptorrecyclings einnimmt [Platta et al., 2009].

In Hefen konnte gezeigt werden, dass PEX2 und PEX10 als E3-Ubiquitinligasen für die Ubc4-abhängige poly-Ubiquitinierung von PEX5 verantwortlich sind [Platta et al., 2009, Williams et al., 2008]. Die poly-Ubiquitinierung ist keine Voraussetzung für den Export von PEX5, jedoch kann sie ein wichtiger Schritt bei der Qualitätskontrolle sein, um nicht funktionelles PEX5 zu beseitigen [Platta et al., 2004, Kiel et al., 2005]. Neben PEX5 werden sowohl PEX18 als auch PEX20 an einem konservierten Cystein mono-ubiquitiniert [Hensel et al., 2011, Léon and Subramani, 2007].

### 1.4.1 Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung ist eine post-translationale Proteinmodifikation. Sie wird durch kovalente Konjugation eines Ubiquitinmoleküls auf das Substrat bewerkstelligt. Die Modifizierung durch Ubiquitinierung führt auf zellulärer Ebene zu Änderungen der Signalkaskade, beeinflusst Interaktionen zu anderen Proteinen und markiert Proteine zur Degradierung (siehe Review[Hicke et al., 2005]). Für die Anlagerung von Ubiquitin an das zu modifizierende Protein werden drei Enzyme (E1, E2 und E3) benötigt, die in einer Kaskade hintereinander geschaltet sind. Zunächst wird unter Bildung einer Thiolesterbindung der C-Terminus des Ubiquitins (G76) an das Cystein des Cystein-aktivierenden Enzyms (E1) gebunden. Dieser Schritt benötigt Energie in Form von ATP. Es folgt die Übertragung des Ubiquitins auf das Cystein des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2). E2 beherbergt eine hoch konservierte katalytische Domäne, die sich aus 150 Aminosäuren zusammensetzt. Neben des aktivierten Cysteins weist sie ein konserviertes Asparagin auf. Es wird vermutet, dass dieses eine essentielle Rolle in der Stabilisierung der E2-Struktur und dessen Umgebung in der katalytischen Domäne einnimmt [Berndsen and Wolberger, 2014]. Im letzten Schritt katalysiert die Ubiquitin-Ligase (E3) die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf das Substrat, indem E3 spezifisch sowohl an E2 als auch an das Zielprotein binden kann. Dabei erfolgt der Transfer über den C-Terminus des Ubiquitins gewöhnlich an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins am Zielprotein unter Bildung einer Isopeptidbindung (für Reviews siehe [Amerik and Hochstrasser, 2004, Hicke et al., 2005, Berndsen and Wolberger, 2014]). In selteneren Fällen wird mittels einer Transthoesterifizierung unter Bildung einer Thioesterbindung das Ubiquitin auf ein Cystein des Zielproteins übertragen. In der Literatur wird auf drei verschiedene Klassen von E3-Ligasen verwiesen, die sich in RING (really interesting new genes), HECT (homology to E6-associated protein C-terminus) und RBR (RING-between-RING) aufteilen. RING-E3-Ligasen übertragen das Ubiquitin von E2 direkt auf das Zielprotein, wohingegen die anderen E3-Ligasen ein aktiviertes Cystein aufweisen, auf welches das Ubiquitin über eine Thiolesterbindung übertragen wird und als Brücke zwischen E2 und E3 fungiert [Hicke et al., 2005, Berndsen and Wolberger, 2014].

Das konservierte 76 Aminosäuren lange Ubiquitin wird entweder als Monomer (mono-Ubiquitinierung) oder in Form von Ketten (poly-Ubiquitinierung) an das Substrat angehängt [Christianson and Ye, 2014]. Es gibt sieben Lysine im Ubiquitin (Lys<sup>6</sup>, Lys<sup>11</sup>, Lys<sup>27</sup>, Lys<sup>29</sup>, Lys<sup>33</sup>, Lys<sup>48</sup>, Lys<sup>63</sup>) sowie der N-Terminus Met<sup>1</sup>, die eine Kettenbildung in Form eines Polyubiquitins erlauben [Dikic et al., 2009]. Bei einer Polyubiquitinierung ist sowohl die Art der Kettenbildung als auch die Aminosäure innerhalb des Ubiquitins, an dem die Ubiquitinmoleküle angehängt werden, bedeutend im Hinblick auf die weitere Funktion des modifizierten Proteins. So können homotypische, verzweigt-kettige und lineare poly-Ubiquitinierungen beobachtet werden [Dikic et al., 2009].

## 1.4.2 Die RING-Finger Proteine PEX2, PEX10, PEX12

Die integralen peroxisomalen Membranproteine PEX2, PEX10, PEX12 werden zu den RING (really interesting new genes)-Finger Proteinen kategorisiert, da sie jeweils am C-Terminus mit einer RING-Finger Domäne ausgestattet sind. Die RING-Finger Domäne wird durch eine cysteinreiche Sequenz charakterisiert [Freemont, 1993]. Die Cysteine können an zwei  $Zn^{2+}$ -Ionen binden und somit ein Zink-Finger-Motiv ausbilden. Sowohl PEX2 [Tsukamoto et al., 1991] als auch PEX10 [Kalish et al., 1995, Okumoto et al., 1998] und PEX12 besitzen ein Zink-Finger-Motiv. Die RING-Finger Proteine fungieren als E3-Ligasen, da sie den direkten Transfer von E2~Ub an das Substrat vermitteln (Review [Metzger et al., 2014]). In der peroxisomalen Biogenese spielen die RING-Finger Proteine einerseits eine Rolle in der Translokation von peroxisomalen Matrixproteinen [Okumoto et al., 2000], zum anderen sind sie essentiell in der Ubiquitinierung von PEX5. Die RING-Finger-Proteine bilden einen ausgeprägten Komplex in der peroxisomalen Membran und stabilisieren sich gegenseitig, wobei das Fehlen eines RING-Peroxins zur Destabilisierung der anderen führt [Agne et al., 2003, Hazra et al., 2002]. Es konnte bisher eine Bindung von PEX2 und PEX10 zu PEX5 gezeigt werden [Chang et al., 1999, Okumoto et al., 2000, Albertini et al., 2001]. Sowohl PEX2 als auch PEX10 sind in der poly-Ubiquitinierung in *S. cerevisiae* von PEX5 eingeschlossen [Platta et al., 2009, Williams et al., 2008].

## 1.5 Der Export von mono-ubiquitiniertem PEX5

Der Export von PEX5 aus der peroxisomalen Membran zurück ins Zytosol ist ATP-abhängig [Oliveira et al., 2003]. PEX1 und PEX6 sind die einzigen bekannten Peroxine, die eine ATPase-Domäne besitzen, deshalb erscheinen sie als die offensichtlichen Kandidaten, PEX5 aus der Membran zu exportieren. *In vitro* Export-Versuche zeigen, dass mono-ubiquitiniertes PEX5 (mUb-PEX5) Substrat für den Exportkomplex ist und aus der peroxisomalen Membran zurück ins Zytosol befördert wird [Miyata and Fujiki, 2005, Platta et al., 2005, Carvalho et al., 2007, Okumoto et al., 2011]. Der Exportkomplex besteht aus den AAA+-ATPasen PEX1 und PEX6, die über das peroxisomale Membranprotein PEX26 in Säugern [Furuki et al., 2006], PEX15 in *S. cerevisiae* [Birschmann et al., 2003] und APEM9 in *Arabidopsis thaliana* [Goto et al., 2011] an das Peroxisom assoziiert sind. Der Mechanismus, inwiefern PEX1 und PEX6 mUb-PEX5 erkennen und wie die Extraktion aus der peroxisomalen Membran verläuft, ist bisher nicht bekannt. In den nachfolgenden Kapiteln soll näher auf den Exportkomplex und im Besonderen auf die AAA-Proteine PEX1 und PEX6 eingegangen werden.

## 1.6 Der Exportkomplex

### 1.6.1 Allgemeines zu AAA+-ATPasen

Die AAA+-ATPasen bilden eine Proteinsuperfamilie und nehmen eine essentielle Rolle in der Transkription, der Proteolyse, der Membranfusion, sowie im Zellzyklus und vesikulären Transport ein [Patel and Latterich, 1998]. Der Name AAA-ATPase steht für „ATPasen associated with a wide range of cellular activities“ [Kunau et al., 1993]. Es gibt zwei Arten von AAA+-Proteinen. Die Mitglieder des Typs I besitzen eine AAA-Kassette, wohingegen die AAA+-Proteine des Typs II zwei AAA-Kassetten besitzen, die auch als D1 und D2 bezeichnet werden. Sie sind in verschiedenem Maße konserviert und nehmen unterschiedliche Funktionen ein. Die konservierten AAA-Kassetten sind durch eine 200-250 lange Aminosäuresequenz definiert, die mehrere charakteristische Motive wie dem Walker A (ATP-Bindung) und Walker B (ATP-Hydrolyse) Motiv, eine SRH (second region of homology)-Domäne und dem Arginin (R)-Finger aufweisen (siehe auch Reviews [Beyer, 1997, Lupas and Martin, 2002, Hanson and Whiteheart, 2005]).

Das Walker A Motiv bildet einen P (Phosphatbinde)-Loop, der mit dem Phosphat des ATPs direkt interagieren kann. Das Lysin in dessen Konsensussequenz GXXXXGK(T/S) ist besonders wichtig, da bei Mutationen die ATP-Bindung in der Walker A Region eliminiert wird [Matveeva et al., 1997, Babst et al., 1998, Tamura et al., 2006].

Das Walker B-Motiv mit der sauren hhhhDE-Sequenz (h steht für eine hydrophobe Aminosäure) ist wichtig für die ATPase Aktivität. Die Asparaginsäure kann mit  $Mg^{2+}$  agieren, das für die ATP-Hydrolyse essentiell ist [Iyer et al., 2004]. Eine Mutation der Glutaminsäure blockiert die ATP-Hydrolyse, jedoch nicht die Bindung [Hanson and Whiteheart, 2005].

Die SRH-Region besteht aus zwei spezifischen strukturellen Elementen, dem Sensor 1 und dem Arginin-Finger. Der Sensor 1 interagiert mit dem  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen ATPs im Walker B. Die zwei Arginin-Finger am N-Terminus der SRH-Domäne nehmen eine Rolle in der Hydrolyse ein [Hanson and Whiteheart, 2005].

Die AAA+-ATPasen bilden oftmals einen hexameren Ring, der unter ATP-Bindung und Hydrolyse eine Konformationsänderung hervorruft. Diese Konformationsänderung liefert mechanische Energie, die für verschiedene Funktionen verwendet wird, beispielsweise um Substratproteine oder Nukleinsäuren umzugestalten [Hanson and Whiteheart, 2005]. Ein bekannter und wichtiger Vertreter der AAA+-ATPasen in Eukaryonten ist p97, auch unter der Bezeichnung VCP (valosine-containing protein) in Säugern und Cdc48p in Hefen bekannt. Es organisiert Substratproteinkomplexe um und ist in ERAD (ER-associated degradation) und in homotypischen Fusionen von Membranen involviert [Ye, 2006, Uchiyama and Kondo, 2005].

## 1.6.2 Der PEX1/PEX6-Komplex

PEX1 und PEX6 sind Mitglieder der großen Proteinfamilie der AAA+-ATPasen und besitzen jeweils zwei AAA-Kassetten [Patel and Latterich, 1998, Vale, 2000]. Eine direkte Interaktion zwischen PEX1 und PEX6 konnte bereits in *H. sapiens* [Tamura et al., 1998], in *S. cerevisiae* [Birschmann et al., 2005] in *P. pastoris* [Faber et al., 1998] und in *H. polymorpha* [Kiel et al., 1999] nachgewiesen werden. Auf der Grundlage von Analysen mit Punktmutationen und *in vitro* durchgeführten Bindungsstudien ist bekannt, dass die ATP-Bindung bzw. ATP-Hydrolyse für die Assemblierung bzw. Disassemblierung des PEX1/PEX6-Komplexes wichtig ist. Es geht aus den Studien auch hervor, dass der PEX1/PEX6-Komplex entweder direkt oder indirekt an dem Export von PEX5 beteiligt ist (für Review siehe [Platta et al., 2014]).

### 1.6.2.1 Die AAA+-ATPase PEX1

PEX1 wurde erstmals in *S. cerevisiae* mit einer molaren Masse von 117 kDa beschrieben [Erdmann et al., 1991]. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist PEX1 im Menschen mit einer molaren Masse von 143 kDa angegeben und das Gen für PEX1 befindet sich auf Chromosom 7 (siehe Review [Waterham and Ebberink, 2012]). Alle Gendefekte in *PEX1* werden zu der Komplementationsgruppe (CG) 1 der PBDs (peroxisome biogenesis disorders) kategorisiert. In den meisten Fällen führen Mutationen in PEX1 zu schweren peroxisomalen Erkrankungen, die häufig mit dem klinischen Bild des Zellweger Spektrum Syndroms (ZSS) einhergehen. Dem ZSS werden drei Phänotypen zugeordnet: das Zellweger Spektrum (ZS), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und die frühkindliche Refsum-Erkrankung (IRD). Die Symptome sind unter anderem Leberbeschwerden, Verzögerung in der Neuroentwicklung, Rethinopathie und Taubheit. Eine häufig vorkommende Mutation in PEX1 ist ein Austausch des Glycins zu einem Alanin an Aminosäureposition 843 (G843A) im zweiten Walker A Motiv (A2). Diese Mutation hat zur Folge, dass die Bindung zwischen PEX1 und PEX6 reduziert ist (siehe auch Review [Waterham and Ebberink, 2012]).

Die erste AAA-Kassette von *ScPEX1* ist weniger konserviert und ohne eines regulären Walker B Motives, Arginin-Fingers oder einer aromatischen Aminosäure im P-Loop der Walker A Region [Ciniawsky et al., 2015]. Die D2 in *ScPEX1* ist hingegen hoch konserviert [Wendler et al., 2012].

Durch die duale Lokalisation von PEX1 lassen sich zwei verschiedene Oligomierzustände beobachten. Es gibt Hinweise, dass PEX1 in Säugern ein Homo-Trimer im Zytosol bildet, an der peroxisomalen Membran hingegen als Hetero-Oligomer ein Komplex mit PEX6 eingeht [Tamura et al., 2006].

### 1.6.2.2 Die AAA+-ATPase PEX6

Das *PEX6*-Gen ist auf dem menschlichen Chromosom 6 lokalisiert. PEX6 hat mit 960 Aminosäuren eine molare Masse von 104 kDa [Yahraus et al., 1996]. Die D1 in *ScPEX6* ist wie bei PEX1 weniger konserviert. Das Walker A Motiv in D1 (A1) in PEX6 weist

Substitutionen im Glycin auf, es ist daher unklar, inwiefern dieses Motiv ATP binden kann [Hanson and Whiteheart, 2005]. Zudem ist in dem Walker B Motiv in D1 (B1) anstelle der Asparaginsäure ein Alanin vorhanden [Birschmann et al., 2005]. Die D2 in PEX6 ist hingegen hochkonserviert [Wendler et al., 2012].

Kürzlich wurde ein neuer Bindungspartner von PEX6 entdeckt. Das Ubiquitin-Binde-Adapterprotein AWP1/ZAND6 besteht aus den zwei Zinkfingerdomänen A20 und AN1 und kann über die A20-Domäne sowohl an mono- als auch an poly-ubiquitinierte Proteine binden. Es konnte auch *in vitro* gezeigt werden, dass PEX6 an AWP1 bindet. Es wird vermutet, dass es bei der Erkennung von mUb-PEX5 involviert ist [Miyata et al., 2012].

### 1.6.2.3 Strukturelle Aspekte der AAA+-ATPasen PEX1 und PEX6

In den letzten Jahren wurde der Fokus der AAA+-ATPasen PEX1 und PEX6 im Hinblick auf die strukturelle Anordnung des Proteinkomplexes gelegt. Saffian *et al* konnte erstmals den *Sc*PEX1/*Sc*PEX6-Komplex rekombinant erzeugen und charakterisieren. Demnach bilden PEX1 und PEX6 in *S. cerevisiae* einen heterohexameren Komplex [Saffian et al., 2012]. Dies ist konform mit der Beobachtung, dass die meisten Mitglieder der AAA+-ATPasen einen hexameren Komplex bilden [Iyer et al., 2004, White and Lauring, 2007].

Mit Hilfe von computerbasierten Berechnungen wurden in *S. cerevisiae* sowohl für PEX1 als auch für PEX6 zwei AAA-Kassetten, D1 und D2, vorausgesagt [Hanson and Whiteheart, 2005, Blok et al., 2015]. Die D2 von PEX1 und PEX6 weisen eine hohe Sequenzidentität von ungefähr 40 % auf, der N-Terminus und die D1 hingegen nur 20 % [Blok et al., 2015]. Über den N-Terminus beider Peroxine gibt es Divergenzen, da zum einen jeweils eine N-terminale Domäne [Hanson and Whiteheart, 2005], zum anderen jeweils zwei N-terminale Domänen, N1 und N2 [Blok et al., 2015], vorausgesagt wurden.

Der PEX1/PEX6-Komplex weist eine dreieckige Form auf. PEX1 und PEX6 bilden eine Doppelringstruktur aus zwei Hexameren [Blok et al., 2015, Ciniawsky et al., 2015, Gardner et al., 2015]. Die Ringe bestehen aus der D1 und D2 von PEX1 und PEX6 und bilden eine mittig ausgerichtete Pore [Gardner et al., 2015]. Der D1-Ring ist im Gegensatz zu dem D2-Ring symmetrisch angeordnet [Blok et al., 2015].

Die N-Termini weisen aufgrund der geringen Sequenzidentität (20 %) strukturelle Unterschiede auf. Das auffälligste Merkmal der N-terminalen Domäne ist die hakenförmige Verlängerung, die von dem D1-Ring übergeht [Gardner et al., 2015]. Der N-Terminus von PEX6 bewegt sich während der ATP-Hydrolyse kaum, wohingegen der N-Terminus von PEX1 nukleotid-abhängig [Ciniawsky et al., 2015] und somit flexibel an den Komplex angeheftet ist [Blok et al., 2015]. Es wird vermutet, dass die N-Domäne in humanem PEX1 aus einer doppel- $\psi$ -barrel Faltung besteht, die es ermöglicht, Adaptoren oder Substrate zu binden, wie dies bei den Homologen NSF oder p97 der Fall ist [Shiozawa et al., 2004].

Es wird außerdem vermutet, dass die D2 des *Sc*PEX1/*Sc*PEX6-Komplexes mit dem Substrat interagiert [Ciniawsky et al., 2015] und dass der Komplex durch die ATPase-Aktivität der D2 das Substrat bewegt [Blok et al., 2015].

### 1.6.3 Das peroxisomale Membranprotein PEX26

Das humane Peroxin PEX26 bzw. das homologe PEX15 in *S. cerevisiae* ist ein peroxisomales TA (tail anchored)-Membranprotein, dessen C-Terminus in der Membran verankert ist und der N-Terminus in das Zytosol ragt [Matsumoto et al., 2003a]. PEX26 wird PEX19-abhängig zur peroxisomalen Membran transportiert [Matsuzono and Fujiki, 2006, Halbach et al., 2006]. Yeast-two-Hybrid Versuche zeigen, dass PEX1 nur über PEX6 an PEX26 binden und dass eine Bindung von PEX6 an PEX26 auch in Abwesenheit von PEX1 erfolgen kann [Matsumoto et al., 2003b]. Die N-terminalen Aminosäuren 13-48 von PEX26 sind essentiell für die Interaktion mit PEX6 [Tamura et al., 2014]. Die Mutation in PEX26 L45P führt zu einem Verlust der PEX1/PEX6-Komplexbindung [Furuki et al., 2006]. Beobachtungen zeigen, dass ein völliges Fehlen von PEX26 mit einer Dislokalisierung von PEX1 und PEX6 einhergeht [Matsumoto et al., 2003a].

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von PEX26 (Aminosäuren 78-85) mit PEX14 interagiert [Tamura et al., 2014].

## 1.7 Deubiquitinierung von mUb-PEX5

Nachdem mono-ubiquitiniertes PEX5 (mUb-PEX5) mit Hilfe des Exportkomplexes aus der Membran gezogen wird, muss zunächst das Ubiquitin von PEX5 entfernt werden, bevor der Importrezeptor wieder ins Zytosol freigesetzt werden kann. Das Entfernen von Ubiquitin von einem Protein wird durch Ubiquitin-Hydrolasen katalysiert (für Reviews siehe [Amerik and Hochstrasser, 2004, Reyes-Turcu et al., 2009]).

In *S. cerevisiae* wurde das deubiquitinierende Enzym Ubp15 identifiziert. Ubp15 kann vermutlich mit der AAA+-ATPase PEX6 über die D1 interagieren [Debelyy et al., 2011]. In Säugern hingegen ist USPX9 als deubiquitinierendes Enzym identifiziert worden [Grou et al., 2012]. USPX9 ist ein zytosolisches Protein, dessen Funktion nicht nur auf den peroxisomalen Matrixproteinimport beschränkt ist.

Es wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass weitere Deubiquitinasen bei dem Export von mUb-PEX5 eine Rolle spielen. Der genaue Mechanismus der Deubiquitinierung von PEX5 konnte bisher noch nicht geklärt werden.

## 1.8 Mono-ubiquitiniertes PEX5 als Grundlage weiterer Studien für den Export

PEX5 als peroxisomaler Importrezeptor nimmt eine bedeutende Rolle des peroxisomalen Importes ein. Er erkennt im Zytosol die neu synthetisierten peroxisomalen Matrixproteine (Cargo) und transportiert diese zum Peroxisom. Nach einem initialen Kontakt mit dem Dockingkomplex (PEX13/PEX14) wird PEX5 in die peroxisomale Membran inseriert und das Cargo in das peroxisomale Lumen freigesetzt. Für den Export von

PEX5 aus der Membran zurück in das Zytosol wird PEX5 am konservierten Cys<sup>11</sup> mono-ubiquitiniert (mUb-PEX5). mUb-PEX5 wird durch die Exportmaschinerie, die aus dem membranverankerten PEX26 und dem PEX1/PEX6-Komplex besteht, aus der peroxisomalen Membran gezogen. Es wird angenommen, dass mUb-PEX5 als Substrat des PEX1/PEX6-Komplexes erkannt wird. Eine direkte oder indirekte Bindung konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Zur Klärung der Frage, ob mUb-PEX5 Substrat des PEX1/PEX6-Komplexes ist, sind Studien notwendig. Bisher war es nicht möglich, mUb-PEX5 als Protein zu gewinnen, um weitere Einblicke in den Exportschritt zu bekommen.

In dieser Arbeit wird die Herstellung von mUb-PEX5 beschrieben. Hierfür wird eine chemische Methode aus dem Bereich der Klickchemie angewendet. Bei der Methode handelt es sich um eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloadditions-Reaktion (CuAAC). In den nächsten Abschnitten wird auf die Klickchemie und die CuAAC näher eingegangen.

## 1.9 Ein Überblick über die Klickchemie

Die Anwendung der Klickchemie kann als eine moderne Technik in der Chemie betrachtet werden, um chemische Komplexe aus Molekülen *in situ* zu synthetisieren. Dabei muss eine sogenannte Klickreaktion einige Kriterien erfüllen, wie zum Beispiel eine breite Anwendbarkeit und leichte Durchführbarkeit, hohe Ausbeuten des Produktes, Unempfindlichkeit der Reaktion gegenüber Wasser oder Sauerstoff und einfache Aufreinigungsmöglichkeiten des entstandenen Produktes. Folgende Klickreaktionen erfüllen die eben genannten Kriterien: (a) nukleophile Substitutionen, (b) nichtaldolartige Carbonylreaktionen, (c) Addition an C-C-Mehrfachbindungen und (d) Cycloaddition [Kolb and Sharpless, 2003]. Im Nachfolgenden soll die Cycloaddition von Aziden und Alkinen genauer beschrieben werden.

### 1.9.1 Cycloaddition von Aziden und Alkinen

Eine Cycloaddition von organischen Aziden und terminalen Alkinen wurde bereits von Huisgen beschrieben. Bei der Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition (Abb. 1.2, A) wird durch die Zugabe eines Alkin-Moleküls (1) und eines Azid-Moleküls (2) unter hohen Temperaturen ein Triazol-Konjugat gewonnen. Dieses stabile Triazol-Konjugat liegt in einem Gemisch aus 1,4- und 1,5-Regioisomeren (3) in einem Verhältnis von 1:1 vor. Eine Optimierung der Huisgen-Cycloadditions-Reaktion hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit und Regioselektivität der 1,4- und 1,5-Isomere konnte durch Meldal und Sharpness im Wesentlichen durch die Zugabe von Cu(I) gesteigert werden. Diese Reaktion wird als Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloadditions-Reaktion (CuAAC) bezeichnet (Abb. 1.2, B) [Rostovtsev et al., 2002, Tornøe et al., 2002]. Das Vorhandensein von Cu(I) stellt den wichtigsten Faktor für eine erfolgreiche Reaktion dar. Die Zugabe von Cu(II) oder CuSO<sub>4</sub> und Ascorbinsäure als Reduktionsmittel führte zu einer Erhöhung der Ausbeute des 1,4-Regioisomers [Rostovtsev et al., 2002]. Die An-

wesenheit von Reduktionsmitteln macht die Reaktion weniger empfindlich gegenüber Sauerstoff (Review [Meldal and Tomøe, 2008]). Weitere Optimierungen der CuAAC bestand in der Anwendung des Reduktionsmittels TCEP <sup>1</sup> [Wang et al., 2003] und der Zugabe des stabilisierenden Liganden TBTA <sup>2</sup> von Cu(I) [Chan et al., 2004]. Es wird angenommen, dass das TBTA Cu(I) vor einer Destabilisierung schützt.

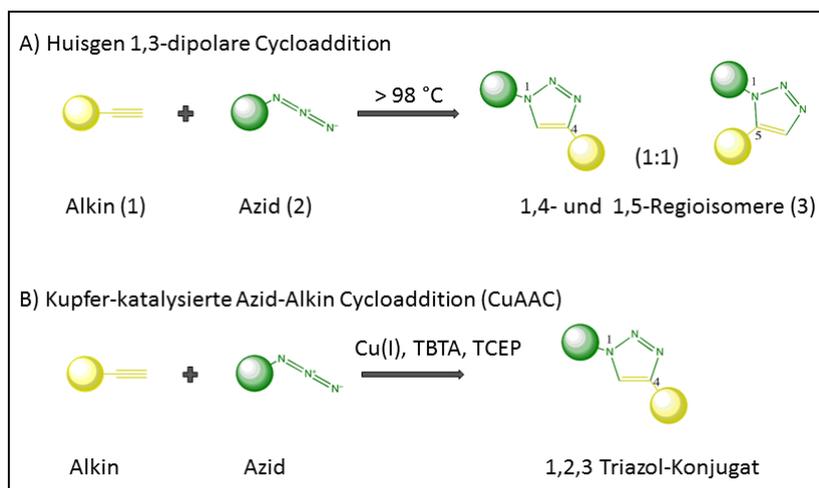


Abbildung 1.2: **Huisgen Cycloaddition und CuAAC.** A) Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition. Bei hohen Temperaturen wird ein Alkin-Molekül (1) und ein Azid-Molekül (2) zu 1,4- und 1,5-Regioisomeren in einem Verhältnis 1:1 gebildet (3). B) Die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) ist eine Weiterentwicklung der Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition unter Verwendung von Cu(I), Reduktionsmittel (TCEP) und einem Liganden (TBTA). Dabei wird die Ausbeute des 1,4-Regioisomers, einem 1,2,3-Triazol-Konjugat erhöht.

Der Einsatz des Liganden ist hinsichtlich der Klickreaktion keine Voraussetzung. Jedoch trägt er dazu bei, die Reaktion zu beschleunigen und das Cu(I) durch Oxidation zu schützen [Meldal and Tomøe, 2008].

Durch die robuste CuAAC entsteht ein 1,2,3-Triazol-Konjugat, das chemisch in Bezug auf Oxidation, Reduktion und Hydrolyse reaktionsträge ist [Meldal and Tomøe, 2008]. Darüber hinaus sind Triazol-Verbindungen beständig gegenüber enzymatischer Degradation [Thundimadathil, 2013]. Die Reaktion zu einem stabilen Triazol ist irreversibel und extrem exothermisch [Kolb and Sharpless, 2003].

Die CuAAC findet Anwendung in vielen organischen Reaktionen. Moleküle wie Zucker [Clark et al., 2008], Nukleotide [Salic and Mitchison, 2008] und Aminosäuren [Dieterich et al., 2006] können mit der Klickchemie markiert werden. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass zwei Peptide anhand einer CuAAC gekoppelt werden können [Weikart and Mootz, 2010].

Zur möglichen Gewinnung von mUb-PEX5 müssen zunächst die Proteine PEX5 und

<sup>1</sup>(tris(2-carboxyethyl)phosphin)

<sup>2</sup>(tris-(benzyltriazolylmethyl)amine)

Ubiquitin als Azid bzw. Alkin modifiziert werden.

## 1.9.2 Chemische Modifizierung von PEX5 zu einem PEX5-Azid

Zur Herstellung des Klickproduktes mUb-PEX5 aus einem PEX5-Azid und einem Ubiquitin-Alkin muss zunächst das PEX5 zu einem PEX5-Azid modifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass PEX5 am konservierten Cys<sup>11</sup> ubiquitiniert wird, muss eine zielgerichtete Ubiquitinierung an dieser Aminosäure erfolgen. Mootz und Mitarbeiter beschreiben eine Methode, in der Cysteine in Proteinen nach rekombinanter Expression und Aufreinigung zu einem Azid modifiziert werden können. Diese Reaktion findet nach Zugabe von Iodoacetamid-Ethyl-Azid statt [Weikart and Mootz, 2010]. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass alle Cysteine in der Primärstruktur des Proteins zu einem Azid umgewandelt werden. Eine zielgerichtete Azid-Modifizierung eines spezifischen Cysteins ist mit dieser Methode nicht möglich.

Eine elegantere Methode besteht in dem Einbau einer unnatürlichen Aminosäure (unnatural amino acid, UAA) während der Translation eines Proteins. Die Verwendung von UAAs hat den Vorteil, dass diese bereits mit der entsprechenden chemischen Modifizierung ausgestattet sind. Für PEX5 kann eine Azid-modifizierte UAA verwendet werden, die während der Translation anstelle des Cys<sup>11</sup> eingebaut wird. Auf die Methode des Einbaus von UAAs soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

### 1.9.2.1 Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine

Die Anwendung, jede natürliche Aminosäure durch eine unnatürliche Aminosäure (UAA) in einem Protein zu ersetzen, bietet der Proteinbiochemie viele Möglichkeiten, besondere chemische Eigenschaften und Reaktionsfähigkeiten in Proteine einzubauen [Minnihan et al., 2009].

Um natürliche Aminosäuren mit UAAs zu ersetzen, wird die *in vitro* oder *in vivo* nonsense-Suppressor tRNA Technologie angewendet [Minnihan et al., 2009]. Diese Technologie wurde in den letzten Jahren sukzessive weiterentwickelt, wobei Schultz und Mitarbeiter viel Pionierarbeit geleistet haben. Zum Einbau einer UAA wird anstelle einer bestimmten Aminosäure die natürliche Kodierung zu einem Stopcodon (nonsense) ausgetauscht. Das Stopcodon wird von einer speziellen tRNA (Suppressor) erkannt, die mit der gewünschten UAA aminoacetyliert wird [Dougherty, 2000]. Für den *in vivo* Einbau der UAA in Proteine müssen zunächst einige Voraussetzungen erfüllt werden, die Schultz und Mitarbeiter umgesetzt und optimiert haben. Zunächst muss eine tRNA entwickelt werden, die nicht von den existierenden Aminoacyl-tRNA Synthetasen (aaRS) in *E. coli* erkannt wird, jedoch in der Translation funktional ist. Diese tRNA muss außerdem die UAA zum Codon transportieren, welches nicht für die anderen endogenen Aminosäuren kodiert. Diese Technologie bedarf der Entwicklung neuer aaRS, die die Suppressor tRNA mit der UAA beladen, jedoch keine endogene *E. coli* tRNA erkennen. Darüber hinaus darf die aaRS ausschließlich die eine tRNA mit der UAA aminoacetylieren. Gleichzeitig darf die UAA kein Substrat für die endogene Aminoacyl-tRNA Synthetase sein [Wang et al., 2001].

In *E. coli* gibt es drei Stopcodons, wobei das Ambercodon am seltensten vorkommt. Das Ambercodontriplet in DNA ist (TAG), in mRNA (UAG) und das entsprechende Anticodon der tRNA (CUA) (Review [Wals and Ovaa, 2014]).

Die Entwicklung von UAAs wird kontinuierlich verbessert. So wurde von Schultz und Mitarbeitern der genetische Code um die UAA p-Azidophenylalanin (AzF) erweitert und ein passendes aaRS/tRNA-Paar für AzF entwickelt [Chin et al., 2002].

Für die Herstellung eines PEX5-Azides wurde die unnatürliche Aminosäure AzF verwendet.

### 1.9.3 Chemische Modifizierung von Ubiquitin zu einem Ubiquitin-Alkin

Zur Herstellung eines Ubiquitin-Alkins wurde die Inteinfusionsstrategie angewendet, die von Evans *et al* beschrieben wurde [Evans et al., 1998]. Die Gewinnung eines Ubiquitin-Alkins wird in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

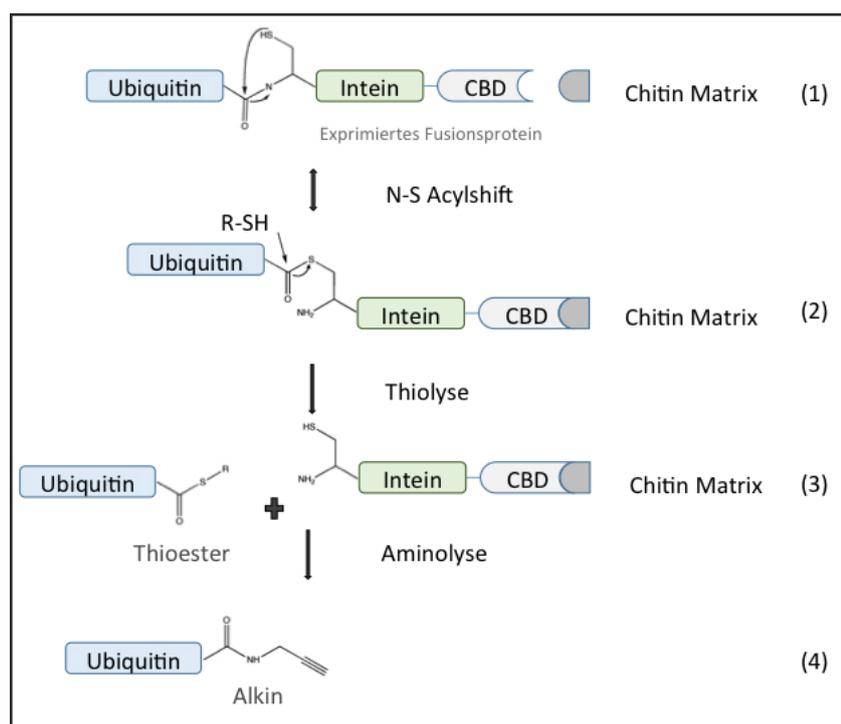


Abbildung 1.3: **Inteinfusionsstrategie.** Nach rekombinanter Expression eines Fusionsproteins (1) erfolgt nach einem nukleophilen Angriff des Cysteins vom Intein auf die Peptidbindung eine Umlagerung zu einem Thioester (2). Durch eine Thiololyse wird der Thioester abgespalten (3) und kann durch eine Aminolyse zu einem Ubiquitin-Alkin erzeugt werden (4).

Zunächst wird ein Fusionsprotein rekombinant erzeugt, welches aus dem Ubiquitin, einem Intein und einem Affinitätstag wie der Chitinbindedomäne (chitin binding domain, CBD) besteht. Über die CBD kann das Fusionsprotein an eine Chitin-Säulen-Matrix binden (1). Nach einem nukleophilen Angriff des Cysteins vom N-terminalen Intein auf die benachbarte Peptidbindung bildet sich ein Thioester (2). Nach Zugabe eines Thiols wird der Thioester durch Thiolyse von dem Intein abgespalten. Es entsteht ein Ubiquitin-Thioester (3). Eine nachfolgende Aminolyse nach Zugabe von Aminen bewirkt die Umwandlung des Ubiquitin-Thioesters zu einem Ubiquitin-Alkin (4). Das somit gewonnene Ubiquitin-Alkin kann zusammen mit dem PEX5-Azid für eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloadditions-Reaktion eingesetzt werden.

## 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Auf die Funktion des peroxisomalen Importrezeptors PEX5 wurde in den einleitenden Kapiteln ausführlich eingegangen. Demnach beschreibt PEX5 eine duale Funktion, indem es sowohl im Zytosol als auch membrangebunden vorkommen kann. PEX5 ist ein „Shuttling“-Rezeptor, der neu synthetisierte peroxisomale Matrixproteine im Zytosol bindet und diese zum Peroxisom transportiert. Nach erfolgtem Import wird das membranverankerte PEX5 am konservierten Cystein mono-ubiquitiniert und durch den Exportkomplex in ATP-abhängiger Art und Weise aus der Membran gezogen.

Bisher ist unklar, wie der genaue Export von mUb-PEX5 aus der Membran abläuft und welche Proteine und Faktoren genau beteiligt sind. Es wird von einer Beteiligung der AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 ausgegangen, die durch ihre Beschaffenheit ATP zu binden, einen energieabhängigen Export vermitteln können. Jedoch konnte bisher weder eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem Exportkomplex und dem mUb-PEX5 gezeigt werden. Die Menge an mUb-PEX5, die in der Zelle vorkommt, ist relativ gering. Für umfangreiche Interaktionsstudien mit mUb-PEX5 ist es notwendig, den Importrezeptor in modifizierter Form in größeren Mengen zur Verfügung zu haben. In der Literatur zu Peroxisomen wurde bislang keine Methode publiziert, die es ermöglicht, mUb-PEX5 in effizienten Mengen zu erhalten.

In dieser Arbeit soll zunächst eine rekombinante Form von mUb-PEX5 hergestellt werden. Basierend auf der Klickchemie soll mit Hilfe einer Kupfer-katalysierten Klickreaktion ein stabiles mUb-PEX5-Konjugat generiert werden. Mit der Gewinnung eines rekombinanten mUb-PEX5 soll eine Ausgangsbasis geschaffen werden, um Interaktionsstudien zwischen mUb-PEX5 und dem Exportkomplex zu ermöglichen. Des Weiteren soll untersucht werden, inwiefern mUb-PEX5 die gleichen Funktionen wie PEX5 ausüben kann. Diese Aspekte sollen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden.

# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Verwendete Reagenzien und Puffer

Alle verwendeten Feinchemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Fa. Roth (Karlsruhe) und Fa. Sigma-Aldrich (München), alle Enzyme, Proteinmarker sowie DNA-Ladder von Fa. Life Technologies (Darmstadt)/ Fa. Thermo Scientific (St. Leon-Rot) bezogen. Alle Oligonukleotide wurden von der Fa. Biomers (Ulm) synthetisiert.

### 2.1.1 Medien, Puffer und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: **Verwendete Medien, Puffer und Reagenzien.**

Antibiotika	
Ampicilin (Amp100)	100 mg/mL
Kanamycin (Kan50)	50 mg/mL
Chloramphenicol (Cam34)	34 mg/mL
Molekularbiologische Puffer	
LB-Medium	1 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
LB-Agar	LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar
SOC-Medium	2 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
0,5 x TBE-Puffer	4,45 mM Tris, 4,45 mM Borsäure, 10 mM EDTA (pH 8)
Proteinbiochemische Puffer	
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
Western-Blot-Puffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,05% SDS (w/v), 20 % MetOH
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % HCl
1 x SDS-Probenpuffer	62,5 mM Tris (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % 2-Mercaptoethanol
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie R-250, 30 % (v/v) EthOH, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure

1 x TBS-Puffer	100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4
Homogenisierungspuffer	250 mM Saccharose, 5 mM MOPS-KOH (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 7,4), pH 7,4, Protease Inhibitor Cocktail (1:200) (P8340, Fa. Sigma-Aldrich, München)
Importpuffer	250 mM Saccharose, 50 mM KCl, 20 mM MOPS-KOH (pH 7,4), 3 mM MgCl <sub>2</sub> ) + 0,2 % (w/v) lipid-free BSA
Proteinexpression und -reinigung	
M9 Grundmedium	45 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,5 mM NaCl
M9 Minimalmedium	M9 Grundmedium, 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,03 mg/mL Thiamin-HCl, 0,2 % (w/v) Glucose, 0,1 % NH <sub>4</sub> Cl, 22 μM FeCl <sub>3</sub>
HisA-Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8
HisB-Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8
StrepA-Puffer	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), pH 8
StrepB-Puffer	StrepA-Puffer, 5 mM Desthiobiotin, pH 8
Chitinbindepuffer	20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), pH 8,2
Abspaltmix	Chitinbindepuffer, 150 mM MESNA, 750 mM Propargylamin, pH 8,2
SEC-A-Puffer	20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 200 mM D-Sorbit, pH 8
SEC-B-Puffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 8
Protein-Proteininteraktionen	
Bindungspuffer (BP)	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 20 % Glycerin, pH 7,4
BP-B	BP, 0,1 % BSA protease-frei
BP-TPI	BP, 0,02 % Tween <sup>®</sup> 20, Protease Inhibitor Cocktail (1:200) (P8340, Fa. Sigma-Aldrich, München)
Elutionspuffer (Elu)-TPI	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 20 % Glycerin, pH 7,4, 0,02 % Tween <sup>®</sup> 20, Protease Inhibitor Cocktail (1:200)
Proteinanalyse	
Proteinase K-Puffer	10 mM Tris, 1 mM Kalziumacetat, 40 % Glycerin, pH 7,4
Zellbiochemische Puffer	
Elektroporationspuffer	250 mM Saccharose, 1 mM MgCl <sub>2</sub> in D-PBS
Zytoleextraktionspuffer	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 20 % Glycerin, pH 7,4, Protease Inhibitor Cocktail (1:200) (P8340, Fa. Sigma-Aldrich, München)
Mowiol-Einbettmedium	9,6 % (w/v) Mowiol 4-88, 24 % (w/v) Glycerin, 0,1 M Tris (pH 8,5), 2,5 % (w/v) DABCO

Chemische Puffer	
Klickpuffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 8

## 2.1.2 Plasmide, Antikörper und Oligonukleotide

Die Tabelle 2.2 gibt die Plasmide wieder, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2.2: **Verwendete Plasmide.**

Plasmidname	Vektor	Protein	Herkunft
pVS1	pET9d	His <sub>6</sub> -hsPEX5L	Wolfgang Schliebs
pCS3	pcDNA3.1zeo	hsPEX19	Christiane Sprenger
pTY03	pcDNA3	hsPEX6	[Yahraus et al., 1996]
pBM57	pcDNA3.1zeo	PEX1	Britta Moellers
Thiolase-myc	pcDNA3	Thiolase-myc	Nancy Braverman
pGD106	pcDNA3	hsPEX5L	Gabriele Dodt
pGKW48	pcDNA3	hsPEX14-myc	Garnet Will
pJD10	pcDNA3.1zeo	hsPEX26-myc	Jan Diekmann
pEB22.11	pEGFP-C1	EGFP-PTS1	Elisabeth Becker
pEB13.10	pcDNA3.1zeo	hsPEX7-myc	Elisabeth Becker
pCK19	pcDNA3.1zeo	hsPEX13	Christina Klein
pSE05	pcDNA3.1	hsPEX6-2xFlag	Patrick Schulte-Euler
GFP-PTS1	pcDNA3	GFP-PTS1	Stephan Gould
pEVOL-AzF	p15A	aaRS/tRNA <sup>AzF</sup> <sub>CUA</sub>	[Young et al., 2010]
pNW04	pTXB1	scUb( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD	[Weikart and Mootz, 2010]
pVS06	pET9d	hsPEX5C11TAG	Vera Sippel
pVS09	pTXB1	scStrep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD	Vera Sippel
pVS11	pcDNA3.1zeo	hsPEX1Y914A	Vera Sippel
pVS12	pcDNA3.1zeo	hsPEX6Y777A	Vera Sippel

In Tabelle 2.3 sind alle Antikörper aufgelistet, die zur Immundetektion (WB), Immunfluoreszenz (IF) und Immunpräzipitation (IP) verwendet wurden.

Tabelle 2.3: **Verwendete Antikörper.** Antikörper für Immundetektion (WB), Immunfluoreszenz (IF) und Immunpräzipitation (IP)

Primärantikörper					
Antikörper	Spezies	Verdünnung			Herkunft
		WB	IF	IP	
$\alpha$ -hsPEX1	rabbit	-	1:50	-	AG Kunau, Bochum
$\alpha$ -hsPEX5 (GDA2)	rabbit	1:5 000	1:800	-	AG Dodt, Bochum
$\alpha$ -hsPEX6 (GDA3)	rabbit	-	1:100	1:50	AG Dodt, Bochum
$\alpha$ -hsPEX14	rabbit	-	1:400	-	AG Kunau, Bochum
$\alpha$ -hsPEX26	rabbit	-	-	1:50	Sabine Weller, Göttingen
$\alpha$ -hsThiolase	rabbit	-	1:100	-	Stephen Gould, Baltimore, USA
$\alpha$ -hsKatalase	sheep	-	1:100	-	Fa.The Binding Site, Schwetzingen
$\alpha$ -hsPMP70	sheep	-	1:100	-	Stephen Gould, Baltimore, USA
$\alpha$ -FLAG	rabbit	-	-	1:35	F 7425, Fa. Sigma-Aldrich, München
$\alpha$ -AFP	mouse	-	1:100	-	QBiogene/MP Biomedicals, Illirch, Frankreich
$\alpha$ -hsMAPK	mouse	1: 2000	-	-	QIAexpress Tag 100, MAP kinase 2 Epitop (EETAR-FQPGYRS), Fa. Quiagen, Hilden
Sekundärantikörper					
Antikörper	Spezies	Verdünnung			Herkunft
		WB	IF	IP	
$\alpha$ -rabbit HRP-gekoppelt	goat	1:15 000	-	-	Fa. Sigma-Aldrich, München
$\alpha$ -mouse HRP-gekoppelt	goat	1:15 000	-	-	Fa. Sigma-Aldrich, München
$\alpha$ -rabbit Alexa Fluor-488	donkey	-	1:300	-	Fa. Life Technologies, Darmstadt
$\alpha$ -sheep Alexa Fluor-488	donkey	-	1:300	-	Fa. Life Technologies, Darmstadt
$\alpha$ -mouse Alexa Fluor-488	donkey	-	1:300	-	Fa. Life Technologies, Darmstadt
$\alpha$ -rabbit Alexa Fluor-594	donkey	-	1:200	-	Fa. Life Technologies, Darmstadt
$\alpha$ -sheep Alexa Fluor-594	donkey	-	1:200	-	Fa. Life Technologies, Darmstadt

Die zur PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: **Oligonukleotide.** Unterstrichen ist das jeweilige mutierte Codon.

Name	Sequenz	Funktion
GD496	5' GTG GAG GCC GAA <u>TAG</u> GGG GGT GCC AAC 3'	forward, Mutagenese in <i>hsPEX5</i> , Cys11TAG
GD497	5' GTT GGC ACC CCC <u>CTA</u> TTC GGC CTC CAC 3'	reverse, Mutagenese in <i>hsPEX5</i> , Cys11TAG
GD504	5' T ATG TCC GCC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TCC GCC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC CA 3'	forward, <i>NdeI</i> -Schnittstelle, <i>Strep</i> <sup>®</sup> II-Tag, TEV-site
GD505	5' T ATG GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA GGC GGA CA 3'	reverse, <i>NdeI</i> -Schnittstelle, <i>Strep</i> <sup>®</sup> II-Tag, TEV-site
GD523	5' CTC ATT AAC ATG <u>GCT</u> GTG GGC CAA AGT G 3'	forward Mutagenese in <i>hsPEX6</i> , Tyr777Ala
GD524	5' C ACT TTG GCC CAC <u>AGC</u> CAT GTT AAT GAG 3'	reverse, Mutagenese in <i>hsPEX6</i> , Tyr777Ala
GD525	5' G TTA CTC AGC AAA <u>GCC</u> ATT GGA GCA AGT G 3'	forward, Mutagenese, <i>hsPEX1</i> , Tyr914Ala
GD526	5' C ACT TGC TCC AAT <u>GGC</u> TTT GCT GAG TAA C 3'	reverse, Mutagenese <i>hsPEX1</i> , Tyr914Ala

### 2.1.3 Verwendete Organismen

Alle Bakterienstämme, die in dieser Arbeit sowohl für Plasmid-Amplifikationen als auch für Proteinexpressionen eingesetzt wurden, sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.5: **Verwendete Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	genetische Eigenschaften
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA $\lambda$ <sup>-</sup>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm lon $\lambda$ (DE3)

Im Rahmen der Arbeit wurde mit humanen Fibroblastenzelllinien (siehe Tabelle 2.6) aus der Haut gearbeitet, die aus Patienten-Zellen (PBD, peroxisome biogenesis disorder) stammen.

Tabelle 2.6: **Verwendete Fibroblastenzelllinien.**

PBD	CG	Gen	Bezeichnung	Referenz/ Herkunft
PBD005T	2	<i>hsPEX5</i>	PEX5-defiziente Fibroblasten/ $\Delta$ PEX5	Dodt et al. 1995/ Gould, Baltimore
PBD009T	1	<i>hsPEX1</i>	PEX1-defiziente Fibroblasten/ $\Delta$ PEX1	Collins et al., 1999/ Gould, Baltimore
PBD010T	4	<i>hsPEX6</i>	PEX6-defiziente Fibroblasten/ $\Delta$ PEX6	Fukuda et al., 1996/ Gould, Baltimore

Alle in dieser Arbeit verwendeten Fibroblastenzelllinien wurden mit dem großen T-Antigen des Simian Virus (SV) 40 immortalisiert.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Von einer Übernachtskultur, die in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (Selektionsmedium) bei 37 °C auf einem Schüttler (160 rpm) angezogen wurde, wurde eine Kultur in 350 mL Selektionsmedium 1:100 angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler (160 rpm) angezogen. Nach Erreichen eines  $OD_{600}$  von 0,5 wurde die Kultur bei 4 °C für 15 Minuten und 3 220 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 30 mL eiskaltem sterilen Reinstwasser und anschließend zwei Mal mit einer eiskalten 20 %-igen Glycerollösung gewaschen. Nach den Waschsritten wurde das Pellet in der 20 %-igen Glycerollösung resuspendiert (je Liter Kultur in 2 mL 20 %-iger Glycerollösung), aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.2 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zu 50  $\mu$ L auf Eis aufgetaute elektrokompente *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) für DNA-Präparationen bzw. *E. coli* BL21 (DE3) für Proteinexpressionen wurden 100 ng Plasmid-DNA oder ein Ligationsansatz hinzugefügt und in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite, Fa. Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) überführt. Nach der Elektroporation in einem Elektroporator (Elektroporator 2510, Fa. Eppendorf, Oldenburg) bei 2 500 V mit zwei Pulsen wurden die Bakterien sofort in 500  $\mu$ L vorgewärmtes SOC-Medium

aufgenommen und bei 37 °C auf dem Schüttler (160 rpm) für ca. 30 Minuten inkubiert, damit die Antibiotikaresistenz ausgebildet werden konnte. Anschließend wurden 50  $\mu\text{L}$  und 100  $\mu\text{L}$  auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechenden Antibiotika mit einem vorher sterilisierten Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde angewendet, um DNA-Fragmente nach einer PCR oder Enzymrestriktion nach ihrer Größe aufzutrennen und zu analysieren. Für 0,8-1 %-ige Agarosegele wurde Standard-Agarose, für 2,5 %-ige Agarosegele „low melt“ Agarose in 0,5 x TBE-Puffer (Elektrophoresepuffer) durch Aufkochen gelöst. Dem flüssigen Gel wurde Ethidiumbromid (Fa. AppliChem, Darmstadt), ein mit der DNA interkalierender aromatischer Farbstoff, in einer Konzentration von 1 mg/mL hinzugegeben, um später die DNA-Fragmente unter dem UV-Licht sichtbar zu machen. Die Taschen wurden mit 6 x Loading Dye (Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) beschwerten Proben sowie Marker (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, 5-10  $\mu\text{L}$ ) befüllt und in Elektrophoresepuffer bei 100 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Agarosegel unter UV-Licht fotografiert.

### 2.2.4 Plasmid-Mini-Präparation

Für eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde eine Übernachtskultur aus einer Glycerinkultur oder einer Kolonie von einer LB-Agar-Platte in einem Volumen von 3-10 mL LB-Medium mit jeweiligen Antibiotika für 16-18 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler (160 rpm) angezogen. Die angewachsene Kultur wurde durch Zentrifugation für zwei Minuten und 16 000 g bei 4 °C geerntet. Die genauen Angaben zur Durchführung sind dem Protokoll des Herstellers (Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System, Fa. Promega, Madison, USA) zu entnehmen. Die saubere DNA wurde in sterilem Reinstwasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration und die Reinheit der DNA wurden mittels Nandrop (siehe 2.2.10) ermittelt. Die DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.5 Plasmid-Midi-Präparation

Für eine Plasmidpräparation im größeren Maßstab wurde eine Übernachtskultur aus einer Glycerinkultur oder einer Kolonie von einer LB-Agar-Platte in einem Volumen von 50-100 mL für ein „high-copy“ bzw. 200 mL für ein „low-copy“ Plasmid in Selektionsmedium für 16-18 h bei 37 °C auf einem Schüttler (160 rpm) angezogen. Die angewachsene Kultur wurde für 20 Minuten und 3 220 g bei 4 °C zentrifugiert. Die genauen Angaben zur Durchführung der Plasmidisolierung sind der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Nucleo Bond® Xtra Midi, Fa. Machery-Nagel, Düren) zu entnehmen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 100  $\mu\text{L}$  sterilem Reinstwasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration und ihre Reinheit wurden mittels Nanodrop (2.2.10) bestimmt.

Die DNA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Jedes Aliquot wurde nur einmal verwendet, um die Stabilität der DNA zu gewährleisten.

## 2.2.6 Sequenzierung von Plasmiden

Zur Überprüfung der Richtigkeit der DNA-Sequenz wurden Plasmide bei der Firma MWG Eurofins (Ebersfeld) sequenziert. Die Sequenzierung beruht auf der Methode von Sanger, die im Jahre 1977 beschrieben wurde.

## 2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymeraseketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von template-DNA, die erstmals von Mullis et al [Mullis and Faloona, 1987] veröffentlicht wurde. Das Prinzip der Methode beruht auf *in vitro* Amplifizierung, indem sequenzspezifische Oligonukleotide an den komplementären DNA-Strang binden und an diesen der DNA-Poylmerase-Komplex anlagern kann. Für die Polymerasekettenreaktionen in dieser Arbeit wurde die rekombinante *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, eine in hohem Maße thermostabile DNA Polymerase, die aus dem Archebakterium *Pyrococcus furiosus* gewonnen wurde. Die *Pfu*-DNA Polymerase katalysiert die template-abhängige Polymerisation der Nukleotide in 5' - 3' Richtung unter Bildung eines zweiten DNA-Stranges. Die *Pfu*-DNA Polymerase zeichnet sich außerdem durch eine 3' - 5' Exonukleaseaktivität aus, wobei die Fehlerrate bei  $2,6 \times 10^{-6}$  je Nukleotid und Zyklus liegt. Das Temperaturoptimum der *Pfu*-DNA-Polymerase liegt bei 72 °C mit einer Elongationsrate von 2 kpb pro Minute.

Ein PCR-Reaktionsansatz von 50  $\mu$ L umfasste 100 ng saubere und frisch aufgereinigte template-DNA, 1 x *Pfu*-Puffer mit  $MgCl_2$ , 5 pmol forward Primer, 5 pmol reverse Primer, 1 mM dNTPs, 1 Unit *Pfu*-DNA Polymerase, der mit Reinstwasser aufgefüllt wurde. Zusätzliche Additiva wie 5 % DMSO und 3  $\mu$ g BSA je PCR-Ansatz wurden bei PCR-Reaktionen von PEX6 hinzugefügt.

Tabelle 2.7: PCR-Programm für PEX1, PEX5 und PEX6.

	PCR-Schritte	PEX5		PEX1 und PEX6	
18 x	Denaturierung	95 °C	2'	95 °C	2'
	Denaturierung	95 °C	1'	95 °C	1'
	Annealing	62 °C	1'	60 °C	1'
	Elongation	72 °C	10'	72 °C	12'
	Elongation final	72 °C	15'	72 °C	20'
	Ende	4 °C	$\infty$	4 °C	$\infty$

## 2.2.8 Ortsspezifische Mutagenese (site-directed mutagenesis)

Für eine ortsspezifische Mutagenese wurden zunächst Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.4) mit einer Länge von ungefähr 28 Basenpaaren angefertigt, in dessen Mitte die gewünschte Mutation liegen soll. Nach erfolgter PCR (siehe 2.2.7) wurde dem Ansatz 10 Units *DpnI* hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. *DpnI* erkennt und schneidet methylierte template-DNA, sodass der amplifizierte mutierte DNA-Strang erhalten bleibt. Ein Aliquot wurde auf einem Agarosegel (siehe 2.2.3) aufgetragen, für die Transformation in *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) wurden 2  $\mu$ L des Ansatzes verwendet.

## 2.2.9 Klonierung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD

### 2.2.9.1 Linearisierung des Vektors

Die Einführung eines N-terminalen *Strep*-Tags<sup>®</sup> II (nachfolgend als Strep bezeichnet) in pNW04, das die Expression von Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD kodiert, konnte mit Hilfe einer Oligonukleotid-Hybridisierung bewerkstelligt werden. Zunächst wurden 2  $\mu$ g des Vektors pNW04 mit *NdeI* für eine Stunde bei 37 °C linearisiert. Zur Verhinderung der Religation des Vektors wurde dieser einer Dephosphorylierung mit der thermosensitiven Alkalinen Phosphatase (Fast AP) unterzogen. Zu dem Restriktionsansatz wurden 2 Units Fast AP hinzugegeben, für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 75 °C inaktiviert.

Der komplette Restriktionsansatz wurde auf einem Agarosegel (siehe 2.2.3) aufgetragen. Die Bande des linearisierten, dephosphorylierten Vektors wurde manuell mit einer sauberen Skalpellklinge ausgeschnitten und über eine Spin-X-Säule (Spin-X<sup>®</sup> centrifuge Tube Filter, 0,22  $\mu$ L, Fa. Costar<sup>®</sup> Corning Incorporated, Corning, USA) extrahiert. Die Isolierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 16 000 g und Raumtemperatur. Eine anschließende Isopropanolfällung reinigte und konzentrierte die DNA auf. Hierfür wurde zum Präzipitieren der DNA zum Ausgangsvolumen 1/10 des Volumens an 3 M Natrium-Acetat (pH 5), sowie das dreifache Volumen an Isopropanol hinzugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 16 000 g und 4 °C. Die mitgefällten Salze wurden durch Waschen mit 70 %-igem Ethanol entfernt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 Minuten wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet bei 65 °C getrocknet, anschließend in einem kleinen Volumen in Reinstwasser gelöst und die Konzentration mittels Nanodrop (siehe 2.2.10) bestimmt.

### 2.2.9.2 Oligonukleotid-Hybridisierung

Zunächst wurden die Oligonukleotide GD504 und GD505 (siehe Tabelle 2.4) an ihrem 5' Enden mit einer T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK) phosphoryliert. Dabei wird der Transfer des  $\gamma$ -Phosphates eines ATPs an die 5'-OH-Gruppe der DNA katalysiert. Jeweils 150 pmol der Oligonukleotide wurden mit 1 mM ATP (Endkonzentration), 10 Units T4 PNK für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, eine anschließende Inaktivierung von T4 PNK erfolgte für 10 Minuten bei 75 °C. Zur Oligonukleotid-Hybridisierung der

Primer wurden diese zunächst initial für vier Minuten, anschließend für eine Minute bei 94 °C denaturiert. Es folgte eine konstante Temperaturabnahme von 0,5 °C je 30 Sekunden bis zum Erreichen von 4 °C.

### 2.2.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Liagtion des aufgereinigten, linearisierten und phosphorylierten Vektors pNW04 und des einzufügenden Strep-Tags, welches durch die vorher beschriebene Methode der Oligonukleotid-Hybridisierung erhalten wurde, wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5' - Phosphat und 3' -Hydroxylende einer doppelsträngigen DNA. Ein Reaktionsansatz von 20  $\mu$ L umfasste 1 Weiss Unit T4-DNA-Ligase, 1 x T4-DNA-Ligasepuffer, 60 ng linearisierten, dephosphorylierten Vektor und Insert, welcher in einem äquimolaren Mengenverhältnis zum Vektor von 1:1 bis 1:5 zusammenpipettiert wurde. Die Reaktion wurde gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend für 16 Stunden bei 16 °C inkubiert.

Nach der Ligation musste der Ansatz zunächst gegen Reinstwasser dialysiert werden, da sich die enthaltenen Salze störend auf die anschließende Transformation in elektrokompente Bakterien auswirken können. Hierfür wurde ein Ansatz auf ein Mikrofilter (0,22  $\mu$ m Filter membrane, Fa. Sigma-Aldrich, München) pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur einer Dialyse gegen Reinstwasser unterzogen. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$  (siehe 2.2.2) transformiert.

### 2.2.10 Messung von Konzentrationen mittels Nanodrop

Zur Ermittlung von DNA- als auch von Proteinkonzentrationen und deren Reinheit wurde der Nanodrop (ND-1000 Spectrophometer, Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) eingesetzt.

**DNA-Konzentrationsmessung:** Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde das Programm Nucleic-Acid 'DNA-50' für doppelsträngige DNA verwendet. Der Quotient 260/280 der jeweils gemessenen Absorptionen gibt die Reinheit der vorliegenden DNA-Probe an. Liegt der Wert bei ungefähr 1,8 entspricht dies reiner DNA, ein Verhältnis von 2 gilt als saubere RNA.

**Protein-Konzentration:** Nach Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte die Konzentrationsbestimmung unter Verwendung des Programmes Proteins A280 'Other protein' unter Berücksichtigung des molekularen Extinktionskoeffizienten ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und Molekulargewicht ( $M_W$ ) des jeweiligen Proteins. Diese Daten wurden der Datenbank „Expasy-Protparam“ entnommen.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus einer Gesamtmenge an Proteinen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

#### 2.3.1.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976] beruht auf Verwendung von Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Die Bindung des Färbereagens an das Protein resultiert in einem Sprung der Absorption von 465 zu 595 nm. Als Referenzprotein wurde Bovines Serum Albumin (BSA, 2 mg/mL, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) verwendet und eine Eichgerade mit verschiedenen Konzentrationen erstellt. Die Proteinproben des PNS aus der Mausleber (2.3.5) wurden vorab 1:20 vorverdünnt und davon 5, 10 und 20  $\mu\text{L}$  eingesetzt, auf 500  $\mu\text{L}$  mit Reinstwasser aufgefüllt und mit derselben Menge an Bradford-Reagenz (Coomassie Protein Assay Reagent, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) versetzt. Die Inkubation der Proteinlösung mit dem Färbereagenz erfolgte für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Die Messung konnte in einem Photometer (Ultrospec 2100 *pro*, Fa. Amersham Biociences/ Fa. GE Healthcare, Freiburg) vorgenommen werden.

#### 2.3.1.2 BCA-Protein-Assay

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinpellets (2.8.2) wurde mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Reagenz (Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, St. Leon-Rot) durchgeführt. Hierbei wurden die Reagenzien BCA-A und BCA-B 50:1 vor Zugabe zu der Proteinlösung vermischt.

Zur Erstellung einer Eichgerade in verschiedenen Konzentrationen wurde BSA (Bovines Serum Albumin, 2 mg/ml, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) verwendet. Die Proteinproben wurden vorab 1:20 vorverdünnt und davon 5, 10 und 20  $\mu\text{L}$  eingesetzt und auf 50  $\mu\text{L}$  mit Reinstwasser aufgefüllt. Nach Zugabe von 950  $\mu\text{L}$  des gemischten BCA-Reagenz erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 60 °C und anschließend die Messung in einem Photometer (Ultrospec 2100 *pro*, Fa. Amersham Biociences/ Fa. GE Healthcare, Freiburg).

### 2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer molaren Masse aufzutrennen und somit besser charakterisieren zu können, wurden Proteinproben einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese), modifiziert nach Laemmli [Laemmli et al., 1974], unterzogen. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurden 10 % (PEX5-Standardgel), 12 % (limitierte Proteolyse (siehe 2.7.1) von rPEX5L

und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bzw. 17 % (Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin) SDS-Gele angefertigt (Zusammensetzung der SDS-Gele siehe Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: **Zusammensetzung der SDS-Gele.** Angaben der Trenngele (TG) und Sammelgele (SG) in %.

	10 % TG	12 % TG	17 % TG	5 % SG
Acrylamid- Bisacrylamid	33 % (v/v)	40 % (v/v)	57 % (v/v)	16,5 % (v/v)
1,5 M Tris	390 mM (pH 8,8)			185 mM (pH 6,8)
350 mM SDS	3,5 mM			3,5 mM
440 mM APS	4,4 mM			4,4 mM
TEMED	5,1 mM			5,1 mM

Die Proben wurden vorab mit 2 x bzw. 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 80 °C für fünf Minuten (alle Proben der Koimmunpräzipitation (siehe 2.6.2)) bzw. 100 °C für fünf Minuten erhitzt. Die Proteinproben wurden bei einer konstanten Spannung (siehe Tabelle 2.9) unter Verwendung einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer bei Raumtemperatur elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit dem Herauslaufen der Lauffront aus dem SDS-Gel abgestoppt, bei SDS-Gelen der Autoradiographie (siehe 2.6.3) erst nachdem die Lauffront ca. 10-15 Minuten herausgelaufen war.

Tabelle 2.9: **Verwendete Spannungen bei SDS-Gelen.**

SDS-Gel	konstante Spannung (V)
Coomassie-Färbung	200 V
Western Blot	140 V
Autoradiographie	120 V

### 2.3.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinproben auf SDS-Gelen (2.3.2) wurden diese mit dem Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff eingefärbt. Hierfür werden die SDS-Gele in Schälchen mit Coomassie-Färbelösung gelegt, kurz in der Mikrowelle aufgekocht und für weitere 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurden die SDS-Gele in Coomassie-Entfärbelösung ebenfalls kurz in der Mikrowelle erhitzt und bis zum gewünschten Entfärbegrad weiter auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Dokumentation wurden die SDS-Gele eingescannt und digitalisiert.

### 2.3.4 Western Blot

Zur Durchführung einer Immundetektion mit spezifischen Antikörpern wurden die mittels einer SDS-PAGE (siehe 2.3.2) aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines diskontinuierlichen Semi-Dry-Blots auf eine Nitrocellulose-Membran (Roti<sup>®</sup>-NC 0,2  $\mu\text{m}$ , Fa. Roth, Karlsruhe) für eine Stunde bei 20 V und Raumtemperatur unter Verwendung des Western-Blot-Puffers übertragen. Eine anschließende Färbung der Membran mit dem reversiblen Farbstoff Ponceau-S wurde zur Kontrolle des Transfers durchgeführt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 7 % Milchpulver-TBS-Triton X-100 0,1% (PEX5) bzw. für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver-TBS-Tween<sup>®</sup> 20 0,02 % (MAPK) geblockt. Es folgte die Inkubation der primären Antikörper in 0,2 % Milchpulver-TBS-Triton X-100 (PEX5, zwei Stunden) bzw. 0,1 % Milchpulver-TBS-Tween<sup>®</sup> 20 0,02 % (MAPK, eine Stunde) bei Raumtemperatur (Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper siehe Tabelle 2.3). Nach einem zweimaligen kurzen und einem dreimaligen jeweils 10-minütigen Waschschrift in entsprechenden TBS-Puffern erfolgte die Inkubation der sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Verwendung derselben Puffer wie beim ersten Antikörper. Die Waschprozedur wurde, wie oben beschrieben, wiederholt, anschließend wurde die Membran einmal mit TBS ohne Detergenzien gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran eine Minute mit einer ECL (enhanced chemical luminescence)-Lösung (Pierce<sup>®</sup> ECL Western Blotting Substrate, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) inkubiert, wobei das Luminol enthaltene Substrat von der Meerrettich-Peroxidase oxidiert und somit Licht emittiert wird. Zur Detektion der Signale wurden Amersham Hyperfilm<sup>™</sup> ECL- Filme (Fa. GE Healthcare, Freiburg) verwendet.

### 2.3.5 Herstellung von post-nukleärem Überstand (PNS) aus Mausleber

Die Herstellung von post-nukleärem Überstand (post-nuclear supernatant, PNS) aus der Mausleber wurde von Gouveia und Mitarbeitern beschrieben [Gouveia et al., 2003a]. Es wurden vier Lebern aus C57BL/6 Wildtyp-Mäusen (mit freundlicher Bereitstellung von AG Feil, Tübingen) präpariert, deren Verarbeitung zügig auf Eis geschah. Die Leber wurden in fünffachen Volumen in Homogenisierungspuffer aufgenommen und mit einem „Potter Elvehjem Homogenisator“ (500 upm) homogenisiert, bis alles eine homogene Masse war. Zum Abtrennen von nicht aufgeschlossenen Zellen und Zellkernen wurde das Homogenat für 10 Minuten, bei 600 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und ein zweites Mal zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (PNS) vorsichtig in ein neues vorgekühltes 50 mL Röhrchen überführt und in 250  $\mu\text{L}$  Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Der PNS aus der Mausleber ist mindestens für zwei Monate haltbar. Die Proteinkonzentration des PNS wurde nach Bradford (siehe 2.3.1.1) gemessen.

### 2.3.6 Importassay

Je Ansatz wurden 300  $\mu\text{g}$  PNS (siehe 2.3.5) in insgesamt 100  $\mu\text{L}$  (Endvolumen) Importpuffer verwendet. Diesem wurde 1 mM ATP (Endkonzentration, 100 mM Stocklösung in Importpuffer ohne BSA) zugegeben und bei 26 °C für 15 Minuten auf einem Heizblock inkubiert. Nach Inkubation wurden davon 80  $\mu\text{L}$  abgenommen und je nach Ansatz 0,25  $\mu\text{M}$  rPEX5 bzw. rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ), 1  $\mu\text{L}$   $^{35}\text{S}$ -PEX5L (pGD106),  $^{35}\text{S}$ -Thiolase (Thiolase-myc) oder  $^{35}\text{S}$ -PEX7 (pEB13.10), die durch TnT *in vitro* exprimiert wurden (siehe dazu Abschnitt 2.6.1), zugegeben. Die Proben wurden für weitere 20 Minuten bei 26 °C auf einem Heizblock, die Negativkontrollen jedoch auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden zu 73,5  $\mu\text{L}$  Probenvolumen 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Endkonzentration) Proteinase K (0,25 mg/mL Stocklösung in Proteinase K-Puffer) (Fa. Sigma-Aldrich, München) zugegeben und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Proteinase K-Aktivität wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMSF (50 mg/mL Stocklösung in Isopropanol gelöst) abgestoppt. Der Ansatz wurde auf 1 mL mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und für 15 Minuten bei 15 000 g und 4 °C zentrifugiert, um die Organellen zu isolieren. Das Pellet wurde in 10  $\mu\text{L}$  2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, für fünf Minuten bei 80 °C erhitzt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel (siehe 2.3.2) aufgetragen und anschließend mit Hilfe eines diskontinuierlichen Semi-Dry-Blots auf eine Nitrocellulose-Membran (Roti<sup>®</sup>-NC 0,2  $\mu\text{m}$ , Fa. Roth, Karlsruhe) für eine Stunde bei 20 V und Raumtemperatur unter Verwendung des Western-Blot-Puffers übertragen. Eine Färbung der Membran mit Ponceau S konnte ein Transfer der Proteine sicherstellen. Zum Auflegen des Filmes (Carestream BioMax MR Film, Fa. Sigma-Aldrich, München) musste die Membran zuvor luftgetrocknet werden. Nach zwei bis fünf Tagen konnte der Film entwickelt werden.

## 2.4 Proteinexpression von rekombinanten Proteinen

### Allgemeines zur Proteinexpression

Die Expression rekombinanter Proteine wurde im bakteriellen Expressionssystem *E. coli* durchgeführt, in dieser Arbeit im speziellen mit dem gram-negativen Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3). Das Plasmid mit der gewünschten kodierenden Proteinsequenz und entsprechendem Promotor wurde in die Bakterien transformiert und durch spezifische Antibiotika selektiert. Die Proteinexpression kann durch Zugabe von entsprechenden Metaboliten induziert werden, indem die Transkription durch Aktivierung des Promotors gestartet wird. In dieser Arbeit wurden sowohl Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) als auch Arabinose als Induktor verwendet. Alle Kulturbedingungen (Bakterienstamm, Temperatur, Expressionszeit und Konzentration von IPTG bzw. Arabinose) mussten für die jeweiligen Proteine vorab optimiert werden, um eine Ausbeute in adäquaten Mengen zu erhalten. In dieser Arbeit wurden die Proteine PEX5L, PEX5C11AzF und *Strep*-tag<sup>®</sup>II-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-GyrA-CBD (kurz *Strep*-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-GyrA-CBD) rekombinant im großen Maßstab exprimiert. Nachfolgend soll auf die verschie-

denen Proteinexpressionen eingegangen werden.

### 2.4.1 Expression von rekombinantem PEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD

Die Expression der rekombinanten Proteine PEX5L bzw. Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD erfolgte in dem Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3), der zuvor mit 100 ng pVS1 (PEX5L) bzw. mit pVS09 (Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD) transformiert wurde (siehe 2.2.2). Die Selektion erfolgte über LB-Agar-Platten mit Antibiotika Kan50 (PEX5L) bzw. Amp100 (Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD). Es wurde jeweils eine Glycerinkultur angefertigt. Am Vorabend wurde eine Kultur in Selektionsmedium aus einer Glycerinkultur bzw. aus einer Kolonie von einer Selektionsplatte angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler (160 rpm) über Nacht angezogen. Für eine Proteinexpression wurden zwei Liter (PEX5L) bzw. acht Liter (Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD) Selektionsmedium in Erlenmeyerkolben mit Schikane vorbereitet. Die Expressionskultur wurde 1:50 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bis die Kultur einen OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,7 erreicht hatte. Die Kulturen wurden mit 1 mM IPTG (PEX5L) bzw. 0,4 mM IPTG (Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD) induziert. Die Proteinexpression für PEX5L erfolgte bei 18 °C über Nacht, für Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD bei 28 °C für vier Stunden. Vor Induktion wurde den Kulturen 500  $\mu$ L Probe entnommen, für 10 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 50  $\mu$ L in HisA-Puffer für rPEX5L und Chitinbindepuffer für Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD resuspendiert und ein Aliquot entnommen. Nach Beendigung der Proteinexpression wurden die Kulturen in einem SLC-4 000 Rotor für 10 Minuten bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC 64 centrifuge, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) und das Pellet entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren und gelagert.

### 2.4.2 Einbau von p-Azidophenylalanin (AzF) in PEX5C11TAG mittels „Nonsense“-Suppression

Der Einbau der unnatürlichen Aminosäure p-Azidophenylalanin (AzF) in PEX5C11TAG erfolgte mittels einer Nonsense-Suppression unter Verwendung von Minimalmedium M9. Im nachfolgenden wird das Protein mit der eingebauten unnatürlichen Aminosäure AzF als PEX5C11AzF bezeichnet. Zunächst wurden jeweils 100 ng der Plasmide pVS06 (PEX5C11TAG) und pEVOL-AzF, welches für die Expression der Aminoacyl-tRNA-Synthetase und Suppressor tRNA (aaRS/tRNA<sup>AzF</sup><sub>CUA</sub>) [Young et al., 2010] kodiert, in *E. coli* BL21 (DE3) kotransformiert (siehe 2.2.2) und auf LB-Agar-Platten mit Kan50/Cam34 selektiert und anschließend Glycerinkulturen angefertigt. Am Vorabend wurde eine Vorkultur in LB-Kan50/Cam34-Medium aus einer Glycerinkultur bzw. aus einer Kolonie der Selektionsplatte angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler (160 rpm) über Nacht angezogen. Für eine Proteinexpression wurden zwei Liter Minimalmedium M9 in Erlenmeyerkolben (mit Schikane) hergestellt. Dem autoklavierten M9 Grundmedium wurden alle weiteren Komponenten zur Her-

stellung des M9 Minimalmediums, die vorab als Stocklösungen entweder autoklaviert oder steril filtriert wurden, sowie die Antibiotika kurz vor der Proteinexpression frisch hinzugegeben. Die Expressionskultur wurde 1:30 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd angezogen, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 erreicht wurde. Der Kultur wurde AzF (F-3075.0001, Fa. Bachem, Weil am Rhein) in einer Endkonzentration von 1 mM als Feststoff hinzugegeben und weitere 5-10 Minuten bei 37 °C zum Lösen der Aminosäure inkubiert. Die Induktion der aaRS/tRNA<sup>AzF</sup><sub>CUA</sub> erfolgte durch Zugabe von Arabinose in einer Endkonzentration von 0,02 %, PEX5C11TAG wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 28 °C für 12 Stunden. Vor Induktion wurde der Expressionskultur ein Aliquot von 500 µL für eine spätere Analyse auf einem SDS-Gel entnommen (siehe oben). Nach Beendigung der Proteinexpression wurde die Kultur in einem SLC-4 000 Rotor für 10 Minuten bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC64 centrifuge, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot), die Pellets wurden bis zur Weiterverwendung bei -80 °C eingefroren.

### 2.4.3 Kleine Testexpressionen

Sollten zunächst kleinere Testexpressionen zur Optimierung der Expressionsbedingung durchgeführt werden, erfolgte dies in einem Gesamtvolumen von 20 mL Selektionsmedium, das 1:50 aus einer Vorkultur angeimpft wurde. Es wurden Proben von 500 µL zu verschiedenen Zeiten entnommen, für 10 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf einem SDS-Gel analysiert.

## 2.5 Proteinaufschluss und -aufreinigung

Die rekombinant exprimierten Proteine mussten zunächst aus dem Proteinpool der lysierten Zellen isoliert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Lyse mechanisch mit French Press bzw. Ultrabeschallung. Zur Proteintrennung wurden die getaggten rekombinanten Proteine mit einer Säulenmatrix inkubiert und nach entsprechendem Protokoll von der Matrix eluiert. Die Aufreinigung über die Ni<sup>2+</sup>-Säule und *Strep*-Tactin-Säule erfolgte mit dem ÄKTA-System (Box-900, Fa. GE Healthcare, Freiburg). Alle Schritte des Proteinaufschlusses als auch die der Aufreinigung wurden bei 4 °C durchgeführt.

### Aufreinigung über Affinitätschromatographie

Die rekombinanten Proteine PEX5, PEX5C11AzF und PEX5-Ub(ΔGG) verfügen am N-terminalen Ende über einen Poly-His-Tag (His<sub>6</sub>-Tag), mit welchem die Proteine über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Die „Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography“ (IMAC) basiert auf der Immobilisierung einer Matrix mit einem zweifach positiv geladenem Kation, in dieser Arbeit dem Ni<sup>2+</sup>, welches mit den Seitengruppen der Histidine wechselwirken kann. Nach Bindung der Proteine an die Ni<sup>2+</sup>-Säule können die rekombinanten Proteine spezifisch über einen Gradienten

mit steigender Imidazolkonzentration von der Säule eluiert werden, da das Imidazol mit dem Histidin konkurriert [Hochuli et al., 1987].

### 2.5.1 Aufschluss und Aufreinigung von rPEX5L und rPEX5C11AzF

Das bei -80 °C eingefrorene Proteinpellet wurde in HisA-Puffer resuspendiert (1 g in 5 mL HisA-Puffer für rPEX5L und 1 g in 7 mL HisA-Puffer für rPEX5C11AzF) und anschließend mechanisch mittels French Press (Emulsiflex, Avestin, Mannheim) bei 2 bar und 750 psi für ungefähr 10 Minuten lysiert. Zur Trennung von löslichem Protein und Zelldebris erfolgte eine Zentrifugation (Sorvall RC 64 centrifuge, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) in einem SS-34 Rotor, für 1 Stunde bei 18 000 rpm und 4 °C. Der filtrierte Überstand (Input; Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, 0,45 µm Filter, Fa. Roth, Karlsruhe) wurde auf die mit Reinstwasser und HisA-Puffer (jeweils 10-15 Säulenvolumen (CV)) äquilibrierte Ni<sup>2+</sup>-Säule (HisTrap™ HP, 1 mL, Fa. GE Healthcare, Freiburg) beladen (Flussgeschwindigkeit 1 mL/ min). Dies erfolgte für ungefähr eine Stunde, dann wurde mit 10 CV HisA-Puffer gewaschen. Für eine spätere Analyse auf einem SDS-Gel wurden Proben von Pellet, welches in 1/5 des Überstandsvolumens in HisA-Puffer resuspendiert wurde, Input und Durchlauf entnommen. Zur Elution des rekombinanten His-getaggtten Proteins wurde der HisB-Puffer in steigender Konzentration zugegeben. Das Protokoll der Proteinreinigung und Elution sind der Tabelle 2.10 zu entnehmen. Die Waschschritte wurden in 2 mL Fraktionen, die Elutionsschritte in jeweils 1 mL Fraktionen gesammelt.

Tabelle 2.10: **Protokoll zur Elution von rPEX5L und rPEX5C11AzF von der Ni<sup>2+</sup>-Säule.**

Waschschritt	HisB-Konzentration in %	Säulenvolumen (CV)
Waschen 1	0	20
Waschen 2	5	25
Elution 1	5-100	25
Elution 2	100	10

Nach Analyse auf einem SDS-Gel wurden die Fraktionen mit dem entsprechendem Protein vereint und einer Dialyse (Dialysemembran mit MWCO 6-8 kDa, Fa. Spektrumlab, Breda, Niederlande) gegen fünf Liter SEC-B-Puffer (rPEX5L) bzw. Klickpuffer (rPEX5C11AzF) über Nacht bei 4 °C unterzogen. Nach erfolgtem Pufferwechsel wurde die Proteinlösung in einem Konzentrator (MWCO 50 kDa, Amicon®-Ultra, Fa. Millipore-Merck, Darmstadt) in einer Zentrifuge bei 3 220 g und 4 °C einkonzentriert. rPEX5L wurde in einem weiteren Schritt über eine Gelfiltration aufgereinigt, rPEX5C11Azf konnte direkt für die Klickreaktion eingesetzt werden.

## 2.5.2 Aufreinigung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Nach der Klickreaktion mit rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin wurde das Klickprodukt einer doppelten Affinitätschromatographie unterzogen, um nicht geklicktes rPEX5C11AzF und überschüssiges Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin zu entfernen. Im ersten Schritt wurde geklicktes und gegen HisA-Puffer dialysiertes rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) über den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag von rPEX5C11AzF auf eine Ni<sup>2+</sup>-Säule (HisTrap<sup>TM</sup> HP, 1 mL, Fa. GE Healthcare, Freiburg) geladen. Die Proteinreinigung und Elution erfolgte mit Hilfe des ÄKTA-Systems (Protokoll in Tabelle 2.11). Die Waschfraktionen (2 mL) und Elutionsfraktionen (1 mL) wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

Tabelle 2.11: **Protokoll zur Elution von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) von der Ni<sup>2+</sup>-Säule.**

Waschschritt	HisB-Konzentration in %	Säulenvolumen (CV)
Waschen 1	0	15
Elution 1	5-100	15
Elution 2	100	15

Die vereinten Fraktionen der Eluate mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) konnten ohne weiteren Pufferwechsel direkt im zweiten Schritt auf eine *Strep*-Tactin-Säule (*Strep*-Tactin<sup>®</sup> Superflow<sup>®</sup> High Capacity, 1 mL, Fa. IBA GmbH, Göttingen) geladen werden. Das *Strep*-tag<sup>®</sup>II am N-Terminus des Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkins ist ein aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) bestehendes Peptid, das hochselektiv an eine *Strep*-Tactin<sup>®</sup>-Matrix, bindet. Nach Bindung und Waschen des rekombinanten Proteins mit StrepA-Puffer wurde mit Desthiobiotin (StrepB-Puffer), einem reversibel bindenden und stabilen Analogon von Biotin, dem natürlichen Liganden von Streptavidin, eluiert. Die Proteinreinigung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mit anschließender Elution erfolgte mittels eines ÄKTA-Systems, wobei die Elution des Proteins mit einem Gradienten ansteigender Desthiobiotinkonzentration erreicht wurde (siehe Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: **Protokoll zur Elution von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) von der *Strep*-Tactin<sup>®</sup>-Säule.**

Waschschritt	StrepB-Konzentration in %	Säulenvolumen (CV)
Waschen 1	0	15
Elution 1	0-100	12
Elution 2	100	13

Sowohl die Wasch- (2 mL) als auch die Elutionsschritte (1 mL) wurden auf einem SDS-Gel analysiert und die entsprechenden Fraktionen mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) vereint. Nach der zweiten Reinigung des Klickproduktes folgte eine Dialyse (Dialys membran MWCO 6-8 kDa, Fa. Spektrumlab, Breda, Niederlande) gegen fünf Liter Klickpuffer über Nacht bei 4 °C. Die Proteinlösung wurde anschließend mit einem Konzentrator

(MWCO 50 kDa, Amicon<sup>®</sup>-Ultra, Fa. Millipore-Merck, Darmstadt) in einer Zentrifuge bei 3 220 g und 4 °C einkonzentriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Nanodrop (siehe 2.2.10) wurde die Proteinlösung in 10 und 50  $\mu$ L Aliquots bei -80 °C eingefroren.

### 2.5.3 Aufschluss von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD und Generierung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin

Nach der Expression von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD in *E. coli* BL21 (DE3) wurde das Bakterienpellet in Chitinbindepuffer resuspendiert (5 g Pellet in 30 mL Puffer). Das homogenisierte Pellet wurde in einem Eiswasserbad durch Ultraschall (Digital Sonifier, Fa. Branson) mechanisch aufgeschlossen (siehe Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: **Protokoll zum Aufschluss von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD mit Ultraschall.**

Amplitude	40 %
pulse on	0,5 Sekunden
pulse off	0,5 Sekunden
Gesamtbeschallung	3 Minuten

Nach dem Aufschluss wurden die löslichen Proteine vom Zelldebris in einer Zentrifuge (Sorvall RC 64 centrifuge, Fa. Thermo Scientific, St. Leon-Rot) mit einem SS-34 Rotor für eine Stunde und 18 000 rpm bei 4 °C getrennt. Vom filtrierten Überstand (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, PVDF, 0,45  $\mu$ m Filter, Fa. Roth, Karlsruhe) und dem in 1/5 des Überstandvolumens in Chitinbindepuffer resuspendierten Pellet wurden für eine spätere Analyse auf dem SDS-Gel ein Aliquot entnommen. Zunächst erfolgte die Bindung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD über die C-terminale ausgerichtete Chitin-Binde-Domäne (CBD) an eine Chitin-Matrix. Die CBD ist eine aus 51 Aminosäuren bestehende Domäne aus *Bacillus circulans*. Die Bindung des rekombinant exprimierten Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD erfolgte im Batch Clamp verfahren. Hierfür wurden 25 mL Schwerkraftsäulen (Fa. Bio-Rad, München) verwendet, die vorab mit jeweils 4 mL Chitin Resin (Fa. New England BioLabs<sup>®</sup>, Frankfurt/ Main) beladen und vier Mal mit Chitinbindepuffer äquilibriert wurden. Der filtrierte Überstand wurde auf 20 ml Endvolumen aufgefüllt. Zur Bindung des Proteins an die Chitin-Matrix wurden die Säulen für ein bis zwei Stunden bei 4 °C auf einem leicht rotierenden Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung im Gravitationsfluss abgelassen und gesammelt. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit Chitinbindepuffer. Zum Abspalten und gleichzeitiger Generierung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin wurden zu je 4 mL Chitin Resin 5 mL Abspaltmix hinzugegeben und für weitere 36-40 Stunden bei 4 °C auf einem leicht rotierenden Drehrad inkubiert. Die Lösung wurde abermals im Gravitationsfluss abgelassen, gesammelt und gegebenenfalls vereint. Es wurden Aliquots von Pellet, Input, Durchfluss und Eluat entnommen und auf einem SDS-Gel analysiert. Eine weitere Aufreinigung

über eine Gelfiltrationssäule (siehe 2.5.4) der Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin-Lösung war notwendig, um Verunreinigungen von nicht abgespaltenem Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD und Komponenten des Abspaltnixes zu entfernen. Die Proteinlösung wurde vor der Gelfiltration gegen fünf Liter Klickpuffer dialysiert (Dialysemembran MWCO 3 kDa, Fa. Spektrumlab, Breda, Niederlande), wobei ein viermaliger Pufferwechsel notwendig war.

## 2.5.4 Gelfiltration von rekombinanten Proteinen

Bei der Gelfiltration (Size Exclusion Chromatography, SEC) handelt es sich um eine Aufreinigungsmethode z. B. von Proteinlösungen, mit der die Proteine auf einer Säulenmatrix ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Große Proteine und Proteinkomplexe laufen schneller, da sie nicht durch die engmaschige Netzstruktur der Säulenmatrix passen und somit außerhalb der Matrix vorbeiwandern, kleinere Proteine wandern durch die Matrix und werden demnach je nach ihrer Größe später eluiert. In dieser Arbeit wurden sowohl präparative als auch analytische Gelfiltrationen eingesetzt. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

### Analytische Gelfiltration

Für die Durchführung einer analytischen Gelfiltration wurde das Ettan-System (Ettan LC Box-900, Fa. GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Hierfür wurden die zu analysierenden Proteinproben vorab für 30 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert, um etwaige Proteinaggregate zu trennen. Je Analyse wurden 30  $\mu$ L der löslichen Proteinprobe in einer Konzentration von 3-6 mg/mL eingesetzt. Für die Analyse von rPEX5L, rPEX5C11AzF und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurde SEC-A-Puffer und eine Superdex<sup>TM</sup> 200 PC 3.2/30 Säule (Fa. GE Healthcare, Uppsala, Schweden), von rStrep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin wurde SEC-B-Puffer und eine Superdex<sup>TM</sup> 75 PC 3.2/30 Säule (Fa. GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 50  $\mu$ L/min wurden 50  $\mu$ L Fraktionen gesammelt. Es wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Unicorn 5.20. Aliquots der entsprechenden Fraktionen wurden im SDS-Gel analysiert.

### Präparative Gelfiltration von rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin

Zur Proteinaufreinigung im größeren Maßstabe wurde im zweiten Aufreinigungsschritt eine präparative Gelfiltration angewandt, um eventuelle Verunreinigungen von unspezifischen Proteinen oder Komponenten in der Proteinlösungen zu trennen. Vorab wurde die Proteinprobe für 30 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert, um mögliche Proteinaggregate zu trennen. Zur weiteren Aufreinigung von rekombinantem PEX5L wurde die Superdex 200 Säule (HiLoad<sup>TM</sup> 16/60 Superdex<sup>TM</sup> 200 prepgrade, Fa. GE Healthcare, Uppsala, Schweden), für Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin die Superdex 75 16/60 Säule und jeweils SEC-B-Puffer verwendet (Parameterangaben zur Säule siehe Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: **Angaben zur präparativen Gelfiltration**

	Superdex 75	Superdex 200
Ausschlussvolumen	40 mL	40 mL
Flussgeschwindigkeit	1mL/min	1 mL/min
Fraktionsvolumen	1,8 mL	2 mL

Die Fraktionen wurden im SDS-Gel analysiert und die entsprechend sauberen Fraktionen des gewünschten Proteins vereint. Zur Aufbewahrung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Proteinlösungen vorher in einem Konzentrator (PEX5L: MWCO 50 kDa, Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin: MWCO 3 kDa, Amicon<sup>®</sup>-Ultra, Fa. Millipore-Merck, Darmstadt) in einer Zentrifuge bei 3 220 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  einkonzentriert und aliquotiert.

## 2.6 Analyse von Protein-Proteininteraktionen anhand von Koimmunpräzipitationen und Pull-down Versuchen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden in dieser Arbeit die Methoden der Koimmunpräzipitation und des Pull-down Versuchen angewandt. Hierfür war es nötig, magnetische Beads vorab mit Antikörpern bzw. mit rekombinanten getaggen Proteinen zu koppeln.

### Vorbereitung der Beads zur Koimmunpräzipitation

Am Tag vor der durchgeführten Koimmunpräzipitation wurden je Ansatz  $50\text{ }\mu\text{L}$  magnetische Dynabeads (Dynabeads<sup>®</sup> M-280 sheep anti-Rabbit IgG, Fa. Life Technologies, Oslo, Norwegen) zunächst je vier Mal mit je 1 ml Bindungspuffer mit 0,1 % BSA protease-frei (BP-B) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde das Reagiergefäß mit den Dynabeads in eine Magnetleiste gestellt, nach ein bis zwei Minuten konnte der Überstand entnommen werden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Dynabeads in  $200\text{ }\mu\text{L}$  (Endvolumen) mit entsprechendem Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 2.3) aufgenommen. Die Inkubation der Dynabeads mit dem Antikörper erfolgte auf einem Drehrad über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Vorbereitung der Mag-NI-NTA-Beads zum Pull-down Versuch

Für einen Pull-down Versuch wurden je Ansatz  $40\text{ }\mu\text{L}$  Mag-Ni-NTA-Beads (His Mag Sepharose<sup>™</sup> Ni, Fa. GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Alle Ansätze, die mit demselben rekombinanten Protein gekoppelt werden sollten, wurden zunächst als Master-Mix behandelt. Die vereinten Ansätze wurden vier Mal mit je 1 mL Bindungspuffer

mit 0,02 % Tween<sup>®</sup> 20 und Protease-Inhibitor Cocktail (1:200, Fa. Sigma-Aldrich, München) (BP-TPI) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Reagiergefäße mit den Mag-Ni-NTA-Beads in eine Magnetleiste gestellt, nach einer halben Minute konnte der Überstand entnommen werden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reagiergefäße kurz zentrifugiert, der restliche Überstand abermals abgenommen. Zur Kopplung der rekombinanten (r) His-getaggtten Proteine PEX5L und PEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurden je 40  $\mu$ L Mag-Ni-NTA-Beads 7  $\mu$ g rPEX5L bzw. 14  $\mu$ g rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) hinzugegeben und in insgesamt 200  $\mu$ L (Endvolumen) BP-TPI aufgenommen. Bei der Leerkontrolle wurden die Mag-Ni-NTA-Beads nur in 200  $\mu$ L (Endvolumen) BP-TPI aufgenommen. Die Inkubation der Mag-Ni-NTA-Beads mit den rekombinanten Proteinen und der Leerkontrolle erfolgte auf dem Drehrad bei 4 °C für 1,5-2 Stunden.

### 2.6.1 *In vitro* Proteinexpression mittels „Transcription and Translation“ (TnT)

Für die *in vitro* Proteinexpression wurde das Kit TnT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Fa. Promega, Madison, USA) verwendet. Ein 25  $\mu$ L Reaktionsansatz umfasste 20  $\mu$ L Retikulozytenlysate-Mix, 1  $\mu$ g Plasmid-DNA (für jede TnT-Reaktion wurde ein neues Aliquot Plasmid-DNA verwendet), 1  $\mu$ L <sup>35</sup>S-Met (35 mCi/mL, Fa. Hartman Analytic, Braunschweig), das restliche Volumen wurde mit nuclease-freiem Wasser (Fa. Promega, Madison, USA) aufgefüllt. Die Dauer der Inkubation betrug insgesamt zwei Stunden bei 30 °C. Nach 15 Minuten wurden die Translationsansätze PEX19 und PEX26 (nachfolgend als PEX19/PEX26 bezeichnet), nach 45 Minuten die Translationsansätze PEX1 und PEX6 (nachfolgend als PEX1/PEX6 bezeichnet) vermischt. Nach Ende der Gesamtinkubationszeit von zwei Stunden wurden Aliquots aller TnT-Ansätze mit 2 x SDS-Probenpuffer vermengt und bei 80 °C für fünf Minuten erhitzt und anschließend bis zur Autoradiographie (siehe 2.6.3) bei -20 °C eingefroren.

### 2.6.2 Koimmunpräzipitation und Pull-down Versuch

Die mit Antikörpern bzw. rekombinanten Proteinen inkubierten Beads wurden kurz zentrifugiert und anschließend drei Mal mit je 1 mL BP-TPI gewaschen. Die als Master-Mix behandelten Mag-Ni-NTA-Beads wurden entsprechend der Ansätze auf Reagiergefäße verteilt. Dies ließ sich am besten bewerkstelligen, indem die Beads in ein gut pipettierbares Volumen in BP-TPI aufgenommen und entsprechend gleichmäßig verteilt wurden. Je Protein-Protein-Interaktionsansatz wurden 2 mM ATP (Stocklösung 250 mM in BP, pH  $\sim$  7) und 4 mM MgCl<sub>2</sub> (Stocklösung 0,5 M in BP, pH  $\sim$  7) jeweils als Endkonzentration hinzugefügt und die Translationsansätze in folgenden Volumina hinzugegeben: PEX14 jeweils 10  $\mu$ L, PEX1, PEX6, PEX7, PEX13, PEX19/PEX26, Thiolase-myc, GFP-PTS1 jeweils 20  $\mu$ L, PEX1/PEX6 jeweils 40  $\mu$ L. Je Protein-Protein-Interaktionsansatz wurde in 150  $\mu$ L (Endvolumen) in entweder BP-TPI oder in  $\Delta$ PEX5-Zytosol aufgenommen. Es wurde ggf. plasmidfreies Retikulozytenlysate hinzu-

gefügt, damit in allen Ansätzen innerhalb eines Versuches die gleichen Voraussetzungen gegeben waren. Die Ansätze wurden für zwei Stunden auf dem Drehrad bei 30 °C inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert, in die Magnetleiste gestellt, der Überstand in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, sofort bei 80 °C für fünf Minuten erhitzt und im Anschluss daran bei -20 °C eingefroren. Die Beads wurden vier Mal mit je 1 mL BP-TPI gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Ansätze abermals kurz zentrifugiert, um jeglichen BP-TPI abzunehmen. Die Elution der Protein-Protein-Interaktions-Proben verlief bei den Beads auf unterschiedliche Weise. Die Dynabeads wurden in 40  $\mu$ L 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 80 °C für fünf Minuten erhitzt, anschließend in die Magnetleiste gestellt. Der Überstand wurde als Eluat bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Mag-Ni-NTA- Beads hingegen wurden in 30  $\mu$ L Elutionspuffer mit 0,02 % Tween<sup>®</sup> 20 und Protease-Inhibitor Cocktail (1:200, Fa. Sigma) (Elu-TPI) aufgenommen und durch mehrmaliges Anschnippen ca. fünf Minuten inkubiert, anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation. Der Überstand des in die Magnetleiste gestellten Reagiergefäßes konnte als Eluat abgenommen, anschließend mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 80 °C für fünf Minuten erhitzt und anschließend bei -20 °C eingefroren werden.

### **2.6.3 Autoradiographie von Proteinproben nach Koimmunpräzipitation und Pull-down Versuch**

Zur Auswertung der Koimmunpräzipitations- und Pull-down Versuche (siehe 2.6.2) wurden die Proben auf einem SDS-Gel analysiert. Hierfür wurden je TnT-Ansatz 10  $\mu$ L und je Eluat bzw. Überstand 20  $\mu$ L Probe aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung (siehe 2.3.2) erfolgte bei 120 V und wurde erst abgestoppt, nachdem die Lauffront bereits ungefähr 15 Minuten herausgelaufen war. Anschließend wurden die SDS-Gele für zwei Mal 30 Minuten auf einem Schüttler in einer 0,5 M Na-Salicylatlösung zur Verstärkung der Radioaktivität inkubiert und im Anschluss einmal mit Wasser gewaschen. Zur Trocknung der SDS-Gele wurden diese mit einer Vakuum-Heiz-Pumpe auf einem Whatmanpapier für eine Stunde (bei 0,75 mm Gelen) bzw. für zwei Stunden (bei 1,5 mm Gelen) getrocknet. Der Film (Carestream BioMax MR Film, Fa. Sigma-Aldrich, München) wurde für zwei bis fünf Tage aufgelegt und anschließend entwickelt.

## **2.7 Proteinanalyse**

### **2.7.1 Limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)**

Für einen 55  $\mu$ L Ansatz einer auf Eis durchgeführten limitierten Proteolyse wurden 6  $\mu$ M rekombinantes PEX5L bzw. PEX5-Ub( $\Delta$ GG) und 5  $\mu$ g/mL Proteinase K (250  $\mu$ g/mL Stocklösung in Proteinase K-Puffer, Fa. Sigma-Aldrich, München) eingesetzt und mit Klickpuffer aufgefüllt. Zu den Zeitpunkten  $t=$  1, 2, 4, 8 und 12 Minuten wurde jeweils ein Aliquot von 10  $\mu$ L entnommen und in ein mit 20  $\mu$ g PMSF (50 mg/ml

Stocklösung in Isopropanol) vorbereitetes Reagiergefäß überführt. Die Proben zu dem Zeitpunkt  $t=0$  enthielten keine Proteinase K. Nach sofortiger Zugabe von 4 x SDS-Probenpuffer wurden die Proben umgehend für fünf Minuten bei 100 °C aufgeköcht. Zur Analyse der verarbeiteten Proteinproben wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  je aufbereitetem Aliquot auf einem 12 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.3.2) und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blau (siehe 2.3.3) gefärbt.

## 2.7.2 CD-Spektrum

Zur Untersuchung der sekundären Strukturelemente ( $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblätter) von aufgereinigten Proteinen wurde ein Circular Dichroism (CD)-Spektrum durchgeführt. Für eine Messung wurden 3,5  $\mu\text{M}$  rekombinantes Protein eingesetzt und in einer Küvette (High Precision Cell 100-QS, 1mm, Fa. Hellma Analytics, Müllheim) gemessen. Als Referenzprobe diente ein mit Reinstwasser 1:4 verdünnter Klickpuffer. Die Messung erfolgte am JASCO-J 715 Spectropolarimeter. Die genauen Parameter sind der Tabelle 2.15 zu entnehmen.

Tabelle 2.15: **Angaben zur Messung eines CD-Spektrums.**

Start	250 nm
Ende	190 nm
Datapitch	0,5 nm
Datapoints	121
Scanning Speed	100 nm/min
Accumulation	8

## 2.7.3 Massenspektrometrie (MS)

Alle Proteinbanden wurden manuell mit einer frischen Skalpellklinge ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Messung und Auswertung erfolgte durch Hr. Dr. Kalbacher, Universität Tübingen.

Die Proteinbanden wurden mit Hilfe einer Trypsin-Restriktion über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte am Reflex IV MALDI-TOF und wurde mit Hilfe der Software FlexAnalysis 2.4 ausgewertet.

## 2.7.4 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Zur genauen Bestimmung der molaren Masse von Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin wurde eine Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt, um die Anlagerung des Amides an Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) zu überprüfen. Hierfür wurden 1  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung zu 100  $\mu\text{L}$  LCMS-A-Lösung (0,1 % Ameisensäure) hinzugefügt. Dies verbessert

die Trenneigenschaft der Säule. Die Messung erfolgte am Shimadzu LCMS-2020 (AG Schwarzer, IFIB, Universität Tübingen).

## 2.8 Zellbiochemische Methoden

### 2.8.1 Kultivierung von Fibroblastenzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit humanen Fibroblastenzellen (siehe Tabelle 2.6) gearbeitet. Die Fibroblastenzellen können durch eine Hautbiopsie entnommen werden und in Kultur angezogen werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit dem „modified Dulbecco’s Eagle’s Medium“ (DMEM, 4,5 g/L Glukose, Fa. Sigma-Aldrich, München), welches eine Modifizierung des „Basal Medium Eagle“ (BME) darstellt. Im Vergleich zu diesem beinhaltet das DMEM eine weitaus höhere Konzentration von Aminosäuren und Vitaminen. Zusätzlich ist dem DMEM Natriumbicarbonat beigemischt, das unter anderem mit seiner Pufferkapazität eine Ansäuerung der von den Zellen abgegebenen Stoffwechselprodukte ins Medium verhindert. Dem Medium wurden Additiva wie L-Glutamin (Fa. PAA, Pasching, Österreich) als essentielle Aminosäure, die als Hauptenergiequelle von Zellen in der Zellkultur fungiert, fetales Kälberserum (FCS, Fa. Sigma-Aldrich, München), das viele Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren beinhaltet und Gentamicin (Fa. Sigma-Aldrich, München), ein Breitbandantibiotikum, das die Proteinbiosynthese hemmt, indem es sich an die 30S Ribosomenuntereinheit lagert, hinzugefügt. Die genauen Konzentrationen dieser Zusätze für das sogenannte Vollmedium und weiterer DMEM-Medienzusammensetzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind der Tabelle 2.16 zu entnehmen.

Tabelle 2.16: **Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien**

Medium	Zusammensetzung
Vollmedium	10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin in DMEM
Auftaumedium A	20 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin in DMEM
Auftaumedium B	15 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin in DMEM
Einfriermedium	20 % (v/v) FCS, 10 % DMSO in DMEM

### Passagieren von Fibroblastenzellen

Die Kultivierung der adhärennten Fibroblastenzellen erfolgte bei 37 °C im Inkubator mit einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 8,5 %. Die Fibroblastenzellen wurden in der Regel alle

zwei bis drei Tage in einem Verhältnis 1:3 bzw. 1:4 passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit HBSS (Hanks' Balanced salt solution, ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , Fa. Sigma-Aldrich, München) gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, München) die adhärenen Zellkontakte vom Zellboden gelöst. Der Fortschritt des sich Ablösens wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde abermals abgesaugt und die Zellen durch leichtes Schlagen gegen den Flaschenboden gelöst. Die gelösten Zellen konnten in Vollmedium aufgenommen werden und entsprechend des gewünschten Verdünnungsfaktors auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden.

### **Auftauen von Fibroblastenzellen**

Die im Flüssigstickstoff gelagerten Fibroblastenzellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, anschließend in 5 mL Auftaumedium A aufgenommen und resuspendiert. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 200 g wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in 5 mL Auftaumedium A aufgenommen. Je nach Menge des eingefrorenen Pellets wurden die Zellen entweder in eine 25 cm<sup>2</sup> oder in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 8,5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden am nächsten Tag im Mikroskop auf Konfluenz überprüft. Nach der zweiten Passage wurden die Zellen in Auftaumedium B, alle weiteren Passagen in Vollmedium kultiviert.

### **Einfrieren von Fibroblastenzellen**

Die Fibroblastenzellen wurden ein Tag vorher so passagiert, dass sie zum Zeitpunkt des Einfrierens eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit der Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellboden gelöst und in 10 mL Vollmedium aufgenommen und für fünf Minuten bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1,6 mL eiskaltem Einfriermedium je 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche aufgenommen und in vorgekühlte Einfriereröhrchen überführt. Die Zellen wurden umgehend für zwei Stunden bei -20 °C und anschließend in -80 °C bis zum nächsten Tag eingefroren. Zur Langzeitlagerung der Fibroblastenzellen wurden diese in die Flüssigphase des Stickstofftanks bei -196 °C überführt.

## **2.8.2 Herstellung von Proteinpellets**

Zur Herstellung von Proteinpellets wurden Fibroblastenzellen mit einer 80-90 %-igen Konfluenz verwendet und wie oben beschrieben geerntet. Nach Aufnahme der Fibroblastenzellen in Vollmedium wurden diese für fünf Minuten bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit HBSS (Hanks' Balanced salt solution, mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , Fa. PAA, Pasching, Österreich) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in eiskaltem, sterilen Reinstwasser aufgenommen (je 25 cm<sup>2</sup> Bodenfläche einer Zellkulturflasche in 60 µL Reinstwasser). Davon wurde ein Viertel für einen BCA-

Proteinbestimmung (siehe 2.3.1.2) abgenommen, der Rest mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und sofort für fünf Minuten bei 100 °C aufgeköcht.

### 2.8.3 Zytolextaktion aus $\Delta$ PEX5 Fibroblastenzellen

Für die Isolierung des Zytolext aus  $\Delta$ PEX5 Fibroblastenzellen wurden vier bis sieben 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit  $\Delta$ PEX5 Fibroblastenzellen, die zu 90 % konfluent waren, verwendet. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, geerntet und in einem 15 mL Röhrcchen vereint. Je 200 mg der  $\Delta$ PEX5 Fibroblastenzellen wurden in 1,2 mL Zytolextaktionspuffer aufgenommen und resuspendiert, ein kleines Aliquot wurde vor dem Aufschluss aufbewahrt. Der Aufschluss erfolgte mittels eines vorgekühlten Homogenisators (Balch-homogenizer). Dieser wurde vorab mit kaltem autoklavierten Reinstwasser und anschließend mit kaltem Zytolextaktionspuffer gespült. Für einen Aufschluss wurde die Zellsuspension mit Hilfe von zwei 2 mL Spritzen fünf bis sieben Mal durch den Homogenisator gedrückt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in einem vorgekühlten Reagiergefäß vereint. Der Erfolg des Aufschlusses wurde unter einem Durchlichtmikroskop kontrolliert und mit den nicht aufgeschlossenen Zellen verglichen. Zur Trennung des postnukleären Überstandes (post-nuclear supernatant, PNS) von Zellkernen und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden das Homogenat zunächst für 10 Minuten bei 700 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein sauberes, vorgekühltes Reagiergefäß überführt. Das Pellet wurde mit der Hälfte des Überstandsvolumens resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde mit dem ersten vereint. Die Isolierung des Zytolexts von den Organellen erfolgte durch eine Ultrazentrifugation. Hierfür wurde der PNS in speziell dafür vorgesehene Reagiergefäße (1 mL Centrifuge Tubes, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) überführt und mit der Feinwaage austariert. Die Ultrazentrifugation (TL-100 Ultrazentrifuge, Fa. Beckman Coulter, Krefeld) erfolgte in einem TLA-45 Rotor, für eine Stunde bei 41 000 rpm (das entspricht 104 000 g) und 2 °C. Die Lipide, die als feiner milchiger Schleier an der Oberfläche des Überstandes sichtbar waren, wurden vorsichtig entfernt, der Rest des Überstandes wurde vereint und in Aliquots bei -80 °C eingefroren und gelagert.

### 2.8.4 Elektroporation von Fibroblastenzellen

Die Elektroporation von Fibroblastenzellen in der Zellkultur erfolgte mit dem Neon<sup>TM</sup> Transfection System (Fa. Life Technologies, ehemals Invitrogen, Darmstadt) und wurde von Kim und Mitarbeitern [Kim et al., 2008] beschrieben. Die genauen Angaben zur Durchführung und Gerätebedienung sind dem Benutzerhandbuch zu entnehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PEX5, PEX1 und PEX6 defiziente Fibroblastenzellen elektroporiert. Die am Tag zuvor passagierten Fibroblastenzellen sollten am Versuchstag eine Konfluenz von 90 % aufweisen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewaschen, vom Zellboden gelöst, anschließend in Vollmedium aufgenommen und die Gesamtzellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die benötigte Zellmenge einer 10  $\mu$ L bzw. 100  $\mu$ L Elektroporationsspitze beträgt  $2 \times 10^5$  bzw.  $2 \times 10^6$  Zellen. Die

tatsächliche zu elektroporierende Gesamtzellzahl ist abhängig von dem im Anschluss durchgeführten Experiment. So wurden je Well einer 6-Well-Platte  $4 \times 10^5$  Zellen (IF nach Tag 1) bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen (IF nach Tag 2), je Well einer 12-Well-Platte  $2 \times 10^5$  Zellen (IF nach Tag 2, nur für  $\Delta$ PEX6 Zellen), je 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche  $8 \times 10^5$  Zellen (Proteinpellets nach Tag 1) bzw.  $4 \times 10^5$  Zellen (Proteinpellets nach Tag 2) benötigt. Die Zellen wurden zweimal mit HBSS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und anschließend in Elektroporationspuffer resuspendiert. Die generell verwendeten Konzentrationen der zu elektroporierenden Komponenten beziehen sich auf einen 10  $\mu$ L Elektroporationsansatz und waren wie folgt: 4  $\mu$ M rPEX5L, 8  $\mu$ M rPEX5-Ub( $\Delta$ GG), 66 ng pEB22.11 (EGFP-PTS1), 1  $\mu$ g pTY03 (PEX6), 1  $\mu$ g pBM57 (PEX1), 1  $\mu$ g pVS11 (PEX1Y914A) bzw. 1  $\mu$ g pSV12 (PEX6Y777A). Es ist zu beachten, dass das zugegebene Volumen der Plasmide bzw. Proteine nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens beträgt. Nach Zugabe der entsprechenden Elektroporationskomponenten wurde das Zellvolumen bestimmt und entsprechend mit Elektroporationspuffer aufgefüllt. Die Elektroporation wurde in einer mit 3 mL Elektroporationspuffer befüllten Elektroporationsküvette durchgeführt. Die Parameter sind der Tabelle 2.17 zu entnehmen.

Tabelle 2.17: **Parameter zur Elektroporation.**

Zelllinie	Spannung	Zeit	Anzahl der Pulse
$\Delta$ PEX5	1050 V	30 ms	1 x
$\Delta$ PEX1	900 V	30 ms	2 x
$\Delta$ PEX6	900 V	30 ms	2 x

Wurden mehrere Elektroporationen desselben Ansatzes durchgeführt, so wurden diese im Anschluss in 10 mL Vollmedium vereint und in die entsprechenden Zellkulturgefäße verteilt. Bei Ansätzen mit elektroporierten rekombinanten Proteinen wurden diese nach Vereinen für fünf Minuten bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert, um überschüssiges Protein, welches nicht in die Zelle aufgenommen wurde, zu entfernen. Das Pellet wurde in einem angemessenen Volumen Vollmedium aufgenommen und ebenfalls in die Zellkulturgefäße verteilt. Sollte im Anschluss an die Elektroporation eine Immunfluoreszenz durchgeführt werden, so wurden die Zellen nach der Elektroporation auf 15 mm Deckgläser ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C und 8,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.8.5 Vorbereitung der Proben zur Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung sollten die Fibroblastenzellen eine Konfluenz von 80 % aufweisen. Die Antikörper wurden in D-PBS (Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline, Fa. Sigma-Aldrich, München) verdünnt und vorab die entsprechenden Antikörperkombinationen in Reagiergefäßen gemischt.

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit D-PBS gewaschen und anschließend in 3 % Formaldehyd (in D-PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Gefolgt von ei-

nem dreimaligen Waschen der Zellen mit D-PBS wurden diese mit sterilem 0,5 %-igen (v/v) Triton X-100 für fünf Minuten permeabilisiert und anschließend abermals drei Mal mit D-PBS gewaschen. Zur Inkubation des ersten Antikörpers wurden 30  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Antikörperkombination auf Parafilm pipettiert, auf den das Deckglas mit der bewachsenen Zelleseite aufgelegt wurde. Nach einer 30-minütigen, lichtgeschützten Inkubation erfolgte ein zehnmaliger Waschschriff mit D-PBS, dem sich die Inkubation des zweiten Fluoreszenz-markierten Antikörpers für 10 Minuten (lichtgeschützt) anschloss. Es wurde erneut zehn Mal mit D-PBS gewaschen. Mit Hilfe von 15  $\mu\text{L}$  Mowiol-Einbettmedium wurden die Deckgläser mit der Zelleseite nach unten auf den Objektträger fixiert und über Nacht ausgehärtet. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop AxioVert 200 M (Fa. Zeiss, Jena) mit einem AxioLAN APOchromat 1.4 63 x Öbobjektiv. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten mit einer AxioCam MR Kamera und der AxioVision 4.7.2 Software (Fa. Zeiss, Jena).

## 2.9 Chemische Methoden

### 2.9.1 Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC)

Die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC), auch als Klickreaktion bezeichnet, wurde von Barry Sharpless und Mitarbeitern [Rostovtsev et al., 2002] beschrieben und entsprechend Sommer *et al* durchgeführt [Sommer et al., 2011]. Nach rekombinanter Expression von rPEX5C11AzF unter Verwendung der Nonsense-Suppression der unnatürlichen Aminosäure p-Azidophenylalanin (AzF) (siehe 2.4.2) und der Generierung von Strep-Ub( $\Delta GG$ )-Alkin (siehe 2.5.3) konnten die modifizierten Proteine anhand der Klickreaktion zusammengeführt werden. Der Ansatz einer Klickreaktion umfasste, wenn nicht anders angegeben, 8  $\mu\text{M}$  rPEX5C11AzF, dem Strep-Ub( $\Delta GG$ )-Alkin bei einer Standard-Klickreaktion in einem molaren Mengenverhältnis 1:3 (24  $\mu\text{M}$ ) bzw. 35  $\mu\text{M}$  Dansylalkin (Stammlösung 3,5 mM in 3% DMSO gelöst, synthetisiert von AG Kalbacher, IFIB, Universität Tübingen) als Positivkontrolle zugegeben wurde. Abweichende molare Mengenverhältnisse wurden vermerkt. Die weiteren Additiva wie 50  $\mu\text{M}$  TCEP (50 mM Stammlösung, pH 7-8) bzw. 200  $\mu\text{M}$  L(+)-Ascorbinsäure (10 mM Stammlösung, wurde immer frisch angesetzt), 50  $\mu\text{M}$  TBTA (1,7 mM Stammlösung in 25 % DMSO und 75% *ter*ButOH gelöst), 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (50 mM Stammlösung) wurden in entsprechender Reihenfolge in Klickpuffer zusammenpipettiert. Die Klickreaktion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur und wurde mit 10 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8) abgestoppt. Für eine Analyse auf einem SDS-Gel wurden 6  $\mu\text{L}$  des Reaktionsansatzes aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung (siehe 2.3.2) lichtgeschützt durchgeführt. Die Auswertung der Positivkontrolle mit Dansylalkin wurde zunächst unter UV-Licht vorgenommen, anschließend erfolgte die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (siehe 2.3.3). Nach einem präparativen Klickansatz erfolgte zunächst ein Pufferwechsel zu HisA-Puffer in einer Dialysemembran (MWCO 6-8 kDa) in fünf Li-

tern über Nacht bei 4 °C und anschließend eine zweifache Aufreinigung über Affinitätschromatographie (siehe 2.5.2).

## 3 Ergebnisse

Der peroxisomale Importrezeptor PEX5 nimmt eine essentielle Rolle in der peroxisomalen Biogenese ein. Als zytosolisches Protein bindet PEX5 an peroxisomale Matrixproteine und transportiert diese zum Peroxisom. Nach der Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran und Translokation der Matrixproteine in das Peroxisom wird PEX5 am konservierten N-terminalen Cystein<sup>11</sup> mono-ubiquitiniert und für den Export markiert. Mit Hilfe des peroxisomalen Exportkomplexes, der aus dem PEX1/PEX6-Komplex und dem membranverankerten PEX26 besteht, kann das monoubiquitinierte PEX5 (mUb-PEX5) energieabhängig aus der peroxisomalen Membran herausgezogen werden. Der genaue Mechanismus des Exportes konnte bisher nicht geklärt werden. Es wird vermutet, dass mUb-PEX5 Substrat des Exportkomplexes ist und direkt oder indirekt an den PEX1/PEX6-Komplex bindet. Zur Klärung des genauen Exportablaufes sind Studien mit mUb-PEX5 notwendig. Eine Isolierung von mUb-PEX5 aus eukaryontischen Zellen wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Im ersten Teil der Arbeit wird auf die Gewinnung von mUb-PEX5 eingegangen. Mit Hilfe einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition, auch als Klickreaktion bezeichnet, sollen die Proteine PEX5 und Ubiquitin mit Hilfe der Klickreaktion zu einem stabilen mUb-PEX5 gebildet werden.

Basierend auf das chemisch hergestellte mUb-PEX5 soll im zweiten Teil der Arbeit die Funktionalität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und die Stabilität von mUb-PEX5 untersucht werden. *In vitro* Interaktionsstudien mit mUb-PEX5 und den Proteinen des Exportkomplexes sollen Aufschluss bringen, ob mUb-PEX5 an diese Proteine binden kann.

### 3.1 *In situ* mono-Ubiquitinierung von humanem peroxisomalen Importrezeptor PEX5

Zur Herstellung von mUb-PEX5 als Klickprodukt einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) müssen die Proteine PEX5 und Ubiquitin als Azid bzw. Alkin vorliegen.

Für die Gewinnung eines PEX5-Azides wurde zunächst eine Methode angewendet, bei der nach rekombinanter Expression des Proteins das Cystein zu einem Azid umgewandelt wurde. Dies geschah durch die Zugabe von Iodoacetamid-Ethyl-Azid [Weikart and Mootz, 2010]. Der Nachteil dieser Anwendung ist, dass alle Cysteine eines Proteins zu einem Azid modifiziert werden. In der Aminosäuresequenz von PEX5 gibt es insgesamt sechs Cysteine (siehe auch Abb. 3.1). Im Hinblick auf die Gewinnung von mUb-PEX5 ist es jedoch bedeutend, dass nur das Cys<sup>11</sup> in PEX5 als Azid vorliegt. Aus diesem Grund, konnte bei dieser Methode nur der N-Terminus von PEX5 (Aminosäuren 1-335) verwendet werden, da es in dieser verkürzten Ver-

sion nur das Cys<sup>11</sup> gibt. PEX5(1-335) ist funktionell, da es an PEX7 binden und somit den PTS2-Proteinimport bedienen kann [Dodt et al., 2001]. Aufgrund des Fehlens der TPR-Domäne am C-Terminus kann diese verkürzte Version keine PTS1-Proteine binden.

Eine spätere Koimmunpräzipitation mit rPEX5(1-335)-Ubiquitin (die Klickreaktion wurde von Nadine Weikart, AG Mootz, durchgeführt) konnte nicht effizient optimiert werden. Dies könnte an der Reinheit bzw. der Ausbeute des Proteins liegen oder an der verkürzten Version des Proteins.

Daher wurde auf eine andere Methode zur Gewinnung eines PEX5-Azides zurückgegriffen. In den nächsten Abschnitten soll auf die Herstellung von PEX5-Azid durch den Einbau einer unnatürlichen Aminosäure (UAA) eingegangen werden. Anschließend wird die Generierung eines Ubiquitin-Alkins mit Hilfe der Inteininfusionsstrategie vorgestellt.

### 3.1.1 Generierung von rekombinantem PEX5C11AzF mittels Einbau der unnatürlichen Aminosäure p-Azidophenylalanin (AzF)

Die lange Form des humanen Rezeptorproteins PEX5 besteht in seiner Primärstruktur aus 639 Aminosäuren (siehe Abbildung 3.1).

```

1  MAMRELVEAE CGGANPLMKL AGHFTQDKAL RQEGLRPGPW PPGAPASEAA SKPLGVASED
61  ELVAEFLQDQ NAPLVSRA PQ TFKMDDLAE MQQIEQSNFR QAPQRAPGVA DLALSENWAQ
121 EFLAAGDAVD VTQDYNEDW SQEFISEVTD PLSVSPARWA EEYLEQSEEEK LWLGEPEGTA
181 TDRWYDEYHP EEDLQHTASD FVAKVDDPKL ANSEFLKFVR QIGEGQVSLE SGAGSGRAQA
241 EQWAAEFIQQ QGTSDAWVDQ FTRPVNTSAL DMEFERAKSA IESDVDFWDK LQAELEEMAK
301 RDAEAHPWLS DYDDLTSATY DKG YQFEEEN PLRDHPQPFE EGLRRLQEGD LPNAVLLFEA
361 AVQQDPKHME AWQYLGTTQA ENEQELLAIS ALRRCLELKP DNQTALMALA VSFTNESLQR
421 QACETLRDWL RYTPAYAHV TPAEEGAGGA GLGPSKRILG SLLSDSLFLE VKELFLAAVR
481 LDPTSIDPDV QCGLGVLFNL SGEYDKAVDC FTAALSVRPN DYLLWNKLGA TLANGNQSEE
541 AVAAYRRALE LQPGYIRSR YNLGISINLG AHREAVEHFL EALNMQRKSR GPRGEGGAMS
601 ENIWSTLRLA LSMLGQSDAY GAADARDLST LLTMFGLPQ

```

Abbildung 3.1: **Primärstruktur von humanem PEX5.** Das humane Rezeptorprotein PEX5 besteht in seiner Primärstruktur aus 639 Aminosäuren, wobei davon 1 % Cysteine sind. Die Cysteine sind rot hervorgehoben.

Für den Export von PEX5 aus der peroxisomalen Membran ist das N-terminale konservierte Cys<sup>11</sup> essentiell. Für die chemische Gewinnung eines mUb-PEX5 ist es notwendig, dass genau an dieser Position PEX5 mit einem Ubiquitin modifiziert wird. Zur Erzeugung eines PEX5-Azides soll anstelle des Cys<sup>11</sup> eine UAA eingebaut werden, die bereits eine Azidmodifizierung enthält. Als UAA wurde p-Azidophenylalanin (AzF) gewählt. Zum Einbau von AzF in PEX5 muss zunächst die natürliche Kodierung des Cysteins (TGC) zu einem Amberstopcodon (TAG) für AzF durch eine ortsspezifische Mutagenese ausgetauscht werden. Das Ambercodontriplet ist in DNA (TAG), in mRNA (UAG) und das Anticodon der tRNA (CUA) (für Review siehe [Wals and Ovaa, 2014]). Zum zielgerichteten Einbau von AzF wird eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) und eine Suppressor tRNA benötigt, die spezifisch für AzF sind. Schultz und Mitarbeiter haben dieses aaRS/tRNA Paar entwickelt und optimiert. Mit Hilfe des pEVOL-AzF-Systems kann das aaRS/tRNA<sup>AzF</sup><sub>CUA</sub> Paar AzF während der Translation *in vivo* in *E. coli* einbauen [Young et al., 2010].

### 3.1.1.1 Expression von rPEX5C11AzF in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure AzF

Als Ausgangskonstrukt diente das Plasmid pVS1, das für die lange Form von PEX5 (PEX5L) kodiert. PEX5L kann sowohl PTS1- als auch PTS2-Proteine in die Peroxisomen importieren. Zunächst wurde durch eine ortsspezifische Mutagenese eine Umkodierung des Cysteinocodons (TGC) zu einem Amberstopcodon (TAG) an Position 11 vorgenommen (*PEX5C11TAG*).

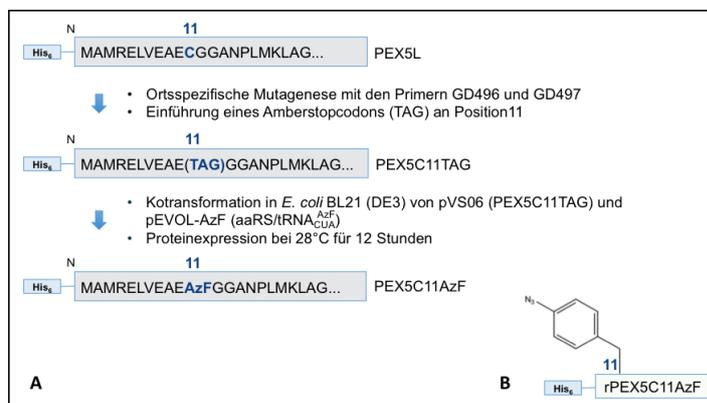


Abbildung 3.2: **Schematische Darstellung zur Gewinnung von rPEX5C11AzF.** A) Am N-terminalen Ende von PEX5L wird zunächst durch eine ortsspezifische Mutagenese mit den Oligonukleotiden GD496 und GD497 ein Austausch des Cysteinocodons zu einem Amberstopcodon vorgenommen. Im weiteren Verlauf wird das Konstrukt für *PEX5C11TAG* zusammen mit pEVOL-AzF, das für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase und tRNA<sub>CUA</sub> (aaRS/tRNA<sup>AzF</sup><sub>CUA</sub>) kodiert, in *E. coli* BL21 (DE3) kotransformiert und nach Zugabe von AzF exprimiert. B) Anstelle des Cys<sup>11</sup> wurde p-Azidophenylalanin (AzF) in PEX5L eingebaut.

Für einen zielgerichteten Einbau von AzF anstelle des Cys<sup>11</sup> ist es bedeutend, dass das Stopcodon am Ende des Leserahmens von PEX5L kein Amberstopcodon ist. Dies trifft für PEX5L zu. Eine schematische Darstellung zur Gewinnung von PEX5-Azid (PEX5C11AzF) gibt Abbildung 3.2 wieder.

Das klonierte *PEX5C11TAG* (pVS06) wurde zusammen mit pEVOL-AzF in den zur Proteinexpression geeigneten Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) kotransformiert. Zunächst sollte eine kleine Testexpression zeigen, ob sich in Anwesenheit von AzF das PEX5-Azid (PEX5C11AzF) exprimieren lässt. Hierfür wurden zwei kleine Expressionsansätze in M9 Minimalmedium mit AzF (1 mM Endkonzentration) und ohne AzF angefertigt. Im Vergleich dazu wurde rPEX5L in LB-Medium exprimiert. Die Expression wurde nach 13 Stunden bei 18 °C beendet. Die Proteinextrakte der entnommenen Proteinproben wurden auf einem SDS-Gel analysiert. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, wird rPEX5C11AzF in Anwesenheit von AzF exprimiert.

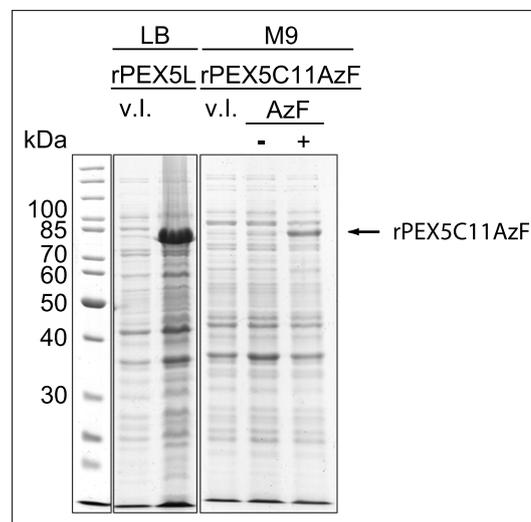


Abbildung 3.3: **Expression von rPEX5C11AzF in Abhängigkeit von AzF.** rPEX5L und rPEX5C11Azf wurden in LB- bzw. in M9 Minimalmedium für 13 Stunden bei 18 °C exprimiert. Die Expression von rPEX5C11AzF erfolgte in An- (+) bzw. in Abwesenheit (-) von 1 mM AzF. Es wurden jeweils 15 % der Proteinproben (500  $\mu$ L) vor Induktion (v.l.) und nach Induktion auf einem 10 %-igen SDS-Gel analysiert und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

Vor Induktion (v.l.) mit Arabinose und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ist auf Höhe des rPEX5C11AzF-Proteins eine schwache Bande zu erkennen, die jedoch in ihrer Intensität nach Zugabe von AzF deutlich zugenommen hat. Ein Vergleich mit dem in LB-Medium exprimierten rPEX5L zum rPEX5C11AzF zeigt eine deutlich stärkere Expression von rPEX5L. Auch ist zu erkennen, dass sowohl rPEX5L als auch rPEX5C11AzF entgegen der theoretisch kalkulierten molaren Masse ( $M_W$ ) von 71,7 kDa (Software *ProtParam* ([Gasteiger, 2003, Gasteiger et al., 2005])) in einem SDS-Gel deutlich langsamer laufen. Dies lässt sich anhand der Primärstruktur von PEX5 erklären, die einen hohen Anteil von rund 16 % saurer Aminosäuren aufweist.

Die Testexpression zeigt, dass sich rPEX5C11AzF in Anwesenheit von AzF exprimieren lässt, jedoch die Ausbeute im Vergleich zu rPEX5L deutlich geringer ist. Da für die Testexpression zunächst die Kulturbedingungen zur Proteinexpression von rPEX5L angewendet wurden, wurden im nächsten Schritt die Parameter zur Proteinexpression von rPEX5C11AzF optimiert.

### 3.1.1.2 Optimierung der Expressionsbedingungen von rPEX5C11AzF

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, wird rPEX5C11AzF in Anwesenheit von AzF im M9 Minimalmedium grundsätzlich exprimiert. Die Ausbeute ist im Vergleich zum rPEX5L deutlich geringer, daher sollte durch eine Optimierung verschiedener Parameter die Proteinexpression erhöht werden. Die Testansätze wurden bei drei verschiedenen Temperaturen (18 °C, 28 °C und 37 °C) ausgeführt und zu vier verschiedenen Zeitpunkten Expressionsproben entnommen.

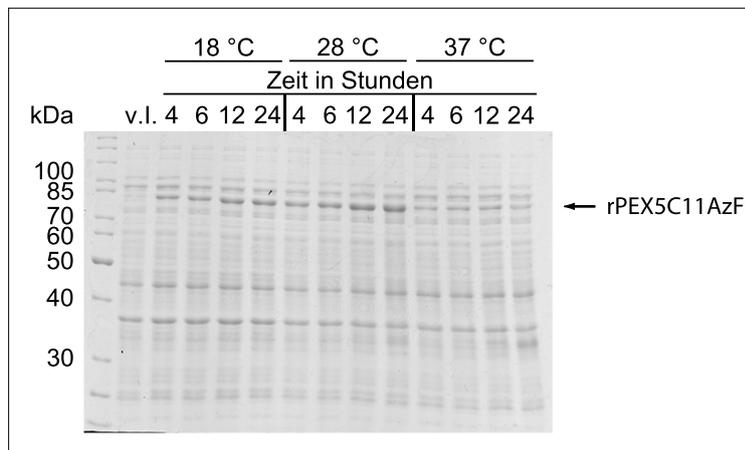


Abbildung 3.4: **Kinetik der rPEX5C11AzF-Expression.** rPEX5C11AzF wurde in M9 Minimalmedium bei 18 °C, 28 °C und 37 °C exprimiert. Expressionsproben (500  $\mu$ L) wurden nach 4, 6, 12 und 24 Stunden entnommen und davon 15 % auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blau.

Die Temperaturen mit höchster Ausbeute sind jene bei 18 °C und 28 °C. Es kann auch ein Anstieg der Proteinexpression mit der Zeit beobachtet werden (Abb. 3.4). Alle weiteren Expressionen von rPEX5C11AzF wurden für 12 Stunden bei 28 °C durchgeführt.

### 3.1.1.3 Aufreinigungen von rPEX5L und rPEX5C11AzF über Affinitätschromatographie

Nachdem bisher erfolgreich die Parameter für eine Expression von rPEX5C11AzF ermittelt wurden, konnte eine Proteinexpression und Aufreinigung im großen Maßstab

erfolgen. Sowohl rPEX5L als auch rPEX5C11AzF beherbergen an ihrem Aminoende einen Polyhistidin-Tag aus sechs Histidinen (His<sub>6</sub>). Aufgrund der Affinität des His<sub>6</sub>-Tags zu Nickel wurde eine affinitätschromatographische Aufreinigung über Nickel-Säulen mit dem ÄKTA-System durchgeführt. Die Aufreinigung von rPEX5L wurde bereits beschrieben [Schliebs and Saidowsky, 1999]. Abweichend davon erfolgte die Expression bei niedrigeren Temperaturen von 18 °C und über Nacht.

Die Expression von rPEX5C11AzF erfolgte im M9 Minimalmedium. Für eine Aufreinigung im großen Maßstab wurden zwei Liter Bakterienkultur eingesetzt, die zwei bis drei Gramm Pelletfeuchtgewicht ergaben. Durch einen mechanischen Aufschluss mittels French Press wurden die Zellen lysiert. Eine anschließende Zentrifugation separierte das lösliche rPEX5C11AzF von den Organellen und Zelltrümmern. Der filtrierte Überstand wurde auf eine Nickel-NTA-Säule (Volumengröße 1 mL) beladen. Mit Hilfe des ÄKTA-Systems wurde rPEX5C11AzF gereinigt (Waschfraktionen A1-A12 jeweils 2 mL) und von der Säule eluiert (Elutionsfraktionen B12-D2 jeweils 1 mL). Genauere Angaben zur Aufreinigung von rPEX5C11AzF sind dem Kapitel 2.5.1 zu entnehmen.

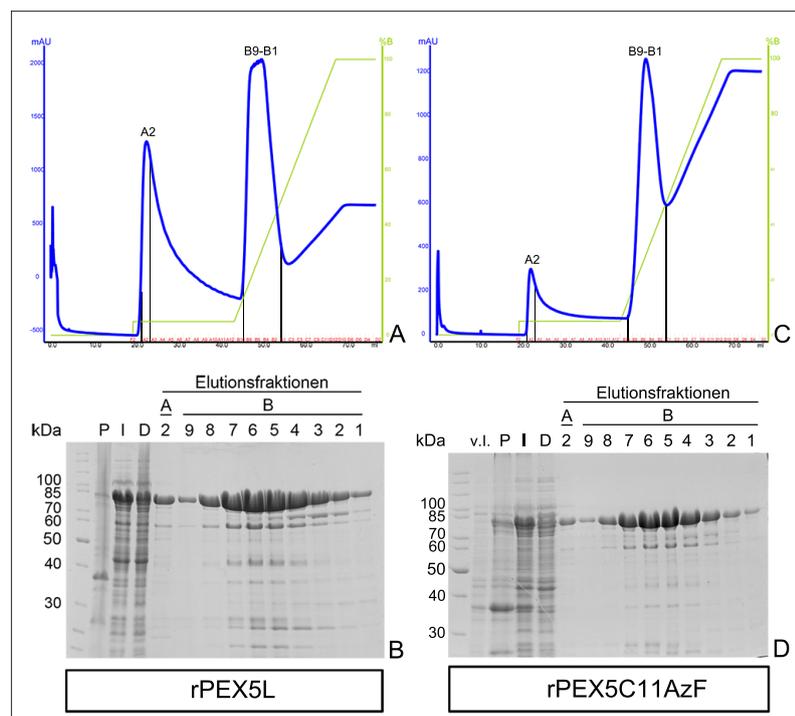


Abbildung 3.5: **Aufreinigung von rPEX5L und rPEX5C11AzF.** Der N-Terminus von sowohl rPEX5L als auch rPEX5C11AzF verfügen über einen His<sub>6</sub>-Tag. Elutionsdiagramm (A) und SDS-Gel (B) von rPEX5L, Elutionsdiagramm (C) und SDS-Gel (D) von rPEX5C11AzF nach einer Nickel-NTA-Säule. Von den Fraktionen vor Induktion (v.l.) wurden 15 % einer Proteinprobe (500  $\mu$ L), von Pellet (P), Input (I) und Durchfluss (D) jeweils 0,02 % des Gesamtansatzes, von A2 (2 mL) 0,3 % und B9-B1 (1 mL) jeweils 0,75 % auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

Wie die Analyse auf dem SDS-Gel zeigt (Abb. 3.5), ließen sich sowohl rPEX5L (A und B) als auch rPEX5C11AzF (C und D) gut über die Nickel-NTA-Säule aufreinigen und konnten in passablen Mengen eluiert werden. In beiden Aufreinigungen ist zu sehen, dass neben dem gewünschten Zielprotein auch weitere unspezifische Proteine von der Säule eluiert wurden. Für rPEX5C11AzF war dies zunächst nicht von Bedeutung, da diese Verunreinigungen für die spätere Klickreaktion keine Auswirkung haben sollten. Die vereinten Elutionsfraktionen von rPEX5C11AzF wurden zunächst gegen Klickpuffer dialysiert und im Weiteren für eine Klickreaktion eingesetzt. Die vereinten Proben von rPEX5L wurden anders als bei rPEX5C11AzF einer zweiten Aufreinigung, der Gelfiltrationschromatographie unterzogen. Für die Aufreinigung von rPEX5L wurde eine präparative Superdex 200 verwendet. Das Fraktionsvolumen betrug 2 mL.

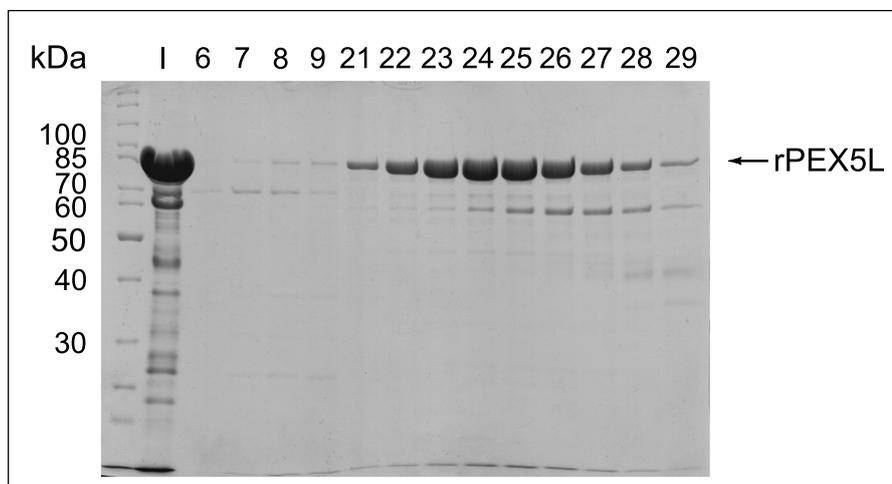


Abbildung 3.6: **Gelfiltrationschromatographie von rPEX5L.** Nach der Gelfiltrationschromatographie von rPEX5L mit einer präparativen Superdex 200 wurden vom Input (I) 10 % und von den Fraktionen (2 mL) jeweils 0,6 % auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

Im Vergleich zur ersten Aufreinigung über die Nickel-NTA-Säule konnten durch die Gelfiltrationschromatographie sämtliche Proteinverunreinigungen eliminiert und rPEX5L erfolgreich aufgereinigt werden (Abb. 3.6). Die Fraktionen 22-28 wurden vereint. Das aufgereinigte rPEX5L konnte für weiterführende Versuche verwendet werden.

### 3.1.2 Generierung eines Ubiquitin-Alkins

Ubiquitine sind ubiquitäre Proteine, denen in der Zelle eine große Bedeutung zugesprochen wird. Sie werden kovalent als mono- oder poly-Ubiquitin an ein Zielprotein gebunden. Im Falle einer poly-Ubiquitinierung erfolgt der Abbau des markierten Proteins im Proteasom. Erfolgt eine mono-Ubiquitinierung, so wird das Zielprotein für andere zelluläre Prozesse gekennzeichnet (siehe dazu Review von [Dikic et al., 2009]).

Im Hinblick auf die Peroxisomenbiogenese wird PEX5 am Cys<sup>11</sup> mono-ubiquitiniert. Zur Gewinnung eines *in situ* generierten mUb-PEX5 mit Hilfe der Klickchemie wird zum einen ein PEX5-Azid benötigt, dessen Herstellung im vorherigen Abschnitt 3.1.1 bereits beschrieben wurde. Zum anderen ist für die Vollendung der Reaktion ein Ubiquitin-Alkin notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Generierung eines Ubiquitin-Alkins aufbauend auf Weikart *et al* bewerkstelligt.

Als Ausgangsbasis diente ein Konstrukt, welches für die Expression von Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD kodiert [Weikart and Mootz, 2010]. Ubiquitine sind in eukaryontischen Organismen hochkonservierte Proteine, die sich in ihrer Primärstruktur in drei Aminosäuren unterscheiden (Abb 3.7). Das in dieser Arbeit verwendete Ubiquitin stammt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Proteinsequenz von *S. cerevisiae* weist im Vergleich zu *Homo sapiens* eine Übereinstimmung von rund 96 % auf, daher wurde von einem Austausch der abweichenden Aminosäuren abgesehen.

	1	11	21	31	41	51	61	71
<b>H. sapiens</b>	MQIFVKLTG	KTITLEVEPS	DTIENVKAKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGG
<b>M. musculus</b>	MQIFVKLTG	KTITLEVEPS	DTIENVKAKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGG
<b>S. cerevisiae</b>	MQIFVKLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGG
<b>H. polymorpha</b>	MQIFVKLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKSKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGG
<b>A. thaliana</b>	MQIFVKLTG	KTITLEVESS	DTIDNVKAKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGG
<b>C. elegans</b>	MQIFVKLTG	KTITLEVEAS	DTIENVKAKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN	IQKESTLHLV	LRLRGG

Abbildung 3.7: **Proteinalignment von Ubiquitin aus verschiedenen eukaryontischen Organismen.** Ubiquitin ist ein hochkonserviertes ubiquitäres Protein, das sich in drei Aminosäuren unterscheidet (orange). Sequenzvergleich aus Menschen (*H. sapiens*), Maus (*M. musculus*), Hefen (*S. cerevisiae* und *H. polymorpha*), Pflanzen (*A. thaliana*) und Fadenwurm (*C. elegans*).

Die letzten zwei Glycinreste am C-Terminus des Ubiquitins wurden deletiert Ub( $\Delta$ GG), um eine möglichst ähnliche Struktur zu einer nativen Gly-Gly- $\epsilon$ -Cys Thioesterbindung zu erhalten. Die Anlagerung der Alkingruppe an das Ub( $\Delta$ GG) wird durch eine Intein-fusionsstrategie erzielt. Zunächst wird das Fusionsprotein (Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD) rekombinant exprimiert und über die Chitinbindedomäne (chitin binding domain, CBD) an die Chitin-Matrix gebunden. Nach einem nukleophilen Angriff des Cysteins vom Intein (GyrA aus *Mycobacterium xenopi*) auf die benachbarte Peptidbindung wird ein Thioester erzeugt. Eine anschließende Thiolyse durch die Zugabe von MESNA resultiert in der Abspaltung des Thioesters zu einem Ub( $\Delta$ GG)-Thioester. Eine gleichzeitige Aminolyse mit Propargylamin erzeugt ein Ub( $\Delta$ GG)-Alkin (siehe auch Abb. 3.8).

Vorversuche haben gezeigt, dass bei einer späteren Klickreaktion nicht jedes rPEX5C11AzF-Protein mit einem Ubiquitin( $\Delta$ GG)-Alkin zusammengeführt werden kann. Für weiterführende Versuche ist es jedoch von Vorteil, wenn *in situ* geklicktes rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) so gut wie möglich von nicht geklicktem rPEX5C11AzF getrennt werden kann. Eine durchgeführte analytische Gelfiltrationschromatographie hat auch gezeigt, dass eine Trennung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) und rPEX5C11AzF nicht möglich war. Möglicherweise ist der Unterschied von ungefähr 8 kDa des Ubiquitins zu gering,

als dass eine erfolgreiche Trennung ablaufen kann.

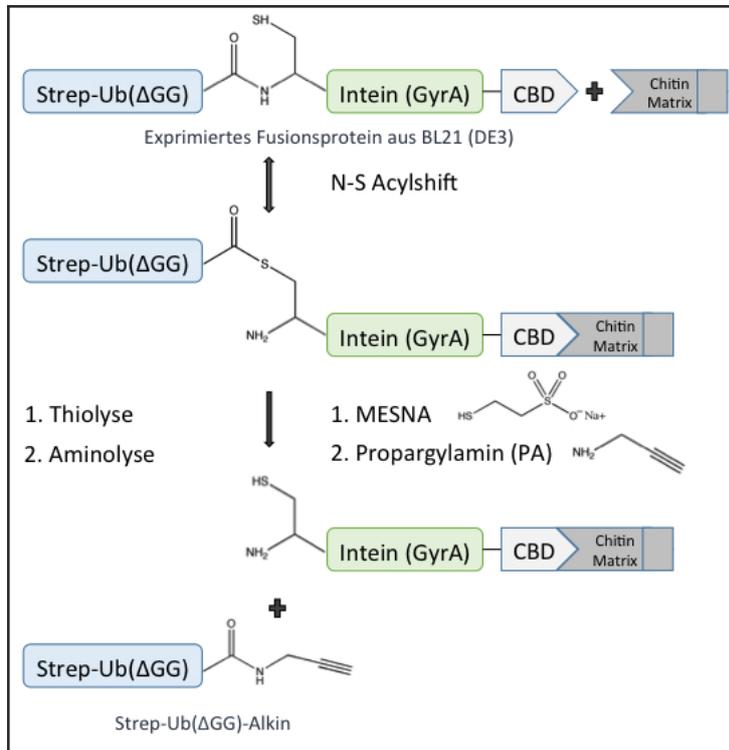


Abbildung 3.8: **Schematische Darstellung zur Gewinnung von Strep-Ub(ΔGG)-Alkin.** Das exprimierte Fusionsprotein Strep-Ub(ΔGG)-GyrA-CBD wird über die Chitinbindedomäne (CBD) an die Chitin-Matrix gebunden. Nach Zugabe von MESNA wird durch Thiolyse der Strep-Ub(ΔGG)-Thioester abgespalten. Gleichzeitig findet die Aminolyse durch die Anwesenheit von Propargylamin statt, die die Bildung eines Strep-Ub(ΔGG)-Alkins bewirkt.

Aus diesem Grund wurde ein N-terminaler *Strep*-Tag<sup>®</sup> II (Strep) am Ubiquitin(ΔGG) durch Oligonukleotid-Hybridisierung zugefügt. Der *Strep*-Tag<sup>®</sup> II besteht aus den acht Aminosäuren WSHPQFEK und bindet mit hoher Affinität an eine *Strep*-Tactin-Matrix. Zusätzlich zu dem *Strep*-Tag<sup>®</sup> II wurde eine TEV-Schnittstelle (Tobacco etch virus) eingeführt, damit später bei Bedarf der *Strep*-Tag<sup>®</sup> II abgespalten werden kann. Das Konstrukt, das für die Expression von Strep-Ub(ΔGG)-GyrA-CBD kodiert, wurde zunächst in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Nach der Expression wurde das Fusionsprotein über die CBD an eine Chitin-Matrix gebunden. Die Vorhergehensweise der Ubiquitin-Alkin Gewinnung ist mit der wie oben beschrieben identisch. Die Abspaltung des Strep-Ub(ΔGG)-Thioesters vom Intein GyrA erfolgte in Anwesenheit des Reduktionsmittels MESNA. Eine gleichzeitige Aminolyse des Strep-Ub(ΔGG)-Thioesters mit Propargylamin bewirkte die Ausbildung eines Strep-Ub(ΔGG)-Alkins. In Abb. 3.8 ist eine schematische Darstellung zur Erzeugung eines Strep-Ub(ΔGG)-Alkins zu sehen.

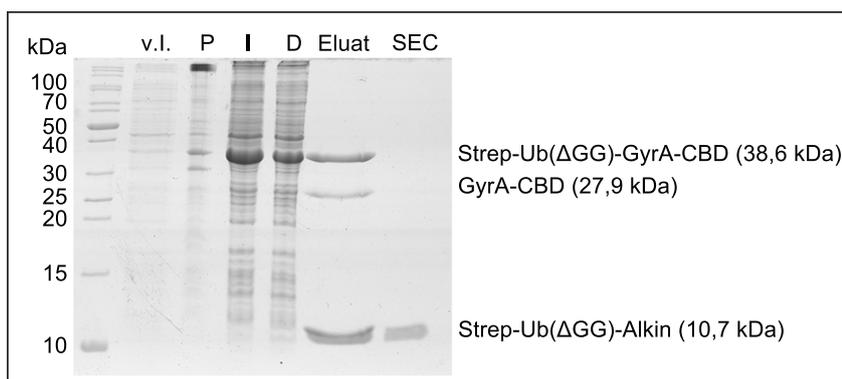


Abbildung 3.9: **Gewinnung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin.** Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD bindet über die Chitin-Binde-Domäne (CBD) an eine Chitin-Matrix. Die Abspaltung und gleichzeitige Erzeugung eines Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkins erfolgte nach Zugabe von MESNA und Propargylamin (Eluat). Das Eluat wurde durch eine Gelfiltrationschromatographie (SEC) mit einer präparativen Superdex 75 weiter aufgereinigt. Von den Fraktionen vor Induktion (v.l.) wurden 15 % der Proteinprobe (500  $\mu$ L), von Pellet (P), Input (I) und Durchfluss (D) jeweils 0,02 % des Gesamtansatzes, von Eluat (E, 30 mL) 0,5 % und nach SEC 4  $\mu$ M Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin auf ein 17 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

Die Proben der Aufreinigung und Generierung von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin wurden auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.9). Nach der Abspaltungsreaktion mit MESNA und der Aminolyse durch Propargylamin sind im Eluat drei Banden zu sehen. Die untere Bande entspricht dem abgespaltenen Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin, das eine ungefähre molare Masse von 11 kDa besitzt. Die mittlere Bande entspricht dem abgespaltenen GyrA-CBD, die obere Bande stellt das nicht gebundene Ausgangsprodukt Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD dar.

Um die beiden oberen Banden von dem abgespaltenen Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin zu trennen, gibt es zwei Möglichkeiten. Bei der ersten Option wird das Eluat nochmals mit einer neuen Chitin-Matrix inkubiert, damit die beiden größeren Proteine, die an ihrem C-Terminus eine CBD beherbergen, an die Chitin-Matrix binden können. Das generierte Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin kann es nicht mehr, da die GyrA-CBD abgespalten wurde. Dieser Ansatz wurde durchgeführt, wobei verschiedene Inkubationszeiten mit dem Eluat und der neuen Chitin-Matrix getestet wurden. Jedoch war das zweite Eluat, das nur noch das generierte Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin beinhalten sollte, stets mit den beiden anderen Proteinen verunreinigt, wenn auch weniger. Aus diesem Grund wurde eine zweite Möglichkeit gewählt: Eine Gelfiltrationschromatographie (SEC) mit einer präparativen Superdex 75, die ein Auftrennungsspektrum im molaren Bereich von 3-70 kDa verfügt, wurde angewendet. Mit Hilfe dieser Methode konnte das Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin erfolgreich und sauber aufgereinigt werden (Abb 3.9, SEC).

### 3.1.3 Das abgespaltene Strep-Ub( $\Delta$ GG) ist ein Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin

Nach der Spaltung des Expressionsproduktes Strep-Ub( $\Delta$ GG)-GyrA-CBD mit dem Reduktionsmittel MESNA, aus dem ein Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Thioester generiert wurde, fand gleichzeitig die Aminolyse in Anwesenheit von Propargylamin statt. Ob eine Alkinanlagerung an das Strep-Ub( $\Delta$ GG) erfolgreich war, konnte mittels eines SDS-Gels nicht geklärt werden, da der molare Größenunterschied bei wenigen Dalton liegt. Konnte die Aminolyse nur teilweise stattfinden, so fiel die Ausbeute in der späteren Klickreaktion von geklicktem rPEX5C11AzF geringer aus. Nach Zugabe von MESNA und Propargylamin jeweils in einer Endkonzentration von 250 mM konnte teilweise eine Alkinanlagerung an das Strep-Ub( $\Delta$ GG) stattfinden.

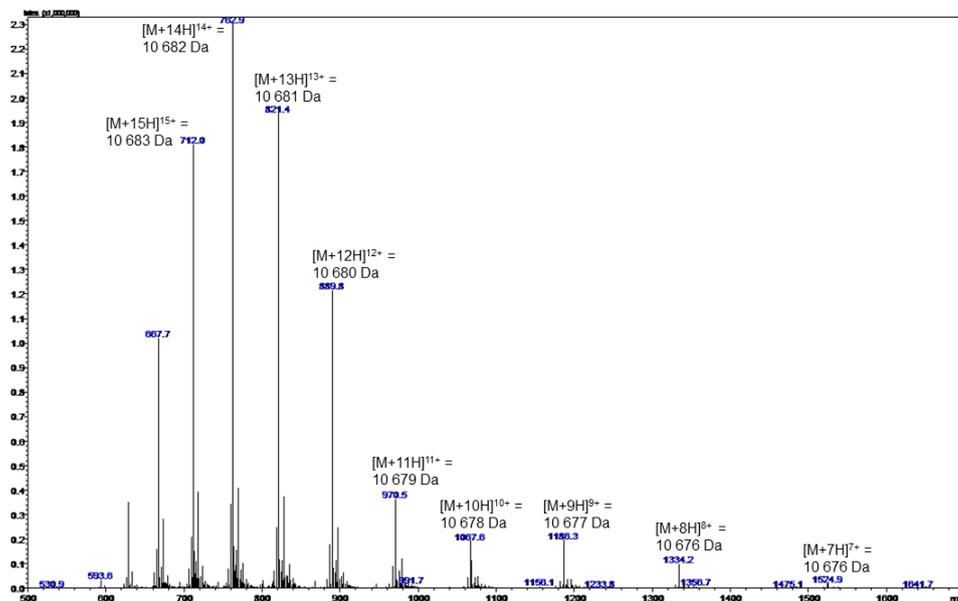


Abbildung 3.10: **ESI-MS-Analyse von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin.** Die erfolgreiche Alkinanlagerung an Strep-Ub( $\Delta$ GG) wurde durch eine Electrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigt. Die Masse des Proteins wird durch das Verhältnis von Masse und Ladung eines Ions bestimmt ( $m/z$ ). Theoretisch kalkulierte Masse von Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin = 10 668 Da, gemessene Durchschnittsmasse  $[M+H]^+_{gemessen} = 10 676$  Da.

Die Effektivität der Alkin-Generierung konnte mit Hilfe einer Electrosprayionisation (ESI)-MS (AG Schwarzer, IFIB, Universität Tübingen) bestimmt werden. Die Auswertung ergab, dass nach Zugabe von Propargylamin in einer Endkonzentration von 250 mM lediglich ein kleiner Teil des durch MESNA erzeugten Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Thioesters mit einem funktionellen Alkin ausgestattet wurde. Die Thioesterbildung durch MESNA findet idealerweise in einem sauren pH-Bereich statt, die Aminolyse hingegen benötigt einen alkalischen pH-Wert. Es gilt einen guten Kompromiss zu finden,

damit sowohl die Thioesterspaltung als auch die Alkinanlagerung stattfinden kann. Außerdem kann die Zugabe von MESNA und Propargylamin variabel erfolgen. Optimierungsversuche haben ergeben, dass ein pH-Wert von 8,2, eine MESNA-Konzentration von 150 mM und eine Propargylaminkonzentration von 750 mM eine sichere Abspaltung des Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Thioesters ermöglicht und gleichzeitig die Aminolyse zur Bildung eines Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkins stattfindet. Diese Parameter ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Eine Überprüfung anhand einer ESI-MS zeigte, dass die Alkinanlagerung an Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin erfolgreich war (Abb. 3.10). Ein anschließender gründlicher Pufferwechsel, um die ergiebigen Mengen an Propargylamin aus der Lösung zu dialysieren ist unabdingbar für die anschließende Klickreaktion, da das Azid auch, sogar viel besser, mit dem Propargylamin reagieren kann.

### 3.1.4 *In situ* Klickreaktion von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin mittels Klickchemie

In den vorherigen Abschnitten wurde auf die Erzeugung von rPEX5C11AzF mittels Nonsense-Suppression der unnatürlichen Aminosäure AzF (siehe Abschnitt 3.1.1) und des Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkins durch Abspaltung eines Inteinproteins (siehe 3.1.2) eingegangen. Beide Komponenten können nun für eine CuAAC-Klickreaktion eingesetzt werden. Weitere Additiva für einen erfolgreichen Ablauf der Klickreaktion sind notwendig. Die Zugabe von TBTA, ein Polytriazolamin, stabilisiert Cu(I) gegen Oxidation und Disproportionierung und verbessert somit den katalytischen Effekt der Cycloadditions-Reaktion [Rostovtsev et al., 2002]. Des Weiteren läuft die Reaktion in Anwesenheit von Reduktionsmitteln ab. Zum Abstoppen der Reaktion wird EDTA hinzugefügt, das mit Kupfer einen Chelatkomplex bildet.

Zunächst wurde eine Klickreaktion mit den Parametern entsprechend aus Sommer *et al* durchgeführt [Sommer et al., 2011]. Hierfür wurden als Ligand TBTA und als Reduktionsmittel TCEP eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 45 Minuten bei Raumtemperatur mit EDTA abgestoppt. Als positive Kontrolle wurde ein synthetisiertes Dansylalkin eingesetzt (Synthese von Hr. Kalbacher, IFIB, Universität Tübingen). In einer Klickreaktion mit rPEX5C11AzF und Dansylalkin kann ein Größenunterschied im SDS-Gel nicht gezeigt werden, da das Dansylalkin lediglich eine molare Masse von ungefähr 300 Dalton aufweist. Aufgrund der Fluorophoreigenschaft des Dansylalkins im kurzwelligen Bereich kann das Klickprodukt (rPEX5C11AzF mit Dansylalkin) jedoch im UV-Licht sichtbar gemacht werden. In der negativen Kontrolle waren weder CuSO<sub>4</sub>, TBTA noch TCEP enthalten, sie enthielt lediglich die Azid- und Alkinproteine. Die Klickreaktion wurde auf einem SDS-Gel analysiert (Abb 3.11).

Ungeklicktes rPEX5C11AzF hat eine molare Masse von ungefähr 72 kDa. Der Größenunterschied zu geklicktem rPEX5C11AzF (rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)) ist deutlich zu sehen. Jedoch ist die Ausbeute von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) sehr gering. Nicht reagiertes rPEX5C11AzF kann allerdings ausgeschlossen werden, da die positive Kontrolle mit Dansylalkin ein starkes Signal ergab.

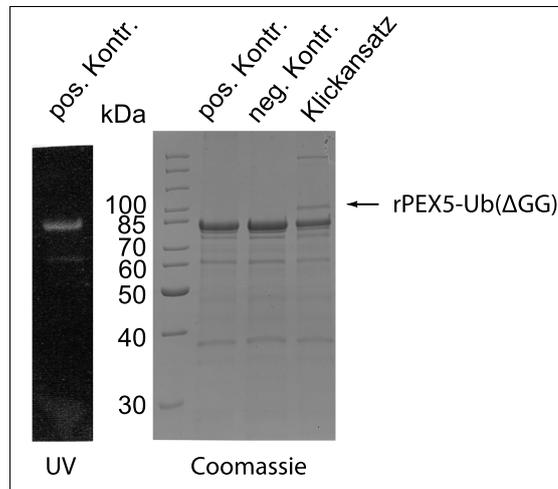


Abbildung 3.11: **Klickreaktion von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin.** Für eine Klickreaktion (Klickansatz) wurden  $8 \mu\text{M}$  rekombinantes PEX511AzF und  $24 \mu\text{M}$  Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin bzw.  $35 \mu\text{M}$  Dansylalkin (positive Kontrolle) eingesetzt. Als Reduktionsmittel wurde TCEP verwendet. Die negative Kontrolle enthielt kein  $\text{CuSO}_4$ , TBTA und TCEP. Die Auswertung der Klickansätze erfolgte unter UV-Licht und nach Coomassie-Brillant-Färbung. Es wurden 15 % eines  $40 \mu\text{L}$  Klickansatzes auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen.

Die Klickreaktion hat verdeutlicht, dass die CuAAC-Reaktion prinzipiell mit den generierten Proteinen rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin funktioniert. Die Ausbeute an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist jedoch sehr gering. Daher sollten sämtliche Parameter wie molare Mengen von Azid:Alkin, Dauer der Klickreaktion, die Art der Reduktionsmittel sowie mögliche weitere Additiva zunächst optimiert werden. Auf die Optimierung dieser Parameter soll in den nächsten Abschnitten weiter eingegangen werden.

### 3.1.4.1 Die Ausbeute der Klickreaktion wird durch Harnstoff nicht erhöht

In der Literatur wird der N-Terminus von PEX5 als nicht globulär und sehr flexibel beschrieben, weshalb eine Kristallisation des gesamten Rezeptorproteins bisher nicht möglich war. Somit sind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine genauen Rückschlüsse zur Struktur von PEX5 möglich. Im Hinblick auf die Klickreaktion ist es jedoch essentiell, dass das Protein frei zugänglich ist. Die Zugabe von Harnstoff zu Proteinen bewirkt deren Denaturierung, wodurch bis dahin nicht zugängliche Domänen besser zugänglich sind. Da nur Vermutungen über die Verfügbarkeit des N-Terminus von rPEX5C11AzF gemacht werden können, an den das Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin zugefügt wird, wurde die Klickreaktion in Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Nach der

Affiniätschromatographie über die Nickel-NTA-Säule von rPEX5C11AzF wurde dieses gegen Klickpuffer dialysiert, das mit 0 M, 2 M, 4 M bzw. 8 M Harnstoff versehen war.

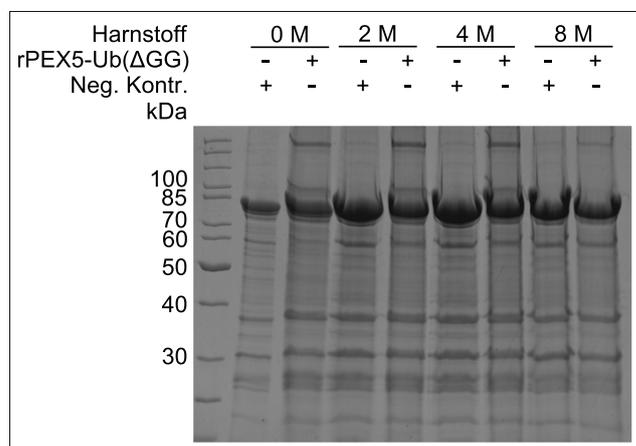


Abbildung 3.12: **Klickreaktion mit Harnstoff.** Klickreaktion mit 8  $\mu$ M rPEX5C11AzF und 24  $\mu$ M Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin (in der Abbildung als rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bezeichnet) in Klickpuffer mit 0 M, 2 M, 4 M oder 8 M Harnstoff. Als Reduktionsmittel wurde TCEP verwendet. Die negative Kontrolle enthielt kein  $\text{CuSO}_4$ , TBTA und TCEP. Es wurden jeweils 15 % eines 40  $\mu$ L Klickansatzes auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

Die Klickreaktion wurde wie im vorherigen Abschnitt beschrieben durchgeführt und die Ansätze auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.12). Im Vergleich zu dem herkömmlichen Klickpuffer (0 M Harnstoff) ist die Klickausbeute bei den Ansätzen mit 2 M bzw. 4 M Harnstoff nicht gestiegen, sie nahm bei einer Konzentration von 8 M Harnstoff sogar ab. Somit lag die Vermutung nahe, dass eine Denaturierung durch Harnstoff von rPEX5C11AzF keine steigende Effizienz hinsichtlich der Klickausbeute ergab.

### 3.1.4.2 Ascorbinsäure als Reduktionsmittel und die Zugabe von SDS steigern die Klickeffizienz erheblich

Die Verwendung von Harnstoff im Klickpuffer erzielte keine Steigerung der Effizienz der Klickreaktion. Daher wurde eine Optimierung weiterer Parameter in Betracht gezogen. Marx und Mitarbeiter haben in ihrer Publikation verschiedene Bedingungen getestet, um eine Verbesserung der Klickeffizienz zu erhalten [Schneider et al., 2013]. Unter Verwendung eines anderen Reduktionsmittels, der Ascorbinsäure und der Zugabe von SDS konnte die Ergiebigkeit der Klickreaktion um bis zu 70 % gesteigert werden.

Diese Erkenntnis soll auf die bisher basierende Klickreaktion angewendet werden. Es wurden zum einen unterschiedliche Konzentrationen des bisher verwendeten Reduktionsmittels TCEP, der vielversprechenden Ascorbinsäure, des Liganden TBTA und SDS verwendet. Zum anderen wurden verschiedene molare Mengenverhältnisse des

Azid- und Alkinproteins getestet. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert und hinsichtlich der verschiedentlich verwendeten Reduktionsmittel gegenübergestellt (Abb. 3.13, A mit TCEP, B mit Ascorbinsäure).

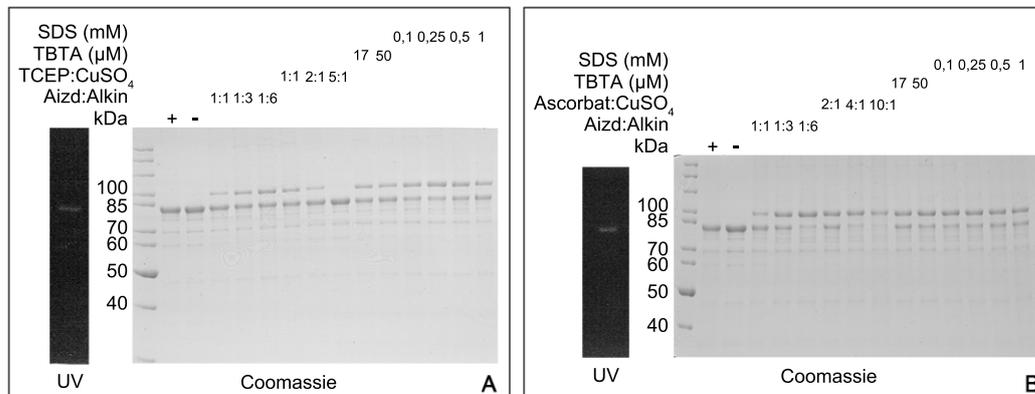


Abbildung 3.13: **Klickreaktion mit den Reduktionsmitteln TCEP und Ascorbinsäure.** Zur Optimierung der Klick-Parameter wurden rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin sowie die Reduktionsmittel TCEP (A) bzw. Ascorbinsäure (B) und  $\text{CuSO}_4$  in verschiedenen molaren Mengenverhältnissen, TBTA und SDS in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die positive Kontrolle (+) enthielt Dansylalkin, in der negativen Kontrolle (-) waren weder  $\text{CuSO}_4$ , TBTA, SDS noch Reduktionsmittel vorhanden. Es wurden jeweils 15 % eines 40  $\mu\text{L}$  Klickansatzes auf einem 10 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht bzw. nach Coomassie-Brillant-Färbung ausgewertet.

Sowohl in dem Ansatz mit TCEP als auch mit Ascorbinsäure ist klar zu sehen, dass eine Zunahme von geklicktem rPEX5C11AzF erfolgt, je höher die Konzentration von anwesendem Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin in der Lösung ist. Des Weiteren kann geschlossen werden, dass eine Zunahme von TCEP im Verhältnis zu  $\text{CuSO}_4$  eine gleichzeitige Abnahme der Klickausbeute ergibt und sogar bei einem Verhältnis TCEP: $\text{CuSO}_4$  von 5:1 keine Klickreaktion mehr erfolgt. Im Vergleich dazu findet bei Verwendung von Ascorbinsäure selbst im Verhältnis Ascorbinsäure: $\text{CuSO}_4$  von 10:1 eine Klickreaktion statt. Darüberhinaus hatten die zwei unterschiedlichen Konzentrationen von TBTA (17  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss in Anwesenheit von TCEP, wohingegen eine leichte Zunahme des Klickproduktes bei gleichzeitiger Verwendung von 50  $\mu\text{M}$  TBTA und Ascorbinsäure verzeichnet werden konnte. Ebenfalls konnte die Zugabe von 0,25 mM SDS in Anwesenheit von TCEP bzw. Ascorbinsäure die Ausbeute leicht erhöhen.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass insgesamt die Klickreaktion mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel wesentlich besser als mit dem herkömmlichen TCEP funktioniert. Sogar bei einem Verhältnis Ascorbinsäure: $\text{CuSO}_4$  von 10:1 konnte eine nahezu 100 %-ige Ausbeute erzielt werden, wobei die Intensität der rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bande im Vergleich zu einem geringen Ascorbinsäure: $\text{CuSO}_4$  Verhältnis abgenommen hat.

Für alle nachfolgenden Klickreaktionen wurde als Reduktionsmittel Ascorbinsäure in einem Verhältnis mit  $\text{CuSO}_4$  von 4:1 verwendet. Zu allen Klick-Ansätzen wurden der Ligand TBTA und SDS in den Konzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  bzw.  $0,25 \text{ mM}$  hinzugefügt.

### 3.1.4.3 Molares Mengenverhältnis rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin von 1:3 und eine längere Reaktionsdauer steigern die Klickausbeute

Nachdem im vorherigen Abschnitt einige Bedingungen für eine effizientere Klickreaktion getestet wurden, wurden im nächsten Schritt die molaren Mengenverhältnisse von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin sowie die Reaktionsdauer variiert. Hierfür wurden die ermittelten Bedingungen aus 3.1.4.2 übernommen und rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin in Verhältnissen von 1:1 bis 1:5 eingesetzt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.14, A).

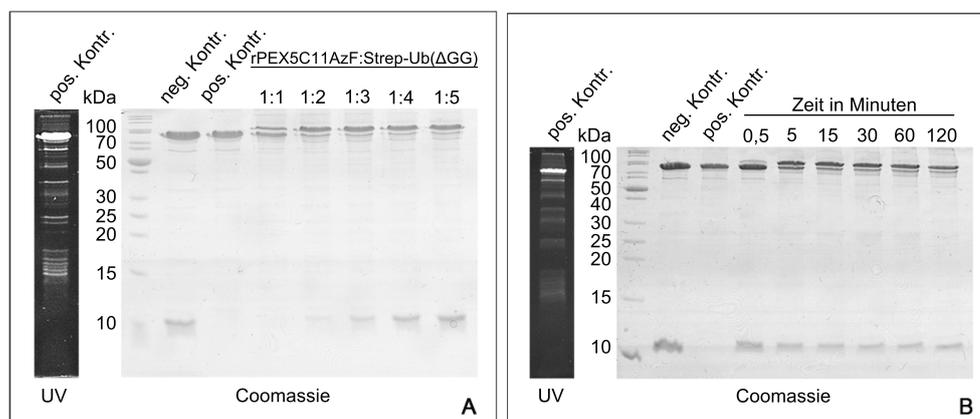


Abbildung 3.14: **Kinetik und molare Mengenverhältnisse.** A) Klickreaktion mit verschiedenen molaren Mengenverhältnissen von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin. B) Standard-Klickreaktion, die zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt wurde. Es wurden jeweils 15 % eines  $40 \mu\text{L}$  Ansatzes auf einem 17 %-igen SDS-Gel analysiert und unter UV-Licht bzw. nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung ausgewertet.

Die Klickeffizienz kann bis zu einem molaren Mengenverhältnis rPEX5C11AzF:Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin von 1:3 gesteigert werden. Ein extremer Überschuss an Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin bewirkt keine weitere Steigerung der Klickausbeute. Die Menge an Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin nimmt ab einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 stetig zu, was für eine Übersättigung von Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin in dem Klickansatz entspricht. Für alle weiteren Versuche wurden rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

Für die Ermittlung der höchsten Klickausbeute in Abhängigkeit der Reaktionsdauer wurde eine Klickreaktion mit den oben beschriebenen Parametern angesetzt und Proben nach 0,5, 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten entnommen und auf einem SDS-Gel

analysiert (Abb. 3.14, B). Bereits nach 30 Minuten konnte ein Maximum des Klickproduktes erreicht werden. Alle folgenden Klickreaktionen wurden nach 30 Minuten beendet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch das Testen verschiedener Bedingungen die Klickausbeute wesentlich erhöht werden konnte.

### 3.1.5 Gewinnung von sauberem rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Obwohl die Klickausbeute gesteigert werden konnte, war es nicht möglich, das gesamte eingesetzte rPEX5C11AzF mit einem Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin zu versehen. Somit lag am Ende einer Klickreaktion ein Gemisch aus geklicktem und ungeklicktem rPEX5C11AzF vor. Für spätere Versuche ist es jedoch von Vorteil, so viel wie möglich ungeklicktes rPEX5C11AzF aus dem Proteinmix zu eliminieren, um falsche Schlussfolgerungen zu vermeiden. Des Weiteren befinden sich in dem Klickansatz Komponenten, die bei späteren Versuchen stören könnten. Aus diesem Grund wurde rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) einer zweifachen Proteinreinigung unterzogen.

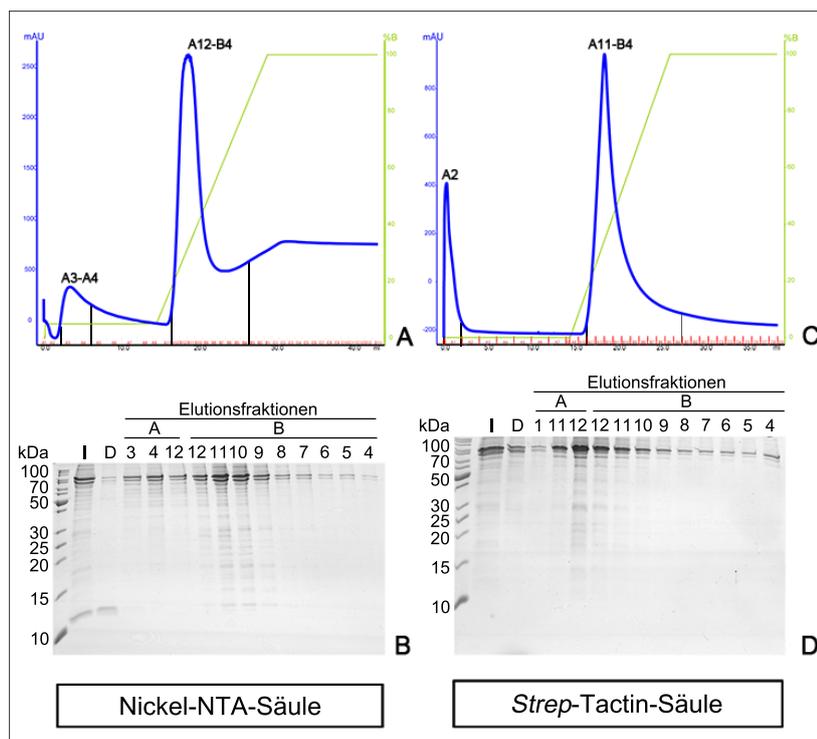


Abbildung 3.15: **Aufreinigung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)**. A) Elutionsdiagramm und B) SDS-Gel nach einer Nickel-NTA-Säule, C) Elutionsdiagramm und D) SDS-Gel nach einer *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Säule. Von den Fraktionen Input (I) und Durchfluss (D) wurden jeweils 0,02 % des Gesamtansatzes, von A3-A4 (jeweils 2 mL), bzw. A2 (2 mL) 0,3 % und von A12-B4 (jeweils 1 mL) bzw. A11-B4 (jeweils 1 mL) 0,75 % auf ein 17 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

Im ersten Schritt wurde eine Affinitätschromatographie über eine Nickel-NTA-Säule mit dem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag von rPEX5C11AzF durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst ein Pufferwechsel, da sich das im Klickpuffer befindliche EDTA störend auf die Nickel-Säulen-Matrix auswirken kann. EDTA ist ein Chelatkomplexbildner und würde das Nickel aus der Matrix komplexieren. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.15, B). Überschüssiges Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin konnte aus dem Klickansatz eliminiert werden, da dieses Protein keine Affinität zur Nickel-Matrix besitzt (Abb. 3.15 B). Alle Elutionsfraktionen, in denen sowohl geklicktes als auch ungeklicktes rPEX5C11AzF zu detektieren war, wurden vereint und direkt im zweiten Aufreinigungsschritt auf eine *Strep*-Tactin<sup>®</sup>-Säule beladen. *Strep*-Tactin<sup>®</sup> ist ein Strep-tavidinderivat und eines der stabilsten Proteine, die bekannt sind. Die Bindung von *Strep*-Tag<sup>®</sup> II-Proteinen an die *Strep*-Tactin<sup>®</sup>-Matrix ist äußerst affin. Deren Elution wird durch Zugabe von Desthiobiotin gewährleistet, welches ein natürlicher Ligand und ein stabiles Analogon von Biotin ist.

Die Proben nach der zweiten Aufreinigung wurden auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 3.15, D). Der Input (I) zeigt, welcher gleichzeitig die vereinten Elutionsfraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt ist, dass kein Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin vorhanden ist. In den Elutionsfraktionen A11-B4 konnte eine Anreicherung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5C11AzF erzielt werden. Die obere, prominentere Bande entspricht dem rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bei 82,3 kDa, die untere Bande ist das ungeklickte rPEX5C11AzF bei 71,7 kDa.

Die Elutionsfraktionen mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurden vereint und konnten für weitere Versuche eingesetzt werden.

### 3.1.6 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist ein mUb-PEX5C11AzF

Nach der Herstellung eines rPEX5C11AzF und eines Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkins erfolgte eine CuAAC-Reaktion, aus der ein *in situ* generiertes rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) resultierte. Um jegliche Komponenten aus der Klickreaktion sowie überschüssiges Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin und nicht geklicktes rPEX5C11AzF zu entfernen, wurde rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) einer zweifachen Affinitätschromatographie unterzogen. Zur Bestätigung, dass es sich bei dem erzeugten rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) tatsächlich um das mono-ubiquitinierte Rezeptorprotein handelt, wurde zum einen ein Western Blot mit Antikörpern gegen PEX5 und zum anderen eine Massenspektrometrie angewendet.

#### 3.1.6.1 PEX5-Antikörper erkennen sowohl rPEX5C11AzF als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Zur Durchführung eines Western Blots wurden Proteinproben nach der Klickreaktion mit verschiedenen molaren Mengenverhältnissen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Klickreaktion wurde wie in Kapitel 3.1.4.3 beschrieben durchgeführt.

Die Detektion der Proteine erfolgte mit PEX5-Antikörpern (GDA2) (Abb. 3.16), die in der Lage sind, beide Proteine zu detektieren. Darüber hinaus ist ein Größenunterschied von ungefähr 10 kDa zu erkennen, der auf die Größe des zusätzlichen Strep-Ub( $\Delta$ GG)-

Alkins zurückzuführen ist. Somit entspricht die obere Bande dem geklickten und die untere dem ungeclickten rPEX5C11AzF. Die Immundetektion mit anti-PEX5 legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der oberen Bande um das *in situ* mono-ubiquitinierte PEX5 handelt.

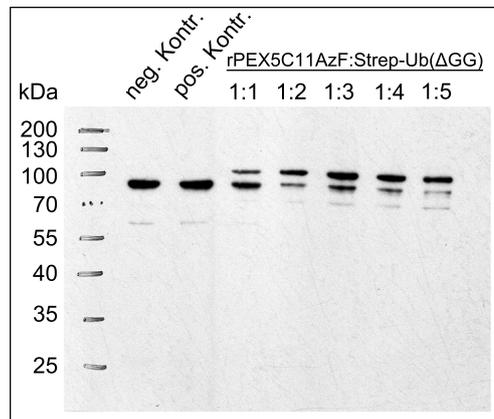


Abbildung 3.16: **Immundetektion nach Klickreaktion.** Nach der Klickreaktion mit verschiedenen molaren Mengenverhältnissen von rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin wurden jeweils 1,8 % eines 40  $\mu$ L Klickansatzes auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von PEX5 erfolgte mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“. Die Expositionszeit des Filmes betrug eine Minute.

Eine genaue Validierung, ob es sich bei dem rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) tatsächlich um das Klickprodukt aus rPEX5C11AzF und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin handelt, ergab eine Massenspektrometrie (MS). Diese wurde von der AG Kalbacher (IFIB, Universität Tübingen) durchgeführt. Eine Analyse von geklicktem und nicht geklicktem rPEX5C11AzF ergab eine eindeutige Bestätigung, dass es sich bei der oberen Bande des Western Blots (Abb. 3.16) tatsächlich um ein mit Strep-Ub( $\Delta$ GG) aus *S.cerevisiae* modifiziertes rPEX5C11AzF handelt (MS-Daten im Anhang).

## 3.2 Funktions- und Interaktionsstudien von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

In den vorangegangenen Abschnitten wurde detailliert auf die Gewinnung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eingegangen. Darauf aufbauend soll im zweiten Teil der Arbeit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) charakterisiert und in Interaktionsstudien im Vergleich zum unveränderten rPEX5L gegenübergestellt werden.

### 3.2.1 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet keine PTS1-Proteine, jedoch den PEX7-PTS2-Proteinkomplex

#### 3.2.1.1 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet nicht an PTS1-Proteine

Der humane peroxisomale Importrezeptor PEX5L bindet über die C-terminale TPR-Domäne im Zytosol die neu synthetisierten Cargo-Proteine an deren C-terminalem, konservierten Tripeptid (PTS1). Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern sich die Bindung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zum normalen rPEX5L zu PTS1-Proteinen verhält. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein Pull-down Versuch entwickelt. Die rekombinanten (r) Proteine PEX5L und PEX5-Ub( $\Delta$ GG) beherbergen an ihrem N-Terminus einen His<sub>6</sub>-Tag. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die Proteine an magnetische Nickel-NTA-Beads, ähnlich einer Nickel-NTA-Säule, zu binden. Des Weiteren wurde GFP-PTS1, ein grün fluoreszierendes Protein, welches am C-Terminus mit der erweiterten Konsensussequenz -P-L-H-S-K-L (PTS1) ausgestattet ist, verwendet. Mit Hilfe einer *in vitro* Transkriptions-Translationsreaktion (TnT) wurde GFP-PTS1 exprimiert und durch Einbau von radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin (nachfolgend als <sup>35</sup>S bezeichnet) markiert. Nach Expression von <sup>35</sup>S-GFP-PTS1 wurde dieses zu den Nickel-NTA-Beads hinzugegeben, die entweder mit 7  $\mu$ g rPEX5L bzw. 14  $\mu$ g rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt waren. Die eingesetzte Proteinkonzentration von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurde vorher auf einem SDS-Gel überprüft. Die Banden wiesen gleiche Intensitäten nach einer Coomassie-Brillant-Blau-Färbung auf, wenn von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) die doppelte Konzentration eingesetzt wurde.

Den Translationsansätzen wurde Bindungspuffer und 2 mM ATP hinzugefügt und für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die gebundenen Fraktionen durch Zugabe eines Imidazol-Elutionspuffers eluiert, da das Imidazol mit dem Histidin um die Bindung an die Nickel-NTA-Beads konkurriert. Sowohl die ungebundenen Fraktionen (Überstände) als auch die Eluate wurden mit Hilfe einer Autoradiographie analysiert (Abb.3.17, A).

<sup>35</sup>S-GFP-PTS1 mit einer molaren Masse von ungefähr 27 kDa kann an rPEX5L-gekoppelte Nickel-NTA-Beads binden. Im Vergleich dazu ist keine Bindung von <sup>35</sup>S-GFP-PTS1 an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-gekoppelte Nickel-NTA-Beads zu beobachten. Die Bindung von <sup>35</sup>S-GFP-PTS1 zu rPEX5L ist spezifisch, da im Eluat der negativen Kontrolle (neg. Kontr.) keine Bindung von <sup>35</sup>S-GFP-PTS1 an die Nickel-NTA-Beads zu sehen ist.

Zur Überprüfung, ob an die Nickel-NTA-Beads tatsächlich die rekombinanten Proteine gekoppelt wurden, wurde zusätzlich ein Western Blot der Ansätze durchgeführt und rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mit PEX5-Antikörpern nachgewiesen (Abb.3.17, B). Sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurden an die magnetischen Nickel-NTA-Beads gebunden.

Es konnte *in vitro* mit Hilfe eines Pull-down Versuches eindeutig gezeigt werden, dass rPEX5L an PTS1-Proteine binden kann und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) diese Eigenschaft nicht besitzt.

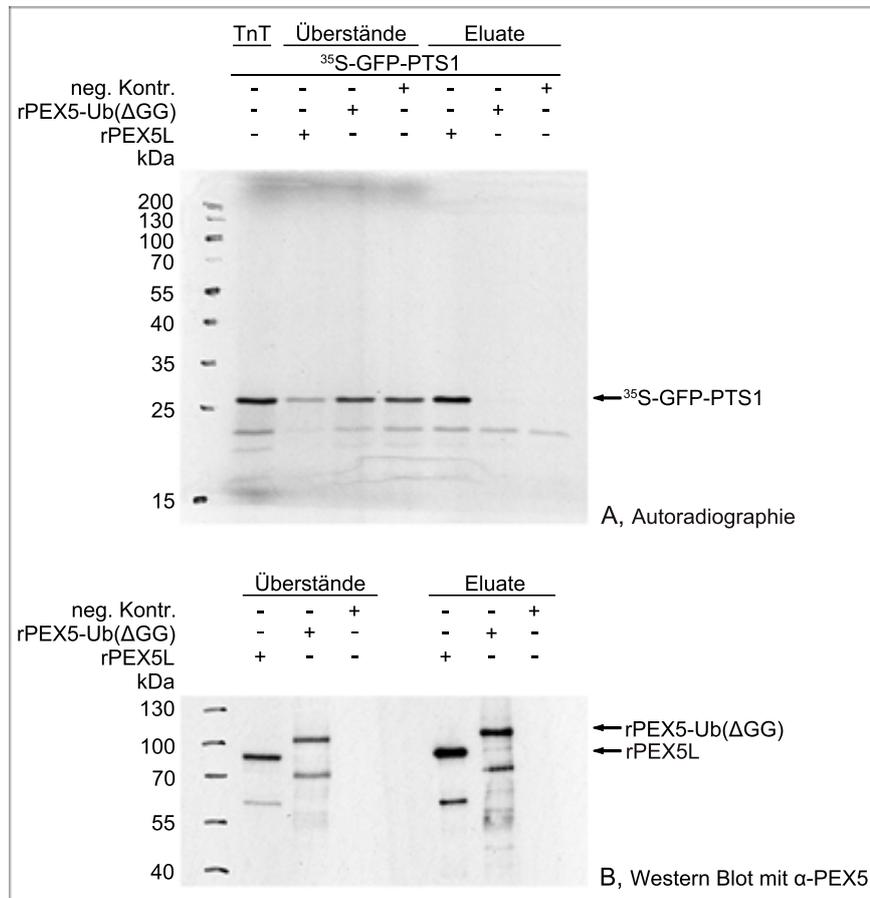


Abbildung 3.17: **Pull-down Versuch mit <sup>35</sup>S-GFP-PTS1**. A) In einem Pull-down Versuch wurde die Interaktionseigenschaft von GFP-PTS1 mit rPEX5L und rPEX5-Ub(ΔGG) überprüft. Hierfür wurden jeweils 40 μL Nickel-NTA-Beads mit 7 μg rPEX5L bzw. 14 μg rPEX5-Ub(ΔGG) oder mit keinem Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Jeweils 20 μL einer TnT-Reaktion von <sup>35</sup>S-GFP-PTS1 wurde zu den Nickel-NTA-Beads gegeben. Die Inkubation der Ansätze erfolgte mit Bindungspuffer und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C. Es wurden von der TnT-Reaktion 20 %, den Überständen 10 % und den Eluaten jeweils 50 % auf ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mittels Autoradiographie analysiert. Die Expositionszeit des Filmes betrug zwei Tage. B) Nachweis von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub(ΔGG) mittels Western Blot. Es wurden von den Überständen und Eluaten jeweils 2,85 % auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub(ΔGG) erfolgte mit α-PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper α-rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“. Die Expositionszeit des Filmes betrug eine Minute.

### 3.2.1.2 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann den PEX7-PTS2-Proteinkomplex binden

Der Import von PTS2-Proteinen wird durch den Korezeptor PEX7 bewerkstelligt, der an das N-terminale Nonapeptid (PTS2) der Cargo-Proteine binden kann. Aufgrund der Interaktion zwischen PEX5L und PEX7 wird der PEX7-PTS2-Proteinkomplex zu den Peroxisomen transportiert. Eine direkte Interaktion zwischen PEX5L und den PTS2-Proteinen konnte bisher nicht beobachtet werden. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann nicht an PTS1-Proteine binden und ist somit nicht in der Lage, diesen Importweg zu bedienen. Unklar bleibt, inwiefern der PTS2-Importweg betroffen ist.

Um dies zu klären, wurde erneut ein Pull-down Versuch angewendet. Zunächst wurden magnetische Nickel-NTA-Beads mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Den gekoppelten Nickel-NTA-Beads wurde sowohl der Korezeptor PEX7 als auch das PTS2-Protein Thiolase-myc hinzugegeben, die zuvor mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und mit radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert wurden. Im Unterschied zum  $^{35}\text{S}$ -GFP-PTS1 Pull-down Versuch (siehe 3.2.1.1) wurde den Ansätzen Zytosol aus  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen anstelle des Bindungspuffers hinzugegeben und nach Zugabe von 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Verwendung von Zytosol aus  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen hat zum einen den Vorteil, dass sämtliche Proteine und Kofaktoren wie im natürlichen Umfeld zugegen sind, die für eine Interaktion essentiell sein könnten. Zum anderen sollte aufgrund der Defizienz von PEX5 dieser Zelllinie vermieden werden, dass das sonst endogene PEX5 mit den Proteinen  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc und  $^{35}\text{S}$ -PEX7 interagieren und in direkter Konkurrenz mit den rekombinanten Proteinen PEX5L und PEX5-Ub( $\Delta$ GG) stehen könnte. Die gebundenen (Elate) und nicht gebundenen (Überstände) Fraktionen wurden anhand einer Autoradiographie analysiert.

Die Auswertung der Proben zeigt, dass rPEX5L wie erwartet an  $^{35}\text{S}$ -PEX7 binden und somit auch  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc präzipitieren kann (Abb.3.18, A). Diese Tatsache trifft auch für rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu. Sowohl die Bindung zu rPEX5L als auch zu rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist spezifisch, da in der negativen Kontrolle weder  $^{35}\text{S}$ -PEX7 noch  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc detektiert wurden. Die Bindung beider rekombinanter Proteine an  $^{35}\text{S}$ -PEX7 ist im Verhältnis zu  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc relativ gering. In der Primärstruktur von PEX7 beläuft sich der Anteil des Methionins auf 0,6 %. Ist der Anteil der eingebauten Radioaktivität gering, spiegelt sich dies auch in der Intensität der Banden bei einer Autoradiographie wider. Die Fähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) PTS2-Proteine zu präzipitieren ist im Vergleich zu rPEX5L nicht reduziert (Abb. 3.18, A). Im durchgeführten Western Blot (Abb. 3.18, B) ist zu sehen, dass sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an die Nickel-NTA-Beads gekoppelt wurden.

Versuche mit weiteren PTS2-Proteinen, wie PAHX-myc (Phytanoyl-CoA-Hydroxylase), ADAPS-PTS2 (Alkyl-dihydroxyacetone Phosphatsynthase), PTS2-CAT, einer bakteriellen Chloramphenicol-Transferase, die mit einer PTS2 versehen wurde und GFP-PTS2, dem Analogon zu GFP-PTS1, wurden in diesem Pull-down Versuch eingesetzt. Alle Versuche blieben erfolglos, da entweder keine Expression in der TnT stattgefunden hat (PTS2-CAT und GFP-PTS2) oder die unspezifische Bindung der Proteine an die magnetischen Nickel-NTA-Beads äußerst hoch und somit keine Auswertung möglich war (PAHX-myc, ADAPS-PTS2).

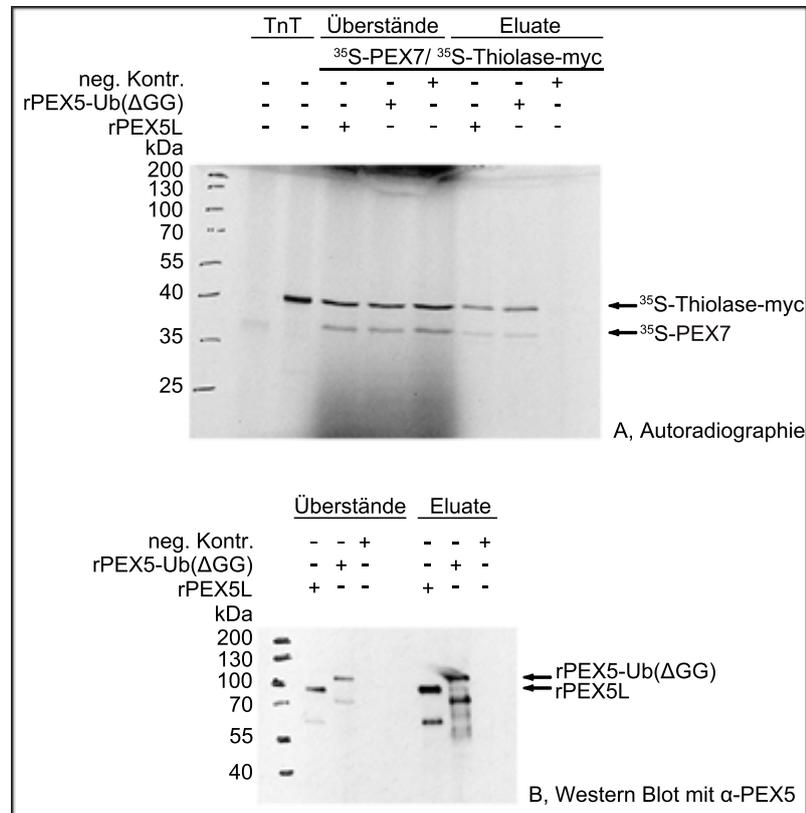


Abbildung 3.18: **Pull-down Versuch mit <sup>35</sup>S-PEX7 und <sup>35</sup>S-Thiolase-myc.** A) Autoradiographie des Pull-down Versuches. Jeweils 40  $\mu$ L Nickel-NTA-Beads wurden mit 7  $\mu$ g rPEX5L bzw. 14  $\mu$ g rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder mit keinem Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Zu jedem Ansatz wurden jeweils 20  $\mu$ L <sup>35</sup>S-Thiolase-myc und <sup>35</sup>S-PEX7 aus einer TnT-Reaktion zu den Nickel-NTA-Beads hinzugegeben. Die Inkubation der Ansätze erfolgte mit  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C. Es wurden von der TnT-Reaktion 20 %, den Überständen 10 % und den Eluatens jeweils 50 % auf einem 12 %-igen SDS-Gel aufgetragen und mittels Autoradiographie analysiert. Die Expositionszeit des Filmes betrug zwei Tage. B) Nachweis von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mittels Western Blot. Es wurden von den Überständen 1,14 % und Eluatens jeweils 2,85 % auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von PEX5 erfolgte mit  $\alpha$ -PEX5 (1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“. Die Expositionszeit des Filmes betrug eine Minute.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der PEX7-PTS2-Proteinkomplex im gleichen Maße sowohl von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) als auch von rPEX5L gebunden werden kann. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann nicht wie im Vergleich zu rPEX5L an PTS1-Proteine binden.

### 3.2.2 Integration von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die peroxisomale Membran

#### 3.2.2.1 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) komplementiert $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nicht für den PTS1-Proteinimport

Die Erkenntnisse aus den beiden vorherigen Versuchen zeigen, dass zumindest *in vitro* keine Bindung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an PTS1-Proteine nachgewiesen werden konnte. Dagegen kann rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mit dem PEX7-PTS2-Proteinkomplex interagieren. Diese Beobachtungen sollen im nächsten Schritt *in vivo* überprüft werden. Hierzu wurden  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen entweder mit rPEX5L oder rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) elektroporiert und nach einem Tag bzw. nach zwei Tagen Immunfluoreszenzpräparate angefertigt und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zusätzlich enthielten die Ansätze das Konstrukt pEB22.11, das für die Expression von EGFP-PTS1, einem „enhanced green fluorescent protein“ mit einer PTS1-Sequenz, kodiert. Nach Einbringen von PEX5 in die  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen kann der Import der peroxisomalen Matrixproteine wie in normalen Fibroblastenzellen ablaufen. Ein Import von EGFP-PTS1 in die Peroxisomen konnte nur dann stattfinden, wenn entweder rPEX5L oder rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gleichzeitig mit dem Konstrukt für EGFP-PTS1 in dieselbe Zelle elektroporiert wurden und funktionsfähig waren. Durch die Färbung der Immunfluoreszenzpräparate mit Antikörpern gegen EGFP-PTS1 ( $\alpha$ -AFP) und dem peroxisomalen Membranprotein PEX14 ( $\alpha$ -PEX14) mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern Alexa488 (grün) bzw. Alexa594 (rot) konnte die Lokalisation von EGFP-PTS1 in der Zelle visualisiert werden. EGFP-PTS1 war in der Zelle zytosolisch lokalisiert, wenn keine gleichzeitige Aufnahme von rPEX5L erfolgte, wohingegen EGFP-PTS1 bei gleichzeitiger Anwesenheit von rPEX5L auch peroxisomal vorlag (siehe dazu Abb. 3.19 (AFP/Thiolase) und 3.20 (AFP/PEX14)). Eine numerische Auswertung ergab, dass nach dem ersten Tag 34,2 % der mit rPEX5L elektroporierten Zellen eine Expression von EGFP-PTS1 aufwiesen, davon etwas mehr als die Hälfte der Zellen (53,1 %) komplementiert waren. Am zweiten Tag konnten weniger transfizierte Zellen (27,2 %) beobachtet werden, hingegen stieg die Komplementationsrate auf 57,1 %. Im Unterschied zu den mit rPEX5L elektroporierten Zellen konnte keine Komplementation der  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen mit EGFP-PTS1 durch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) beobachtet werden. Ungefähr ein Drittel der Zellen exprimierten am ersten Tag EGFP-PTS1 (30,1 %), wohingegen EGFP-PTS1 nur in 14,3 % der Zellen am zweiten Tag exprimiert wurde (siehe dazu auch Tabelle 3.1).

In  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen, die mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) elektroporiert wurden, konnte keine peroxisomale Lokalisation und somit keine Komplementation von EGFP-PTS1 beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die *in vitro* Versuche aus 3.2.1.1, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) keine

PTS1-Proteine binden kann.

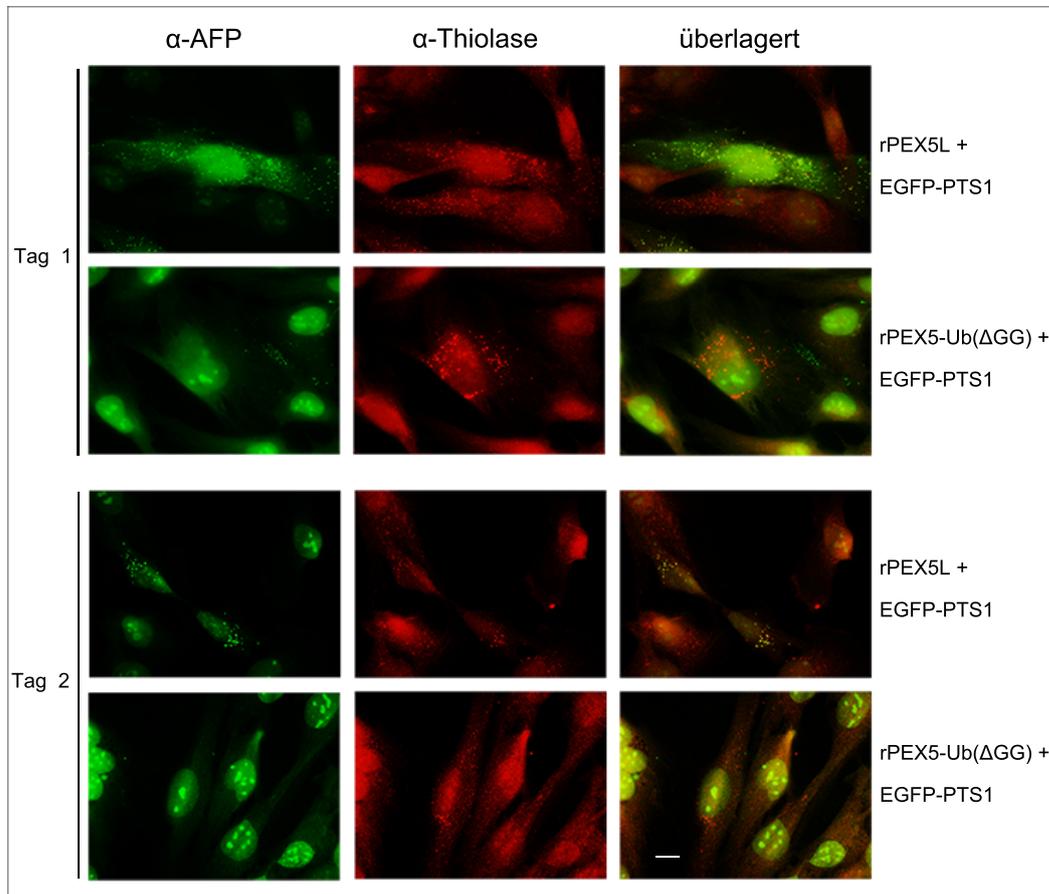


Abbildung 3.19: **Lokalisation von EGFP-PTS1 in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nach Elektroporation mit rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG).**  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen wurden mit dem Plasmid für EGFP-PTS1 und 4  $\mu$ M rPEX5L bzw. 8  $\mu$ M rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bei 1 050 V elektroporiert. Nach einem Tag bzw. zwei Tagen wurden Immunfluoreszenzpräparate angefertigt und die Zellen mit entsprechenden Antikörpern angefärbt. Zur Auswertung der peroxisomalen und zytosolischen Verteilung von EGFP-PTS1 wurden jeweils ungefähr 500 Zellen gezählt. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Ölobjektiv (63x) gemacht. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

Neben dem exogenen EGFP-PTS1-Protein wurde zusätzlich versucht, die Lokalisation eines endogenen PTS1-Proteins zu ermitteln. Hierfür wurde die Katalase als geeigneter Kandidat in Betracht gezogen. Der Versuch war leider nicht erfolgreich, da weder am ersten noch am zweiten Tag nach der Elektroporation die Katalase in den Zellen mit Antikörpern visualisiert werden konnte. In Abwesenheit von PEX5 in PEX5-defizienten Fibroblastenzellen wird die Katalase zwar exprimiert, jedoch abgebaut, wenn diese nicht in die Peroxisomen importiert wird. Durch das Einbringen des peroxisomalen

Matrixproteinrezeptors wird der Abbau der Katalase verhindert. Jedoch könnte nach 24 Stunden die Menge an Katalase zu gering sein, um sie in den Zellen mit Antikörpern sichtbar zu machen. Darüber hinaus muss die Halbwertszeit des eingeführten rekombinanten Proteins PEX5L berücksichtigt werden. Zum Zeitpunkt der Elektroporation hat die Proteinmenge ihr Maximum, anders bei der Elektroporation eines Plasmides, dessen Protein transient exprimiert wird. In Folge dessen kann es zu einer ungünstigen Konstellation kommen, dass die Zeitspanne, bis die Katalase in ausreichenden Mengen vorhanden ist, zu lange dauert und zu diesem Zeitpunkt nicht mehr genügend PEX5 vorhanden ist, um den Import des PTS1-Proteins zu bedienen.

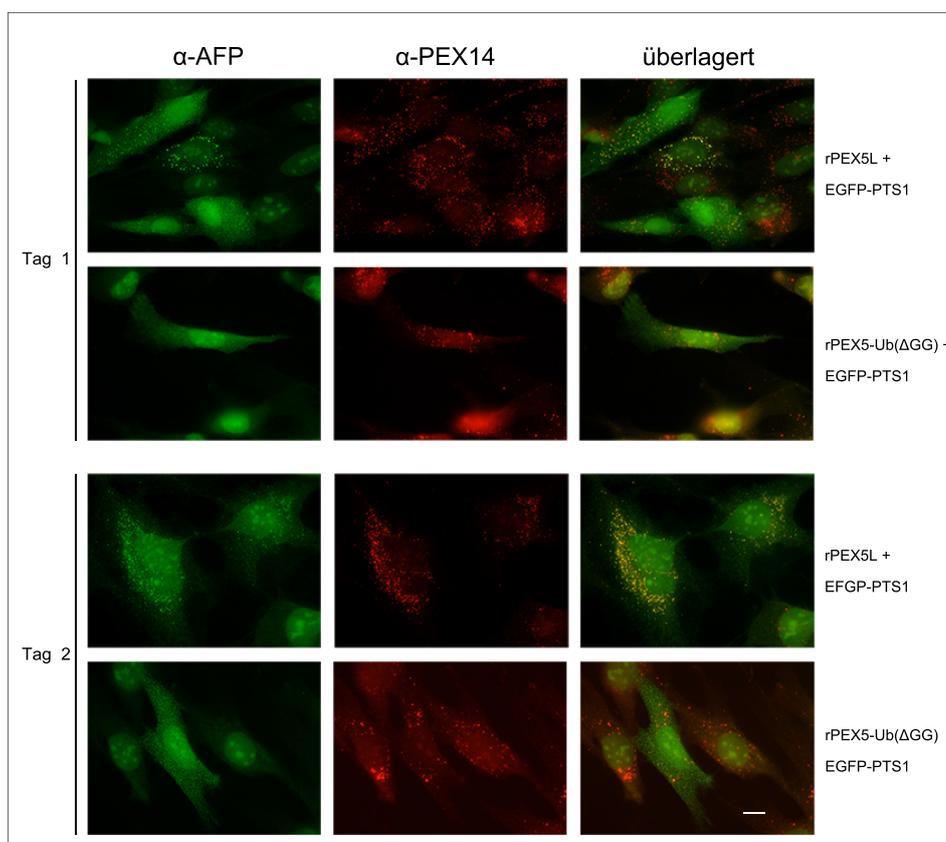


Abbildung 3.20: Lokalisation von EGFP-PTS1 in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nach Elektroporation mit rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG).  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen wurden mit dem Plasmid für EGFP-PTS1 und 4  $\mu$ M rPEX5L bzw. 8  $\mu$ M rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bei 1 050 V elektroporiert. Nach einem Tag bzw. zwei Tagen wurden Immunfluoreszenzpräparate angefertigt und die Zellen mit entsprechenden Antikörpern angefärbt. Zur Auswertung der peroxisomalen und zytosolischen Verteilung von EGFP-PTS1 wurden jeweils ungefähr 500 Zellen gezählt. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Ölobjektiv (63x) gemacht. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

### 3.2.2.2 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) komplementiert $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen für den PTS2-Proteinimport

Die *in vitro* Versuche zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in der Lage ist, mit dem PEX7-PTS2-Proteinkomplex zu interagieren. Es stellte sich nun die Frage, inwiefern rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) *in vivo*  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen für den PTS2-Proteinimport komplementieren kann.

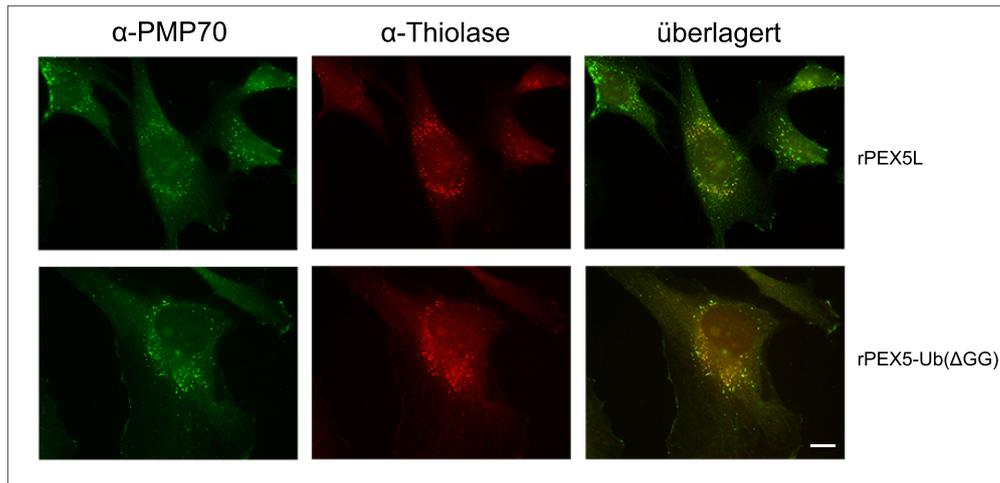


Abbildung 3.21: **Lokalisation der endogenen Thiolase in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen.**  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen wurden mit 4  $\mu$ M rPEX5L bzw. 8  $\mu$ M rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bei 1 050 V elektroporiert. Nach zwei Tagen wurden Immunfluoreszenzpräparate angefertigt und die Zellen mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern angefärbt. Zur Auswertung der peroxisomalen und zytosolischen Verteilung der endogenen Thiolase wurden jeweils ungefähr 500 Zellen gezählt. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Öljektiv (63x) gemacht. Der Balken entspricht 20  $\mu$ m.

Als PTS2-Protein wurde die endogene Thiolase gewählt.  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen wurden entweder mit rPEX5L oder rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) elektroporiert. Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurden Immunfluoreszenzpräparate angefertigt.

Zur Ermittlung der Lokalisation von Thiolase wurden die Präparate mit Antikörpern gegen das peroxisomale Membranprotein PMP70 ( $\alpha$ -PMP70) und dem endogenen PTS2-Protein Thiolase ( $\alpha$ -Thiolase) verwendet und mit entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern Alexa488 (grün) bzw. Alexa594 (rot) visualisiert. Am zweiten Tag konnten 32,4 % der mit rPEX5L elektroporierten Zellen eine peroxisomale Lokalisation der Thiolase verzeichnen. Im Vergleich dazu konnte rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in 11,3 % der Zellen die Thiolase wieder in die peroxisomale Matrix importieren (siehe auch Abb. 3.21 und Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: **Komplementationsraten für den PTS1- und PTS2-Proteinimport in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen.** Komplementationsraten für den PTS1- und PTS2-Proteinimport nach Elektroporation mit rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen.

	PTS1-Import (EGFP-PTS1)	PTS2-Import (Thiolase)
rPEX5L	53-57 %	32 %
rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)	-	11 %

Die hier gewonnenen *in vivo* Erkenntnisse sind mit den vorangegangenen Ergebnissen aus der *in vitro* Interaktionsstudie konform. Diese zeigen, dass rPEX5L voll funktionsfähig ist und sowohl an PTS1-Proteine binden und als auch mit dem PEX7-PTS2-Proteinkomplex interagieren kann. Eine Komplementation mit PTS1- und PTS2-Proteinen konnte in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu rPEX5L ist rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nur teilweise funktionsfähig. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann eine Interaktion mit dem PEX7-PTS2-Proteinkomplex eingehen, jedoch nicht an PTS1-Proteine binden. Eine Komplementation in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen konnte dementsprechend nur für PTS2-Proteine beobachtet werden. In Tabelle 3.1 sind die Komplementationsraten für den PTS1- und den PTS2-Proteinimport nochmals zusammengefasst

### 3.2.2.3 Abbau von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nach Elektroporation in $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, dass die elektroporierten rekombinanten Proteine PEX5L und PEX5-Ub( $\Delta$ GG) weiterhin die Fähigkeit aufweisen, das Fehlen des endogenen PEX5 in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen zumindest teilweise zu kompensieren. Jedoch kann die Menge an PEX5 ab dem Zeitpunkt der Elektroporation nicht mehr vermehrt werden. Es kommt infolgedessen mit der Zeit zu einem Abbau der rekombinanten Proteine. Zur Überprüfung, inwiefern diese Proteine nach Elektroporation noch intakt sind, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden nach einem Tag und nach zwei Tagen die mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) elektroporierten  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen geerntet. Je Zellextrakt wurden 20  $\mu$ g Gesamtprotein auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Zum Nachweis von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in den Extrakten wurde ein Antikörper gegen PEX5 ( $\alpha$ -PEX5) verwendet. Als Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Protein MAP-Kinase (MAPK), das mit entsprechenden Antikörpern ( $\alpha$ -MAPK) detektiert werden konnte (siehe Abb. 3.22).

Bereits nach einem Tag ist weniger rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) als rPEX5L in den Zellen nachzuweisen. Im Vergleich dazu nahm am zweiten Tag auch die Menge an rPEX5L in den Zellen um 50 % deutlich ab, rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) konnte fast nicht mehr nachgewiesen

werden.

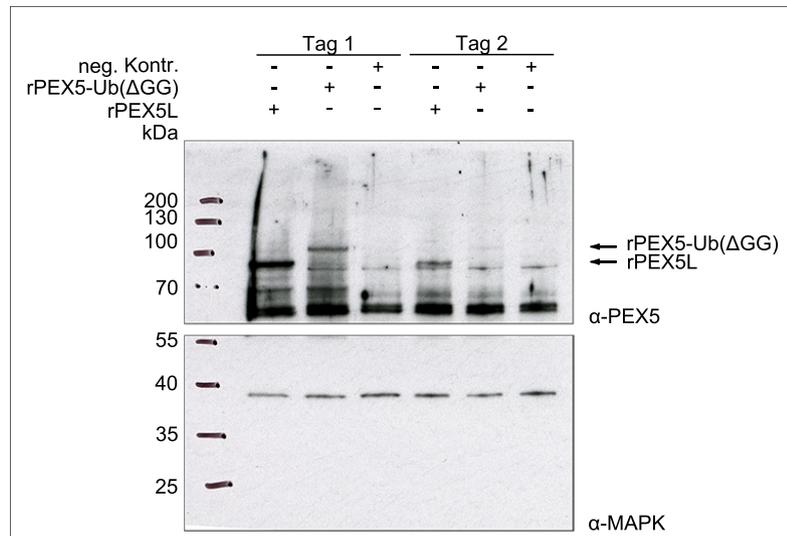


Abbildung 3.22: **Abbau der rekombinanten Proteine in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen.**

$\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen wurden mit  $4 \mu\text{M}$  rPEX5L bzw.  $8 \mu\text{M}$  rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) bei  $1\ 050\ \text{V}$  elektroporiert. Nach einem Tag bzw. zwei Tagen wurden Proteinpellets angefertigt und jeweils  $20\ \mu\text{g}$  Gesamtprotein auf einem  $10\ \%$ -igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis von PEX5 erfolgte mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit (1:15 000). Als Ladekontrolle wurde die MAP-Kinase (MAPK) verwendet. Der Nachweis erfolgte mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -MAPK (1:2 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse (1:15 000). Die Detektion der Antikörper erfolgte unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“. Die Expositionszeit des Filmes betrug 45 Minuten. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der „FusionCapt Advance“ Software.

In der negativen Kontrolle kann weder am ersten noch am zweiten Tag PEX5 detektiert werden. Dies bestätigt die Abwesenheit von endogenem PEX5 in der PEX5-defizienten Zelllinie. Ein Grund für eine schnellere Degradation von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) könnte die Markierung mit Ubiquitin sein, die zum proteosomalen Abbau führen kann, obwohl es sich nicht um eine klassische poly-Ubiquitinierung handelt.

### 3.2.2.4 Import von Thiolase in die Peroxisomen im Importassay

In den vorherigen Immunfluoreszenzversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Einbringen von rPEX5L in PEX5-defiziente Fibroblastenzellen der PTS1- und PTS2-Proteinimport wieder hergestellt werden konnte. Im Unterschied dazu konnte rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen nur den PTS2-Proteinimport in die Peroxiso-

men bewerkstelligen. Diese teilweise Funktionalität von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bezüglich des Proteinimportes sollte im Folgenden anhand eines Importassays überprüft werden. Hierfür wurde zunächst ein einfacher Importassay etabliert, der zeigen sollte, dass PEX5 in die peroxisomale Membran integriert werden kann. Dazu wurde ein post-nukleärer Überstand (post-nuclear supernatant, PNS) aus Mausleber verwendet. Ein Ansatz des Importassays enthielt nur PNS, der als Kontrolle diente. Um die Menge an endogenem PEX5 in der peroxisomalen Membran zu reduzieren, wurden die Ansätze teilweise mit 1 mM ATP versetzt und für 15 Minuten bei 26 °C inkubiert. Der Export von PEX5 ist energieabhängig und wird durch die Peroxine PEX1, PEX6 und PEX26 des Exportkomplexes bewerkstelligt [Oliveira et al., 2003, Matsumoto et al., 2003a].

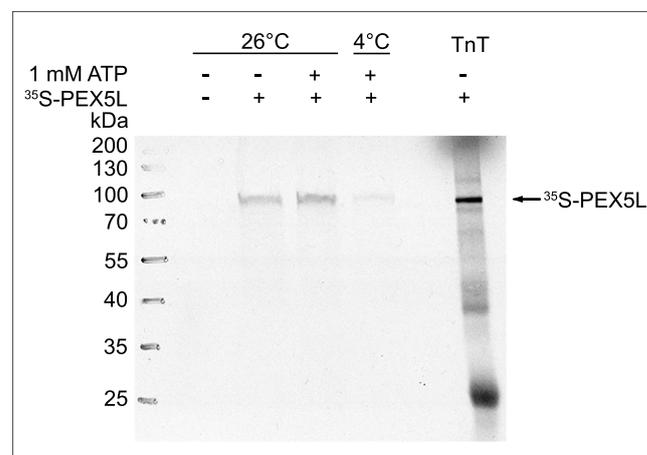


Abbildung 3.23: **Importassay mit <sup>35</sup>S-PEX5L**. Importassay mit PNS (post-nukleärer Überstand) aus Mausleber, dem 1  $\mu$ L <sup>35</sup>S-PEX5L und teilweise 1 mM ATP hinzugefügt wurde. Die Importreaktion erfolgte für 20 Minuten bei 26 °C, die negative Kontrolle wurde bei 4 °C inkubiert. Nach Protease K-Behandlung wurden die gesamten Proben und 25 % der TnT-Reaktion auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Expositionszeit des Autoradiographiefilmes betrug zwei Tage.

Nach der Vorinkubation mit ATP wurde den Ansätzen <sup>35</sup>S-PEX5L, das zuvor durch eine TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und durch Einbau von <sup>35</sup>S-Met radioaktiv markiert wurde, hinzugegeben. Die Importreaktion konnte während der 20-minütigen Inkubation bei 26 °C ablaufen. Die negative Kontrolle, bei der kein Import erfolgen sollte, wurde bei 4 °C durchgeführt. Die anschließende Zugabe von Proteinase K bewirkte eine vollständige Degradation aller Proteine, die nicht in die Organellen transportiert wurden oder durch die Membran geschützt sind. Demzufolge bleiben nur proteasegeschützte Proteine intakt, die später nachgewiesen werden können.

<sup>35</sup>S-PEX5L wird nach erfolgter Importreaktion proteasegeschützt in die peroxisomale Membran inseriert (Abb. 3.23). Weiterhin kann ein leichter Anstieg von <sup>35</sup>S-PEX5L nach vorheriger Inkubation mit 1 mM ATP in die peroxisomale Membran beobachtet

werden. Das bedeutet, dass durch die zusätzliche Anwesenheit von ATP mehr endogenes PEX5 aus der peroxisomalen Membran durch die AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 gezogen werden kann. Im Zuge dessen wird mehr exogenes  $^{35}\text{S}$ -PEX5L in die Membran inseriert. Auch ist zu sehen, dass eine Abnahme des Importes erfolgt, wenn dieser bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt wird. Es konnte in Versuchen von Azevedo und Mitarbeitern gezeigt werden, dass der Import von peroxisomalen Matrixproteinen und somit auch die einhergehende Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran temperaturabhängig ist [Costa-Rodrigues et al., 2004]. Bei einer Importtemperatur von 16 °C konnte im Vergleich zu 26 °C und 37 °C ein deutlicher Rückgang verzeichnet werden. Im Allgemeinen findet bei Temperaturen um 4 °C keine Enzymaktivität mehr statt, des Weiteren ist die Bewegung der Lipide in der Membran erheblich eingeschränkt.

Im nächsten Schritt soll geklärt werden, inwiefern sich die rekombinanten Proteine rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die peroxisomale Membran integrieren lassen. Hierfür wurde erneut ein Importassay angewendet, wie er bereits oben beschrieben wurde. Zu dem PNS wurde teilweise 1 mM ATP hinzugefügt und für 15 Minuten bei 26 °C inkubiert. Nach der Vorinkubation mit ATP wurde den Ansätzen  $^{35}\text{S}$ -PEX5L, sowie die rekombinanten Proteine rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in einer Überschusskonzentration von 0,25  $\mu\text{M}$  hinzugefügt und für weitere 20 Minuten bei 26 °C inkubiert.

Ein Überschuss der rekombinanten Proteine sollte eine massive Konkurrenz zum  $^{35}\text{S}$ -PEX5L und dem endogenen PEX5 bewirken und somit die Möglichkeit eines Importes beider Proteine blockieren. Anschließend erfolgte abermals die Zugabe von Proteinase K.

Zunächst konnte nach der Vorinkubation des PNS mit 1 mM ATP erneut eine leichte Zunahme des exogenen  $^{35}\text{S}$ -PEX5L-Levels verzeichnet werden (Abb. 3.24  $^{35}\text{S}$ -PEX5L), wie bereits schon im vorherigen Versuch gezeigt werden konnte (Abb. 3.23). Jedoch wird kaum  $^{35}\text{S}$ -PEX5L in die peroxisomale Membran inseriert, nachdem zu den Ansätzen entweder rPEX5L oder rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im massiven Überschuss hinzugegeben wurde. Demnach konnten nur noch 4 % bzw. 13 % von  $^{35}\text{S}$ -PEX5L nach Zugabe von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die peroxisomale Membran inseriert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die rekombinanten Proteine mit dem  $^{35}\text{S}$ -PEX5L und vermutlich auch mit dem endogenen PEX5 in direkter Konkurrenz in Bezug auf den Import stehen.

Untersuchungen zeigen, dass eine Insertion des Matrixproteinrezeptors in die peroxisomale Membran nur nach Bindung an sein Cargo erfolgen kann [Gouveia et al., 2000, Gouveia et al., 2003b, Costa-Rodrigues et al., 2004]. Aufgrund der Tatsache, dass kaum  $^{35}\text{S}$ -PEX5L nach Zugabe von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu detektieren ist, legt dies die Vermutung nahe, dass die rekombinanten Proteine mit den im PNS vorhandenen PTS1- bzw. PTS2-Proteinen und entsprechenden Kofaktoren interagieren können. Ein somit entstandener Cargo-Rezeptorkomplex kann im nächsten Schritt einen initialen Kontakt mit dem Dockingprotein PEX14 eingehen. Ein massiver Überschuss der rekombinanten Proteine hat somit eine Abnahme von importfähigen  $^{35}\text{S}$ -PEX5L zur Folge und kann die Reduktion der  $^{35}\text{S}$ -PEX5L Banden erklären. Mit

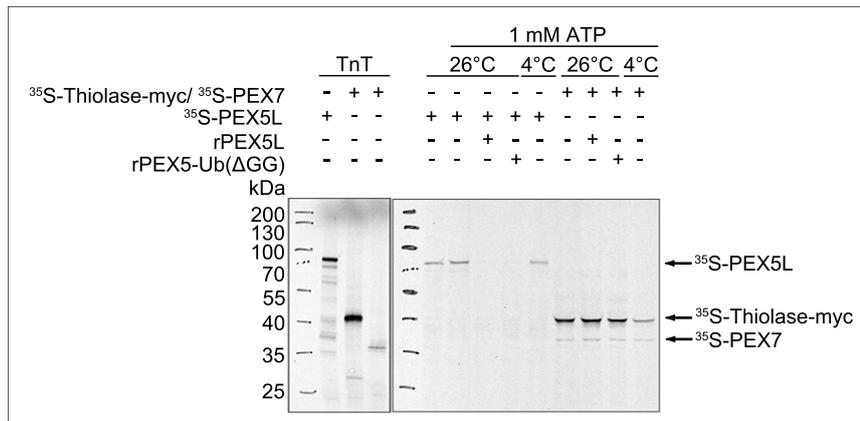


Abbildung 3.24: **Importassay mit <sup>35</sup>S-PEX5L und <sup>35</sup>S-Thiolase/<sup>35</sup>S-PEX7.** Für jede Importreaktion wurde 300  $\mu$ g PNS (post-nukleärer Überstand) aus Mausleber eingesetzt und mit 1 mM ATP im Importpuffer für 15 Minuten bei 26 °C vorinkubiert. Die Proteine PEX5L, Thiolase-myc und PEX7 wurden mittels einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und mit <sup>35</sup>S-Met markiert. Von den mit <sup>35</sup>S-Met markierten Proteinen wurden jeweils 1  $\mu$ L und von den rekombinanten Proteinen jeweils 0,25  $\mu$ M zu den Ansätzen hinzugegeben und für 20 Minuten bei 26 °C bzw. 4 °C inkubiert. Es folgte eine Proteinase K-Behandlung für fünf Minuten auf Eis. Die gesamten Proben und 25 % der TnT-Reaktion wurden auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Expositionszeit des Autoradiographiefilmes betrug vier Tage. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der „FusionCapt Advance“ Software.

diesem Importassay lässt sich jedoch nicht klären, ob eine Insertion der rekombinanten Proteine in die peroxisomale Membran tatsächlich erfolgt ist und eine Translokation des Cargos stattgefunden hat. Eine Detektion der Proteine kann nur erfolgen, wenn diese radioaktiv markiert sind, das nur für <sup>35</sup>S-PEX5L der Fall ist. Ein Nachweis mit Antikörpern gegen PEX5 kann keine nähere Erkenntnis bringen, da diese sowohl das endogene PEX5, als auch <sup>35</sup>S-PEX5L, rPEX5L und rPEX5-Ub(ΔGG) erkennen können. Der Importassay zeigt, dass die Proteine prinzipiell miteinander um die Importbereitschaft konkurrieren und vermutlich ein Docking an der peroxisomalen Membran stattfindet. Dies spiegelt sich in der Reduktion von <sup>35</sup>S-PEX5L wider.

Um zu klären, ob rPEX5L bzw. rPEX5-Ub(ΔGG) tatsächlich in die peroxisomale Membran integriert werden und PTS1-bzw. PTS2-Proteine ins Peroxisom importieren können, wurde eine weitere Importreaktion angewendet. Die Durchführung wurde bereits vorher beschrieben. Jedoch wurde in diesem Versuch statt des <sup>35</sup>S-PEX5Ls <sup>35</sup>S-Thiolase-myc und <sup>35</sup>S-PEX7 hinzugefügt (Abb. 3.24 <sup>35</sup>S-Thiolase-myc und <sup>35</sup>S-PEX7). Nach Zugabe von rPEX5L im massiven Überschuss konnte keine Reduktion von importiertem <sup>35</sup>S-PEX7 bzw. <sup>35</sup>S-Thiolase-myc festgestellt werden. Nach Zugabe von rPEX5-Ub(ΔGG) war der Import von <sup>35</sup>S-PEX7 und <sup>35</sup>S-Thiolase-myc um ca. 20 % reduziert. Dies legt die Vermutung nahe, dass rPEX5-Ub(ΔGG) zumindest so weit in die pero-

xisomale Membran integriert werden kann, dass ein Import von sowohl  $^{35}\text{S}$ -PEX7 als auch  $^{35}\text{S}$ -Thiolase möglich ist. Bei der Importreaktion bei 4 °C wurde sehr viel weniger  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc importiert.

Der Importassay zeigt, dass durch die Zugabe der rekombinanten Proteine rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) eine Konkurrenz zum  $^{35}\text{S}$ -PEX5L in Bezug auf die Matrixproteine entsteht. Das PTS2-Protein Thiolase-myc kann in die Peroxisomen importiert werden und ist vor der Proteaseaktivität geschützt. Der Importassay und die *in vivo* Komplementationsversuche zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) den PTS2-Proteinimportweg bedienen kann.

### 3.2.3 rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) und die peroxisomale Exportmaschinerie

rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) ist in der Lage, den PEX7-PTS2-Proteinkomplex zu binden und die PTS2-Proteine in die Peroxisomen zu importieren. Dies lässt darauf schließen, dass rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) in die peroxisomale Membran inseriert wird. Die nächsten Schritte im Verlauf des Rezeptor-Recyclings umfassen die mono-Ubiquitinierung durch die RING-Finger-Proteine und der anschließende Export von mUb-PEX5 aus der Membran. Bisher konnten noch keine Interaktionen zwischen dem mUb-PEX5 und dem Exportkomplex, der aus dem membranverankerten PEX26 und den AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 besteht, nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, inwieweit rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) in der Lage ist, mit PEX1, PEX6 und PEX26 zu interagieren, wurde ein Pull-down Versuch entwickelt. Zunächst wurden die rekombinanten Proteine PEX5L und PEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) durch ihren N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag an magnetische Nickel-NTA-Beads gekoppelt.

Zur Untersuchung möglicher Interaktionen mit den Exportproteinen wurden die AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 einzeln und als Komplex (PEX1/PEX6), sowie das membranverankerte PEX26 zusammen im Komplex mit PEX19 (PEX19/PEX26) hinzugegeben. Die Zugabe von PEX19 bewirkt die Stabilisierung peroxisomaler Membranproteine während ihrer Synthese, da PEX19 sowohl als peroxisomaler Membranproteinrezeptor als auch Chaperon fungiert.

Diese Proteine wurden mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und durch Einbau von radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Nach der Expression wurden die  $^{35}\text{S}$ -Proteine zu den Nickel-NTA-Beads hinzugefügt und in Gegenwart von  $\Delta\text{PEX5}$ -Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Verwendung von  $\Delta\text{PEX5}$ -Fibroblastenzytosol hat den Vorteil, dass mögliche, unbekannte Faktoren vorhanden sind, die eine Interaktion erst ermöglichen. Durch die Abwesenheit von endogenem PEX5 entfällt die Konkurrenz zu den rekombinanten PEX5-Proteinen. Für eine Analyse durch eine Autoradiographie wurden die gebundenen Fraktionen (Eluate) verwendet (Abb. 3.25, A).

#### 3.2.3.1 rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) bindet an PEX26

Deutlich sichtbar ist die Fähigkeit beider rekombinanter Proteine an  $^{35}\text{S}$ -PEX26, jedoch nicht an  $^{35}\text{S}$ -PEX19 zu binden (Abb. 3.25, A). Für einen nicht-dissoziierten  $^{35}\text{S}$ -

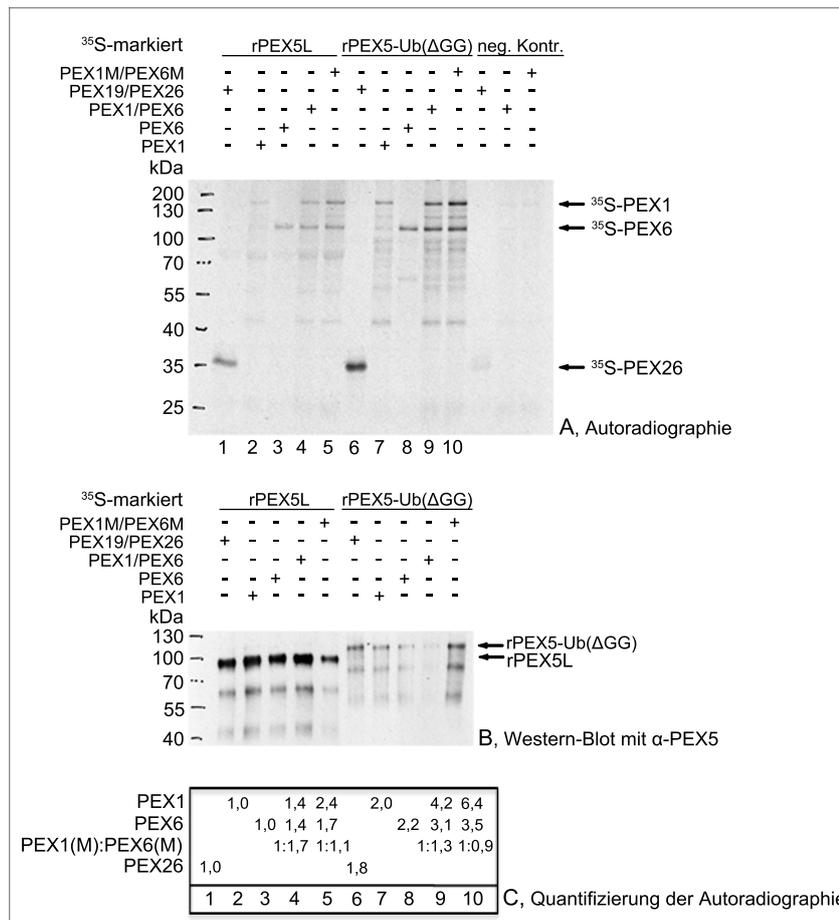


Abbildung 3.25: **Pull-down Versuch mit den Exportproteinen.** A) Autoradiographie des Pull-down Versuches mit den Exportproteinen PEX1, PEX6 und PEX26, die mittels einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und durch Einbau von <sup>35</sup>S-Met markiert wurden. Jeweils 40 μL Nickel-NTA-Beads wurden mit 7 μg rPEX5L bzw. 14 μg rPEX5-Ub(ΔGG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Die Translationsansätze (<sup>35</sup>S-PEX1, <sup>35</sup>S-PEX6 und <sup>35</sup>S-PEX19/PEX26 jeweils 20 μL und <sup>35</sup>S-PEX1(M)/PEX6(M) jeweils 40 μL) wurden zu den gekoppelten Nickel-NTA-Beads hinzugefügt. Zusammen mit ΔPEX5-Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP wurden die Ansätze für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Von den Eluaten wurden jeweils 50 % auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Expositionszeit des Autoradiographiefilmes betrug vier Tage. B) Nachweis von PEX5 mittels Western Blot. Es wurden 2,85 % der Eluate auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion von PEX5 erfolgte mit dem Primärantikörper α-PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper α-rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“. C) Quantifizierung der Banden erfolgte mit der „FusionCapt Advance“ Software.

PEX19/PEX26-Komplex siehe Abb. 3.28). Der  $^{35}\text{S}$ -PEX19/PEX26-Komplex dissoziiert vermutlich durch die Bindung von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) an PEX26 vollständig. Möglicherweise konkurrieren rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) mit PEX19 um die gleiche Bindungsstelle in PEX26 und bewirken das Loslösen von PEX19 in Gegenwart von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ). Die Bindung von  $^{35}\text{S}$ -PEX26 an rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) ist deutlich höher wie die an rPEX5L (Abb. 3.25, C). Eine Interaktion zwischen mUb-PEX5 und PEX26 wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und konnte anhand des Pull-down Versuches erstmals gezeigt werden.

### **3.2.3.2 rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) bindet an die Exportmaschinerie besser als rPEX5L**

Ein Vergleich aller Proteine der Exportmaschinerie (PEX1, PEX6, PEX26) zeigt, dass rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) insgesamt eine deutlich bessere Interaktion mit den Exportproteinen eingehen kann als rPEX5L (Abb. 3.25). Dies ist deutlich anhand der höheren Intensität der Banden erkennbar. Das trifft sowohl für PEX26, PEX1 und PEX6 als auch für die Mutanten PEX1Y914A (PEX1M) und PEX6Y777A (PEX6M) zu. Auf PEX1Y914A und PEX6Y777A wird später in Kapitel 3.2.7 eingegangen.

### **3.2.3.3 Der PEX1/PEX6-Komplex bindet an rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) besser als PEX1 und PEX6 einzeln**

Es ist ebenfalls deutlich erkennbar, dass sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) mit den einzelnen AAA-ATPasen  $^{35}\text{S}$ -PEX1 und  $^{35}\text{S}$ -PEX6 als auch mit dem  $^{35}\text{S}$ -PEX1/PEX6-Komplex interagieren können. Beide rekombinanten Proteine binden  $^{35}\text{S}$ -PEX6 besser als  $^{35}\text{S}$ -PEX1. Insgesamt ist auch hier erkennbar, dass rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) wesentlich besser im Unterschied zu rPEX5L sowohl an  $^{35}\text{S}$ -PEX1 als auch an  $^{35}\text{S}$ -PEX6 binden kann (Abb. 3.25).

Auffallend ist, dass der  $^{35}\text{S}$ -PEX1/PEX6-Komplex jeweils besser an rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) binden kann als die einzelnen Proteine  $^{35}\text{S}$ -PEX1 und  $^{35}\text{S}$ -PEX6.

Ein Vergleich des  $^{35}\text{S}$ -PEX1/PEX6-Komplex-Verhältnisses zeigt, dass dieser bei Bindung an rPEX5L in einem Verhältnis PEX1:PEX6 1:1,7 vorliegt und ein 1:1,3 Verhältnis in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) aufweist. PEX6 enthält in Relation zu PEX1 in seiner Primärstruktur wesentlich weniger Methionine. Der Anteil an Methionin in PEX6 beläuft sich auf 1,1 %, wohingegen in PEX1 der Anteil bei 1,8 % liegt. Trotz des geringeren Anteils an Methionin in PEX6 kann eine bessere Bindung an rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) beobachtet werden.

Zusätzlich wurde ein Western Blot zum Nachweis der Kopplung von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) an die Nickel-NTA-Beads durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 200 ng der rekombinanten Proteine aus den Eluatfraktionen verwendet. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen PEX5 (Abb. 3.25, B). Der Western Blot zeigt, dass mehr rPEX5L als rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) detektiert wird. Die Bindung an die Nickel-NTA-Beads erfolgt über den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag der rekombinanten Proteine. Möglicherweise ist die Bindeeigenschaft von rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) an die Nickel-NTA-Beads durch die N-terminale Modifizierung mit Ubiquitin beeinträchtigt. Eine weitere Möglichkeit be-

steht in einem Abbau von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG). Die Inkubation der Ansätze erfolgte für zwei Stunden bei 30 °C in Anwesenheit von  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzytosol. Das Zytosol beinhaltet viele Faktoren, die eine Instabilität und somit einen Abbau von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) fördern könnten.

Da vorher ein Konzentrationsvergleich von beiden rekombinanten Proteinen auf einem SDS-Gel anhand einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung stattgefunden hatte, kann ausgeschlossen werden, dass rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Nickel-NTA-Beads hinzugegeben wurde. Weshalb der Nachweis von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in diesem Western Blot nicht so gut funktioniert hat, kann nicht geklärt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus dem Pull-down Versuch mit den Exportproteinen, dass sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an PEX1, PEX6 und PEX26 binden können. Es konnte zudem erstmalig gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) PEX26 *in vitro* binden kann. Des Weiteren geht aus dem Versuch hervor, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5L deutlich besser an die Exportproteine binden kann.

### 3.2.4 Die rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bindung zu PEX14 ist durch die Exportproteine nicht beeinträchtigt

Die bisherigen Erkenntnisse zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) den PTS2-Proteinimportweg aufrechterhalten und im späteren Verlauf mit den Exportproteinen interagieren kann. Diese Fähigkeit impliziert eine Interaktion mit dem Dockingkomplex PEX13/PEX14. Zur Überprüfung, ob diese Bindung mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gezeigt werden kann, wurde erneut ein Pull-down Versuch, wie zuvor mit den Exportproteinen (siehe Kapitel 3.2.3) beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurden Nickel-NTA-Beads mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Die mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimierten Peroxin-Komplexe  $^{35}$ S-PEX1/PEX6,  $^{35}$ S-PEX19/PEX26 wurden einzeln oder zusammen mit  $^{35}$ S-PEX14 zu den gekoppelten Nickel-NTA-Beads hinzugefügt. In einem weiteren Ansatz wurde  $^{35}$ S-PEX13 zu den gekoppelten Nickel-NTA-Beads gegeben. Die Translationsansätze wurden zusammen mit dem  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Elution mit einem Imidazol-Elutionspuffers konnten die gebundenen Fraktionen (Eluate) mit Hilfe einer Autoradiographie analysiert werden (Abb. 3.26 A).

#### 3.2.4.1 Die Dockingproteine PEX13 und PEX14 binden sowohl an rPEX5L als auch an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Aus dem Pull-down Versuch geht deutlich hervor, dass sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in der Lage sind, an die Proteine des Dockingkomplexes PEX14 und PEX13 zu binden (Abb. 3.26, A). Die  $^{35}$ S-PEX13-Bindung an rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist im Vergleich zu  $^{35}$ S-PEX14 jedoch deutlich schwächer.

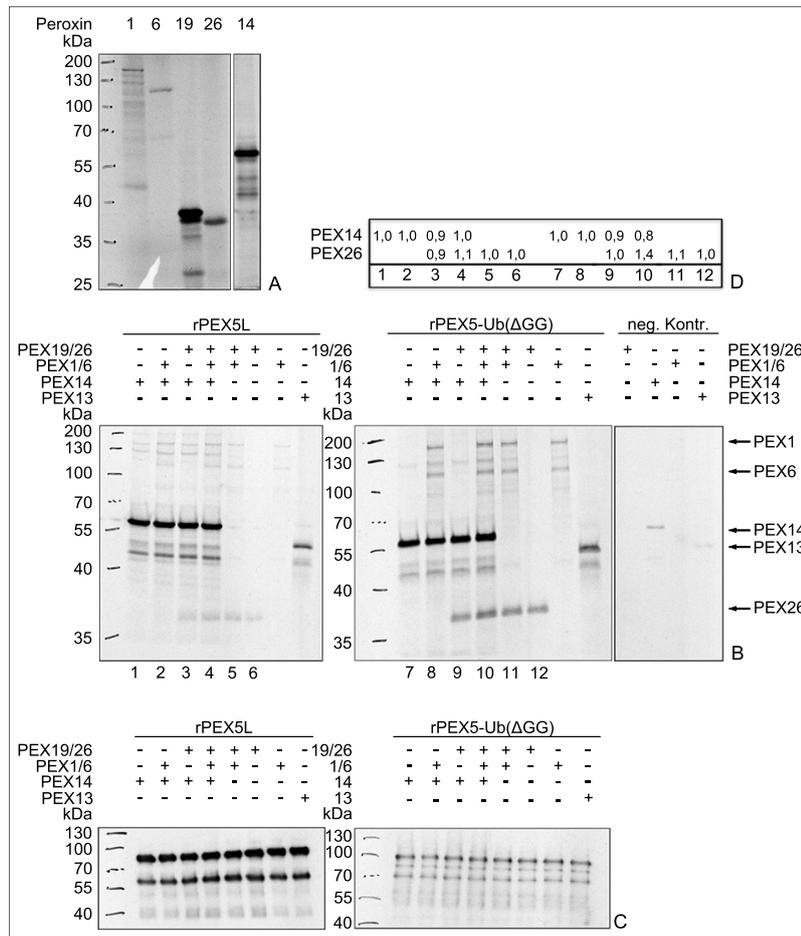


Abbildung 3.26: **Pull-down Versuch mit den Docking- und Exportproteinen.** A) TnT-Reaktionen der einzelnen Peroxine. Es wurden jeweils 25 % der TnT-Reaktion auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. B) Autoradiographie des Pull-down Versuches mit den Docking- und Exportproteinen. Jeweils 40  $\mu$ L Nickel-NTA-Beads wurden mit 7  $\mu$ g rPEX5L bzw. 14  $\mu$ g rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Die Proteine PEX1, PEX6, PEX13, PEX14, PEX19 und PEX26 wurden mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und durch Einbau von  $^{35}$ S-Met markiert. Die Translationsansätze ( $^{35}$ S-PEX14 jeweils 10  $\mu$ L,  $^{35}$ S-PEX13 und  $^{35}$ S-PEX19/PEX26 jeweils 20  $\mu$ L und  $^{35}$ S-PEX1/PEX6 jeweils 40  $\mu$ L) wurden zu den gekoppelten Nickel-NTA-Beads hinzugefügt und zusammen mit  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Von den Eluaten wurden jeweils 50 % auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Expositionszeit des Autoradiographiefilmes betrug vier Tage. C) Nachweis von PEX5 mittels Western Blot. Es wurden 2,85 % der Eluate auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion von PEX5 erfolgte mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“. Die Expositionszeit des Filmes betrug eine Minute. D) Quantifizierung der PEX14- und PEX26-Banden aus B). Die Quantifizierung erfolgte mit der „FusionCapt Advance“ Software für beide Gele einzeln.

### 3.2.4.2 Die PEX14-Bindung zu rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wird durch den Exportkomplex nicht beeinflusst

Das peroxisomale Membranprotein PEX14 stellt den initialen Kontakt zum Peroxisom mit Cargo-beladenem PEX5 her. PEX14 ermöglicht vermutlich PEX5, sich in die peroxisomale Membran zu inserieren. Infolgedessen kann eine Freilassung des Cargos in die peroxisomale Matrix erfolgen. Da bisher noch nicht bekannt ist, inwiefern sich das Bindungsverhalten von PEX5 zu PEX14 im Verlauf des Exportes ändert, wurden einige Kombinationsmöglichkeiten *in vitro* mit den Exportproteinen getestet (Abb. 3.26, A).  $^{35}$ S-PEX14 wurde allein oder zusammen mit  $^{35}$ S-PEX1/PEX6 bzw.  $^{35}$ S-PEX19/PEX26 oder mit beiden Komplexen für zwei Stunden bei 30 °C nach Zugabe von  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP mit den Nickel-NTA-Beads inkubiert.

Die gebundene Menge an  $^{35}$ S-PEX14 zu rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bleibt nahezu unverändert, unabhängig von der Anwesenheit von  $^{35}$ S-PEX1/PEX6 oder  $^{35}$ S-PEX19/PEX26 oder beiden Komplexen (siehe auch 3.26, D).

### 3.2.4.3 Die PEX26-Bindung an rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nimmt in Anwesenheit von PEX14 und PEX1/PEX6 zu

Zusätzlich wurde untersucht, inwiefern PEX14 und PEX1/PEX6 einen Einfluss auf die Bindung von PEX26 haben. Es kann mehr  $^{35}$ S-PEX26 an rPEX5L bzw. rPEX5L-Ub( $\Delta$ GG) gekoppelte Nickel-NTA-Beads gebunden werden, wenn gleichzeitig  $^{35}$ S-PEX1/PEX6 und  $^{35}$ S-PEX14 anwesend sind. Dies lässt die Vermutung zu, dass  $^{35}$ S-PEX26 sowohl an rPEX5L- bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) als auch gleichzeitig an den  $^{35}$ S-PEX1/PEX6-Komplex bzw. an  $^{35}$ S-PEX14 binden kann. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass PEX26 und PEX6 über ihre jeweiligen N-Termini eine Interaktion eingehen [Matsumoto et al., 2003b]. Dies kann den minimalen Anstieg von  $^{35}$ S-PEX26 bei gleichzeitiger Anwesenheit von  $^{35}$ S-PEX1/PEX6 erklären. Eine weitere Erklärung wäre die PEX26-PEX14-Interaktion, die erst kürzlich von Fujiki und Mitarbeitern gezeigt werden konnte [Tamura et al., 2014].

Insgesamt wird auch hier deutlich, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wesentlich besser an  $^{35}$ S-PEX26 und an den  $^{35}$ S-PEX1/PEX6-Komplex binden kann.

Zusätzlich wurde ein Western Blot durchgeführt, um zu überprüfen, ob rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an die Nickel-NTA-Beads gekoppelt wurden. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern gegen PEX5 (Abb. 3.26, B). Auch hier ist erneut deutlich zu erkennen, dass weitaus weniger rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5L nachgewiesen werden konnte.

Dieser Pull-down Versuch mit den Docking- und Exportproteinen erlaubt mehrere Aussagen. Erstens können sowohl PEX13 als auch PEX14 an rPEX5L und an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) binden, wobei die PEX13-Bindung im Vergleich zur PEX14-Bindung schwächer ist. Zweitens wird die Bindung von PEX14 an rPEX5L und

rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) durch die Anwesenheit der Exportproteine nicht beeinflusst. Dies legt die Vermutung nahe, dass die peroxisomalen Membranproteine PEX14 und PEX26, sowie der AAA-ATPase-Komplex PEX1/PEX6 über unterschiedliche Domänen an rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) binden können. Die Interaktionen wurden weder signifikant positiv noch negativ beeinflusst. Drittens nimmt die Bindung von PEX26 an rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu, wenn PEX1/PEX6 oder PEX14 und PEX1/PEX6 anwesend sind.

Der Versuch zeigt, dass es Unterschiede in den Interaktionen von Exportproteinen und rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gibt. Allerdings wird auch deutlich, dass es noch einen weiteren Faktor geben muss, der die Dissoziation von mUb-PEX5 und dem peroxisomalen Import-Export-Komplex triggert, da keine signifikanten Änderungen hinsichtlich der Interaktionen untereinander beobachtet werden konnten.

### 3.2.5 PEX14 bindet an PEX26

Im Pull-down Versuch mit PEX14 und den Exportproteinen (siehe dazu Kapitel 3.2.4) konnte gezeigt werden, dass PEX14 in der Lage ist, gleichermaßen an rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu binden. In der Literatur wurde kürzlich eine mögliche Interaktion von PEX14 mit PEX26 beschrieben [Tamura et al., 2014]. Aus den vorherigen Pull-down Versuchen geht jedoch nicht hervor, inwiefern sich in Gegenwart von rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine mögliche PEX14-PEX26 Interaktion ändern kann. Um dies zu testen wurde eine Koimmunpräzipitation konzipiert. Magnetische Dynabeads wurden vorab mit Antikörpern gegen PEX26 gekoppelt. PEX14 und der PEX19/PEX26-Komplex wurden *in vitro* mit Hilfe einer TnT-Reaktion exprimiert und durch den Einbau von  $^{35}$ S-Met markiert. Beide Translationsansätze wurden zu den Dynabeads gegeben und entweder mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder keinem der beiden rekombinanten Proteine inkubiert. Als negative Kontrolle wurde nur  $^{35}$ S-PEX14 zu den mit  $\alpha$ -PEX26 gekoppelten Dynabeads gegeben. Die Ansätze wurden mit Bindungspuffer und zusätzlichen 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Die gebundenen Fraktionen (Euate) wurden mittels einer Autoradiographie analysiert (Abb. 3.27, A). Die Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -PEX26 zeigt, dass  $^{35}$ S-PEX14 an  $^{35}$ S-PEX26 binden kann. Der  $^{35}$ S-PEX19/PEX26-Komplex ist nach Zugabe von  $^{35}$ S-PEX14 dissoziiert. Dies konnte bereits in den vorherigen Pull-down Versuchen beobachtet werden. Nach Zugabe von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist die Bindung von  $^{35}$ S-PEX14 an  $^{35}$ S-PEX26 um 10 % im Vergleich zu rPEX5L erhöht.

Die Ergebnisse bestätigen zum einen die Fähigkeit von PEX14 an PEX26 auch in Abwesenheit von Zytosol zu binden. Zum anderen legen sie die Vermutung nahe, dass die Bindung von PEX14 an PEX26 in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) verstärkt wird. Zur Detektion der rekombinanten Proteine wurde zusätzlich ein Western Blot mit Antikörpern gegen PEX5 durchgeführt. Offensichtlich sind die Proteine in der Lage, unspezifisch an die Beads zu binden (Abb. 3.27 B). Diese Tatsache beeinträchtigt jedoch nicht die gewonnenen Ergebnisse, da lediglich die Auswirkung der Anwesenheit der rekombinanten Proteine in Bezug auf die PEX14-PEX26-Bindung ermittelt werden sollte und nicht eine direkte Bindung der rekombinanten Proteine mit PEX14 oder PEX26.

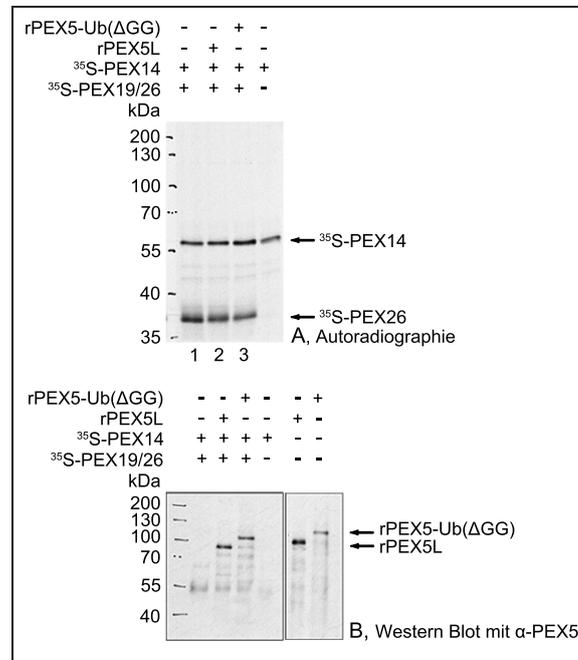


Abbildung 3.27: **PEX14 bindet an PEX26.** A) Autoradiographie der Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -PEX26. Jeweils 50  $\mu$ L magnetische Dynabeads wurden mit  $\alpha$ -PEX26 (1:50) gekoppelt. Die Proteine PEX14 und PEX19/PEX26 wurden mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert. Die Translationsansätze (von  $^{35}$ S-PEX14 jeweils 10  $\mu$ L und  $^{35}$ S-PEX19/PEX26 jeweils 20  $\mu$ L) und 7  $\mu$ g rPEX5L bzw. 14  $\mu$ g rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurden entsprechend zu den Ansätzen hinzugefügt und zusammen mit Bindungspuffer und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Es wurden jeweils 50 % der Eluate auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Expositionszeit des Autoradiographiefilmes betrug zwei Tage. B) Western Blot zum Nachweis von PEX5. Je Fraktion wurden 2,85 % auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper gegen PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blot Substrates“. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der „FusionCapt Advance“ Software.

### 3.2.6 rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) verstärkt die Bindung von PEX26 an PEX6

Wie die vorherigen Versuche zeigen, binden sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) deutlich an die Proteine des Docking- und Exportkomplexes. Es konnte eine stärkere Bindung der Exportproteine an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5L beobachtet werden. Für die Pull-down Versuche wurden die rekombinanten Proteine an magnetische Nickel-NTA-Beads gekoppelt und die  $^{35}\text{S}$ -Met markierten Docking- und Exportproteine hinzugegeben. Aufgrund des relativ geringen Hintergrundsignals waren alle Bindungen spezifisch zu den rekombinanten Proteinen. Die Pull-down Versuche lassen auf eine Bindung der Docking- und Exportproteine an die rekombinanten Proteine schließen. Jedoch ist unklar, wie sich die Interaktionen dieser Proteine in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) untereinander beeinflussen. In Kapitel 3.2.5 konnte zum einen eine Bindung von PEX14 an PEX26 gezeigt werden, zum anderen auch, dass sich in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) die Bindung von PEX14 zu PEX26 verstärkt. Unklar ist, welche Auswirkung die Bindung von PEX26 an den PEX1/PEX6-Komplex in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) hat. Zur Klärung dieses Aspektes wurde erneut eine Koimmunpräzipitation mit magnetischen Dynabeads durchgeführt. Hierfür wurde ein PEX6-Konstrukt gewählt, das am C-Terminus einen zweifachen FLAG-Tag (PEX6-FLAG) besitzt. Die Verwendung von Antikörpern gegen diesen Tag hat den Vorteil, dass sie monoklonal sind und spezifisch ihr Epitop erkennen. Nach Kopplung der Dynabeads mit  $\alpha$ -FLAG wurden PEX1 und die Komplexe PEX1/PEX6-FLAG und PEX19/PEX26 mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert und durch den Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Met radioaktiv markiert. Die Translationsansätze  $^{35}\text{S}$ -PEX1/PEX6-FLAG und  $^{35}\text{S}$ -PEX19/PEX26 wurden zu den Dynabeads gegeben und mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder keinem Protein inkubiert. Als negative Kontrollen wurden der  $^{35}\text{S}$ -PEX19/PEX26-Komplex bzw.  $^{35}\text{S}$ -PEX1 zu den mit  $\alpha$ -FLAG gekoppelten Dynabeads gegeben. Die Ansätze wurden zusammen mit Bindungspuffer und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Die gebundenen Fraktionen (Elate) wurden anhand einer Autoradiographie analysiert (Abb. 3.28 A).

In allen Ansätzen kann sowohl  $^{35}\text{S}$ -PEX1/PEX6-FLAG- als auch der  $^{35}\text{S}$ -PEX19/PEX26-Komplex detektiert werden (Abb. 3.28). Dies ist auf die Interaktion von PEX26 und PEX6-FLAG zurückzuführen, welche bereits in der Literatur beschrieben wurde [Matsumoto et al., 2003b]. Im Unterschied zu den vorherigen Versuchen erfolgte keine Dissoziation des  $^{35}\text{S}$ -PEX19/PEX26-Komplexes. In Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nimmt die Bindung von  $^{35}\text{S}$ -PEX19/PEX26 an  $^{35}\text{S}$ -PEX1/PEX6-FLAG im Vergleich zu rPEX5L um 30 % zu. Dies impliziert eine direkte Bindung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an PEX26 oder an den PEX1/PEX6-Komplex oder an PEX26 und PEX1/PEX6-Komplex, da während der Interaktion kein Zytosol zugegen war.

Zur Detektion der rekombinanten Proteine wurde ein Western Blot mit  $\alpha$ -PEX5 durchgeführt (Abb. 3.28 B). Sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) binden unspezifisch an die Beads. Jedoch kann im Vergleich dazu wesentlich mehr rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in den Koimmunpräzipitationsansätzen detektiert werden.

Die Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -FLAG bestätigt die vorherigen Pull-down Versuche, in denen eine Bindung von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an die Exportproteine gezeigt werden konnte (siehe dazu Kapitel 3.2.3 bzw. 3.2.4 und Abb. 3.25 bzw. 3.26).

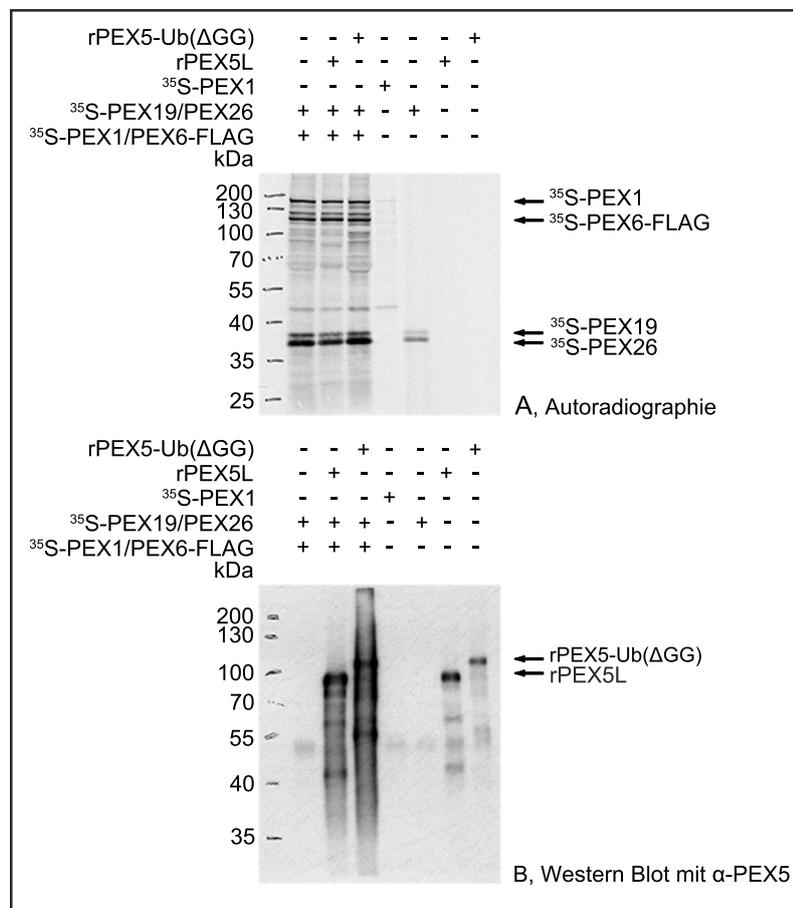


Abbildung 3.28: **Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -FLAG-PEX6.** A) Autoradiographie der Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ -FLAG. Jeweils 50  $\mu$ L magnetische Dynabeads wurden mit  $\alpha$ -FLAG (1:35) gekoppelt. PEX1, PEX1/PEX6 und PEX19/PEX26 wurden mit Hilfe einer TnT-Reaktion *in vitro* exprimiert. Die Translationsansätze (von  $^{35}$ S-PEX1/PEX6 jeweils 40  $\mu$ L und  $^{35}$ S-PEX19/PEX26 bzw.  $^{35}$ S-PEX1 jeweils 20  $\mu$ L) und 7  $\mu$ g rPEX5L bzw. 14  $\mu$ g rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurden entsprechend zu den Ansätzen hinzugefügt und zusammen mit Bindungspuffer und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30  $^{\circ}$ C inkubiert. Es wurden jeweils 50 % der Eluate auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Expositionszeit des Autoradiographiefilmes betrug zwei Tage. B) Western Blot zum Nachweis von PEX5. Je Fraktion wurden 2,85 % auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper gegen PEX5 (GDA2, 1:5 000) und dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -rabbit (1:15 000) unter Verwendung des „ECL Western Blot Substrates“. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der „FusionCapt Advance“ Software.

### 3.2.7 Mutationen im Tyrosin-Loop beeinflussen die Bindung des PEX1/PEX6-Komplexes an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

In Hefen wurde kürzlich untersucht, inwiefern die konservierten aromatischen Aminosäuren im potentiellen Substratbinde-Motiv in D1 und D2 von sowohl PEX1 als auch von PEX6 für die Substratbindung essentiell sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Hefen nicht mehr in der Lage waren Oleat zu metabolisieren, wenn das Tyrosin im Tyrosin-Loop in der D2 von PEX1 und von PEX6 mutiert war. Ciniawsky *et al* postulierten, dass die D2 von PEX1 und von PEX6 mit dem Substrat interagiert [Ciniawsky *et al.*, 2015]. Das Substrat des PEX1/PEX6-Komplexes ist bisher nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass es sich um mUb-PEX5 handelt.

Es soll untersucht werden, inwiefern sich eine Tyrosin-Mutation im Substratbinde-Motiv in D2 auf die humanen AAA-ATPasen PEX1 und PEX6 übertragen lässt. Dafür wurde zunächst mit Hilfe einer ortsspezifischen Mutagenese ein Austausch von Tyrosin zu Alanin in PEX1 (PEX1Y914A) und in PEX6 (PEX6Y777A) vorgenommen. Es wurde erneut ein Pull-down Versuch angewendet. Die Nickel-NTA-Beads wurden entweder mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder ohne Protein (negative Kontrolle, neg. Kontr.) gekoppelt. Der PEX1Y914A/PEX6Y777A-Komplex wurde mit Hilfe einer *in vitro* TnT-Reaktion exprimiert und mit  $^{35}$ S-Met markiert. Die Translationsansätze wurden zu den Nickel-NTA-Beads hinzugefügt und nach Zugabe von  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzytosol und 2 mM ATP für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Die gebundenen Fraktionen (Elate) wurden mit Hilfe einer Autoradiographie analysiert (siehe Abb. 3.25).

rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann deutlich besser an den PEX1Y914A/PEX6Y777A-Komplex (in der Abb. 3.25 als PEX1M/PEX6M bezeichnet) binden als rPEX5L. Die Bindung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) und rPEX5L an den PEX1Y914A/PEX6Y777A-Komplex ist leicht erhöht im Vergleich zum PEX1/PEX6-Komplex. Eine Mutation im Tyrosin-Loop im möglichen Substratbinde-Motiv in D2 von PEX1 und von PEX6 verringert weder die Bindung zu rPEX5L noch zu rPEX5-Ub( $\Delta$ GG). Im Unterschied zu den Hefen wird die Bindung an rPEX5L bzw. an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu dem humanen PEX1Y914A/PEX6Y777A-Komplex sogar positiv beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass der Tyrosin-Loop in D2 von humanem PEX1 und von PEX6 nicht essentiell für die rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bindung ist.

In *in vivo* Komplementationsstudien mit  $\Delta$ PEX1- bzw.  $\Delta$ PEX6-Fibroblastenzellen konnte gezeigt werden, dass nach Expression der entsprechenden Mutanten ein funktionaler Matrixproteinimport in die Peroxisomen stattfand. In  $\Delta$ PEX1-Fibroblastenzellen, die PEX1 und EGFP-PTS1 exprimierten, konnte eine peroxisomale Lokalisation von EGFP-PTS1 in 42,9 % der Zellen festgestellt werden. Wurde hingegen PEX1Y914A und EGFP-PTS1 exprimiert, so konnten nur 13,9 % der Zellen eine peroxisomale Lokalisation von EGFP-PTS1 aufweisen.

In  $\Delta$ PEX6-Fibroblastenzellen, die PEX6 bzw. PEX6Y777A und EGFP-PTS1 exprimierten, konnten 62,5 % der Zellen eine peroxisomale Lokalisation von EGFP-PTS1 aufweisen, wenn PEX6 in der Zelle vorhanden war. Im Vergleich dazu konnten 52,6 % der EGFP-PTS1 und PEX6Y777A exprimierenden Zellen eine peroxisomale Lokalisation von EGFP-PTS1 aufweisen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutanten PEX1Y914A und PEX6Y777A *in vivo* einen geringeren peroxisomalen Matrixproteinimport im Vergleich zu den normalen PEX1 und PEX6-Proteinen aufrechterhalten können. Im Unterschied zu den Hefen kann in menschlichen Fibroblastenzellen der peroxisomale Matriximport durch die Mutanten stattfinden. Dies lässt vermuten, dass der Tyrosin-Loop in D2 von PEX1 und PEX6 nicht essentiell für die Substratbindung ist.

### 3.2.8 Strukturelle Untersuchungen von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Die bisherigen Versuche zeigen, dass das chemisch hergestellte ubiquitinierte PEX5 zumindest teilweise funktionsfähig ist. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann den PEX7-PTS2-Komplex binden und somit den Import für PTS2-Proteine aufrechterhalten. Dies trifft jedoch nicht auf den PTS1-Proteinimport zu. Die Bindung der PTS1-Proteine findet über die  $\alpha$ -helikalen TPR-Domänen am C-Terminus von PEX5 statt. Der N-Terminus hingegen ist ungefaltet, dem außerdem eine wichtige Rolle im Export zugeschrieben wird. Am Cys<sup>11</sup> wird PEX5 durch eine mono-Ubiquitinierung für den Export markiert.

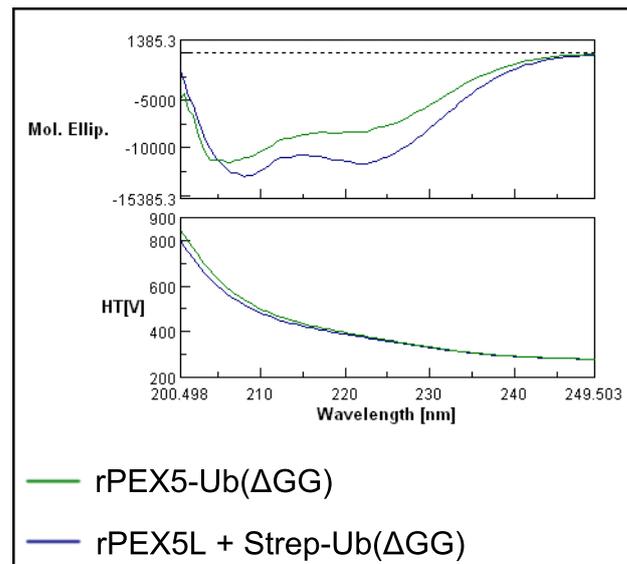


Abbildung 3.29: **CD-Spektrum von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG), rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin.** Von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) als auch rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Dargestellt ist die Messung von 200 nm bis 250 nm nach insgesamt acht Durchgängen. Für eine Messung wurde jeweils  $3,5 \mu\text{M}$  Protein eingesetzt. Obere Abbildung zeigt die „Molar Ellipticity“ (Mol. Ellip.), die untere Abbildung stellt die „High Tension“ (HT) in Volt dar.

Denkbar wären strukturelle Änderungen von mUb-PEX5, die sich unter anderem auf die Bindung von PTS1-Proteinen auswirken können. Um dies zu klären, wurde zunächst eine Circular dichroismus (CD)-Messung durchgeführt. Anhand dieser Messung können

sekundäre Strukturelemente wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter untersucht werden. Um festzustellen, inwiefern es einen Unterschied in der Sekundärstruktur von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu den nicht geklickten rekombinanten Proteinen gibt, wurden zwei Messungen durchgeführt. Für die erste Messung wurden zunächst die Proteine rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin in gleichen äquimolaren Mengenverhältnissen gemischt und ein CD-Spektrum aufgenommen. In einer zweiten Messung wurden Daten von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) erfasst. Beide Spektren wurden miteinander verglichen (Abb. 3.29).

Bei Vorhandensein der nicht geklickten Komponenten rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin können zwei charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm beobachtet werden. Diese beiden Wellenlängen definieren  $\alpha$ -Helices. Beide Minima fallen bei rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) flacher aus. Insbesondere bei 222 nm kann ein deutlicher Unterschied von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin festgestellt werden.

Für  $\beta$ -Faltblattstrukturen gibt es im Vergleich zu den  $\alpha$ -Helices nur ein Minimum bei 217 nm. Dieses Minimum ändert sich nur geringfügig bei rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu den ungeklickten Komponenten rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin.

Diese Art von CD-Messung erlaubt es nicht, genauere Vorhersagen bezüglich der Verteilung von sekundären Strukturelementen zu treffen. Daher bleibt lediglich festzuhalten, dass bei rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ein Unterschied im Vergleich zu den nicht geklickten rekombinanten Proteinen rPEX5L und Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin festzustellen ist. Es kann daher angenommen werden, dass eine andere Konformation vorliegt. Für genauere Details müssten weitere kristallographische Untersuchungen unternommen werden.

### 3.2.8.1 Limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Zur Ergänzung der CD-Messung wurde eine limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 6  $\mu$ M rekombinantes Protein eingesetzt, dem Proteinase K in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/mL hinzugegeben wurde. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Proteolyse mit 20  $\mu$ g PMSF abgestoppt. Die Analyse der Proben erfolgte auf einem 12 %-igen SDS-Gel (Abb. 3.30).

Die limitierte Proteolyse zeigt, dass nach einer Protease K-Behandlung der rekombinanten Proteine unterschiedliche Abbaubanden entstehen. Sowohl bei rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) findet bereits nach einer Minute ein starker Abbau des gesamten Proteins statt. Bei der rPEX5L-Proteolyse entstehen relativ schnell Fragmente mit einer Größe von ungefähr 33-35 kDa (Abb. 3.30, Nr. 2 und 3), die weitestgehend stabil bleiben und nicht weiter in kleinere Fragmente abgebaut werden. Im Unterschied dazu wird rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mit der Zeit in mehrere kleinere Fragmente mit einer Größe von ungefähr 20-25 kDa abgebaut (Abb. 3.30, Nr. 7, 8 und 9). Die nummerierten Banden wurden einer Massenspektrometrischen-Analyse unterzogen. Die mit einem Stern markierten Fragmente wurden ausgewertet (siehe dazu Abb. 3.31 bzw. im Anhang).

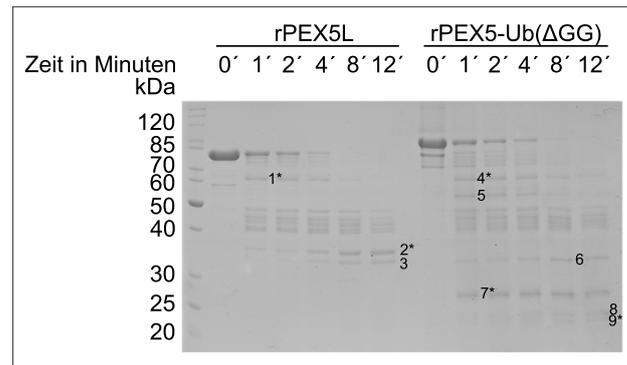


Abbildung 3.30: **Limitierte Proteolyse von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG).** Für eine limitierte Proteolyse wurden jeweils 6  $\mu$ M rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eingesetzt. Die Proteolyse erfolgte mit 5  $\mu$ g/mL Proteinase K. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion mit 20  $\mu$ g PMSF abgestoppt. Die Proben wurden auf einem 12 %-igen SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau analysiert. Die nummerierten Fragmente wurden einer Massenspektrometrischen (MS)-Analyse unterzogen. Die Auswertung der mit einem Stern markierten Proteinbanden wurde in der Abbildung Abb. 3.31 graphisch dargestellt.

### 3.2.8.2 Der N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist stabil

Die Auswertung der Massenspektrometrie (MS) nach der limitierten Proteolyse ergab, dass der N-Terminus im Vergleich zum C-Terminus von rPEX5L instabiler ist. Bereits nach einer Minute kann ein großer Teil des N-Terminus nicht mehr nachgewiesen werden, der C-Terminus hingegen bleibt sogar nach 12 Minuten stabil (Abb. 3.31, Nr. 1).

Es ist bekannt, dass der N-terminale Bereich von PEX5 ungefaltet ist. Dadurch sind die Domänen vor Proteasen ungeschützt und können somit schneller abgebaut werden. Die  $\alpha$ -helicalen TPR-Domänen von PEX5 hingegen bleiben vor einer Proteaseaktivität länger geschützt.

Im Vergleich dazu bleibt der N-terminale Bereich von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) länger stabil (3.31, Nr. 4 und 7). Der C-Terminus ist im Unterschied zu rPEX5L instabiler, da er zunehmend abgebaut wird. Drei Bereiche am N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) fallen besonders auf. Der erste Bereich ist am äußersten N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bei Aminosäure 20-28 zu finden. Dieses Peptid konnte in allen Fragmenten (4-9) nach einer limitierten Proteolyse von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gefunden werden. Der zweite Bereich erstreckt sich von Aminosäure 84-100. Dieses Peptid wurde ebenfalls in den Fragmenten 4-7 von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG), jedoch nicht in rPEX5L gefunden. Der dritte Bereich ist von Aminosäure 205-237 lokalisiert und konnte auch in allen Fragmenten (4-9) gefunden werden. Dieser Bereich überlappt mit der PEX7-Bindestelle, die in PEX5L in 191-222 zu finden ist. Für die Bereiche 20-28 und 84-110 konnten bisher in der Literatur keine relevanten Funktionen gefunden werden.

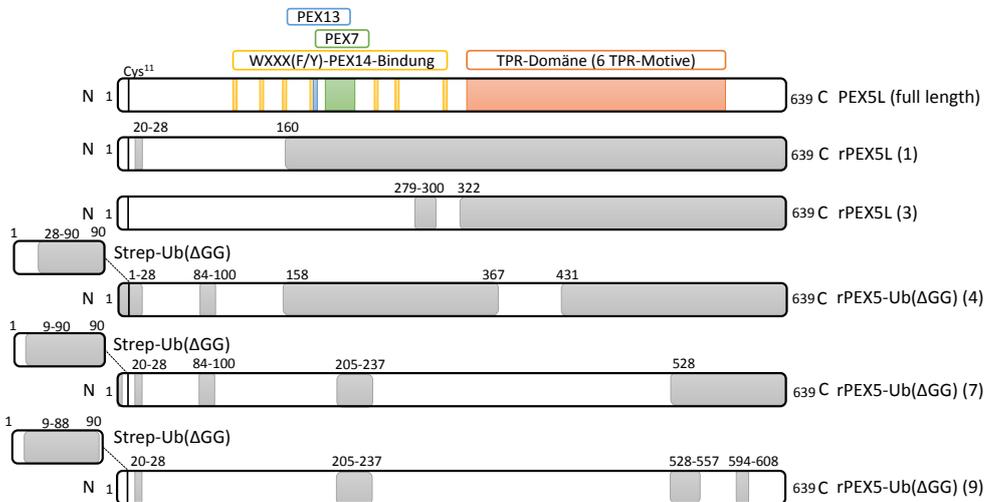


Abbildung 3.31: **Massenspektrometrische Analyse der limitierten Proteolyse.** Nach der limitierten Proteolyse wurden die mit einem Stern markierten Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert. WXXX(F/Y)-Motive sind in gelb (118-122, 140-144, 159-163, 184-188, 243-247, 257-261, 308-312), PEX7-Bindestelle in grün (191-222), PEX13-Bindestelle in blau (184-192), die sechs TPR-Domänen in rot (335-589) und die stabilen Bereiche in rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in grau dargestellt. Die Angaben der Domänenbereiche für das full length PEX5L wurde aus [Shiozawa et al., 2009] entnommen.

Die MS-Analyse zeigt deutlich, dass der N-Terminus in rPEX5L schnell abgebaut wird, der C-Terminus hingegen über eine längere Zeit stabil bleibt. Im Unterschied dazu kann beobachtet werden, dass der N-terminale Bereich von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) geschützter ist. Die Bereiche 20-28 und 205-237 konnten in allen Fragmenten (4-9) detektiert werden, der Bereich 84-110 hingegen in den Fragmenten 4-7. Für die Bereiche 20-28 und 84-110 ist die Funktion bisher unbekannt.

## 4 Diskussion

In der peroxisomalen Biogenese ist der Importrezeptor PEX5 für peroxisomale Matrixproteine ein wesentlicher Bestandteil. PEX5 fungiert als „Shuttle“-Rezeptor zwischen Zytosol und dem Peroxisom, indem dieser im Zytosol an peroxisomale Matrixproteine bindet und diese zum Peroxisom transportiert. Nach dem Docking am Peroxisom wird PEX5 in die peroxisomale Membran inseriert und entlässt sein Cargo in die peroxisomale Matrix. Eine anschließende Ubiquitinierung am konservierten N-terminalen Cystein von PEX5 (mUb-PEX5) initiiert den Export durch die beteiligte Exportmaschinerie. Bislang ist unklar, wie der genaue Mechanismus des Exportes abläuft und in welchem Umfang Interaktionen zwischen den peroxisomalen Proteinen und dem mUb-PEX5 stattfinden. Um dies zu beantworten, ist es zunächst notwendig, mUb-PEX5 in größeren Mengen zur Verfügung zu haben. In dieser Arbeit wird erstmals die Erzeugung von rekombinantem mUb-PEX5 beschrieben. Dafür wurde die Methode der Klickchemie angewandt. Zunächst wurde durch eine Nonsense-Suppression anstelle des Cys<sup>11</sup> die unnatürliche Aminosäure p-Azidophenylalanin (AzF) in PEX5 (PEX5C11AzF) eingebaut und nach dessen Expression aufgereinigt. In einem zweiten Schritt erfolgte die Expression und Herstellung eines Ubiquitin-Alkins (Strep-Ub( $\Delta$ GG)-Alkin) durch Intein-spaltung. In einer Kupfer-katalysierten Klickreaktion wurden beide rekombinant hergestellten Proteine zu einem Strep-Ub( $\Delta$ GG)-PEX5C11AzF (rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)) chemisch erzeugt. Das gewonnene rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist stabil und kann als neu erschaffenes Tool für weiterführende Versuche in der peroxisomalen Biogenese eingesetzt werden. Aufbauend auf das gewonnene rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wurden funktionelle Studien im Vergleich zum unveränderten rPEX5L durchgeführt. Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5L keine PTS1-Proteine binden kann. Im Unterschied dazu konnten *in vitro* und *in vivo* Versuche zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in der Lage ist, den PEX7-PTS2-Proteinkomplex zu binden und einen PTS2-Protein-Import aufrecht zu erhalten. Die Importfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) konnte darüber hinaus auch mit Hilfe eines *in vitro* entwickelten Importassays bestätigt werden. Sowohl PEX7 als auch das PTS2-Protein Thiolase-myc waren nach einer Proteinase K-Behandlung in der peroxisomalen Membran geschützt. Diese Tatsache impliziert auch eine Insertion von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die Organellenmembran. In einem *in vitro* konzipierten Pull-down Versuch wurden die Proteininteraktionen mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) und dem Dockingkomplex PEX14/PEX13, sowie den Exportproteinen PEX26, PEX1 und PEX6 untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass erstens PEX14 und PEX13 sowohl an rPEX5L und an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) binden können. Zweitens bindet PEX14 gleichermaßen an rPEX5L und an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG). Drittens konnte die PEX14-Bindung an rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) weder durch die Anwesenheit von PEX26 noch vom PEX1/PEX6-Komplex beeinflusst werden. Viertens konnte erstmals gezeigt werden, dass es eine Interaktion zwischen PEX26 und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gibt. Fünftens ging aus den *in vitro* Interaktionsstudien eindeutig hervor, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Unterschied zu rPEX5L besser an die

Exportproteine binden kann. Die Erkenntnisse aus diesen Studien zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zumindest teilweise funktionsfähig ist und sich im Bindungsverhalten zu anderen Peroxinen deutlich zum rPEX5L unterscheidet. Dies lässt den Schluss zu, dass unter anderem auch strukturelle Aspekte als Möglichkeit in Betracht gezogen werden können. Eine limitierte Proteolyse mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse zeigte, dass der N-Terminus von rPEX5L instabil ist und nach kurzer Zeit abgebaut wurde, hingegen der C-Terminus stabil bleibt. Im Vergleich dazu konnten drei Bereiche am N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) identifiziert werden, die entweder nicht oder erst spät abgebaut wurden. Der C-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) weist im Vergleich zu rPEX5L einen instabileren Zustand auf. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass durch das chemisch hergestellte rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ein funktionelles Werkzeug gewonnen wurde, das als Grundlage zur Beantwortung von bisher ungeklärten Fragen in der peroxisomalen Biogenese eingesetzt werden kann. Auf einzelne Aspekte soll im Nachfolgenden weiter eingegangen und diskutiert werden.

## 4.1 Strukturelle Umlagerungen in rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) können PTS1-Bindung verhindern

In *in vitro* und *in vivo* Versuchen wurde die Bindungseffizienz von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5L im Hinblick auf die Cargobindung untersucht. Es konnte in einem *in vitro* Pull-down Versuch gezeigt werden, dass nach Zugabe von GFP-PTS1, keine Bindung zwischen dem PTS1-Protein und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu detektieren war. Hingegen war die Interaktion zwischen GFP-PTS1 und rPEX5L unverändert. Anders verhielt es sich mit dem PTS2-Protein Thiolase-myc, da sowohl zwischen rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine Interaktion beobachtet werden konnte. Diese Resultate konnten in weiteren *in vivo* Versuchen mit  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen bestätigt werden.  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen weisen aufgrund einer Mutation im PEX5-Genom kein PEX5-Proteingehalt in der Zelle auf, die eine Importunfähigkeit von Matrixproteinen in die Peroxisomen zur Folge hat. Nach Einbringen von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) und dem PTS1-Konstrukt EGFP-PTS1 konnte keine peroxisomale Lokalisation von EGFP-PTS1 festgestellt werden. Im Unterschied dazu konnten  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen mit rPEX5L und EGFP-PTS1 komplementiert werden. Wurde hingegen die Lokalisation des endogenen PTS2-Proteins Thiolase untersucht, konnte eine peroxisomale Lokalisation dieser beobachtet werden, wenn rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bzw. rPEX5L zugegen war. Allerdings war die Importeffizienz der Thiolase durch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Vergleich zu rPEX5L um fast ein Drittel reduziert. Insgesamt zeigen diese Versuche, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nicht in der Lage ist, an PTS1-Proteine zu binden und einen funktionsfähigen PTS1-Protein-Import zu bewerkstelligen. Dies trifft jedoch nicht auf den PTS2-Protein-Import zu. Dieser findet nach wie vor statt, auch wenn die Effizienz im Vergleich zum normalen rPEX5L reduziert ist.

Die Bindung von PTS1-Proteinen erfolgt am C-terminalen Ende von PEX5, das aus sieben TPRs besteht. In einer Kristallisationsstudie wurde der C-Terminus von humanem PEX5 zusammen mit einem PTS1-Pentapeptid (YQSKL) untersucht. Demnach

sind die TPRs in zwei Cluster aufgeteilt, die sich aus den TPRs 1-3 und den TPRs 5-7 zusammensetzen. Die TPR4 liegt zwischen den zwei Clustern und bildet eine Art Drehachse ([Gatto et al., 2000b]). Diese Studie konnte zeigen, dass in den sieben TPRs insgesamt zehn konservierte Aminosäuren zu finden sind, wobei die Asparagine Asn 489, Asn 497, Asn 524 und Asn 531 eine zentrale Rolle bei der PTS1-Bindung spielen. Demnach konnte in der Kristallisation von PEX5 gezeigt werden, dass das PTS1-Peptid in einer Grube zwischen den zwei TPR-Clustern sitzt und mit den Asparaginen wechselwirkt [Gatto et al., 2000a, Gatto et al., 2000b].

Weiterführende Strukturanalysen mit humanem PEX5 und zwei verschiedenen PTS1-Cargos zeigten, dass sich die Bindungsaffinität je nach PTS1-Sequenz zum Rezeptor ändert. AGT (Alanine-glyoxylate aminotransferase) weist eine atypische PTS1-Sequenz (-KKL) auf und bindet mit einer geringeren Affinität an den PEX5-Rezeptor [Fodor et al., 2012, Fodor et al., 2015]. Die PTS1 von SCP2 (sterol carrier protein 2) hat die Sequenz -AKL und bindet mit einer relativ hohen Affinität an PEX5 [Stanley et al., 2006]. Interessanterweise ist die Bindungsaffinität von der AGT-Mutante (AGT K390A) (-AKL) mit der von SCP2 vergleichbar. Die Bindung des Cargos an PEX5 geht mit einer Konformationsänderung in PEX5 einher.

Die Tatsache, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) den PEX7-PTS2-Proteinkomplex jedoch keine PTS1-Proteine binden kann, impliziert eine Änderung in dem strukturellen Aufbau des modifizierten PEX5. PEX5 wird am konservierten Cys<sup>11</sup> monoubiquitiniert. Es wäre denkbar, dass eine Ubiquitinierung am äußersten N-Terminus sich auf die Faltung der N-terminalen Domäne von PEX5 auswirkt und somit eine Änderung in der Stabilität zur Folge hat. Durch eine limitierte Proteolyse und einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse der entstandenen Proteinbanden von rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) konnte ein Unterschied in der Stabilität der jeweiligen Termini festgestellt werden. Der N-Terminus von rPEX5L ist weitestgehend instabil. Bereits nach einer Minute waren die ersten 160 Aminosäuren abgebaut. Im weiteren Verlauf der Proteolyse konnte eine zunehmende Stabilität ab Aminosäure 322 beobachtet werden. Dieser C-terminale Bereich deckt die gesamte TPR-Domäne in PEX5 ab. In der Literatur wird der N-Terminus von PEX5 als nicht globulär und ungefaltet beschrieben. Der C-Terminus hingegen ist durch die TPR-Domänen gefaltet und ist dadurch weniger anfällig für Proteasen.

Im Unterschied dazu wies der N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine deutlichere Stabilität auf. Es konnten drei Bereiche (Aminosäuren 20-28, 84-110 und 205-237) gefunden werden, die entweder über einen längeren oder über den gesamten Zeitraum vor der Proteaseaktivität geschützt waren. Es ist naheliegend, dass diese Bereiche entweder durch die Ubiquitinierung am N-Terminus von PEX5 stabilisiert wurden oder sogar mit dem Ubiquitin selbst wechselwirken können. Der unstrukturierte N-Terminus von PEX5 könnte somit einer Konformationsänderung unterliegen. In einer CD-Messung konnte lediglich gezeigt werden, dass das Klickprodukt rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine Änderung in den  $\alpha$ -Helices zur Folge hat. Das gemessene Minimum bei 222 nm zeigte bei rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine flachere Schulter im Vergleich zu dem Ubiquitin (Strep-Ub( $\Delta$ GG)) und rPEX5L Proteingemisch.

Im Hinblick auf die rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Faltung und der Unfähigkeit an PTS1-Proteine zu binden, wäre es denkbar, dass der ubiquitinierte N-Terminus von PEX5 „umklappt“

und somit eine Bindung der PTS1-Proteine in der TPR-Domäne blockiert. Das PTS1-Protein könnte somit nicht mehr länger mit den Asparaginen in der Bindungsgrube der beiden TPR-Clustern binden. Die PEX7-Bindedomäne (191-222) in PEX5 ist hingegen am N-Terminus lokalisiert und von den angenommenen strukturellen Änderungen wahrscheinlich nicht betroffen. Es wäre auch möglich, dass durch die N-terminale Ubiquitinierung eine Konformationsänderung in PEX5 verhindert wird, sodass die PTS1-Proteine nicht effektiv an PEX5 binden können. Möglicherweise hängt das Bindungsvermögen der PTS1-Proteine an mUb-PEX5 von der jeweiligen Signalsequenz ab. Dies müsste mit weiteren PTS1-Proteinen getestet werden, die sich in ihrer peroxisomalen Sequenz unterscheiden.

Um genauere Einblicke zu erhalten, inwiefern PEX5 nach der Ubiquitinierung einer Konformationsänderung unterliegt, müssen weitere strukturelle Studien erfolgen.

## 4.2 Die Import- und Exportfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

Der PEX5-Zyklus kann in verschiedene Stadien unterteilt werden. Demnach werden im Zytosol die Cargoproteine von PEX5 gebunden (Stadium 0) und zum peroxisomalen Dockingkomplex transportiert (Stadium 1). Nach Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran erfolgt gleichzeitig die Translokation des Cargos in die peroxisomale Matrix. *In vitro* Importassays konnten zeigen, dass nach einer Protease K-Behandlung nur ein N-terminales Fragment von PEX5 mit einer Größe von 2 kDa ins Zytosol ragt, der Rest von PEX5 ist Protease-geschützt in die peroxisomale Membran inseriert (Stadium 2). In diesem Stadium sind die Cargoproteine nach erfolgter Translokation durch die Organellenmembran ebenfalls Protease-geschützt [Alencastre et al., 2009, Francisco et al., 2013]. Durch weitere Studien konnte gezeigt werden, dass PEX5 im nächsten Schritt ein wenig mehr in die peroxisomale Membran gezogen wird, jedoch nicht vollständig. In diesem Stadium 3 wird PEX5 am Cys<sup>11</sup> monoubiquitiniert (mUb-PEX5) [Carvalho et al., 2007] und somit für den Export markiert. Der monoubiquitinierte N-Terminus von PEX5 ragt ins Zytosol. Dies ist notwendig, da im nächsten Schritt mUb-PEX5 mit Hilfe des Exportkomplexes aus der peroxisomalen Membran herausgezogen (Stadium 4) und anschließend debuiquitiniert wird (Stadium 5). Für PEX5 beginnt ein neuer Zyklus.

Ein Aspekt dieser Arbeit stellt die Importfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die Peroxisomen dar. In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) den PEX7-PTS2-Proteinkomplex jedoch nicht PTS1-Proteine binden kann. Dies impliziert eine Funktionalität von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) des Stadiums 1. Anhand von Immunfluoreszenzversuchen konnte ein PTS2-Protein-Import in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen beobachtet werden.

### 4.2.1 Die Importfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)

In einem *in vitro* Importassay wurde die Importfähigkeit (Stadium 1 und Stadium 2) von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) genauer untersucht. Zunächst wurde postnukleärer Überstand (PNS) aus Mausleber mit 1 mM ATP inkubiert, um den Anteil des endogenen PEX5 aus der peroxisomalen Membran zu reduzieren. Zur besseren Beurteilung, wieviel PEX5 innerhalb einer bestimmten Zeit in die peroxisomale Membran inseriert wird, wurde ein  $^{35}\text{S}$ -Met markiertes PEX5 ( $^{35}\text{S}$ -PEX5L) dem PNS hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 26 °C für 20 Minuten inkubiert, um einen Import von  $^{35}\text{S}$ -PEX5L zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine Protease K-Behandlung, um Proteine, die außen an der Organellenmembran haften, enzymatisch abzubauen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der Import von PEX5 in Abhängigkeit der Temperatur erfolgt. Bei 0 °C findet ein Docking des PEX5-Cargo-Komplexes an PEX14 statt, die Translokation jedoch nur bei höheren Temperaturen [Francisco et al., 2013]. Diese Tatsachen konnten in dieser Arbeit mit einem *in vitro* Importassay bestätigt werden (siehe dazu Abb. 3.23).  $^{35}\text{S}$ -PEX5 wurde in die Peroxisomen inseriert und war vor der Proteaseaktivität geschützt. Hingegen erfolgte kaum Import bei Temperaturen um 4 °C.

Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) wie normales PEX5 die Stadien 1 und 2 erreichen kann (siehe dazu die Importassays in Abb. 3.24). Wenn rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu der Importreaktion mit  $^{35}\text{S}$ -PEX5L in erheblich größeren Mengen hinzugegeben wurde, konnte keine Insertion von  $^{35}\text{S}$ -PEX5L in die Membran beobachtet werden. Dies legt nahe, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Import mit dem normalen PEX5 konkurrenzfähig ist. Das PNS beinhaltet viele Faktoren und Proteine, die einen Import von peroxisomalen Matrixproteinen aufrechterhalten. Da nur Cargo-beladenes PEX5 importiert werden kann, zeigt dies, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mit den im PNS enthaltenen PEX7-Korezeptoren und PTS2-Proteinen einen Komplex gebildet haben muss und dieser zum Peroxisom transportiert wurde.

Wurde hingegen  $^{35}\text{S}$ -PEX7 und  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc zu der Importreaktion hinzugegeben, konnte wie bei  $^{35}\text{S}$ -PEX5L für den PEX7-PTS2-Proteinkomplex ebenfalls ein Protease-geschützter Status erworben werden.

Dies geht mit den Annahmen kürzlich veröffentlichter Untersuchungen konform. Diese zeigen zum einen, dass Cargoproteine, die gleichzeitig mit der Insertion von PEX5 in die Matrix transloziert werden, Protease-geschützt sind [Alencastre et al., 2009, Francisco et al., 2013]. Zum anderen erwirbt PEX7 in PEX5- und PTS2-abhängiger Art und Weise einen Protease-geschützten Status in der peroxisomalen Membran [Rodrigues et al., 2014]. Wie alle PTS2-Proteine wird auch die Thiolase in einen sogenannten reifen Zustand prozessiert, in dem die N-terminale PTS2-Sequenz nach erfolgtem Import abgespalten wird [Alencastre et al., 2009]. In dem in dieser Arbeit angewendeten Importassay erwirbt die  $^{35}\text{S}$ -Thiolase-myc einen Protease-geschützten Status, es kann jedoch im Moment nicht genau geklärt werden, ob eine Prozessierung stattgefunden hat. Hierfür müssen weitere Versuche erfolgen.

Die Importreaktionen bei 4 °C zeigen einen geringeren Import (Abb. 3.24). Das liegt vermutlich in der technischen Handhabung der Proben. Der Import ist ein schneller Prozess und kann bereits nach wenigen Minuten erfolgen. Werden die Zusätze vorher nicht ausreichend gekühlt bzw. wird die Reaktion nicht sofort auf 4 °C runtergekühlt,

reicht dies für einen Import in geringen Mengen aus.

Aus den Importassays geht zusammen mit den *in vivo* Immunfluoreszenzversuchen hervor, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) im Hinblick auf den PTS2-Import voll funktionsfähig ist. Die Thiolase als ein Vertreter der PTS2-Proteine wird in die Peroxisomen importiert und hat einen Protease-geschützten Status erworben. Diese Ergebnisse zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) die Stadien 1 (Docking an die peroxisomale Membran) und 2 (Protease-geschützte Insertion in die Membran) erreichen kann.

#### **4.2.2 Der Export von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) aus der peroxisomalen Membran**

Nach Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran wird PEX5 am Cys<sup>11</sup> durch die RING-Finger-Proteine monoubiquitiniert (Stadium 3). Im Stadium 2 ist PEX5 größtenteils in die peroxisomale Membran eingebettet, der Größenunterschied von Stadium 2 und Stadium 3 liegt bei 2 kDa. Das Ubiquitin ist zum Zytosol gerichtet. So können die beteiligten Exportproteine PEX26 und der AAA-ATPase-Komplex PEX1/PEX6 mUb-PEX5 erkennen und es aus der peroxisomalen Membran herausziehen.

In dieser Arbeit wurde kein *in vitro* Exportassay durchgeführt. Jedoch lassen die *in vivo* Versuche mit  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen die Vermutung zu, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) exportiert wird. In den Immunfluoreszenzversuchen konnte gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) den PTS2-Import wieder herstellen kann. Anhand des Importassays konnte ein Import in die peroxisomale Membran von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gezeigt werden (Stadium 2). Wäre der Export gestört, so würde rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) einen einmaligen Import mit dem PEX7-PTS2-Proteinkomplex bewerkstelligen können, jedoch anschließend in der peroxisomalen Membran akkumulieren. Immunfluoreszenz-gekoppelte Antikörper sind nicht sehr sensitiv. Die Menge an einmalig importiertem Cargo könnte durch eine Färbung dieser Art nicht sichtbar gemacht werden. Demnach kann stark davon ausgegangen werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nach dem Import in die Peroxisomen wieder exportiert wird und Stadium 4 erreichen kann.

#### **4.2.3 Eine Deubiquitinierung von mUb-PEX5 ist nicht zwingend erforderlich**

Nach Erreichen von Stadium 4 (Export von mUb-PEX5 aus der Membran) wird mUb-PEX5 durch USPX9 [Grou et al., 2012] deubiquitiniert. Interessanterweise zeigen die Daten in dieser Arbeit, dass eine Deubiquitinierung von mUb-PEX5 nicht zwingend erforderlich ist, um wieder eine neue Importrunde zu starten. Diese Tatsache konnte *in vitro* im Importassay und *in vivo* mit  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen gezeigt werden (siehe dazu Kapitel 3.2.2).

Zu der Vermutung, dass eine Deubiquitinierung von mUb-PEX5 abdingbar ist, gelangen ebenfalls Azevedo und Mitarbeiter [Grou et al., 2009b]. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit vorgestellten *in vivo* Versuchen mit  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen, haben

Grou *et al* einen *in vitro* Importassay angewendet. Hierfür wurde PNS aus Rattenleber mit  $^{35}\text{S}$ -PEX5 und Ubiquitinaldehyd, einem Inhibitor von DUBs, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um einen Import mit anschließender Monoubiquitinierung zu ermöglichen. Die Zugabe von NEM (N-Ethylmaleinimide), einem Inhibitor für Deubiquitinasen, sollte das mUb-PEX5 stabilisieren. Das lösliche, exportierte mUb- $^{35}\text{S}$ -PEX5 wurde durch eine Zentrifugation von den Organellen getrennt. Der Überstand mit löslichem mUb- $^{35}\text{S}$ -PEX5 und  $^{35}\text{S}$ -PEX5 wurde mit Iodoacetamid behandelt, einem Inhibitor von DUBs. In einem zweiten Importassay wurde der Überstand mit mUb- $^{35}\text{S}$ -PEX5 und  $^{35}\text{S}$ -PEX5 zugegeben und bei 16 °C durchgeführt, um eine *de novo* Ubiquitinierung zu inhibieren. Ein Überschuss an GST-Ub wurde hinzugefügt, um eine mögliche *de novo* Ubiquitinierung besser zu beurteilen. GST-Ub kann PEX5 ubiquitinieren, der Export von GST-Ub-PEX5 ist jedoch gehemmt [Carvalho *et al.*, 2007]. Nach der Importreaktion und Proteinase K-Behandlung konnte erneut ein Protease-resistenter Status von mUb- $^{35}\text{S}$ -PEX5 beobachtet werden.

Dieser *in vitro* Importassay zeigt deutlich, dass mUb-PEX5 wieder in die peroxisomale Membran inseriert werden kann. Im Unterschied zu dem Versuch aus Grou *et al* war es in der hier vorliegenden Arbeit nicht möglich, das rekombinante PEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) radioaktiv zu markieren. Somit konnte der Status der Proteinaseresistenz von rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) nicht überprüft werden. Es wurde aber bereits oben diskutiert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) in die peroxisomale Membran inseriert wurde.

Die Daten in dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) keine PTS1-Proteine binden und in  $\Delta\text{PEX5}$ -Fibroblastenzellen den genetisch bedingten Importdefekt nicht wieder herstellen kann. Entgegen dieser Ergebnisse postulieren Grou *et al*, dass mUb-PEX5 und PEX5 ähnliche Cargoprotein-BindungsKapazitäten aufweisen [Grou *et al.*, 2009b]. Bei einem durchgeführten Sucrose-Gradienten mit einem Gemisch aus mUb-PEX5 und PEX5 in Anwesenheit von GST-SKL bzw. GST-LKS zeigten beide Proteine gleiche Laufeigenschaften: PEX5 konnte wie erwartet an GST-SKL, jedoch nicht an GST-LKS binden. mUb-PEX5 war stets in den gleichen Fraktionen wie PEX5 zu detektieren. Aufgrund dieser Tatsache wurde vermutet, dass mUb-PEX5 an PTS1-Proteine bindet.

Die Problematik dieser These beruht auf Beobachtungen dieser vorliegenden Arbeit. Im ersten Teil wurde auf die Gewinnung von rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) eingegangen. Mit Hilfe einer Klickreaktion wurde rPEX5-Azid und Strep- Ub( $\Delta\text{GG}$ )-Alkin zu einem rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) generiert. Die anfänglichen Klickausbeuten waren relativ gering. Eine anschließende Aufreinigung über eine Streptactin-Matrix sollte geklicktes PEX5 vom nicht geklickten PEX5 (rPEX5C11AzF) trennen. Das meiste nicht geklickte PEX5 konnte durch die Säulenaufreinigung getrennt werden. Jedoch war im Eluat stets ein 1:1 Verhältnis von rPEX5C11AzF und rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) zu beobachten. Dies ließ zunächst auf ein Hetero-Dimer aus rPEX5C11AzF und rPEX5-Ub( $\Delta\text{GG}$ ) schließen. Nachdem die Klickeffizienz auf nahezu 90 % verbessert wurde, trat dieses Phänomen nicht mehr auf. Vermutlich kann ein Protein aus einem Proteingemisch schlechter aufgereinigt werden, wenn der Anteil dieses Proteins relativ gering ist. In Bezug auf den Sucrose-Gradienten aus Grou *et al* wäre es aufschlussreich, wenn dieser Versuch mit den einzelnen Proteinen mUb-PEX5 und PEX5 durchgeführt werden würde.

Des Weiteren sollte erwähnt werden, dass es sich sowohl bei GST-SKL und GFP-PTS1 um nicht-natürliche Proteinkonstrukte handelt. Die Sequenz -SKL ist eine echte peroxisomale Zielsequenz, bei dem PTS1 des GFP-PTS1 handelt es sich um eine verlängerte Konsensussequenz. Möglicherweise könnte die Art der PTS1-Sequenz bei der Bindung an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine Rolle spielen. Dies müsste in weiteren Versuchen geklärt werden, die zum einen mit GST-SKL und zum anderen mit natürlich vorkommenden PTS1-Proteinen durchgeführt werden können.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die duale Funktion von PEX5 sowohl als ein zytosolisches Protein als auch ein in die Membran inseriertes Protein auch für rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zutrifft. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist trotz der Modifikation am N-Terminus teilweise funktional.

### **4.3 Die Funktionalität von PEX14 und der Exportproteine im Export von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)**

Im vorherigen Kapitel wurde bereits eingehend die Funktionalität von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in Bezug auf die Cargoprotein-Bindungsfähigkeit und Import in die Peroxisomen diskutiert. Darauf basierend kann stark davon ausgegangen werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nach der Insertion in die peroxisomale Membran durch die Exportmaschinerie wieder herausgezogen wird. In verschiedenen Pull-down Versuchen konnte eine Interaktion der Docking (PEX13/PEX14)- und Exportproteine (PEX1/PEX6, PEX26) sowohl mit rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gezeigt werden (siehe dazu die Kapitel ). Besonders auffällig war die bessere Bindungsfähigkeit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an die Exportproteine im Vergleich zu rPEX5L. Hingegen war die Bindungseffizienz von PEX14 zu rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gleichbleibend. Im Nachfolgenden soll auf die Rolle von PEX14 und die der Exportproteine näher eingegangen werden.

#### **4.3.1 Die Rolle von PEX14 in Bezug auf den Export von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)**

PEX14 ist ein essentielles peroxisomales Membranprotein. Es ermöglicht dem Cargobeladenen PEX5 einen ersten Kontakt mit der peroxisomalen Membran. Am N-Terminus von PEX14 befindet sich ein prolinreiches Motiv (PXXP), das mit der SH3-Domäne von PEX13 interagieren kann. PEX13 stellt die zweite Komponente im Dockingkomplex dar.

In einem *in vitro* Pull-down Versuch konnte gezeigt werden, dass rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) an die Proteine des Dockingkomplexes binden können. Die PEX13-rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bindung war im Vergleich zur PEX13-rPEX5L-Bindung nicht signifikant erhöht. Im Unterschied zur PEX13-Bindung war die Interaktion von PEX14 mit rPEX5 und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) um ein vielfaches stärker.

Nach Erreichen des Stadiums 1 (Docking an die Peroxisomen) wird das zytosolische PEX5 ein Bestandteil der peroxisomalen Membran (Stadium 2). Es ist anzunehmen,

dass PEX14 bei der Insertion von PEX5 in die Membran eine wesentliche Rolle spielt. In der Annahme der Bildung einer transienten Pore kann dieser Vorgang verdeutlicht werden. In einer Ringstruktur wird PEX5 durch PEX14 in die Membran eingebettet. Beide Proteine bilden zusammen eine Art transiente Pore. Diese erlaubt die Translokation und Freilassung des Cargos in die peroxisomale Matrix. Der genaue Vorgang der Porenbildung ist bisher noch nicht bekannt. Nach der Translokation der Matrixproteine wird PEX5 monoubiquitiniert (Stadium 3). Aus dem *in vitro* Interaktionsversuch geht hervor, dass das Bindungslevel von PEX14 zu rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gleich bleibt. Daraus kann geschlossen werden, dass PEX5 nach der Ubiquitin-Modifizierung weiterhin ein Bestandteil der transienten Pore ist. Die Interaktion zu PEX14 wird durch die Ubiquitinierung nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus werden vermutlich die N-Terminalen WXXX(F/Y)-PEX14-Bindungsmotive in PEX5 durch die Ubiquitinierung nicht beeinflusst.

Ein weiterer Aspekt zeigt, dass durch die Anwesenheit des PEX1/PEX6-Komplexes bzw. PEX26 oder beiden Komponenten keine signifikante Beeinflussung der PEX14-Bindung zu rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) beobachtet werden kann. Daraus geht hervor, dass PEX14, PEX1/PEX6 und PEX26 unterschiedliche Bindungsmotive in rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) haben müssen, die sich nicht gegenseitig beeinflussen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Proteine und Proteinkomplexe auch miteinander interagieren.

Aus dem Pull-down Versuch geht eine weitere Annahme hervor. Nach Zugabe von PEX14, PEX1/PEX6 und PEX26 zu den mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gekoppelten Nickel-Beads kann ein Anstieg des PEX26-Levels verzeichnet werden. Diese Zunahme von PEX26 war in keinem anderen Ansatz zu beobachten. Dies lässt eine Interaktion zwischen PEX26 und PEX14 vermuten. Um dies zu testen, wurden magnetische Dynabeads mit Antikörpern gegen PEX26 gekoppelt und PEX26/PEX19 und PEX14 hinzugegeben. Es konnte eine Interaktion zwischen PEX14 und PEX26 beobachtet werden. Eine derartige Interaktion wurde auch von Fujiki und Mitarbeitern gezeigt [Tamura et al., 2014]. Wurde rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) zu dem Ansatz hinzugegeben, so konnte mehr PEX14 mit den PEX26-Antikörpern präzipitiert werden. Dies bedeutet, dass eine Interaktion der peroxisomalen Membranproteine vorhanden ist, die durch die Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) deutlich verstärkt wird.

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Nach der Bindung von PEX5 an das Peroxisom folgt eine Insertion von PEX5 durch PEX14 in die peroxisomale Membran. Nach der Translokation der Cargoproteine wird PEX5 monoubiquitiniert. Dieser Schritt erfolgt noch in der Pore mit PEX14. Gleichzeitig kann PEX14 an PEX26, dem Ankerprotein der AAA-ATPasen PEX1 und PEX6, binden. Durch die mono-Ubiquitinierung von PEX5 wird die Interaktion von PEX14 und PEX26 verstärkt. Es ist durchaus möglich, dass PEX14 und PEX26 dadurch enger zusammengebracht werden. Gleichzeitig oder infolgedessen kann mUb-PEX5 an PEX26 binden. Möglicherweise wird hierdurch PEX26 aktiviert.

Unklar bleibt jedoch, welche Faktoren die PEX14-rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bindung lösen. Hierfür müssen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, da die Interaktionen von PEX26 und PEX1/PEX6 zu keinem Lösen der PEX14-rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)-Bindung führt. PEX13 als weiteres peroxisomales Membranprotein könnte demnach ein Kandi-

dat sein. Es müsste in weiteren Studien untersucht werden, inwiefern sich die Anwesenheit von PEX13 auf die Bindungsaffinität von PEX14 und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) auswirkt, auch in Anwesenheit der Exportproteine.

### 4.3.2 Der Export durch die Exportproteine

Die Peroxine PEX1 und PEX6 gehören zu der AAA-ATPase-Proteinfamilie und werden durch zwei AAA-Kassetten (D1 und D2) gekennzeichnet, die durch verschiedene Merkmale charakterisiert werden. Zwei wichtige Eigenschaften sind zum einen die ATP-Bindedomäne (Walker A) und die ATP-Hydrolysedomäne (Walker B). PEX1 und PEX6 gehen ATP-abhängig einen Komplex ein. Strukturelle Analysen in Hefen zeigen, dass die D1 und die D2 von PEX1 und von PEX6 in einer doppelringförmigen Struktur angeordnet sind, die eine mittig ausgerichtete Pore bilden [Blok et al., 2015, Tan et al., 2015, Ciniawsky et al., 2015, Gardner et al., 2015]. „Negative staining electron microscopy“ Versuche zeigen, dass die Ringstruktur außerdem eine dreieckige Form aufweist [Ciniawsky et al., 2015]. Der D1-Ring ist symmetrisch angeordnet und stabilisiert vermutlich den Komplex. Über den D2-Ring erfolgt die ATP-Hydrolyseaktivität [Blok et al., 2015, Tan et al., 2015].

mUb-PEX5 ist vermutlich Substrat des PEX1/PEX6-Komplexes. Jedoch wurde in der Literatur über keine direkte oder indirekte Bindung zwischen mUb-PEX5 und dem PEX1/PEX6-Komplex berichtet. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Pull-down Versuche konnten zeigen, dass rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) mit PEX1, PEX6 und dem PEX1/PEX6-Komplex interagieren kann. Diese Interaktionen waren mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) stets mehr. Aus diesen Versuchen geht nicht hervor, welche Bereiche der Proteine essentiell für eine Interaktion sind.

Möglicherweise werden für den Export von mUb-PEX5 weitere Kofaktoren benötigt. p97 ist ebenfalls ein Vertreter der AAA-ATPasen mit einer Doppelringstruktur. Die N-termini von p97 und seinem Kofaktor Ufd1 erkennen Poly-Ubiquitine. Diese N-termini haben die gleiche Faltung wie die Tandem N-Domänen von PEX1/PEX6. Es wäre durchaus möglich, dass PEX1 und PEX6 Kofaktoren zur Substraterkennung benötigen (siehe dazu Diskussion von [Blok et al., 2015]).

Ein Exportfaktor wurde von Fujiki und Mitarbeitern [Miyata et al., 2012] identifiziert. Hierbei handelt es sich um AWP1/ZFAND6, einem Protein mit zwei Zink-Finger-Domänen (A20 und AN1). Zink-Finger-Domänen sind in der Lage Ubiquitine zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass AWP1 über die Zink-Finger-Domänen an PEX6 binden kann. Eine PEX1-Bindung an AWP1 konnte nicht beobachtet werden. AWP1 könnte als Mediator des mUb-PEX5 wirken und eine Brücke zwischen PEX6 und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) darstellen. Die Pull-down Versuche mit rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in dieser Arbeit wurden mit Zytosol aus  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen durchgeführt. AWP1 ist ein zytosolisches Protein. Es ist gut möglich, dass nach Zugabe des Zytosols zu den Pull-down Ansätzen, die Bindung von PEX6 und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) oder auch rPEX5L fördert. PEX6 konnte stets besser an rPEX5L und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) binden als PEX1.

In Hefen gibt es derzeit zwei Exportmodelle von mUb-PEX5. Im ersten wird angenom-

men, dass das Substrat (möglicherweise mUb-PEX5) in und vermutlich durch die Pore von PEX1/PEX6 geschoben wird. Eine ATP-Hydrolyse in D2 bewirkt eine Konformationsänderung in PEX1/PEX6 und würde demnach eine Bewegung des Substrates nach sich ziehen. Vermutlich ist ein schwenkbares Segment in Form einer konservierten und essentiellen Aminosäuren in der Pore von PEX1/PEX6 notwendig, um das Substrat durch die Pore zu stoßen [Tan et al., 2015].

Das zweite Modell beschreibt die mögliche Interaktion des Substrates mit der D2 über konservierte aromatische Aminosäuren im Substratbinde-Loop von PEX1/PEX6. In Anwesenheit von ATP wird der Substratbinde-Loop in D2 zur Substratbindung freigegeben. Durch die freiwerdende Energie infolge der ATP-Hydrolyse wird das Substrat durch die Pore gezogen und vermutlich entweder teilweise oder ganz entfaltet [Ciniawsky et al., 2015].

In beiden Modellen geht hervor, dass das Substrat vermutlich durch die Pore des PEX1/PEX6-Komplexes geht. Die Modelle zeigen zum einen, dass das Substrat durch die Pore geschoben (siehe erstes Modell) oder zum anderen, dass es gezogen wird (siehe zweites Modell). Die Substratbewegung geschieht in Abhängigkeit von ATP. Zur weiteren Aufklärung des genauen Ablaufes und der beteiligten Domänen des PEX1/PEX6-Substratkomplexes müssten zusätzliche Strukturanalysen durchgeführt werden.

#### 4.4 Das Modell von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in der peroxisomalen Biogenese

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) funktional bezüglich des PTS2-Protein-Importes ist. Der PTS1-Proteine können von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gebunden werden. Möglicherweise spielen hier strukturelle Veränderungen in rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) eine Rolle. Eine limitierte Proteolyse hat gezeigt, dass der N-Terminus von rPEX5L bereits nach kurzer Zeit abgebaut wird, dieser im Vergleich zu rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) stabiler bleibt. Auffällig war, dass drei N-terminale Domänen in rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) stabil sind. Möglicherweise spielt eine Wechselwirkung des Ubiquitins eine Rolle. Es ist denkbar, dass die Ubiquitin-Modifizierung am N-Terminus von PEX5 den C-Terminus beeinträchtigen und somit die Bindung von PTS1-Proteinen verhindert. Es konnte weiter gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in die peroxisomale Membran inseriert wird und einen Protease-geschützten Status einnimmt. Die PTS2-Proteine erlangen ebenfalls einen Protease-geschützten Zustand nach Translokation in die peroxisomale Matrix.

Es kann stark davon ausgegangen werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nach Insertion wieder aus der peroxisomalen Membran herausgezogen wird. *In vivo* Versuche in  $\Delta$ PEX5-Fibroblastenzellen machen deutlich, dass eine Komplementation des PTS2-Protein-Importes durch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) möglich ist. Wäre der Export blockiert, so hätte das eine Akkumulation von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) in der peroxisomalen Membran zur Folge. *In vitro* Interaktionsstudien mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bzw. rPEX5L und den Docking- und Exportproteinen belegen, dass PEX14 vergleichbar mit rPEX5L bzw. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) interagiert und diese Bindung nicht durch die Anwesenheit der Export-

proteine beeinflusst wird. Sowohl rPEX5L als auch rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) können mit den Exportproteinen interagieren, wobei die Interaktion mit rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) um ein Vielfaches verstärkt war.

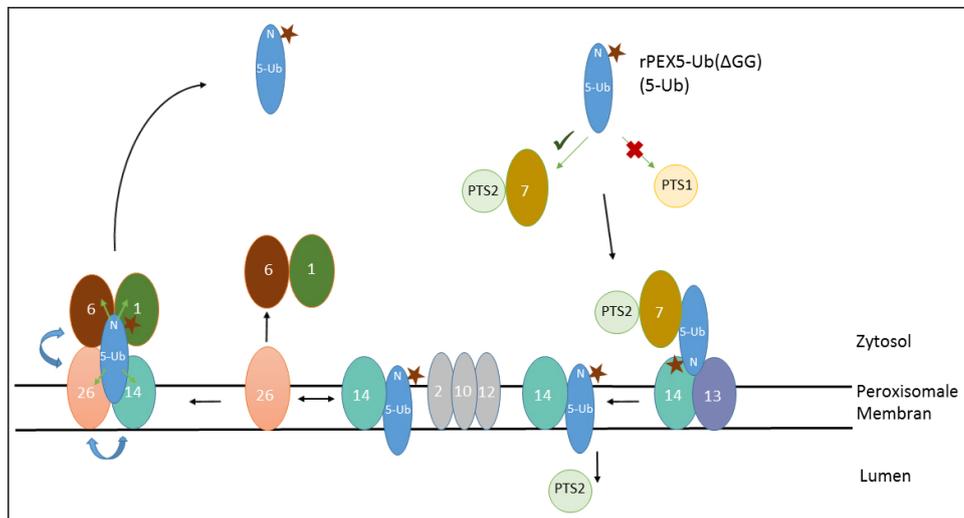


Abbildung 4.1: **Modell von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)**. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) (in dieser Abbildung als 5-Ub bezeichnet) ist am N-Terminus ubiquitiniert (roter Stern). rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann keine PTS1-Proteine binden, jedoch den PEX7-PTS2-Proteinkomplex und transportiert diesen zur peroxisomalen Membran (siehe grüne Pfeile). rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) bindet an den Dockingkomplex (PEX14/PEX13) und wird anschließend in die peroxisomale Membran inseriert. Gleichzeitig wird das PTS2-Protein in das peroxisomale Lumen freigesetzt. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist vermutlich weiterhin an PEX14 gebunden. Die Funktion der RING-Finger-Proteine (PEX2, PEX10, PEX12) ist in Bezug auf rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) unbekannt. PEX14 interagiert mit PEX26. Es ist denkbar, dass durch die Bindung zum einen PEX26 näher an rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gebracht und zum anderen PEX26 aktiviert wird. Infolge einer Aktivierung kann der PEX1/PEX6-Komplex an die peroxisomale Membran rekrutiert werden, wobei PEX26 an PEX6 bindet. In Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gleichzeitig an PEX14, PEX26 und an den PEX1/PEX6-Komplex binden kann (siehe grüne Pfeile). rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist vermutlich Substrat des Exportkomplexes (PEX26, PEX1, PEX6) und wird wahrscheinlich durch die Pore des PEX1/PEX6-Komplexes aus der Membran gezogen. Durch die stabile Bindung des Ubiquitins an PEX5 kann rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nicht deubiquitiniert werden.

Die Ubiquitin-Modifizierung bewirkt vermutlich weitere Interaktionen der Peroxine in der Membran. Demnach ist es vorstellbar, dass die Ubiquitinierung von PEX5 während der Interaktion mit PEX14 stattfindet. Im Zuge dessen wird die PEX14-PEX26-Interaktion verstärkt. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) interagiert mit dem TA-Protein PEX26. Es ist denkbar, dass PEX26 durch diese Interaktionen aktiviert wird und infolgedessen den

PEX1/PEX6-Komplex an die peroxisomale Membran rekrutiert. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) als mögliches Substrat des Exportkomplexes kann aus der Membran gezogen werden. Anhand durch EM und Cryo-EM Studien von PEX1 und PEX6 ist es vorstellbar, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) durch eine Pore im PEX1/PEX6-Komplex in Anwesenheit von ATP aus der Membran gezogen wird. Das Model in Abb. 4.1 fasst die Ergebnisse aus dieser Arbeit und die in diesem Kapitel diskutierten Aspekte zusammen.

Mit Hilfe des *in vitro* hergestellten Tools rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist es erstmals gelungen, PEX5 in ubiquitiniertes Form und in großen Mengen zu erhalten. Das stabile Protein ist funktional und ist in sowohl *in vitro* und *in vivo* einsetzbar.

Mit der Gewinnung von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) kann in weiterführenden Studien geklärt werden, ob es sich bei mUb-PEX5 tatsächlich um das Substrat des PEX1/PEX6-Komplexes handelt. Des Weiteren kann untersucht werden, ob mUb-PEX5 direkt oder indirekt an den PEX1/PEX6-Komplex bindet und inwiefern Kofaktoren für den Export von mUb-PEX5 aus der peroxisomalen Membran notwendig sind.

## 5 Zusammenfassung

Der Importrezeptor PEX5 ist für die peroxisomale Biogenese essentiell. Er versorgt die Peroxisomen mit den notwendigen Enzymen, um deren Funktion aufrecht zu erhalten. Die peroxisomalen Matrixproteine werden im Zytosol an den freien Ribosomen synthetisiert und von PEX5 durch ihre peroxisomale Erkennungssequenz (PTS1 oder PTS2) gebunden. Der PEX5-Matrixproteinkomplex wird zur peroxisomalen Membran transportiert und bindet dort an den membranverankerten Dockingkomplex (PEX13/PEX14). Anschließend erfolgt die Insertion von PEX5 in die peroxisomale Membran, wobei zeitgleich die Translokation durch die Membran und Freilassung des Matrixproteins in das Peroxisom erfolgt. Im nächsten Schritt wird PEX5 am N-terminalen konservierten Cystein monoubiquitiniert (mUb-PEX5) und ATP-abhängig durch die Exportmaschinerie (PEX26, PEX1/PEX6) aus der Membran gezogen. Nach der Deubiquitinierung kann ein neuer Zyklus von PEX5 stattfinden.

In dieser vorliegenden Arbeit sollten folgende Aspekte untersucht werden: 1) Inwiefern kann mUb-PEX5 den PEX5-Zyklus aufrechterhalten? 2) Findet eine direkte Interaktion zwischen mUb-PEX5 und der Exportmaschinerie statt? Zur Beantwortung dieser Fragestellung war es zunächst notwendig, mUb-PEX5 in größeren Mengen zur Verfügung zu haben. Eine rekombinante Gewinnung von mUb-PEX5 wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Diese Gewinnung wurde im ersten Schritt unter Verwendung der Klickchemie etabliert. Zunächst wurde durch eine Nonsense-Suppression in PEX5 die unnatürliche Aminosäure p-Azidophenylalanin (AzF) anstelle des konservierten N-terminalen Cysteins eingebaut (PEX5C11AzF). Im weiteren Schritt wurde Ubiquitin (Ub( $\Delta$ GG)) rekombinant exprimiert und durch Inteinspaltung zu einem Ub( $\Delta$ GG)-Alkin generiert. Aus beiden Komponenten konnte durch eine Kupferkatalytische Klickreaktion ein stabiles rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) hergestellt werden.

Es konnte in *in vitro* und *in vivo* Versuchen gezeigt werden, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) nicht an PTS1-Proteine binden, jedoch PTS2-Proteine in die Peroxisomen transportieren kann. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist in der Lage, an den Dockingkomplex zu binden und in die peroxisomale Membran zu inserieren. rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) und die PTS2-Matrixproteine erlangen somit einen Protease-geschützten Status. Es ist stark anzunehmen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) durch den Exportkomplex aus der Membran entfernt werden kann.

*In vitro* Interaktionsstudien zeigen, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) gleichermaßen wie rPEX5L an PEX14 binden kann und dass diese Bindung durch die Anwesenheit des Exportkomplexes nicht beeinflusst wird. Aus den Versuchen geht auch hervor, dass rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) stets besser an die Exportproteine binden kann als das normale rPEX5 (rPEX5L). Eine Interaktion zwischen PEX26 und rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) konnte erstmals gezeigt werden. In weiteren Studien konnte eine Bindung zwischen PEX14 und PEX26 nachgewiesen werden, die in Anwesenheit von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) verstärkt wurde.

Eine Analyse zur Faltung mittels einer limitierten Proteolyse der rekombinanten Proteine ergab, dass der N-Terminus im Vergleich zum C-Terminus von rPEX5L instabil

und damit vermutlich weniger gefaltet ist. Im Unterschied dazu weist der N-Terminus von rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) drei stabile Bereiche auf, die möglicherweise durch die Ubiquitinierung geschützt werden. Der C-Terminus in rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) ist hingegen instabiler und wird zunehmend abgebaut.

Die in dieser Arbeit beschriebene Herstellung von rPEX5-mUb( $\Delta$ GG) ermöglichte eine Vielzahl von Interaktionsstudien, durch die neue Aspekte der PEX5-Importmaschinerie gewonnen werden konnten. Dadurch wurde eine Ausgangsbasis für weitere Einblicke in die Peroxisom-Biogenese geschaffen. Weitere Studien könnten darauf aufbauend beispielsweise klären, inwiefern mUb-PEX5 mit dem PEX1/PEX6-Komplex interagiert und ob es sich hierbei um direkte oder indirekte Interaktionen handelt.

## 6 Abstract

Peroxisomes are single membrane-bound organelles. As they do not contain any DNA, all peroxisomal matrix proteins have to be imported post-translationally. The peroxisomal matrix protein import receptor PEX5 recognizes and binds newly synthesized matrix proteins via the peroxisomal targeting sequence (PTS1 and PTS2) in the cytosol. This PEX5-cargo-complex is then transported to the peroxisome. After docking to the peroxisomal docking complex (PEX13/PEX14), PEX5 is integrated into the peroxisomal membrane and the cargo is released into the peroxisomal lumen. Next, PEX5 is mono-ubiquitinated (mUb-PEX5) at its conserved N-terminal cysteine and pulled out of the membrane in an ATP-dependant manner via the export complex (PEX1, PEX6 and PEX26). After de-ubiquitination PEX5 is ready for a new import cycle.

In this thesis, following questions will be addressed: 1) Is mUb-PEX5 able to keep the PEX5-import-cycle intact? 2) Are there any interactions between mUb-PEX5 and members of the export complex? Studying these aspects requires a high amount of pure mUb-PEX5. A recombinant expression of mUb-PEX5 has not been described before. In this work, this step was established by applying click chemistry. First, the unnatural amino acid p-azidophenylalanine (AzF) was incorporated into PEX5, replacing the conserved N-terminal cysteine (PEX5C11AzF). Next, an Ubiquitin (Ub( $\Delta$ GG)) was recombinantly expressed and an Ub( $\Delta$ GG)-alkyne was generated by an intein fusion strategy. Through a copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), PEX5C11AzF and Ub( $\Delta$ GG)-alkyne could be clicked to a stable mono-ubiquitinated PEX5 (rPEX5-Ub( $\Delta$ GG)).

The here performed *in vitro* and *in vivo* assays demonstrated that rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) cannot bind PTS1-cargo-proteins, but that it is able to transport PTS2-cargo-proteins into peroxisomes. Further, this work shows that rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) binds to the peroxisomal docking complex and is inserted into the peroxisomal membrane. Thus, both rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) and PTS2-cargo-proteins achieve a protease-protected status. Presumably, rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) is released back to the cytosol by the export complex.

*In vitro* studies presented in this thesis showed that both rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) and rPEX5L bind to PEX14 and that this interaction is not influenced by the export complex. In comparison to rPEX5L, rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) always bound stronger to the export complex. This work demonstrated for the first time an interaction between PEX26 and rPEX5-Ub( $\Delta$ GG). Further studies showed that the interaction between PEX26 and PEX14 could be increased in the presence of rPEX5-Ub( $\Delta$ GG).

Moreover, limited proteolysis was performed to analyse the folding of rPEX5-Ub( $\Delta$ GG). This revealed that the N-terminal part of rPEX5L was less stable in contrast to the C-terminus. In comparison to rPEX5L, the N-terminus of rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) exhibits three stable areas, which are possibly protected by ubiquitination. By contrast, the C-terminus of rPEX5-Ub( $\Delta$ GG) is less stable.

This work serves as the foundation for further studies of the export machinery of PEX5, e.g. by exploring whether mUb-PEX5 interacts with the PEX1/PEX6-complex

and whether this interaction is direct or indirect.

# Literaturverzeichnis

- [Agne et al., 2003] Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Girzalsky, W., and Kunau, W. H. (2003). Pex8p: An intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Molecular Cell*, 11(3):635–646.
- [Albertini et al., 2001] Albertini, M., Girzalsky, W., Veenhuis, M., and Kunau, W. H. (2001). Pex12p of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import. *European journal of cell biology*, 80(4):257–270.
- [Albertini et al., 1997] Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. a., Veenhuis, M., and Kunau, W. H. (1997). Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell*, 89(1):83–92.
- [Alencastre et al., 2009] Alencastre, I. S., Rodrigues, T. a., Grou, C. P., Fransen, M., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2009). Mapping the cargo protein membrane translocation step into the PEX5 cycling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40):27243–27251.
- [Amerik and Hochstrasser, 2004] Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1695(1-3):189–207.
- [Azevedo and Schliebs, 2006] Azevedo, J. E. and Schliebs, W. (2006). Pex14p, more than just a docking protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12):1574–1584.
- [Babst et al., 1998] Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J., and Emr, S. D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO Journal*, 17(11):2982–2993.
- [Berndsen and Wolberger, 2014] Berndsen, C. E. and Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(4):301–307.
- [Beyer, 1997] Beyer, a. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 6(10):2043–2058.
- [Birschmann et al., 2005] Birschmann, I., Rosenkranz, K., Erdmann, R., and Kunau, W. H. (2005). Structural and functional analysis of the interaction of the AAA-peroxins Pex1p and Pex6p. *FEBS Journal*, 272(1):47–58.
- [Birschmann et al., 2003] Birschmann, I., Stroobants, A. K., van den Berg, M., Schäfer, A., Rosenkranz, K., Kunau, W.-H., and Tabak, H. F. (2003). Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Molecular biology of the cell*, 14(6):2226–36.
- [Blatch and Lässle, 1999] Blatch, G. L. and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays*, 21(11):932–939.
- [Blok et al., 2015] Blok, N. B., Tan, D., Wang, R. Y.-R., Penczek, P. a., Baker, D., DiMaio, F., Rapoport, T. a., and Walz, T. (2015). Unique double-ring structure of the peroxisomal Pex1/Pex6 ATPase complex revealed by cryo-electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201500257.
- [Bosh, 1992] Bosh, H. V. D. (1992). Biochemistry of peroxisomes1. *Annual review of biochemistry*, 61:157–97.
- [Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248–254.
- [Braverman et al., 1998] Braverman, N., Dodt, G., Gould, S. J., and Valle, D. (1998). An isoform of

- pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. Human molecular genetics, 7(8):1195–1205.
- [Braverman et al., 1997] Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S. J., and Valle, D. (1997). Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. Nature genetics, 15(4):369–76.
- [Brennand et al., 2012] Brennand, A., Rigden, D. J., and Michels, P. a. M. (2012). Trypanosomes contain two highly different isoforms of peroxin PEX13 involved in glycosome biogenesis. FEBS Letters, 586(13):1765–1771.
- [Brocard et al., 1994] Brocard, C., Kragler, F., Simon, M. M., Schuster, T., and Hartig, A. (1994). The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL. Biochemical and biophysical research communications, 204(3):1016–22.
- [Brocard et al., 1997] Brocard, C., Lametschwandtner, G., Koudelka, R., and Hartig, A. (1997). Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. EMBO Journal, 16(18):5491–5500.
- [Brown and Baker, 2003] Brown, L.-A. and Baker, A. (2003). Peroxisome biogenesis and the role of protein import. Journal of cellular and molecular medicine, 7(4):388–400.
- [Carvalho et al., 2006] Carvalho, A. F., Costa-Rodrigues, J., Correia, I., Costa Pessoa, J., Faria, T. Q., Martins, C. L., Fransen, M., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2006). The N-terminal half of the peroxisomal cycling receptor Pex5p is a natively unfolded domain. Journal of Molecular Biology, 356(4):864–875.
- [Carvalho et al., 2007] Carvalho, A. F., Pinto, M. P., Grou, C. P., Alencastre, I. S., Fransen, M., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2007). Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. Journal of Biological Chemistry, 282(43):31267–31272.
- [Chan et al., 2004] Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B., and Fokin, V. V. (2004). Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. Organic Letters, 6(17):2853–2855.
- [Chang et al., 1999] Chang, C. C., Warren, D. S., Sacksteder, K. a., and Gould, S. J. (1999). PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. Journal of Cell Biology, 147(4):761–773.
- [Chin et al., 2002] Chin, J. W., Santoro, S. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L., and Schultz, P. G. (2002). Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. Journal of the American Chemical Society, 124(31):9026–7.
- [Christianson and Ye, 2014] Christianson, J. C. and Ye, Y. (2014). Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. Nature Structural & Molecular Biology, 21(4):325–335.
- [Ciniawsky et al., 2015] Ciniawsky, S., Grimm, I., Saffian, D., Girzalsky, W., Erdmann, R., and Wendler, P. (2015). Molecular snapshots of the Pex1/6 AAA+ complex in action. Nature Communications, 6:7331.
- [Clark et al., 2008] Clark, P. M., Dweck, J. F., Mason, D. E., Hart, C. R., Buck, S. B., Peters, E. C., Agnew, B. J., and Hsieh-wilson, L. C. (2008). Direct In-Gel Fluorescence Detection and Cellular Imaging of O-GlcNAc-Modified Proteins Direct In-Gel Fluorescence Detection and Cellular Imaging of O-GlcNAc-Modified Proteins. Communication, pages 11576–11577.
- [Cohen et al., 1995] Cohen, Ren, and Baltimore (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. Cell, 80(2):237–248.
- [Costa-Rodrigues et al., 2005] Costa-Rodrigues, J., Carvalho, A. F., Fransen, M., Hambruch, E., Schliebs, W., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2005). Pex5p, the peroxisomal cycling receptor, is a monomeric non-globular protein. Journal of Biological Chemistry, 280(26):24404–24411.
- [Costa-Rodrigues et al., 2004] Costa-Rodrigues, J., Carvalho, A. F., Gouveia, A. M., Fransen, M.,

- Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2004). The N terminus of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, is required for redirecting the peroxisome-associated peroxin back to the cytosol. Journal of Biological Chemistry, 279(45):46573–46579.
- [De Duve and Baudhuin, 1966] De Duve, C. and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). Physiological reviews, 46(2):323–357.
- [Debelyy et al., 2011] Debelyy, M. O., Platta, H. W., Saffian, D., Hensel, A., Thoms, S., Meyer, H. E., Warscheid, B., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2011). Ubp15p, a ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. Journal of Biological Chemistry, 286(32):28223–28234.
- [Dieterich et al., 2006] Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., and Schuman, E. M. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(25):9482–7.
- [Dikic et al., 2009] Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K. J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. Nature reviews. Molecular cell biology, 10(10):659–671.
- [Distel et al., 1996] Distel, B., Erdmann, R., Gould, S. J., Blobel, G., Crane, D. I., Cregg, J. M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J. M., Just, W. W., Kiel, J. a. K. W., Kunau, W. H., Lazarow, P. B., Mannaerts, G. P., Moser, H. W., Osumi, T., Rachubinski, R. a., Roscher, A., Subramani, S., Tabak, H. F., Tsukamoto, T., Valle, D., Van Der Klei, I., Van Veldhoven, P. P., and Veenhuis, M. (1996). A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. Journal of Cell Biology, 135(1):1–3.
- [Dodt et al., 1995] Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H. W., Watkins, P., Valle, D., and Gould, S. J. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. Nature genetics, 9(2):115–25.
- [Dodt and Gould, 1996] Dodt, G. and Gould, S. J. (1996). Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: Evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. Journal of Cell Biology, 135(6 II):1763–1774.
- [Dodt et al., 2001] Dodt, G., Warren, D., Becker, E., Rehling, P., and Gould, S. J. (2001). Domain Mapping of Human PEX5 Reveals Functional and Structural Similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p. Journal of Biological Chemistry, 276(45):41769–41781.
- [Dougherty, 2000] Dougherty, D. A. (2000). Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. Current opinion in chemical biology, 4(6):645–52.
- [Erdmann, 1994] Erdmann, R. (1994). The peroxisomal targeting signal of 3-oxoacyl-CoA thiolase from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 10(7):935–944.
- [Erdmann and Blobel, 1996] Erdmann, R. and Blobel, G. (1996). Identification of Pex13p, a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. Journal of Cell Biology, 135(1):111–121.
- [Erdmann and Schliebs, 2005] Erdmann, R. and Schliebs, W. (2005). Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. Nature reviews. Molecular cell biology, 6(9):738–42.
- [Erdmann et al., 1991] Erdmann, R., Wiebel, F. F., Flessau, a., Rytka, J., Beyer, a., Fröhlich, K. U., and Kunau, W. H. (1991). PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. Cell, 64(3):499–510.
- [Evans et al., 1998] Evans, T. C., Benner, J., and Xu, M. Q. (1998). Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element. Protein science : a publication of the Protein Society, 7(11):2256–2264.
- [Faber et al., 1998] Faber, K. N., Heyman, J. a., and Subramani, S. (1998). Two AAA family peroxins, PpPex1p and PpPex6p, interact with each other in an ATP-dependent manner and are associated with different subcellular membranous structures distinct from peroxisomes. Molecular and cellular biology, 18(2):936–943.

- [Fodor et al., 2012] Fodor, K., Wolf, J., Erdmann, R., Schliebs, W., and Wilmanns, M. (2012). Molecular requirements for peroxisomal targeting of alanine-glyoxylate aminotransferase as an essential determinant in primary hyperoxaluria type 1. *PLoS biology*, 10(4):e1001309.
- [Fodor et al., 2015] Fodor, K., Wolf, J., Reglinski, K., Passon, D. M., Lou, Y., Schliebs, W., Erdmann, R., and Wilmanns, M. (2015). Ligand-Induced Compaction of the PEX5 Receptor-Binding Cavity Impacts Protein Import Efficiency into Peroxisomes. *Traffic*, 16(1):85–98.
- [Francisco et al., 2013] Francisco, T., Rodrigues, T. a., Freitas, M. O., Grou, C. P., Carvalho, A. F., Sá-Miranda, C., Pinto, M. P., and Azevedo, J. E. (2013). A cargo-centered perspective on the PEX5 receptor-mediated peroxisomal protein import pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40):29151–29159.
- [Freemont, 1993] Freemont, P. S. (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 684:174–92.
- [Freitas et al., 2011] Freitas, M. O., Francisco, T., Rodrigues, T. a., Alencastre, I. S., Pinto, M. P., Grou, C. P., Carvalho, A. F., Franssen, M., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2011). PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47):40509–40519.
- [Furuki et al., 2006] Furuki, S., Tamura, S., Matsumoto, N., Miyata, N., Moser, A., Moser, H. W., and Fujiki, Y. (2006). Mutations in the peroxin Pex26p responsible for peroxisome biogenesis disorders of complementation group 8 impair its stability, peroxisomal localization, and interaction with the Pex1p-Pex6p complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3):1317–1323.
- [Gardner et al., 2015] Gardner, B. M., Chowdhury, S., Lander, G. C., and Martin, A. (2015). The Pex1/Pex6 complex is a heterohexameric AAA+ motor with alternating and highly coordinated subunits. *Journal of molecular biology*, 427(6 Pt B):1375–88.
- [Gasteiger, 2003] Gasteiger, E. (2003). ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13):3784–3788.
- [Gasteiger et al., 2005] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. *The proteomics protocols handbook*, pages 571–607.
- [Gatto et al., 2000a] Gatto, G. J., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., and Berg, J. M. (2000a). A proposed model for the PEX5-peroxisomal targeting signal-1 recognition complex. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 38(3):241–6.
- [Gatto et al., 2000b] Gatto, G. J., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., and Berg, J. M. (2000b). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature structural biology*, 7(12):1091–1095.
- [Girzalsky et al., 2009] Girzalsky, W., Platta, H. W., and Erdmann, R. (2009). Protein transport across the peroxisomal membrane. *Biological Chemistry*, 390(8):745–751.
- [Goto et al., 2011] Goto, S., Mano, S., Nakamori, C., and Nishimura, M. (2011). Arabidopsis ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY9 is a peroxin that recruits the PEX1-PEX6 complex to peroxisomes. *The Plant cell*, 23(4):1573–1587.
- [Gouveia et al., 2003a] Gouveia, A. M., Guimarães, C. P., Oliveira, M. E., Reguenga, C., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2003a). Characterization of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, using a cell-free in vitro import system. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1):226–232.
- [Gouveia et al., 2003b] Gouveia, A. M., Guimarães, C. P., Oliveira, M. E., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2003b). Insertion of Pex5p into the peroxisomal membrane is cargo protein-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7):4389–4392.
- [Gouveia et al., 2000] Gouveia, a. M. M., Reguenga, C., Oliveira, M. E. M., Sa-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2000). Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver: Pex5p in the Pex5p-Pex14p

- membrane complex is a transmembrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42):32444–32451.
- [Grimm et al., 2012] Grimm, I., Saffian, D., Platta, H. W., and Erdmann, R. (2012). The AAA-type ATPases Pex1p and Pex6p and their role in peroxisomal matrix protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823:150–158.
- [Grou et al., 2009a] Grou, C. P., Carvalho, a. F., Pinto, M. P., Alencastre, I. S., Rodrigues, T. a., Freitas, M. O., Francisco, T., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2009a). The peroxisomal protein import machinery—a case report of transient ubiquitination with a new flavor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(2):254–62.
- [Grou et al., 2009b] Grou, C. P., Carvalho, A. F., Pinto, M. P., Huybrechts, S. J., Sa-Miranda, C., Franssen, M., and Azevedo, J. E. (2009b). Properties of the Ubiquitin-Pex5p Thiol Ester Conjugate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16):10504–10513.
- [Grou et al., 2012] Grou, C. P., Francisco, T., Rodrigues, T. a., Freitas, M. O., Pinto, M. P., Carvalho, A. F., Domingues, P., Wood, S. a., Rodríguez-Borges, J. E., Sá-Miranda, C., Franssen, M., and Azevedo, J. E. (2012). Identification of ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) as a deubiquitinase acting on ubiquitin-peroxin 5 (PEX5) thioester conjugate. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16):12815–12827.
- [Halbach et al., 2006] Halbach, A., Landgraf, C., Lorenzen, S., Rosenkranz, K., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R., and Rottensteiner, H. (2006). Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *Journal of cell science*, 119(Pt 12):2508–2517.
- [Hanson and Whiteheart, 2005] Hanson, P. I. and Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(7):519–529.
- [Hazra et al., 2002] Hazra, P. P., Suriapranata, I., Snyder, W. B., and Subramani, S. (2002). Peroxisome remnants in pex3delta cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(8):560–574.
- [Hensel et al., 2011] Hensel, A., Beck, S., El Magraoui, F., Platta, H. W., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2011). Cysteine-dependent Ubiquitination of Pex18p Is Linked to Cargo Translocation across the Peroxisomal Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50):43495–43505.
- [Hicke et al., 2005] Hicke, L., Schubert, H. L., and Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(8):610–21.
- [Hochuli et al., 1987] Hochuli, E., Döbeli, H., and Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of chromatography*, 411:177–84.
- [Hodge et al., 1991] Hodge, V. J., Gould, S. J., Subramani, S., Moser, H. W., and Krisans, S. K. (1991). Normal cholesterol synthesis in human cells requires functional peroxisomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 181(2):537–41.
- [Huhse et al., 1998] Huhse, B., Rehling, P., Albertini, M., Blank, L., Meller, K., and Kunau, W. H. (1998). Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *The Journal of cell biology*, 140(1):49–60.
- [Islinger et al., 2012] Islinger, M., Grille, S., Fahimi, H. D., and Schrader, M. (2012). The peroxisome: An update on mysteries. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(5):547–574.
- [Itoh and Fujiki, 2006] Itoh, R. and Fujiki, Y. (2006). Functional domains and dynamic assembly of the peroxin Pex14p, the entry site of matrix proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15):10196–10205.
- [Iyer et al., 2004] Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2004). Evolutionary

- history and higher order classification of AAA+ ATPases. Journal of Structural Biology, 146(1-2):11–31.
- [Jansen et al., 2004] Jansen, G. a., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. a. (2004). Molecular Basis of Refsum Disease: Sequence Variations in Phytanoyl-CoA Hydroxylase (PHYH) and the PTS2 Receptor (PEX7). Human Mutation, 23(3):209–218.
- [Kalish et al., 1995] Kalish, J. E., Theda, C., Morrell, J. C., Berg, J. M., and Gould, S. J. (1995). Formation of the peroxisome lumen is abolished by loss of *Pichia pastoris* Pas7p, a zinc-binding integral membrane protein of the peroxisome. Molecular and cellular biology, 15(11):6406–6419.
- [Kiel et al., 2005] Kiel, J. a. K. W., Emmrich, K., Meyer, H. E., and Kunau, W. H. (2005). Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. Journal of Biological Chemistry, 280(3):1921–1930.
- [Kiel et al., 1999] Kiel, J. a. K. W., Hilbrands, R. E., Van Der Klei, I. J., Rasmussen, S. W., Salomons, F. a., Van Der Heide, M., Faber, K. N., Cregg, J. M., and Veenhuis, M. (1999). *Hansenula polymorpha* Pex1p and Pex6p are peroxisome-associated AAA proteins that functionally and physically interact. Yeast, 15(11):1059–1078.
- [Kim et al., 2008] Kim, J. A., Cho, K., Shin, M. S., Lee, W. G., Jung, N., Chung, C., and Chang, J. K. (2008). A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. Biosensors and Bioelectronics, 23(9):1353–1360.
- [Kim and Hetteema, 2015] Kim, P. K. and Hetteema, E. H. (2015). Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. J Mol Biol, 427(6, Part A):1176–1190.
- [Klein et al., 2001] Klein, a. T. J., Barnett, P., Bottger, G., Konings, D., Tabak, H. F., and Distel, B. (2001). Recognition of Peroxisomal Targeting Signal Type 1 by the Import Receptor Pex5p. Journal of Biological Chemistry, 276(18):15034–15041.
- [Kolb and Sharpless, 2003] Kolb, H. C. and Sharpless, K. B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. Drug Discov. Today, 8(24):1128–1137.
- [Kunau et al., 1993] Kunau, W. H., Beyer, a., Franken, T., Götte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, a., and Wiebel, F. F. (1993). Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. Biochimie, 75(3-4):209–224.
- [Laemmli et al., 1974] Laemmli, U. K., Teaff, N., and D’Ambrosia, J. (1974). Maturation of the head of bacteriophage T4. III. DNA packaging into preformed heads. Journal of molecular biology, 88(4):749–765.
- [Lametschwandtner et al., 1998] Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J., and Hartig, A. (1998). The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal I between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. Journal of Biological Chemistry, 273(50):33635–33643.
- [Léon et al., 2006] Léon, S., Goodman, J. M., and Subramani, S. (2006). Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: Transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 1763(12):1552–1564.
- [Léon and Subramani, 2007] Léon, S. and Subramani, S. (2007). A conserved cysteine residue of *Pichia pastoris* Pex20p is essential for its recycling from the peroxisome to the cytosol. Journal of Biological Chemistry, 282(10):7424–7430.
- [Lupas and Martin, 2002] Lupas, A. N. and Martin, J. (2002). AAA proteins. Current Opinion in Structural Biology, 12(6):746–753.
- [Ma et al., 2009] Ma, C., Schumann, U., Rayapuram, N., and Subramani, S. (2009). The peroxisomal

- matrix import of Pex8p requires only PTS receptors and Pex14p. Molecular biology of the cell, 20(16):3680–9.
- [Magliano et al., 2011] Magliano, P., Flipphi, M., Arpat, B. a., Delessert, S., and Poirier, Y. (2011). Contributions of the peroxisome and ??-oxidation cycle to biotin synthesis in fungi. Journal of Biological Chemistry, 286(49):42133–42140.
- [Managadze et al., 2010] Managadze, D., Würtz, C., Wiese, S., Schneider, M., Girzalsky, W., Meyer, H. E., Erdmann, R., Warscheid, B., and Rottensteiner, H. (2010). Identification of PEX33, a novel component of the peroxisomal docking complex in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. European Journal of Cell Biology, 89(12):955–964.
- [Marzioch et al., 1994] Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M., and Kunau, W. H. (1994). PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. The EMBO journal, 13(20):4908–4918.
- [Matsumoto et al., 2003a] Matsumoto, N., Tamura, S., and Fujiki, Y. (2003a). The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. Nature cell biology, 5(5):454–460.
- [Matsumoto et al., 2003b] Matsumoto, N., Tamura, S., Furuki, S., Miyata, N., Moser, A., Shimozawa, N., Moser, H. W., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y. (2003b). Mutations in novel peroxin gene PEX26 that cause peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. American journal of human genetics, 73(2):233–246.
- [Matsumura et al., 2000] Matsumura, T., Otera, H., and Fiyiki, Y. (2000). Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pl, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. Journal of Biological Chemistry, 275(28):21715–21721.
- [Matsuzono and Fujiki, 2006] Matsuzono, Y. and Fujiki, Y. (2006). In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p. Journal of Biological Chemistry, 281(1):36–42.
- [Matveeva et al., 1997] Matveeva, E. a., He, P., and Whiteheart, S. W. (1997). N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein contains high and low affinity ATP-binding sites that are functionally distinct. The Journal of biological chemistry, 272(42):26413–26418.
- [Meijer et al., 2010] Meijer, W. H., Gidijala, L., Fekken, S., Kiel, J. a. K. W., Van Den Berg, M. a., Lascaris, R., Bovenberg, R. a. L., and Van Der Klei, I. J. (2010). Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. Applied and Environmental Microbiology, 76(17):5702–5709.
- [Meinecke et al., 2010] Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Krüger, V., Beck, S., Wagner, R., and Erdmann, R. (2010). The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. Nature cell biology, 12(3):273–277.
- [Meldal and Tomøe, 2008] Meldal, M. and Tomøe, C. W. (2008). Cu-catalyzed azide - Alkyne cycloaddition. Chemical Reviews, 108(8):2952–3015.
- [Metzger et al., 2014] Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E., and Weissman, A. M. (2014). RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. Biochimica et biophysica acta, 1843(1):47–60.
- [Minnihan et al., 2009] Minnihan, E. C., Yokoyama, K., and Stubbe, J. (2009). Unnatural amino acids: better than the real things? F1000 biology reports, 1(November):88.
- [Miyata and Fujiki, 2005] Miyata, N. and Fujiki, Y. (2005). Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. Molecular and cellular biology, 25(24):10822–10832.
- [Miyata et al., 2012] Miyata, N., Okumoto, K., Mukai, S., Noguchi, M., and Fujiki, Y. (2012).

- AWP1/ZFAND6 functions in Pex5 export by interacting with cys-monoubiquitinated Pex5 and Pex6 AAA ATPase. *Traffic*, 13(1):168–183.
- [Mukai and Fujiki, 2006] Mukai, S. and Fujiki, Y. (2006). Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49):37311–37320.
- [Müller et al., 1991] Müller, W. H., van der Krift, T. P., Krouwer, A. J., Wösten, H. A., van der Voort, L. H., Smaal, E. B., and Verkleij, A. J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *The EMBO journal*, 10(2):489–95.
- [Mullis and Faloona, 1987] Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155:335–50.
- [Nagotu et al., 2012] Nagotu, S., Kael, V. C., Erdmann, R., and Platta, H. W. (2012). Molecular basis of peroxisomal biogenesis disorders caused by defects in peroxisomal matrix protein import. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9):1326–1336.
- [Natsuyama et al., 2012] Natsuyama, R., Okumoto, K., and Fujiki, Y. (2012). Peroxisome targeting signal type-1 receptor, Pex5p, stabilizes Pex14p: Study using a newly isolated pex5 CHO cell mutant, ZPEG101. *Biochemical Journal*, 207:195–207.
- [Okumoto et al., 2000] Okumoto, K., Abe, I., and Fujiki, Y. (2000). Molecular anatomy of the peroxin Pex12p. Ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33):25700–25710.
- [Okumoto et al., 1998] Okumoto, K., Itoh, R., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tamura, S., Kondo, N., and Fujiki, Y. (1998). Mutations in PEX10 is the cause of Zellweger peroxisome deficiency syndrome of complementation group B. *Human molecular genetics*, 7(9):1399–405.
- [Okumoto et al., 2011] Okumoto, K., Misono, S., Miyata, N., Matsumoto, Y., Mukai, S., and Fujiki, Y. (2011). Cysteine ubiquitination of PTS1 receptor Pex5p regulates Pex5p recycling. *Traffic*, 12(8):1067–1083.
- [Oliveira et al., 2003] Oliveira, M. E., Gouveia, A. M., Pinto, R. a., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2003). The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41):39483–39488.
- [Otera et al., 2000] Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N., and Fujiki, Y. (2000). The mammalian peroxin Pex5pl, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p·PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28):21703–21714.
- [Otera et al., 1998] Otera, H., Okumoto, K., Tateishi, K., Ikoma, Y., Matsuda, E., Nishimura, M., Tsukamoto, T., Osumi, T., Ohashi, K., Higuchi, O., and Fujiki, Y. (1998). Peroxisome targeting signal type 1 (PTS1) receptor is involved in import of both PTS1 and PTS2: studies with PEX5-defective CHO cell mutants. *Molecular and cellular biology*, 18(1):388–399.
- [Otera et al., 2002] Otera, H., Setoguchi, K., Hamasaki, M., Kumashiro, T., Shimizu, N., and Fujiki, Y. (2002). Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. *Molecular and cellular biology*, 22(6):1639–1655.
- [Otzen et al., 2005] Otzen, M., Wang, D., Lunenborg, M. G. J., and van der Klei, I. J. (2005). Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *Journal of cell science*, 118(Pt 15):3409–3418.
- [Patel and Latterich, 1998] Patel, S. and Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in cell biology*, 8(2):65–71.

- [Platta et al., 2009] Platta, H. W., El Magraoui, F., Bäumer, B. E., Schlee, D., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2009). Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Molecular and cellular biology*, 29(20):5505–5516.
- [Platta et al., 2007] Platta, H. W., El Magraoui, F., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2007). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *Journal of Cell Biology*, 177(2):197–204.
- [Platta et al., 2004] Platta, H. W., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2004). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *The Biochemical journal*, 384(Pt 1):37–45.
- [Platta et al., 2005] Platta, H. W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2005). Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nature cell biology*, 7(8):817–822.
- [Platta et al., 2013] Platta, H. W., Hagen, S., and Erdmann, R. (2013). The exportomer: The peroxisomal receptor export machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(8):1393–1411.
- [Platta et al., 2014] Platta, H. W., Hagen, S., Reidick, C., and Erdmann, R. (2014). The peroxisomal receptor dislocation pathway: To the exportomer and beyond. *Biochimie*, 98(1):16–28.
- [Purdue et al., 1998] Purdue, P. E., Yang, X., and Lazarow, P. B. (1998). Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *Journal of Cell Biology*, 143(7):1859–1869.
- [Rehling et al., 1996] Rehling, P., Marzioch, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M., and Kunau, W.-h. (1996). the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *EMBO Journal*, 15(12):2901–2913.
- [Reyes-Turcu et al., 2009] Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., and Wilkinson, K. D. (2009). Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1):363–397.
- [Rodrigues et al., 2014] Rodrigues, T. A., Alencastre, I. S., Francisco, T., Brites, P., Fransen, M., Grou, C. P., and Azevedo, J. E. (2014). A PEX7-Centered Perspective on the Peroxisomal Targeting Signal Type 2-Mediated Protein Import Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 34(15):2917–2928.
- [Rostovtsev et al., 2002] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 41(14):2596–9.
- [Saffian et al., 2012] Saffian, D., Grimm, I., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2012). ATP-dependent assembly of the heteromeric Pex1p-Pex6p-complex of the peroxisomal matrix protein import machinery. *Journal of Structural Biology*, 179(2):126–132.
- [Salic and Mitchison, 2008] Salic, A. and Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7):2415–2420.
- [Schliebs and Saidowsky, 1999] Schliebs, W. and Saidowsky, J. (1999). Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9):5666–5673.
- [Schneider et al., 2013] Schneider, D., Schneider, T., Rösner, D., Scheffner, M., and Marx, A. (2013). Improving bioorthogonal protein ubiquitylation by click reaction. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(12):3430–5.
- [Shimizu et al., 1999] Shimizu, N., Itoh, R., Hirono, Y., Otera, H., Ghaedi, K., Tateishi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Harano, T., Mukai, S., and Fujiki, Y. (1999). The Peroxin Pex14p. *Biochemistry*, 274(18):12593–12604.
- [Shiozawa et al., 2009] Shiozawa, K., Konarev, P. V., Neufeld, C., Wilmanns, M., and Svergun, D. I. (2009). Solution structure of human Pex5.Pex14.PTS1 protein complexes obtained by small angle

- X-ray scattering. The Journal of biological chemistry, 284(37):25334–25342.
- [Shiozawa et al., 2004] Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2004). Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase: Characterization of a putative adaptor-binding domain. Journal of Biological Chemistry, 279(48):50060–50068.
- [Sichting et al., 2003] Sichting, M., Schell-Steven, A., Prokisch, H., Erdmann, R., and Rottensteiner, H. (2003). Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes. Molecular biology of the cell, 14(2):810–21.
- [Sommer et al., 2011] Sommer, S., Weikart, N. D., Brockmeyer, A., Janning, P., and Mootz, H. D. (2011). Expanded click conjugation of recombinant proteins with ubiquitin-like modifiers reveals altered substrate preference of SUMO2-modified Ubc9. Angewandte Chemie - International Edition, 50(42):9888–9892.
- [Stanley et al., 2006] Stanley, W. a., Philipp, F. V., Kursula, P., Schüller, N., Erdmann, R., Schliebs, W., Sattler, M., and Wilmanns, M. (2006). Recognition of a Functional Peroxisome Type 1 Target by the Dynamic Import Receptor Pex5p. Molecular Cell, 24(5):653–663.
- [Tamura et al., 2014] Tamura, S., Matsumoto, N., Takeba, R., and Fujiki, Y. (2014). AAA peroxins and their recruiter Pex26p modulate the interactions of peroxins involved in peroxisomal protein import. The Journal of biological chemistry, 289(35):24336–24346.
- [Tamura et al., 1998] Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., and Fujiki, Y. (1998). A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p. Biochemical and biophysical research communications, 245(3):883–886.
- [Tamura et al., 2006] Tamura, S., Yasutake, S., Matsumoto, N., and Fujiki, Y. (2006). Dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p. Journal of Biological Chemistry, 281(38):27693–27704.
- [Tan et al., 2015] Tan, D., Blok, N. B., Rapoport, T. a., and Walz, T. (2015). Structures of the double-ring AAA ATPase Pex1/Pex6 involved in peroxisome biogenesis. FEBS Journal, pages n/a–n/a.
- [Tanabe et al., 2011] Tanabe, Y., Maruyama, J. I., Yamaoka, S., Yahagi, D., Matsuo, I., Tsutsumi, N., and Kitamoto, K. (2011). Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry, 286(35):30455–30461.
- [Terlecky et al., 1995] Terlecky, S. R., Nuttley, W. M., McCollum, D., Sock, E., and Subramani, S. (1995). The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. The EMBO journal, 14(15):3627–3634.
- [Thundimadathil, 2013] Thundimadathil, J. (2013). Click chemistry in peptide science: a mini-review. Oligos & Peptides - Chimica Oggi - Chemistry Today, 31(2):34–37.
- [Titorenko et al., 1998] Titorenko, V. I., Smith, J. J., Szilard, R. K., and Rachubinski, R. A. (1998). Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. The Journal of cell biology, 142(2):403–20.
- [Tolbert and Essner, 1981] Tolbert, N. E. and Essner, E. (1981). Microbodies: Peroxisomes and glyoxysomes. Journal of Cell Biology, 91(3 II).
- [Tornøe et al., 2002] Tornøe, C. W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. Journal of Organic Chemistry, 67(9):3057–3064.
- [Toyama et al., 1999] Toyama, R., Mukai, S., Itagaki, a., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Wanders, R. J., and Fujiki, Y. (1999). Isolation, characterization and mutation analysis of PEX13-defective Chinese hamster ovary cell mutants. Human molecular genetics, 8(9):1673–1681.

- [Tsukamoto et al., 1991] Tsukamoto, T., Miura, S., and Fujiki, Y. (1991). Restoration by a 35K membrane protein of peroxisome assembly in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant. *Nature*, 350(6313):77–81.
- [Uchiyama and Kondo, 2005] Uchiyama, K. and Kondo, H. (2005). p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *Journal of biochemistry*, 137(2):115–9.
- [Vale, 2000] Vale, R. D. (2000). AAA proteins: Lords of the ring. *Journal of Cell Biology*, 150(1):13–19.
- [Wals and Ovaa, 2014] Wals, K. and Ovaa, H. (2014). Unnatural amino acid incorporation in *E. coli*: current and future applications in the design of therapeutic proteins. *Frontiers in chemistry*, 2(April):15.
- [Walton et al., 1995] Walton, P. a., Hill, P. E., and Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Molecular biology of the cell*, 6(6):675–683.
- [Wanders, 2004] Wanders, R. J. a. (2004). Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *American journal of medical genetics. Part A*, 126A(4):355–375.
- [Wang et al., 2003] Wang, D., Visser, N. V., Veenhuis, M., and van der Klei, I. J. (2003). Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*, 278(44):43340–43345.
- [Wang et al., 2001] Wang, L., Brock, a., Herberich, B., and Schultz, P. G. (2001). Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5516):498–500.
- [Waterham and Ebberink, 2012] Waterham, H. R. and Ebberink, M. S. (2012). Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(9):1430–1441.
- [Weikart and Mootz, 2010] Weikart, N. D. and Mootz, H. D. (2010). Generation of site-specific and enzymatically stable conjugates of recombinant proteins with ubiquitin-like modifiers by the Cu<sup>+</sup>-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *ChemBioChem*, 11(6):774–777.
- [Wendler et al., 2012] Wendler, P., Ciniawsky, S., Kock, M., and Kube, S. (2012). Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(1):2–14.
- [White and Lauring, 2007] White, S. R. and Lauring, B. (2007). AAA+ ATPases: Achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic*, 8(12):1657–1667.
- [Will et al., 1999] Will, G. K., Soukupova, M., Hong, X., Erdmann, K. S., Kiel, J. a., Dodt, G., Kunau, W. H., and Erdmann, R. (1999). Identification and characterization of the human orthologue of yeast Pex14p. *Molecular and cellular biology*, 19(3):2265–2277.
- [Williams et al., 2008] Williams, C., van den Berg, M., Geers, E., and Distel, B. (2008). Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(4):620–624.
- [Woodward and Bartel, 2005] Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005). The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Molecular biology of the cell*, 16(2):573–583.
- [Yahraus et al., 1996] Yahraus, T., Braverman, N., Dodt, G., Kalish, J. E., Morrell, J. C., Moser, H. W., Valle, D., and Gould, S. J. (1996). The peroxisome biogenesis disorder group 4 gene, PXAAA1, encodes a cytoplasmic ATPase required for stability of the PTS1 receptor. *The EMBO journal*, 15(12):2914–2923.
- [Ye, 2006] Ye, Y. (2006). Diverse functions with a common regulator: Ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *Journal of Structural Biology*, 156(1):29–40.
- [Young et al., 2010] Young, T. S., Ahmad, I., Yin, J. a., and Schultz, P. G. (2010). An Enhanced

System for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in E. coli. Journal of Molecular Biology, 395(2):361–374.

# 7 Anhang

