

Peroxisomenbiogenese: Peroxine und Präimpxe

Sven Thoms und Ralf Erdmann,

Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum

► Noch vor wenigen Jahren bestand wenig Zweifel, dass Peroxisomen in der Zelle mechanistisch ähnlich gebildet werden wie Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum. Inzwischen ist klar, dass die peroxisomale Importmaschinerie, im Unterschied zu anderen Organellen, gefaltete Proteine, sogar ganze Proteinkomplexe importieren kann, und vielleicht sogar muss.

Omnis peroxisoma e peroxisoma?

Bislang beschränkten sich die Hinweise auf die Vermehrung und Vererbung von Peroxisomen durch Teilung auf die Interpretation elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Mit Hilfe der zeitaufgelösten Analyse fluoreszent markierter Peroxisomen konnten HOEPFNER *et al.* (2001) nun zeigen, dass Peroxisomen von Peroxisomen abstammen und es einen geregelten Mechanismus ihrer Vererbung gibt (Abb. 1). Je geringer die Kopienzahl eines Organells ist, desto weniger kann sich das Organell dabei auf eine statistische Verteilung verlassen. Es muss also einen gere-

gelten Mechanismus nicht nur der Zellteilung, sondern auch der Organellenvererbung geben. HOEPFNER *et al.* (2001) zeigten, dass das Actin-Cytoskelett und ein Myosin, sowie das Dynamin-Homologe Vps1p bei der Verteilung der Peroxisomen in die Tochterzelle eine wichtige Rolle spielen.

Die Tatsache, dass Peroxisomen von Peroxisomen abstammen schließt allerdings die Möglichkeit einer de-novo-Synthese von Peroxisomen unter bestimmten Bedingungen nicht aus. So können Mutanten, in denen weder Peroxisomen noch peroxisomale Reststrukturen nachweisbar sind, nach funktioneller Komplementation neue Peroxisomen bilden. Nach einer kontrovers diskutierten Vorstellung gibt es einen, von bislang unerkannten Endomembranen ausgehenden Transport von Vesikeln zu den Peroxisomen. Gestützt wird diese Annahme durch die Isolierung verschiedener Peroxisomenpopulationen aus *Yarrowia lipolytica*, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden und ATP-abhängig fusionieren (TITORENKO und RACHUBINSKI, 2001).

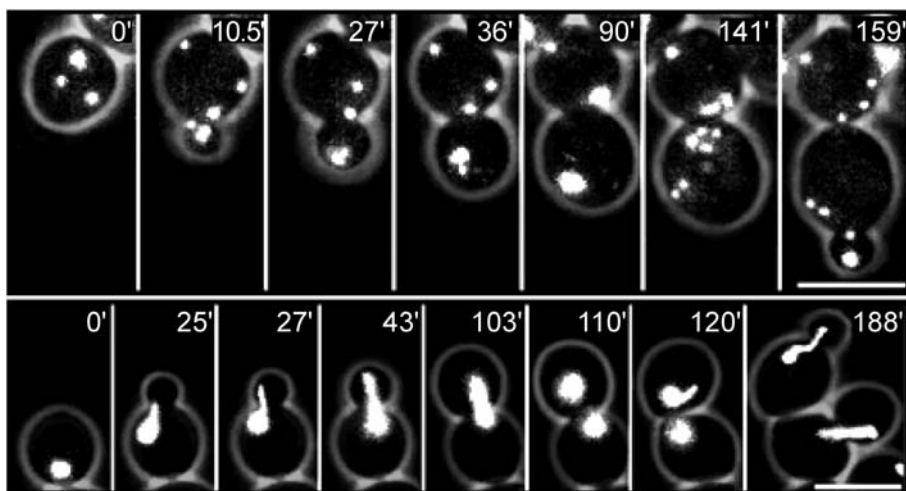


Abb. 1: Teilung von Peroxisomen im Verlauf des Zellzyklus der Hefe *S. cerevisiae*. Peroxisomen wurden durch GFP-PTS1 sichtbar gemacht und fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Die obere Serie zeigt die Teilung und Verteilung von Peroxisomen in Wildtyp-Zellen. Nach der Knospung begeben sich einige Peroxisomen in die Tochterzelle und sammeln sich an der Spitze der Knospe. Die untere Serie zeigt die Teilung eines Peroxisoms in einer Zelle, die das Dynamin-ähnliche Protein Vps1p fehlt. Das Peroxisom streckt sich in die Tochterzelle hinein und teilt sich während der Zellteilung. Bereits kurz nach der Teilung des Peroxisoms bildet sich erneut die elongierte Vererbungsstruktur. Wegen der Vps1p-Deletion hat die Zelle nur ein einziges, vergrößertes Peroxisom, das sich verzögert teilt. GFP, grün fluoreszierendes Protein. PTS, peroxisomales Targeting-Signal. Größenmaßstab 5 µm. (aus Hoepfner *et al.*, 2001).

Sequenzielle Protein-Protein-Interaktionen beim Proteinimport

Nach der aktuellen Vorstellung werden alle peroxisomalen Proteine an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und post-translational in Peroxisomen importiert. Für Membran- und Matrixproteine gibt es dabei verschiedene Importwege (ERDMANN und BLOBEL, 1996).

Wie gelangen die peroxisomalen Enzyme in das Peroxisom? Matrixproteine tragen eines von zwei peroxisomalen Targeting-Signalen (PTS), eine C-terminale Sequenz aus drei Aminosäuren im Fall von PTS1 oder ein N-terminales Peptid aus neun Aminosäuren im Fall von PTS2. Die Proteine mit Import-Signal binden bereits im Cytosol einen löslichen Rezeptor: Pex5p für PTS1 oder Pex7p für PTS2. Diese Kargo-Rezeptor-Komplexe binden daraufhin an die membranständige Docking-Maschinerie, die aus den Peroxinen Pex14p, Pex13p und Pex17p (Komplex I) besteht. Pex8p und der RING-Komplex (Komplex II) aus den integralen Membranproteinen Pex10p, Pex12p und Pex2p spielen bei den auf das Docking folgenden Schritten eine Rolle. Der Mechanismus der eigentlichen Translokation ist immer noch rätselhaft. Es ist nicht klar, wie die eigentliche Translokationsmaschinerie zusammengesetzt ist, ob sich eine Membranpore bildet, oder ob der Import eine Art Endozytose darstellt. Im Unterschied zum Import in den Kern, bei dem die Kargo-Proteine zunächst auch lösliche Rezeptoren binden, gibt es in Peroxisomen keine Struktur, die Ähnlichkeit mit einer Kernpore hätte. An einer späteren Phase des Imports sind das Ubiquitin-konjugierende Enzym Pex4p mit seinem Membranrezeptor Pex22p und die ATPasen Pex1p und Pex6p beteiligt. Der peroxisomale Import lässt sich als eine Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen darstellen, in deren Verlauf Kargo-beladene Rezeptoren von einer Komponente der Importmaschinerie zur nächsten gelangen. Die zeitlich aufeinander folgenden Abschnitte dieser Importkaskade sind: Kargo-Rezeptor-Bindung, Docking, Translokation und Rezeptor-Recycling (Abb. 2; HOLROYD und ERDMANN, 2001).

Kargo-Rezeptor-Multi-Oligomerisierung

In Säugerzellen gibt es zwei Pex5p-Isoformen, Pex5S (das funktionelle Homologe zu Pex5p) und Pex5L, das an den Pex7p-PTS2-Komplex bindet und den PTS2-Weg so in den PTS1-Weg überführt. Weil das Pex18p der Bäckerhefe dem Pex5L ähnelt, konnte man annehmen, dass Pex18p (oder das gegen Pex18p austauschbare Pex21p) analog als Adapter für die Anbindung des Rezep-

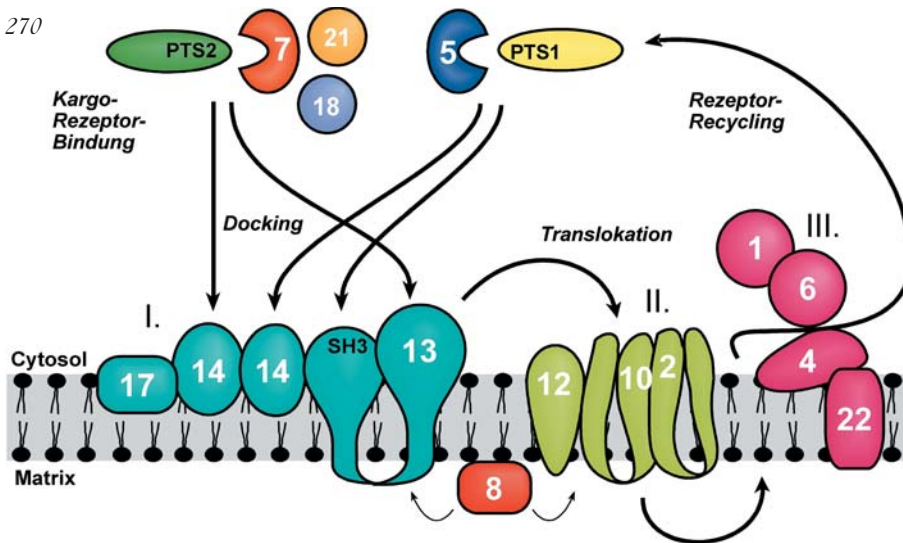


Abb. 2: Sequenzielle Protein-Protein-Interaktionen beim Import von Matrixproteinen in Peroxisomen. Kargo-Rezeptor-Bindung: Proteine mit Importsignal PTS1 oder PTS2 assoziieren mit den zugehörigen Rezeptoren Pex5p und Pex7p. Docking: Wahrscheinlich bindet der Rezeptor zunächst an Pex14p und erst im entladenen Zustand an Pex13p. Pex7p bindet an Pex14p und an die N-terminale Domäne von Pex13p. Der aus den RING-Proteinen Pex10p, Pex12p und Pex2p bestehende Komplex II und das intraperoxisomale Pex8p könnten an der eigentlichen Translokation beteiligt sein und Komplex III, bestehend aus den Peroxinen Pex4p, Pex22p, Pex1p und Pex6p am Recycling der Rezeptoren.

plexen zusammenlagern. In diesen Komplexen befanden sich weitere Matrixproteine, die sich nach dem Import aus dem Verband lösten. Es scheint so, als würden sich Matrixproteine vor dem Import zu einem großen Proteinkomplex zusammenlagern, um in das Peroxisom zu gelangen.

Kombinatorische Vielfalt in Präimplexen

Die Import-Fähigkeiten von Peroxisomen sind erstaunlich: Sie können gefaltete und oligomere Proteine aufnehmen. Peroxisomen importieren sogar Gold-Partikel, wenn sie mit einer PTS-Sequenz beschichtet werden (WALTON *et al.*, 1995).

Der Rezeptor Pex5p kann zwar nur ein PTS1-tragendes Protein direkt binden, Pex5p bildet aber Tetramere (SCHLIEBS *et al.*, 1999). Zudem sind die meisten, wenn nicht alle peroxisomalen Matrixproteine Oligomere. Es können sich also große Aggregate aus Rezeptor und Import-Substrat bilden,

tor-PTS2-Komplexes an den Docking-Komplex fungiert. STEIN *et al.* (2002) konnten allerdings zeigen, dass Pex7p unabhängig von PEX18p-21p an die Docking-Komponenten Pex13p und Pex14p bindet. Obwohl das PTS2-Substrat Thiolase direkt an den Rezeptor Pex7p bindet und Pex7p wiederum direkt an den Dockingkomplex binden kann, braucht die effiziente Assoziation von Thiolase mit dem Docking-Komplex *in vivo* die Anwesenheit von Pex18p oder Pex21p. Pex18p-21p aus *S. cerevisiae* verhält sich damit ähnlich wie Pex20p aus *Yarrowia lipolytica*, welches die Oligomerisierung von Thiolase vermittelt, die möglicherweise eine notwendige Voraussetzung für deren Import ist. Frühe Hinweise auf ein solches Szenario findet sich bei BELLION und GOODMAN (1987). Sie beobachteten, dass die im Cytosol synthetisierten Enzyme sich bereits kurz nach ihrer Synthese und vor dem Transfer ins Peroxisom zu großen Proteinkom-

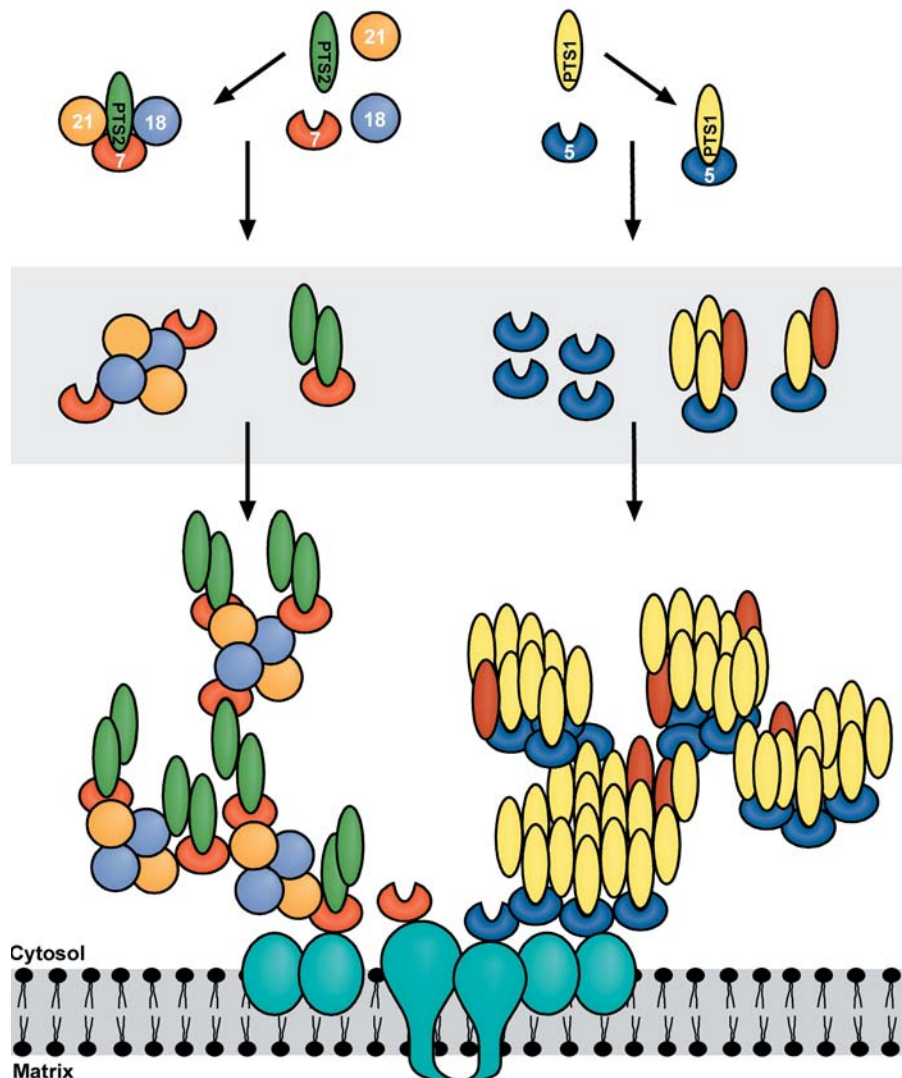


Abb. 3: Präimplex-Hypothese. Die PTS1-Rezeptoren tetramersieren und binden oligomere Substrate, so dass sich vor dem Import Aggregate an Komplex I bilden. Die rot-braun dargestellten Kargoproteine sind blinde Passagiere. Sie werden mit den PTS1-Enzymen importiert, ohne selbst ein PTS zu tragen. Der PTS2-Rezeptor kann, vermittelt durch Pex18p und Pex21p ebenfalls oligomerisieren und oligomere Importsubstrate binden. Da sowohl die Importsubstrate als auch die löslichen Rezeptoren, sogar der membranständige Dockingkomplex oligomerisieren, ergibt sich eine Vielzahl von kombinatorischen Möglichkeiten, von denen in der Abbildung nur ein kleiner Teil dargestellt ist. Nach diesem Modell ist die Kargo-Rezeptor-Oligomerisierung ein wesentlicher Schritt für den peroxisomalen Proteinimport.

weil die zu importierenden Enzyme mit mehreren Import-Rezeptoren interagieren können, und die tetrameren Import-Rezeptoren mehrere Enzym-Oligomere binden (Abb. 3). Die Möglichkeiten werden noch dadurch vergrößert, dass auch Pex14p aus dem Dockingkomplex als Oligomer vorliegt.

Der PTS2-Rezeptor Pex7p homo-oligomerisiert anscheinend nicht. Hier kommen Pex18p und Pex21p ins Spiel. Sie binden sowohl einander als auch Pex7p. STEIN *et al.* (2002) zeigten, dass der PTS2-Rezeptor bei einem Block des Imports mit großen Mengen an Thiolase assoziiert ist. In Abwesenheit von Pex18p und Pex21p bindet Pex7p hingegen nur wenig Thiolase. Pex18p und Pex21p könnten also die Oligomerisierungsfaktoren für Kargo-beladenes Pex7p sein. Man kann sich so leicht vorstellen, dass die Import-Komplexe Oligomere höherer Ordnung bilden, eine Art von Aggregat oder Netzwerk (Abb. 3). Da sich diese Aggregate vor dem Import bilden, wurden sie auch *Präimplete* genannt, kurz für ‚Prä-Import-Komplexe‘ (GOULD *und* COLLINS, 2002). Möglicherweise ist die Bildung von solchen komplexen Aggregaten sogar die Voraussetzung für den Import der peroxisomalen Enzyme (ECKERT *und* ERDMANN, 2003).

Die letzten Schritte

Es bleibt zu klären wie die oligomerisierten Kargo-Rezeptor-Komplexe über die peroxisomale Membran gelangen. Sollte sich die beschriebene Multi-Oligomerisierung als eine notwendige Voraussetzung für den peroxisomalen Proteinimport erweisen, wird die Existenz eines Transmembrantransports über ein Kanalprotein oder eine Pore weniger wahrscheinlich. Es sei denn, bereits vor dem Import oder während des Importes würden die Präimplete wieder aufgelöst. Welchen Sinn hätte dann aber die vorausgegangene Assemblierung? Pex1p und Pex6p könnten an einer Dissoziation der Präimplete beteiligt sein. Beide Peroxine gehören zu den AAA-Proteinen (ERDMANN *et al.*, 1991). Das sind Chaperone, die Proteinkomplexe disassemblieren oder Proteinkonformationen verändern können. Diese beiden AAA-Peroxine sind die einzigen bekannten ATPasen der peroxisomalen Proteinimport-Maschinerie, dürften also für die ATP-Abhängigkeit des Imports verantwortlich sein.

Sollte keine Disassemblierung der Präimplete stattfinden, dann erinnert der peroxisomale Import an den Autophagozytose-artigen Import der Aminopeptidase I (API) in die Vakuole. API dodekamerisiert im Cytosol und wird von einer Doppelmembran umschlossen. Die Aussenmembran dieses Vesikels fusioniert mit der Vakuole. Die innere

Membran dieser Vesikel wird dann zur vollständigen Reifung der API intravakuolär abgebaut (REGGIORI *und* KLIONSKY, 2002).

Literatur

- Bellion, E. and Goodman, J.M.** (1987) Proton ionophores prevent assembly of a peroxisomal protein. *Cell* 48: 165–173.
- Eckert, J. and Erdmann, R.** (2003) Peroxisome Biogenesis. *Rev. Phys. Biochem. Pharm.* 147, in press (DOI 10.1007/s10254-003-0007-z).
- 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: 499–510.
- Erdmann, R. and Blobel, G.** (1996) Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J. Cell Biol.* 135: 111–121.
- Hoepfner, D., van den Berg, M., Philippsen, P., Tabak, H.F. and Hettema, E.H.** (2001) A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 155: 979–990.
- Holroyd, C. and Erdmann, R.** (2001) Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Lett.* 501: 6–10.
- Reggiori, F. and Klionsky, D.J.** (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell.* 1: 11–21.
- Schliebs, W., Saidowsky, J., Agianian, B., Dodt, G., Herberg, F.W. and Kunau, W.H.** (1999) Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. Structural basis for interaction of PEX5 with PEX14. *J. Biol. Chem.* 274: 5666–5673.
- Stein, K., Schell-Steven, A., Erdmann, R. and Rottensteiner, H.** (2002) Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6056–6069.
- 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. *J. Cell Biol.* 142: 403–420.
- Titorenko, V.I. and Rachubinski, R.A.** (2001) The life cycle of the peroxisome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 357–368.
- Walton, P.A., Hill, P.E. and Subramani, S.** (1995) Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell.* 6: 675–683.

Korrespondenzadresse:

Dr. Sven Thoms und Prof. Dr. Ralf Erdmann
Ruhr-Universität Bochum
Medizinische Fakultät
Institut für Physiologische Chemie
D-44780 Bochum
Ralf.Erdmann@ruhr-uni-bochum.de