

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Direktorin Prof. Dr. med. J. Gärtner)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Zielsteuerung von peroxisomalen Membranproteinen mit *tail anchor*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Judith Büntzel

aus

Weimar

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	PD Dr. rer. nat. S. Thoms
Co-Referent:	Prof. Dr. rer. nat. R. Kehlenbach
Drittreferent:	Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung:	22.11.2017
--------------------------------------	-------------------

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Zielsteuerung von peroxisomalen Membranproteinen mit *tail anchor*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 14.11.2017

.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	12
2.1 Erstellung der DNA-Konstrukte	12
2.2 Umgang mit Hefen und Hefekulturen	15
2.3 Zellyse und Western Blot	16
2.4 Mikroskopie	17
2.5 <i>In-silico</i> -Analyse von TMD-Länge und – hydrophobizität	18
3. Ergebnisse und Diskussion	18
3.1 PEX26 und Pex15 weisen konservierte Zielsteue- rungsinformationen auf	18
3.2 PEX26 wird in die ER-Membran integriert	20
3.3 PEX26-Integration in das ER ist GET-abhängig	22
3.4 PEX19 hat keinen Einfluss auf den ER-Eintritt von PEX26 und beeinflusst die PEX26-Zielsteuerung unabhängig von Get3	24
3.5 Die Zielsteuerung von PEX26 wird von basischen Aminosäuren des C-Segmentes beeinflusst	27
4. Zusammenfassung	29
5. Literaturverzeichnis	32
6. Publikation	38

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1 Expression von Fis1 in <i>S. cerevisiae</i>	22
Abbildung 2 Expression von PEX26 und PEX26-Mutanten <i>S. cerevisiae</i> , Wildtyp	28

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Klonierte Konstrukte, die nicht in Buentzel et al. 2015 gelistet werden	14
Tabelle 2	Oligonukleotide, die nicht in Buentzel et al. 2015 gelistet werden	15
Tabelle 3	Vergleich TMD-Hydrophobizitäten von Pex15 und PEX26	24

Abkürzungsverzeichnis

CG	Komplementationsgruppe
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
GAL1	Galaktokinase 1
GET	<i>Guided Entry of Tail-anchor</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MOM	äußere Membran des Mitochondriums
mPTS	peroxisomales Membran-Zielsteuerungssignal
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
ops	Opsin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	peroxisomaler Biogenesedefekt
PEG	Polyethylenglykol
PEX	Peroxin
PGK	Phosphoglyzerokinase
PMP	peroxisomales Membranprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTS	peroxisomales Zielsteuerungssignal
RCDP	Rhizomelia chondrodysplasia punctata
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SD	<i>synthetic defined</i> - Medium
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TA	<i>tail anchor</i>
TOM	Translokationssystem der äußeren Membran (des Mitochondriums)
TMD	Transmembrandomäne
TRC	<i>transmembrane recognition complex</i>
u.a.	und andere
VLCFA	sehr langkettige Fettsäuren (<i>very long chain fatty acids</i>)
ZS	Zellweger-Syndrom
ZSS	Zellweger-Spektrum
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Peroxisomen sind Zellorganellen, die von einer einfachen Membran begrenzt werden. Bis auf wenige Ausnahmen sind sie in fast allen eukaryotischen Zellen anzutreffen (Smith und Aitchison 2013). Erstmals beschrieben wurden sie in Nieren von Mäusen (Rhodin 1954). Sie wurden zunächst als Microbodies bezeichnet, zwölf Jahre später wurde von De Duve der Begriff Peroxisom geprägt. Von ihm wurde das Peroxisom als ein Organell definiert, das zumindest eine Oxidase und eine Katalase besitzt, die den Auf- und Abbau von Wasserstoffperoxid koordinieren (De Duve und Baudhuin 1966). Die Aufgaben der Peroxisomen sind sehr vielfältig: Einige ihrer Funktionen im menschlichen Organismus sind die β -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA) oder die α -Oxidation von Phytansäure. Im Peroxisom finden außerdem Teile der Ether-Phospholipidsynthese (Synthese von Plasmalogenvorstufen), Synthese von Gallensäurevorläufern sowie der Abbau von radikalen Sauerstoffspezies und Wasserstoffperoxid statt (Wanders und Waterham 2006, Wanders 2013, Smith und Aitchison 2013).

Die Entstehung eines Peroxisoms ist ein komplexer Vorgang, für den spezifische Biogenesefaktoren, die PEX-Proteine (auch Peroxine genannt) benötigt werden. Peroxine sind an mehreren Prozessen beteiligt: Sie werden für die Bildung der peroxisomalen Membran gebraucht - durch sie wird die Membran fähig, Matrixproteine zu importieren. Während der Zellteilung regulieren sie einen Teil der peroxisomalen Vererbung (Smith und Aitchison 2013). Damit die peroxisomale Membran importkompetent wird, müssen die peroxisomalen Membranproteine (PMP) in die Membran integriert werden. Die PMPs werden im Zytosol an freien Polyribosomen translatiert (Kim und Hettema 2015). Nach der Translation erreichen diese Proteine das Peroxisom entweder über das endoplasmatische Retikulum (ER) oder werden direkt von dem farnesylierten Biogenesefaktor PEX19 (PEX19-abhängiger Klasse-I-Weg) zur peroxisomalen Membran gebracht. Neben PEX19 werden für die Membranbiogenese noch PEX3 und PEX16 benötigt (Jones et al. 2004, Fujiki et al. 2014, Rucktäschel et al. 2009). PEX19 agiert als löslicher Rezeptor und Transportprotein (Chaperon). Es erkennt seine Fracht (Cargo) nach dessen Translation anhand eines peroxisomalen Membran-Zielsteuerungssignals (mPTS) und transportiert sie zur

peroxisomalen Membran. Dort interagiert eine PEX19-Domäne mit dem zytosolischen Anteil des Membranproteins PEX3, und es kommt zur Insertion des Cargos (Fang et al. 2004, Ma et al. 2011, Hattula et al. 2014). Aber nicht alle PMPs benötigen PEX19, um zur peroxisomalen Membran zu gelangen: In humanen Zellen sind bisher drei Proteine bekannt, die zunächst das ER passieren, bevor sie unabhängig von PEX19 zum Peroxisom gelangen: PEX3, PEX16 und PMP34 (Kim et al. 2006, Kim und Mullen 2013). Eine neuere Arbeit beschreibt, dass PEX16 in der Lage ist, verschiedene PMPs wie PEX11 β , FIS1 und PMP70 zur ER-Membran zu rekrutieren (Hua et al. 2015). In Bäckerhefe durchqueren neben Pex3 auch PMPs, die den Import der Matrixproteine dirigieren, das ER (van der Zand et al. 2010, Thoms et al. 2012). Wenn PEX3, PEX19 oder PEX16 in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, ist die peroxisomale Membrangeneese unterbunden – Daher sind in betroffenen Zellen dann keine Peroxisomen vorhanden (Fujiki et al. 2014).

Für den Prozess der Peroxisomenbiogenese in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) gibt es verschiedene, z.T. konkurrierende Modelle:

(1) Peroxisomen entstehen durch Wachstum und Teilung oder

(2) durch die Fusion von präperoxisomalen Vesikeln, die am ER entstehen (Hoepfner et al. 2005, Motley und Hetteema 2007, van der Zand et al. 2012).

Das erste Modell beschreibt, dass reife Peroxisomen zunächst wachsen und dann durch das Zusammenspiel von verschiedenen Teilungsfaktoren (auch Fissionsfaktoren) geteilt werden. Diese Fissionsfaktoren sind auch an der Teilung von Mitochondrien beteiligt. Dieser Prozess der Fission läuft in mehreren Schritten ab: Zuerst initiiert PEX11 die Elongation des bestehenden Peroxisoms. Anschließend wird der Teilungsfaktor Fis1 rekrutiert. Dieser und weitere Kofaktoren wiederum versammeln Proteine, die die Einschnürung und Teilung des elongierten Peroxisomtubulus möglich machen (Kuravi et al. 2006, Motley und Hetteema 2007, Hetteema und Motley 2009, Schrader et al. 2012).

Das zweite Modell beruht auf folgender Beobachtung: in $\Delta pex3$ - oder $\Delta pex19$ - Bäckerhefestämmen gibt es keine Peroxisomen. Wird in diesen Stämmen jedoch wieder Pex3 oder Pex19 exprimiert, so entstehen Peroxisomen *de-novo* vom ER (Hoepfner et al. 2005).

Eine Voraussetzung für die Ausbildung eines reifen Peroxisoms ist, dass dieses mithilfe des peroxisomalen Transportproteins PEX5 Matrixproteine im-

portieren kann. Dieser Import geschieht durch das peroxisomale Translokon, welches den Transport der Matrixproteine über die peroxisomale Membran ermöglicht. Das Translokon wird erst durch die Interaktion von zwei Komplexen gebildet: dem RING-Komplex (bestehend aus Pex2, Pex10 und Pex12) und dem *docking*-Komplex (bestehend aus Pex13 und Pex14) (Smith und Aitchison 2013, Tabak et al. 2013).

Das zweite Peroxisombiogenesemodell stützt diese Beobachtung: viele PMPs in Hefe passieren das ER, bevor sie das Peroxisom erreichen (van der Zand et al. 2010, Thoms et al. 2012). Zu den PMPs, die das ER durchqueren, zählen auch die PEX-Proteine, die zur Bildung des peroxisomalen Translokons benötigt werden. Wenn die PMPs das ER verlassen, werden sie in zwei verschiedene Gruppen von präperoxisomalen Vesikeln sortiert. Eine Vesikel-Population enthält die Komponenten des RING-Komplexes, während die andere den *docking*-Komplex beherbergt. Das PMP Pex15 rekrutiert die AAA-Typ ATPasen Pex1 und Pex6. Unter dem Zusammenspiel von Pex1 und Pex6 kommt es zur Fusion der beiden präperoxisomalen Vesikel-Populationen. Das Translokon entsteht und der Import von peroxisomalen Matrixproteinen kann beginnen (van der Zand et al. 2012, Tabak et al. 2013).

Erst ein reifes Peroxisom kann Matrixproteine importieren. Voraussetzung für ihren Import ist in der Regel ein peroxisomales Zielsteuerungssignal (PTS). Aber auch Proteine ohne ein PTS können in das peroxisomale Lumen gelangen – vorausgesetzt sie oligomerisieren mit einem Protein, das ein PTS1 trägt. Diese Proteine erreichen sozusagen nach dem „Huckepackprinzip“ das peroxisomale Lumen (Hasan et al. 2013, Thoms 2015). Je nach Erkennung der Matrixproteine durch PEX5 oder PEX7, unterscheidet man zwischen PTS1 oder PTS2. Nur ein kleiner Teil der Proteine trägt das Amino- (N-) Terminus gelegene PTS2. Dieses ist ein neun Aminosäuren langes Signal, das innerhalb der ersten 20 Aminosäuren des N-Terminus der PTS2-tragenden Matrixproteine lokalisiert ist. Der Großteil der peroxisomalen Matrixproteine besitzt jedoch am Carboxy- (C-) Terminus befindlich das PTS1. Dieses Motiv ist circa zehn Aminosäuren lang und dient PEX5 als Erkennungssignal. Die letzten drei Aminosäuren des Motivs sind im Wesentlichen ausschlaggebend für die Erkennung des Matrixproteins. Die Aminosäuren, die ihnen vorausgehen, können die endgültige Zielsteuerung

des Proteins modulieren. Definierend für das PTS1 ist dessen häufigste Tripeptidsequenz Serin-Lysin-Leucin (SKL) am C-Terminus des Matrixproteins. Es gibt verschiedene Varianten dieser Tripeptidsequenz, deren Motiv sich wie folgt zusammensetzen kann: (S/A/C)-(K/R/H)-(L/A) (Hasan et al. 2013). Das peroxisomale Matrixprotein wird anhand des PTS1 erkannt und von seinem löslichen Rezeptor PEX5 gebunden. Daraufhin erfolgt der Transport zum peroxisomalen Translokon. Von ihm wird PEX5 mit seiner Fracht in das Peroxisom transloziert. Dort entlässt PEX5 das Matrixprotein. In einem nächsten Schritt wird PEX5 mit einem einzelnen Ubiquitin markiert. Für die an Pex15 (oder dessen humanes Analog PEX26) gebundenen AAA-Typ ATPasen PEX1 und PEX6 ist dies das Signal, PEX5 wieder ins Zytosol zu transportieren (Dodt und Gould 1996, Dammai und Subramani 2001, Ma et al. 2011, Fujiki et al. 2012b).

16 *PEX* Gene koordinieren im Menschen die Peroxisomenbiogenese. Bei 14 dieser Gene sind pathologische Mutationen bekannt, deren klinisches Korrelat die Peroxisomenbiogenesedefekte (PBD) sind. Diese werden in zwei große Untergruppen unterteilt: in Erkrankungen des Zellweger-Spektrums (ZSS) und in den Rhizomelia chondrodysplasia punctata Typ I (RCDP). Zu dem ZSS gehören drei Krankheiten, die sich im Schweregrad der Ausprägung ihres klinischen Phänotyps unterscheiden. Menschen mit Refsum-Syndrom (RS) können das Erwachsenenalter und von neonataler Adrenleukodystrophie (NALD) betroffene das Schulkindalter erreichen. Neugeborene, die am Zellweger-Syndrom (ZS) leiden, versterben jedoch schon im Kleinkindalter (Waterham und Ebberink 2012, Braverman et al. 2013). Typische Symptome des ZS sind faziale Dysmorphien, eine schwere, muskuläre Hypotonie, eine psychomotorische Retardierung, eine Hepatomegalie, die von einer Leberdysfunktion begleitet wird, Beeinträchtigungen der Niere und eine Vergrößerung der Liquorventrikel. Charakteristisch für die neurologischen Läsionen sind eine fehlerhafte Migration und Differenzierung von Neuronen sowie Defekte in der Bildung der weißen Substanz. Später kommt es zu einer Neurodegeneration des Gehirns. Die Symptome der NALD sind weniger schwerwiegend und treten während des späten Kleinkindalters auf. Es stehen vor allem epileptische Anfälle und eine psychomotorische Regression im Vordergrund. Morphologisches Korrelat sind eine Demyelinisierung und eine progressive kortikale Atrophie. Von diesen beiden

Formen unterscheidet sich das RS, deren Patienten durch eine leichten psychomotorische Retardierung, einen Hörverlust und eine Degeneration der Retina gekennzeichnet sind (Shimozawa 2007, Shimozawa 2011, Waterham und Ebberink 2012, Braverman et al. 2013).

Insgesamt sind PBD durch eine genetische Heterogenität gekennzeichnet. Auf Genotyp-Ebene teilt man die PBD in 13 Komplementationsgruppen (CG) ein. Mehr als 50% der Betroffenen des ZSS sind der CG 1 (Mutation im Gen *PEX1*) zuzuordnen. Morphologisch lassen sich zwei Typen von CG unterscheiden: Ein Teil besitzt noch peroxisomale Reststrukturen. Diese werden auch als „ghosts“ bezeichnet. Die Membran der „ghosts“ enthält zwar PMPs, aber im Organelllumen sind keine oder kaum Matrixproteine anzufinden. Wenn *PEX16* (CG9), *PEX19* (CG12) oder *PEX3* (CG14) mutiert sind, sind in den Patientenzellen gar keine peroxisomalen Strukturen zu finden (Fujiki et al. 2012a). Um diese Krankheiten und ihre Pathophysiologie besser zu verstehen, muss das bestehende Wissen über die Peroxisomenbiogenese und die Interaktion ihrer verschiedenen Biogenesefaktoren erweitert werden.

In dieser Arbeit wurden zwei Peroxine untersucht: das humane *PEX26* und *Pex15*, welches in *S. cerevisiae* zu finden ist. Beide PMPs üben in ihrem jeweiligen Organismus die gleiche Funktion aus – sie binden die ATPasen *PEX1* und *PEX6* an die peroxisomale Membran. *Pex15* und *PEX26* gehören zu der Klasse der Proteine mit *tail anchor* (TA) (Matsumoto et al. 2003, Birschmann et al. 2003). Diese TA-Proteine bilden eine Untergruppe der integralen Membranproteine. Sie sind durch den Besitz einer C-terminalen, von geladenen Aminosäuren flankierten Transmembrandomäne (TMD) gekennzeichnet. Dieser folgt ein kurzer C-terminale Abschnitt mit einer Länge von bis zu 30 Aminosäuren. Die TMD und die ihr folgenden Aminosäuren werden gemeinsam auch als C-Segment bezeichnet. Die Proteintopologie der TA-Proteine ist wie folgt: die funktionelle Domäne der TA-Proteine befindet sich im Zytosol, während ihr C-terminale Ende nach luminal ausgerichtet ist. Da die TMD der TA-Proteine am C-Terminus lokalisiert ist und sie keine N-terminale Signal-Sequenz besitzen, findet ihre gesamte Translation an freien Ribosomen im Zytosol statt. Erst danach werden die TA-Proteine zu ihrer Zielmembran transportiert (Kutay et al. 1993, Borgese et al. 2003, Borgese et al. 2007). Es gibt verschiedene Mecha-

nismen, die eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Zielmembranen der TA-Proteine erlauben. Nach der Translation wird im Zytosol zunächst entschieden, ob das TA-Protein zum Peroxisom, zur äußeren Membran des Mitochondriums (MOM) oder zum ER gebracht wird.

Die Unterscheidung zwischen mitochondrialen, peroxisomalen sowie TA-Proteinen des ERs ist komplex. Die Eigenschaften der TMD und die ihr folgenden C-terminalen Aminosäuren beeinflussen die Zielsteuerung der Proteine. Mitochondriale TA-Proteine haben eine eher kürzere TMD mit einer geringeren Hydrophobizität als TA-Proteine, für das ER bestimmt sind. Im *tail anchor* der mitochondrialen TA-Proteine sind netto mehr positiv geladene Aminosäuren zu finden als im *tail anchor* der TA-Proteine des ERs. Diese sind weniger positiv oder sogar negativ geladen (Kuroda et al. 1998, Beilharz et al. 2003, Borgese et al. 2003, Kalbfleisch et al. 2007). Wie genau mitochondriale TA-Proteine zur MOM gelangen und dort integriert werden, ist noch nicht bekannt. Der Prozess ist jedoch unabhängig von dem Translokationssystem der äußeren mitochondrialen Membran (TOM) (Setoguchi et al. 2006). Von peroxisomale TA-Proteine wissen wir bisher nur, dass diese von PEX19 zur peroxisomalen Membran gesteuert werden (Yagita et al. 2013). Mehr hingegen ist über die Zielsteuerung der TA-Proteine des ERs bekannt. Einige Proteine mit niedriger Hydrophobizität der TMD können spontan in die ER-Membran integrieren. Proteine, deren Hydrophobizität der TMD höher ist, benötigen Transportproteine, die eine Aggregation der Proteine im Zytosol verhindern (Borgese et al. 2007). Aufgrund ihrer Topologie werden TA-Proteine vollständig im Zytosol translatiert. Hier können sie von verschiedenen Chaperonen erkannt werden: Die Proteine Hsp40/HSc70 transportieren ihr Fracht ATP-abhängig zum ER, wo die TA-Proteine sich wahrscheinlich unassistent in die Membran integrieren (Abell et al. 2007). Andere TA-Proteine nutzen die Hilfe eines Translokon-Komplexes. Einige von ihnen sind Substrate des *Signal-Recognition-Particles* (SRP). Dieses ist in der Lage, post-translational hydrophobe Abschnitte der TA-Proteine zu erkennen und zu binden (Abell et al. 2004). Das SRP rekrutiert das TA-Protein zum SEC61-Translokon. Dieses ist (in *S. cerevisiae*) in Assoziation mit den Faktoren Sec62, Sec63, Sec71 und Sec72 in der Lage, die TA-Proteine in die ER-Membran einzufügen. Eine Sonderstellung nehmen Sec62 und Sec63 ein. Sie erkennen

selbstständig kurze TA-Proteine unabhängig vom SRP (Johnson et al. 2013a, Johnson et al. 2013b).

Es gibt noch ein anderes System, das TA-Proteine erkennt: der *Guided Entry of Tail-anchor* (GET-) Transportweg. Während der Translation eines TA-Proteins sind die Ribosomen in der Lage, einen *Transmembrane Recognition Complex* (TRC) zu rekrutieren. Dieser besteht aus verschiedenen Komponenten. Eine, Sgt2 in *S. cerevisiae*, erkennt die C-terminale TMD des TA-Proteins. Ein weiterer Teil des Komplexes wird von Get4 und Get5 (bzw. die Homologe TRC35 oder Ubl4A im Menschen) gebildet. Sie rekrutieren erst das Transportprotein Get3 (bzw. das humane Homolog TRC40). Dann vermitteln sie die Interaktion von Get3 mit Sgt2: das TA-Protein wird von Sgt2 auf Get3 übertragen (Stefanovic und Hegde 2007, Jonikas et al. 2009, Mariappan et al. 2010, Wang et al. 2010).

Get3 bildet Dimere und kommt in zwei Konformationen vor, in einer geöffneten und einer geschlossenen. Der Wechsel zwischen geöffnet und geschlossen wird durch ATP-Hydrolyse ermöglicht. Im geschlossenen Zustand bilden die beiden Get3 Moleküle des Dimers mit ihren α -helikalen Domänen eine Bindestelle für die TA-Proteine. Nach der Bindung transportiert der Get3-Dimer sein Substrat zum ER. Dort sitzt der Get1-Get2-Rezeptorkomplex. Get2 bindet Get3, wodurch Get3 in die Nähe von Get1 gelangt. Durch die Interaktion mit Get1 wechselt Get3 von seiner geschlossenen zur offenen Konformation. Das TA-Protein ist jetzt nicht mehr an Get3 gebunden und wird in die ER-Membran eingefügt. In einem letzten Schritt bindet Get3 ATP, was zu einer Lösung der Get1-Get3-Interaktion führt. Get3 ist wieder frei im Zytosol verfügbar und kann erneut als Chaperon fungieren (Schuldiner et al. 2008, Mariappan et al. 2010, Vilardi et al. 2011, Chartron et al. 2012, Denic et al. 2013, Vilardi et al. 2014). In humanen Zellen interagiert der TRC40-Substratkomplex zunächst mit CAML (welches in humanen Zellen die Funktion von Get2 ausübt). In einem zweiten Schritt stellen CAML und dessen Interaktionspartner WRB (humanes Get1 Homolog) synergistisch sicher, dass das Substrat in die ER-Membran integriert wird (Vilardi et al. 2011, Yamamoto und Sakisaka 2012, Vilardi et al. 2014).

Auf den ersten Blick scheinen PEX26 und Pex15 sich zu ähneln: Sie sind beide peroxisomale TA-Proteine, sie haben die gleiche Funktion und interagieren mit PEX19 (Matsumoto et al. 2003, Birschmann et al. 2003, Halbach et al. 2006). Erstaunlicherweise haben die Proteine jedoch nur einen geringen Anteil an identischer Aminosäuresequenz von 15% (paarweise Alignierung, EMBOSS Needle, Standardeinstellung). Auch auf Ebene des Transports zum Peroxisom scheinen sich PEX26 und Pex15 zu unterscheiden. Von PEX26 wird angenommen, dass es im Zytosol von PEX19 erkannt und direkt zum Peroxisom gebracht wird (Halbach et al. 2006, Yagita et al. 2013). Pex15 passiert zunächst das ER, bevor es in Peroxisomen gelangt. Anders als PEX26 ist es Substrat des GET-Transportweges. Pex15 wird von Get3 erkannt und über Get1 und Get2 ins ER integriert. Von dort wird es Pex19-abhängig in Vesikeln zum Peroxisom transportiert (Elgersma et al. 1997, Schuldiner et al. 2008, Lam et al. 2010). Wie auch die Peroxisomenbiogenese wird die Zielsteuerung der PMPs kontrovers diskutiert. Viele PMPs in *S. cerevisiae* passieren das ER, bevor sie zum Peroxisom transportiert werden (van der Zand et al. 2010). Neuere Arbeiten sprechen auch für eine mögliche ER-Passage von humanen PMPs (Kim und Mullen 2013, Hua et al. 2015). In dieser Arbeit sollen daher diese Fragen näher untersucht werden:

Folgt PEX26 ebenfalls diesem Verhalten und integriert sich in das ER? Wenn dies zutrifft, gibt es Parallelen zwischen dem Zielsteuerungsverhalten von PEX26 und Pex15?

2. Material und Methoden

2.1. Erstellung der DNA-Konstrukte

Zur Klonierung der Plasmide wurden konventionelle Klonierungstechniken, das Gateway-Klonieren und die *Site-directed*-Mutagenese verwendet. Die für diese Arbeit klonierten Konstrukte sind unter der Originalpublikation (Buentzel et al. 2015) und in Tabelle 1 gelistet.

Für die Expression von PEX26 in Hefe wurde ein für die Expression in *S. cerevisiae* Codon optimiertes PEX26 (PEX26^{co}) verwendet. Die Plasmide pRS416GAL1-PEX26^{co}-EcoRI-opsin (pJB3) und pRS416GAL1-EcoRI-Fis-opsin (pJB5) wurden in zwei Schritten kloniert: die für den Opsin-Marker kodierenden

Oligonukleotide OST921/ 922 wurden annealt (*Annealing*) und über die Restriktionsstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pRS416GAL1 kloniert. In den neu entstandenen Vektor pRSGAL1-*EcoRI*-opsin (pJB2) wurden PEX26^{co} und Fis1 über *XbaI* und *EcoRI*, bzw. *BamHI* und *EcoRI* eingefügt. Zuvor waren beide Gene mit den Oligonukleotiden OST957/ 958 bzw. 927/928 durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) von den Templates pENTR-PEX26^{co} (PST1193) und pDONR zeo-Fis1-STOP (PST1257) amplifiziert worden. pRS416GAL1-PEX26^{co} -opsin wurde generiert, indem PEX26^{co} mit OST957 und OST1088 von PST1193 amplifiziert und in den mit *XbaI* und *XhoI* geöffneten Vektor pRS416GAL1 eingefügt wurde.

pJB8 wurde als Template genommen, um durch *Site-directed* Mutagenese die Konstrukte pRS416GAL1- PEX26^{co}-AAR-opsin (pJB21), pRS416GAL1-PEX26^{co}-ARR-opsin (pJB22), pRS416GAL1-PEX26^{co}-RAA-opsin (pJB23), und pRS416GAL1-PEX26^{co}-AAA-opsin (pJB24) PEX26^{co} zu klonieren. Zunächst wurde pRS416GAL1- PEX26^{co}-opsin mit den Primern OST1194/1195 bzw. OST1196/1197 zu pRS416GAL1- PEX26^{co}-ARR-opsin und pRS416GAL1-PEX26^{co}-RAA-opsin mutiert. In einem zweiten Schritt gingen aus diesen Konstrukten pRS416GAL1- PEX26^{co}-AAA-opsin und pRS416GAL1- PEX26^{co}-AAR-opsin hervor. Nach jeder Mutagenese-PCR wurde der Templatevektor mit *DpnI* verdaut.

pRS416GAL1-EGFP-PEX26^{co} (pJB27) wurde ebenfalls in zwei Schritten kloniert: zunächst wurde das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) mit den Oligonukleotiden OST526/1272 mittels PCR amplifiziert (Template pAG416-GPD-EGFP-PEX26) und über die Restriktionsstellen *XbaI* und *EcoRI* in den Vektor pRS416GAL1 eingefügt. PEX26^{co} und die PEX26-Mutanten PEX26^{co}-ARR, PEX26^{co}-AAR, PEX26^{co}-RAA und PEX26^{co}-AAA wurden mit den Primern OST1273/1274, von pJB8, pJB22, pJB23 und pJB24 amplifiziert und mithilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pRS416GAL1-EGFP (pJB26) eingefügt. Die resultierenden Plasmide wurden wie folgt bezeichnet: pRS416GAL1-EGFP-PEX26^{co}-opsin (pJB27), pRS416GAL1-EGFP-PEX26^{co}-ARR-opsin (pJB28), pRS416GAL1-EGFP-PEX26^{co}-RAA-opsin (pJB29), und pRS416GAL1-EGFP-PEX26^{co}-AAA-opsin (pJB30).

pAG416-GPD-EGFP-PEX26^{co} (PST1310) und pAG416-EGFP-PEX26 wurden mithilfe der Gateway-Klonierungstechnik erstellt. Hierfür wurden die

Entry-Vektoren pENTR221 PEX26^{co} (PST1193) und pENTR221 PEX26 (PST1147) in einer LR-Reaktion mit dem Destinationsvektor pAG416-GPD-EGFP-ccdB (PST1117) rekombiniert. Die Rekombination des Destinationsvektors pAG416-GAL1-EGFP-ccdB (PST1341) mit pENTR221 PEX26^{co} (PST1193) ergab pAG416-GAL1-EGFP-PEX26^{co} (PST1486).

Um das Konstrukt p416TEF-PEX15ΔTMD-PEX26^{co} zu klonieren, wurden in einer ersten PCR die N-terminale, lösliche Domäne von Pex15 und das C-Segment von PEX26 (PEX26-C) mit den Oligonukleotiden OST 1101/1102 und OST1103/958 von pAG418-GPD-Pex15 und PST1310 amplifiziert. Die resultierenden Produkte wurden wiederum als Template für eine zweite PCR verwendet, die mit den Primern OST1101 und OST958 durchgeführt wurde. Das Fusionsprotein wurde anschließend über die Schnittstellen *Xba*I und *Eco*RI in den Vektor pTEF416 kloniert. Da bei der Sequenzierung ein *Frameshift* in der Fusionsregion auffiel, wurde dieser durch eine *Site-directed*-Mutagenese mit den Primern OST1275/1276 korrigiert. Ein STOP-Codon wurde auf gleiche Weise mit den Primern OST1176/1177 eingefügt, so dass p416TEF-Pex15ΔTMD-PEX26^{co}-STOP (PST1565) entstand.

pRS416TEF-EGFP wurde durch die Amplifikation EGFPs mittels PCR (verwendete Oligonukleotide: OST562 und OST1272) und dessen anschließenden Insertion in den Vektor pRS416TEF hergestellt. Für die Klonierung wurden die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Eco*RI verwendet. pRS416TEF-EGFP-PEX26²⁶²⁻³⁰⁵ wurde kloniert, indem zunächst PEX26²⁶²⁻³⁰⁵ mithilfe der Oligonukleotide OST1301 und OST1303 durch PCR amplifiziert wurde. Als Template diente das Konstrukt pJB8. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsstellen *Eco*RI und *Xho*I in den Vektor pRS416TEF-EGFP kloniert.

Tabelle 1 Klonierte Konstrukte, die nicht in der Originalpublikation (Buentzel et al. 2015) gelistet werden

pJB5	pRS416GAL1-Pex15-opsin
pJB21	pRS416GAL1-PEX26 ^{co} -AAR-opsin
pJB22	pRS416GAL1-PEX26 ^{co} -ARR-opsin
pJB23	pRS416GAL1-PEX26 ^{co} -RAA-opsin
pJB24	pRS416GAL1-PEX26 ^{co} -AAA-opsin
pJB28	pRS416GAL1-EGFP- PEX26 ^{co} -ARR-opsin
pJB29	pRS416GAL1-EGFP- PEX26 ^{co} -RAA-opsin
pJB30	pRS416GAL1-EGFP- PEX26 ^{co} -AAA-opsin

Tabelle 2 Oligonukleotide, die nicht in der Originalpublikation (Buentzel et al. 2015) gelistet werden

OST927	GCGCGGATCCATGACCAAAGTAGATTTTTGG
OST928	GCGCGAATTCCTTCTCTTGTTTCTTAAGAA
OST1194	GGAAGGCTGCATTTTCTGCCCTCTACCAGCTCCGAATCCG
OST1195	CGGATGCGGAGCTGGTAGAGGGCAGAAAATGCAGCCTTCC
OST1196	CTCGCCTCTACCAGCTCGCCATCGCTGACGGTCCTAACTTCTACG
OST1197	CGTAGAAGTTAGGACCGTCAGCGATGGCGAGCTGGTAGAGGCGAG

2.2. Umgang mit Hefen und Hefekulturen

Die Hefestämme, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in der Originalpublikation (Buentzel et al. 2015) zu finden. Es wurden ausschließliche Bäckerhefestämme (*S. cerevisiae*) verwendet. Zur Anzucht der Hefen wurden folgende Medien verwendet: *synthetic defined*- (SD) Medium (0,67% Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (Difco), 0,75% Kaliumchlorid, 0,5% Ammoniumsulfat, 0,083% Aminosäuremix, Kohlenstoffquelle abhängig vom Versuch), Ölsäuremedium (0,15% Ölsäure, 0,9% Aminosäurenmix, 0,1% Hefeextrakt, 0,17% Hefe Stickstoff Basis ohne Aminosäuren (Difco), 0,4% Tween40 und 2% Agar) und YP-Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton). Der Aminosäuremix wurde wie folgt zusammengemischt: 5,2% Adeninhemisulfat, 5,2% Arginin-HCl, 5,2% Histidin-HCl, 15,7% Homoserin, 5,2% Isoleucin, 5,2% Leucin, 5,2% Lysin-HCl, 5,2% Methionin, 7,9% Phenylalanin, 7,9% Tryptophan, 5,2% Tyrosin, 3,1% Uracil und 23,6% Valin. Wenn Aminosäuren als Selektionsmarker verwendet wurden, fehlte die entsprechende Aminosäure im Aminosäuremix. Gegossenen Platten wurden 20 g/l Agar hinzugefügt.

Alle Hefestämme wurden bei 28°C herangezogen, Flüssigkulturen wurden zusätzlich mit 300 rpm geschüttelt. Nicht transformierte Stämme wurden auf YP-Medium, das mit 2% Glukose versetzt war, aufgezogen.

Für die Galaktose-Puls-Experimente wurden die Hefestämme zunächst 10 h in einem flüssigen SD-Medium mit 2% Glukose angezogen. Danach wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und wuchsen über Nacht auf einem SD-Medium mit 4% Raffinose bis zu einer OD₆₀₀ von 3-5. Die Zellen wurden bei 2500 rpm herunter zentrifugiert und in 2%igem Galaktose-SD-Medium aufgenommen. Für die *Pulse-Chase*-Experimente verblieben die Hefen bis zu 2,5 h auf dem Galaktose-SD-Medium. Danach wurden sie abzentrifugiert

und dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, bevor sie in einem 2% Glukose-SD-Medium aufgenommen und der *Chase*-Schritt initiiert wurde.

Für den Ölsäureversuch wurden die Hefezellen zunächst für 10 h auf 2% Glukose-SD-Medium hochgezogen. Danach folgten zwei Hungerschnitte. Hierfür wurden die Zellen auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt und 10 h lang in einem 0,3% Glukose-SD-Medium kultiviert. Für den zweiten Hungerschnitt wurden die Hefen erneut auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt und über Nacht wieder in einem 0,3% Glukose-SD-Medium bis zu einer OD_{600} von 2 angezogen. Die Hefen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert und dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Hefen wurden in 5 ml Wasser aufgenommen. Danach wurde eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1,000 angefertigt. 2 μ l der Hefesuspension wurden auf die Ölsäureplatte getüpfelt. Diese inkubierte 7 Tage bei 28°C, bevor die Platten fotodokumentiert wurden.

Für die extrachromosomale Expression von DNA wurden die Hefestämme mit Plasmiden transformiert: Dazu wurden 10 μ l kompetente Hefen mit 2 μ l des Plasmids versetzt. Es wurde das sechsfache Volumen an PEG-comp-Puffer (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA/NaOH (pH 8), 40% PEG3350 (Sigma)) hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde gemischt und inkubierte für 30 min bei Raumtemperatur, bevor er mit 9% Dimethylsulfoxid versetzt wurde. Es folgte ein 15-minütiger Hitzeschock. Danach wurden die Hefen abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Hefepellet in sterilem Wasser aufgenommen und auf Platten mit den entsprechenden Selektionsmarkern ausgestrichen.

2.3. Zellyse und Western Blot

Die Zellen wuchsen bis zu einer OD_{600} von 2-5. Es wurden Proben genommen, die einer OD_{600} von 1,5 entsprachen. Die Hefen wurden bei 13,000 x g abzentrifugiert und mit TE-Puffer (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 500 μ l Wasser aufgenommen und mit 75 μ l Lysepuffer versetzt (1% beta-Mercaptoethanol, 0,5 M EDTA, 5 M Natriumhydroxyd, 100 mM PMSF). Die Proben wurden 10 min bei 4°C gevortext. Anschließend wurden die Proteine 5 min lang mit 23% Trichloressigsäure präzipitiert. Es folgte ein 15 min Zentrifugationsschritt (13,000 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Das Proteinpellet wurde zweimal mit 100% Azeton

(-20°C) gewaschen und anschließend in 20 µl Wasser gelöst. Den Proben wurden 10 µl Ladepuffer (4x Roti-Load1-Puffer (Roth)) hinzugefügt. Kontrollen wurden mit den deglykosylierenden Proteinen *EndoH* oder *PNGase F* behandelt. Vor der Gelelektrophorese wurden sie für 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Proteinproben wurden mittels Western Blot analysiert. Hierfür wurde eine SDS-Page-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Separation wurde ein 12% Polyacrylamidgel verwendet. Die Proteine wurden anschließend durch halbtrockenes Blotting (1,5 mA je cm²) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungen wurden mit 5% Blockpuffer (5% Milchpulver gelöst in PBS (10% NaCl, 0,25% KCl, 1,8% Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,3% KH₂PO₄) gesättigt. Der Opsin-Antikörper wurde zunächst 1:1,000, später als Antikörperüberstand 1:100, der Phosphoglycerokinase-Antikörper 1:10,000, in PBS mit 1% Milchpulver verdünnt. Die Membran und der Antikörper inkubierten über Nacht bei 4°C auf einer Wippe. Vor dem Hinzufügen des sekundären Antikörpers wurde die Membran dreimal 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper Esel-Anti-Maus-IgG-HRP (konjugiert) wurde in einer 1:10,000 Verdünnung genutzt. Die Membran wurde mit Lumi-Light oder Lumi-Light plus Western Blot Substrat (Roche) behandelt, um Chemilumineszenz zu erzeugen. Anschließend wurden die Proteine mit dem Luminescent Image Analyzer LAS 4000 (Fuji) detektiert und fotografiert.

2.4. Mikroskopie

Vor dem Mikroskopieren wurden Proben der in Flüssigkultur gezogenen Hefezellen abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 0,1% Formaldehyd versetzt, um die Hefen zu fixieren. Die lebenden Zellen wurden in *Low-melting*-Agarose gebettet. Die Zellen wurden unter 100-facher Vergrößerung unter einem Ölimmersionsobjektiv (NA 1.3) mit einem Zeiss Imager M1 Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Für Immunfluoreszenz fixierte HeLa-Zellen wurden unter 40-facher und 100-facher Vergrößerung beobachtet. Die Präparate lagen schon vor und wurden für diese Arbeit analysiert. Für die Aufnahmen wurde eine HRm Kamera und die Axiovision 4.8 acquisition Software verwendet.

2.5. *In-silico*-Analyse von TMD-Länge und -hydrophobizität

Die Transmembrandomänen von Pex15 und PEX26 wurde mithilfe von TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html, (Hoffmann und Stoffel 1993)) vorhergesagt. Die Hydrophobizitäten wurden mittels des Hydrophobizitätsscores nach Kyte und Doolittle (1982) bestimmt. Die Fenstergröße zur Berechnung der Hydrophobizität betrug 7 (Kyte und Doolittle 1982).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. PEX26 und Pex15 weisen konservierte Zielsteuerungsinformationen auf.

Um auf Parallelen zwischen der Zielsteuerung PEX26 und Pex15 zu testen, exprimierten wir das humane PEX26 in *S. cerevisiae*. Aufgrund einer zu niedrigen Expressionsrate des ursprünglichen PEX26, wurde eine PEX26-Version, die für die Expression in Hefe optimiert war, verwendet. PEX26 wurde an seinem N-terminalen Ende mit einem EGFP markiert und in Hefe exprimiert. Dort lokalisierte es in grünen Punkten, die mit dem peroxisomalen Marker HcRed-SKL kolokalisierten (Büntzel et al. (2015): Figures 1b-e). Aus dieser Beobachtung ließen sich mehrere Schlüsse ziehen: (1) *S. cerevisiae* scheint ein geeigneter Modellorganismus zu sein, die Zielsteuerung des humanen PEX26 weiter zu untersuchen. (2) Trotz der geringen Sequenzübereinstimmung der Proteine wird PEX26 in Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) erkannt und zum korrekten Organell gebracht, was ein erster Hinweis auf eine Gemeinsamkeit in der Zielsteuerung von PEX26 und Pex15 ist. Die peroxisomale Lokalisation von PEX26 in Bäckerhefe war der Anlass, zum Vergleich in HeLa-Zellen Pex15 zu exprimieren. Pex15 wurde mit dem fluoreszierenden Protein Venus markiert. Erstaunlicherweise zeigte sich auch hier eine Koinzidenz von Venus-Pex15 und dem peroxisomalen Marker PEX14. Als PMP ist PEX14 ein Marker der peroxisomalen Membran. Jedoch gibt es keinen Aufschluss darüber, ob Pex15 in die gleiche Peroxisomenpopulation wie PEX26 sortiert wurde. Aus diesem Grund wurden PEX26 und Pex15 gemeinsam exprimiert. Beide Proteine zeigten eine Kolokalisation (Büntzel et al. (2015): Figure 1i). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Pex15 durch das Chaperon erkannt wurde, das auch PEX26 zum Peroxisom bringt. Es lässt sich hieraus schlussfolgern, dass das Zielsteuerungssignal

Pex15 ausreichend konserviert ist, um das Protein auch in humanen Zellen in funktionelle, reife Peroxisomen sortieren zu können.

Ein möglicher Kandidat für den Transport zum Peroxisom in *S. cerevisiae* und HeLa-Zellen ist PEX19. Pex15 besitzt wie PEX26 zwei PEX19-Bindestellen im Bereich seines C-Segmentes (Halbach et al. 2006). Für diese Annahme spricht, dass in HeLa-Zellen exprimiertes Pex15, dessen C-Segment deletiert wurde (Pex15 Δ TMD), nur im Zytosol zu beobachten war. Äquivalent hierzu zeigte auch PEX26 Δ ex5, eine Splicing-Variante von PEX26, der die TMD fehlt, in Hefe eine zytosolische Lokalisation (Figures 1e, h) (Buentzel et al. 2015, Weller et al. 2005).

Lässt sich aus diesen Beobachtungen postulieren, dass PEX26 auch die Funktion von Pex15 übernehmen kann? Hefezellen, denen das Peroxin Pex15 fehlt, können keine funktionellen Peroxisomen ausbilden (Elgersma et al. 1997). Daher wurden Δ pex15-Hefezellen mit PEX26 transformiert, um zu testen, ob PEX26 die Funktion von Pex15 übernehmen kann. Anschließend wurden die mit PEX26 transformierten Δ pex15-Hefezellen auf Ölsäureplatten getüpfelt. Wenn Hefestämme, die keine reifen, funktionellen Peroxisome besitzen, auf Ölsäure kultiviert werden, zeigen diese kein Wachstum- sie benötigen Peroxisomen, um auf diesem Medium zu überleben (Lockshon et al. 2007). In dem hier beschriebenen Versuch konnte kein Wachstum der mit PEX26 transformierten Δ pex15-Hefezellen auf Ölsäure festgestellt werden. In einem zweiten Test wurde dieses Ergebnis bestätigt: Für die Detektion von Peroxisomen in *S. cerevisiae* durch Mikroskopie kann man ein fluoreszierendes Protein, HcRed-SKL, als peroxisomalen Marker verwenden. HcRed-SKL ist ein Fluorophor, das mit einem PTS-1 versehen ist. Dementsprechend verhält sich HcRed-SKL wie ein peroxisomales Matrixprotein und wird mithilfe des Transportproteins Pex5 ins Peroxisom importiert- vorausgesetzt, es liegt ein reifes, importkompetentes Peroxisom vor. Für den zweiten Versuch wurde HcRed-SKL zusammen mit PEX26 in Δ pex15-Zellen exprimiert. Falls reife Peroxisomen vorliegen, wird HcRed-SKL in Punkten lokalisieren, die den Peroxisomen der Hefezelle entsprechen. In diesem Versuch war HcRed-SKL jedoch im Zytosol anzutreffen. Die Ergebnisse der hier beschriebenen zwei Experimente zeigen, dass es dem Δ pex15-Stamm nicht möglich war, funktionierende Peroxisomen zu bilden. PEX26 kann also nicht die Funktion von Pex15 übernehmen. Auch wenn nur die funktionelle

N-terminale Domäne von Pex15 (Aminosäuren 1-331) in $\Delta pex15$ exprimiert wurde, war der Ölsäuretest negativ und HcRed-SKL verblieb im Zytosol (Buentzel et al. (2015): Figures 1f, g). Das C-Segment von Pex15 (Aminosäuren 332-383) ist also Voraussetzung dafür, dass das PMP zur peroxisomalen Membran gelangt und seine Funktion erfüllen kann. PEX26 kann zwar nicht die Funktion von Pex15 ersetzen, aber das Signal des PEX26-C-Segmentes (Aminosäuren 252-305) ist in der Lage, die peroxisomale Membran in Hefe zu erreichen: Wenn das C-Segment von PEX26 (PEX26-C) mit einem N-terminalen EGFP markiert und anschließend in *S. cerevisiae* exprimiert wird, so erscheint PEX26-C in Punkten, die mit HcRed-SKL kolokalisieren (Buentzel et al. (2015): Supplementary Figure S3).

In einem weiteren Versuch wurde PEX26-C mit der funktionellen, N-terminalen Domäne von Pex15 fusioniert. In einem nächsten Schritt wurde geprüft, ob dieses Hybridprotein in der Lage ist, in $\Delta pex15$ -Hefezellen die Peroxisomenbiogenese zu induzieren. Hierzu wurden $\Delta pex15$ -Hefezellen mit dem Pex15-PEX26-C-Fusionsprotein transformiert und auf einem Ölsäuremedium getestet. Interessanterweise waren diese Hefen, die das Pex15-PEX26-C-Fusionsprotein besaßen, in der Lage, auf Ölsäuremedium zu überleben. Außerdem wurde HcRed-SKL zusammen mit Pex15-PEX26-C in $\Delta pex15$ exprimiert. Anders als bei der Koexpression von HcRed-SKL mit PEX26 zeigte sich hier eine peroxisomale Lokalisation von HcRed-SKL (Buentzel et al. (2015): Figures 1f, g). Daraus lässt sich schließen, dass die in PEX26 enthaltene Zielsteuerungsinformation ausreichend ist, um genügend Moleküle des Fusionsproteins zur peroxisomalen Membran zu rekrutieren. So wird Genese von funktionellen Peroxisomen in $\Delta pex15$ möglich.

3.2. PEX26 wird in die ER-Membran integriert.

Die Zielsteuerungsinformation von Pex15 und PEX26 ist so konserviert, dass PEX26 in Hefe und Pex15 in HeLa-Zellen in die peroxisomale Membran integriert werden. In *S. cerevisiae* passiert Pex15 das ER, bevor es die Peroxisomen erreicht (Elgersma et al. 1997, van der Zand et al. 2010). Um zu analysieren, ob ein ER-Eintritt eine weitere Gemeinsamkeit von PEX26 und Pex15 ist, wurde PEX26 mit einem C-terminalen Opsin-Marker gekennzeichnet. Dieses leitet sich von dem bovinen Rhodopsin ab (Adamus et al. 1991) und besitzt ein

Asparagin-Lysin-Threonin- (NKT-) Motiv, welches glykosyliert werden kann. Proteine, die dem Lumen des ERs exponiert sind und ein Glykosylierungsmotiv besitzen, werden in der Regel N-glykosyliert. Die im Glykosylierungsmotiv befindliche Aminosäure Asparagin wird bei ER-Eintritt mit einem Glukose₃-Mannose₉-N-acetylglucosamin vernetzt (Zielinska et al. 2010, Shrimal et al. 2015). Der Opsin-Marker ist daher als ein Marker für ER-Integration zu verstehen. Durch die Glykosylierung kann das molekulare Gewicht eines Proteins pro Glykosylierungsmotiv um bis zu 3 kDa gesteigert werden (Helenius und Aebi 2004), deshalb laufen glykosylierte Proteine im Western Blot langsamer als nicht glykosylierte.

Neben PEX26 wurde noch Fis1, ein TA-Protein, das Teil der MOM oder der peroxisomalen Membran ist (Mozdy et al. 2000, Koch et al. 2005), mit einem Opsin-Marker versehen. PEX26 wurde in HeLa-Zellen und Hefe, Fis1 nur in *S. cerevisiae* exprimiert. Als Kontrolle diente eine Probe, die mit den deglykosylierenden Proteinen *EndoH* oder *PNGase F* behandelt wurde. Der Western Blot wurde mit einem Opsin-Antikörper (Adamus et al. 1991) behandelt, um die Proteine detektieren zu können.

PEX26 und Fis1 erschienen im Western Blot als Doppelbande (Buentzel et al. (2015): Figure 2c sowie Abbildung 1 der Dissertation). Die Kontrolle stellte sich als eine Bande dar. Die untere Bande der Doppelbande korrespondierte mit der Kontrolle. Die obere Bande entsprach dem glykosylierten Protein. In den Vorexperimenten zu dieser Arbeit wurden PEX26 und Fis1 beide zu stark überexprimiert. Um auszuschließen, dass die Integration ins ER nur aufgrund einer falschen Zielsteuerung bei Überexpression geschieht, wurden PEX26-ops(in) und Fis1-ops(in) in den hier gezeigten Versuchen mittels Pulsexperiment exprimiert. Beide Proteine wurden von dem Galaktose-induzierbaren Promoter des GAL1-Gens kontrolliert. Dieses Verfahren erlaubte, das Glykosylierungsverhalten der Proteine zu bestimmten Zeitpunkten (15 min und 150 min) nach Expressionsbeginn zu betrachten. Nach 15 min überwog der Anteil an glykosyliertem PEX26, während der Großteil an Fis1 nicht glykosyliert war. Nach 150 min zeigte Fis1 einen Phänotyp, bei dem zwar etwas von der Proteinprobe glykosyliert war, der Großteil von Fis1 jedoch wurde weiterhin nicht glykosyliert. Während PEX26 bevorzugt ins ER geht, gelangt Fis1 nur dorthin, wenn es überexprimiert wird: Nach 15 min Expression ist keine Glykosylierung von Fis1

erkennbar. Erst nach 150 min liegt ein Teil von Fis1 glykosyliert vor, während der Großteil weiterhin nicht glykosyliert wird. Der Anteil an Fis1, der in das ER gelangt, benötigt keine Hilfe durch den GET-Transportweg - bei Expression in *get*-defizienten Stämmen zeigt Fis1 keinen Phänotyp.

Fis1 kann entweder Pex19-abhängig ins Peroxisom gelangen (Halbach et al. 2006) oder es integriert sich spontan in die MOM. Die Lipidzusammensetzung der MOM unterscheidet sich von der des ERs. Kinetisch ist es für Fis1 leichter, sich in die Ergosterol-arme MOM einzufügen (Kemper et al. 2008). Daher ist anzunehmen, dass, erst wenn dieser Weg gesättigt ist, Fis1 in die ER-Membran integriert wird. Das könnte die Erklärung für die nach 150 min beobachtete Glykosylierung sein. Während das ER nicht das Primärziel von Fis1 ist, ist die frühzeitige Glykosylierung PEX26 Indiz dafür, dass die ER-Lokalisation PEX26 nicht nur einen Sättigungseffekt darstellt. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten das Zielsteuerungsverhalten von PEX26 und Pex15 weiter untersucht.

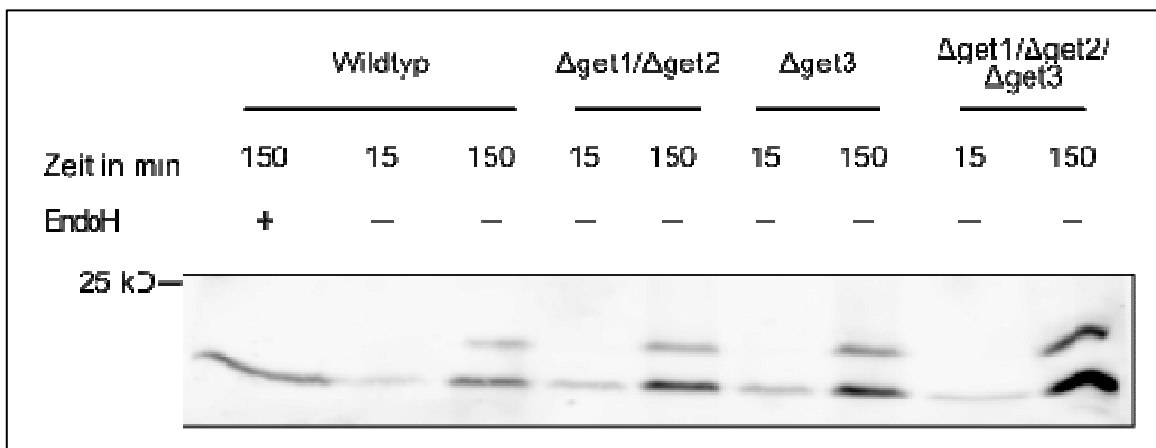


Abbildung 1

Fis1 wurde in *S. cerevisiae*- Wildtyp und *get*-defizienten Stämmen- untersucht. Erst nach 150 min war eine Glykosylierung zu beobachten. Wurde Fis1 für einen kürzeren Zeitraum exprimiert, so war keine Glykosylierung zu detektieren. Expression von Fis1 in *get*-defizienten Stämmen hat keinen Einfluss auf das Glykosylierungsmuster des Proteins.

3.3. PEX26-Integration in das ER ist GET-abhängig.

Die meisten TA-Proteine, die in die ER-Membran eingefügt werden, nutzen das SEC61-Translokon oder den GET-Transportweg (Denic 2012, Johnson et al. 2013b). Nutzt PEX26-ops einen dieser zwei Wege? Wir exprimierten PEX26-ops in verschiedenen Bäckerhefe-Knockout-Stämmen sowie in Hefestämmen, die eine verminderte Expression essentieller Gene aufwiesen (DAMP-Stämme,

Breslow et al. 2008): es erfolgte eine Expression in DAmP-sec62 und Δ sec72 sowie in Δ get2, Δ get3, Δ get1/ Δ get2, Δ get1/ Δ get2/ Δ get3 und Δ get5. Es wurde erneut Galaktose-abhängig die Expression von PEX26 induziert und die Proben nach 120 min abgenommen. Im Western Blot war kein Unterschied zwischen dem PEX26, das im Wildtypstamm exprimiert wurde, und dem PEX26 aus den DAmP-sec62- und Δ sec72- Stämmen zu beobachten. Der durchschnittliche Anteil an glykosyliertem PEX26 in Wildtypzellen lag bei 69% (N=7), während der in DAmP-sec62 und Δ sec72 je 73% oder 74% (N=3) betrug. PEX26 nutzt demnach nicht den post-translationalen, SRP-abhängigen Zielsteuerungsmechanismus. Weiterhin scheint es unabhängig vom Sec62/Sec63-abhängigen Transportweg zu sein, der vor allem die Integration von kurzen TA-Proteinen koordiniert, die weniger als 80 Aminosäuren lang sind (Johnson et al. 2013a).

Wenn PEX26-ops in den verschiedenen *get*-defizienten Stämmen exprimiert wurde, so wurde hier, anders als im oben beschriebenen Experiment, ein Phänotyp zu beobachten: im Gegensatz zu dem PEX26 des Wildtypstammes war hier das Protein kaum glykosyliert. Der Anteil an glykosyliertem Protein lag bei allen defizienten Stämmen zwischen 15% und 20% (N \geq 3). Nach der Komplementation eines *get5*-Knockout-Stammes mit dem fehlenden Gen zeigte PEX26 wieder ein Glykosylierungsmuster, das dem der Wildtypkontrolle entsprach. PEX26 gelangt also unabhängig vom SEC61-Translokon mithilfe des GET-Transportweges ins ER. Der Defekt des Δ get5-Stammes liegt zum Beginn des Transportweges, während Δ get3 und Δ get1/ Δ get2 eine Blockade des Transportes zum ER bzw. ins ER verursachen (Schuldiner et al. 2008, Chartron et al. 2012). Da im Western Blot kein Unterschied zwischen dem Glykosylierungsmuster von PEX26 in den verschiedenen *get*-defizienten Stämmen zu beobachten ist, lässt das auf eine Abhängigkeit PEX26 von allen Faktoren des GET-Transportweges schließen (Buentzel et al. (2015): Figures 4a-b). Der Ausfall eines Bestandteiles des Transportweges verhindert die ER-Integration von PEX26. Diese Beobachtung bestätigt sich, wenn EGFP-PEX26 in einem Puls-Chase-Experiment in Δ get3-Zellen exprimiert wird: das Protein lokalisiert 80 min nach Ende des Expressionsimpulses in grünen Punkten, die keine Kolokalisation mit dem ER-Marker SEC63-RFP zeigen. Auch eine sehr enge Assoziation mit dem ER, wie in Δ pex19-Zellen, ist nicht zu beobachten. Werden jedoch der Peroxisomenmarker HcRed-SKL und EGFP-PEX26 koexprimiert, ist

eine Koinzidenz beider Proteine zu sehen, wie sie schon aus Experimenten mit dem Wildtyp bekannt ist. Daher verhindert ein Ausfall des GET-Transportweges nicht die peroxisomale Zielsteuerung PEX26. Das TA-Protein erreicht auch in der Abwesenheit von Get3 das Peroxisom (Buentzel et al. (2015): Figures 2d, 4c).

Es ist bekannt, dass PEX26 in HeLa-Zellen unabhängig von dem Get3-Homolog TRC40 mithilfe des Chaperons PEX19 das Peroxisom erreicht (Yagita et al. 2013). Auch Pex26 in *Neurospora crassa* ist unabhängig von Get3 (Chen et al. 2014). Wie erklärt sich also die GET-Abhängigkeit in *S. cerevisia*? Get3 selektiert seine Substrate nach der Hydrophobizität der TMD. In humanen Zellen und in *Neurospora crassa* ist die Hydrophobizität der TMD von PEX26 zu niedrig. In Bäckerhefe hingegen ist die Hydrophobizitätsschwelle des Chaperons geringer (siehe Tabelle 3): das Get3-Substrat Pex15 hat eine niedrigere TMD Hydrophobizität als PEX26, daher wird auch PEX26 in *S. cerevisiae* von Get3 erkannt (Schuldiner et al. 2008, Johnson et al. 2013b, Chen et al. 2014).

Tabelle 3 Vergleich TMD-Hydrophobizitäten von Pex15 und PEX26 (Kyte und Doolittle 1982, Hoffmann und Stoffel 1993)

Protein	Spezies	Beginn	Ende	Länge	Hydrophobizität
PEX26	<i>H. sapiens</i>	252	269	18	30,1
Pex15	<i>S. cerevisiae</i>	352	372	20	24,8

3.4. Pex19 hat keinen Einfluss auf den ER-Eintritt von PEX26 und beeinflusst die PEX26-Zielsteuerung unabhängig von Get3

Bisher wurde angenommen, dass hauptsächlich Pex19 für die Zielsteuerung von PEX26 verantwortlich ist (Halbach et al. 2006, Yagita et al. 2013). Wenn PEX26-ops unter Einfluss des Galaktokinase-1-(GAL1-) Promoters 120 min in $\Delta pex19$ -Zellen exprimiert wird, dann ist im Western Blot zunächst ein Unterschied zu den Glykosylierungsleveln von PEX26 in der Kontrolle zu erkennen (Wildtyp). Der durchschnittliche Anteil an glykosyliertem PEX26 beträgt 69% im Wildtyp (N=7) und 91% in $\Delta pex19$ -Zellen (N=5). Für einen direkten Vergleich der Expressionslevel von PEX26 in beiden Stämmen wurde das Expressionslevel mit der mitgeführten Kontrolle Phosphoglycerokinase (PGK) ins Verhältnis gesetzt. Der Anteil an nicht-glykosyliertem PEX26 des Wildtyps wurde auf 100% gesetzt und mit dem Anteil in $\Delta pex19$ verglichen. Letzterer war im Ver-

gleich zum Wildtyp auf 35% vermindert. Das nicht-glykosylierte PEX26 scheint also in $\Delta pex19$ -Zellen weniger stabil zu sein als im Wildtyp. Pex19 hat damit keinen Einfluss auf den ER-Eintritt von PEX26, aber auf die Halbwertszeit der Proteine, die nicht das ER betreten (Buentzel et al. (2015): Figures 5a, c-d). Da $\Delta pex19$ -Zellen keine Peroxisomen enthalten (Hetteema et al. 2014), ist davon auszugehen, dass sich dieser Unterschied am ehesten durch einen eine Instabilität von PEX26-Molekülen im Zytosol erklären lässt. Der höhere Anteil an glykosylierten Protein in $\Delta pex19$ -Zellen ist also nicht durch eine effektivere Migration in das ER, sondern durch einen Abbau des nicht-glykosyliertem PEX26 in $\Delta pex19$ -Zellen zu erklären.

Um die zelluläre Lokalisation PEX26 in $\Delta pex19$ -Zellen mikroskopisch beobachten zu können, wurde die EGFP-PEX26- Expression für 2.5 h mit Galaktose induziert und 80 min nach Ende des Impulses betrachtet. Zu dieser Zeit zeigte PEX26 zwar keine direkte Kolokalisation mit dem ER-Marker SEC63-RFP, jedoch war es in sehr enger Assoziation mit dem ER zu beobachten. Wenn man davon ausgeht, dass der ER-Eintritt von PEX26 vor seinem Transport zum Peroxisom geschieht, dann könnten diese Strukturen präperoxisomale Vesikel sein. Von Pex15 ist bekannt, dass es eben in diese präperoxisomalen Vesikel lokalisiert. Die präperoxisomalen Vesikel benötigen Pex19, um zum Peroxisom transportiert zu werden (Lam et al. 2010).

In $\Delta get3$ -Zellen wurde PEX26 in Peroxisomen beobachtet und in $\Delta pex19$ -Zellen zeigt PEX26 eine eng mit dem ER assoziierte Lokalisation. Beides deutet daraufhin, dass sowohl Get3 als auch Pex19 als mögliches Chaperon für PEX26 fungieren können. PEX26-ops wurde hierauf Galaktose-abhängig in einem $\Delta pex19\Delta get3$ -Stamm exprimiert. Beim Betrachtung der Proteinexpression im Western Blot fiel Folgendes auf: Im Vergleich zu der Expression in Wildtypzellen ist die Expression von PEX26 in $\Delta pex19\Delta get3$ -Zellen stark reduziert. Das Ausmaß des glykosylierten PEX26 des $\Delta pex19\Delta get3$ -Stammes gleicht dem des $\Delta get3$ -Stammes. Der Anteil an nicht glykosyliertem Protein ist in $\Delta pex19\Delta get3$ -Zellen mit 27% jedoch viel geringer als die 57% in $\Delta get3$ -Hefen; dabei wurde der Wildtyp 100% gesetzt, und Anteile wurden ins Verhältnis mit der Kontrolle PGK errechnet. Wenn der Proteasomeninhibitor MG132 zu Beginn des Galaktose-Pulses zu den Kulturen hinzugefügt wird, erhöht sich der in $\Delta pex19\Delta get3$ detektierte Anteil an PEX26 um einen Faktor von 2,3. Im Pulse-

Chase-Experiment lokalisiert EGFP-PEX26 in $\Delta pex19\Delta get3$ -Zellen 80 min nach Ende des Pulses im Zytosol.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich für die Zielsteuerung von PEX26 in *S. cerevisiae* folgendes Modell: Sowohl Get3 als auch Pex19 konkurrieren um PEX26. Ein Großteil PEX26 wird von Get3 erkannt und zum ER gebracht. Pex19 wird benötigt, um den Transport der präperoxisomalen Vesikel vom ER zum Peroxisom zu koordinieren (Lam et al. 2010). In der Abwesenheit von Get3 ist Pex19 in der Lage, PEX26 zu erkennen. Es stabilisiert so den zytosolischen Pool an PEX26 und bringt das Protein sukzessive zum Peroxisom. Dort interagiert Pex19 mit Pex3 und PEX26 wird in die peroxisomale Membran eingefügt (Fang et al. 2004, Ma et al. 2011). Wenn weder Get3 noch Pex19 vorhanden sind, wird ein Großteil des zytosolischen PEX26-Pools durch das Proteasom abgebaut.

Die zytosolische Translation der PMPs und ihr anschließender PEX19-abhängiger Transport zum Peroxisom sind eines der stärksten Argumente für das Wachstums- und Teilungsmodell der Peroxisomen-Proliferation (Lazarow und Fujiki 1985, Motley und Hettema 2007, Hettema und Motley 2009). Dieses Modell erklärt jedoch nicht die Beobachtung, dass in Bäckerhefe viele PMPs das ER passieren, bevor sie zum Peroxisom gelangen. Aus diesem Grund wurde ein zweites Modell der Peroxisomenbiogenese entwickelt. Es berücksichtigt die ER-Passage der PMPs. Diese werden im ER in präperoxisomale Vesikel sortiert. Die Vesikel fusionieren und bilden so funktionelle Peroxisomen (van der Zand et al. 2010, van der Zand et al. 2012). Dieses zweite, jüngere Modell erklärt unter anderem, warum eine *de-novo*-Peroxisomenbiogenese möglich ist, wenn man *PEX*-defizienten Zellen das fehlende Protein zuführt (Hoepfner et al. 2005, Tabak et al. 2013). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass beide Prozesse –Wachstum und Teilung und *de-novo*-Biogenese von Peroxisomen-unabhängig voneinander parallel ablaufen können und dass es je nach Spezies eine bevorzugte Art der Peroxisomenbiogenese gibt (Kim und Hettema 2015). So sind im Unterschied zu *S. cerevisiae* in humanen Zellen wenige PMPs bekannt, die das ER passieren: PEX3, PEX16 und PMP34. Neuere Daten sprechen ebenfalls für eine PEX16-abhängige Rekrutierung von PEX10, PEX11 β und Fis1 sowie dem C-Segment von PEX26 zum ER (Hua et al. 2015). Dabei ist der PEX16-abhängige Transport von PEX3 über das ER verglichen zu dem

PEX16-unabhängigen Transport (vom Zytosol direkt zum Peroxisom) der präferierte Weg. Bei Sättigung dieses ER-Weges wird PEX3 direkt zum Peroxisom gebracht (Kim et al. 2006, Aranovich et al. 2014). Im Rahmen der Erstellung der Originalpublikation (Buentzel et al. 2015) wurde PEX26 auch in HeLa-Zellen exprimiert, wo ebenfalls eine Glykosylierung des Proteins beobachtet wurde. Anders als der GET-Transportweg in Hefe ist der ER-Transport von PEX26 unabhängig von TRC40 (Yagita et al. 2013), was offen lässt, wie PEX26 in humanen Zellen in die ER-Membran eingefügt wird. Jedoch wäre es möglich, dass PEX26 ähnlich wie PEX3 dem PEX16-abhängigen Weg folgt. Hierfür spricht, dass die TMD PEX26 in der Anwesenheit von PEX16 in der ER-Membran vorzufinden ist (Hua et al. 2015). Die Expression in HeLa-Zellen unterlag der Kontrolle eines Zytomegalievirus-Promoters. Im Rahmen der Überexpression kann es also zu einer Sättigung des PEX16-abhängigen Weges gekommen sein - dies würde erklären, warum glykosyliertes und nicht glykosyliertes PEX26 im Western Blot detektiert wurden.

Interessanterweise lassen sich zwischen dem Verhalten von PEX26 in *S. cerevisiae* und PEX3 in humanen Zellen Parallelen ziehen: PEX26 wird unabhängig von Pex19 in die ER-Membran integriert. In Abwesenheit seines Chaperons Get3 kann PEX26 immer noch von Pex19 zum Peroxisom gebracht werden, es kann sich also eines zweiten Transportwegs bedienen, um ins Peroxisom zu gelangen.

3.5. Die Zielsteuerung PEX26 wird von basischen Aminosäuren des C-Segmentes beeinflusst.

Die Zielsteuerung der TA-Proteine wird unter anderem von der Ladung der Aminosäuren ihres C-Segmentes beeinflusst. Drei oder mehr positive Aminosäuren im C-Segment sind ein Indikator für eine Zielsteuerung zum Mitochondrium (Borgese et al. 2003, Kalbfleisch et al. 2007). Im C-Segment von PEX26 finden sich zwei Häufungen von positiv geladenen Aminosäuren. Von der ersten ist bekannt, dass sie einen Einfluss auf die peroxisomale Zielsteuerung PEX26 hat (Yagita et al. 2013). Möglicherweise liegt sie in der zweiten PEX19-Bindestelle (Halbach et al. 2006, Yagita et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die basischen Aminosäuren (Arginine) der zweiten Häu-

fung von PEX26 einen Einfluss auf dessen Zielsteuerung zum ER haben (Abbildung 2).

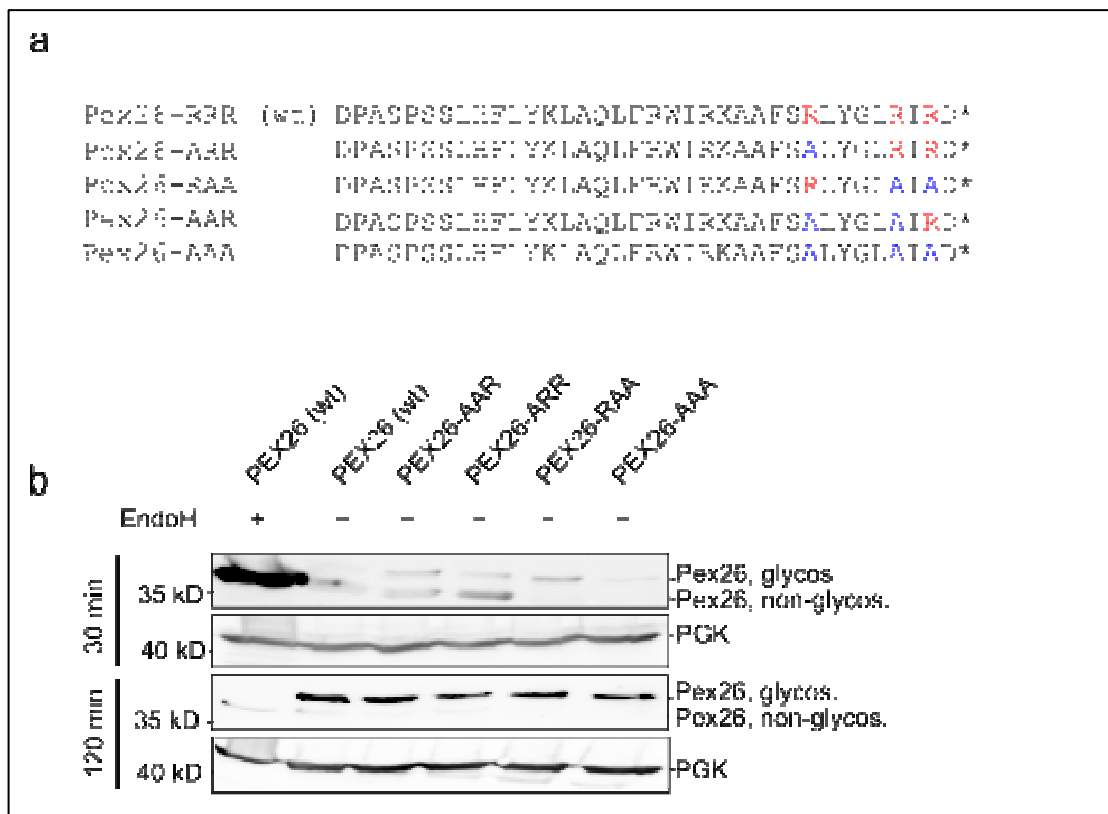


Abbildung 2

Vom Wildtypprotein ausgehend wurden vier verschiedene Pex26-Mutanten generiert (a), die basische Aminosäure Arginin wurde zur unpolaren Aminosäure Alanin mutiert. Die Analyse der Mutationen geschah durch Western Blot (b). 30 min nach Beginn der Expression ähnelt PEX26-AAR dem Wildtyp am meisten. PEX26-RAA und PEX26-AAA zeigen vor allem Glykosylierung. Nach 120 min Expression ähnelt sich das Glykosylierungsmuster der Proteine. Es wird kaum nicht glykosyliertes PEX26-RAA und PEX26-AAA detektiert.

Dazu wurden die Arginine in verschiedenen Kombinationen zu der unpolaren Aminosäure Alanin mutiert. Der Wildtyp und die Mutanten PEX26-ARR, PEX26-RAA, PEX26-AAR und PEX-AAA (siehe Abbildung 2a) wurden C-terminal mit einem Opsin-Marker gekennzeichnet. Anschließend wurden die Proteine in einem Bäckerhefe Wildtypstamm für 30 min oder 120 min exprimiert. Die Expression stand unter der Kontrolle des GAL1-Promoters. Die Proben wurden mittels Western Bot analysiert.

Bei allen Proben war eine Glykosylierung zu beobachten. Nach 30 min fiel auf, dass PEX26-RAA und PEX26-AAA ausschließlich ER-Lokalisation zeigten. Die Expression von PEX26-AAA war nur eine geringe. Nach 120 min äh-

nelte PEX26-AAR in seinem Glykosylierungsmuster dem Wildtyp PEX26-RRR. Bei den anderen Mutanten wurde im Vergleich zum PEX26-Wildtyp weniger Protein detektiert.

Für diese Beobachtung gibt es zwei Erklärungen: (1) PEX26-AAR und PEX26-ARR haben eine langsamere Insertionskinetik als die anderen Mutanten, und (2) PEX26-RAA und PEX26-AAA werden sehr schnell abgebaut, sollten sie nicht in die ER-Membran integriert werden. Es lässt sich folgern, dass eine Verminderung der positiven Ladungen von PEX26 eine Zielsteuerung zum ER hin (in Hefe) begünstigt. Weiterhin scheinen die Arginine dem Abbau von PEX26 im Zytosol entgegenzuwirken. Da alle Proteine unter der Kontrolle des gleichen Promoters sind, sollte nicht die Expression, sondern die Stabilität der Mutanten vermindert sein. Phänotypisch wird dies am auffälligsten bei PEX26-AAA, das nach 30 min kaum zu detektieren war. Wenn die Phänotypen PEX26-AAR und PEX26-RAA verglichen werden, fällt auf, dass beide Mutanten in der Summe die gleiche Reduktion an positiver Ladung erfahren haben. PEX26-AAR ist jedoch stabiler und ähnelt im Western Blot dem Wildtyp PEX26. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Summe der Ladungen, sondern auch deren Position Einfluss auf das Verhalten PEX26 haben.

4. Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Zielsteuerung peroxisomaler TA-Proteine. Es wurde zunächst das Verhalten von zwei Peroxinen, das des humanen PEX26 und das des Hefeproteins Pex15, analysiert. Weiterhin wurde die Zielsteuerung des peroxisomalen TA-Proteins Fis1 untersucht. Fis1 und PEX26 wurden mit einem glykosylierbaren Opsin-Marker gekennzeichnet, um einen potentiellen ER-Eintritt zu erkennen. Beide Proteine zeigten im Western Blot einen Mobilitätsshift, der auf eine Integration in die ER-Membran schließen ließ. Während die Mehrheit des exprimierten PEX26 glykosyliert wurde, zeigte ein Großteil des exprimierten Fis1 zu frühen Zeitpunkten der Induktion die Tendenz, nicht glykosyliert zu werden. Erst nach längeren Induktionszeiten zeigte es ein ähnliches Glykosylierungsmuster wie PEX26. Daher ist davon auszugehen, dass die zu Fis1 gemachten Beobachtungen Folge eines Sättigungseffektes sind.

Der Schwerpunkt der weiteren Experimente lag auf PEX26 und dessen Hefeanalog Pex15. Beide Proteine rekrutieren die ATPasen PEX1 und PEX6 zu peroxisomalen Membran (Matsumoto et al. 2003, Birschmann et al. 2003), zeigen jedoch nur 15% Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz. Trotz dieser Unterschiede ähneln Pex15 und PEX26 sich in zwei Stationen ihrer Zielsteuerung:

(1) Pex15 wird von Chaperonen erkannt, die es zum Peroxisom in humanen Zellen transportieren, während PEX26 in der Lage ist, in *S. cerevisiae* das Peroxisom zu erreichen. Pex15 wird in die gleiche Peroxisomenpopulation wie PEX26 in HeLa-Zellen integriert. Dies spricht dafür, dass Pex15 durch denselben Zielsteuerungsmechanismus wie PEX26 erkannt und zum Peroxisom gebracht wird. Ein möglicher Kandidat für diese Funktion ist PEX19. PEX26 und Pex15 besitzen beide ein PEX19-abhängiges Zielsteuerungssignal an ihrem C-Terminus (Halbach et al. 2006). Das konservierte Zielsteuerungssignal befindetet sich im C-Segment der Proteine. Wenn das C-Segment von Pex15 oder PEX26 deletiert wird, verbleiben die Mutanten im Zytosol.

(2) Genau wie Pex15 wird PEX26 in die ER-Membran integriert. In *S. cerevisiae* benutzt es hierfür denselben Mechanismus wie Pex15. PEX26 wird von den Chaperonen des GET-Transportweges erkannt und zu dem Get1/Get2 Rezeptorkomplex rekrutiert. Der koordiniert die Insertion des Proteins in die ER-Membran. Wenn ein Baustein des GET-Transportweges ausfällt, sinkt auch der Anteil von PEX26, der in die ER-Membran eingefügt werden kann. Während der ER-Eintritt von PEX26 in Hefe gut nachvollziehbar ist, bleibt offen, welcher Mechanismus dies in humanen Zellen ermöglicht. Mehrere Studien schließen Get3-Homolog TRC40 als möglichen Koordinator der ER-Integration aus (Yagita et al. 2013, Buentzel et al. 2015).

Der ER-Eintritt von PEX26 ist unabhängig von PEX19. Eine Passage über das ER zum Peroxisom ist nicht notwendig, um die Peroxisomenbiogenese sicherzustellen. Von humanen PEX3 ist bekannt, dass dessen ER-Passage nicht notwendig ist, aber die Geschwindigkeit der Peroxisomenbiogenese in humanen Zellen reguliert (Aranovich et al. 2014). Es gibt weiterhin Hinweise, dass PEX26 durch den gleichen Mechanismus wie PEX3 zum humanen ER rekrutiert wird (Hua et al. 2015). Entsprechend könnte sein Zielsteuerungsverhalten dem von PEX3 ähneln.

In dieser Arbeit wurde anhand des Modellorganismus *S. cerevisiae* Folgendes demonstriert: Bei einem Ausfall des ER-Weges stellt Pex19 sicher, dass PEX26 im Zytosol stabilisiert, ein Abbau durch das Proteasom verhindert und PEX26 sein Zielorganell, das Peroxisom, erreichen wird. Wenn Pex19 und Get3 beide ausfallen, so wird PEX26 durch das Proteasom detektiert und abgebaut.

Die Zielsteuerung von TA-Proteinen ist zum einen von ihrer TMD, zum anderen aber auch von den Aminosäuren, welche die TMD flankieren, abhängig (Borgese et al. 2003). Der TMD von PEX26 folgt eine Aminosäuresequenz, die zwei Häufungen von positiv geladenen, basischen Aminosäuren aufweist. Während die erste Häufung die Zielsteuerung zum Peroxisom beeinflusst (Yagita et al. 2013), hat die zweite Einfluss auf die Stabilität des Proteins. Eine Verminderung der positiven Ladungen führt dazu, dass eine Zielsteuerung hin zum ER begünstigt wird. Erfolgt keine ER-Integration, so werden Mutanten eher abgebaut als der PEX26-Wildtyp.

5. Literaturverzeichnis

Abell BM, Pool MR, Schlenker O, Sinning I, High S (2004): Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J* 23, 2755–2764

Abell BM, Rabu C, Leznicki P, Young JC, High S (2007): Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J Cell Sci* 120, 1743–1751

Adamus G, Zam ZS, Arendt A, Palczewski K, McDowell JH, Hargrave PA (1991): Anti-rhodopsin monoclonal antibodies of defined specificity: characterization and application. *Vision Res* 31, 17–31

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

Beilharz T, Egan B, Silver PA, Hofmann K, Lithgow T (2003): Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 8219–8223

Birschmann I, Stroobants AK, van den Berg M, Schäfer A, Rosenkranz K, Kunau W-H, Tabak HF (2003): Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol Biol Cell* 14, 2226–2236

Borgese N, Colombo S, Pedrazzini E (2003): The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J Cell Biol* 161, 1013–1019

Borgese N, Brambillasca S, Colombo S (2007): How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr Opin Cell Biol* 19, 368–375

Braverman NE, D'Agostino MD, Maclean GE (2013): Peroxisome biogenesis disorders: Biological, clinical and pathophysiological perspectives. *Dev Dis Res Rev* 17, 187–196

Breslow DK, Cameron DM, Collins SR, Schuldiner M, Stewart-Ornstein J, Newman W, Braun S, Madhani HD, Krogan NJ, Weissman JS (2008): A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat Methods* 5, 711–718

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

Chartron JW, Clemons WM, Suloway CJM (2012): The complex process of GETting tail-anchored membrane proteins to the ER. *Curr Opin Struct Biol* 22, 217–224

Chen Y, Pieuchot L, Loh RA, Yang J, Kari TMA, Wong JY, Jedd G (2014): Hydrophobic handoff for direct delivery of peroxisome tail-anchored proteins. *Nat Commun* 5, 5790

Dammai V, Subramani S (2001): The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105, 187–196

De Duve C, Baudhuin P (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323–357

Denic V (2012): A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends Biochem Sci* 37, 411–417

Denic V, Dötsch V, Sinning I (2013): Endoplasmic reticulum targeting and insertion of tail-anchored membrane proteins by the GET pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013334

Dotz G, Gould SJ (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. *J Cell Biol* 135, 1763–1774

Elgersma Y, Kwast L, van den Berg M, Snyder WB, Distel B, Subramani S, Tabak HF (1997): Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* 16, 7326–7341

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

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

Fujiki Y, Nashiro C, Miyata N, Tamura S, Okumoto K (2012b): New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p during peroxisome biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 145–149

Fujiki Y, Okumoto K, Mukai S, Honsho M, Tamura S (2014): Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front Physiol* 5, 307

Halbach A, Landgraf C, Lorenzen S, Rosenkranz K, Volkmer-Engert R, Erdmann R, Rottensteiner H (2006): Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J Cell Sci* 119, 2508–2517

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

Hattula K, Hirschberg D, Kalkkinen N, Butcher SJ, Ora A (2014): Association between the intrinsically disordered protein PEX19 and PEX3. *PLoS One* 9, e103101

Helenius A, Aebi M (2004): Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019–1049

Hettema EH, Motley AM (2009): How peroxisomes multiply. *J Cell Sci* 122, 2331–2336

Hettema EH, Erdmann R, van der Klei I, Veenhuis M (2014): Evolving models for peroxisome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29, 25–30

Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF (2005): Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122, 85–95

Hofmann K, Stoffel W (1993): TMBASE - A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374, 166

Hua R, Gidda SK, Aranovich A, Mullen RT, Kim PK (2015): Multiple Domains in PEX16 Mediate Its Trafficking and Recruitment of Peroxisomal Proteins to the ER. *Traffic* 16, 832-852

Johnson N, Haßdenteufel S, Theis M, Paton AW, Paton JC, Zimmermann R, High S (2013a): The signal sequence influences post-translational ER translocation at distinct stages. *PLoS One* 8, e75394

Johnson N, Powis K, High S (2013b): Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2403–2409

Jones JM, Morrell JC, Gould SJ (2004): PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 57–67

Jonikas MC, Collins SR, Denic V, Oh E, Quan EM, Schmid V, Weibezahn J, Schwappach B, Walter P, Weissman JS (2009): Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 323, 1693–1697

Kalbfleisch T, Cambon A, Wattenberg BW (2007): A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic* 8, 1687–1694

Kemper C, Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, Rapaport D (2008): Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci* 121, 1990–1998

Kim PK, Mullen RT (2013): PEX16: a multifaceted regulator of peroxisome biogenesis. *Front Physiol* 4, 241

Kim PK, Hettema EH (2015): Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. *J Mol Biol* 427, 1176–1190

Kim PK, Mullen RT, Schumann U, Lippincott-Schwartz J (2006): The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol* 173, 521–532

Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M (2005): A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16, 5077–5086

Kuravi K, Nagotu S, Krikken AM, Sjollema K, Deckers M, Erdmann R, Veenhuis M, van der Klei IJ (2006): Dynamamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119, 3994–4001

Kuroda R, Ikenoue T, Honsho M, Tsujimoto S, Mitoma JY, Ito A (1998): Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b5. *J Biol Chem* 273, 31097–31102

Kutay U, Hartmann E, Rapoport TA (1993): A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol* 3, 72–75

Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105–132

Lam SK, Yoda N, Schekman R (2010): A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21523–21528

Lazarow PB, Fujiki Y (1985): Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489–530

Lockshon D, Surface LE, Kerr EO, Kaeberlein M, Kennedy BK (2007): The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* 175, 77–91

Ma C, Agrawal G, Subramani S (2011): Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* 193, 7–16

Mariappan M, Li X, Stefanovic S, Sharma A, Mateja A, Keenan RJ, Hegde RS (2010): A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466, 1120–1124

Matsumoto N, Tamura S, Fujiki Y (2003): The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* 5, 454–460

Motley AM, Hettema EH (2007): Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J Cell Biol* 178, 399–410

Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM (2000): Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367–380

Rhodin J: Correlation of ultrastructural Organisation and function in normal and experimentally changed convoluted tubule cells of the mouse kidney. Phil. Diss., Stockholm University Aktiebolaget Godvil, Stockholm 1954

Rucktäschel R, Thoms S, Sidorovitch V, Halbach A, Pechlivanis M, Volkmer R, Alexandrov K, Kuhlmann J, Rottensteiner H, Erdmann R (2009): Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* 284, 20885–20896

Schrader M, Bonekamp NA, Islinger M (2012): Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1343–1357

Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, Schwappach B, Weissman JS (2008): The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134, 634–645

Setoguchi K, Otera H, Mihara K (2006): Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J* 25, 5635–5647

Shimozawa N (2007): Molecular and clinical aspects of peroxisomal diseases. *J Inher Metab Dis* 30, 193–197

Shimozawa N (2011): Molecular and clinical findings and diagnostic flowchart of peroxisomal diseases. *Brain Dev* 33, 770–776

Shrimal S, Cherepanova NA, Gilmore R (2015): Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum. *Sem Cell Dev Biol* 41, 71–78

Smith JJ, Aitchison JD (2013): Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 803–817

Stefanovic S, Hegde RS (2007): Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128, 1147–1159

Tabak HF, Braakman I, van der Zand A (2013): Peroxisome formation and maintenance are dependent on the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 82, 723–744

Thoms S (2015): Import of proteins into peroxisomes: piggybacking to a new home away from home. *Open Biol* 5, 150148

Thoms S, Harms I, Kalies K-U, Gärtner J (2012): Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic* 13, 599–609

van der Zand A, Braakman I, Tabak HF (2010): Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 21, 2057–2065

van der Zand A, Gent J, Braakman I, Tabak HF (2012): Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* 149, 397–409

Vilardi F, Lorenz H, Dobberstein B (2011): WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci* 124, 1301–1307

Vilardi F, Stephan M, Clancy A, Janshoff A, Schwappach B (2014): WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane. *PLoS One* 9, e85033

Wanders RJA (2013): Peroxisomes in human health and disease: metabolic pathways, metabolite transport, interplay with other organelles and signal transduction. *Subcell Biochem* 69, 23–44

Wanders RJA, Waterham HR (2006): Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75, 295–332

Wang F, Brown EC, Mak G, Zhuang J, Denic V (2010): A chaperone cascade sorts proteins for posttranslational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 40, 159–171

Waterham HR, Ebberink MS (2012): Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1430–1441

Weller S, Cajigas I, Morrell J, Obie C, Steel G, Gould SJ, Valle D (2005): Alternative splicing suggests extended function of PEX26 in peroxisome biogenesis. *Am J Hum Genet* 76, 987–1007

Yagita Y, Hiromasa T, Fujiki Y (2013): Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway. *J Cell Biol* 200, 651–666

Yamamoto Y, Sakisaka T (2012): Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Mol Cell* 48, 387–397

Zielinska DF, Gnad F, Wiśniewski JR, Mann M (2010): Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell* 141, 897–907

6. Publikation

Judith Buentzel, Fabio Vilardi, Amelie Lotz-Havla, Jutta Gärtner, Sven Thoms

Conserved targeting information in mammalian and fungal peroxisomal tail-anchored proteins.

Sci Rep 5, 17420 (2015)

DOI: 10.1038/srep17420

PMID: 26627908

Danksagung

Ich möchte meinem Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Thoms, für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, aber auch für die regen Diskussionen und die Freiheit, die er mir bei der Planung meiner Experimente gegeben hat, danken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Corinna Dickel, die mich geduldig an das Arbeiten im Labor herangeführt und mir bei Durchführung von Experimenten und (technischen) Fragen zur Seite stand und mir stets weiterhelfen konnte.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. med. Jutta Gärtner sowie dem Team aus dem Labor der Neuropädiatrie, mit dem ich die letzten vier Jahre zusammengearbeitet habe.

Lebenslauf


Ich wurde am 09.12.1990 als erste Tochter der Ärzte Heike und Jens Büntzel in Weimar geboren. Durch den Beruf meiner Eltern bedingt erfolgten mehrere Schulwechsel. Im Juni 2009 legte ich am Wilhelm- von- Humboldt Gymnasium die Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0) ab. Von August 2006 bis Februar 2007 hatte ich die Gelegenheit, im Rahmen des Voltaire-Programms das Lycée Louis Lapicque in Epinal (Frankreich) zu besuchen.

Im Oktober 2009 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Ich schloss den vorklinischen Abschnitt des Studiums im September 2011 mit dem Physikum (Note: 1,5) ab. Den klinischen Teil meines Studiums absolvierte ich ebenfalls in Göttingen und beendete ihn im Oktober 2015 mit Bestehen des Zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung (Note: 2,0). Während meines Praktischen Jahres arbeitete an der Universitätsmedizin Göttingen (Abteilungen Thorax-Herz-Gefäßchirurgie, Nephrologie und Rheumatologie, Hämatologie und Onkologie) und in den Schildaukliniken in Seesen (Abteilung für Neurologie). Im November 2016 schloss ich das Medizinstudium erfolgreich (Note: 1,5) ab.

Während meines Studiums wurde ich durch ein Stipendium der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit gefördert. 2014 konnte ich als Stipendiatin der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung am 64th Nobel Laureate Meeting in Lindau teilnehmen. Die Medizinische Fakultät Göttingen unterstützte mich mit einem Promotionsstipendium, dem Jacob-Henle-Programms für Experimentelle Medizin. Das Förderprogramm ermöglichte mir von August 2012 bis September 2013, Teile des Masterstudienganges Molecular Medicine zu belegen, und den experimentellen Teil meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Sven Thoms in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin zu erarbeiten.

Von Oktober 2013 bis Oktober 2015 blieb ich weiter Mitglied der Arbeitsgruppe und habe in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Thoms kleine wissenschaftliche Projekte geplant und betreut. In dieser Zeit habe ich auch an zwei wissenschaftlichen Publikationen mitgewirkt. Meine Forschungsergebnisse konnte ich im Februar 2016 auf dem Kongress „Peroxisystems“ am Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) im Rahmen eines Postervortrages vorstellen.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Conserved targeting information in mammalian and fungal peroxisomal tail-anchored proteins

Judith Buentzel¹, Fabio Vilardi², Amelie Lotz-Havla³, Jutta Gärtner¹ & Sven Thoms¹

Received: 05 May 2015

Accepted: 22 October 2015

Published: 02 December 2015

The targeting signals and mechanisms of soluble peroxisomal proteins are well understood, whereas less is known about the signals and targeting routes of peroxisomal membrane proteins (PMP). Pex15 and PEX26, tail-anchored proteins in yeast and mammals, respectively, exert a similar cellular function in the recruitment of AAA peroxins at the peroxisomal membrane. But despite their common role, Pex15 and PEX26 are neither homologs nor they are known to follow similar targeting principles. Here we show that Pex15 targets to peroxisomes in mammalian cells, and PEX26 reaches peroxisomes when expressed in yeast cells. In both proteins C-terminal targeting information is sufficient for correct sorting to the peroxisomal membrane. In yeast, PEX26 follows the pathway that also ensures correct targeting of Pex15: PEX26 enters the endoplasmic reticulum (ER) in a GET-dependent and Pex19-independent manner. Like in yeast, PEX26 enters the ER in mammalian cells, however, independently of GET/TRC40. These data show that conserved targeting information is employed in yeast and higher eukaryotes during the biogenesis of peroxisomal tail-anchored proteins.

Peroxisome biogenesis requires the concerted action of a number of proteins termed PEX proteins or peroxins. These proteins form the import machinery for peroxisomal matrix proteins, and contribute to peroxisome membrane formation and to peroxisome inheritance¹. The import of most peroxisome matrix proteins is dependent on PEX5, a soluble receptor that recognizes the peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1). PMPs, on the other hand, can enter the peroxisomal membrane either via passage through the ER membrane, or post-translationally via a direct PEX19-dependent pathway. The peroxisome biogenesis factor PEX19 recognizes PMPs by their membrane PTS (mPTS) and, aided by PEX3, chaperones its cargo to and/or into the peroxisomal membrane. Cells are virtually devoid of peroxisomes when one of the peroxins PEX19, PEX3, or PEX16 is not functional^{2–4}.

Cellular peroxisome formation is impaired in a number of genetic disorders, collectively termed peroxisome biogenesis disorders (PBD)⁵. These diseases are characterized by a deficiency of a peroxin leading to an inability to form mature, functional peroxisomes. *PEX1* is the most commonly affected gene in human PBD. *PEX1* and *PEX6* are ATPases of the AAA family⁶, members of which are often special chaperones or segregases, controlling the interaction of other proteins and/or membrane fusion processes⁷. Two different, but not necessarily exclusive functions have been described for AAA peroxins⁸. *PEX6* and *PEX1* are involved in recycling of *PEX5* from the peroxisomal lumen into the cytosol⁹ and biogenesis of peroxisomes from precursor membrane structures by fusion of immature peroxisome precursors^{10,11}. Import of peroxisomal matrix proteins requires a translocon that cycles *PEX5* and its cargo into the peroxisome. Two components form this import machinery: the docking and the RING complex. In yeast, these complexes are stored separately in two distinct pre-peroxisomal vesicles. Upon vesicle

¹University Medical Center, Department of Child and Adolescent Medicine, Robert Koch Str. 40, 37075 Göttingen, Germany. ²Department of Molecular Biology, Humboldtallee 23, 37073 Göttingen, Germany. ³Dr. von Haunersches Kinderspital, Lindwurmstr. 2a, 80337 München. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.T. (email: sven.thoms@med.uni-goettingen.de)

fusion during peroxisome biogenesis both RING and docking complex form the peroxisomal translocon, thus enabling peroxisome matrix protein import^{11,12}.

In yeast, the PMP Pex15 anchors Pex1 and Pex6 to the membrane¹³. In mammals PEX26 is the membrane anchor for PEX1 and PEX6¹⁴. Both, Pex15 and PEX26, are tail-anchored (TA) proteins, integral membrane proteins with a single transmembrane domain (TMD) located at the C-terminus^{14,15}. The TMD of TA proteins necessitates post-translational import into its target membrane¹⁶. TA proteins destined for the ER can enter this organelle by several pathways. The signal recognition particle (SRP) is able to recognize some TA proteins after translation¹⁷. Short secretory proteins use the Sec62/63 channel for translocation into the ER¹⁸. The chaperones Hsp40 and Hsc70 do also stabilize TA proteins post-translationally and mediate ER targeting¹⁹. But the majority of TA proteins is targeted to the ER via the GET/TRC40-pathway²⁰. In yeast Get3 recognizes, binds, and targets the TA protein to the ER²¹. Upon interaction with the Get1/Get2-receptor complex Get3 releases its cargo, which inserts into the ER membrane^{22–26}. TRC40 is the mammalian homologue of Get3²⁷. Insertion of TA proteins into the ER is facilitated by the interaction of TRC40 with a membrane receptor complex formed by WRB^{24,28} and CAML^{29,30}.

PEX26 and Pex15 pose an interesting puzzle: while both are tail-anchored and share the same function, they share no sequence similarity. Pex15 is either a very distant homologue of PEX26 that cannot be recognized due to extreme sequence divergence (divergent evolution), or it has evolved independently with a similar function and membrane topology (convergent evolution). Whereas it was shown that Pex15 enters the ER dependent on the GET-pathway before being targeted to the peroxisome^{15,22}, PEX26 is reported to target PEX19-dependently to the peroxisome directly after its synthesis in the cytosol without involvement of the ER^{31,32}. As Pex15 and PEX26 share a common function, we wanted to analyze if both proteins have common, conserved targeting features. Our results show that PEX26, like Pex15, is integrated into the ER. Furthermore Pex15 and PEX26 are targeted to peroxisomes if expressed in human cells and *S. cerevisiae* respectively, arguing for evolutionarily conserved membrane targeting information in these proteins.

Results

Conserved peroxisome targeting information in the membrane protein PEX26. Mammalian PEX26 and yeast Pex15 share a similar function in AAA peroxin binding and membrane recruitment, and both are TA proteins¹⁴. Yet both proteins show only 15% amino acid identity, indicating that they might not be homologous (Fig. 1a). In the light of their similar function but their dissimilar primary structure we wanted to investigate if both proteins also share common features in their targeting itineraries and mechanisms, and if they follow general mechanisms of membrane targeting. We therefore expressed human PEX26 in yeast fused with an N-terminal enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tag under the control of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GPD) promoter. Although the GPD promoter usually leads to strong overexpression, PEX26 showed very low expression in wild-type *S. cerevisiae* (Fig. 1b). We speculated that unfavorable codon usage of the human protein is the cause for the low expression in yeast. Therefore we mutated the seven uncommon CGG arginine codons to CGC (nucleotide positions 93, 156, 180, 194) or AGG (nucleotide positions 496, 571, 871), which are more common codons for arginine in yeast³³. The resulting codon-optimized construct PEX26^{co} expressed at twofold intensity in yeast compared to the original PEX26 construct (Fig. 1b,c). Improved PEX26 expression from the codon-optimized construct was confirmed by Western blot (Fig. 1d).

Next we studied the intracellular localization of human PEX26 in yeast. When we expressed PEX26 fused to the C-terminus of the EGFP, the protein accumulated in puncta indicative of peroxisomal localization (Fig. 1b,e). Co-expression of EGFP-PEX26 with the peroxisome matrix marker HcRed-SKL led to co-localization of both fluorescent fusion proteins (Fig. 1e). We therefore conclude that human PEX26 is targeted to peroxisomes in *S. cerevisiae*. The natural variant PEX26 Δ ex5 lacks the TMD which is encoded by exon 5³⁴. Expression of PEX26 Δ ex5 fused with an N-terminal EGFP leads to cytosolic localization (Fig. 1e) indicating that the TMD is needed for peroxisomal targeting. To test this further, we cloned and expressed the TMD of PEX26 together with the C-segment as a fusion protein with N-terminal EGFP. The fusion protein localized to the peroxisome, although it is expressed at a low level (Supplementary Figure S3).

Given the surprising localization of PEX26 in yeast peroxisomes, we investigated if PEX26 could complement *pex15*-deficiency in yeast. Yeasts with defective Pex15 lack mature peroxisomes¹⁵ and are thus not able to grow on oleate medium³⁵. Expression of Pex15 allowed growth on oleate, but expression of PEX15 Δ TMD and PEX26 could not complement the Δ *pex15* strain (Fig. 1f). To test if the C-terminal TMD and peroxisomal targeting information of PEX26 combined with the cytosolic domain of Pex15 would restore peroxisomal function, we designed a Pex15-PEX26 fusion protein comprising the cytosolic N-terminal part of Pex15 (amino acids 1 to 331) and the TMD with the C-terminus of PEX26 (amino acids 252 to 305). This fusion protein was expressed in the Δ *pex15* strain and allowed growth on oleate (Fig. 1f). Then we co-expressed the constructs used for the oleate assay with HcRed-SKL. Peroxisomal localization of HcRed-SKL and thus functional peroxisomes were only observed in the Δ *pex15* strains expressing Pex15 or the Pex15-PEX26 fusion protein (Fig. 1g). These experiments show that the cytosolic domain of PEX26 cannot replace the cytosolic domain of Pex15, but C-termini of PEX26 and Pex15 share common targeting information that allow peroxisomal targeting and restoration of peroxisome

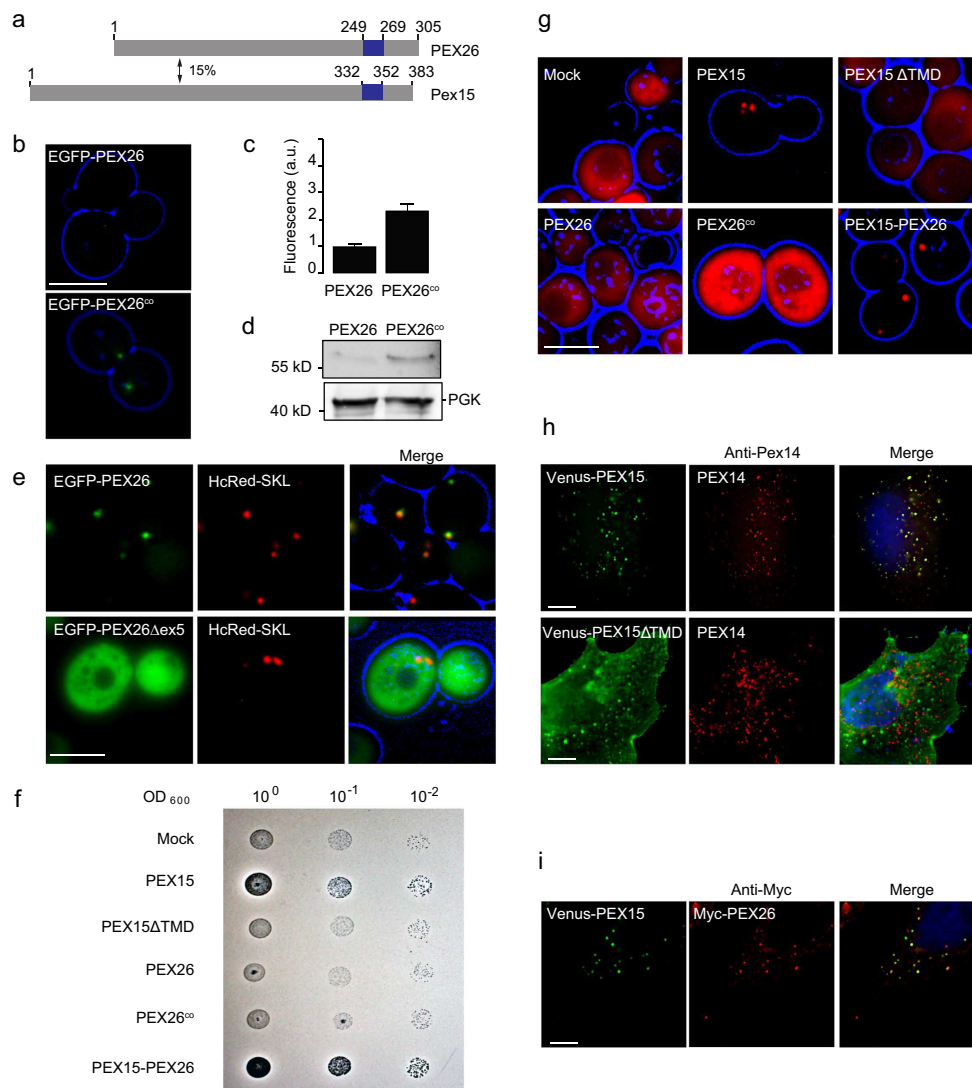


Figure 1. Peroxisome targeting information in PEX26 and Pex15 is evolutionarily conserved. (a) Human PEX26 and yeast Pex15 are functionally similar tail-anchored proteins with only 15% amino acid identity (pairwise alignment Emboss Needle default settings). Predicted TMDs (Topcons⁶²) are marked in blue. TMDs are followed by the luminal amino acids, the so-called C-segment. (b–d) Improved expression of PEX26 in yeast after codon-optimization. GPD promoter-driven expression of PEX26 and codon-optimized PEX26^{co} in wild-type yeast cells. PEX26 was labelled at the N-terminus with the green fluorescent protein EGFP. (b) Direct fluorescence of EGFP-PEX26 and EGFP-PEX26^{co}. Cell contours are shown in blue (widefield images). Bar = 10 μm. (c) Quantification of (b). The expression of PEX26^{co} increased by factor 2.3. N = 94 and 102. Error bar = s.e.m. P < 0.0001 (unpaired t-test). (d) Western blot of logarithmically grown cells with an anti-GFP antibody. Full-size blots are presented in Supplementary Figure S1. (e) PEX26 localizes to peroxisomes in yeast. Co-localization with the peroxisome marker HcRed-SKL. PEX26^{Δex5} lacks the TMD encoded by exon 5 and shows cytosolic localization. Bar = 5 μm. (f) The TMD and C-segment of PEX26 can functionally replace the TMD and C-segment of Pex15 in yeast. PEX26 cannot restore peroxisome maturation in $\Delta pex15$ yeast. Growth assay on olate plates of $\Delta pex15$ cells transformed with plasmids expressing Pex15, Pex15^{ΔTMD}, PEX26, PEX26^{co} or Pex15-PEX26. Halos indicate olate consumption. (g) The Pex15-PEX26-fusion protein is able to restore peroxisomal matrix protein import of HcRed-SKL in $\Delta pex15$ yeast cells. Pex26 and PEX26^{co} fail to re-establish peroxisomal matrix protein import. Co-expression of Pex15, Pex15^{ΔTMD}, PEX26, PEX26^{co} or Pex15-PEX26 with HcRed-SKL. Bar = 5 μm. (h) Yeast Pex15 is imported into peroxisomes in HeLa cells. The peroxisomal targeting information of Pex15 is situated in the TMD and the C-segment. Pex15^{ΔTMD} remains cytosolic. Immunofluorescence of Venus-Pex15 and Venus-Pex15^{ΔTMD} with antibodies directed against the peroxisomal membrane protein PEX14. Bar = 10 μm. (i) PEX26 and Pex15 co-localize in the same population of peroxisomes in HeLa cells upon co-expression. Co-transfection with Venus-Pex15 and Myc-PEX26 and immunofluorescence with anti-Myc antibody directed against Myc-PEX26. Bar = 10 μm.

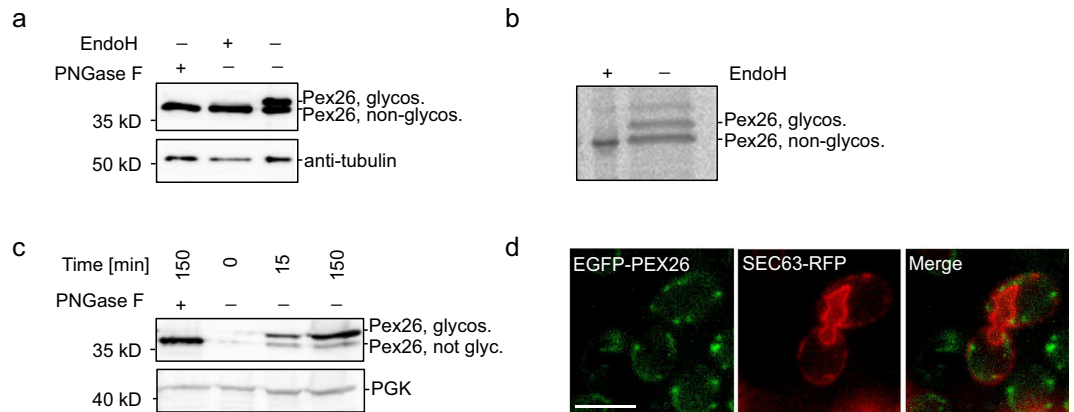


Figure 2. The C-terminus of PEX26 becomes exposed to the endoplasmic reticulum. (a) PEX26-ops enters the ER in HeLa cells. Glycosylation is used as marker for ER integration. Western blot. Samples were taken 48 hours after transfection with PEX26-ops. The slower migrating band indicates glycosylation. Controls: lysates were treated with the deglycosylating enzymes PNGase F and EndoH. (b) ER entry of PEX26-ops within 30 min. Autoradiograph. HeLa cells expressing PEX26-ops were labelled for 30 min with [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine. Cells were lysed and PEX26-ops was immunoprecipitated with anti-opsin antibody. (c) PEX26-ops glycosylation indicates that the luminal domain is exposed to the ER in yeast. GAL1 promoter-driven expression of PEX26-ops in yeast is induced for 15 or 150 min. After 150 min, the majority of the PEX26-ops is glycosylated. (d) EGFP-PEX26 localizes to the ER in the absence of peroxisomes. Expression of EGFP-PEX26 in $\Delta pex19$ yeast. Close association of EGFP-PEX26 with the ER marker Sec63-RFP. Bar = 5 μ m. Full-size blots and autoradiograph are presented in Supplementary Figure S1.

maturation in the $\Delta pex15$ strain. The peroxisomal localization of EGFP-PEX26 in *S. cerevisiae* suggests a conserved targeting signal for this peroxisomal protein between mammalian cells and yeast. In all subsequent experiments with PEX26 in yeast, we used this codon-optimized form, and we will refer to PEX26^{co} as PEX26.

To further investigate this conserved targeting process, we conversely expressed Venus-Pex15 in HeLa cells and analyzed its localization by direct fluorescence and immunofluorescence. The majority of Venus-Pex15 localized in puncta that co-labelled with the peroxisomal marker PEX14 (Fig. 1h). These results show that, like PEX26 in *S. cerevisiae*, Pex15 localizes to peroxisomes in HeLa cells.

We then asked if Pex15 and PEX26 localized into the same or different populations of human peroxisomes. Myc-PEX26 and Venus-Pex15 were co-expressed in HeLa cells and analyzed by combined immunofluorescence and direct fluorescence. Both, PEX26 and Pex15 localized into puncta that coincided with each other showing that Pex15 and PEX26 are targeted into the same population of peroxisomes (Fig. 1i).

PMPs are thought to share a—yet poorly defined—targeting signal found near the TMD, called membrane PTS (mPTS)³⁶. We therefore think that the conserved targeting information, that allowed the peroxisomal targeting of Pex15 in HeLa cells and PEX26 in yeast, is localized near the C-terminus, comprising the TMD and the luminal segment. This is supported by the complementation of the fusion protein Pex15-PEX26 in $\Delta pex15$ yeast. When we expressed Pex15 without the TMD and the luminal segment (Venus-Pex15 Δ TMD) in HeLa-cells, the protein localized to the cytosol and could not enter the peroxisome which further supports this hypothesis (Fig. 1h). Gray-scale representations of single channel images of Fig. 1h,i are in Supplementary Figure S2.

Like PEX26 in *S. cerevisiae*, yeast Pex15 localizes to peroxisomes in HeLa cells. The protein is targeted to the same sub-population of peroxisomes like human PEX26. As HeLa cells comprise functional peroxisomes that require PEX26, this observation indicates that Pex15 was inserted into mature peroxisomes. Pex15 and PEX26 share a targeting signal, which is conserved amongst species.

The C-terminus of PEX26 gets exposed to the endoplasmic reticulum lumen. Pex15 traffics to the peroxisome via the ER in a GET-dependent manner²², whereas the targeting of PEX26 was shown to be independent of Get3-homologue TRC40³¹. Given the similar peroxisome-targeting properties of Pex15 and PEX26, we wanted to study the earlier steps of PEX26 targeting in mammalian and in yeast cells and asked if PEX26 enters the ER. PEX26 was tagged with a short opsin-tag that can be glycosylated in the ER lumen to monitor ER-passage³⁷. Samples were taken 48 hours after transfection of HeLa cells with PEX26-ops. Controls were treated with the deglycosylating enzymes EndoH and PNGase F. The control samples showed a single band on Western blot, whereas in untreated samples two bands were detected (Fig. 2a). The lower band migrated at the same level as the deglycosylated sample, thus representing the non-glycosylated protein. The upper band showed a lower mobility due to glycosylation. We conclude that PEX26 entered the ER.

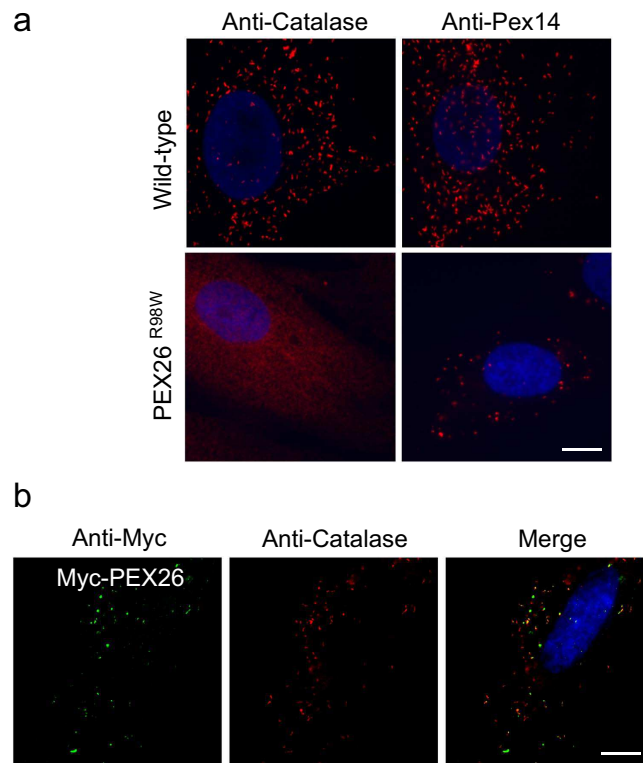


Figure 3. Human PBD fibroblasts with a mutation in *PEX26*. (a) *PEX26* deficiency leads to impaired peroxisome maturation. Fibroblasts from a control and from a patient with *PEX26*^{R98W} mutation were probed with antibodies directed against the peroxisomal matrix protein catalase and the peroxisomal membrane protein PEX14. No catalase import in patient fibroblasts. Apparent peroxisome size is increased in the patient fibroblasts, but peroxisomes are less abundant. Bar = 10 μ m. (b) Expression of Myc-*PEX26* in *PEX26*^{R98W} fibroblasts partially restores peroxisome maturation and import of catalase. Catalase is largely localized to the peroxisome, but peroxisome number is still reduced. Bar = 10 μ m. Gray-scale representations of single channel images of this figure are in Supplementary Figure S2.

To confirm these results we designed a radio-pulse label experiment. HeLa cells were transfected with *PEX26*-ops. Twenty-four hours after transfection, cells were labelled with [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine for only 30 min and *PEX26*-ops was immunoprecipitated with an anti-opsin antibody. *PEX26*-ops appeared as a double band on the autoradiograph (Fig. 2b). A control with EndoH showed that the lower band corresponded to the deglycosylated form, whereas the upper band in the gel is the glycosylated protein (Fig. 2b). The short pulse was thus sufficient to monitor *PEX26* glycosylation in the ER.

To investigate *PEX26* trafficking in yeast, the C-terminus of *PEX26* was tagged with a short opsin-tag codon-optimized for expression in yeast that would allow glycosylation if *PEX26* passed the ER in *S. cerevisiae*. *PEX26*-ops was expressed under the control of the galactokinase (*GAL1*) promoter in wild-type cells for up to 150 min. A control was treated with PNGase. *PEX26* migrated as double band, the lower coincided with the deglycosylated form, and the upper was only detected in the untreated sample (Fig. 2c). The mobility shift must thus be due to glycosylation, indicating that *PEX26* targets to the ER in yeast also in the pulse-experiment.

Next we co-expressed *GAL1*-driven EGFP-*PEX26* with the ER-marker Sec63-RFP in $\Delta pex19$ cells to assess the localization of *PEX26* in the absence of peroxisomes in a pulse-chase experiment. One hour after the pulse, EGFP-*PEX26* was found in close association with the ER-marker (Fig. 2d) indicating that *PEX26* accumulates in an ER-proximate compartment. These results also suggest that Pex19 is not required for targeting *PEX26* to the ER. Similar to Pex15, *PEX26* is inserted into the ER in *S. cerevisiae*^{15,38}. Furthermore we could show that the luminal part of the protein gets exposed to the ER lumen in HeLa cells.

Human PBD fibroblasts with mutations in *PEX26*. *PEX26* contributes to peroxisome biogenesis by anchoring *PEX6* and *PEX1* to the membrane of the peroxisome. The development of a mature import-competent peroxisome is not possible in the absence of *PEX26*^{3,9}. To assess the cellular phenotype of *PEX26* deficiency we stained skin fibroblasts from a patient with a homozygous *PEX26* C292 > T (R98W) mutation for the peroxisomal matrix protein catalase. As expected, the protein showed cytosolic localization (Fig. 3a). When we stained for the PMP *PEX14* round plump puncta were observed.

They were larger in size and smaller in number than peroxisomes found in the control and clustered mainly in the cell center and close to the nucleus. These immature peroxisomes were not able to import catalase (Fig. 3a). In control fibroblasts, catalase was localized to defined puncta that were more evenly distributed within the cell (Fig. 3a). We tested if our *PEX26* construct was able to restore peroxisome maturation upon introduction in *PEX26*^{-/-}-deficient fibroblasts. We transfected *PEX26*-deficient patient fibroblast cells with Myc-*PEX26*. Catalase was used as a marker for peroxisome biogenesis. In the transfected cell, catalase is largely localized to the peroxisome, but peroxisome number remains reduced. The construct thus partially restored catalase import in the deficient cell line (Fig. 3b).

PEX26 targeting to the ER is dependent on the GET machinery. Next we wanted to analyze if the GET-pathway which is responsible for inserting Pex15 into the ER³⁹, is also used by *PEX26*. As TA proteins employ a broad range of mechanisms that lead to their targeting to the ER^{24,40} we also tested for a possible dependency on post-translational targeting factors.

PEX26-ops was expressed in different *get*-deficient strains, and in *DAmP-sec62* and Δ *sec72* yeasts. Protein expression under the control of the *GAL1* promoter was induced by shifting de-repressed cells to galactose. *PEX26*-ops, when expressed in the wild-type control strain, appeared as a double band in the Western blot (Fig. 4a, lane 2). Double bands representing both glycosylated and non-glycosylated protein were also present in *sec62*- and *sec72*-deficient strains. There was no change of glycosylation levels observed between the *PEX26*-ops expressed in *DAmP-sec62* or Δ *sec72* and the control (Fig. 4a, lanes 3 and 4, see also Supplementary Table S1). In all *get*-deficient strains, however, the majority of *PEX26* migrated in the fraction of the lower band corresponding to the non-glycosylated *PEX26* (Fig. 4a). Less than 20% of *PEX26* became glycosylated in all strains lacking one or several components of the GET-pathway acting at different stages of TA protein biogenesis (Fig. 4a, lanes 5 to 9). When we transformed the *get5*-deficient strain with a *GET5*-expressing plasmid, the pathway was rescued and *PEX26* glycosylation was restored (Fig. 4b). We conclude that ER-targeting of *PEX26* is dependent on the GET-pathway. When EGFP-*PEX26* was pulse-expressed in a Δ *get3* strain, the protein localized into green puncta that did not coincide with the ER, but with the peroxisomal marker HcRed-SKL indicating that *PEX26* can reach peroxisomes in the absence of GET3 (Fig. 4c).

Taken together, the data indicate a GET-dependent but non-essential ER targeting of *PEX26*. *PEX26* can eventually reach peroxisomes even if the GET-pathway is impaired. ER integration of *PEX26* also appears to be independent of the post-translational Sec62 and Sec72 translocon subunits.

In the light of the GET-dependency of *PEX26* in *S. cerevisiae* we wanted to investigate if ER integration in HeLa cells was dependent on the mammalian Get3 homologue TRC40. HeLa cells were co-transfected with *PEX26*-ops and TRC40 or dominant negative mutants of TRC40 previously reported to impair TA protein targeting in HeLa cells³⁹. *PEX26*-ops was detected by Western blot. Glycosylation was not altered between the control and samples overexpressing TRC40 or TRC40 mutants (Fig. 4d). To be able to identify smaller changes in *PEX26* glycosylation, we performed a radio-pulse experiment co-expressing the dominant TRC40 mutant SW1 that impedes ER entry of the TA protein Ramp4-ops (Fig. 4e). *PEX26*-ops was precipitated through the opsin-tag from radio-labelled cells co-transfected with *PEX26*-ops and TRC40. Similar to Western blot analysis, the autoradiograph indicated that *PEX26* glycosylation is not influenced by co-expression of TRC40 or dominant TRC40 mutants (Fig. 4f). These findings confirm previous microscopy studies showing that the ER targeting of *PEX26* in mammalian cells is independent of the TRC40-pathway³¹.

In yeast *PEX26* glycosylation occurs before Pex19-dependent peroxisome formation. *PEX19* plays a crucial role in targeting of PMPs to the peroxisome^{36,41} and has been shown to support the trafficking of *PEX26* to peroxisomes^{31,42}. We now find that *PEX26* enters the ER. Therefore we wanted to investigate if *PEX19* is involved in the integration of *PEX26* into the ER or at later steps of peroxisome formation. We expressed *PEX26* in *pex19*-deficient yeast cells. Again, the protein was controlled by the *GAL1* promoter and induced in a pulse experiment. In the wild-type, 32% of the *PEX26* remained without glycosylation. In Δ *pex19*, only 14% were not glycosylated (Fig. 5a). The expression of *PEX26* dropped by 20% relative to the control protein PGK. This reduction in the total amount of *PEX26* can be attributed to the reduction of the not-glycosylated *PEX26*, because the amount of glycosylated *PEX26* remains unchanged (Fig. 5a). This observation is in agreement with a role of Pex19 stabilizing PMPs in the cytosol².

PEX26 was then expressed in HeLa cells treated with siRNA targeting *PEX19*. The knock-down reduced *PEX19* protein by 81% (Fig. 5b). Cells were analyzed in a radio-pulse experiment with [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine. *PEX26*-ops glycosylation level was not altered between cells treated with siRNA or without (Fig. 5b). These data indicate the ER entry of *PEX26* is independent of *PEX19*.

Our data in yeast show that *PEX26* targeting to the ER is dependent on Get3, but not on Pex19. However, Get3 and Pex19 are chaperones affecting the targeting of *PEX26*. Therefore we wanted to investigate the functional relationship of these proteins in *PEX26* targeting. We expressed *PEX26* in Δ *get3* and in Δ *pex19* strains and compared the glycosylation pattern in these mutants with a Δ *pex19* Δ *get3* knock-out. Expression in Δ *get3* confirmed that the majority of *PEX26* remained non-glycosylated, whereas glycosylation was observed again when expressing *PEX26* in Δ *pex19*-cells (Fig. 5c). The double knock-out showed a reduction of total *PEX26* compared to the wild-type and the single knock-out

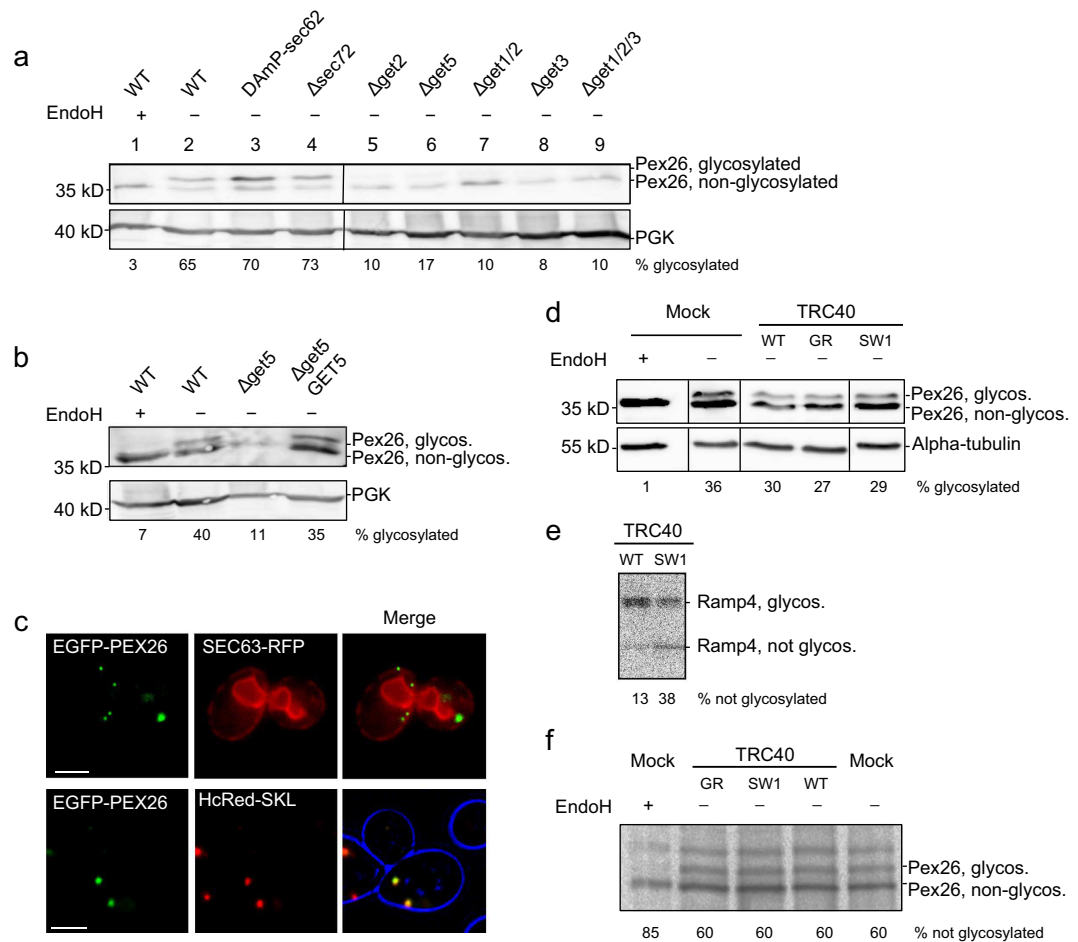


Figure 4. PEX26 targeting to the ER is dependent on the GET machinery. (a–c) GAL1 promoter-driven pulse expression of PEX26-ops in yeast. Opsin glycosylation reports entry into the ER. (a) GET-dependent but SEC62/SEC72-independent entry of PEX26-ops into the ER in yeast. Strains defective in post-translational ER targeting (DAmP-sec62, Δsec72)⁶³ or the GET pathway were transformed with PEX26-ops and expression was induced for 120 min. Western blot with anti-opsin antibodies. Both halves of each panel were cropped from the same blot. Quantifications of band intensities can be found in Supplementary Table S1 (n ≥ 3). (b) Extrachromosomal GET5-expression restores ER entry of PEX26-ops in Δget5-yeasts. Induction for 120 min. Western blot with anti-opsin antibodies. (c) EGFP-PEX26 does not integrate into the ER if the GET-pathway is impaired, but co-localizes with the peroxisomal marker HcRed-SKL. Co-expression of EGFP-PEX26 with Sec63-RFP ER marker or peroxisomal marker HcRed-SKL in a Δget3 strain. Bar = 5 μm. (d–f) Integration of PEX26-ops into the ER is TRC40-independent. Co-transfection of PEX26-ops with TRC40^{WT}, TRC40^{SW1}, TRC40^{GR} or mock plasmid. (d) TRC40 and TRC40 mutants do not influence ER targeting of PEX26-ops. Western blot. HeLa cells were co-transfected for 15 hours with PEX26-ops and mock, TRC40 or TRC40 mutant. All parts of each panel were cropped from the same blot. (e,f) TRC40-independent ER targeting of PEX26. Overexpression of the dominant TRC40 mutant SW1 impairs ER entry of Ramp4-ops but not of PEX26. HeLa cells co-expressing (e) Ramp4-ops or (f) PEX26 and TRC40 variants were labelled for 15 min with [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine. (e) Ramp4-ops and (f) PEX26 were immunoprecipitated with anti-opsin antibodies and analyzed by autoradiography. Band intensities were quantified. Full-size blots and autoradiograph are presented in Supplementary Figure S1.

strains (Fig. 5c). The level of glycosylated PEX26 in the double knock-out was similar to Δget3 (Fig. 5c). These results suggest that the absence of PEX19 does not interfere with the Get3-dependent targeting of PEX26, but that Pex19 is able to stabilize the cytosolic PEX26 that accumulates in the absence of Get3.

In order to investigate if the reduction of total PEX26 in Δpex19Δget3 cells was due to protein degradation we repeated the pulse-experiment and added 30 μM of the proteasome inhibitor MG132 to yeast cultures during induction of PEX26-ops expression. We observed an increase of PEX26-ops, both glycosylated and non-glycosylated, in all samples treated with the proteasome inhibitor. For example, the non-glycosylated form in Δpex19 cells increased by a factor of 2.4 (Fig. 5d). We conclude that both, Pex19 and Get3, stabilize PEX26-opsin after translation in yeast.

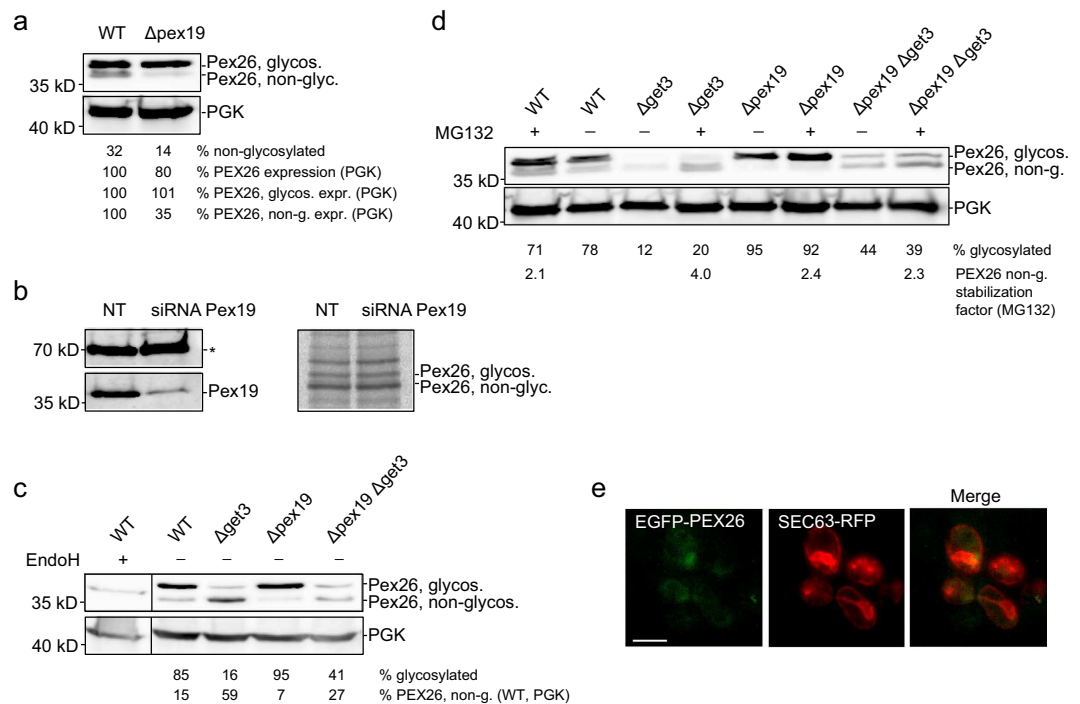


Figure 5. The Pex19-dependent steps occur after or independently of ER entry of PEX26. (a,b) ER integration of PEX26-ops is independent of PEX19, both, in HeLa and in yeast cells. (a) Knock-out of *PEX19* does not affect the ER entry of PEX26-ops but affects the level of non-glycosylated PEX26. Expression of PEX26-ops in Δ pex19 cells for 120 min. To compare protein expression in wild-type and Δ pex19 PEX26-ops expression is stated in relation to PGK levels. '%PEX26 expression' is the total amount of PEX26 relative to PGK. '%PEX26, glycos. expr.' and '%PEX26 non-g. expr.' are the levels of glycosylated and non-glycosylated forms relative to PGK. WT was set to 100%. Quantifications show that only the non-glycosylated PEX26-ops is reduced to 35% in Δ pex19 cells. (b) PEX19 does not influence ER entry of PEX26-ops in mammalian cells. HeLa cells expressing PEX26-ops were treated for 60 hours with siRNA directed against PEX19 or with non-targeting siRNA. For radiolabelling, cells were grown for 15 min with [³⁵S]-cysteine and [³⁵S]-methionine before immunoprecipitation of PEX26-ops. Western blot (left): Knockdown of PEX19. The asterisk marks a nonspecific band as a loading control. Autoradiograph of radio-pulse experiment (right): Pex26-ops glycosylation is not reduced. (c) Pex19 stabilizes cytosolic PEX26-ops in the absence of Get3. The additional Δ pex19 knockout in Δ get3 reduces the non-glycosylated form of PEX26-ops from 59% to 27%. '%PEX26 non-g. (WT, PGK)' is relative to wild-type, normalized by PGK protein expression. Both parts of each panel were cropped from the same blot. (d) Pex19 and Get3 stabilize cytosolic PEX26-ops. Non-stabilized PEX26-ops is degraded by the proteasome. Cells treated with 30 μ M MG132 show a 2.1- to 4-fold increase of non-glycosylated, cytosolic PEX26-ops in wild-type, Δ pex19, Δ get3, and Δ pex19 Δ get3 strains. (e) Pex19 and Get3 are required for organelle targeting of PEX26. Localization of EGFP-PEX26 in Δ pex19 Δ get3 yeast. GAL1 promoter-driven expression was recorded 80 min after chase. EGFP-PEX26 does not co-localize with the ER marker Sec63-RFP. Bar = 5 μ m. Full-size blots and autoradiograph are presented in Supplementary Figure S1.

We expressed GAL1-driven EGFP-PEX26 in Δ pex19 Δ get3 to visualize the localization of PEX26. 80 min after the pulse the majority of EGFP-PEX26 localized in the cytosol (Fig. 5e). ER-localization or a similar behavior like in Δ get3-cells (EGFP-PEX26 in puncta, like in Fig. 4c) was not observed. We conclude that Pex19 and Get3 are both responsible for targeting PEX26 in yeast.

Taken together, in yeast PEX26 is targeted GET-dependently to the ER. When the GET-pathway is blocked, the cytosolic pool of PEX26 is further stabilized by the yeast Pex19. The recognition of PEX26 by yeast Pex19 is another conserved feature of the peroxisome biogenesis machinery. When Pex19 is deficient in addition to Δ get3, the expression and stability of PEX26 is further decreased. These data therefore suggest that the ER-targeting of PEX26 occurs before Pex19-dependent peroxisome formation (Fig. 6).

Discussion

The challenge of tail-anchored protein targeting to the peroxisome. Our understanding of TA protein targeting to the secretory pathway or the outer mitochondrial membrane has advanced

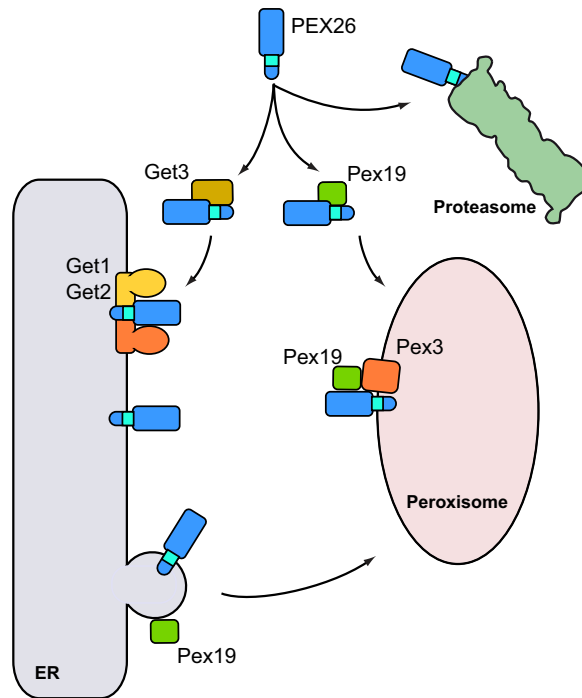


Figure 6. Model of PEX26 targeting. TA proteins are translated in the cytosol and require chaperone systems for post-translational targeting. The peroxisomal TA protein PEX26 is recognized by Get3 in the cytosol and directed to the ER. The receptor complex consisting of Get1 and Get2 mediates the insertion of PEX26 into the ER membrane. In the membrane, PEX26 is sorted into pre-peroxisomal vesicles that require Pex19 for budding from the ER. In the absence of *GET3*, the majority of cytosolic PEX26 is stabilized by the PMP chaperone Pex19 and directly targeted to the peroxisome, where an interaction of Pex19 and Pex3 mediates the integration of PEX26 into the peroxisomal membrane. If both, Get3 and Pex19, are inactivated, PEX26 is degraded by the proteasome.

considerably in recent years^{24,25,40,43}. However, how TA proteins are integrated into the peroxisomal membrane is poorly understood. The TA proteins yeast Pex15 and mammalian PEX26 are PMPs involved in the recruitment of the AAA-type ATPases PEX1 and PEX6 to the maturing peroxisome^{13,14}. Pex15 and PEX26 are thus functionally very similar despite showing only a low similarity in their amino acid sequence. The peroxisome targeting of both proteins is dependent on PEX19^{32,44}. However, Pex15 is also known for its ability to enter the ER as a substrate of the GET-pathway^{15,22}, whereas the targeting PEX26 is independent of the mammalian Get3 homologue TRC40³¹.

In this study we wanted to revisit the targeting of these two proteins. We analyzed PEX26 in mammalian cells, and we codon-optimized PEX26 for expression in yeast. Cross-expression of PEX26 in yeast and Pex15 in HeLa cells showed that both exogenously expressed proteins are targeted to peroxisomes. This suggests that Pex15 and PEX26 could be targeted by a common, conserved membrane targeting signal.

Targeting of the peroxisomal membrane protein PEX26 to the ER. PEX19 is thought to recognize PMPs shortly after their translation in the cytosol and to subsequently target them to the peroxisomal membrane^{2,45,46}. However this model does not consider that various PMPs including Pex15 are targeted to the ER before entering the peroxisomal membrane^{47,48}. To study if PEX26 enters the ER we tagged the protein with an opsin-tag that becomes glycosylated once the C-terminal domain faces the lumen of the ER. Surprisingly, PEX26 was glycosylated both in *S. cerevisiae* and HeLa cells, mirroring the behavior of Pex15. We conclude that passage through the ER is another common feature shared by Pex15 and PEX26. Generally, ER-targeting of TA proteins is dependent on the GET/TRC40-pathway, on a post-translational SRP-dependent pathway, or on chaperones of the Hsc70/Hsp40 family⁴⁰. We were able to show that PEX26 can enter the ER in *S. cerevisiae* independently of the SEC-translocon subunits Sec62 and Sec72. This seems reasonable as the ER translocon containing Sec62 and Sec63 is specialized on post-translational transport of short secretory proteins comprising less than 80 amino acids¹⁸. In *S. cerevisiae* however PEX26 uses the GET-pathway for targeting to the ER similar to its yeast analog Pex15²². Nevertheless, PEX26 can eventually reach peroxisomes even in absence of a functional GET-pathway in agreement with the postulated redundancy of TA protein biogenetic pathways⁴³ and/or by spontaneous insertion¹⁶. Accordingly, in mammalian cells, dedicated but yet unidentified chaperones

could shuttle peroxisomal TA proteins to the ER membrane in a TRC40-independent manner as shown by our experiments that confirmed TRC40-independent targeting of PEX26 in mammalian cells³¹.

Contrary to other models of PEX26 targeting³¹, the finding that PEX26 can enter the ER independent of the TRC40 pathway shows that GET/TRC40-independence cannot be used as argument against the involvement of the ER in peroxisome biogenesis routes. One possible reason for TRC40-independence of PEX26 might be that the TMD hydrophobicity of PEX26 is too low for recognition by TRC40, similarly to PEX26 from *Neurospora crassa*⁴⁹. Human PEX26 has a more hydrophobic TMD than Pex15⁴⁹, which is a regular substrate of the GET-pathway. The higher hydrophobicity of human PEX26 might therefore be the reason why transport and insertion of PEX26 into the ER is GET-dependent in yeast. The effect of PEX16, a PMP found in mammalian but not in yeast cells, might also contribute to the differences in ER targeting of PEX26 in yeast and human. Overexpressed PEX16 was recently reported to recruit the TMD and the C-segment of PEX26 to the ER⁵⁰. Although the signal recognized by PEX16 is not known, one could speculate that PEX16 is involved in the targeting of PEX26 in a manner similar to Get3 in yeast.

The role of PEX19 in PMP targeting to the ER and the peroxisome. We tested the hypothesis that PEX19 is the chaperone that would mediate PEX26 entry into the ER. PEX26 was expressed in a $\Delta pex19$ yeast strain and in a [³⁵S]-pulse experiment in HeLa cells treated with siRNA directed against PEX19. In both cases the levels of PEX26 glycosylation were not altered compared to wild-type. We conclude that PEX19 does not influence the targeting of PEX26 into the ER membrane. But PEX19 is known to stabilize PMPs just after their translation in the cytosol^{2,45,46}. Indeed, we observed that the pool of non-glycosylated PEX26 was stabilized in the absence of Get3. When expressed in a $\Delta pex19\Delta get3$ strain the amount of non-glycosylated PEX26 decreased compared to the protein detected in the $\Delta get3$ strain. Degradation of non-targeted PEX26 is likely proteasome dependent as the addition of a proteasome inhibitor increased the amount of detectable PEX26. These results allow drawing a model whereby Pex19 is able to stabilize cytosolic PEX26 in the absence of Get3 (Fig. 6). If Pex19 exerts an additional influence on PEX26 targeting, this is likely to occur after ER integration or in a parallel pathway.

We showed that yeast Pex15 and mammalian PEX26 behave similar despite being expressed in evolutionarily distant organisms. In yeast, mammalian PEX26 appears to follow a similar itinerary like Pex15. We speculate that PEX26 is included in the same pre-peroxisomal vesicles that require Pex19 to bud from the ER and to be targeted to peroxisomes³⁸. These vesicles might correspond to the structures closely associated with the ER that we observed while expressing PEX26 in $\Delta pex19$ cells.

The role of the ER in peroxisome formation. Most cellular membrane proteins are first targeted to the ER. Chloroplasts and mitochondria, owing to their endosymbiotic history, are noticeable exceptions. Peroxisomes are not of endosymbiotic origin and seem to have evolved a more complex set of protein targeting routes^{12,51,52}. Therefore, whether PMPs are first targeted to the ER, is discussed controversially in the field.

It has often been argued that post-translational import of proteins into peroxisomes and growth and division of peroxisomes speak for direct import of both, matrix and membrane proteins^{4,52,53}. On the other hand, biogenesis of peroxisomes in yeast occurs mainly *de-novo*⁵⁴ at the ER from distinct pre-peroxisomal vesicles that contain partially assembled docking and RING complexes¹¹. Upon fusion of these vesicles the transport complex required for peroxisome matrix protein import is established. A prerequisite for peroxisome maturation is that PMPs travel via the ER towards the budding side of these pre-peroxisomal vesicles. While nearly all of PMPs in *S. cerevisiae* enter the ER^{47,48}, in human cells, only PEX3, PMP34, and PEX16 have been shown to pass the ER^{55–57}.

Recent work in a mammalian system provided evidence that PEX3 and PMP34 pass the ER before entering the peroxisome if PEX16 is present⁵⁷. It was proposed that PMPs are transported to the peroxisome either using a PEX16- and ER-dependent (group I) pathway, or a direct, PEX16-independent pathway with direct post-translational PMP insertion into the peroxisomal membrane (group II). Both pathways are not mutually exclusive – upon saturation of the slower group I pathway PEX3 was directed to the peroxisome via the other^{52,57}. Following this model, PEX26 could be targeted PEX16-dependently via the ER towards the peroxisome⁵⁰. When PEX26 is overexpressed, the PEX16-dependent pathway might be saturated and the successive employment of the PEX16-independent path could explain why we find both glycosylated and non-glycosylated PEX26 on our Western blots and autoradiographs. We also showed that similar to mammalian PEX3, PEX26 in yeast can travel two possible routes to the peroxisome. The GET-dependent targeting to the ER is favored. But if this pathway is impaired, a second, Pex19-dependent targeting mechanism ensures proper integration into the peroxisomal membrane (Fig. 6).

Materials and Methods

DNA cloning. All oligonucleotides and plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S2 and Supplementary Table S3, respectively. pENTR221-PEX26⁶⁰ (PST1193) was derived from pENTR221-PEX26 (PST1147) by using the primers OST751, OST752, OST753, OST754, OST755, OST756, OST757, OST758, OST789, OST790, OST791, and OST792 for site-directed mutagenesis of pENTR221-PEX26.

pAG416-GPD-EGFP-PEX26^{co} (PST1310) was generated from entry vector pENTR 221-PEX26^{co} (PST1193) and destination vector pAG416-GPD-EGFP-ccdB (PST1117) by using the Gateway system. pAG416-GPD-EGFP-PEX26 (PST1311) was obtained similarly by combining pENTR 221-PEX26 (PST1147) with pAG416-GPD-EGFP-ccdB (PST1117). pAG416-GAL1-EGFP-PEX26^{co} (PST1486) was obtained by recombination of pENTR221-PEX26^{co} (PST1193) and pAG416-GAL1-EGFP-ccdB (PST1341).

pRS416GAL1-PEX26^{co}-EcoRI-opsin (pJB3) was cloned in two steps. First oligonucleotides coding the opsin-tag (OST921 and OST922) were annealed and cloned into the vector pRS416GAL1 opened by EcoRI and XhoI, yielding pRS416GAL1-opsin (pJB2). PEX26 was amplified from PST1311 using oligonucleotides OST957 and OST958 and cloned into XbaI and EcoRI sites of pJB2. For cloning of pcDNA3.1(-)-PEX26-EcoRI-opsin (PST1362) the XbaI-XhoI fragment containing PEX26-EcoRI-opsin from pJB3 was introduced into pcDNA3.1(-) using the same restriction sites.

For cloning of pRS416GAL1-PEX26^{co}-opsin PEX26^{co} was amplified from PST1310 with the oligonucleotides OST957 and OST1088 and inserted into XbaI and XhoI of pRS416GAL1 (PST904). pRS416GAL1-EGFP(pJB26) and pRS416TEF-EGFP (pJB31) were derived from pRS416GAL1 and pRS416TEF (PST814) respectively by insertion of EGFP, amplified from PST1310 using primers OST562 and 1272 into XbaI and EcoRI sites. In order to obtain pRS416GAL1-EGFP-PEX26^{co}-opsin (pJB27) and pRS416TEF-EGFP-PEX26 252–305, PEX26^{co} and PEX26 252–305 were amplified from pJB8 using OST1273/OST1274 and OST1301/OST1303. The resulting PCR products were inserted into EcoRI and XhoI sites of pJB26 and pJB36.

To obtain p416TEF-PEX15ΔTMD-PEX26ΔSTOP (PST1413) the N-terminal domain of Pex15 and the TMD and C-terminus of PEX26 were amplified from PST1127 and PST1310 using OST1101 and 1103 and OST1102 and 958, respectively. These PCR products then served as PCR template for the amplification of the Pex15-PEX26 fusion protein using primers OST1101 and 958. The product was cloned into the XbaI and EcoRI sites of p416TEF (PST814). Sequencing showed a frame shift in the Pex15-PEX26 fusion region. The frame shift was corrected by site-directed mutagenesis using the oligonucleotides OST1275 and 1276. OST1176 and 1177 were used for adding a STOP codon by site-directed mutagenesis. The final product was p416TEF-PEX15ΔTMD-PEX26-STOP (PST1565). For cloning of pcDNA3.1(-)-PEX26-opsin (PST1380) PEX26 was amplified from PST1147 using primers OST957 and 1052. The PCR product was cloned into the vector XbaI and XhoI sites of pcDNA3.1(-) (PST994).

PEX15 and PEX15ΔTMD were amplified from genomic DNA using the primers OST746 and 747 and OST746 and 748, respectively. The amplicates were integrated into pDONR221 by the BP-reaction. The resulting constructs were pENTR221-PEX15 (PST1326) and pENTR221-PEX15ΔTMD (PST1566). PST1326 and PST1566 were recombined with pAG416-GPD (PST1340) resulting the expression clones pAG416-GPD-PEX15 (PST1126) and pAG-GPD-PEX15ΔTMD (PST1127). pEXP-Venus-PEX15 (PST1133) and pEXP-Venus-PEX15ΔTMD (PST1134) were obtained by recombining pENTR221-PEX15 (PST1326) or pENTR221-PEX15ΔTMD and pDEST-N-Venus (PST1183) in an LR-reaction.

For cloning pCR3.1-Myc-Pex15 (PST1137) and pCR3.1-PEX15ΔTMD (PST1138) PEX15 and PEX15ΔTMD were amplified with using the primers OST746 and 747 and OST746 and 748. The PCR product was integrated into pCR3.1-Myc by BP- reaction.

For cloning of pRS425-Sec63-RFP (PST811) SEC63-RFP was excised from pSR1960 (PST802) using NotI (blunted) and HindIII restriction enzymes, and inserted into pRS425 (PST809) SacI (blunted) and HindIII sites.

For cloning of pcDNA3.1-TRC40_GRmyc, the coding sequence of TRC40_GR was amplified from pQE80-MBP-TRC40_GR using the primers Asna1-F and Asna1myc-R. The PCR product was cloned into the pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Immunofluorescence and microscopy. Cells expressing *PEX26* or *PEX15* constructs were analyzed by direct fluorescence and immunofluorescence experiments. If not indicated otherwise, cells were transfected for 48 hours using Effectene (Qiagen). Fixation, permeabilization, incubation with antibodies, and mounting was carried out as described^{58,59}. The following antibodies were used: anti-PEX14 (ProteinTech, rabbit polyclonal, dilution 1:200) and anti-Myc (Cell Signaling, mouse monoclonal, dilution 1:2000), anti-Catalase (Oxis International, rabbit polyclonal, 1:1000), anti-mouse Alexa488 (MoBiTech, dilution 1:200), and anti-rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch, dilution 1:200). Yeast cells were mounted in low-melting agarose for imaging. Samples were analyzed using a 100x oil immersion objective (NA 1.3) on a Zeiss Imager M1 fluorescence wide field microscope with a HRm Camera and the Axiovision 4.8 acquisition software. For yeast microscopy widefield images were contrast-enhanced and false-colored in blue to show cell contours.

[³⁵S] pulse label experiments. HeLa cells were transfected as indicated. 24 hours after transfection, cells were washed once with PBS. Cells were incubated with 2 ml RPMI cell medium (Sigma-Aldrich), 10% freshly dialyzed fresh bovine serum and 1% glutamine for 2 hours at 37°C. Cells were labelled for 15 min or 30 min at 37°C using 50 μCi/well [³⁵S]-methionine and [³⁵S]-cysteine (Hartmann Analytic, Braunschweig) and then washed twice with PBS. For lysis, cells were treated with RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 2 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM PMSE, 1 x Complete protease inhibitors (Roche)) for 10 min on ice. Cell debris was removed by

centrifugation (10 min at 20,000 g and 4 °C). The supernatant of lysate was supplemented with 20 µl of anti-opsin antibody⁶⁰ cell culture supernatant (courtesy of Stephen High) and was incubated for 1 hour at 4 °C on a turning wheel. Incubation continued for another 3 hours after addition of 20 µl ProteinG-agarose (Thermo Scientific). Samples were centrifuged at 5,200 × g at 4 °C for 3 min. The supernatant was discarded and beads were washed five times with RIPA buffer and once with PBS buffer containing 150 mM sodium chloride. Beads were eluted in SDS gel loading buffer (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.12 M DTT, 5% glycerol, 0.025% bromophenol blue). The proteins were separated by SDS-PAGE on a polyacrylamide gel. Gels were vacuum dried on Whatman paper. Phosphoimager screens were exposed for ca. 2–25 hours and analyzed by a Fujifilm base 1800 II camera. Intensities of protein bands were quantified using ImageJ (NIH).

Yeast stains and yeast cell culture. Yeast strains used in this study are listed in Supplementary Table S4. To obtain $\Delta pex19\Delta get3$ the *PEX19* ORF was deleted in $\Delta get3$ by integration of the *hphNT1* marker using OST526, OST527 and pFA6-hphNT1 as described⁶¹.

The following yeast media were used in this study: Synthetic drop out medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 0.75% potassium chloride, 0.5% ammonium sulfate, 0.083% amino acids, carbon source as indicated), oleate medium (0.15% oleate, 0.9% amino acids (all amino acids), 0.1% yeast extract, 0.17% yeast nitrogen base, 0.4% Tween40 and 2% agar). The amino acid mixture contained 5.2% adenine hemisulfate, 5.2% arginine-HCl, 5.2% histidine-HCl, 15.7% homoserine, 5.2% isoleucine, 5.2% leucine, 5.2% lysine-HCl, 5.2% methionine, 7.9% phenylalanine, 7.9% tryptophan, 5.2% tyrosine, 3.1% uracil and 23.6% valine. Amino acids used as selection marker were left out in the respective amino acid mixture. Solid media contained 20 g/l agar.

For galactose induced expression yeasts were first cultured in a liquid synthetic medium containing 2% glucose. Cells were then diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 and grown in synthetic medium containing 4% raffinose overnight to an OD₆₀₀ of 4. Cells were transferred to synthetic medium containing 2% galactose for induction of expression. In pulse-chase-experiments, protein expression was induced for 2.5 hours, and chase was initiated by shifting cells to medium containing 2% glucose.

For the oleate growth assays cells were cultured in a synthetic medium containing 2% glucose for 10 hours. Yeast cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1, transferred to synthetic medium containing 0.3% glucose, and incubated for ten hours and grown to an OD₆₀₀ of three. Samples were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 and starved on 0.3% glucose medium overnight under same conditions. Yeasts were spun down, washed three times with sterile water, and a 10-fold dilution series ranging from an OD₆₀₀ of 1 to 10⁻³ was prepared. Yeasts were then spotted onto oleate plates and incubated for one week at 28 °C.

Cell lysis and Western blot analysis. Yeast cells equivalent to 3 OD₆₀₀ were harvested 15 min, 30 min, 120 min and 150 min after induction. Cells were washed with TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), resuspended in 500 µl water and immediately lysed by addition of 75 µl lysis concentrate (5 M sodium hydroxide, 1% beta-mercaptoethanol, 100 mM PMSF, 0.5 M EDTA). Proteins were precipitated by 23% trichloroacetic acid for 5 min on ice. After centrifugation at 13,000 × g for 15 min at 4 °C the pellets were washed twice with 100% acetone (−20 °C). Pellets were resuspended in 20 µl water, and 10 µl loading buffer (4x Roti-Load1 buffer (Roth)) was added. Samples were denatured for 5 min at 95 °C.

Mammalian cells were washed twice with PBS. 70 µl 4x SDS-loading buffer (including 1× complete protease inhibitors (Roche) and 9 mM N-ethylmaleinimid (NEM) without beta-mercaptoethanol) were added to the cells. After 10 min incubation at room temperature 20 mM DTT was added. Cells were removed from the cell culture plates and lysed by ultrasound three times for 60 s (Bandelin SonoRex RK 106S, 480 W). Samples were incubated for another 30 min at 37 °C and for 10 min at 95 °C. For the experiment described in Fig. 2a cells were washed twice with PBS containing 1 mM EDTA. 24 hours after transfection, cells were removed from culture plates and centrifuged at 20,000 g for 10 min at 4 °C. Pellets were resuspended and lysed in RIPA lysis buffer. Cells were incubated for 30 min on ice and were vortexed several times during this incubation step. Then the samples were centrifuged at maximum speed for 15 min at 4 °C. Supernatants were used for Western blot. 4x SDS-loading buffer was added. Control samples were treated with PNGase (New England Biolabs) or with EndoH (New England Biolabs) for deglycosylation.

Proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry blotting. The following antibodies were used: mouse anti-opsin⁶⁰ (courtesy of Stephen High), mouse anti-PGK (Life technologies), mouse anti-GFP (BD Biosciences), chicken anti-Pex19 (Jackson ImmunoResearch) mouse anti-alpha-tubulin (Sigma Aldrich), donkey anti-mouse IgG HRP-conjugated (Jackson ImmunoResearch). All primary antibodies were diluted 1:1000, except anti-PGK 1:10000. Secondary antibodies were used at 1:10000 dilution. Chemiluminescence was generated with Lumi-light and Lumi-light plus Western blotting substrates (Roche) and recorded using the Luminescent image analyzer LAS 4000 (Fuji). Intensities of protein bands were quantified using ImageJ (NIH).

References

- Smith, J. J. & Aitchison, J. D. Peroxisomes take shape. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 803–817 (2013).
- Jones, J. M., Morrell, J. C. & Gould, S. J. PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **164**, 57–67 (2004).
- Fujiki, Y., Okumoto, K., Mukai, S., Honsho, M. & Tamura, S. Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front Physiol* **5**, 307 (2014).
- Motley, A. M. & Hettema, E. H. Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J. Cell Biol.* **178**, 399–410 (2007).
- Waterham, H. R. & Ebberink, M. S. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1430–1441 (2012).
- Tamura, S. *et al.* A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 883–886 (1998).
- White, S. R. & Lauring, B. AAA+ ATPases: Achieving Diversity of Function with Conserved Machinery. *Traffic* **8**, 1657–1667 (2007).
- Thoms, S. & Erdmann, R. Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1620–1628 (2006).
- Fujiki, Y., Nashiro, C., Miyata, N., Tamura, S. & Okumoto, K. New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p during peroxisome biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Cell Research* **1823**, 145–149 (2012).
- Titorenko, V. I. & Rachubinski, R. A. Peroxisomal membrane fusion requires two AAA family ATPases, Pex1p and Pex6p. *J. Cell Biol.* **150**, 881–886 (2000).
- Van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I. & Tabak, H. F. Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* **149**, 397–409 (2012).
- Tabak, H. F., Braakman, I. & van der Zand, A. Peroxisome formation and maintenance are dependent on the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 723–744 (2013).
- Birschmann, I. *et al.* Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Molecular biology of the cell* **14**, 2226–2236 (2003).
- Matsumoto, N., Tamura, S. & Fujiki, Y. The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat. Cell Biol.* **5**, 454–460 (2003).
- Elgersma, Y. *et al.* Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* **16**, 7326–7341 (1997).
- Borgese, N., Brambillasca, S. & Colombo, S. How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 368–375 (2007).
- Abell, B. M., Pool, M. R., Schlenker, O., Sinning, I. & High, S. Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO J.* **23**, 2755–2764 (2004).
- Johnson, N. *et al.* The signal sequence influences post-translational ER translocation at distinct stages. *PLoS ONE* **8**, e75394 (2013).
- Abell, B. M., Rabu, C., Leznicki, P., Young, J. C. & High, S. Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J. Cell. Sci.* **120**, 1743–1751 (2007).
- Johnson, N., Powis, K. & High, S. Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2403–2409 (2013).
- Mateja, A. *et al.* Structure of the Get3 targeting factor in complex with its membrane protein cargo. *Science* **347**, 1152–1155 (2015).
- Schuldiner, M. *et al.* The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* **134**, 634–645 (2008).
- Wang, F., Chan, C., Weir, N. R. & Denic, V. The Get1/2 transmembrane complex is an endoplasmic-reticulum membrane protein insertase. *Nature* **512**, 441–444 (2014).
- Denic, V. A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 411–417 (2012).
- Hegde, R. S. & Keenan, R. J. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 787–798 (2011).
- Voth, W. *et al.* The protein targeting factor Get3 functions as ATP-independent chaperone under oxidative stress conditions. *Mol. Cell* **56**, 116–127 (2014).
- Stefanovic, S. & Hegde, R. S. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**, 1147–1159 (2007).
- Vilardi, F., Lorenz, H. & Dobberstein, B. WRB is the receptor for TRC40/Asn1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J. Cell. Sci.* **124**, 1301–1307 (2011).
- Yamamoto, Y. & Sakisaka, T. Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Mol. Cell* **48**, 387–397 (2012).
- Vilardi, F., Stephan, M., Clancy, A., Janshoff, A. & Schwappach, B. WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane. *PLoS ONE* **9**, e85033 (2014).
- Yagita, Y., Hiromasa, T. & Fujiki, Y. Tail-anchored PEX26 targets peroxisomes via a PEX19-dependent and TRC40-independent class I pathway. *J. Cell Biol.* **200**, 651–666 (2013).
- Halbach, A. *et al.* Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J. Cell. Sci.* **119**, 2508–2517 (2006).
- Sharp, P. M. *et al.* Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res* **16**, 8207–8211 (1988).
- Weller, S. *et al.* Alternative splicing suggests extended function of PEX26 in peroxisome biogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 987–1007 (2005).
- Lockshon, D., Surface, L. E., Kerr, E. O., Kaeberlein, M. & Kennedy, B. K. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics* **175**, 77–91 (2007).
- Ma, C., Agrawal, G. & Subramani, S. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* **193**, 7–16 (2011).
- Pedrazzini, E., Villa, A., Longhi, R., Bulbarelli, A. & Borgese, N. Mechanism of residence of cytochrome b(5), a tail-anchored protein, in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **148**, 899–914 (2000).
- Lam, S. K., Yoda, N. & Schekman, R. A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 21523–21528 (2010).
- Horst, D. *et al.* EBV protein BNLF2a exploits host tail-anchored protein integration machinery to inhibit TAP. *J. Immunol.* **186**, 3594–3605 (2011).

40. Johnson, N., Powis, K. & High, S. Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2403–2409 (2013).
41. Rucktäschel, R. *et al.* Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 20885–20896 (2009).
42. Halbach, A., Rucktäschel, R., Rottensteiner, H. & Erdmann, R. The N-domain of Pex22p Can Functionally Replace the Pex3p N-domain in Targeting and Peroxisome Formation. *J. Biol. Chem.* **284**, 3906–3916 (2009).
43. Borgese, N. & Fasana, E. Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 937–946 (2011).
44. Fujiki, Y., Okumoto, K., Mukai, S., Honsho, M. & Tamura, S. Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front Physiol* **5**, 307 (2014).
45. Fujiki, Y., Matsuzono, Y., Matsuzaki, T. & Fransen, M. Import of peroxisomal membrane proteins: The interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**, 1639–1646 (2006).
46. Fang, Y., Morrell, J. C., Jones, J. M. & Gould, S. J. PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **164**, 863–875 (2004).
47. Van der Zand, A., Braakman, I. & Tabak, H. F. Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2057–2065 (2010).
48. Thoms, S., Harms, I., Kalies, K.-U. & Gärtner, J. Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic* **13**, 599–609 (2012).
49. Chen, Y. *et al.* Hydrophobic handoff for direct delivery of peroxisome tail-anchored proteins. *Nat Commun* **5**, 5790 (2014).
50. Hua, R., Gidda, S. K., Aranovich, A., Mullen, R. T. & Kim, P. K. Multiple Domains in PEX16 Mediate Its Trafficking and Recruitment of Peroxisomal Proteins to the ER. *Traffic* **16**:832–52. (2015).
51. McBride, H. M. & Mohanty, A. Emerging roles of mitochondria in the evolution, biogenesis, and function of peroxisomes. *Front. Physiol.* **4**, 268 (2013).
52. Kim, P. K. & Hetteema, E. H. Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. *J. Mol. Biol.* **427**, 1176–1190 (2015).
53. Lazarow, P. B. & Fujiki, Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 489–530 (1985).
54. Mukherji, S. & O’Shea, E. K. Mechanisms of organelle biogenesis govern stochastic fluctuations in organelle abundance. *Elife* **3**, e02678 (2014).
55. Toro, A. A. *et al.* Pex3p-dependent peroxisomal biogenesis initiates in the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* **107**, 1083–1096 (2009).
56. Kim, P. K., Mullen, R. T., Schumann, U. & Lippincott-Schwartz, J. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a *de novo* PEX16-dependent pathway from the ER. *J. Cell Biol.* **173**, 521–532 (2006).
57. Aranovich, A., Hua, R., Rutenberg, A. D. & Kim, P. K. PEX16 contributes to peroxisome maintenance by constantly trafficking PEX3 via the ER. *J. Cell. Sci.* **127**:3675–86 (2014).
58. Thoms, S., Hofhuis, J., Thöing, C., Gärtner, J. & Niemann, H. H. The unusual extended C-terminal helix of the peroxisomal α/β -hydrolase Lpx1 is involved in dimer contacts but dispensable for dimerization. *J. Struct. Biol.* **175**, 362–371 (2011).
59. Schueren, F. *et al.* Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *Elife* **3**, e03640 (2014).
60. Adamus, G. *et al.* Anti-rhodopsin monoclonal antibodies of defined specificity: characterization and application. *Vision Res.* **31**, 17–31 (1991).
61. Janke, C. *et al.* A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962 (2004).
62. Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A. & Elofsson, A. TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res.* **37**, W465–468 (2009).
63. Schuldiner, M. *et al.* Exploration of the Function and Organization of the Yeast Early Secretory Pathway through an Epistatic Miniarray Profile. *Cell* **123**, 507–519 (2005).

Acknowledgements

We thank Stephen High for discussions that have inspired this work. We thank Blanche Schwappach, Stephen High, Symeon Siniosoglou, and Ewald Hetteema, for yeast strains, antibodies, and plasmids. We are grateful to Corinna Dickel for technical assistance and to Christopher Nötzel for expression analysis of codon-optimized PEX26. This project was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GA354/7-1 to JG), the Jacob Henle program of the University Medical Center Göttingen (to JB) and the Research program of the Göttingen Faculty of Medicine (to ST). We thank Kristina Bersch for comments on the manuscript. We acknowledge support by the Open Access Publication Funds of the Göttingen University.

Author Contributions

J.B. performed the experiments and analyzed the data. F.V. analyzed the data and contributed reagents. A.L.H. contributed DNA constructs. S.T. designed and supervised the study, and analyzed the data. J.G. contributed reagents and supervised the study. J.B. and S.T. wrote the manuscript and prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Buentzel, J. *et al.* Conserved targeting information in mammalian and fungal peroxisomal tail-anchored proteins. *Sci. Rep.* **5**, 17420; doi: 10.1038/srep17420 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information

Conserved targeting information in mammalian and fungal peroxisomal tail-anchored proteins

Judith Büntzel, Fabio Vilardi, Amelie Lotz-Havla, Jutta Gärtner, Sven Thoms

Supplementary Tables

Table S1. Statistical analysis of glycosylation.

Table S2. Oligonucleotides used in this study

Table S3. Plasmids used in this study

Table S4. Yeast strains used in this study

Supplementary Figures

Figure S1. Full-size uncropped Western blots and autoradiographs of all figures.

Figure S2. Gray-scale representations of single channel images of figures 1h, i and 3a, b.

Figure S3. Targeting of PEX26 TMD and C-segment to the peroxisome in yeast.

Supplementary Tables

	Fig.	Gel lane	Mean (%)	S.e.m.	P value
Wild-type	4a	2	69	3.9	
<i>DAmP-Sec62</i>	4a	3	73	4.4	0.5100
<i>Δsec72</i>	4a	4	74	3.5	0.4700
<i>Δget2</i>	4a	5	15	2.7	<0.0001
<i>Δget3</i>	4a	8	13	1.6	<0.0001
<i>Δget5</i>	4a	6	18	3.4	<0.0001
<i>Δget1/2</i>	4a	7	17	5.2	<0.0001
<i>Δget1/2/3</i>	4a	9	20	7.8	0.0002
<i>Δpex19</i>	5a	2	91	3.2	0.0018
<i>Δpex19 Δget3</i>	5c	5	44	1.5	0.0039

Table S1. Quantification of glycosylation of PEX26 expressed in yeast strains

Name	Sequence (5' to 3')
OST526	AAGTATTGACGGAAAGAAGAAATGCCAAACATACAACACGAAGTACGTACGCTGCAGGTCGAC
OST527	TTACTGTTATCATAAAATATATATACCTTATTGTTGTTTGAACCGATCGATGAATTCGAGCTCG
OST562	GGCCGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATG
OST751	GTCCCGGCCCGCGCGCCGGCCGTG
OST752	CACGCCGGCGCGCGGGCCGGGAC
OST753	CCTGGACTTCCGCGCGGCGCTGGAG
OST754	CTCCAGCGCCGCGCGGAAGTCCAGG
OST755	GACCTGCGAGCGCGCTGGCAGAGTC
OST756	GACTCTGCCAGGCGCGCTCGCAGGTC
OST757	GGCAGAAATGGATCGCTGGCAAGAAGTCCTC
OST758	GAGGACTTCTTGCCAGCGATCCATTTCTGCC
OST789	GAATTCACGTGCAGAGGGTGCTGCCTC
OST790	GTACATCCAGTCGCCTCTCCTCACCAAAGG
OST791	CTCTCCGCTGGATCAGGAAGGCTGCATTTTC
OST792	GAAAATGCAGCCTTCTGTATCCAGCGGAAGAG
OST921	AATTCGGTCCAAACTTCTACGTCCCATTCTCCAACAAGACCGGTTAG
OST922	TCGACTAACCGGTCTTGTGGAGAATGGGACGTAGAAGTTTGGACCG
OST957	ACTAGTTCTAGAATGAAGAGCGATTCTTCGACC
OST958	CGCGGAATTCGTACGGATGCGGAGCTG
OST1052	GCGCCTCGAGCTAGCCCGTCTTGTGGAGAA
OST1088	CGCGCTCGAGCTAACCGGTCTTGTGGAGAATGGGACGTAGAAGTTTGGACCCGGACGGATGCGGAG
OST1101	GCGCTCTAGAAGTGCTGCAAGTGAGATAAT
OST1102	GCATCATTTACAAGAAGTCAAAAAGAGTCTCCTGGCTG
OST1103	GCCAGGAGACTCTTTTGGACTTCTTGTGAAATGATGC
OST1176	CAGCTCCGCATCCGTGACTGAGAATTCGGTCCAAACTTC
OST1177	GAAGTTTGGACCGAATTCTCAGTCACGGATGCGGAGCTG
OST1194	GGAAGGCTGCATTTCTGCCCTCTACCAGCTCCGAATCCG
OST1195	CGGATGCGGAGCTGGTAGAGGGCAGAAAATGCAGCCTTCC
OST1196	CTCGCTCTACCAGCTCGCCATCGCTGACGGTCCTAACTTCTACG
OST1197	CGTAGAAGTTAGGACCGTCAGCGATGGCGAGCTGGTAGAGGCGAG
OST1272	CGCGTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAG
OST1273	CGCGGAATTCATGAAGAGCGATTCTTCGAC
OST1274	CGCGCTCGAGCTAACCGGTCTTGTGGAA
OST1275	GAAGCATCATTTACAAGAAGTAAAAAGAGTCTCCTGGCTGCC
OST1276	GGCAGCCAGGAGACTCTTTTACTTCTTGTGAAATGATGCTTC
OST1301	GCGCGAATTCCTCAAAAAGAGTCTCCTGGCT
OST1303	CGCGCTCGAGCTAGTCACGGATGCGGAG
Asna1-F	GAATTCCTCCACCATGGCGGCAGGGGTG
Asna1myc-R	CTACTACAAGTCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCCTGGGCACTGGGGGGCTT

Table S2. Oligonucleotides used in this study

Number	Name	Source
	pFA6-hphNT1	Janke et al. ⁶¹
PST802	pSM1960	Metzger et al. ⁶⁴
PST809	pRS425	Mumberg et al. ⁶⁵
PST811	pRS425-SEC63-RFP	This study
PST814	p416TEF	Mumberg et al. ⁶⁵
PST904	pRS416GAL1	Mumberg et al. ⁶⁵
PST994	pcDNA3.1(-)	Invitrogen
	HcRed-SKL	E. Hettema ⁴
PST1117	pAG416-GPD-EGFP-ccdB	Alberti et al. ⁶⁶
PST1126	pAG416-GPD-PEX15	This study
PST1127	pAG416-GPD-PEX15ΔTMD	This study
PST1133	pEXPVenusPEX15	This study
PST1134	pEXPVenus-PEX15ΔTMD	This study
PST1135	pCR3.1-Myc-PEX26	This study
PST1137	pCR3.1Myc-PEX15	This study
PST1138	pCR3.1Myc-PEX15ΔTMD	This study
PST1147	pENTR221-PEX26	This study
PST1165	pDONR207	Invitrogen
PST1173	pcDNA3.1-TRC40_WTmyc	Horst et al. ³⁸
PST1174	pcDNA3.1-TRC40_SW1myc	Horst et al. ³⁸
PST1183	pDEST-N-Venus	Alberti et al. ⁶⁶
PST1193	pENTR221-PEX26 ^{co}	This study
PST1310	pAG416-GPD-EGFP-PEX26 ^{co}	This study
PST1311	pAG416-GPD-1EGFP-PEX26	This study
PST1326	pENTR221-PEX15	This study
PST1340	pAG416-GPD-ccdB	Alberti et al. ⁶⁶
PST1341	pAG416-GAL1-EGFP-ccdB	Alberti et al. ⁶⁶
PST1362	pcDNA3.1(-)-PEX26-EcoRI- opsin	This study
PST1380	pcDNA3.1 (-)-PEX26-opsin	This study
PST1413	p416TEF-PEX15ΔTMD-PEX26ΔSTOP	This study
PST1414	pcDNA 3.1-TRC40_GR	This study
PST1486	pAG416-GAL1-EGFP-PEX26 ^{co}	This study
PST1565	pRS416TEF-PEX15ΔTMD-PEX26	This study
PST1566	pENTR221 PEX15ΔTMD	This study
	pQE80-MBP-TRC40_GR	Favaloro et al. ⁶⁷
	pcDNA3.1/V5-His-TOPO	Invitrogen
	pDONR221	Invitrogen
	pCR3.1-Myc	Invitrogen
pJB2	pRS416GAL1-EcoRI-opsin	This study
pJB3	pRS416GAL1-PEX26 ^{co} -EcoRI-opsin	This study
pJB8	pRS416GAL1-PEX26 ^{co} opsin	This study

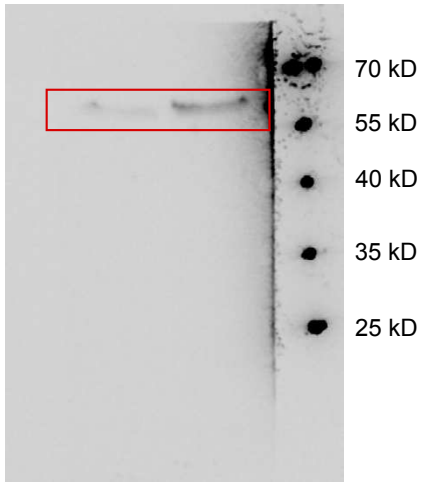
pJB26	pRS416GAL1-EGFP	This study
pJB27	pRS416GAL1-EGFP-PEX26 ^{co} -opsin	This study
pJB31	p416TEF-EGFP	This study
pJB36	p416TEF-EGFP-PEX26 253-305	This study

Table S3. Plasmids used in this study

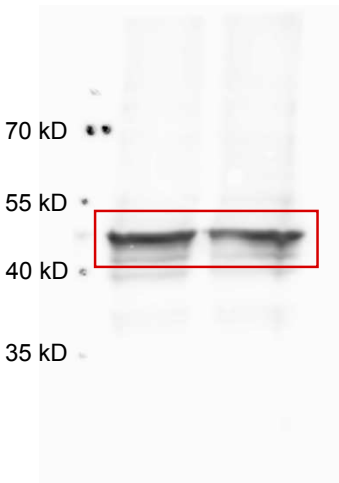
Strain	Source
Wild-type BY4741	Euroscarf (Frankfurt)
$\Delta get1/ \Delta get2/ \Delta get3$	Schuldiner et al. ²²
$\Delta get1/ \Delta get2$	Schuldiner et al. ²²
$\Delta get3$	Schuldiner et al. ²²
$\Delta get5$	Yeast Consortium Deletion Library ⁶⁸
$\Delta pex15$	Yeast Consortium Deletion Library ⁶⁸
$\Delta pex19$	Yeast Consortium Deletion Library ⁶⁸
$\Delta sec72$	Yeast Consortium Deletion Library ⁶⁸
DAmP-sec62	Schuldiner et al. ⁶³
$\Delta pex19\Delta get3$	This study

Table S4. Yeast strains used in this study

Fig. 1 (b)

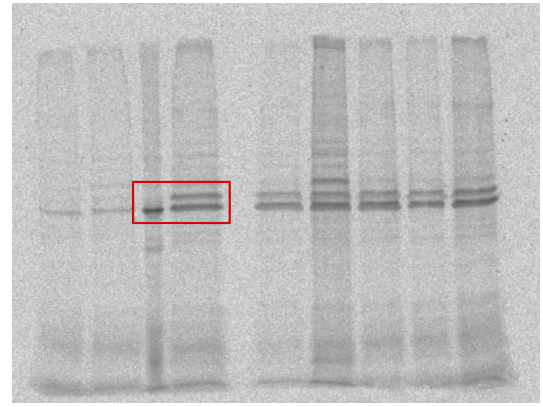


anti-GFP



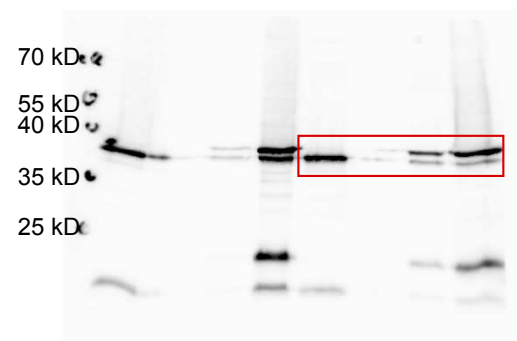
anti-PGK

Fig. 2 (b)



autoradiograph

Fig. 2 (c)

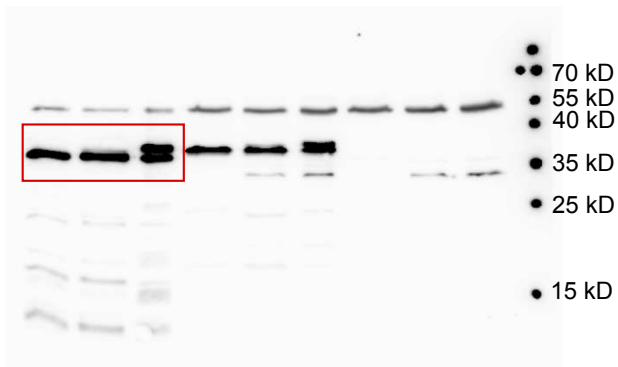


anti-opsin

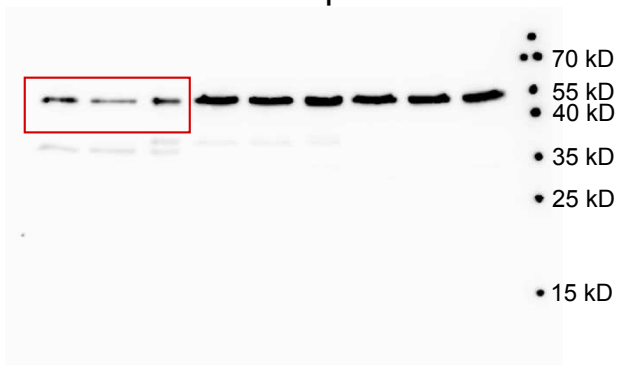


anti-PGK

Fig. 2 (a)

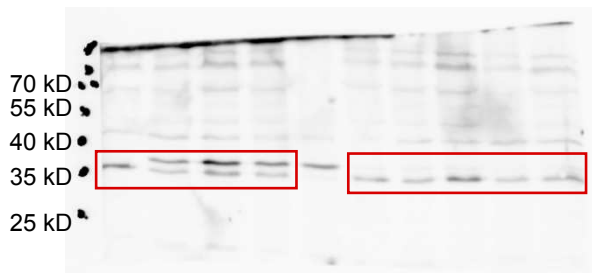


PEX26-opsin

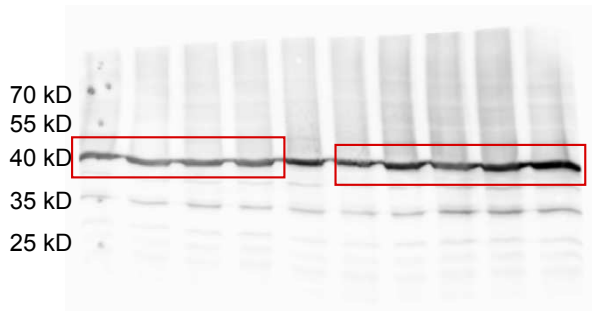


alpha-tubulin

Fig. 4 (a)

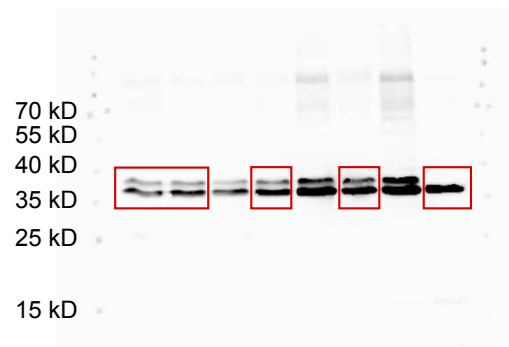


anti-opsin

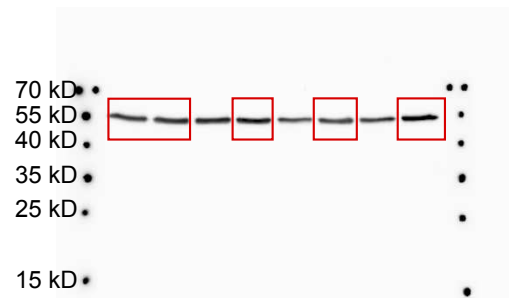


anti-PGK

Fig. 4 (d)

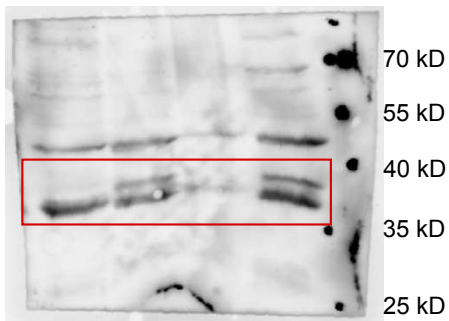


anti-opsin

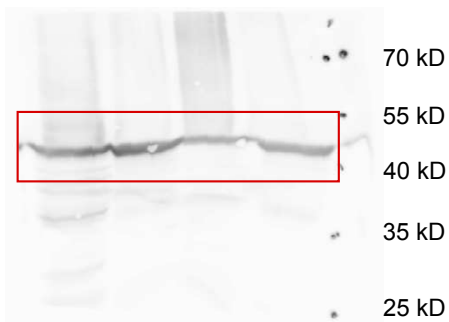


anti-PGK

Fig. 4 (b)

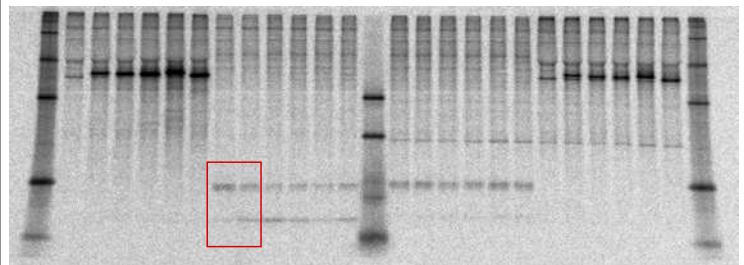


anti-opsin



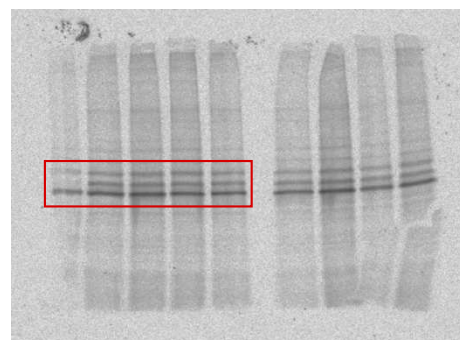
anti-PGK

Fig. 4 (e)



autoradiograph

Fig. 4 (f)



autoradiograph

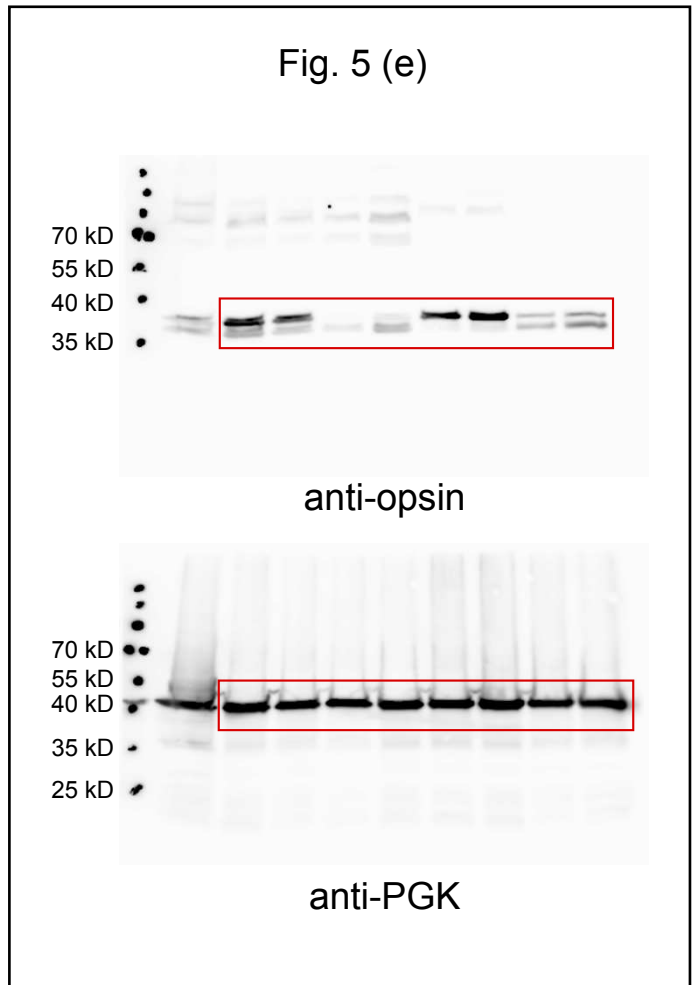
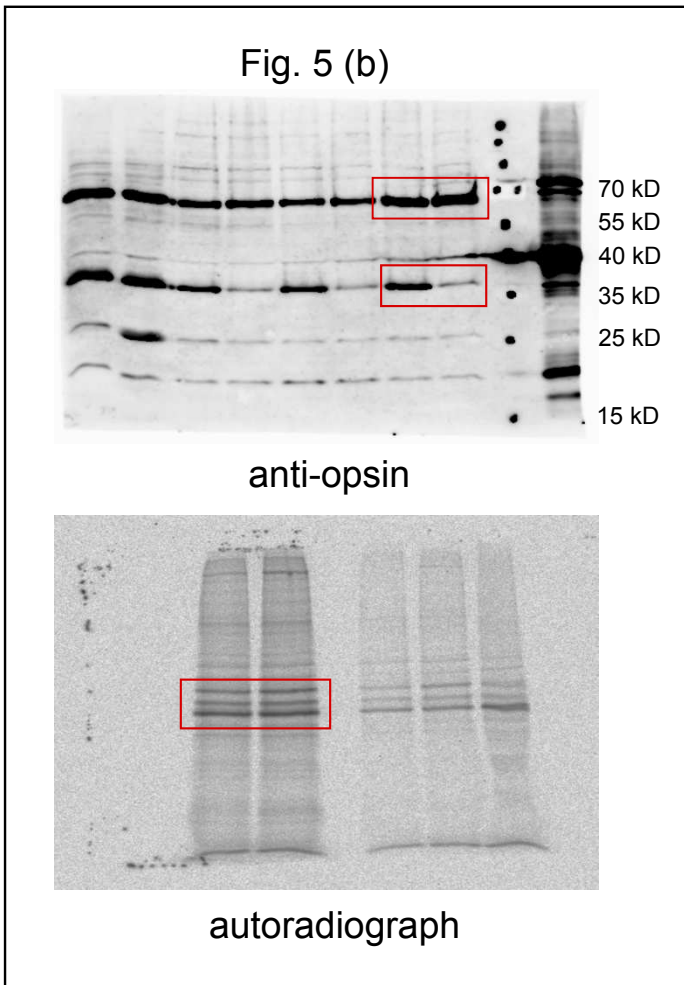
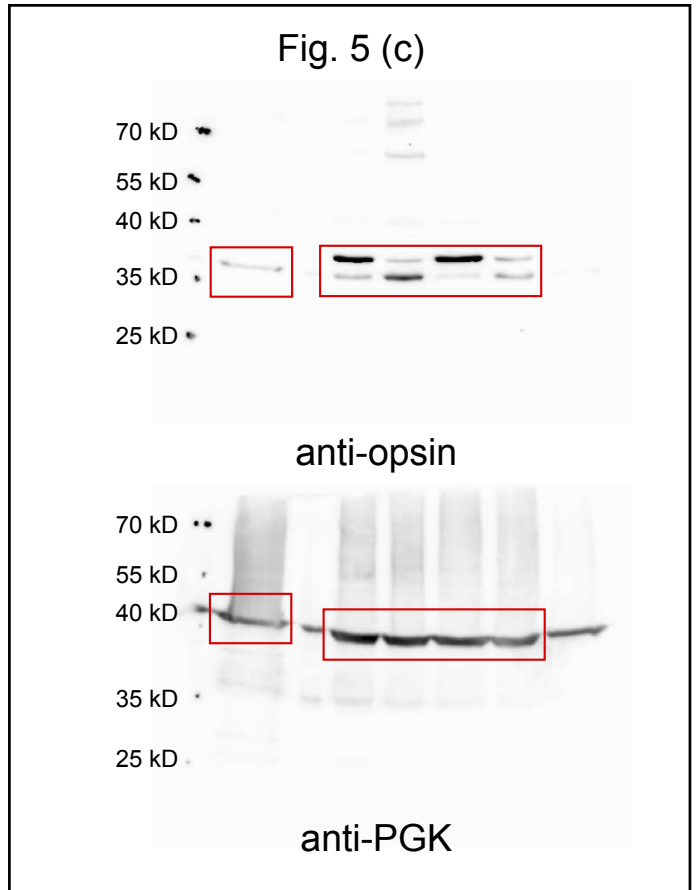
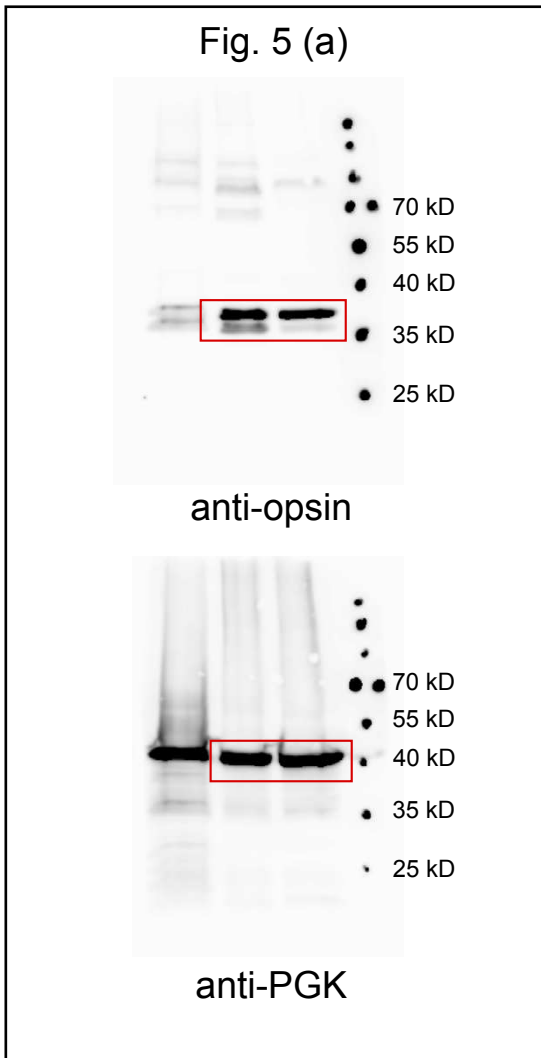


Figure S1. Full-size uncropped Western blots and autoradiographs of all figures.

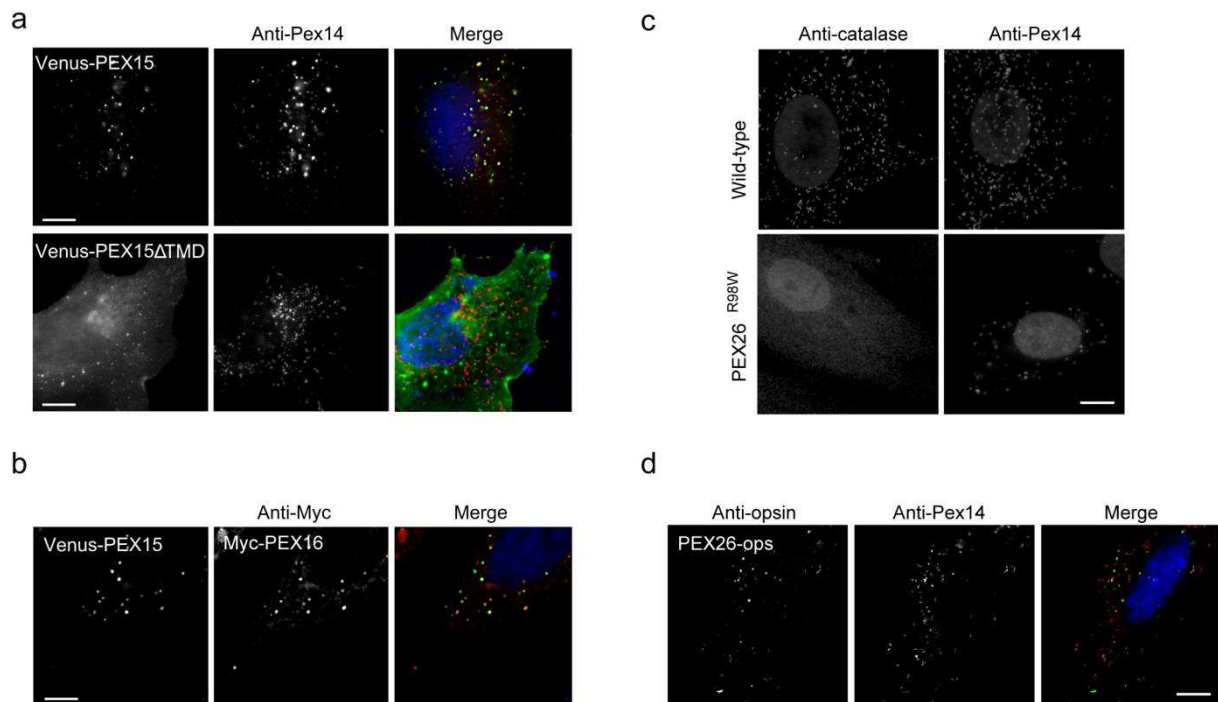


Figure S2. Gray-scale representations of single channel images of figures 1h, i and 3a, b.

(a) Yeast Pex15 localizes to peroxisomes in HaLa cells. Peroxisome targeting is dependent on TMD and luminal segment of Pex15. Direct fluorescence of Venus-Pex15 and Venus-Pex15 Δ TMD shows co-localization with the peroxisome marker PEX14 (immunofluorescence) and cytosolic localization, respectively. (b) PEX26 and Pex15 are recruited to the same population of peroxisomes. Direct fluorescence of Venus-Pex15, immunofluorescence of Myc-PEX26, both proteins co-localize. Bar = 10 μ m. (c) Deficiency in PEX26 leads to impaired peroxisome maturation. Fibroblasts of a control and a patient carrying a PEX26^{R98W} mutation were stained for the peroxisomal matrix protein catalase and the PMP PEX14. Catalase import is impaired in patient fibroblasts, peroxisomes are less abundant and larger than in wild-type. Bar = 10 μ m. (d) Expression of Myc-PEX26 in PEX26^{R98W} fibroblasts partially rescues peroxisome maturation and import of catalase. Bar = 10 μ m.

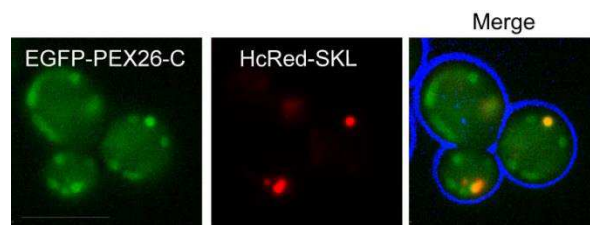


Figure S3. Targeting of PEX26 TMD and C-segment to the peroxisome in yeast.

(a) Conserved peroxisomal targeting information of PEX26 resides in the TMD and the luminal C-segment. PEX26-C, a truncated version of PEX26 (amino acids 252 to 305), was fused to N-terminal EGFP. Constitutive, TEF promoter-driven expression in wild-type yeast. EGFP-PEX26-C puncta partially co-localize with the peroxisomal marker HcRed-SKL.