# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung .............................................................................................................................................. 1

1.1. Allgemeiner Aufbau der hier vorgelegten Arbeit zu Pex1p und Pex6p ........................................... 1

1.2. AAA⁺-ATPasen mit ähnlicher Architektur, aber unterschiedlichen zellularen Funktionen ........... 1

1.2.1. Allgemeine Klassifizierung von AAA⁺-ATPasen ........................................................................ 1

1.2.2. Pex1p und Pex6p sind klassische Typ II AAA⁺-ATPasen ............................................................. 3

1.2.3. Zellulare Funktionen verschiedener AAA⁺-ATPasen ................................................................. 6

1.3. Peroxisomen ....................................................................................................................................... 8

1.3.1. Mutationen in Peroxin-Genen resultieren in peroxisomalen Erkrankungen ............................ 9

1.4. Import von Proteinen in die peroxisomale Matrix ........................................................................... 11

1.4.1. Bindung des Cargos im Zytosol .................................................................................................. 13

1.4.2. Ausbildung der Import-Pore an der peroxisomalen Membran ...................................................... 13

1.4.3. Ubiquitinylierung der PTS-Rezeptoren und Rückführung ins Zytosol ...................................... 14

1.5. Rekrutierung des AAA⁺-Motors an die peroxisomale Importmaschinerie .................................... 15

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit ................................................................................................................... 18

## 2. Material und Methoden ........................................................................................................................ 19

2.1. Materialien ......................................................................................................................................... 19

2.1.1. Geräte ........................................................................................................................................ 19

2.1.2. Chemikalien ............................................................................................................................. 20

2.1.3. Verbrauchsmaterialien .............................................................................................................. 21

2.1.4. Größenstandards ....................................................................................................................... 21

2.1.5. Enzyme ...................................................................................................................................... 21

2.1.6. Mikroorganismen ....................................................................................................................... 22

2.1.7. Nukleinsäuren ........................................................................................................................ 22

2.1.8. Antiseren ................................................................................................................................... 23

2.1.9. Oligonukleotide ....................................................................................................................... 24

2.1.10. Medien .................................................................................................................................... 25

2.1.11. Puffer, Lösungen und Polymere ............................................................................................. 25

2.2. Methoden .......................................................................................................................................... 27

2.2.1. Zellbiologische Methoden ......................................................................................................... 27

2.2.2. Analytische Methoden ............................................................................................................. 29

2.2.3. Molekularbiologische Methoden .............................................................................................. 30

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden .............................................................................................. 31
3. Ergebnisse .................................................................................................................. 39

3.1. Sequenzanalyse von Pex1p und Pex6p ................................................................. 39
3.2. Isolierung des rekombinant exprimierten Pex1p/Pex6p-Komplexes aus E. coli .......... 40
3.3. Vergleich des in E. coli und homolog in Hefe exprimierten Pex1p/Pex6p-Komplexes ........ 42
3.4. ATPase-Aktivität des rekombinanten Pex1p/Pex6p-Komplexes ................................ 43
3.5. Struktur-Analyse des Pex1p/Pex6p-Komplexes mittels Elektronen-Mikroskopie .......... 44
3.7. Identifizierung der für die Komplex-Stabilität verantwortlichen Walker A-Motive .......... 48
3.8. Auswirkungen von Walker B-Mutationen auf die Pex1p/Pex6p-Komplexbildung ........ 50
3.9. Auswirkungen von Arginin-Finger Mutationen auf die Pex1p/Pex6p-Komplexbildung ........ 51
3.10. Auswirkungen von Mutationen innerhalb putativer ISS-Motive auf die Komplexbildung ...... 52
3.11. Größenausschluss-Chromatographie der verschiedenen Pex1p/Pex6p-Mutanten .......... 53
3.12. Optimierung der Pex1p/Pex6p-Isolierung für vergleichende ATPase-Aktivitätsanalysen .... 55
3.15. Auswirkung der Pex1p<sup>D797N</sup> Walker B-Mutation auf die Pex1p/Pex6p Komplexformierung ... 61
3.16. In vitro Analysen zum Funktionsverlustes der Pex1p<sup>D797N</sup> Walker B-Mutation ............. 63
3.17. Analysen zu potentiellen Arginin-Fingern in der D1-Domäne von Pex6p ................. 65
3.18. Nukleotid-abhängige Anbindung des Pex1p/Pex6p-Komplexes an Pex15p .......... 67
3.19. Auswirkung der Walker B-Mutationen auf die Assemblierung der peroxisomalen Importmaschinerie ................................................................. 68
3.20. In vitro Charakterisierung der Interaktion des Pex1p/Pex6p-Komplexes zu Pex15p .......... 70
3.21. Analysen zur Stöchiometrie des Pex1p/Pex6p/Pex15p-Komplexes .......................... 72
3.22. Größenausschluss-Chromatographie einzelnen Pex6p mit Pex15p ......................... 74
3.23. Nukleotid-abhängige Bindung des Pex1p/Pex6p-Komplexes an Pex15p ............... 75
3.24. Durch ATP-Hydrolyse induzierte Dissoziation des Pex1p/Pex6p/Pex15p Komplexes ........ 76
3.25. Studien zur Bindung des AAA<sup>+</sup>-Komplexes an Ubiquitin ................................. 78
3.26. Studien zur Bindung von Pex1p/Pex6p an ein artifizielles Ubiquitin-Pex5p Fusionsprotein ... 81
3.27. Etablierung eines Systems zur Einführung Positions-spezifischer Photo-Crosslinker .......... 83
3.28. Synthese und Isolierung der Ub<sup>68pa</sup>-Pex5p<sup>Δ1-6</sup> Photo-Crosslinker .................. 85
3.29. In vitro Photo-Crosslinking mit GST-Ub<sup>68pa</sup>-Pex5p<sup>Δ1-6</sup> und dem Pex1p/Pex6p-Komplex ....... 86
3.30. In vitro Photo-Crosslinking mit Ub<sup>68pa</sup>-Pex5p<sup>Δ1-6</sup> nach Abspaltung der GST-Fusion ........ 88
3.31. Einfluss von Pex15p und Ub-Pex5p auf die ATPase-Aktivität des Pex1p/Pex6p-Komplexes ... 89

4. Diskussion .................................................................................................................. 92

4.1. Expressions- und Reinigungsprozeduren zur Isolierung des Pex1p/Pex6p-Komplexes .... 92
4.2. Nukleotid-abhängige Formierung des hetero-hexameren Pex1p/Pex6p-Komplexes .............. 93
  4.2.1. Effekte von Walker A-Mutationen auf die Pex1p/Pex6p-Komplexbildung .................... 94
  4.2.2. Die Wahl der für Walker B-Mutations-Analysen geeigneten Aminosäure .................... 96
  4.2.3. Asymmetrische Effekte von Arginin-Finger- und ISS-Motiv-Mutationen auf die Pex1p/Pex6p-Komplexbildung ................................................................. 98
4.3. Die ATPase-Aktivität des Pex1p/Pex6p-Komplexes ........................................................ 99
  4.3.1. Asymmetrischer Beitrag von Pex1p und Pex6p zur ATPase-Aktivität des Komplexes ...... 100
  4.3.2. Einfluss der D1 AAA⁺-Domänen auf die ATPase-Aktivität von Pex1p/Pex6p .......... 102
4.4. Struktur und Dynamik des Pex1p/Pex6p-Komplexes ....................................................... 103
  4.4.1. EM-Analyse des Pex1p/Pex6p-Komplexes in verschiedenen Nukleotid-Zuständen ...... 103
  4.4.2. Strukturelle Analyse der Pex1p/Pex6p Walker B-Varianten ........................................ 105
  4.4.3. Bewegungen der Pore-Loops in Abhängigkeit des Nukleotid-Status ......................... 106
  4.4.4. Koordination der ATP-Hydrolyse Ereignisse im AAA⁺-Ring ................................... 108
4.5. Dynamische Anbindung des Pex1p/Pex6p-Motors an die peroxisomale Importmaschinerie. 110
4.6. Ubiquitin-abhängige Bindung von Pex5p an den Pex1p/Pex6p-Komplex ....................... 113
  4.6.1. Optimierung des Photo-Crosslinkings zur Identifizierung der Ub-Pex5p Bindestelle ...... 115
4.7. Modell des Pex5p Exports basierend auf den aktuellen Forschungs-Ergebnissen .......... 116
5. Zusammenfassung .............................................................................................................. 120
6. Referenzen ....................................................................................................................... 122
7. Anhang ............................................................................................................................ 134
8. Danksagung ..................................................................................................................... 137
9. Lebenslauf und Publikationen ......................................................................................... 139