

Peroxisomen

Proteinimport in die peroxisomale Matrix – ein Prozess nimmt Form an

ASTRID HENSEL, WOLFGANG GIRZALSKY, RALF ERDMANN
INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, ABTEILUNG SYSTEMBIOCHEMIE,
RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

In Peroxisomen laufen zahlreiche, für die Zelle wichtige Stoffwechselprozesse ab. Dieser Artikel beschäftigt sich mit der Frage, wie die Kern-codierten peroxisomalen Enzyme in die Organellenmatrix gelangen.

Many important metabolic pathways occur in peroxisomes. This article deals with the question of how peroxisomal enzymes, which are encoded in the nucleus, reach the peroxisomal matrix.

Das Peroxisom – ein vielseitiges Organell

■ Peroxisomen sind von einer Lipiddoppelschicht umgebene Zellorganellen, die ubiquitär in allen Eukaryotenzellen vorkommen. Ihren Namen erhielten sie aufgrund der Präsenz mindestens einer H_2O_2 -produzierenden Oxidase sowie einer detoxifizierenden Katalase [1]. Alle Peroxisomen weisen ein komplettes β -Oxidationssystem auf. In Pflanzen und Hefen werden Fettsäuren ausschließlich peroxisomal metabolisiert, während in tierischen Peroxisomen nur sehr langkettige Fettsäuren oxidiert werden.

Neben diesen allgemeinen Charakteristika können Peroxisomen, abhängig vom Organismus, dem Gewebetyp und den Umweltbedingungen, in viele weitere Stoffwechselwege involviert sein, zu denen unter anderem die Cholesterin-, Plasmalogen- und Gallensäurebiosynthese der Säugetierzelle, der Glyoxylat-Zyklus der Pflanzen und die Penicillinbiosynthese einiger filamentöser Pilze gehören [2].

Peroxisomale Zielsequenzen werden erkannt und zur peroxisomalen Membran dirigiert

Peroxisomen besitzen weder eigene DNA, noch verfügen sie über eine Translationsmaschinerie. Dies impliziert, dass alle peroxisomalen Matrixproteine kern-codiert sind und nach der Synthese an freien Ribosomen zu ihrem Zielorganell dirigiert werden [3]. Dazu

sind sie mit sogenannten peroxisomalen *targeting*-Signalen (PTS) ausgestattet. Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen an ihrem extremen C-Terminus ein PTS1-Motiv [4], ein konserviertes Tripeptid, welches im Zytosol von dem peroxisomalen

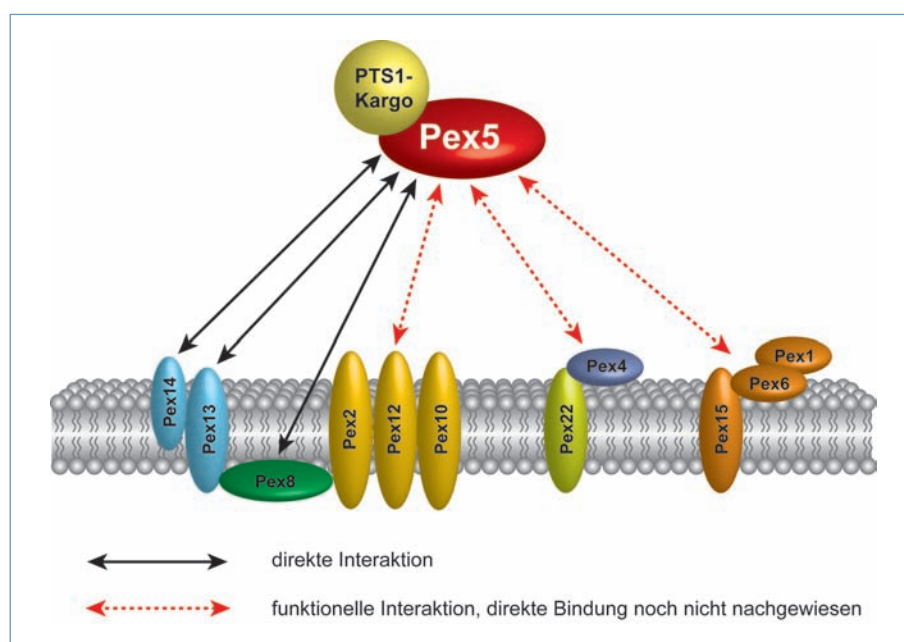
Rezeptor-Peroxin Pex5p erkannt und gebunden wird.

Mit geringerer Häufigkeit ist das peroxisomale *targeting*-Signal 2 (PTS2) vertreten. Hierbei handelt es sich um ein in seiner Sequenz konserviertes Nonapeptid im N-Terminus der Kargoproteine. Als zuständiger Rezeptor wurde Pex7p identifiziert.

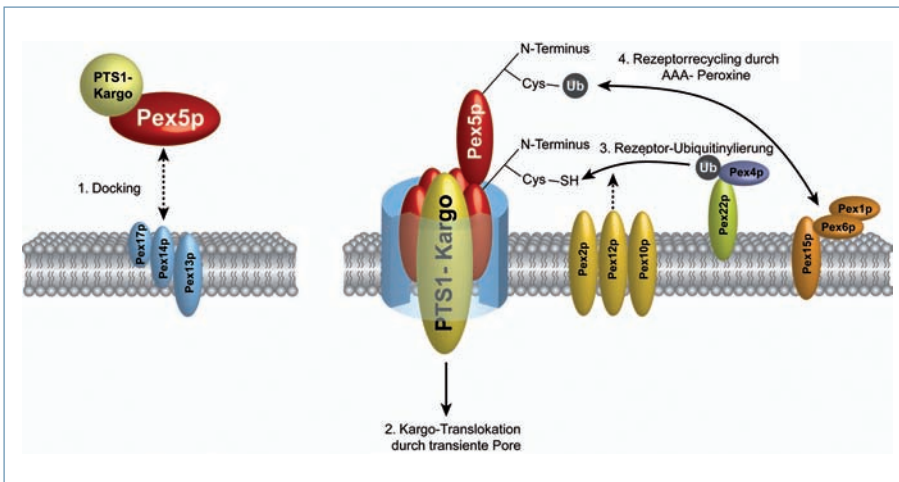
Im Unterschied zu Pex5p benötigt Pex7p noch Ko-Rezeptoren. In *Saccharomyces cerevisiae* wird diese Aufgabe beispielsweise von den funktionell redundanten Proteinen Pex18p und Pex21p ausgeübt.

Ubiquitinierungsprozesse regulieren den Rezeptorzyklus

Sowohl für Pex5p als auch für Pex7p und die PTS2-Ko-Rezeptoren konnte eine duale Verteilung zwischen Zytosol und Peroxisom nachgewiesen werden. Dieser Befund lässt sich



▲ **Abb. 1:** Interaktionsnetzwerk des PTS1-Rezeptors Pex5p mit dem peroxisomalen Importomer. Pex5p geht mit vielen Proteinen des peroxisomalen Importomers direkte oder funktionelle Interaktionen ein: Innerhalb von Pex13p und Pex14p gibt es mehrere Pex5p-Bindestellen, auch mit Pex8p kann der PTS1-Rezeptor direkt interagieren. Für die Ubiquitin-Ligasen Pex2p und Pex12p sowie für das Ubiquitin-konjugierende Enzym Pex4p stellt Pex5p ein spezifisches Substrat dar, ebenso für die AAA-Peroxine Pex1p und Pex6p, die als Translokasen fungieren.



▲ **Abb. 2:** Modell der transienten Importpore. Pex5p dirigiert Kargoproteine zur Peroxisomenoberfläche und inseriert als Rezeptor-Kargo-Komplex in die peroxisomale Membran, wodurch eine temporäre Importpore formiert wird. Den Docking-Peroxinen Pex13p, Pex14p und Pex17p wird dabei eine Funktion als Porenregulator bzw. -stabilisator zugewiesen. Die Disassemblierung der Pore wird vermutlich durch eine Pex4p-vermittelte Ubiquitylierung von Pex5p initiiert. Hierbei fungieren die „RING“-Peroxine Pex2p, Pex10p und Pex12p als Ubiquitin-Ligasen. Der ubiquitylierte Rezeptor wird dann durch Pex1p und Pex6p in das Zytosol exportiert.

mit dem heute allgemein akzeptierten Modell der zyklisierenden Rezeptoren erklären. Dieses postuliert, dass die PTS-Rezeptoren nach der Anlieferung der Kargoproteine zur peroxisomalen Membran wieder in das Zytosol „exportiert“ werden, um für eine neue Runde des Matrixproteinimports zur Verfügung zu stehen.

Im Rezeptorzyklus spielen Ubiquitinmodifikationen des Rezeptors eine entscheidende Rolle. Dabei treten zwei verschiedene Arten der Ubiquitylierung auf [5]: Eine Polyubiquitylierung markiert Pex5p zur proteasomalen Degradation und stellt damit eine Qualitätskontrolle dar. Unter Normalbedingungen wird Pex5p dagegen monoubiquityliert, was vermutlich als Erkennungssignal für die Recyclingmaschinerie dient. Beide Modifikationsformen ermöglichen eine Entfernung des PTS-Rezeptors von der peroxisomalen Membran [6].

Importkomponenten an der peroxisomalen Membran und deren Interaktionsnetzwerk mit Pex5p

Die löslichen Rezeptoren binden die PTS-haltigen Kargoproteine im Zytosol und dirigieren sie zur peroxisomalen Membran. Dort sind eine Reihe weiterer Importkomponenten lokalisiert, die allesamt für einen funktionellen Matrixproteinimport essenziell sind.

Den initialen Kontakt mit der peroxisomalen Membran erfahren die Kargo-beladenen PTS-Rezeptoren durch Anbindung an den sogenannten Docking-Komplex, bestehend

aus Pex13p, Pex14p und in der Hefe zusätzlich Pex17p. Die Docking-Komponenten und die PTS-Rezeptoren bilden ein komplexes Interaktionsnetzwerk aus: Pex13p und Pex14p sind in der Lage, über mehrere Kontaktpunkte miteinander zu interagieren, und weisen zudem auch mehrere Interaktionsbereiche für die PTS-Rezeptoren auf [7].

Pex8p ist ein mit der Innenseite der peroxisomalen Membran assoziiertes Peroxin, welches in *S. cerevisiae* den Docking-Komplex mit einem weiteren essenziellen Membran-komplex, dem sogenannten „RING-Finger“-Komplex (*really interesting new gene*) verknüpft. Pex8p ist das einzige Peroxin, das sowohl ein PTS1- als auch ein PTS2-Motiv besitzt. Da es zudem in der Lage ist, mit Pex5p und Pex7p zu wechselwirken, wird eine Funktion in der Kargo-Dissoziation postuliert [8]. Für die RING-Peroxine konnte eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität demonstriert werden. Als spezifisches Substrat von Pex2p und Pex12p wurde Pex5p identifiziert, wobei Pex2p die Polyubiquitylierung vermittelt, während Pex12p im Zusammenspiel mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Pex4p für die Monoubiquitylierung des Rezeptors verantwortlich ist [9].

Pex1p und Pex6p zählen zur Familie der AAA (*ATPases associated with various cellular activities*)-Proteine. Ihre Anbindung an die peroxisomale Membran erfolgt über das integrale Membran-Peroxin Pex15p bzw. das orthologe Pex26p in Säugerzellen. Die AAA-ATPasen sind als Dislokasen in den ATP-ver-

brauchenden Rezeptor-Recyclingschritt involviert, indem sie die Pex5p-Freisetzung von der peroxisomalen Membran zurück in das Zytosol bewirken [10].

Ein bemerkenswertes Charakteristikum der membranständigen peroxisomalen Importmaschinerie ist die Tatsache, dass alle Subkomplexe in Kontakt mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p treten (**Abb. 1**).

Der Translokationsschritt von Matrixproteinen über die peroxisomale Membran

Nachdem die *player* des peroxisomalen Matrixproteinimports nun identifiziert und ihre Wechselwirkungen untereinander recht gut charakterisiert sind, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Kargotranslokation.

Lange Zeit galt der Prozess der peroxisomalen Matrixprotein-Translokation als Mysterium. Im Unterschied zu Mitochondrien, die ihre Proteine im entfalteten Zustand importieren, sind Peroxisomen in der Lage, native und oligomerisierte Proteine über ihre Lipiddoppelschicht zu schleusen [11]. Dieses Phänomen ist beispielsweise auch für den Zellkern bekannt, der allerdings auch dementsprechend große permanente Porenstrukturen in der Kernmembran besitzt. In peroxisomalen Membranen konnten bisher dagegen keine permanenten Translokationsporen oder Importkanäle nachgewiesen werden.

Vor Kurzem konnte das Rätsel um den peroxisomalen Proteinimport gelöst werden. Aktuelle Daten belegen, dass aus Hefemembranen isolierte Pex5p-Komplexe nach Rekonstitution in artifiziellen Liposomen elektrophysiologisch detektierbare Poren ausbilden können [12].

Das Novum an diesen Poren ist, dass sie nicht permanent durchlässig sind, sondern ihre Öffnung durch die Zugabe von Kargobeladenem Rezeptor induzierbar ist. Es konnten variable Porendurchmesser von bis zu neun Nanometer gemessen werden. Vermutlich ist die Pore so flexibel, um sich den Anforderungen der jeweiligen Kargolieferung anzupassen.

Die nächste spannende Frage ist nun, welche Proteinkomponenten die transiente peroxisomale Importpore formieren. Der isolierte Pex5p-Komplex enthielt neben Pex5p unter anderem Pex14p, in geringen Mengen Pex13p und weitere Komponenten der membranständigen Importmaschinerie.

Die PTS-Rezeptoren selbst sind heiße Kandidaten für das Poren-formende Protein. Dafür

sprechen mehrere Indizien: Zum einen konnte für die PTS-Rezeptoren eine partiell peroxisomale Lokalisation gezeigt werden, zum anderen verhält sich eine Subpopulation von Pex5p wie ein integrales Membranprotein. Hinzu kommt auch die Fähigkeit von Pex5p zur Homooligomerisation sowie seine Eigenschaft, mit vielen Membran-Peroxinen zu interagieren.

Es wird aktuell von dem Modell ausgegangen (**Abb. 2**), dass Pex5p in die peroxisomale Membran inseriert wird und dadurch selbst die Hauptkomponente der Translokationspore ausbildet [12], analog dem Wirkprinzip Poren-formender Toxine, die sich als lösliche Proteine in Membranen einlagern und durch eine Konformationsänderung Membrandurchspannende Poren formieren.

Dem Docking-Komplex wird in diesem Modell eine Funktion als Porenregulator bzw. -stabilisator zugewiesen. Durch die Pex5p-Ubiquitinierung und die Dislokase-Aktivität der AAA-Peroxine wird die Rezeptorfreisetzung und dadurch die Poren-Disassemblierung reguliert.

Bis dato ist allerdings nicht bekannt, wie die Prozesse Matrixprotein-Translokation und Rezeptorrecycling chronologisch anzuordnen sind. Es wäre denkbar, dass die Rezeptorfreisetzung von der Membran mit dem Kargo-Translokationsschritt gekoppelt ist. ■

- [5] Girzalsky W, Platta HW, Erdmann R (2009) Protein transport across the peroxisomal membrane. *Biol Chem* 390:745–751
- [6] Platta HW, El Magraoui F, Schlee D et al. (2007) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *Mol Cell Biol* 29:5509–5516
- [7] Rayapuram N, Subramani S (2006) The importomer – a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim Biophys Acta* 1763:1613–1619
- [8] Wang D, Visser NV, Veenhuis M et al. (2003) Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 278:43340–43345
- [9] Platta HW, El Magraoui F, Bäumer BE et al. (2009) Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *J Cell Biol* 177:197–204
- [10] Platta HW, Grunau S, Rosenkranz K et al. (2005) Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* 7:817–822
- [11] McNew JA, Goodman JM (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J Cell Biol* 127:1245–1257
- [12] Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W et al. (2010) The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nature Cell Biol* 12:273–277

Literatur

- [1] DeDuve C, Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46:323–357
- [2] Tolbert NE, Essner E (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* 91:271–283
- [3] Lazarow PB, Fujiki Y (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann Rev Cell Biol* 1:489–530
- [4] Gould SJ, Keller GA, Hosken N et al. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108:1657–1664

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ralf Erdmann
Ruhr-Universität Bochum
Medizinische Fakultät
Institut für Physiologische Chemie
D-44780 Bochum
Tel.: 0234-3224943
Fax: 0234-3214266
Ralf.Erdmann@rub.de

AUTOREN



Astrid Hensel

Jahrgang 1982. 2001–2004 B. Sc. (Biochemie) an der Ruhr-Universität Bochum. 2004–2006 M. Sc. (Biochemie) an der Ruhr-Universität Bochum. Seit 2006 Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erdmann.



Wolfgang Girzalsky

Jahrgang 1968. 1996 Diplom und 1999 Promotion an der Ruhr-Universität Bochum. 1999–2003 Postdoktorat bei Prof. Dr. Kunau in Bochum. Seit 2003 Arbeitsgruppen-Leiter am Institut für Physiologische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum.



Ralf Erdmann

1986 Diplom und 1989 Promotion an der Ruhr-Universität Bochum. 1991–1995 Postdoktorat an der Rockefeller Universität New York, USA. 1997 Habilitation an der Ruhr-Universität Bochum. 1998–2002 Professur für Biochemie an der FU Berlin. Seit 2002 Professur für Physiologische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum.