
**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA
PEX5P: IMPLICAÇÕES MECANÍSTICAS NO PROCESSO
DE IMPORTAÇÃO PROTEICA PARA A MATRIZ
PEROXISSOMAL**

JOÃO MIGUEL SILVA E COSTA RODRIGUES

Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas

2007

JOÃO MIGUEL SILVA E COSTA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA PEX5P:
IMPLICAÇÕES MECANÍSTICAS NO PROCESSO DE
IMPORTAÇÃO PROTEICA PARA A MATRIZ PEROXISSOMAL**

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor
em Ciências Biomédicas submetida ao Instituto
de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Jorge Azevedo

Categoria – Professor associado com agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Doutora Clara Sá-Miranda

Categoria – Directora da Unidade de Biologia do
Lisossoma e do Peroxissoma

Afiliação – Instituto de Biologia Molecular e
Celular do Porto

Para todos aqueles que me apoiaram ao longo destes anos...

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO TEÓRICA	8
1.1- Morfologia e função do peroxissoma	9
1.2- Doenças peroxissomais	11
1.2.1- Doenças provocadas pela deficiência de uma única enzima peroxissomal.....	11
1.2.2- Doenças da biogénese peroxissomal	12
1.3- Biogénese peroxissomal	13
1.3.1- Biogénese da membrana do peroxissoma	13
1.3.2- Proliferação peroxissomal	15
1.3.3- Transporte de proteínas para a matriz do peroxissoma.....	15
1.3.3.1- Importação de proteínas contendo PTS1	18
1.3.3.2- Importação de proteínas contendo PTS2	19
1.3.3.3- Importação de proteínas sem PTS1 ou PTS2 para a matriz peroxissomal	20
1.3.3.4- Peroxinas envolvidas na importação de proteínas matriciais para o peroxissoma	20
1.3.3.4.1- Pex5p	21
1.3.3.4.2- Pex7p	27
1.3.3.4.3- Pex14p	28
1.3.3.4.4- Pex13p	30
1.3.3.4.5- Pex2p, Pex10p e Pex12p	31
1.3.3.4.6- Pex1p e Pex6p	32
1.4- Modelo de importação de proteínas contendo PTS1 para a matriz do peroxissoma.....	33
1.5- Modelo do pré-íplex	35
2- OBJECTIVOS	39
3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.1- Oligonucleótidos utilizados	42
3.2- Produção dos cDNAs utilizados nas reacções de síntese proteica in vitro	42
3.3- Síntese das proteínas marcadas radioactivamente.....	43
3.4- Produção das proteínas recombinantes	43
3.5- Péptidos utilizados	44
3.6- Ensaio de proteólise parcial	44
3.7- Sequenciação dos fragmentos proteolíticos da Pex5p	45

3.8- Centrifugação em gradientes de sacarose	45
3.9- Determinação do coeficiente de sedimentação da Pex5p	45
3.10- Cromatografia de filtração em gel	46
3.11- Determinação do raio de Stokes da Pex5p	46
3.12- Sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio	47
3.13- Cálculo da massa molecular da Pex5p	47
3.14- Preparação de PNS e de peroxissomas purificados de fígado de rato.....	48
3.15- Experiências de importação <i>in vitro</i> da Pex5p	49
3.16- Anticorpos utilizados.....	49
3.17- SDS-PAGE.....	50
3.18- Transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose e detecção da proteína radioactiva	51
4- RESULTADOS	52
4.1- Estudo de interacções proteicas envolvendo a Pex5p	53
4.1.1- Ensaio de proteólise parcial da Pex5p.....	54
4.1.1.1- Alterações na acessibilidade da Proteinase K à Pex5p, na presença de PTS1.....	54
4.1.1.2- Alterações na acessibilidade da proteinase K à Pex5p na presença do domínio SH3 da Pex13p	56
4.1.2- Caracterização do estado oligomérico da Pex5p.....	59
4.1.2.1- Determinação do coeficiente de sedimentação da Pex5p	59
4.1.2.2- Determinação do raio de Stokes da Pex5p	62
4.1.2.3- Cálculo da massa molecular da Pex5p	65
4.1.2.4- Sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio	65
4.2- Caracterização funcional do N-terminus da Pex5p humana	67
4.2.1- Em busca de uma função para os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p.....	68
4.2.2- A deleção dos 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p não afecta o endereçamento da peroxina para o peroxissoma	69
4.2.3- Δ N110-Pex5p não é exportada da membrana do peroxissoma para o citossol.....	72
4.2.4- Estudo do efeito da temperatura nos processos de importação e exportação da Pex5p	74
4.2.5- Caracterização da transição de estado 2 para estado 3 da Pex5p.....	77
5- DISCUSSÃO.....	79
5.1- Estudo de algumas das interacções proteicas centradas na Pex5p	80
5.2- Caracterização funcional do N-terminus da Pex5p humana	84

6- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	90
7- BIBLIOGRAFIA	93

PRECEITOS LEGAIS

De acordo com o disposto no Decreto-Lei nº 216/92 de 13 de Outubro, esclarece-se serem da nossa responsabilidade a execução das experiências que estiveram na origem dos resultados apresentados neste trabalho, assim como a sua interpretação, discussão e redacção.

Nesta tese foram apresentados os resultados contidos nos artigos já publicados e seguidamente discriminados:

Costa-Rodrigues J., Carvalho, A. F., Fransen, M. Hambrusch E., Schliebs W., Sá-Miranda, C., Azevedo, J. E. (2005) Pex5p, the peroxisomal cycling receptor, is a monomeric non-globular protein. *J. Biol. Chem.* **280**: 24404-24411

Costa-Rodrigues, J., Carvalho, A. F., Gouveia, A. M., Fransen, M., Sá-Miranda, C., Azevedo, J. E. (2004) The N-terminus of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, is required for redirecting the peroxisome-associated peroxin back to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **279**: 46573-46579

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Azevedo, por todo o apoio prestado durante estes anos em que tive o privilégio de fazer parte do seu grupo. Os seus inúmeros conhecimentos científicos, aliados à clareza de transmissão de ideias, bem como um acompanhamento incansável e pormenorizado de todas as experiências efectuadas foram, e serão sempre, um exemplo por mim a seguir. À Doutora Clara Sá-Miranda, pelo apoio e incentivo que senti desde o primeiro dia. Aos meus colegas de trabalho, especialmente aos que trabalharam directamente comigo, à Andreia, Manuel, Cláudia, Inês, José, Carla, Márcia e Alexandra, pelo companheirismo, ajuda e amizade que esteve presente todos os dias, a todas as horas. Os resultados obtidos e apresentados nesta tese foram uma consequência directa do bom ambiente existente no nosso laboratório.

Gostaria também de agradecer aos elementos que compõem a minha Comissão de Acompanhamento, a Professora Doutora Maria João Saraiva e o Professor Doutor Vítor Costa, pela disponibilidade demonstrada para qualquer ajuda que fosse solicitada.

Agradeço ainda à Fundação para a Ciência e Tecnologia pela bolsa de doutoramento concedida (SFRH / BD / 12819 / 2003). Este trabalho foi desenvolvido ao abrigo dos projectos de investigação (POCTI/PME/41822/2001 e POCTI/SAU/1345/2002).

Por último, um agradecimento para todos aqueles que contribuíram de uma forma indirecta para o sucesso desta tese. À Anabela por ter estado sempre ao meu lado, nos bons e nos maus momentos. À Inês, por ter trazido uma nova luz à minha vida. Aos meus pais, irmãos e restante família por todo o carinho e apoio que me transmitiram de uma forma permanente. Aos meus amigos, por me fazerem sentir bem mesmo quando os resultados não eram os melhores.

A todos muito obrigado!

ABREVIATURAS

AAA	ATPase associada a diversas actividades celulares
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATP _γ S	Adenosina 5'-(3-tiotrifosfato)
BSA	Albumina sérica bovina
Citc	Citocromo c
CoA	Coenzima A
DBP	Doenças da biogénese peroxissomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E-64	<i>N</i> -(trans-epoxissuccinil)-L-leucina-4-guanidinobutilamida
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GC	Grupo de complementação
GST	Glutathione S-transferase
Hsp	Proteína de choque térmico
IgG	Imunoglobulina G
kDa	QuiloDalton
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)-propanossulfónico
mPTS	Sinal de endereçamento de proteínas para a membrana do peroxissoma
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pex	Peroxina
PK	Proteinase K
PMP	Proteína da membrana peroxissomal
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PNS	Sobrenadante pós-nuclear
Prot-PTS1	Proteína contendo PTS1
PTS1	Sinal de endereçamento para o peroxissoma do tipo 1
PTS2	Sinal de endereçamento para o peroxissoma do tipo 2
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SCP2	<i>Sterol carrier protein 2</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
STI	Inibidor de tripsina de soja

<i>TCA</i>	Ácido tricloroacético
<i>TPR</i>	Repetição tetratricopeptídica
<i>Tris</i>	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
<i>X-ALD</i>	Adrenoleucodistrofia neonatal associada ao cromossoma X
<i>WD</i>	Domínio proteico que contém um motivo do tipo triptofano-aspartato

RESUMO

As proteínas peroxissomais são sintetizadas no citosol e importadas após tradução para o organelo. O receptor citosólico da maioria das proteínas da matriz peroxissomal é a Pex5p, que capta as proteínas no citosol e transporta-as para o peroxissoma. No entanto, e apesar de alguns detalhes mecanísticos desse processo já estarem desvendados, ainda existem inúmero aspectos que permanecem por esclarecer.

Neste trabalho foi desenvolvido um ensaio de proteólise parcial para a Pex5p humana, que permite a identificação de novos ligandos para a peroxina, bem como a caracterização dessas interações. Através da utilização desse ensaio constatou-se que a ligação de PTS1 à Pex5p origina alterações conformacionais numa região da peroxina a montante dos TPRs. Além disso, foi também demonstrado que a Pex5p interage com o domínio SH3 da Pex13p, e que essa interação requer a presença dos 204 aminoácidos N-terminais da Pex5p.

Com base em trabalhos que sugeriam que a Pex5p apresentava um comportamento tetramérico, e uma vez que o peroxissoma possui a capacidade de importar proteínas oligoméricas, foi proposto, em 2001, que essa importação ocorria através da formação de complexos proteicos enormes, um modelo designado por “modelo do pré-íplex”. No entanto, as evidências experimentais que estavam na base desse modelo eram, no mínimo, questionáveis.

De forma a tentar clarificar este assunto, a massa molecular da Pex5p humana foi estimada através de dois métodos independentes. No primeiro método determinou-se o coeficiente de sedimentação e o raio de Stokes da Pex5p, que permitiram calcular a massa molecular da peroxina. No segundo método, a massa molecular foi estimada através de análise de sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio. Em ambos os métodos constatou-se que a Pex5p é uma proteína monomérica.

Recorrendo a um sistema de importação *in vitro*, no qual se monitoriza o comportamento da Pex5p, foi determinado que os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p são necessários para a exportação da peroxina da membrana do peroxissoma para o citosol. Foi ainda demonstrado que, ao contrário do processo de importação, a exportação da Pex5p é um processo extremamente dependente da temperatura. Verificou-se que a 16°C a exportação da Pex5p se encontra bloqueada, e que esse bloqueio resulta da incapacidade do estado 2 da Pex5p originar estado 3.

ABSTRACT

Peroxisomal proteins are synthesized in the cytosol and imported post-translationally to the organelle. The receptor for most of the peroxisomal matrix proteins is Pex5p, which binds the proteins in the cytosol and transport them to the peroxisome. However, although some mechanistic details of that process are now clear, there are several aspects that remain unsolved.

In this work it was developed a protease protection assay for human Pex5p, that allows the identification of new ligands for the peroxin, as well as the characterization of those interactions. By using that assay it was shown that the interaction of PTS1 with Pex5p induce conformational changes in the peroxin in a region upstream of the TPRs. In addition, it was also shown that Pex5p interacts with the SH3 domain of Pex13p, and this interaction requires the 204 aminoacids of the N-terminus of Pex5p.

Taking as background some studies that suggested that Pex5p behaved as a tetrameric protein, and considering that peroxisomes are able to import oligomeric proteins, in 2001 it was proposed that these importation process occurred by the formation of huge proteic complexes, a model called "pre-implex model". However, the experimental evidencies behind this model are, at least, questionable.

In order to clarify this issue, the molecular mass of human Pex5p was estimated by two independent methods. In the first one, it was determined the sedimentation coefficient and the stokes radius of Pex5p, and those values were used to calculate the molecular mass of the peroxin. In the second method, the molecular mass was estimated by sedimentation equilibrium analysis. In both methods it was shown that Pex5p is a monomeric protein.

Using a *in vitro* import system, in wich it is possible to monitorize the behaviour of Pex5p, it was determined that the 110 aminoacids of the N-terminus of Pex5p are required for export of the peroxin to the cytosol. It was also shown that export of Pex5p is a highly temperature dependent process, in contrast to the import process. It was observed that at 16°C export of Pex5p is blocked, and this impairment is a consequence of the incapacity of stage 2 Pex5p to originate stage 3.

RÉSUMÉ

Les protéines péroxisomiales sont synthétisées dans la cytosol et importées après traduction jusqu'à l'organelle. Le récepteur cytosolique de la majorité des protéines de la matrice péroxisomiale est le Pex5p, qui capte les protéines dans la cytosol et les transporte au péroxisome. Néanmoins, bien que quelques détails mécanistiques aient déjà été démasqués, il existe encore d'innombrables aspects qui restent à éclaircir. Dans ce travail, nous avons développé un essai de protection protéolitique pour Pex5p humain, lequel a permis l'identification de nouveaux ligands pour le péroxisome, ainsi que la caractérisation de ces interactions. À travers l'utilisation de cet essai, nous avons constaté que la liaison de PTS1 à Pex5p donne lieu à des modifications conformationnelles dans une région de la péroxine en amont des TPRs. En outre, nous avons aussi démontré que le Pex5p interagit avec le domaine SH3 de Pex13p, et que cette interaction exige la présence des 204 acides aminés N-terminaux de Pex5p.

Sur la base de travaux qui suggéraient que Pex5p présentait un comportement tétramérique, et vu que le péroxisome possède la capacité d'importer des protéines oligomériques, il a été proposé en 2001, que cette importation se produisait à travers la formation de complexes protéiques énormes, un modèle désigné par "modèle de pré-implex". Néanmoins, les évidences expérimentales qui étaient la base de ce modèle étaient, au minimum, discutables.

De manière à essayer de clarifier ce sujet, la masse moléculaire de Pex5p humain a été estimée à travers deux méthodes indépendantes. Dans la première méthode, nous avons déterminé le coefficient de sédimentation et le rayon de Stokes de Pex5p, ce qui a permis de calculer la masse moléculaire du péroxisome. Dans la seconde méthode, la masse moléculaire a été estimée à travers une analyse de sédimentation par centrifugation jusqu'à l'équilibre. Dans les deux méthodes, nous avons constaté que Pex5p était une protéine monomérique.

En faisant appel à un système d'importation *in vitro*, dans lequel le comportement de Pex5p était monitorisé, nous avons déterminé que les 110 acides aminés N-terminaux de Pex5p étaient nécessaires pour l'exportation de la membrane péroxisomiale au cytosol. Nous avons également démontré que, contrairement au processus d'importation, l'exportation de Pex5p était un processus extrêmement dépendant de la température. Il a été vérifié qu'à 16°C l'exportation de Pex5p se trouve bloquée, et que ce blocage résulte de l'incapacité de l'état 2 de Pex5p à donner lieu à l'état 3.

1- INTRODUÇÃO TEÓRICA

1- INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1- Morfologia e função do peroxissoma

Os peroxissomas são organelos existentes em virtualmente todas as células eucarióticas, compreendendo também os glioxissomas das plantas e dos fungos, os glicossomas dos cinetoplastídeos, e os corpos de Woronin de *Neurospora crassa*. Este último tipo de peroxissoma contém um núcleo cristalóide hexagonal, e está envolvido no estancamento de perdas de citosol em fungos filamentosos [1]. São conhecidos apenas alguns seres eucarióticos unicelulares que não possuem peroxissomas, sendo considerados formas de vida eucariótica primitiva ou descendente de eucariotas com peroxissomas [2, 3]. Os peroxissomas foram descritos pela primeira vez na década de 50 por Rhodin [4]. A sua morfologia varia com o tecido e a espécie em questão: normalmente são estruturas esféricas e o seu diâmetro oscila entre os 0,1µm-1µm [5] (Figura 1A); em algumas espécies de levedura, bem como no fígado humano, podem adoptar uma forma tubular [6-8]. Estes organelos estão delimitados por uma única membrana, com aproximadamente 6,5-7nm de espessura e com uma razão fosfolípidos/proteína peroxissomal de 105nmol/mg [9], sendo que os fosfolípidos mais abundantes são a fosfatidilcolina (57%) e a fosfatidiletanolamina (28%) [10, 11].

A membrana dos peroxissomas é impermeável a protões e a pequenos metabolitos [12-15]. Existe alguma controvérsia quanto ao pH da matriz do peroxissoma, havendo autores que defendem que é semelhante [16], mais básico [12] ou mais ácido [17, 18] do que o do citosol. Em células de mamíferos o número de peroxissomas existentes varia entre algumas centenas e alguns milhares. O número médio de peroxissomas nas células humanas é de cerca de 500, sendo que a excepção são os glóbulos vermelhos, que não possuem peroxissomas [19, 20]. Os peroxissomas possuem uma matriz muito densa que contém mais de 50 enzimas, caracterizada em vários casos pela existência de uma estrutura paracristalina (Figura 1B). Em fígado de rato, por exemplo, essa estrutura paracristalina é composta por urato oxidase.

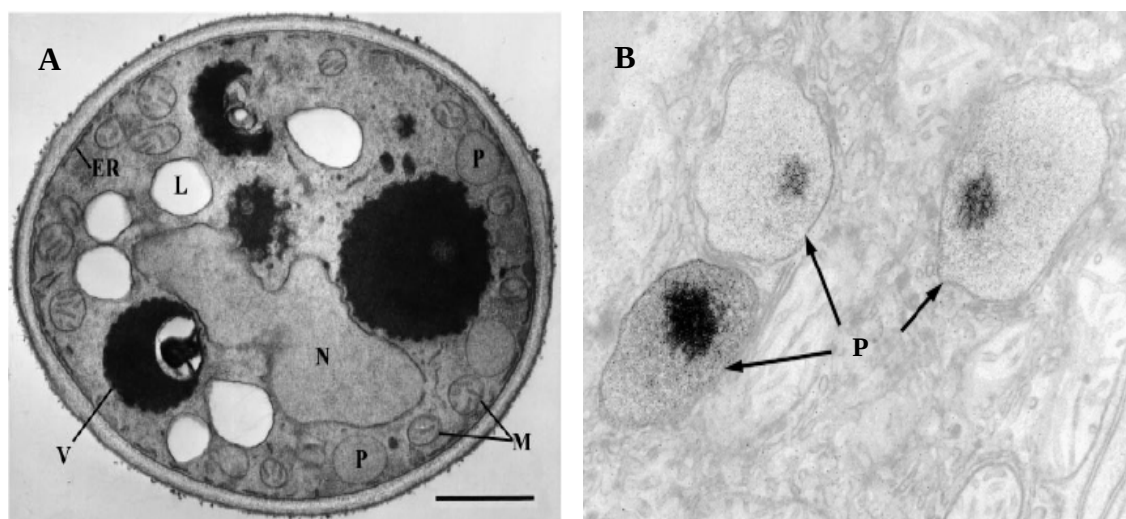


Figura 1 – Morfologia do peroxissoma.

A – Micrografia electrónica de uma célula de *S. cerevisiae* crescida em ácido oleico. Barra=1 μ m; P, peroxissoma; N, núcleo; M, mitocôndria; ER, retículo endoplasmático; V, vacúolo; L, gota lipídica (Extraída de [21]).

B – Micrografia electrónica de peroxissomas de fígado de rato mostrando a localização da enzima urato oxidase através da técnica do cério. P, peroxissoma (Extraída de [22]).

Inicialmente os peroxissomas foram designados por microcorpos (*microbodies*), sendo que essa designação foi alterada para peroxissoma, após a descoberta da respiração baseada no peróxido de hidrogénio, característica desses organelos [23]. Os peroxissomas desempenham várias funções metabólicas, como é o caso da oxidação de vários tipos de lípidos (ácidos gordos de cadeia longa e muito longa, ácidos dicarboxílicos de cadeia longa, ácidos gordos insaturados, ácido pristânico, leucotrienos) [5, 24-26], vários passos da síntese de plasmalogénios (apesar de a síntese de plasmalogénios ser dividida pelo ER e pelo peroxissoma é no peroxissoma que a ligação éter é introduzida) e da síntese *de novo* de colesterol, metabolismo de isoprenóides [27-29], conversão de ácido fitânico a ácido pristânico, oxidação de D-aminoácidos e poliaminas (revisto em [5]), síntese de ácido docosahexanóico [24], síntese de ácidos biliares e catabolismo de purinas (revisto em [30]). Em plantas, o ciclo do glioxilato (sementes) e a fotorrespiração (folhas) ocorre nos peroxissomas (revisto em [26]). Em leveduras, vários passos do ciclo do glioxilato também ocorrem no peroxissoma, bem como a biossíntese de lisina, e a degradação de aminoácidos, metanol, peróxido de hidrogénio e ácidos gordos [31], sendo que nestes organismos a β -oxidação é um processo exclusivamente peroxissomal [32].

1.2- Doenças peroxissomais

A importância vital dos peroxissomas a nível biológico está bem patente na existência de várias doenças genéticas associadas a estes organelos, caracterizadas por problemas no desenvolvimento (principalmente do sistema nervoso central) e acumulação anormal de metabolitos [5, 33]. No entanto, e apesar de os peroxissomas terem sido descobertos na década de 50, só em 1973 foi efectuada a primeira observação que relacionava os organelos com uma doença. Nesse trabalho verificou-se que células de pacientes com síndrome de Zellweger não possuíam peroxissomas [34]. As doenças peroxissomais podem ser divididas em dois grupos distintos, ambos com consequências fenotípicas profundas:

- doenças provocadas pela deficiência de uma única enzima peroxissomal;
- doenças da biogénese peroxissomal (DBP).

1.2.1- Doenças provocadas pela deficiência de uma única enzima peroxissomal

Este conjunto de doenças, como o próprio nome indica, é caracterizado pela deficiência de uma enzima peroxissomal, e consequente perda da respectiva função metabólica. Actualmente são conhecidas mais de uma dezena destas doenças [35-37]. A adrenoleucodistrofia associada ao cromossoma X (X-ALD) é a patologia mais comum do grupo e resulta de mutações no gene que codifica um transportador existente na membrana peroxissomal. É uma doença degenerativa progressiva que afecta principalmente o sistema nervoso central e a glândula adrenal, sendo caracterizada por um aumento dos níveis de ácidos gordos de cadeia muito longa no plasma [24, 35]. A condrodisplasia rizomélica punctata tipo 2, outra doença deste grupo, é provocada por uma deficiência numa enzima da via de biossíntese dos plasmalogénios, a dihidroxiacetona fosfato aciltransferase, e é caracterizada por problemas de crescimento e desenvolvimento, cataratas e níveis reduzidos de plasmalogénios [24]. As doenças provocadas pela deficiência de uma enzima da β -oxidação peroxissomal (por exemplo, deficiência na acil-CoA oxidase) são normalmente caracterizadas por uma redução do número de peroxissomas nas células, bem como por um aumento do tamanho dos mesmos [20].

1.2.2- Doenças da biogénese peroxissomal

As DBP são provocadas por deficiências em proteínas indispensáveis para a manutenção e hereditariedade dos peroxissomas. Essas proteínas são colectivamente designadas por peroxinas e representadas pelo acrónimo *Pexn*, sendo os genes que as codificam designados por *PEXn*. O número (*n*) que identifica a peroxina ou o gene reflecte a ordem da sua descoberta [38].

As DBP foram o primeiro grupo de doenças que permitiu relacionar problemas metabólicos com malformações [39]. As DBP são um grupo heterogéneo de doenças autossómicas recessivas, que compreende 13 grupos de complementação. Estas patologias são caracterizadas pela deficiência em múltiplas funções peroxissomais [40-42], podendo verificar-se duas situações: ausência de peroxissomas nas células (grupos de complementação 9, 12 e 14) ou existência de estruturas membranares (“*peroxisomal ghosts*”) contendo proteínas da membrana do peroxissoma, mas destituídas da maioria (ou todas) as proteínas matriciais (grupos de complementação 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 e 13), sendo que nestes casos o número de peroxissomas por célula é cerca de 5 vezes inferior, e o tamanho dos mesmo é superior ao normal (revisto em [5]).

As doenças da biogénese peroxissomal podem ser agrupadas em dois espectros fenotípicos distintos: o espectro Zellweger e o espectro condrodysplasia rizomélica punctata (CDRP).

O espectro Zellweger é o mais frequente (GC1-10, 12), abrangendo cerca de 80% dos pacientes com DBP, podendo apresentar três graus de severidade: a síndrome de Zellweger, a forma mais severa, que normalmente é letal durante o primeiro ano de vida; a adrenoleucodistrofia neonatal, a forma intermédia; e a doença infantil de Refsum, a forma menos severa, podendo os pacientes atingir uma idade superior a 30 anos (revisto em [5] e em [39]). Devido à deficiência no endereçamento das enzimas possuidoras de PTS1 ou PTS2 para o peroxissoma (ver capítulos 1.3.3.1 e 1.3.3.2), todas, ou quase todas, as funções metabólicas peroxissomais estão comprometidas. Os indivíduos com este espectro fenotípico apresentam problemas hepáticos, atraso mental variável e retinopatia [24]. Estas patologias podem ser causadas por mutações em vários genes *PEX*, nomeadamente 1, 2, 3, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 16, 19 e 26 [43].

O espectro CDRP (GC 11) está associado a mutações apenas no gene *PEX7* [44, 45]. Como apenas o endereçamento de proteínas com PTS2 está comprometido (ver capítulo 1.3.3.4.2), o seu fenótipo bioquímico é distinto do espectro Zellweger (revisto em [5]).

1.3- Biogénese peroxissomal

Os peroxissomas são organelos destituídos de DNA e de maquinaria de síntese de proteínas, pelo que todas as suas proteínas são sintetizadas no citosol, sendo a maioria transportada após tradução para o organelo [21, 26, 46].

De forma a tentar identificar quais os genes envolvidos na biogénese peroxissomal, vários estudos foram efectuados, nomeadamente estudos de complementação funcional de células CHO mutantes com bibliotecas de cDNA humano [47, 48], análises proteómicas [49, 50] e clonagem dos genes de levedura necessários para o crescimento destes microorganismos em meio contendo ácido oleico como única fonte de carbono [51]. Actualmente são conhecidas 32 peroxinas (Kim et al, JCB, 2006), sendo que algumas só foram identificadas nalguns organismos.

As peroxinas podem ser divididas em 3 grupos distintos [26, 52]: peroxinas necessárias para a biogénese e integridade da membrana peroxissomal; peroxinas necessárias para a proliferação peroxissomal; e peroxinas necessárias para o transporte e endereçamento de proteínas para a matriz do peroxissoma.

1.3.1- Biogénese da membrana do peroxissoma

Os peroxissomas são organelos que, ao contrário de outros organelos (mitocôndria, cloroplasto), possuem a capacidade de se formar *de novo* em células originalmente destituídas de peroxissomas [53-55]. Estudos recentes sugerem que as membranas peroxissomais têm origem no retículo endoplasmático [56], o que vem de encontro a várias observações anteriormente publicadas (revisto em [57]), como por exemplo: foram observados peroxissomas cujas membranas se encontravam intimamente associadas ao retículo endoplasmático [58, 59]; foi detectada Emp24 em peroxissomas nascentes de leveduras, sendo que esta proteína é um dos componentes proteicos das vesículas revestidas por COPII derivadas do retículo endoplasmático [60, 61]; duas peroxinas, Pex2p e Pex16p são N-glicosiladas em *Yarrowia lipolytica*, sugerindo a sua passagem pelo retículo endoplasmático [62].

As proteínas da membrana do peroxissoma são designadas por PMP (*peroxisomal membrane protein*). O processo de endereçamento das PMPs é distinto do envolvido no endereçamento das proteínas matriciais, o que explica a inexistência de *peroxisomal ghosts* em células de determinados doentes da biogénese peroxissomal (ver capítulo 1.2.2), nomeadamente naqueles que possuem defeitos nos genes PEX3, PEX16

e PEX19 [46, 63-68]. O sinal de endereçamento das PMPs (mPTS) não está bem caracterizado, apenas se sabendo que consiste num segmento hidrofílico contendo um grupo de aminoácidos carregados positivamente e adjacentes a, pelo menos, um conjunto de aminoácidos hidrofóbicos ou a um domínio transmembranar (revisto em [21] e em [69]). Recentemente foi proposto que existem dois tipos de mPTS: mPTS1, cuja importação para o peroxissoma é dependente da Pex19p; e mPTS2, cuja importação não é dependente da Pex19p [70]. Actualmente apenas está identificada uma proteína contendo mPTS2, a Pex3p [70].

A Pex3p é uma proteína intrínseca de membrana, apresentando a extremidade C-terminal voltada para o citosol [71-75]. A sua região N-terminal (aminoácidos 1-46) contém a informação necessária para o endereçamento da peroxina para o peroxissoma em todas as espécies [71, 72, 74-80].

A Pex3p está envolvida no processo de endereçamento/inserção de outras PMPs [66, 81], servindo como âncora membranar para o complexo Pex19p-PMP [52, 74, 82, 83].

A Pex19p é uma proteína acídica, farnesilada na sua região C-terminal, sendo que essa farnesilação ocorre numa cisteína presente num motivo CAAX. Apesar de ser a única peroxina conhecida que é farnesilada, a relevância fisiológica desta observação permanece por esclarecer [46, 65, 81, 83, 84]. Em solução, a Pex19p humana encontra-se sob a forma monomérica, cuja metade N-terminal apresenta uma conformação desordenada, enquanto que a metade C-terminal apresenta uma estrutura rígida [85].

A localização subcelular da Pex19p é bimodal, com cerca de 95% sob a forma citosólica e 5% associada a peroxissomas [46]. Esta distribuição dupla da peroxina está de acordo com a sua função, pois é aceite que a Pex19p funciona como receptor de novas PMPs sintetizadas no citosol, endereçando-as para o peroxissoma (revisto em [5, 21, 69]).

Recentemente foi demonstrado que a importação de PMPs é dependente da presença de Pex19p durante a tradução das mesmas, e que a afinidade da Pex19p para a Pex3p aumenta marcadamente quando a primeira se encontra em complexo com uma PMP [86]. Estas observações sugerem fortemente que os complexos [Pex19p-PMP], formados na ausência de peroxissomas, são os substratos para a maquinaria de inserção de PMPs na membrana peroxissomal.

A Pex16p é uma peroxina identificada em vários fungos, plantas e mamíferos, sendo que em leveduras apenas foi identificada em *Y. lipolytica*. Esta peroxina está envolvida na biogénese das membranas peroxissomais. No entanto, o papel que desempenha nesse processo não é muito claro. Alguns autores defendem que a Pex16p

é o receptor membranar da Pex3p e provavelmente de outras PMPs, enquanto outros sugerem que é um componente do translocador membranar para as PMPs [82, 87, 88].

1.3.2- Proliferação peroxissomal

A proliferação peroxissomal é um processo dinâmico, na medida em que a acção de determinados estímulos externos estimula ou inibe esse processo. Por exemplo, o crescimento de leveduras cultivadas na presença de determinados ácidos gordos ou de metanol como única fonte de carbono promove a proliferação peroxissomal, pois estes organelos estão envolvidos no catabolismo dessas moléculas. Na presença de glucose como única fonte de carbono, o número de peroxissomas na levedura é quase nulo [21].

A Pex11p é uma peroxina envolvida no processo de proliferação peroxissomal, controlando a quantidade e o tamanho dos peroxissomas [89]. Esta peroxina contém dois domínios transmembranares e as suas extremidades estão voltadas para o citosol [5, 21]. Em leveduras só existe um gene PEX11, e a ausência da proteína codificada pelo mesmo leva à formação de poucos peroxissomas de dimensões elevadas. Por outro lado, a sobreexpressão de Pex11p promove a proliferação peroxissomal, verificando-se a existência de muitos peroxissomas pequenos nas células [49, 90, 91]. Em humanos são conhecidos 3 genes que codificam a Pex11p: PEX11 α , PEX11 β e PEX11 γ . A expressão do gene PEX11 α ou PEX11 β é suficiente para induzir a proliferação peroxissomal [92].

O papel que a Pex11p desempenha na proliferação peroxissomal tem sido alvo de alguma controvérsia, pois há autores que defendem que esta peroxina apenas está envolvida nesse processo como consequência indirecta do seu papel na oxidação peroxissomal de ácidos gordos [93]. No entanto, na ausência de actividade metabólica peroxissomal, a Pex11p promove a proliferação dos peroxissomas, sugerindo um papel directo da peroxina neste fenómeno [94].

1.3.3- Transporte de proteínas para a matriz do peroxissoma

Actualmente estão identificadas mais de 50 proteínas da matriz peroxissomal. A maioria possui um dos dois sinais de endereçamento para a matriz do organelo que se encontram definidos: PTS1 (*peroxisomal targeting signal type 1*) e PTS2 (*peroxisomal targeting signal type 2*) (revisto em [5, 21, 26, 30]). A importação das proteínas para a matriz peroxissomal apresenta uma propriedade que a distingue da importação proteica

para a maioria dos restantes organelos: as proteínas são transportadas já no seu estado nativo e oligomérico, ou seja, não é necessário que a proteína esteja desnaturada (*unfolded*) para atravessar a membrana peroxissomal. No entanto, as primeiras experiências efectuadas sobre o tema sugeriam exactamente o contrário: a comparação da cinética de tetramerização da catalase em hepatócitos (avaliada em função da actividade enzimática da mesma) com a de importação da catalase para a fracção organelar sugeria que a catalase era importada na forma monomérica e destituída do grupo heme [95, 96]; em glioxissomas de pepino, a importação da malato sintetase parecia também ocorrer da mesma forma [97]; além disso, verificou-se que a octamerização da álcool oxidase parecia ocorrer simultaneamente ou imediatamente após a importação da enzima para os peroxissomas [98-101]. No entanto, várias experiências foram surgindo posteriormente que revelaram que, de facto, o peroxissoma possui a capacidade de importar proteínas no seu estado nativo. Foi demonstrado que a luciferase no seu estado nativo era importada para peroxissomas [102]. Verificou-se que o peroxissoma era capaz de importar subunidades de proteínas oligoméricas, mesmo se estas não possuísem sinais de endereçamento, um processo que foi designado de importação “à boleia”. Após expressão de tiolase sem o PTS2, esta era endereçada para o peroxissoma em células da estirpe selvagem, enquanto que em células *Δtiolase* permanecia no citosol. Como a tiolase é uma proteína dimérica, estas observações sugeriam uma importação de heterodímeros compostos por tiolase com e sem PTS2 [103]. Uma experiência semelhante foi efectuada com a cloramfenicol acetiltransferase (enzima bacteriana trimérica), onde se verificou que a coexpressão da enzima com e sem PTS1 promovia a importação das duas espécies para peroxissomas de levedura e de células de macaco [104]. Posteriormente verificou-se que o mesmo processo de importação “à boleia” ocorre também para várias outras proteínas, nomeadamente, a Mdh3p de *S. cerevisiae* [105], as isocitrato liases de algumas plantas [106], e as enoil-CoA isomerases Dci1p e Eci1p de *S. cerevisiae* [107].

Foi demonstrado que partículas de ouro com 4-9nm de diâmetro, revestidas por albumina humana contendo PTS1, são importadas *in vivo* para a matriz do peroxissoma [108]. Além disso, algumas enzimas peroxissomais adquirem a sua estrutura quaternária no citosol, antes de serem transportadas para o organelo [103, 104, 109]. Foi também demonstrado que a importação de moléculas de albumina com PTS1 ocorre a velocidades semelhantes independentemente de estas estarem ou não no seu estado nativo [110]. Verificou-se que a importação da dihidrofolato redutase contendo um PTS1 para o peroxissoma não era inibida pela presença de aminopterina, uma substância que se liga à enzima e promove o seu enrolamento [111]. Em *Y. lipolytica*, a importação da acil-CoA oxidase ocorre com a enzima já na forma pentamérica [112]. Foi demonstrado

que moléculas de IgG *crosslinked* com um péptido contendo PTS1 são importadas para o peroxissoma [108], mas se em vez de se utilizar PTS1 se utilizar um sinal de endereçamento mitocondrial essas moléculas não são importadas para a mitocôndria [113]. Estas observações ilustram a capacidade do peroxissoma importar as suas proteínas já no estado nativo, mesmo quando se tratam de proteínas oligoméricas. Além disso, ainda não foram encontradas quaisquer chaperones peroxissomais [114], com excepção de algumas pequenas proteínas Hsp que foram encontradas em peroxissomas de *Arabidopsis* [115]. A ausência de chaperones peroxissomais está de acordo com uma importação de proteínas já no seu estado nativo.

Esta capacidade de importação de grandes partículas/moléculas encontra paralelo com a maquinaria de importação presente em alguns sistemas membranares, como por exemplo: o translocador *twin-arginine* (Tat) existente na membrana citoplasmática de bactérias e nos tilacóides [116]; o sistema de secreção Tipo II existente na membrana externa de bactérias Gram-negativas [117]; o sistema de importação/exportação nuclear [118], que promove o transporte de grandes macromoléculas, que podem atingir os 23nm [119-121], através de estruturas membranares complexas (poros nucleares). As semelhanças no tipo de substratos transportados poderiam sugerir a existência de grandes poros na membrana peroxissomal. No entanto, tais estruturas nunca foram observadas [122-124]. A análise de membranas peroxissomais pela técnica de *freeze-fracture* revelou apenas a existência de pequenas partículas intramembranares [125], sendo que a identidade/relevância fisiológica dessas partículas permanece por esclarecer.

A importação de proteínas para a matriz do peroxissoma recorre a receptores solúveis, ao contrário do que se passa, por exemplo, na mitocôndria, onde os receptores Tom20 e Tom70 se encontram associados à membrana externa da mitocôndria [126]. Os receptores para as proteínas da matriz do peroxissoma são a Pex5p e a Pex7p, que reconhecem as proteínas com PTS1 ou com PTS2, respectivamente (ver capítulos 1.3.3.4.1 e 1.3.3.4.2). Estes receptores reconhecem as proteínas no citosol e endereçam-nas para o organelo, onde libertam as proteínas que transportam e são depois reciclados de novo para o citosol, para efectuarem novos ciclos de importação. Este modelo de actuação foi designado por “modelo dos receptores cíclicos” [127].

Em termos teóricos, o modo de actuação da Pex5p pode ser entendido de 3 formas distintas. A Pex5p pode reconhecer as proteínas no citosol, endereçando-as posteriormente para a membrana do peroxissoma, onde entrega as mesmas a uma translocase que se encarrega de transportar as proteínas matriciais para o interior do organelo. Com base neste modelo alguns autores propuseram o chamado “modelo do pré-implex” [42], que será discutido no capítulo 1.5.

Por outro lado, é possível atribuir à Pex5p um papel mais activo na importação de proteínas contendo PTS1 para a matriz peroxissomal, na medida em que a peroxina pode reconhecer essas proteínas no citosol e transportar as mesmas através da membrana do peroxissoma, desempenhando um papel não só no endereçamento mas também no processo de translocação. Neste caso a Pex5p reconhece as proteínas contendo PTS1 no citosol, endereça-as para a membrana peroxissomal e insere-se na mesma antes de libertar para a matriz as proteínas que transporta.

Uma variação a este modelo ocorre no chamado “modelo extendido dos receptores cíclicos” [128]. Neste caso, é defendido que a Pex5p acompanha as prot-PTS1 até ao interior do peroxissoma. Este modelo apoia-se num estudo em que se verificou que após adição de um local de clivagem para uma protease da matriz peroxissomal à Pex5p, a peroxina era clivada proteoliticamente [128]. No entanto, os autores não mostraram que a clivagem ocorria com a peroxina na matriz do peroxissoma, não se podendo excluir, portanto, que a Pex5p se tenha mantido sempre em associação com a membrana peroxissomal, apresentando apenas um domínio exposto à acção da protease.

De facto, tendo em conta as diferentes observações publicadas, o modelo que mais se adequa à forma de actuação da Pex5p parece ser aquele em que a peroxina capta as proteínas com PTS1 no citosol, interage com a membrana peroxissomal inserindo-se e libertando posteriormente as proteínas matriciais no interior do organelo, mas sempre em associação com a membrana peroxissomal (ver capítulo 1.4).

Muitas das peroxinas identificadas até ao momento estão envolvidas no processo de importação de proteínas matriciais para o peroxissoma, sendo que algumas estão envolvidas na importação quer de proteínas contendo PTS1, quer de proteínas contendo PTS2. Existe um conjunto de proteínas matriciais do peroxissoma que não se enquadram em nenhuma das vias de importação definidas (PTS1 e PTS2), o que levou vários autores a sugerir uma terceira via que abarca essas excepções.

1.3.3.1- Importação de proteínas contendo PTS1

A maioria das proteínas da matriz do peroxissoma contém um PTS1. A primeira sequência PTS1 foi identificada na enzima luciferase [129], cuja localização peroxissomal tinha sido descoberta anteriormente [102]. Este sinal de endereçamento é caracterizado por um tripéptido não clivável, que, ao contrário do que sucede normalmente nos sinais de endereçamento para o retículo endoplasmático, mitocôndria ou cloroplasto, se

encontra localizado na extremidade C-terminal das proteínas matriciais. Como consequência desta localização, a importação das proteínas que contêm PTS1 não pode ocorrer em simultâneo com a tradução das mesmas, tendo que ser sintetizadas na totalidade antes de serem enviadas para os peroxissomas [130]. A sequência PTS1 identificada originalmente na luciferase foi S-K-L, mas são conhecidas algumas variações da mesma, sendo que a sequência consenso estabelecida para este sinal de endereçamento é (S/A/C)-(K/R/H)-L [52, 131-136]. No entanto, o PTS1 parece ser um pouco mais complexo. De facto, foi proposto que o PTS1 engloba 12 aminoácidos, que podem ser agrupados em três regiões distintas [137, 138]: o tripéptido localizado na extremidade C-terminal, responsável pela interacção com os TPRs da Pex5p; um tetrapéptido localizado imediatamente a montante, que se pensa que é importante no estabelecimento de interacções adicionais com a Pex5p; uma região flexível, que contribui para a acessibilidade do PTS1.

A importação de proteínas contendo PTS1 é dependente de ATP, mas não de GTP ou de um potencial de membrana [139-142]. Foi sugerido que a dependência de ATP nesse processo não ocorre nos passos que culminam com a translocação de prot-PTS1 através da membrana peroxissomal, ao contrário do que originalmente se pensava, mas sim na exportação da Pex5p da membrana peroxissomal para o citosol [143]. Esta propriedade foi confirmada posteriormente por outros laboratórios [144, 145].

1.3.3.2- Importação de proteínas contendo PTS2

O sinal de endereçamento PTS2 foi originalmente identificado na tiolase de fígado de rato como uma pré-sequência localizada na região N-terminal da enzima, que é clivada proteoliticamente no peroxissoma [146, 147]. A sequência PTS2 é caracterizada por um nonapéptido presente em algumas proteínas da matriz do peroxissoma [146, 147], estando neste momento identificadas cerca de dez proteínas possuidoras deste sinal de endereçamento [148]. A sequência consenso para o PTS2 é menos restritiva que a estabelecida para o PTS1, estando definida como (R/K)-(L/I/V)-X₅-(H/Q)-(L/A) [149]. Apesar de normalmente se localizar na extremidade N-terminal, esta sequência funciona como sequência topogénica em qualquer local da proteína (revisto em [26]). O comprimento do espaçador (X₅) entre os aminoácidos conservados no PTS2 parece ser crucial para o reconhecimento da sequência por parte da Pex7p [107, 150-152] (ver capítulo 1.3.3.4.2). Apesar de existir uma sequência consenso para os PTS2, há autores que defendem que essa sequência é uma simplificação, existindo diferenças na mesma

entre diferentes espécies, pois alguns dos aminoácidos representados são não-funcionais em determinados contextos PTS2 [21, 153].

A clivagem do PTS2 após importação para a matriz do peroxissoma é dependente do organismo em causa. Foi verificado que em humanos, plantas e em *Y. lipolytica* existe clivagem do sinal de endereçamento de algumas proteínas por uma protease peroxissomal [154, 155], sendo que em *S. cerevisiae* esta clivagem proteolítica parece não ocorrer [26, 156].

Apesar da via PTS1 existir em todas as espécies estudadas até agora, o mesmo não é verdadeiro para a via PTS2. No caso das plantas, cerca de um terço das proteínas peroxissomais possui PTS2 [157], e em mamíferos também são conhecidas várias proteínas contendo PTS2. Em *S. cerevisiae* apenas a tiolase possui esse sinal de endereçamento, e em *C. elegans* não é conhecida nenhuma proteína com PTS2, sendo que neste último caso todas as proteínas da matriz do peroxissoma possuem PTS1 e são reconhecidas pela Pex5p [158].

1.3.3.3- Importação de proteínas sem PTS1 ou PTS2 para a matriz peroxissomal

Apesar da vasta maioria das proteínas matriciais do peroxissoma possuírem PTS1 ou PTS2, existem algumas exceções, que não possuem nenhum destes sinais de endereçamento [55, 159]. Algumas dessas proteínas são: a alanina:glioxilato aminotransferase humana [160, 161], a acil-CoA oxidase peroxissomal de *P. pastoris* [162], a acil-CoA oxidase de *C. tropicalis* e de *S. cerevisiae* [163, 164], a álcool oxidase de *H. polymorpha* e a Pex8p de *Y. lipolytica* [165].

No entanto, não se pode excluir que, pelo menos nalguns dos casos referidos, a importação das proteínas ocorra “à boleia”, em vez de utilizar mecanismos distintos dos descritos para PTS1 e PTS2. Foi demonstrado, por exemplo, que a proteína ScEci1p à qual foi removido o PTS1 é importada para o peroxissoma através da dimerização com a proteína ScDci1p, que possui PTS1 [107].

1.3.3.4- Peroxinas envolvidas na importação de proteínas matriciais para o peroxissoma

Existem várias peroxinas envolvidas na importação de proteínas para a matriz do peroxissoma. Neste capítulo são descritas individualmente aquelas que de alguma forma

estão relacionadas com o trabalho desenvolvido no âmbito desta tese. No capítulo 1.4 é apresentado um modelo de actuação das mesmas que integra a informação apresentada neste capítulo.

1.3.3.4.1- Pex5p

A Pex5p foi originalmente caracterizada em *Pichia pastoris* [166], sendo que actualmente já foi identificada em mamíferos, leveduras, invertebrados, plantas e protozoários [21]. Apesar da ausência de qualquer domínio transmembranar na Pex5p, esta comporta-se como uma proteína intrínseca de membrana quando associada com a membrana do peroxissoma, resistindo a extracção alcalina a pH 11,5 [167-170]. As propriedades das duas fracções subcelulares de Pex5p, citosólica e associada à membrana peroxissomal, são marcadamente distintas. Quando em solução, esta peroxina apresenta uma susceptibilidade elevada ao tratamento com proteases, sendo que quando em associação com a membrana do peroxissoma essa susceptibilidade deixa de existir, tornando-se extremamente resistente à clivagem proteolítica [145, 168, 171]. Em peroxissomas de fígado de rato a Pex5p aparenta ser completamente resistente ao tratamento com proteases, com excepção da região N-terminal com cerca de 2kDa [168, 172].

A Pex5p é uma proteína composta por duas regiões estrutural e funcionalmente distintas. A região C-terminal é caracterizada pela presença de sete repetições tetratricopeptídicas (TPRs). Os TPRs são motivos proteicos normalmente compostos por 34 aminoácidos, existentes em várias proteínas envolvidas em diversos processos celulares, como, por exemplo, regulação do ciclo celular e fosforilação ou glicosilação de proteínas [173, 174]. Pensa-se que estes motivos estão envolvidos em interacções proteína-proteína, [173, 175], reconhecendo nalguns casos, e tal como acontece para a Pex5p, sequências localizadas na região C-terminal das proteínas [176, 177]. Apesar de os TPRs apresentarem normalmente pouca conservação de sequências, a sua estrutura é conservada, apresentando-se tridimensionalmente como um arranjo compacto de duas hélices α antiparalelas (A e B) unidas por um *loop* [176, 178-180]. Os TPRs encontram-se organizados em conjuntos de pelo menos três unidades, sendo que, de uma maneira geral, os poucos aminoácidos conservados encontram-se voltados para o interior da estrutura, enquanto que os variáveis se encontram expostos à superfície. É através dos TPRs que a Pex5p interacciona com o PTS1, ou seja, é esta região que está envolvida no reconhecimento e ligação às proteínas matriciais, sendo portanto indispensável para a

importação das mesmas [134, 167, 169, 181-186]. Esta propriedade foi primeiramente identificada em *P. pastoris*, onde se verificou que Pex5p deste organismo traduzida *in vitro* interactuava com péptidos imobilizados contendo –SKL [166]. Estudos em que foi utilizada mutagénese aleatória confirmaram a importância dos TPRs para o reconhecimento de PTS1 por parte da Pex5p [186]. A estrutura cristalina da região C-terminal da Pex5p humana em complexo com um péptido contendo PTS1 (Figura 2B) revelou que nessa peroxina os TPRs estão agrupados em 2 conjuntos (TPRs 1-3 e 5-7). O TPR 4 não se apresentou no cristal com uma estrutura típica de um TPR, formando antes uma hélice α contínua de 21 aminoácidos [183]. Foi determinado que no complexo o PTS1 se encontra numa cavidade existente entre os dois conjuntos de TPRs. Recentemente foi obtida a estrutura da região C-terminal da Pex5p na ausência de PTS1 e na presença da SCP2, uma proteína com PTS1 [187, 188]. Nesse trabalho verificou-se que a extremidade C-terminal da Pex5p apresenta 3 hélices α , que são precedidas por um *loop* (aminoácidos 589-601) que faz a ligação dessa região da proteína ao TPR7. Na presença da SCP2, esse *loop*, designado por “*loop 7C*”, interacciona com o TPR1, funcionando como um elo de ligação, juntamente com o TPR4, entre os dois conjuntos de TPRs. Na ausência de prot-PTS1, o *loop 7C* não interacciona com o TPR1, o que provoca uma abertura do arranjo tridimensional dos conjuntos de TPRs da Pex5p (ver Figura 2).

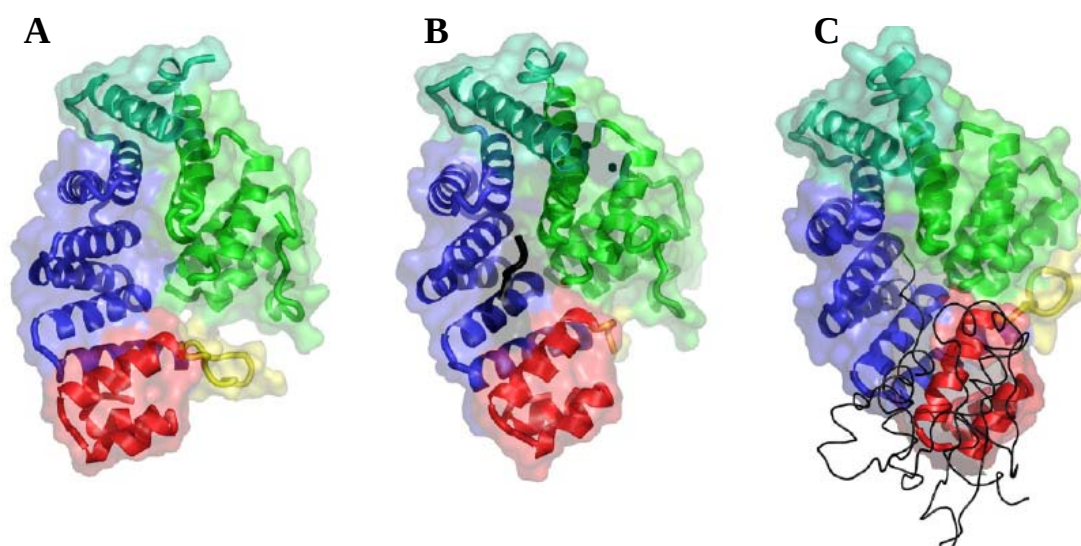


Figura 2 – Estrutura tridimensional dos TPRs da Pex5p na presença e na ausência de PTS1 (extraído de [188]).

A – TPRs da Pex5p na ausência de PTS1 [187]; **B** – TPRs da Pex5p em complexo com um pentapéptido contendo PTS1 (YQSKL) [183]; **C** – TPRs da Pex5p em complexo com a proteína SCP2, que contém um PTS1 [187]. Esquema de cores: TPRs 1-3 (verde), TPR 4 (azul), TPRs 5-7 (vermelho), ligandos PTS1 (preto).

Foi obtido um valor de K_d de 250-500nM para a interacção entre Pex5p e PTS1 em *Pichia pastoris* [169, 189], enquanto que para a Pex5p humana esse valor ronda os 20-70nM [183, 184, 189, 190]. Em *Hansenula polymorpha*, o valor de K_d determinado para a mesma interacção foi de 18nM [191], e em *L. donovani* obteve-se um valor de 140nM [192]. Foi demonstrado que a interacção entre os TPRs e o PTS1 não é modulado por ATP [189]. Uma única alteração de um aminoácido no TPR6 (N489K) foi identificada num indivíduo com adrenoleucodistrofia neonatal. Verificou-se que essa mutação compromete a capacidade da Pex5p interactuar com PTS1 [182]. Substituições isoladas de glicina para aspartato no primeiro ou sexto TPR em células CHO abolem ou diminuem a afinidade da Pex5p para o PTS1 [193], sendo verificado o mesmo resultado no mesmo tipo de substituições no quinto TPR de Pex5p em *Y. lipolytica* [194]. Foi proposto que as diferenças que existem na eficiência de importação de proteínas para o peroxissoma entre diferentes espécies estão relacionada com a capacidade dos TPRs da Pex5p reconhecerem os diferentes PTS1 [182]. Esta hipótese apoiou-se em diferentes observações, nomeadamente: uma fusão entre a região N-terminal da Pex5p de *P. pastoris* e a região C-terminal da Pex5p humana restaura a importação de algumas proteínas contendo PTS1 em células de *P. pastoris* mutantes *pex5* [170]; no entanto, a mesma fusão não consegue restaurar a capacidade de células de *P. pastoris* mutantes em *pex5* crescerem em metanol [170, 182]; em *H. polymorpha* $\Delta pex5$, a expressão de Pex5p de melancia recupera a formação de peroxissomas, no entanto, a importação de proteínas contendo PTS1 é apenas parcialmente restaurada [195]. Além de conter a região que interactua com PTS1, a metade C-terminal da Pex5p contém também o local de interacção dessa peroxina com a Pex12p e com Pex10p [196, 197].

A região N-terminal da Pex5p é caracterizada pela existência de um elevado número de aminoácidos ácidos e pela presença de várias locais de interacção com diversas peroxinas, nomeadamente com a Pex14p [198-204], Pex13p [50, 201, 204-208], Pex7p [193, 209-212] e Pex8p em leveduras [213]. Nessa região existem várias repetições pentapeptídicas diaromáticas (WxxxF/Y), que se pensa fazerem parte de hélices anfipáticas, estando os aminoácidos aromáticos voltados para o mesmo lado da hélice [201]. A quantidade dessas repetições na região N-terminal da Pex5p varia de acordo com a espécie, sendo que em leveduras existem pelo menos duas, em mamíferos existem sete, e em melancia existem nove [185, 201, 214]. Estes motivos estão envolvidos na interacção da Pex5p com outras peroxinas [185, 214], nomeadamente com a Pex14p (com algumas excepções, ver parágrafo seguinte) e com a Pex13p. A interacção entre a Pex5p e a Pex14p é extremamente forte, sendo que é a única interacção entre peroxinas conhecida que é resistente a condições estridentes de

solubilização [30]. Nenhum outro componente da maquinaria de importação (ver capítulo 1.4) interacciona tão fortemente com a Pex5p como a Pex14p [214-216].

Foi demonstrado que os sete motivos WxxxY existentes na Pex5p humana possuem a capacidade de interaccionar individualmente com a Pex14p, independentemente da presença dos restantes, e essa interacção é muito forte, apresentando valores de K_d compreendidos entre 1-100nM [214]. Portanto, a elevada afinidade da interacção Pex5p-Pex14p deve-se ao facto de existirem na região N-terminal da Pex5p vários locais de interacção para a Pex14p. Além disso, o facto da Pex14p polimerizar (ver capítulo 1.3.3.4.3) também faz com que a interacção entre Pex5 e Pex14p seja multivalente, aumentando a afinidade entre as duas peroxinas. A estequiometria de ligação entre as duas peroxinas não é 1:1, sendo que uma estequiometria de 1:5 (Pex5p:Pex14p) foi observada em complexos isolados de membranas peroxissomais de fígado de rato [168], enquanto que após cromatografia de filtração em gel foi sugerido que essa estequiometria é de 1:7 [201]. Recentemente foi sugerido, com base em resultados de *two hybrid system*, que em *S. cerevisiae* não são as duas repetições diaromáticas existentes na Pex5p que estão envolvidas na interacção com a região N-terminal da Pex14p, mas sim uma região (aminoácidos 246-267) que contém um motivo pentapeptídico invertido (FQEVW). Foi demonstrado que o triptofano dessa sequência é importante para a interacção [10]. Este motivo pentapeptídico invertido encontra-se conservado em fungos e em *C. elegans* [10]. Em *L. donovani*, também foi proposto que não são os motivos diaromáticos que estão envolvidos na interacção da Pex5p com a Pex14p. Este organismo possui três desses motivos, mas após análise de mutações verificou-se que, *in vitro*, a forte interacção observada entre as duas peroxinas é mediada por uma região de 17 aminoácidos localizada na região N-terminal da Pex5p, mas que não engloba nenhum motivo diaromático [217]. Foi verificado também que um fragmento contendo os três motivos diaromáticos de *P. pastoris* e um péptido contendo um dos motivos diaromáticos de *T. brucei* não interacciona com a Pex14p *in vitro* [204, 218].

A interacção entre a Pex5p e a Pex13p não se encontra tão bem documentada. Alguns estudos revelam que alguns dos motivos diaromáticos da Pex5p estão envolvidos na interacção [185, 207], havendo no entanto alguma controvérsia quanto à região da Pex13p que interacciona com a Pex5p. Estudos em *S. cerevisiae* mostraram que é o domínio SH3 da Pex13p (ver capítulo 1.3.3.4.4) que interacciona com a Pex5p, mais concretamente com uma região que engloba um dos dois motivos diaromáticos [185, 206, 207, 219, 220]. Verificou-se que a interacção entre as duas peroxinas não envolve a prolina 203 da Pex5p, o que sugere que essa interacção representa um novo tipo envolvendo um domínio SH3 mas não um domínio PxxP [206]. A sequência da Pex5p

proposta como estando envolvida na interacção é $W_{204}xxxFxxLExE_{214}$. É de salientar que os aminoácidos W204 e F208 compõem o motivo diaromático envolvido na interacção entre as duas peroxinas. Em *P. pastoris*, verificou-se que os aminoácidos 100-213 da Pex5p compreendem a região mínima da peroxina capaz de interagir com o domínio SH3 da Pex13p [204]. Esta região contém 3 repetições diaromáticas, o que sugere que também neste organismo os motivos diaromáticos estão envolvidos na interacção entre a Pex5p e a Pex13p. Curiosamente, quando se utilizaram peroxinas de mamífero, mais concretamente, de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) verificou-se que a região N-terminal da Pex13p interage com os motivos diaromáticos 2-4 (aminoácidos 140-243) da Pex5p, não tendo sido detectada nenhuma interacção entre o domínio SH3 da Pex13p e a Pex5p [185]. Experiências realizadas no âmbito desta tese revelaram resultados diferentes, tal como descrito no capítulo 4.1.1.2. Foi demonstrado que quando em complexo com a prot-PTS1, a Pex5p possui menor afinidade para a Pex13p do que na ausência de prot-PTS1 [185, 204]. Estas observações levantam a hipótese de a libertação da prot-PTS1 da Pex5p ocorrer antes da interacção com a Pex13p.

Recentemente verificou-se que em células CHO a Pex5p interage com a Pex1p e com a Pex6p, mas essa interacção é fraca e/ou transiente [145]. Também em *S. cerevisiae* esta interacção foi descrita, tendo sido observada a existência de um complexo membranar contendo a Pex5p, Pex1p e Pex6p [144].

A Pex5p de mamíferos apresenta duas isoformas, uma mais curta, Pex5pS, e uma mais longa, Pex5pL. Enquanto que a Pex5pS medeia apenas a importação de proteínas contendo PTS1, a Pex5pL é necessária para a importação de proteínas contendo PTS1 ou PTS2 [209, 221]. A diferença entre estas duas formas resulta de um processo de *splicing* alternativo, através do qual o transcrito do gene PEX5 pode apresentar ou não o exão 7. Se houver manutenção do exão 7 no transcrito, a proteína resultante (Pex5pL) apresenta 37 aminoácidos adicionais, quando comparada com a Pex5pS [193, 209]. A Pex5p interage com a Pex7p. No entanto, essa interacção apenas está descrita para plantas e mamíferos [193, 209-212], sendo que em mamíferos o local de interacção na Pex5p envolve parte dos 37 aminoácidos adicionais que a Pex5pL possui [193, 209-211].

O facto de a importação de proteínas contendo PTS1 e de proteínas contendo PTS2 convergirem ao nível da Pex5p, e os locais de interacção na Pex5p para PTS1 e Pex7p estarem localizados em regiões distintas da peroxina explicam porque é que algumas mutações nos TPRs apenas afectam a importação de proteínas com PTS1, enquanto que mutações que diminuem marcadamente os níveis de mRNA PEX5 afectam os dois tipos de importação [182, 209]. É de realçar que parte da região mapeada como necessária para a interacção entre a Pex5p e a Pex7p (aminoácidos 209-229) tem

homologia com sequências de outras peroxinas de diferentes espécies, que tal como a Pex5p possuem várias repetições pentapeptídicas diaromáticas na região N-terminal [222], nomeadamente a Pex18p e a Pex21p de *S. cerevisiae* e Pex20p de *Y. lipolytica* e *N. crassa* [210, 222]. Esta observação sugere que o gene de mamíferos PEX5 evoluiu de forma que a proteína por ele codificado desempenhe a função que é desempenhada por duas ou três peroxinas de fungos [5, 210, 222]. Em concordância com esta hipótese está o facto de um mutante duplo de *S. cerevisiae* *pex18Δ/pex21Δ* ser parcialmente complementado pela expressão de Pex20p de *Y. lipolytica* [222]. Além disso, recentemente verificou-se que uma proteína quimérica constituída pela região N-terminal da Pex18p e pela região C-terminal da Pex5p, possui a capacidade de manter a importação de proteínas contendo PTS1, substituindo funcionalmente a Pex5p [223].

A Pex5p é ubiquitilada *in vivo* num processo que requer as peroxinas RING (Pex2p, Pex10p e Pex12p; ver capítulo 1.3.3.4.5), sendo que pode ser poliubiquitilada ou monoubiquitilada [224-226]. A forma ubiquitilada da Pex5p comporta-se como uma proteína intrínseca de membrana, resistindo a extracções com carbonato a pH 11,5 [144]. Normalmente a poliubiquitilação de proteínas funciona como um sinal de degradação, enquanto que a monoubiquitilação pode funcionar como um sinal de endereçamento [227]. Por exemplo, se as proteínas p53 e Rad18 forem poliubiquitiladas, são endereçadas para o proteossoma. No entanto, se forem monoubiquitiladas são exportadas do núcleo [228, 229]. Da mesma forma, verificou-se que apesar da Pex5p poder ser poliubiquitilada, esta modificação parece estar envolvida num processo de controlo de qualidade, marcando a peroxina para degradação, em vez de estar envolvida no processo de transporte de proteínas para a matriz peroxissomal [144, 224, 225]. Em *S. cerevisiae*, mutações nos genes PEX1, PEX4, PEX6 e PEX22 conduzem a uma poliubiquitilação da Pex5p e acumulação da mesma na membrana do peroxissoma [144, 224, 226], enquanto que mutações em componentes do proteossoma provocam uma localização citosólica da peroxina modificada [144]. Verificou-se também que a utilização de MG123, um inibidor do proteossoma, aumenta a estabilidade da Pex5p *in vivo* [230] e *in vitro* [144]. Estas observações apoiam a hipótese de a poliubiquitilação da Pex5p estar envolvida na degradação da peroxina, num processo que requer as peroxinas AAA (Pex1p e Pex6p; ver capítulo 1.3.3.4.6) para remoção da Pex5p poliubiquitilada da membrana peroxissomal. A monoubiquitilação da Pex5p é dependente da presença dos factores de acoplagem e das peroxinas RING na sua forma funcional [225], o que sugere que este processo não está associado à degradação do receptor, mas que poderá fazer parte do ciclo da Pex5p durante a importação de proteínas matriciais [231]. Alguns autores sugerem que a monoubiquitilação poderá funcionar como um sinal de exportação [232]. No entanto, é de realçar que ao contrário do que acontece em leveduras, em

mamíferos ainda não se verificou a existência de Pex5p ubiquitilada, pelo que a relevância desse processo em mamíferos permanece por esclarecer.

Recentemente foi observado que *in vitro* a Pex5p possui a capacidade de interagir com membranas lipídicas [10]. Nesse trabalho verificou-se que na ausência de peroxissomas a Pex5p possui a capacidade de se associar não especificamente a membranas, tendo sido obtido o mesmo resultado com uma versão da Pex5p (W204A; W261A) incapaz de interagir com a Pex14p e a Pex13p. Foi observado também que a Pex5p humana ou de leveduras se insere espontaneamente em membranas fosfolipídicas *in vitro*, e uma fracção significativa da mesma adquire resistência à tripsina [10]. Foi proposto que a formação de um complexo estável entre a peroxina e os factores de acoplagem (ver capítulo 1.4) poderá contribuir para a associação específica da Pex5p com a membrana peroxissomal, pois a quantidade de Pex5p associada aos peroxissomas em células $\Delta pex13\Delta pex14$ é quase nula. Estas observações levaram os autores a sugerir que o poro transiente através do qual se dá a importação de proteína matriciais poderá ser formado pela Pex5p, ou pela Pex5p em complexo com a Pex14p [10]. Neste modelo o poro formado pode apresentar tamanhos variáveis, permitindo a passagem de moléculas de diferentes dimensões.

1.3.3.4.2- Pex7p

A Pex7p é uma proteína pertencente à família das proteínas com repetições WD que reconhece as proteínas possuidoras de PTS2 [233-235]. Esta peroxina possui 6 repetições WD, com cerca de 40 aminoácidos de comprimento cada (WD40), abrangendo quase a totalidade da proteína, com excepção dos 60 aminoácidos N-terminais [153]. Em humanos, deficiências na Pex7p estão na origem de uma DBP letal, a condrodysplasia rizomélica punctata [236-238], bem como de alguns casos da doença infantil de Refsum [239].

A Pex7p é uma proteína hidrofílica, solúvel e sem domínios transmembranares [127, 240]. Tal como acontece para a Pex5p, a localização subcelular da Pex7p é dupla, apresentando uma fracção citosólica e uma fracção associada ao peroxissoma [21, 153].

A Pex7p é indispensável para a importação de proteínas contendo PTS2, sendo que já foi demonstrada a interacção directa entre o nonapéptido PTS2 e a Pex7p através de várias metodologias, nomeadamente, cromatografia de afinidade, co-imunoprecipitação e *two hybrid system* [233, 234, 241]. Após formação no citosol, o complexo [Pex7p-proteína contendo PTS2] é endereçado para a membrana do

peroxissoma. No entanto, a forma de actuação da Pex7p parece variar de acordo com o organismo em causa. Em mamíferos e em plantas requer a presença de Pex5p [193, 209, 211, 242]. Em eucariotas inferiores é necessária a acção de outras peroxinas, nomeadamente, as peroxinas redundantes Pex18p/Pex21p em *S. cerevisiae* [243] e a Pex20p em *N. crassa*, em *Y. lipolytica*, em *H. polymorpha* e em *P. pastoris* [244-247]. Foi proposto que o papel da Pex5p na importação de proteínas contendo PTS2 em mamíferos e plantas se prende com o endereçamento do complexo [Pex7p-proteína contendo PTS2] para a membrana peroxissomal [193, 212]. No caso dos mamíferos, a acoplagem do complexo [Pex7p-proteína contendo PTS2] à membrana peroxissomal é mediado pela interacção Pex5p-Pex14p, enquanto que em leveduras ocorre uma interacção directa entre a Pex7p e a Pex14p [193, 198, 199, 202].

Recentemente foi demonstrado que a Pex7p viaja ciclicamente entre o citosol e os peroxissomas, sendo que é necessário que a peroxina possua a sua extremidade C-terminal livre para o processo de exportação [248].

1.3.3.4.3- Pex14p

A Pex14p é uma proteína homodimérica, com cerca de dois terços C-terminais voltados para o citosol [202, 203, 249, 250], enquanto que a localização da sua extremidade N-terminal está envolta em alguma ambiguidade. Verificou-se, em estudos de imunofluorescência, que a acessibilidade dos 134 aminoácidos N-terminais da Pex14p estava dependente das condições de solubilização, sendo que em condições em que a membrana peroxissomal não era solubilizada essa região não estava acessível [203]. Quando foram utilizadas formas recombinantes da Pex14p de rato e de *S. cerevisiae*, com um epítipo na sua extremidade N-terminal, verificou-se que esse epítipo não estava acessível aos anticorpos utilizados nesses trabalhos, estando, no entanto acessível para clivagem proteolítica [199, 202]. Utilizando peroxissomas de fígado de rato ou de murganho verificou-se que os primeiros 130 aminoácidos da Pex14p, que não são intrinsecamente resistentes à proteólise, são completamente resistentes a clivagem proteolítica, mesmo quando a protease tem acesso à face lumenal da membrana peroxissomal [250]. Portanto, existem dados que suportam que a região N-terminal está voltada para o citosol ou está embebida na membrana do peroxissoma. Recentemente foi identificado um novo GC das DBP, que relacionam defeitos no gene PEX14 com o síndrome de Zellweger [43].

Em fígado de rato, a Pex14p corresponde a cerca de 0,25% da proteína peroxissomal total [216]. Esta proteína comporta-se como uma proteína intrínseca de membrana, não sendo extraível da membrana peroxissomal através de sonicação dos organelos na presença de soluções com diferentes forças iónicas, ou através da incubação dos organelos a pH 11,5 [198-200, 203, 249, 251-253]. No entanto, em *S. cerevisiae* verificou-se que pelo menos parte da proteína é extraída da membrana peroxissomal após tratamento alcalino dos organelos [198, 199, 254]. Em *L. donovani* a Pex14p parece ser uma proteína solúvel, que se associa periféricamente com a membrana glicossomal [253].

Em termos estruturais, esta peroxina possui um domínio transmembranar de 16 aminoácidos e um motivo *coiled-coil* putativo localizado na região C-terminal [250]. Em *S. cerevisiae* foi descrito um motivo padrão de ligação tipo II rico em prolinas, P-X-X-P, localizado na região N-terminal [255].

No caso dos mamíferos a interacção entre moléculas de Pex14p é mediada pelo motivo *coiled-coil* [250, 256], sendo que o domínio transmembranar também parece estar envolvido nessa interacção [257].

O motivo P-X-X-P é o local de interacção da peroxina com o domínio SH3 da Pex13p [206, 219, 220, 255, 258], afirmação corroborada pelo facto de que a substituição das duas prolinas por alaninas abolir a interacção entre as duas peroxinas [255]. Foi descrito um segundo local de interacção entre a Pex14p e a Pex13p, localizado na região luminal da Pex13p [259]. Este segundo local pode explicar o facto de, em *S. cerevisiae*, após mutação das prolinas do domínio P-X-X-P e consequente efeito na interacção entre o domínio SH3 da Pex13p e a Pex14p, as células ainda serem capazes de crescer em ácido oleico como única fonte de carbono [255]. Em mamíferos a interacção entre a Pex14p e a Pex13p também está documentada, sendo que neste caso não envolve o domínio P-X-X-P, que está ausente nestes organismos, mas sim outra região N-terminal da Pex14p [185, 257, 260].

A Pex14p interacciona com os receptores das proteínas matriciais, Pex5p e Pex7p, existindo alguma controvérsia quanto aos locais de ligação envolvidos na interacção com a Pex5p. Em *S. cerevisiae* estão descritos dois locais de interacção, um na região N-terminal, e outro na região C-terminal (contido entre os aminoácidos 250-308), que se sobrepõe ao local de interacção com a Pex7p [254], enquanto que em humanos apenas está descrito um local de interacção, envolvendo os 78 aminoácidos N-terminais, região esta extremamente conservada entre diferentes espécies [201, 257]. Essa região contém o domínio F-L-X₁₅-F-L-X₂-K-G-L-T-X₂-E-I-T, que está igualmente descrita como necessária para a interacção da Pex14p com a Pex5p em *S. cerevisiae*, *L. donovani* e *T. brucei* [217, 218, 254]. Tal como acontece para a Pex5p, a Pex14p está envolvida na

acoplagem da Pex7p à membrana peroxissomal. Na ausência de Pex14p, o grau de associação de Pex5p e Pex7p à membrana peroxissomal encontra-se diminuído, o que compromete a importação de proteínas contendo PTS1 ou PTS2, que ficam retidas no citosol [43, 193, 198-202, 207, 214, 251, 261]. Quando se sobreexpressa a Pex14p, a quantidade de Pex5p associada à membrana peroxissomal encontra-se aumentada, e a importação de proteínas contendo PTS1 encontra-se inibida [193, 207, 251], o que corrobora o envolvimento da Pex14p nesse processo. No entanto, quando a sobreexpressão de Pex14p é acompanhada por uma sobreexpressão de Pex13p, o efeito inibitório na importação de proteínas com PTS1 já não se verifica, o que sugere que a formação de um complexo entre as duas peroxinas é indispensável para o processo [207].

Recentemente foi determinado que a sequência mínima de Pex14p necessária para restaurar a capacidade de importação de proteínas contendo PTS1 ou PTS2, em células CHO *pex14*, compreende a região de interacção com a Pex5p, o domínio transmembranar putativo e o domínio *coiled-coil*. Foi determinado que essa região abrangia os aminoácidos 21-200 [257]. Esta observação sugere que a oligomerização da Pex14p é indispensável para o correcto funcionamento da peroxina.

1.3.3.4.4- Pex13p

A Pex13p é uma peroxina intrínseca de membrana, não sendo extraível dos peroxissomas através do tratamento dos organelos com soluções de elevada concentração salina ou pH elevado [50, 205, 208]. Foi inicialmente identificada em *S. cerevisiae* e em *P. pastoris*, onde se verificou que a ausência do gene PEX13 provocava um impedimento do crescimento dessas células em ácido oleico ou metanol como única fonte de carbono [262, 263]. Verificou-se também que, nessa situação, a importação de catalase para os peroxissomas estava afectada.

A Pex13p é caracterizada pela presença de dois domínios transmembranares e de um domínio SH3 localizado na região C-terminal, e exposto no citosol [55]. Os domínios SH3 são normalmente compostos por 60 aminoácidos, e encontram-se presentes em diversas proteínas, mediando normalmente interacções entre proteínas envolvidas em diversos processos celulares, tais como organização do citoesqueleto, cascatas de transdução de sinal e endereçamento de proteínas [50, 205, 208, 264-267]. A estrutura tridimensional do domínio SH3 da Pex13p de *S. cerevisiae* foi resolvida através de cristalografia de raios-X e NMR, tendo sido observado que a mesma

apresenta as características estruturais dos domínios SH3 [219, 220]. Foi demonstrado que o domínio SH3 da Pex13p é essencial para o correcto funcionamento da peroxina, pois a deleção desse domínio resulta num fenótipo idêntico ao obtido por *knockout* do gene inteiro [205].

A Pex13p interacciona com a Pex14p através do domínio SH3, e com os receptores das proteínas matriciais do peroxissoma, Pex5p e Pex7p [185, 205, 255, 261]. Mutações em dois aminoácidos do domínio SH3 abolem a interacção entre esse domínio da Pex13p e a Pex14p, não afectando, no entanto a interacção entre a Pex13p e a Pex5p [207, 255]. Estudos de mutagenese aleatória levaram à identificação de algumas substituições de aminoácidos no domínio SH3 que abolem a interacção com a Pex5p mas que não têm qualquer efeito na interacção com a Pex14p [206]. Estas observações, juntamente com o facto de que, *in vitro*, o domínio SH3 interacciona simultaneamente com um péptido proveniente da Pex5p e com outro proveniente da Pex14p [206], sugerem que os locais de ligação para as duas peroxinas no domínio SH3 são distintos.

Tal como acontece para a Pex14p, a importação de proteínas contendo PTS1 ou PTS2 está comprometida na ausência de Pex13p. No entanto, a função da Pex13p na biogénese dos peroxissomas permanece por esclarecer, sendo que várias funções já lhe têm sido atribuídas, desde factor de acoplagem da Pex5p à membrana peroxissomal, até factor envolvido na libertação das prot-PTS1 da Pex5p e/ou na reciclagem do receptor para o citosol.

1.3.3.4.5- Pex2p, Pex10p e Pex12p

As peroxinas Pex2p, Pex10p e Pex12p são proteínas intrínsecas da membrana do peroxissoma, com dois domínios transmembranares, caracterizadas pela existência de um domínio RING (*really interesting new gene*) localizado na sua região C-terminal e exposto no citosol [268-279]. Esse domínio RING medeia interacções proteína-proteína envolvendo a Pex2p, Pex10p e Pex12p, nomeadamente, a interacção da Pex10p com a Pex12p, bem como a interacção das mesmas com a Pex5p [52, 196, 197, 280]. Os domínios RING ligam zinco através de cisteínas e histidinas conservadas. No entanto, essa capacidade de ligação de zinco apenas foi identificada na Pex10p [270]. Esta observação pode explicar porque é que estudos de importação *in vitro* revelaram que a importação de proteínas contendo PTS1 para peroxissomas de mamíferos ou de plantas é estimulada por zinco [281, 282].

Recentemente verificou-se que a importação da Pex5p *in vitro* é dependente da presença das peroxinas RING [145]. Pensa-se que estas peroxinas actuam após o

processo de acoplagem da Pex5p com a membrana peroxissomal, no processo de translocação e/ou reciclagem do receptor para o citosol, pois células humanas ou de leveduras que não possuem Pex2p, Pex10p ou Pex12p registam uma manutenção dos níveis normais ou mesmo uma acumulação de Pex5p nos peroxissomas [269-273, 275, 276, 283, 284].

1.3.3.4.6- Pex1p e Pex6p

A Pex1p e a Pex6p são as únicas peroxinas conhecidas que possuem uma capacidade de ATPase [285, 286]. Pertencem à família AAA (ATPase associada a diversas actividades celulares), designação atribuída após identificação da Pex1p [285]. A família AAA é caracterizada pela presença de um ou dois domínios de 200-250 aminoácidos extremamente conservados, responsáveis pela ligação ao ATP e consequente actividade de ATPase [231]. Esta família de proteínas é composta por uma grande quantidade de membros, bem como por uma grande heterogeneidade de funções dos mesmos, tais como degradação de proteínas, replicação de DNA, transporte mediado por vesículas, movimento dos microtúbulos e desmontagem de complexos proteicos associados a membranas (factor sensível à N-etilmaleimida, NSF, por exemplo) [287-289]. Estruturalmente, ambas as peroxinas (Pex1p e Pex6p) possuem dois domínios AAA na sua região C-terminal, sendo que o segundo domínio se encontra melhor conservado evolutivamente [231].

Mutações nos genes que codificam a Pex1p ou a Pex6p são a causa mais frequente de DBP [290], sendo responsáveis, juntamente com as mutações no gene PEX26 por cerca de 85% dos casos de síndrome de Zellweger existentes [39]. A ausência de qualquer uma das peroxinas AAA leva ao aparecimento de *peroxisomal ghosts* [291], estando a maioria das proteínas matriciais erradamente localizada no citosol [285, 286, 292].

A Pex1p e a Pex6p interactuam uma com a outra num processo dependente de ATP, sendo que essa interacção é importante para o correcto desempenho das suas funções [285, 293-299]. No entanto, a composição exacta deste complexo proteico ainda permanece por caracterizar.

Verificou-se que a Pex6p interactua com a Pex26p em mamíferos [307] e com a Pex15p em *S. cerevisiae* [308], sendo que essas peroxinas funcionam como uma âncora membranar para as peroxinas AAA. Além desta interacção, a Pex1p e a Pex6p também interactuam com outras peroxinas, nomeadamente Pex5p, Pex10p e Pex12p, em *S.*

cerevisiae [42]. Recentemente verificou-se que a Pex1p e a Pex6p formam um complexo de elevado peso molecular no citosol, complexo esse que contém Pex5p [309].

As funções da Pex1p e da Pex6p não são redundantes, pois a sobreexpressão de uma não substitui funcionalmente a outra [144]. No entanto, a atribuição de uma função concreta para estas peroxinas tem gerado bastante controvérsia na área, havendo autores a propor funções moleculares muito distintas para as peroxinas. Como a Pex1p e a Pex6p são as únicas peroxinas conhecidas com uma actividade de ATPase, e como o processo de importação de proteínas matriciais requer hidrólise de ATP, essas proteínas tornam-se os candidatos mais prováveis para executar os passos que requerem hidrólise de ATP nesse processo [139, 300-303]. Por outro lado, há autores que relacionam estas peroxinas com a maturação e crescimento dos peroxissomas em *Y. lipolytica*, nomeadamente em processos de fusão de pequenas vesículas peroxissomais [155, 304, 305]. Esta hipótese baseia-se no facto de as ATPases que compõem os complexos NSF/Sec18p e p97/Cdc48p, que estão envolvidos em processos de fusão membranar, apresentarem semelhanças estruturais com a Pex1p e com a Pex6p [293]. Há ainda autores que sugerem que as peroxinas AAA estão envolvidas no processo de separação da Pex5p da proteína que transporta, imediatamente antes da importação (ver capítulo 1.5 e [42]), havendo outros que as envolvem no processo de transporte de lípidos para o peroxissoma [306]. Recentemente foi sugerido que a Pex1p e a Pex6p são dispensáveis para a importação da Pex5p para os peroxissomas, mas estão envolvidas na exportação da Pex5p da membrana peroxissomal para o citosol, sendo que este processo ocorre quer para a forma não modificada, quer para a forma ubiquitilada da Pex5p e é dependente de ATP [144, 145].

1.4- Modelo de importação de proteínas contendo PTS1 para a matriz do peroxissoma

Apesar da grande controvérsia que existe quanto a alguns aspectos relativos a algumas das peroxinas envolvidas na importação de proteínas contendo PTS1 para a matriz do peroxissoma, pode-se definir um modelo geral para o processo. É de salientar que alguma da controvérsia referida pode estar relacionada com vários factores, tais como: limitações e artefactos de vários métodos utilizados em alguns trabalhos; alterações num gene que codifica determinada peroxina podem ter implicações em outros componentes da maquinaria de importação; redundância de funções entre algumas

peroxinas, o que pode mascarar a importância de determinada peroxina numa determinada função.

O importómero está definido como sendo um complexo existente na membrana do peroxissoma, composto por dois subcomplexos distintos, o subcomplexo de acoplagem e o subcomplexo RING, ligados entre si através da Pex8p [215, 310]. O subcomplexo de acoplagem é formado pela Pex14p e Pex13p (e Pex17p em leveduras), e o subcomplexo RING é formado pela Pex2p, Pex10p e Pex12p. O importómero está envolvido na importação de proteínas para a matriz do peroxissoma, mas não na importação de PMPs. Vários trabalhos foram publicados que revelaram que, de facto, existem peroxinas dos supostos subcomplexos referidos que se encontram em associação umas com as outras. Em peroxissomas de fígado de rato foram isolados complexos contendo Pex2p, Pex12p, bem como Pex5p, Pex14p e quantidades não estequiométricas de Pex13p [216]. Em *S. cerevisiae*, experiências de coimunoprecipitação revelaram a existência de complexos contendo Pex12p, Pex10p, Pex5p, Pex14p e Pex13p [311]. No entanto, a existência dos dois subcomplexos distintos nunca foi demonstrada experimentalmente, tendo sido proposta apenas teoricamente. O que na realidade parece existir, de acordo com os resultados apresentados neste parágrafo, é um complexo membranar grande e extremamente transiente composto por várias peroxinas distintas, e que está envolvido no processo de importação de proteínas para a matriz peroxissomal, e não dois subcomplexos distintos.

A Figura 3 ilustra o modelo de importação de proteínas para a matriz peroxissomal mediado pela Pex5p em mamíferos. Resumidamente esse processo tem início no citosol, onde a Pex5p recruta as prot-PTS1, através da interacção do PTS1 com o domínio TPR da peroxina. Seguidamente o complexo [Pex5p-prot-PTS1] interacciona com o complexo de importação, presente na membrana peroxissomal [312]. Posteriormente ocorre a translocação do complexo [Pex5p-prot-PTS1] através da membrana do peroxissoma, ficando a Pex5p embebida nessa membrana, e com a região C-terminal voltada para a matriz do peroxissoma [145, 172]. Após a translocação, a Pex5p liberta a prot-PTS1 para o interior do organelo, e é exportada para o citosol, num processo dependente de ATP [143-145]. Essa dependência coloca a Pex1p e a Pex6p como os principais candidatos envolvidos na exportação da Pex5p do peroxissoma para o citosol. Uma vez no citosol, a Pex5p inicia novos ciclos de importação.

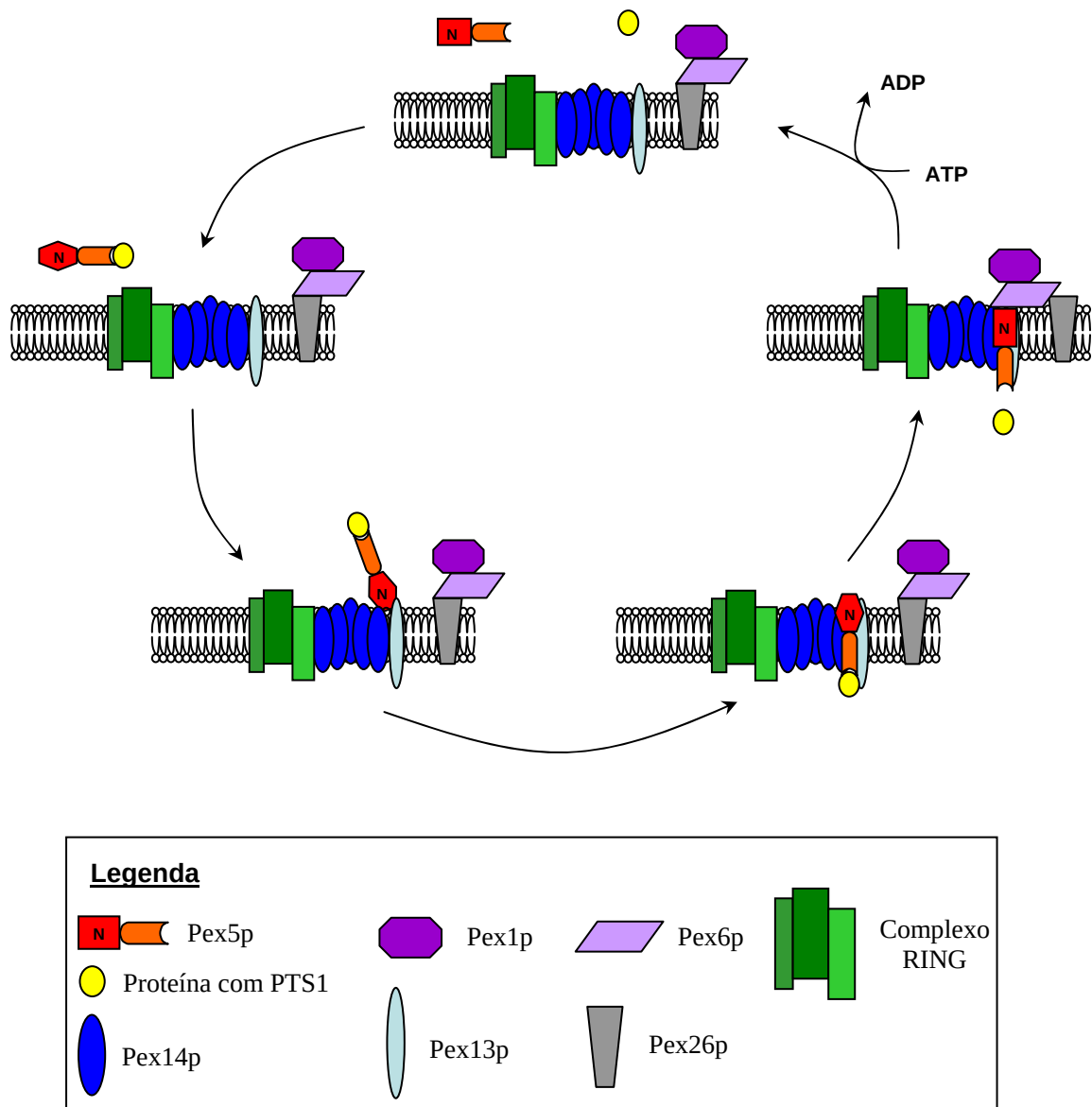


Figura 3 – Modelo de actuação da Pex5p na importação de proteínas com PTS1 para a matriz do peroxissoma em mamíferos.

1.5- Modelo do pré-íplex

Vários trabalhos foram publicados acerca do estado oligomérico da Pex5p, e da sua relevância fisiológica. Na levedura metilotrófica *H. polymorpha* foi sugerido, com base em estudos de análise de fluorescência, que a Pex5p apresenta diferentes estados oligoméricos, controlados pelo pH [191, 313]. Nesses trabalhos os autores afirmaram que a pH 6,0 a Pex5p se encontra predominantemente sob a forma monomérica, enquanto que a pH neutro se encontra em tetrâmeros. Foi ainda sugerido que a Pex5p desse organismo possui uma afinidade maior para o PTS1 a pH neutro do que a pH 6,0 [191,

313]. Além disso, foi sugerido que a adição de Pex8p a uma solução de Pex5p tetramérica ligada a PTS1, promove a dissociação dos tetrâmeros, com consequente libertação de PTS1 e formação de heterodímeros Pex5p-Pex8p [191].

Num estudo efectuado com a Pex5p humana, também se verificou que a peroxina aparenta existir na forma oligomérica [201]. Após cromatografia de filtração em gel verificou-se que a Pex5pL e a Pex5pS aparentam possuir uma massa de 270kDa, o que sugere que as peroxinas se encontram na forma tetramérica. No entanto, a região C-terminal da Pex5p não aparenta oligomerizar em cromatografia de filtração em gel. Além disso, a visualização da Pex5p em microscopia electrónica (coloração negativa), bem como de uma forma da Pex5p que contém apenas os 251 aminoácidos N-terminais, sugeriu a existência de estruturas quadrangulares, com uma cavidade central e que aparentavam ser formadas por quatro subunidades. Noutro trabalho envolvendo a Pex5pL humana recombinante, com um *tag* de 6 histidinas na extremidade N-terminal, foi determinado que 50% da peroxina presente na preparação se apresentava sob a forma tetramérica [189]. Nesse estudo a técnica utilizada foi novamente a cromatografia de filtração em gel, tendo sido estimada uma massa molecular para a Pex5p de cerca de 300kDa. É de salientar que a restante proteína da preparação de Pex5p apareceu no *void volume*, o que levou os autores a sugerir que essa população provavelmente representava agregados de Pex5p.

Em *L. donovani* a Pex5p também aparenta ser uma proteína tetramérica, sendo que essa oligomerização é dependente de domínios localizados na região N-terminal da peroxina, que compreende os aminoácidos 1-391 [314]. Quando foi analisado o comportamento da Pex5p de *L. donovani* e de vários fragmentos da peroxina por cromatografia de filtração em gel [192] verificou-se que: a Pex5p se comportava como tetramérica; um fragmento contendo os aminoácidos 1-202 da Pex5p aparentava ser hexamérico; e dois fragmentos da Pex5p contendo os aminoácidos 203-391 ou os aminoácidos 290-391, bem como uma versão da Pex5p sem os aminoácidos 269-291 se comportavam como proteínas diméricas. Nesse trabalho foi proposto que a região que contém os aminoácidos 1-391 é importante não só para estabilizar a estrutura tetramérica da Pex5p mas também para modular a estrutura quaternária da peroxina após ligação ao PTS1. Foi sugerido que a ligação de PTS1 à Pex5p promove a dissociação da forma tetramérica da peroxina para uma forma dimérica [192]. Ao contrário do que acontece para as restantes Pex5p conhecidas, a Pex5p de *L. donovani* possui dois domínios *coiled-coil* putativos, entre os aminoácidos 59-91 e 277-310 [192]. No entanto, o primeiro desses domínios é rico em resíduos de glutamina e de alanina, fugindo ao padrão clássico conhecido para os domínios *coiled-coil*.

Como a maquinaria de importação de proteínas matriciais permite a importação de proteínas oligoméricas, e sabendo que no caso de homooligómeros cada subunidade terá um sinal de endereçamento independente, foi proposto um modelo de importação proteica baseado nestas observações. Esse modelo, designado por “modelo do pré-implex” [42] (Figura 4) defende que cada Pex5p oligomérica liga vários PTS1, e como a maioria das proteínas contendo PTS1 são oligoméricas, cada uma delas liga uma Pex5p, criando um complexo muito grande formado por ligações mutuamente multivalentes entre as proteínas com PTS1 e a Pex5p. Esses complexos foram designados por “pré-implexes” (do inglês *pre-import complexes*) [42]. Foi proposto que a formação destes complexos é controlada principalmente por dois parâmetros, a concentração das proteínas e a afinidade entre elas. As enzimas oligoméricas que possuem uma afinidade elevada para a Pex5p e uma cinética de oligomerização lenta entram no pré-implex sob a forma monomérica, enquanto que as enzimas com pouca afinidade para a Pex5p e com uma cinética de oligomerização mais rápida entram no pré-implex na forma oligomérica. Além disso, as enzimas monoméricas também são englobadas no pré-implex desde que possuam um PTS1. Outra interação multivalente é a que envolve a Pex5p e a Pex14p, pois a primeira possui vários locais de ligação à segunda, que como é dimérica apresenta a capacidade de ligar duas moléculas de Pex5p. Esta interação contribui para a expansão dos pré-implexes, na medida em que pode interligar diferentes complexos [Pex5p-prot-PTS1]. Além disso, a interação entre as duas peroxinas também serve para promover a associação dos pré-implexes com a membrana peroxissomal, aumentando a concentração das proteínas a transportar na vizinhança dos peroxissomas.

Este modelo permite entender a importação de proteínas para a matriz do peroxissoma numa perspectiva que minimiza a difusão das moléculas pela célula, aumentando a rapidez e a especificidade do processo, recorrendo apenas à energia das interações proteína-proteína.

Uma vez no interior do peroxissoma, as enzimas com PTS1 não se encontram em pré-implexes, o que significa que esses complexos devem ser desfeitos antes ou durante o processo de translocação. As peroxinas AAA (Pex1p e Pex6p) são potenciais candidatos a desempenhar essa função, uma vez que são conhecidos exemplos de ATPases AAA envolvidas na desmontagem de complexos proteicos [315, 316]. Além disso, estas peroxinas também estão implicadas no processo de importação de proteínas para a matriz do peroxissoma [52].

Foi proposto que a desmontagem dos pré-implexes está associada à translocação das enzimas para a matriz peroxissomal, num processo mediado pela Pex1p e pela Pex6p. Este modelo permite justificar algumas particularidades da importação proteica para o peroxissoma: necessidade de ATP, transporte rápido e específico de proteínas

para a matriz, importação de proteínas no seu estado nativo/oligomérico e o envolvimento das peroxinas AAA no processo.

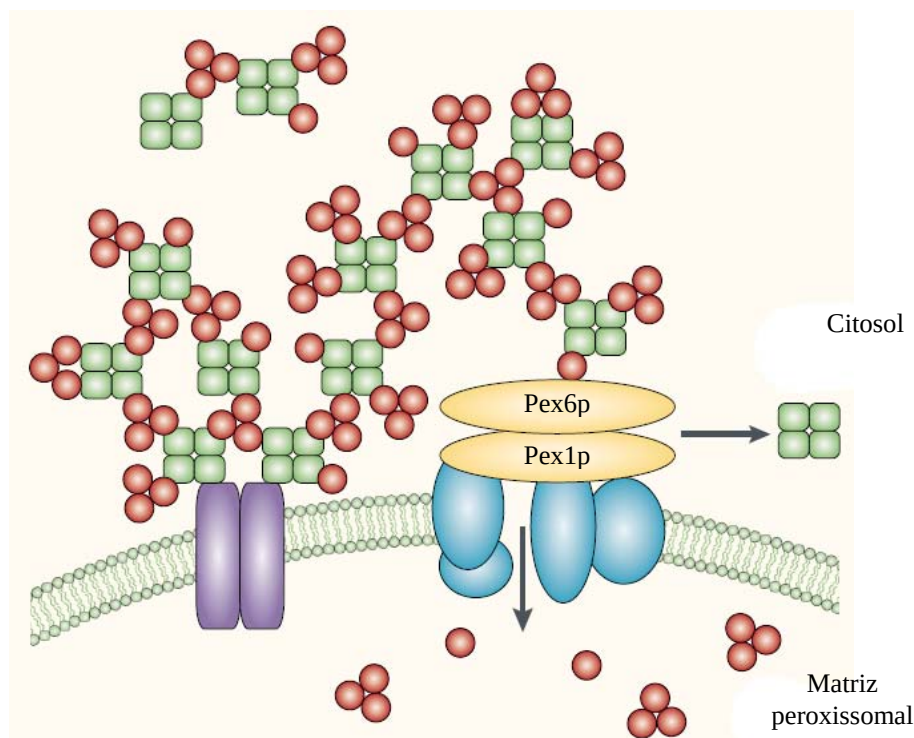


Figura 4 – Representação esquemática do “modelo do pré-íplex” (adaptado de [42]).

A Pex5p tetramérica (verde) liga proteínas oligoméricas com PTS1 (vermelho) no citosol. Os complexos formados (pré-íplexes) associam-se à membrana do peroxissoma através da interacção da Pex5p com a Pex14p (roxo). A Pex1p e a Pex6p promovem a desmontagem dos pré-íplexes, permitindo a translocação das proteínas com PTS1 para a matriz do peroxissoma e reciclando a Pex5p para o citosol.

No entanto, é de realçar que o único fundamento experimental por detrás do “modelo do pré-íplex” se prende com a suposta capacidade da Pex5p oligomerizar. No decorrer do trabalho experimental efectuado no âmbito desta tese verificou-se que essa capacidade é artefactual (ver capítulo 4.1.2). De facto, todas as evidências experimentais que sugeriam que a Pex5p é uma proteína oligomérica foram obtidas recorrendo a técnicas que se baseiam ou no raio de Stokes ou no coeficiente de difusão da proteína. Estas duas grandezas são relacionáveis uma com a outra, e apenas são úteis para estimar o estado oligomérico de uma proteína se a mesma apresentar uma forma globular, o que não é o caso, tal como demonstrado no capítulo 4.1.2. Ou seja, é muito provável que o “modelo do pré-íplex” não traduza o modo de actuação da Pex5p em condições fisiológicas, uma vez que as bases experimentais por detrás desse modelo são, no mínimo, muito questionáveis.

2- OBJETIVOS

2- OBJECTIVOS

A Pex5p é uma peroxina que está envolvida na importação de proteínas para a matriz do peroxissoma. Apesar de se acreditar que esta proteína funciona como um receptor cíclico, que reconhece e capta as proteínas no citosol e as endereça para o peroxissoma, o mecanismo deste processo encontra-se ainda, de uma forma geral, mal caracterizado.

Um dos aspectos fulcrais para a compreensão do mecanismo de actuação da Pex5p prende-se com a caracterização de interacções que envolvam a Pex5p e outras peroxinas. Desta forma, tentou-se desenvolver um método simples de detecção de interacções proteína-proteína, com base na elevada susceptibilidade da Pex5p à acção de proteases.

No entanto, e devido aos vários trabalhos publicados que sugeriam que a Pex5p era tetramérica, tornou-se essencial determinar se, de facto, esta peroxina se encontrava num estado oligomérico, de forma a ser possível interpretar os dados obtidos no ensaio de proteólise parcial desenvolvido. Uma vez que os resultados que sugeriam que a Pex5p era tetramérica se baseavam apenas numa metodologia, tentou-se desenvolver uma abordagem que permitisse determinar a massa molecular da peroxina recorrendo a várias técnicas distintas.

Um segundo objectivo deste trabalho envolveu uma caracterização funcional da Pex5p. Apesar de se saber que na região N-terminal da Pex5p que se encontra a maioria dos locais de ligação a outras peroxinas, quase não existe informação acerca da função dos 117 aminoácidos N-terminais da Pex5p. Assim, procurou-se atribuir uma função para essa região da peroxina, recorrendo a truncagens N-terminais e a um sistema de importação *in vitro* que permite monitorizar o comportamento da Pex5p.

Finalmente, e uma vez que o processo de exportação da Pex5p para o citosol se encontra ainda mal caracterizado, tentou-se efectuar um estudo cinético desse processo, de forma a contribuir para uma melhor compreensão do mesmo.

3- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- Oligonucleótidos utilizados

Primer	Sequência
fPex5p Δ N17	5'-GAGCCACCATGAAGCTCGCCGGGCACT-3'
fPex5p Δ N110	5'-GACCCACCATGGACTTGGCCTTGTCTGAGAACTGG-3'
rPex5p	5'-GAGACTGTCACTGGGGCAGGCCAAACATAG-3'
fT7prom	5'-GAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCACCATG-3'
fPex5p Δ N204	5'-CCGGCATGCGCAATGCGGGAGCTGGTGG-3'
rPex5p-2	5'-GCGGTCGACTCACTGGGGCAGGCCAAACATA-3'
fPex5pHis	5'-CCGGCATGCGCAATGCGGGAGCTGGTGG-3'
rPex5pHis	5'-GCGGTCGACTCACTGGGGCAGGCCAAACAT-3'

Tabela 1 – Oligonucleótidos utilizados nas reacções de PCR.

3.2- Produção dos cDNAs utilizados nas reacções de síntese proteica *in vitro*

Todos os cDNAs obtidos, quer por clonagem, quer por PCR de expressão, possuíam um promotor T7 a montante da sequência codificante.

Para a obtenção dos cDNAs das versões da Pex5p truncadas na extremidade N-terminal, Δ N17-Pex5p e Δ N110-Pex5p, compreendendo os aminoácidos 17-639 e 110-639, respectivamente, o plasmídeo pGEM4-Pex5p [172] foi submetido a um PCR de expressão [317]. Nesse processo o plasmídeo foi utilizado como molde para uma primeira reacção de PCR, na qual foram utilizados os oligonucleótidos fPex5p Δ N17 e rPex5p, para se obter o cDNA codificante da Δ N17-Pex5p, e fPex5p Δ N110 e rPex5p para se obter o cDNA codificante da Δ N110-Pex5p. Posteriormente os dois cDNAs foram submetidos a uma nova reacção de PCR, utilizando os oligonucleótidos fT7prom e rPex5p, de forma a introduzir a sequência do promotor da RNA polimerase T7 a montante da sequência codificante.

Para a obtenção do cDNA da versão da Pex5p truncada na região N-terminal, compreendendo os aminoácidos 204-639, Δ N204-Pex5p, o plasmídeo pGEM4-Pex5p

[172] foi submetido a uma reacção de PCR com os oligonucleótidos fPex5p Δ N204 e rPex5p-2. O fragmento de DNA obtido foi inserido no vector pGEM®-T Easy de acordo com as instruções do fabricante (Promega). O plasmídeo obtido foi digerido com *Sall*, e a inserção foi clonada no local de restrição *Sall* do vector pGEM-4 (Promega).

Para a produção do cDNA da versão da Pex5p truncada na extremidade C-terminal, que compreende os aminoácidos 1-324, Δ C1-Pex5p, o procedimento efectuado foi o descrito em [318].

3.3- Síntese das proteínas marcadas radioativamente

Antes de se proceder à transcrição do RNA da Pex5pL e da Δ N204-Pex5p, os plasmídeos pGEM4-Pex5p [172] e pGEM4- Δ N204-Pex5p foram linearizados com *NheI*.

Todos os cDNAs foram submetidos a uma reacção de transcrição *in vitro* utilizando a polimerase T7 (Roche Applied Science). Posteriormente, o RNA obtido foi traduzido através do kit de tradução Retic Lysate IVT™ (Ambion), na presença de metionina marcada radioativamente, Redivue™ L-[³⁵S]methionine (actividade específica > 1000Ci/mmol), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4- Produção das proteínas recombinantes

As proteínas de fusão GST-LKS (proteína composta por uma molécula de GST com uma sequência PTS1 não funcional na sua extremidade C-terminal), GST-SKL (proteína composta por uma molécula de GST com uma sequência PTS1 funcional na sua extremidade C-terminal), GST, GST-Pex5p e GST-TPRs (proteína recombinante compreendendo os aminoácidos 312-639 da Pex5p com GST na extremidade N-terminal) foram obtidas como descrito em [172, 318]. A proteína de fusão (His)₆-SH3, correspondente aos aminoácidos 236-403 da Pex13p humana, com um *tag* de histidinas na região N-terminal, foi obtida como descrito em [200].

Para produção da proteína de fusão (His)₆-Pex5p, o plasmídeo pGEM4-Pex5p [172] foi utilizado como molde numa reacção de PCR, com os oligonucleótidos fPex5pHis e rPex5pHis. O fragmento obtido foi inserido no vector pGEM®-T Easy de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Posteriormente o vector resultante foi digerido com *SphI* e *Sall*, e a inserção foi clonada no plasmídeo pQE-30 (Qiagen), obtendo-se o vector pQE-Pex5p. A expressão da proteína foi efectuada na estirpe M15 de *Escherichia coli*,

utilizando 1mM IPTG para a indução. Após expressão, a proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade com HIS-Select™ (Sigma). A proteína obtida após três eluições com 50mM imidazole foi concentrada em concentradores Vivaspín 10000 MWCO PES (Vivascience).

3.5- Péptidos utilizados

Os péptidos utilizados, pep-SKL (CRYHLKPLQSKL) e pep-LKS (CRYHLKPLQLKS) foram sintetizados por Sigma Genosys e ressuspensos em água estéril desionizada e desgaseificada. O péptido YQSKL foi gentilmente oferecido pelo Dr. W. Nastainczyk da Universidade de Saarland (Alemanha).

3.6- Ensaio de proteólise parcial

Os ensaios de proteólise parcial foram efectuados num volume final de 50µL. A solução tampão utilizada era composta por 50mM Tris.HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA e 1mM DTT. Quando se utilizou a proteína recombinante, foram adicionadas 5µg de (His)₆-Pex5p a cada reacção. Quando se utilizou a Pex5p marcada radioactivamente, foi adicionado 1µL de lisado de reticulócito contendo a proteína radioactiva a cada reacção. A concentração utilizada de pep-SKL, pep-LKS, GST-SKL e GST-LKS foi de 2µM. A concentração de (His)₆-SH3 utilizada foi de 1,5µM.

As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 37°C, sendo depois submetidas a uma incubação com PK (0,5µg/mL para as reacções com a Pex5p radioactiva e 1µg/mL para as reacções com a peroxina recombinante) em gelo, durante 15 minutos. Seguidamente adicionou-se PMSF (concentração final 0,5mg/mL), incubou-se 2 minutos em gelo, de forma a inactivar a protease, e procedeu-se a uma precipitação proteica com TCA 10% (m/V). As proteínas foram depois lavadas com acetona e submetidas a análise por SDS-PAGE.

3.7- Sequenciação dos fragmentos proteolíticos da Pex5p

A sequenciação dos fragmentos resultantes da clivagem proteolítica da Pex5p foi efectuada através de degradação de Edman no HHMI/Keck Biotechnology Resource Laboratory, em New Haven (EUA).

3.8- Centrifugação em gradientes de sacarose

As amostras foram preparadas em 200 μ L e continham 2 μ M de GST-SKL ou GST-LKS e 20 μ g de (His)₆-Pex5p ou 3 μ L de lisado de reticulócito contendo Pex5p ou Δ C1-Pex5p marcada radioactivamente. A solução tampão utilizada (solução tampão A) era composta por 50mM Tris.HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA e 1mM DTT. O facto de se ter aplicado uma amostra com um volume de apenas 200 μ L permitiu melhorar a resolução do gradiente, minimizando a distribuição das proteínas em múltiplas fracções.

Após incubação das amostras a 37°C durante 10 minutos, foram adicionadas 2 μ g de IgGs bovinas, albumina sérica bovina, inibidor de tripsina de soja e citocromo c. A adição destas proteínas permitiu a sua utilização como padrões de sedimentação, pois possuem coeficientes de sedimentação conhecidos. As soluções obtidas foram depois aplicadas cuidadosamente no topo de gradientes descontínuos de sacarose. Os gradientes eram composto por soluções de sacarose em solução tampão A, suplementada com 2 μ M GST-SKL ou GST-LKS: 2,0mL a 4%, 1,8mL a 8%, 1,7mL a 12%, 1,5mL a 16%, 1,2mL a 20%, 1,0mL a 25% e 1,0mL a 30% (m/V). Os gradientes foram depois submetidos a uma centrifugação a 180000g (no raio médio) durante 20h, a 4°C, no rotor basculante TH-641 da Sorvall. Após a centrifugação foram recolhidas 13 fracções de 0,8mL a partir do fundo do gradiente, que foram analisadas por SDS-PAGE.

3.9- Determinação do coeficiente de sedimentação da Pex5p

Os coeficientes de sedimentação das versões da Pex5p utilizadas foram determinados por interpolação gráfica a partir da relação linear entre os coeficientes de sedimentação dos padrões de sedimentação *versus* a fracção do gradiente onde foram recolhidos.

Controlo interno	Coefficiente de sedimentação / s
IgGs bovinas	6,9
Albumina sérica bovina	4,3
Inibidor de tripsina de soja	2,3
Citocromo c	1,9

Tabela 2 – Padrões de sedimentação utilizados e respectivos coeficientes de sedimentação.

3.10- Cromatografia de filtração em gel

As amostras foram preparadas em 200 μ L de solução tampão A e continham 20 μ g de (His)₆-Pex5p ou 1 μ L de lisado de reticulócito contendo Pex5p ou Δ C1-Pex5p marcada radioactivamente. A concentração de pep-SKL ou pep-LKS utilizada nas amostras foi de 40 μ M, enquanto que para as proteínas GST-SKL ou GST-LKS esse valor foi de 10 μ M.

As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente foram injectadas numa coluna Superose 12 HR 10/30 (Amersham Biosciences) e corridas a um fluxo de 0,5mL/min com solução tampão A desgaseificada e sem DTT. A coluna utilizada foi calibrada através da utilização de diferentes padrões com raios de Stokes conhecidos, nomeadamente, tiroglobulina, ferritina, aldolase, albumina sérica bovina e inibidor de tripsina de soja. Durante a cromatografia foram recolhidas fracções de 500 μ L abrangendo a região de raios de Stokes de interesse, tendo também como suporte a absorvância a 280nm. Essas fracções foram submetidas a precipitação com 10% (m/V) ácido tricloroacético, lavadas com acetona e analisadas por SDS-PAGE.

3.11- Determinação do raio de Stokes da Pex5p

Os raios de Stokes das versões da Pex5p analisadas foram determinados tal como descrito em [319], tendo como referência os raios de Stokes dos padrões utilizados.

Padrão utilizado	Raio de Stokes / nm
Tiroglobulina	8,5
Ferritina	6,1
Aldolase	4,8
Albumina sérica bovina	3,6
Inibidor de tripsina de soja	2,3

Tabela 3 – Padrões utilizados na cromatografia de filtração em gel e respectivos raios de Stokes.

3.12- Sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio

Após se submeter 200µg de (His)₆-Pex5p a uma cromatografia de filtração em gel, nas mesmas condições que as descritas anteriormente, as fracções que continham o pico de “270kDa” obtido no cromatograma de absorvância a 280nm foram misturadas e concentradas num concentrador Vivaspin 10000 MWCO PES (Vivascience). A concentração final obtida foi de 1mg/mL. Essa solução foi submetida a uma análise de sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio no National Centre for Macromolecular Hydrodynamics na Universidade de Nottingham (Reino Unido). A análise foi efectuada numa ultracentrífuga analítica Beckman XL-A equipada com uma óptica de varrimento de absorção.

3.13- Cálculo da massa molecular da Pex5p

A massa molecular das proteínas no seu estado nativo (M) foi calculada, tal como descrito em [320], a partir dos valores do coeficiente de sedimentação e do raio de Stokes, determinados experimentalmente, através da Equação 1,

$$M = \frac{6\pi\eta N a s}{1 - \nu\rho}$$

onde η representa a viscosidade do meio, N o número de Avogadro, a o raio de Stokes, s o coeficiente de sedimentação, ν o volume específico parcial da proteína, e ρ a densidade do meio.

O volume específico parcial das diferentes versões da Pex5p e da GST-SKL foram calculados através do programa informático SEDNTERP v1.08 (www.jphilo.mailway.com/default.htm).

3.14- Preparação de PNS e de peroxissomas purificados de fígado de rato

O PNS e os peroxissomas purificados foram preparados a partir de fígados de ratos machos Wistar com cerca de 1-2 meses de idade, sujeitos a um ciclo de luz de 12h e colocados em jejum 24 horas antes do sacrifício.

A preparação de PNS foi efectuada tal como descrito em [143]. Sucintamente, os fígados de rato foram homogeneizados em tampão SEM (0,25M sacarose, 1mM EDTA.NaOH, pH 7,4, 20mM MOPS.KOH, pH 7,4) suplementado com 2µg/mL de E-64, e submetidos a duas centrifugações de 600g (no raio médio) a 4°C, durante 10 minutos. As centrifugações foram efectuadas numa centrífuga Sorvall® (Dupont Instruments), num rotor SS-34. O sobrenadante obtido (PNS) foi aliquotado (40-60mg/mL por alíquota), congelado em azoto líquido e conservado a -70°C. A competência destas alíquotas para importação *in vitro* permanece inalterada durante aproximadamente um mês [172].

Os peroxissomas de fígado de rato foram preparados de acordo com [143]. Resumidamente, após homogeneização dos fígados em tampão SEM suplementado com 2µg/mL de E-64, o homogeneizado foi centrifugado a 600g (no raio médio), durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente foram efectuadas mais duas centrifugações, a 2350g (no raio médio), 10 minutos, 4°C e depois a 12300g (no raio médio), 20 minutos, 4°C. A centrífuga utilizada até este passo foi uma Sorvall® (Dupont Instruments), com um rotor SS-34. O sedimento obtido foi ressuspendido em tampão SEM e submetido a uma centrifugação num gradiente descontínuo de Nycodenz. O gradiente era constituído por duas soluções de Nycodenz em SEM suplementado com 2µg/mL de E-64: 1mL a 25% e 7mL a 33% (m/V). Este gradiente foi submetido a uma centrifugação de 20 minutos, a 60000g (no raio médio), 4°C. A centrífuga utilizada foi uma Sorvall Ultra Pro 80, com um rotor T-1270. O sedimento obtido foi ressuspendido em tampão SEM suplementado com 2µg/mL de E-64 (a concentração proteica da suspensão obtida foi ajustada para 20-40mg/mL), aliquotado, congelado em azoto líquido e conservado a -70°C. É de salientar que o protocolo utilizado para a preparação de peroxissomas purificados se encontra optimizado, permitindo a obtenção de peroxissomas com um elevado grau de pureza (94%), com uma contaminação residual de retículo endoplasmático (3,6%) e mitocôndrias (1,8%) [321].

A determinação da concentração proteica do PNS e dos peroxissomas foi efectuada através do método de Bradford, utilizando IgGs bovinas como padrão [322].

3.15- Experiências de importação *in vitro* da Pex5p

As reacções de importação *in vitro* foram efectuadas num volume final de 100µL em tampão de importação (0,25M sacarose, 20mM MOPS.KOH, pH 7,4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,2% (m/V) BSA deslipidada, 20µM metionina, e 2µg/mL E-64). A quantidade de PNS utilizado foi de 150µg por reacção, excepto quando indicado o contrário. A quantidade de peroxissomas purificados utilizada foi de 80µg. Nalgumas experiências foi utilizado um sistema de regeneração de ATP composto por 10mM creatina fosfato e 5U/mL de creatina fosfoquinase (concentrações finais).

As experiências de importação *in vitro* da Pex5p foram efectuadas de acordo com o descrito em [172]. Succintamente, após incubação dos lisados de reticulócito com o PNS ou peroxissomas durante 30 minutos a 26°C (excepto indicação em contrário), adicionou-se proteinase K (concentração final 300µg/mL) e incubou-se em gelo durante 30 minutos. Seguidamente adicionou-se PMSF (concentração final 0,5mg/mL) e incubou-se 2 minutos em gelo, de forma a inactivar a PK. Diluiu-se as reacções de importação para 1mL com tampão SEM e centrifugou-se a 15000g (no raio médio), durante 15 minutos, a 4°C. Os sedimentos organelares obtidos foram submetidos a precipitação com ácido tricloroacético 10% (m/V), lavados com acetona e analisados por SDS-PAGE.

Nas experiências de inibição com anticorpos, o PNS ou os peroxissomas foram incubados em gelo durante 20 minutos na presença de 30µg de imunoglobulinas de soro pré-imune ou anti-Pex14p, ou de 10µg de fragmentos Fab pré-ímmunes ou anti-Pex13p, antes de se iniciar a reacção de importação *in vitro*.

Quando utilizadas, as proteínas recombinantes foram adicionadas de forma a obter uma concentração final de 0,17µM (GST e GST-TPRs), 0,85µM (GST-Pex5p), e 8µM (GST-SKL e GST-LKS).

3.16- Anticorpos utilizados

Os anticorpos utilizados foram: anti-Pex14p [216] (preparado pela Doutora Márcia Oliveira); anti-Pex13p [323] (gentilmente cedido pelo Doutor Marc Fransen).

As IgG foram purificadas do soro de coelho usando Proteína A-Sepharose®, de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Biosciences).

A preparação dos fragmentos Fab, através da utilização de papaína imobilizada, foi efectuada com o kit *ImunoPure Fab Preparation*, de acordo com as instruções do fabricante (Pierce).

3.17- SDS-PAGE

As amostras proteicas foram incubadas a 65°C, durante 15 minutos, em tampão de solubilização (50mM Tris.HCl, pH 8,8, 2%(m/V) SDS, 0,02%(m/V) azul de bromofenol, 10%(m/V) glicerol, 2mM EDTA.NaOH, pH 8,8 e 0,1M DTT). Seguidamente procedeu-se a uma segunda incubação, desta vez a 95°C, durante 5 minutos. Antes de aplicar no gel, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 15000g (no raio médio) à temperatura ambiente, durante 2 minutos, de forma a remover algum material insolúvel que estivesse em suspensão.

Os géis utilizados possuíam uma espessura de 0,75 ou 1mm. As electroforeses foram efectuadas de acordo com o sistema descontínuo de Laemli [324]. Resumidamente, o gel de empacotamento era composto por 5% poliacrilamida (razão acrilamida:bisacrilamida, 75:1), 125mM Tris.HCl, pH 6,8 e 0,1%(m/V) SDS. O gel de separação era composto por 10, 11 ou 12% poliacrilamida (razão acrilamida:bisacrilamida, 75:1), 750mM Tris.HCl, pH 8,8 e 0,1%(m/V) SDS.

O tampão de corrida utilizado era composto por 0,025M Tris, 0,25M glicina e 0,1%(m/V) SDS.

Os marcadores de massa molecular utilizados nas electroforeses foram a lisozima de clara de ovo (14kDa), inibidor de tripsina de soja (21kDa), anidrase carbónica bovina (31kDa), ovalbumina de clara do ovo (45kDa), albumina sérica bovina (66kDa) e fosforilase b de músculo de coelho (97kDa).

Após a separação electroforética das proteínas, os géis foram incubados durante 1 hora em solução corante (0,2% (m/V) azul de Coomassie R-250, 10% (V/V) ácido acético e 50% (V/V) metanol. Seguidamente foram descorados com solução descorante (8% (V/V) ácido acético e 25% (V/V) etanol).

3.18- Transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose e detecção da proteína radioactiva

Para a transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell) foi utilizado um sistema *semi-dry* de acordo com as instruções do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

Nas experiências em que foi utilizada proteína radioactiva, a detecção da mesma foi efectuada através de autorradiografia em filmes Biomax da Kodak. Quando relevante, a análise densitométrica dos filmes foi efectuada recorrendo ao sistema de digitalização automática UNSCAN-IT.

4- RESULTADOS

4.1- Estudo de interacções proteicas envolvendo a Pex5p

4.1.1- Ensaios de proteólise parcial da Pex5p

Tirando partido do facto de a Pex5p apresentar uma elevada susceptibilidade à acção de proteases (ver também [168]), foi desenvolvido um ensaio de proteólise parcial para a peroxina humana. Este ensaio permite identificar novos ligandos para a Pex5p, bem como detectar e identificar possíveis alterações estruturais na peroxina, quando na presença de determinados ligandos. De facto, estudos envolvendo digestões parciais podem fornecer dados importantes acerca da estrutura de determinadas proteínas, sendo que muitas vezes permitem detectar alterações conformacionais induzidas por interacções proteína-ligando (por exemplo, [325]).

De uma forma resumida, o ensaio desenvolvido consiste na incubação de Pex5p humana, proveniente de tradução *in vitro* ou de expressão heteróloga em *E. coli*, na presença de péptidos/proteínas, seguida de incubação com PK e posterior inactivação da protease (ver capítulo 3.6).

É de salientar que, apesar de a Pex5p humana possuir uma massa de 70,9 kDa, quando submetida a uma electroforese por SDS-PAGE aparenta ter cerca de 97kDa. O facto de a Pex5p se comportar como uma proteína com uma massa molecular superior à real, deve-se provavelmente ao facto de se tratar de uma proteína extremamente polar, o que altera as suas propriedades electroforéticas, uma vez que possui uma capacidade menor de ligar moléculas de SDS.

4.1.1.1- Alterações na acessibilidade da Proteinase K à Pex5p, na presença de PTS1

Tal como descrito na introdução teórica, a Pex5p possui na sua região C-terminal vários domínios TPR, que estão envolvidos no reconhecimento/ligação de PTS1 à peroxina [134, 167, 169, 181-186]. De forma a verificar se a susceptibilidade da Pex5p à acção proteolítica da PK se alterava na presença de PTS1, foram efectuados ensaios de proteólise parcial da proteína na presença de péptidos e proteínas contendo PTS1.

Após incubação da Pex5p, sintetizada *in vitro*, com pep-SKL, ou com pep-LKS como controlo negativo, procedeu-se a uma incubação das amostras com PK (concentração final 0,5µg/mL). A concentração da protease utilizada foi determinada em estudos preliminares, nos quais se procedeu a uma titulação da quantidade de PK a utilizar. Seguidamente inactivou-se a protease e analisou-se o padrão proteolítico das amostras por SDS-PAGE e autorradiografia. Comparando os resultados obtidos para as

duas condições (Figura 5A, linhas 1 e 2), verifica-se que existem diferenças significativas entre elas, o que sugere que a ligação de PTS1 à ^{35}S -Pex5p altera a susceptibilidade da peroxina à acção da PK. De facto, há a destacar duas observações nos resultados obtidos: na presença de pep-SKL, o padrão proteolítico da Pex5p apresenta um duplete com cerca de 40kDa (Figura 5A, seta *a*), enquanto que na ausência de PTS1 (experiência controlo com pep-LKS) existe uma banda que é particularmente abundante, com cerca de 35kDa (Figura 5A, seta *b*). Quando em vez de se utilizar pep-SKL, foi utilizado um péptido menor contendo também um PTS1 (YQSKL), verificou-se igualmente o aparecimento do duplete com cerca de 40kDa (resultados não apresentados). De forma a tentar validar os resultados obtidos, procedeu-se exactamente à mesma experiência, mas desta vez não foram utilizados péptidos (pep-SKL e pep-LKS), mas sim proteínas recombinantes (GST-SKL e GST-LKS). Os resultados obtidos foram virtualmente os mesmos (Figura 5A, linhas 3 e 4). É de realçar também a existência de uma banda com cerca de 34kDa em todas as condições testadas (Figura 5A, seta *c*), o que sugere que essa banda corresponde a um fragmento da Pex5p que é intrinsecamente resistente à acção da PK, independentemente da presença ou não de PTS1.

A mesma experiência foi efectuada utilizando desta vez Pex5p recombinante. Verificou-se que esta proteína apresentava o mesmo padrão proteolítico que a ^{35}S -Pex5p, quando na presença de pep-SKL ou pep-LKS (Figura 5B, linhas 2 e 3). Procedeu-se então à sequenciação N-terminal (degradação de Edman) do duplete de 40kDa, da banda de 35kDa e da banda de 34kDa. As sequências obtidas foram identificadas como correspondendo aos aminoácidos: 291-296 e 295-300 para o duplete de 40kDa; 308-313 e 319-324 para a banda de 35kDa; 308-312 para a banda de 34kDa. O facto de estarem presentes, na banda de 35kDa, dois fragmentos da Pex5p diferentes, sugere que além de diferirem na sequência N-terminal, os dois fragmentos também possuem diferentes extremidades C-terminal.

Portanto, os resultados obtidos revelam que a ligação de uma proteína/péptido com PTS1 à Pex5p induz alterações na acessibilidade da PK a determinadas ligações peptídicas da peroxina. Mais concretamente, as ligações em causa encontram-se a montante do primeiro TPR da Pex5p humana [183], precedendo-o em 30 aminoácidos (ligação envolvendo os aminoácidos 307-308) e 19 aminoácidos (ligação envolvendo os aminoácidos 318-319).

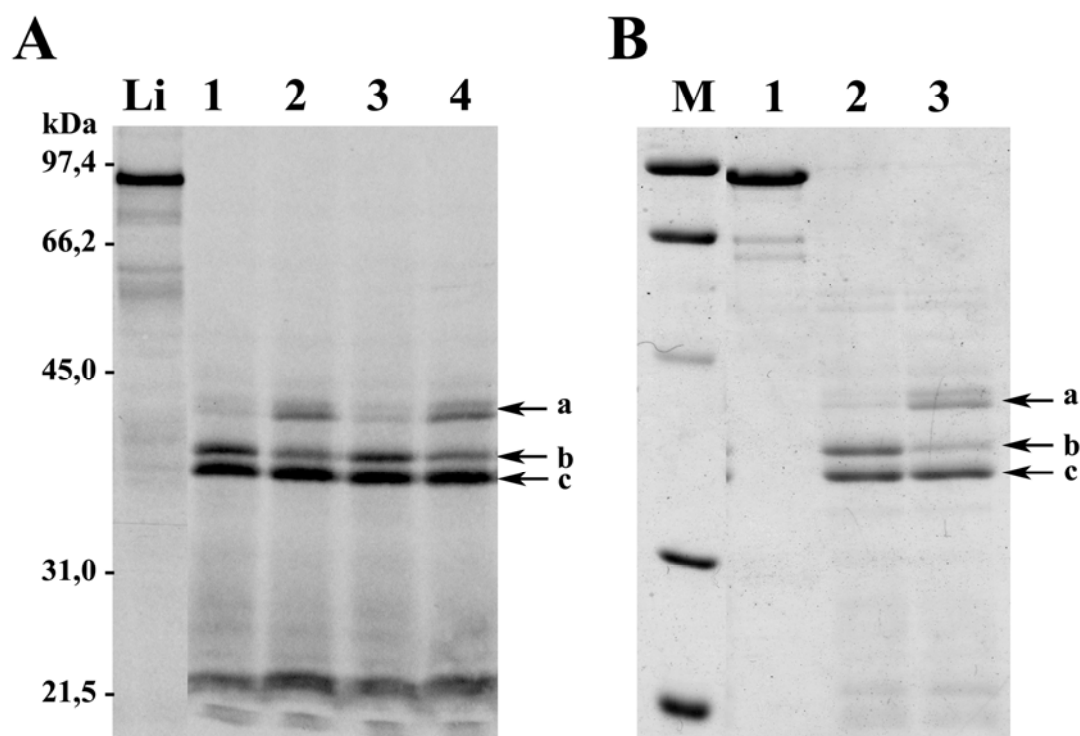


Figura 5 – O padrão proteolítico da Pex5p, após tratamento com PK, é alterado na presença de PTS1.

A – ^{35}S -Pex5p foi incubada a 37°C, durante 10 minutos, na presença de pep-LKS (linha 1), pep-SKL (linha 2), GST-LKS (linha 3) ou GST-SKL (linha 4). Seguidamente as amostras foram tratadas com PK, e analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia. A seta *a* indica o duplete de 40kDa, a seta *b* indica a banda de 35kDa, a seta *c* indica a banda de 34kDa e a linha *Li* corresponde a 0,5 μL de lisado de reticulócito contendo ^{35}S -Pex5p. Os números apresentados à esquerda são relativos à massa molecular dos padrões utilizados. **B** – $(\text{His})_6$ -Pex5p foi incubada na presença de pep-LKS (linha 2) ou pep-SKL (linha 3). Após tratamento das amostras com PK, estas foram analisadas por SDS-PAGE e o gel foi corado com azul de Coomassie. O duplete de 40kDa, a banda de 35kDa e a banda de 34kDa encontram-se assinalados pelas setas *a*, *b* e *c*, respectivamente. A linha 1 corresponde a 2 μg de Pex5p recombinante purificada, e a linha *M*, representa os padrões de massa molecular utilizados, com as massas apresentadas no painel **A**.

4.1.1.2- Alterações na acessibilidade da proteinase K à Pex5p na presença do domínio SH3 da Pex13p

A Pex13p (ver capítulo 1.3.3.4.4) é uma peroxina existente na membrana do peroxissoma, caracterizada por possuir um domínio SH3 voltado para o citosol [5, 21, 26]. Já foram descritas interações entre esta peroxina e a Pex5p, embora exista alguma controvérsia acerca da região da Pex13p envolvida nesta interação. Por um lado, em

eucariotas inferiores foi demonstrado que essa interacção é directa, e envolve o domínio SH3 da Pex13p [50, 204, 205, 208]. No entanto, em mamíferos os resultados não são assim tão claros. Estudos de *two hybrid system* revelaram resultados negativos e positivos para a interacção entre as duas peroxinas [205, 256]. Além disso, estudos *in vitro* que visaram a demonstração de uma interacção directa entre a Pex5p e o domínio SH3 apresentaram sempre resultados negativos [185, 200]. No entanto, numa experiência de *pull-down* foi detectada uma interacção entre a Pex5p e a Pex13p humanas [185]. Curiosamente, quando os domínios das peroxinas envolvidos na interacção foram mapeados, obtiveram-se resultados inesperados. O domínio da Pex5p envolvido na interacção correspondia ao domínio da peroxina que interacciona com o domínio SH3 da Pex13p em eucariotas inferiores. No entanto, verificou-se que o domínio da Pex13p envolvido na interacção não correspondia ao domínio SH3, mas sim a uma porção N-terminal da peroxina, mais concretamente aos aminoácidos 1-135 [185]. É de realçar que este resultado foi obtido com proteínas de fusão contendo domínios da Pex13p fundidos com moléculas de GST na sua extremidade N-terminal.

Na tentativa de verificar se a interacção entre as duas peroxinas era detectada com o nosso ensaio de proteólise parcial, foram testadas duas proteínas de fusão da Pex13p humana, correspondentes aos aminoácidos 1-135 e 255-403, com uma molécula de GST na extremidade N-terminal. Com ambas as proteínas o resultado obtido foi negativo (resultados não apresentados). No entanto, a obtenção de um resultado negativo no nosso ensaio de proteólise parcial não implica necessariamente que não existe interacção entre as proteínas envolvidas. Ou seja, existem vários factores que podem provocar a ocorrência de um resultado negativo falso, nomeadamente: o ligando putativo pode apresentar uma susceptibilidade elevada à acção da PK; a interacção entre as duas proteínas pode não resultar em alterações estruturais na Pex5p que provoquem alterações na acessibilidade da PK à peroxina. Além disso, o facto de as proteínas recombinantes utilizadas possuírem uma molécula grande (GST) na sua região N-terminal pode também interferir com a interacção dessas proteínas com a Pex5p. De forma a descartar esta hipótese, repetiu-se a experiência, mas desta vez utilizou-se o domínio SH3 da Pex13p humana com um *tag* N-terminal de 6 histidinas. Nessa experiência foi detectada uma interacção entre a proteína recombinante e a ³⁵S-Pex5p (Figura 6, linhas 3-6). De facto, na presença de (His)₆-SH3 o padrão proteolítico da Pex5p é profundamente alterado, sendo de destacar um aumento da resistência da peroxina à PK. Comparando os padrões proteolíticos da Pex5p incubada com (His)₆-SH3, na presença de pep-LKS ou pep-SKL (Figura 6, linhas 5 e 6), verifica-se que o aumento da resistência da peroxina à acção da PK parece ser superior na primeira condição. Esta

observação corrobora a ideia que a Pex13p se liga preferencialmente a Pex5p na ausência de PTS1 [185, 204].

De forma a testar a especificidade da interacção observada, foi incluída na experiência uma versão da Pex5p com uma truncagem de 204 aminoácidos na extremidade N-terminal (^{35}S - ΔN204 -Pex5p). De acordo com dados publicados, a região da Pex5p humana que interacciona com a Pex13p humana encontra-se compreendida entre os aminoácidos 1-204 [185]. Portanto, seria de esperar que esta forma truncada da Pex5p não interaccionasse com o domínio SH3 da Pex13p. Os resultados obtidos revelaram que a ^{35}S - ΔN204 -Pex5p possui a capacidade de ligar PTS1, mas, de facto, não interacciona com a proteína $(\text{His})_6$ -SH3 (Figura 6, linhas 7-10). Ou seja, a Pex5p humana possui a capacidade de interaccionar com a Pex13p, numa interacção que, por um lado requer os aminoácidos 1-204 da Pex5p, e por outro lado, o domínio SH3 da Pex13p. Esta interacção é específica, sugerindo uma conservação evolutiva da mesma.

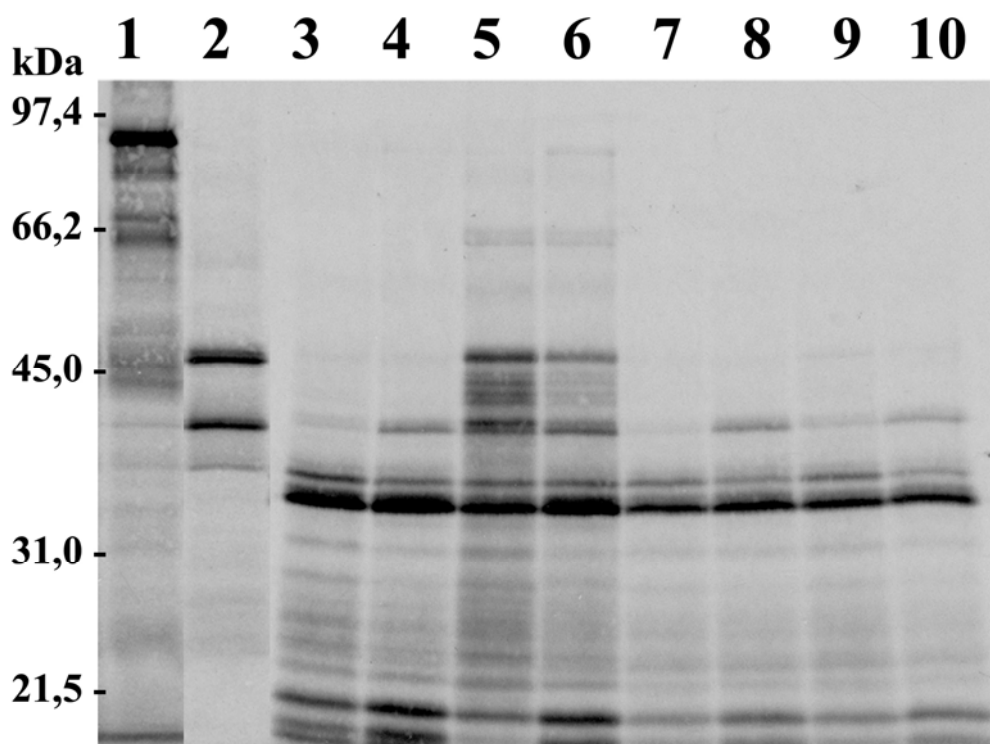


Figura 6 – Padrões proteolíticos da Pex5p após tratamento com PK na presença de $(\text{His})_6$ -SH3.

Após incubação de ^{35}S -Pex5p (linhas 3-6) ou ^{35}S - ΔN204 -Pex5p (linhas 7-10), com pep-LKS (linhas 3, 5, 7, 9) ou pep-SKL (linhas 4, 6, 8, 10), na ausência (linhas 3, 4, 7 e 8) ou presença de $(\text{His})_6$ -SH3 (linhas 5, 6, 9, 10), as amostras foram tratadas com PK. Seguidamente o padrão proteolítico das proteínas foi analisado por SDS-PAGE e autorradiografia. As linhas 1 e 2 representam os lisados de reticulócito que contêm as duas versões da Pex5p utilizadas, ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔN204 -Pex5p, respectivamente. Os números apresentados à esquerda são relativos à

massa molecular dos padrões utilizados. É de realçar que a síntese da ^{35}S - ΔN204 -Pex5p *in vitro* deu origem a duas proteínas com diferentes pesos moleculares (ver linha 2). A banda de menor massa molecular é consequência, provavelmente, do início da tradução num codão ATG interno.

4.1.2- Caracterização do estado oligomérico da Pex5p

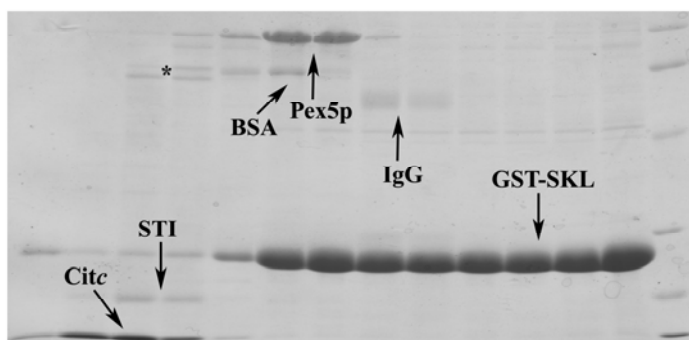
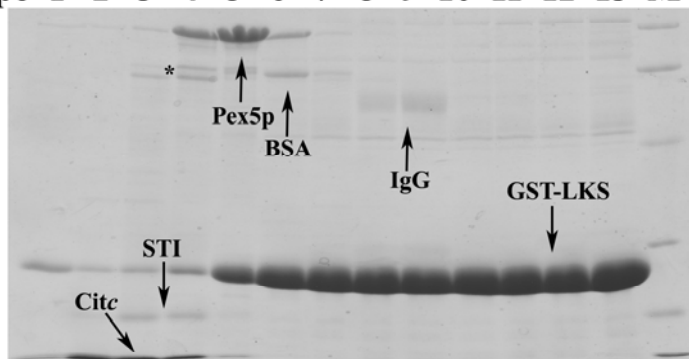
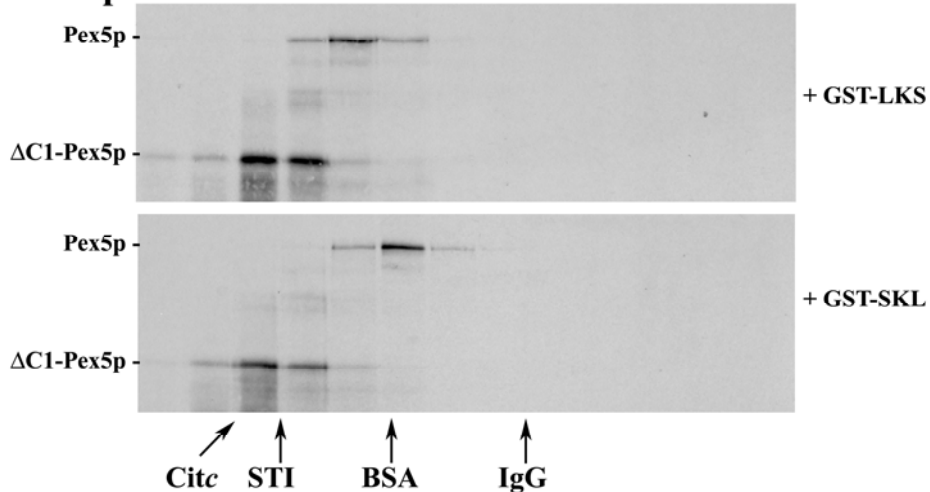
A Pex5p é uma proteína para a qual foram descritos vários estados oligoméricos, sendo que nalguns trabalhos foi sugerido que esses estados oligoméricos eram alterados após ligação a PTS1 (ver capítulo 1.5). Portanto, as alterações na acessibilidade da PK à peroxina, induzidas pela ligação de PTS1, poderiam ser originadas, não por alterações conformacionais na Pex5p, mas sim por alterações na estrutura quaternária da proteína, tal como proposto, por exemplo, para a Pex5p de *L. donovani* [192]. De forma a tentar racionalizar os resultados obtidos no ensaio de proteólise parcial da Pex5p, tornou-se imperativo determinar qual a verdadeira massa molecular da proteína. Para tal foram utilizadas duas estratégias distintas e independentes. Uma das estratégias recorreu ao método descrito por Siegel e Monty [320], no qual a massa molecular de uma proteína pode ser calculada a partir do seu coeficiente de sedimentação (determinado a partir de análise de sedimentação em gradientes de sacarose) e do raio de Stokes (obtido a partir de cromatografia de filtração em gel). A segunda estratégia envolveu a sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio, uma técnica através da qual se obtém a massa molecular como consequência dos coeficientes de sedimentação e de difusão da proteína.

4.1.2.1- Determinação do coeficiente de sedimentação da Pex5p

De forma a determinar qual o coeficiente de sedimentação da Pex5p humana, foram efectuadas análises de sedimentação em gradientes de sacarose para a peroxina. Para cada experiência foram preparados dois gradientes, um contendo GST-SKL e outro GST-LKS (2 μM em ambas as condições). No caso do primeiro, a amostra aplicada correspondia à Pex5p pré-incubada com GST-SKL, enquanto que no segundo gradiente, a amostra correspondia à Pex5p pré-incubada com GST-LKS. A inclusão de GST-SKL (ou GST-LKS como controlo negativo) na composição do gradiente teve como objectivo garantir que a Pex5p se encontrava na presença do seu ligando durante todo o tempo de centrifugação.

Após análise das fracções dos gradientes (Figura 7A), verificou-se que na ausência de PTS1 (gradiente contendo GST-LKS) a Pex5p humana recombinante (72,3kDa) se comporta como uma proteína globular com cerca de 40kDa, sedimentando acima da BSA (66,2kDa e coeficiente de sedimentação de 4,31s). Foi determinado um coeficiente de sedimentação de $3,68 \pm 0,18$ s para essa condição. Considerando que após análise por SDS-PAGE se constatou que a Pex5p não se apresentava clivada proteoliticamente, esta observação sugere que a peroxina possui uma forma não globular. Na presença de GST-SKL, a Pex5p apresenta um coeficiente de sedimentação de $5,00 \pm 0,27$ s, correspondente a uma proteína globular com cerca de 90kDa, o que indica que se formou um complexo entre a Pex5p e a GST-SKL. É de realçar que quase toda a Pex5p aplicada no gradiente se apresenta em complexo com a GST-SKL, o que revela que, nas nossas preparações proteicas, não existem quantidades significativas de proteína inactiva.

Foi efectuada a mesma análise para a ^{35}S -Pex5p, sendo que nestas experiências foi incluído um controlo negativo, que consistiu numa versão da Pex5p composta apenas pelos aminoácidos 1-324 (^{35}S - ΔC1 -Pex5p). Ou seja, esta forma da Pex5p não possui os TPRs, que são responsáveis pelo reconhecimento e interacção com PTS1 [134, 167, 169, 181-186]. Verificou-se que a ^{35}S -Pex5p apresentava o mesmo comportamento que a peroxina recombinante, na presença de GST-LKS ou GST-SKL (Figura 7B). Além disso, verificou-se também que, tal como esperado, o coeficiente de sedimentação da ^{35}S - ΔC1 -Pex5p (37,1kDa) permaneceu inalterado na presença de GST-SKL. O coeficiente de sedimentação para esta forma truncada da Pex5p foi determinado, tendo-se obtido um valor de $2,40 \pm 0,13$ s.

A**Topo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M Fundo****B****Topo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 Fundo****Figura 7** – Centrifugação da Pex5p em gradientes de sacarose.

A – Após incubação de $(\text{His})_6$ -Pex5p com GST-LKS (painel superior) ou GST-SKL (painel inferior), foi adicionada às amostras uma mistura de proteínas com coeficientes de sedimentação conhecido. Seguidamente as amostras foram aplicadas no topo de gradientes de sacarose contendo GST-LKS (painel superior) ou GST-SKL (painel inferior). Após centrifugação, foram recolhidas fracções do gradiente, a partir do fundo do tubo. As fracções foram analisadas por SDS-PAGE e o gel foi corado com azul de Coomassie. As diferentes proteínas utilizadas no

ensaio, Pex5p, GST-LKS ou GST-SKL, e os padrões de sedimentação encontram-se indicados por setas e pelos respectivos nomes. Os padrões utilizados foram: CytC, STI, BSA e IgG. É de realçar que, no caso desta última proteína, apenas é possível visualizar as cadeias pesadas, uma vez que as cadeias leves se encontram parcialmente mascaradas pela GST-LKS ou GST-SKL. O asterisco representa duas bandas proteicas provenientes da preparação da Pex5p recombinante. Uma vez que essas proteínas são purificadas através de um *tag* N-terminal de histidinas, e que são reconhecidas pelo anticorpo anti-Pex5p (resultados não apresentados), provavelmente correspondem a versões da Pex5p com truncagens na extremidade C-terminal. A linha *M* representa os padrões de massa molecular utilizados no SDS-PAGE, com massas de (do topo para o fundo): 97,4kDa, 66,2kDa, 45,0kDa, 31,0kDa, 21,5kDa e 14,4kDa. **B** – ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔC1 -Pex5p foram incubadas na presença de GST-LKS (painel superior) ou GST-SKL (painel inferior). Seguidamente foram adicionados a cada amostra padrões de sedimentação (ver legenda do painel **A**), e a mistura resultante foi aplicada no topo de gradientes de sacarose contendo GST-LKS (painel superior) ou GST-SKL (painel inferior). Após centrifugação, foram recolhidas frações do gradiente a partir do fundo do tubo, que foram analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia. Os padrões de sedimentação encontram-se indicados no fundo da figura, tendo sido visualizados após corar a membrana de nitrocelulose com Ponceau S.

4.1.2.2- Determinação do raio de Stokes da Pex5p

Para a determinação do raio de Stokes da Pex5p foram efectuadas análises de cromatografia de filtração em gel. A solução tampão de corrida não foi suplementada com DTT, uma vez que foi descrito que a ausência dessa substância não altera o perfil de eluição da Pex5p ([201] e resultados não apresentados). Tal como mostrado na Figura 8A, a Pex5p humana recombinante na ausência de PTS1 (pré-incubação com GST-LKS ou pep-LKS) apresenta um volume de eluição compreendido entre os volumes de eluição da ferritina (440kDa e raio de Stokes de 6,1nm) e da aldolase (158kDa e raio de Stokes de 4,8nm). Foi determinado um raio de Stokes para a Pex5p de $5,33 \pm 0,21\text{nm}$, que corresponde a uma proteína globular com cerca de 270kDa. É de salientar que nalgumas experiências foram observados picos adicionais ao principal (correspondente a uma proteína globular de 270kDa, pico “270kDa”). Esses picos corresponderiam a proteínas globulares com massas de 130kDa e 60kDa). No entanto, após análise por SDS-PAGE dos mesmos constatou-se que apenas o pico de “270kDa” correspondia à $(\text{His})_6$ -Pex5p, sendo que os restantes picos eram resultado da presença de fragmentos proteolíticos da Pex5p (resultados não apresentados). Quando a presença de tais picos se verificou, essas preparações de $(\text{His})_6$ -Pex5p foram rejeitadas.

Quando a Pex5p recombinante foi pré-incubada com pep-SKL, o seu raio de Stokes permaneceu inalterado. No entanto, quando pré-incubada com GST-SKL, a Pex5p eluiu da coluna mais cedo, o que corresponde a um aumento no raio de Stokes. Esta observação sugere que foi formado um complexo entre a Pex5p e a GST-SKL, sendo que esse complexo resistiu, pelo menos na sua maioria, ao processo cromatográfico, hipótese corroborada pela análise por SDS-PAGE das fracções correspondentes (Figura 8B). Foi determinado um raio de Stokes de $5,86 \pm 0,31$ nm para o complexo proteico.

Tal como para a centrifugação em gradientes de sacarose, as experiências de cromatografia de filtração em gel foram repetidas para a Pex5p sintetizada *in vitro*. Mais uma vez se obteve um comportamento idêntico para a proteína radioactiva, quando comparada com a recombinante. Na presença de pep-LKS ou pep-SKL (dados não apresentados), ou GST-LKS (Figura 8C) a ^{35}S -Pex5p apresentou um tempo de retenção na coluna semelhante ao da $(\text{His})_6$ -Pex5p. Após a pré-incubação com GST-SKL, verificou-se, como era esperado, uma diminuição no valor desse tempo de retenção, correspondente a um aumento no raio de Stokes. Foi também analisado o comportamento em cromatografia de filtração em gel da ^{35}S - ΔC1 -Pex5p. Apesar de, tal como se previa, o comportamento da proteína permanecer inalterado na presença de GST-LKS ou GST-SKL, esta versão da Pex5p apresentou um tempo de retenção na coluna muito próximo do valor obtido para a Pex5p completa, tendo sido estimado um valor de $5,00 \pm 0,25$ nm para o seu raio de Stokes.

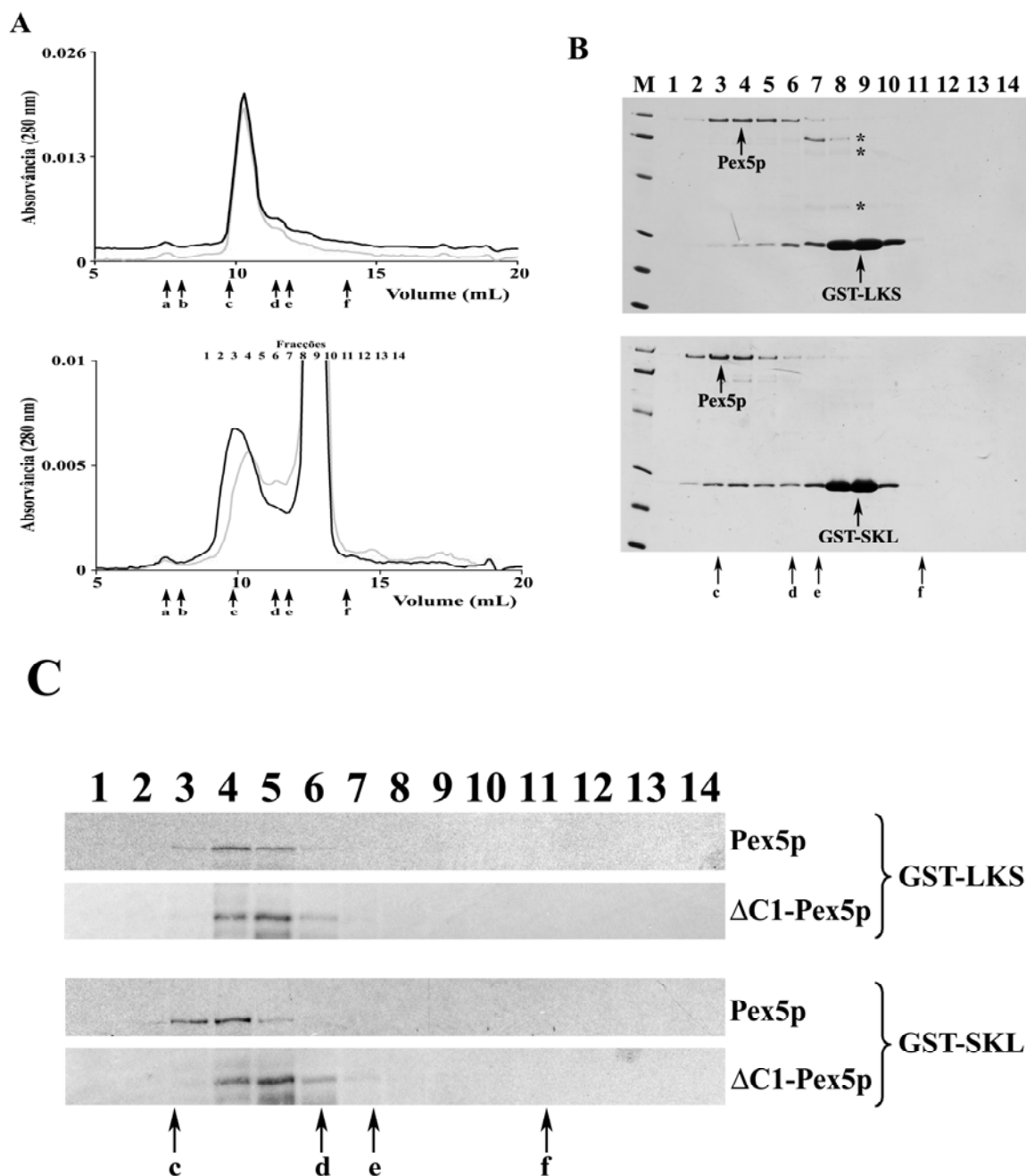


Figura 8 – Análise do comportamento da Pex5p humana em cromatografia de filtração em gel.

A – Após incubação da $(\text{His})_6$ -Pex5p com pep-LKS (linha cinzenta) ou pep-SKL (linha preta), as amostras foram analisadas por cromatografia de filtração em gel (painel superior). O mesmo tipo de análise foi efectuado utilizando em vez de pep-LKS e pep-SKL, GST-LKS e GST-SKL, respectivamente (painel inferior). Nesta experiência foram recolhidas fracções, tal como indicado pelos números no topo do painel inferior. **B** – Gel de SDS-PAGE utilizado para analisar a composição das fracções recolhidas na experiência do painel inferior da figura **A**, corado com azul de Coomassie. Os asteriscos representam proteínas contaminantes de *E. coli*, presentes na preparação de GST-LKS. **C** – Após incubação de ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔC1 -Pex5p com GST-LKS

(painel superior) ou GST-SKL (painel inferior), as amostras foram analisadas em cromatografia de filtração em gel. As fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia. As letras e as setas apresentadas em todos os painéis desta figura representam o *void volume* (a) e os volumes de eluição da tiroglobulina (b), ferritina (c), aldolase (d), BSA (e) e STI (f).

4.1.2.3- Cálculo da massa molecular da Pex5p

Através da equação 1 (ver capítulo 3.13) é possível determinar a massa molecular de uma proteína a partir do seu coeficiente de sedimentação e do raio de Stokes. Após se ter determinado esses parâmetros (Tabela 4) para as proteínas utilizadas nas nossas experiências, procedeu-se então ao cálculo das massas moleculares correspondentes. Foram obtidos valores de $80,5 \pm 4,9$ kDa para a Pex5p, $48,3 \pm 3,6$ kDa para a $\Delta C1$ -Pex5p, e $124,1 \pm 9,4$ kDa para o complexo [Pex5p.GST-SKL].

Portanto, os nossos resultados revelam que a Pex5p é de facto uma proteína monomérica, com uma forma não globular. Esta última característica parece ser devida à conformação da região N-terminal da peroxina, tal como sugerido pelos resultados obtidos para a $\Delta C1$ -Pex5p.

Proteína	Coefficiente de sedimentação / s	Raio de Stokes / nm	Massa molecular / kDa
Pex5p	$3,68 \pm 0,18$	$5,33 \pm 0,21$	$80,5 \pm 4,9$
$\Delta C1$ -Pex5p	$2,40 \pm 0,13$	$5,00 \pm 0,25$	$48,3 \pm 3,6$

Tabela 4 – Valores obtidos para o coeficiente de sedimentação, raio de Stokes e massa molecular das duas versões da Pex5p em estudo.

4.1.2.4- Sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio

Tendo obtido resultados que revelavam que afinal a Pex5p é uma proteína monomérica, com uma forma não globular, recorreu-se a uma metodologia independente para validar os nossos resultados. Para tal submeteu-se a Pex5p a uma análise de sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio. Esta técnica permitiu também descartar a influência de determinados factores nos nossos resultados, nomeadamente, o factor de diluição da Pex5p e as elevadas pressões hidrostáticas a que a proteína foi sujeita durante a centrifugação nos gradientes de sacarose. De facto, na análise de

sedimentação por centrifugação até ao equilíbrio, a Pex5p não se encontrava numa solução diluída (1mg/mL), nem foi submetida a pressões hidrostáticas elevadas. No entanto, os resultados obtidos corroboraram os nossos resultados anteriores, tendo sido estimada uma massa molecular de $73,8 \pm 2,6$ kDa para a peroxina. É de realçar que não foi verificada a existência de nenhuma forma oligomérica da Pex5p durante a análise.

Resumindo, após análise dos resultados obtidos pelas duas estratégias utilizadas verifica-se que a Pex5p é uma proteína monomérica, sendo que essa propriedade não é alterada pela ligação da peroxina a PTS1.

4.2- Caracterização funcional do N-terminus da Pex5p humana

4.2.1- Em busca de uma função para os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p

Comparando a estrutura primária de várias Pex5p de diferentes organismos é possível constatar que a sua metade C-terminal apresenta conservação evolutiva, o mesmo não se verificando para a metade N-terminal. No entanto, e apesar de a região C-terminal da Pex5p estar envolvida em interações com PTS1 [134, 167, 169, 181-186] e com as peroxinas RING, Pex10p e Pex12p [196, 197], é na região N-terminal que se encontram os locais de ligação da Pex5p com a Pex14p [185, 201, 214], Pex13p ([185] e capítulo 4.1.1.2) e Pex7p [193, 209-211]. Curiosamente, todas estas interações encontram-se mapeadas a partir do aminoácido 118 da Pex5p humana, sendo que existe pouca informação disponível acerca dos 117 aminoácidos N-terminais da peroxina. Foi demonstrado que essa região é importante para a Pex5p *in vivo* [185], permanecendo, no entanto, por esclarecer a razão para tal se verificar.

De forma a tentar perceber qual a função dessa região da Pex5p humana recorreu-se a um sistema de importação *in vitro* desenvolvido no nosso laboratório, que é particularmente útil para o estudo e caracterização do processo de importação da Pex5p para o peroxissoma [172]. Esse sistema recorre à utilização de proteínas (Pex5p ou variantes) marcadas radioactivamente (sintetizadas *in vitro* na presença de ³⁵S-metionina). Resumidamente, sobrenadantes pós-nucleares ou peroxissomas purificados são incubados na presença das proteínas radioactivas, sendo que após incubação os organelos são tratados com uma protease (PK) e sedimentados. Portanto, consegue-se desta forma monitorizar a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal. Verificou-se que, quando associada à membrana peroxissomal, a Pex5p se apresenta distribuída entre duas fracções, denominadas de estado 2 e estado 3 da Pex5p. O estado 2 é caracterizado por uma resistência quase total à clivagem proteolítica da Pex5p, com excepção de um fragmento com cerca de 2kDa localizado na extremidade N-terminal da proteína. O estado 3 é caracterizado por uma resistência total à acção da PK. Através da utilização deste sistema de importação *in vitro* foi demonstrado que o estado 2 da Pex5p surge primeiro no ciclo de actuação da peroxina, e que este estado dá origem ao estado 3 da Pex5p [172]. Verificou-se também que ambos os estados de Pex5p são imunoprecipitados utilizando um anticorpo anti-Pex14p. Esta observação sugere que a Pex14p se encontra em contacto com a Pex5p durante todos os passos do ciclo de actuação da Pex5p, que ocorrem na membrana do peroxissoma, o que sugere um papel para a Pex14p no próprio processo de translocação [172].

Foi também mostrado que a inserção da Pex5p na membrana do peroxissoma é dependente da disponibilidade de Pex14p, bem como da presença de proteínas contendo PTS1 no meio de importação [172, 318]. Foi observado que a dependência de ATP no processo ocorre apenas no processo de exportação da Pex5p da membrana do peroxissoma para o citosol, sendo que o processo de importação não é dependente da presença do nucleótido [143].

Recentemente têm sido publicados trabalhos de outros grupos de investigação em peroxissomas que recorrem a este sistema de importação *in vitro* como ferramenta nos seus estudos [144, 145], o que ilustra a versatilidade e utilidade do sistema.

4.2.2- A deleção dos 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p não afecta o endereçamento da peroxina para o peroxissoma

De forma a tentar perceber qual a função dos primeiros 110 aminoácidos da Pex5p, foi caracterizado o comportamento de uma versão da Pex5p humana sem estes aminoácidos (Δ N110-Pex5p), utilizando para o efeito o sistema de importação *in vitro* descrito na secção anterior.

Tal como demonstrado previamente [172], na ausência de nucleótidos exógenos, a Pex5p importada para os peroxissomas é detectada sob a forma de duas populações distintas associadas à membrana do peroxissoma e resistentes à clivagem com PK – estado 2 e estado 3 da Pex5p (Figura 9A, linha 1). Um resultado semelhante é obtido quando se adiciona ATP γ S à reacção de importação, ainda que a razão entre a quantidade de Pex5p em cada um dos estados seja diferente, obtendo-se normalmente mais estado 3 do que estado 2 (Figura 9A, linha 3). No entanto, quando a reacção de importação da Pex5p é efectuada na presença de ATP exógeno, a razão entre os dois estados da Pex5p é alterada significativamente, sendo que quase a totalidade da peroxina se apresenta no estado 2 (Figura 9A, linha 2). Tal como esperado, quando se efectuaram as mesmas experiências, mas desta vez com Δ N110-Pex5p (Figura 9A, linhas 4-6), não foi possível observar dois estados distintos da peroxina associada à membrana do peroxissoma. Esta observação encontra-se perfeitamente de acordo com o previsto, uma vez que a Δ N110-Pex5p não possui o local de clivagem reconhecido pela PK. Surpreendentemente, comparando os resultados obtidos para a importação da Pex5p com os obtidos para a importação da Δ N110-Pex5p, verifica-se uma diferença quantitativa quando a reacção é efectuada na presença de ATP exógeno (Figura 9A, linhas 2 e 5). De facto, nesta condição, ao contrário do que se passa na ausência de

nucleótidos exógenos, ou na presença de ATP γ S, a quantidade de Δ N110-Pex5p associada à membrana peroxissomal e resistente à clivagem com PK é significativamente superior à da Pex5p submetida a uma reacção de importação equivalente.

De forma a tentar perceber se a acumulação de Δ N110-Pex5p associado à membrana peroxissomal era específica, foram efectuadas algumas experiências de importação *in vitro* adicionais. Foi demonstrado anteriormente que a inserção de Pex5p na membrana do peroxissoma é um processo que depende da presença de prot-PTS1 no meio aquoso das reacções (equivalente ao citosol celular). De facto, após adição de um excesso de GST-TPRs à reacção de importação, de forma a sequestrar as proteínas contendo PTS1, a importação da Pex5p é bloqueada [318]. Quando essa experiência foi efectuada com a Δ N110-Pex5p, verificou-se que a proteína exibiu exactamente o mesmo comportamento que a Pex5p (Figura 9B). Na presença de GST-TPRs a importação da proteína era bloqueada (Figura 9B, linhas 4 e 5), sendo que esse bloqueio era revertido na presença de um excesso de proteínas recombinantes com PTS1 (Figura 9B, linha 6). Resumindo, demonstrou-se que a inserção de Δ N110-Pex5p na membrana peroxissomal é um processo dependente da presença de PTS1.

Outro critério utilizado para demonstrar a especificidade da importação de Δ N110-Pex5p consiste em utilizar anticorpos anti-Pex14p. Estudos anteriores demonstraram que a importação de Pex5p para a membrana do peroxissoma é inibida quando o PNS é pré-incubado com anticorpos direccionados contra a Pex14p [172]. Além disso, verificou-se também que na presença de IgGs anti-Pex14p a importação de uma proteína contendo PTS1 é bloqueada [200]. Quando se procedeu à importação de Δ N110-Pex5p utilizando PNS pré-incubado com IgGs anti-Pex14p constatou-se que, tal como acontece para a Pex5p, a quantidade de proteína associada à membrana do peroxissoma diminuía (Figura 9C).

Repetindo as mesmas experiências, mas desta vez utilizando IgGs (resultados não apresentados), ou fragmentos Fab anti-Pex13p, verificou-se igualmente que a importação de Pex5p ou de Δ N110-Pex5p para a membrana peroxissomal era inibida (Figura 9D). É de salientar que esta inibição se verificou não só quando se utilizou PNS nas reacções de importação (Figura 9D, linhas 1-3), mas também quando se utilizou peroxissomas purificados de fígado de rato (Figura 9D, linhas 4-6). Uma vez que os peroxissomas purificados não possuem a capacidade de exportar a Pex5p da membrana para o citosol [143], esta última observação sugere fortemente que a maioria (ou mesmo todos) os locais de acoplagem/translocação na membrana peroxissomal contêm Pex13p.

Portanto, ficou demonstrado que a importação da Δ N110-Pex5p para o peroxissoma é específica, uma vez que esta proteína apresentou o mesmo

comportamento que a Pex5p, quanto à dependência de prot-PTS1 e ao efeito da presença de anticorpos anti-Pex14p e anti-Pex13p nas reacções de importação. Ou seja, uma vez que a especificidade da importação se mantém, é possível afirmar que os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p não são indispensáveis para o reconhecimento e ligação de PTS1, nem para o endereçamento da Pex5p para o peroxissoma e posterior inserção na membrana do organelo.

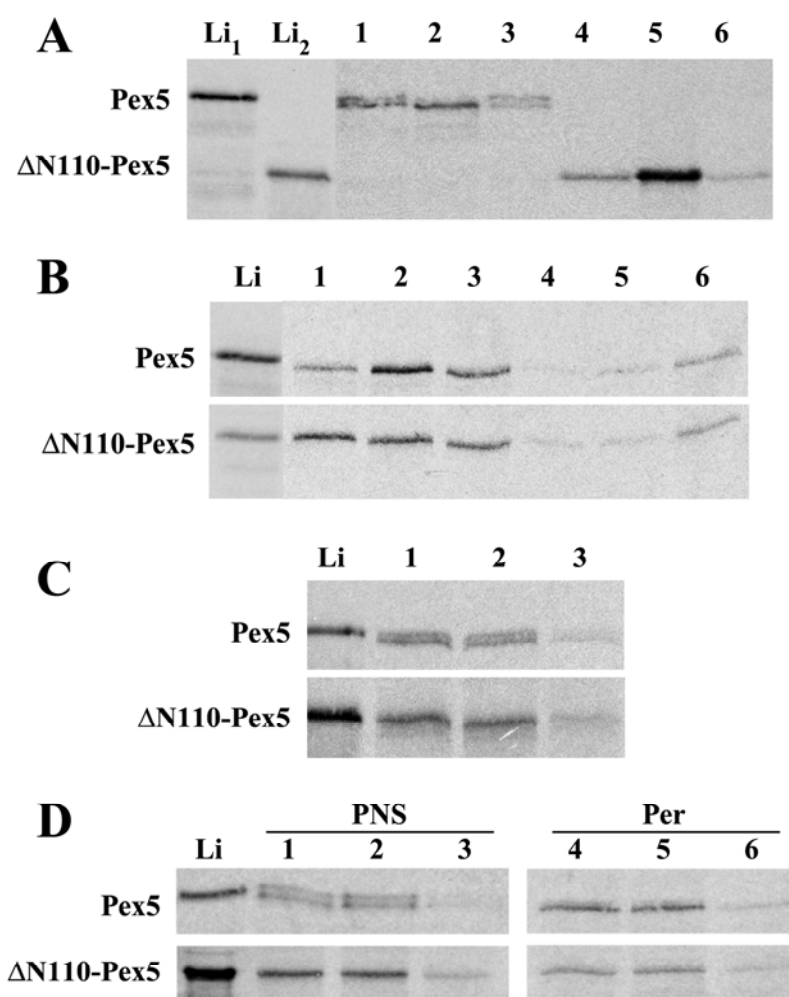


Figura 9 – ³⁵S-ΔN110-Pex5p é especificamente endereçada e inserida na membrana do peroxissoma.

A – ³⁵S-Pex5p (linhas 1-3) ou ³⁵S-ΔN110-Pex5p (linhas 4-6) foi incubada com PNS em tampão de importação na ausência de nucleótidos exógenos (linhas 1 e 4), ou na presença de 5mM ATP (linhas 2 e 5) ou 5mM ATP_γS (linhas 3 e 6). As linhas Li₁ e Li₂ representam ~5% dos lisados de reticulócito contendo ³⁵S-Pex5p e ³⁵S-ΔN110-Pex5p, respectivamente, utilizados nas reacções de importação. **B** – ³⁵S-Pex5p ou ³⁵S-ΔN110-Pex5p foi incubada com PNS em tampão de importação suplementado com 5mM ATP, na presença de 0,17μM GST (linhas 1-3) ou GST-TPRs (linhas 4-6). Nalgumas reacções de importação incluiu-se também 8μM das proteínas

recombinantes GST-LKS (linhas 2 e 5) ou GST-SKL (linhas 3 e 6). **C** – Após incubação durante 20 minutos em gelo, de PNS na ausência de IgGs (linha 1), ou na presença de IgGs pré-ímmes (linha 2) ou IgGs anti-Pex14p (linha 3), as amostras resultantes foram submetidas a reacções de importação com ^{35}S -Pex5p ou ^{35}S - ΔN110 -Pex5p, na ausência de nucleótidos exógenos. **D** – Após incubação durante 20 minutos em gelo, de PNS ou peroxissomas na ausência de fragmentos Fab (linhas 1 e 4), ou na presença de fragmentos Fab pré-ímmes (linhas 2 e 5) ou anti-Pex13p (linhas 3 e 6), as amostras resultantes foram submetidas a reacções de importação com ^{35}S -Pex5p ou ^{35}S - ΔN110 -Pex5p, na ausência de nucleótidos exógenos. As linhas *Li* representam ~5% dos lisados de reticulócito contendo ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔN110 -Pex5p (painéis superiores e painéis inferiores, respectivamente), utilizados nas reacções de importação. Todas as experiências de importação *in vitro* apresentadas nesta figura foram efectuadas a 26°C, tendo sido as amostras tratadas com PK e analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia.

4.2.3- ΔN110 -Pex5p não é exportada da membrana do peroxissoma para o citosol

Após importação na presença de ATP exógeno a quantidade de ΔN110 -Pex5p associada à membrana do peroxissoma e resistente à acção da PK é muito elevada, quando comparada com a obtida com a Pex5p submetida às mesmas condições (Figura 9A, linhas 2 e 5). Tal como ficou demonstrado nas experiências anteriores, esse aumento na quantidade de proteína associada ao peroxissoma deriva de um processo específico. Uma vez que na presença de ATP o nosso sistema de importação permite a importação e exportação da Pex5p [143], a acumulação de ΔN110 -Pex5p sugere fortemente que esta versão da peroxina apresenta problemas na exportação da membrana do peroxissoma para o citosol, acumulando-se no organelo.

De forma a tentar validar esta hipótese efectuou-se uma experiência de *pulse-chase in vitro*, tal como descrito em [172]. Nesta experiência foi testado o comportamento de 4 proteínas distintas: Pex5p, ΔN110 -Pex5p, ΔC1 -Pex5p e ΔN17 -Pex5p. Esta última proteína foi testada numa fase posterior do trabalho (ver parágrafo seguinte). De um modo sumário a experiência de *pulse-chase* consistiu na incubação da Pex5p (ou variantes) sintetizada *in vitro* com PNS, durante 15 minutos, na ausência de nucleótidos exógenos (*pulse*). Seguidamente, e de forma a bloquear a importação das proteínas marcadas radioactivamente, foi adicionado um excesso de GST-Pex5p, e a mistura resultante foi incubada durante mais 7 minutos. Após a incubação foi retirada uma alíquota da amostra (Figura 10, linha 1) e foi adicionado ATP (concentração final 5mM) ao restante (*chase*). Procedeu-se a uma nova incubação, tendo sido retiradas mais duas

alíquotas, ao fim de 8 e 23 minutos (Figura 10, linhas 2 e 3, respectivamente). Verificou-se que a quantidade de Pex5p e de Δ C1-Pex5p associada à membrana do peroxissoma diminuiu em função do tempo, o que revela que estas proteínas são substratos para a maquinaria de exportação do peroxissoma, que as recoloca no citosol. Portanto, os aminoácidos 325-639 da Pex5p não são indispensáveis para a exportação da peroxina para o citosol. Observando os resultados obtidos para a Δ N110-Pex5p, constata-se que esta proteína apresenta uma quantidade associada à membrana do peroxissoma constante em função do tempo, o que indica que a Δ N110-Pex5p não possui a capacidade de ser exportada para o citosol.

Tendo por base este último resultado, tentou-se produzir formas da Pex5p com truncagens N-terminais que envolvessem uma deleção menor do que 110 aminoácidos, de forma a tentar mapear mais finamente a região envolvida no fenómeno em causa. Após várias tentativas infrutíferas, foi finalmente obtida uma forma da Pex5p sem os 17 aminoácidos N-terminais (Δ N17-Pex5p). A expressão desta proteína apresentou-se fraca, o que limitou significativamente a sua utilização. No entanto, foi possível utilizar a Δ N17-Pex5p numa experiência de *pulse-chase*, que revelou que, tal como acontecia com a Δ N110-Pex5p, a quantidade de Δ N17-Pex5p associada à membrana peroxissomal também permanece constante. Esta observação indica que esta proteína também não é um substrato para a maquinaria de exportação peroxissomal. Ou seja, os aminoácidos 18-110 da Pex5p não são suficientes para promover a exportação da peroxina para o citosol, sendo necessários os 17 aminoácidos N-terminais para que o processo ocorra.

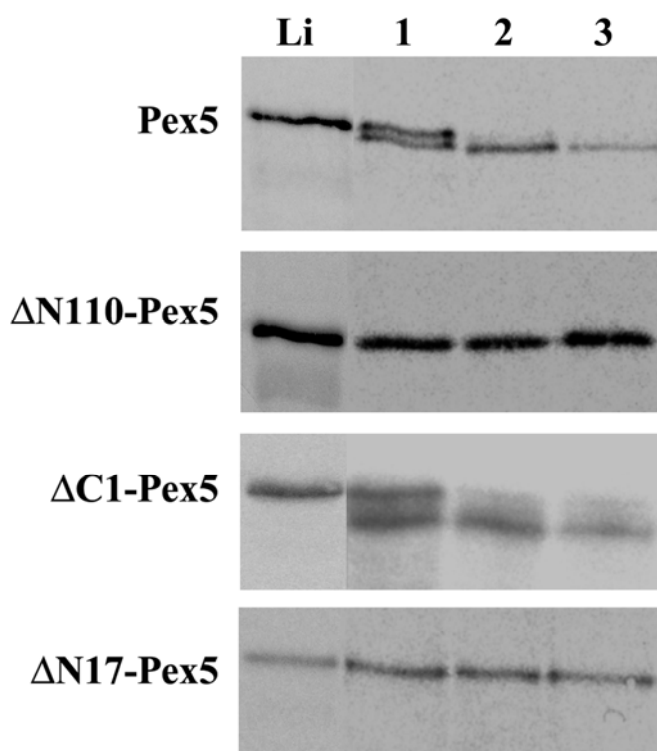


Figura 10 – Análise da capacidade de exportação de versões da Pex5p.

Após incubação de ^{35}S -Pex5p, ^{35}S - ΔN110 -Pex5p, ^{35}S - ΔC1 -Pex5p ou ^{35}S - ΔN17 -Pex5p com 450 μg de PNS, num volume final de 300 μL , na ausência de nucleótidos exógenos, durante 15 minutos a 26°C, foi adicionado um excesso de GST-Pex5p às amostras, de forma a bloquear a importação das proteínas marcadas radioativamente. Após 7 minutos de incubação, foi recolhida uma alíquota correspondente a 150 μg de PNS (linha 1). Seguidamente foi adicionado ATP (concentração final 5mM), e procedeu-se a nova incubação. Após 8 e 23 minutos de incubação, foram retiradas alíquotas correspondentes a 150 μg cada (linhas 2 e 3, respectivamente). Todas as alíquotas foram tratadas com PK e analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia. As linhas *Li* representam os lisados de reticulócito contendo as versões da Pex5p utilizadas nas reacções de importação.

4.2.4- Estudo do efeito da temperatura nos processos de importação e exportação da Pex5p

Apesar de vários trabalhos terem sido publicados acerca do processo de importação da Pex5p para a membrana do peroxissoma, e do processo de exportação da peroxina para o citosol, o conhecimento desses processos permanece ainda muito escasso.

De forma a tentar contribuir para um esclarecimento maior do processo de exportação da Pex5p, foi analisada a influência da temperatura na cinética do processo. Anteriormente tinha sido verificado que, no nosso sistema de importação *in vitro*, a quantidade de ^{35}S -Pex5p associada à membrana do peroxissoma e resistente à acção da PK variava consoante a temperatura utilizada para a importação [172]. Constatou-se que, quando as experiências eram efectuadas a 37°C, essa quantidade era menor do que a 26°C. Além disso, noutro trabalho foi demonstrado que culturas celulares submetidas a temperaturas mais baixas (16°C) apresentam uma acumulação de Pex5p associada com os peroxissomas [326].

A experiência de análise do efeito da temperatura no processo de exportação da Pex5p foi efectuada recorrendo à utilização de duas proteínas diferentes em simultâneo, Pex5p e ΔN110 -Pex5p. Basicamente a experiência consistiu em incubar PNS na presença de 5mM ATP, durante 10 minutos, a 26°C. Esta incubação teve como objectivo promover a exportação de Pex5p endógena dos locais de acoplagem/translocação da membrana do peroxissoma. Seguidamente a mistura reaccional foi separada em três porções iguais, e adicionada a tubos contendo solução tampão de importação previamente equilibrada a 16°C, 26°C ou 37°C, e contendo ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔN110 -Pex5p. As amostras foram incubadas à respectiva temperatura, tendo sido retiradas alíquotas iguais após 2,5, 7,5, 15 e 25 minutos de incubação. Essas alíquotas foram submetidas a digestão com PK, e a quantidade de proteína radioactiva resistente à acção da PK em cada uma delas foi quantificada (Figura 11).

Analisando os resultados constatou-se que a 16°C ambas as versões da Pex5p apresentam um aumento em função do tempo na quantidade associada à membrana do peroxissoma e resistente à acção da PK. Comparando as quantidades relativas da Pex5p e da ΔN110 -Pex5p nas alíquotas verificou-se que a razão entre elas permaneceu praticamente constante em função do tempo (ver gráfico da Figura 11). Portanto, uma vez que a ΔN110 -Pex5p não é exportada da membrana peroxissomal para o citosol, conclui-se que a 16°C a Pex5p também não é exportada, acumulando-se na membrana do peroxissoma, uma vez que apresenta o mesmo comportamento cinético que a ΔN110 -Pex5. No entanto, quando a temperatura analisada foi 26°C ou 37°C, tal já não se verificou. Apesar de em ambas as condições a ΔN110 -Pex5p ter continuado a apresentar um comportamento revelador da sua acumulação na membrana do peroxissoma, a Pex5p atingiu uma situação de equilíbrio, a partir da qual a quantidade da peroxina associada à membrana peroxissomal não aumentou. Analisando o gráfico apresentado na Figura 11, constatou-se que a 26°C e a 37°C a razão entre a quantidade de Pex5p e ΔN110 -Pex5p resistente à acção da PK originou uma curva côncava, que tendia para

zero. Este efeito foi particularmente notório na experiência efectuada a 37°C, uma vez que o estado de equilíbrio da Pex5p foi atingido antes dos 2,5 minutos de incubação. Esta observação significa que o tempo de semi-vida da Pex5p associada à membrana peroxissomal é inferior a 2,5 minutos, uma vez que, em equilíbrio, a taxa de exportação da Pex5p é igual à taxa de importação.

Portanto, após análise dos resultados verificou-se que estes estavam não só de acordo com os resultados *in vitro* descritos em cima [172], como forneciam a explicação para o facto de a quantidade de Pex5p associada aos peroxissomas aumentar, *in vivo*, quando se submetem culturas celulares a temperaturas baixas [326]. Ou seja, a acumulação de Pex5p nos peroxissomas verificada quando se diminui a temperatura é consequência de uma inibição do processo de exportação da peroxina para o citosol e não de uma inibição do processo de importação, tal como proposto pelos autores desse trabalho [326].

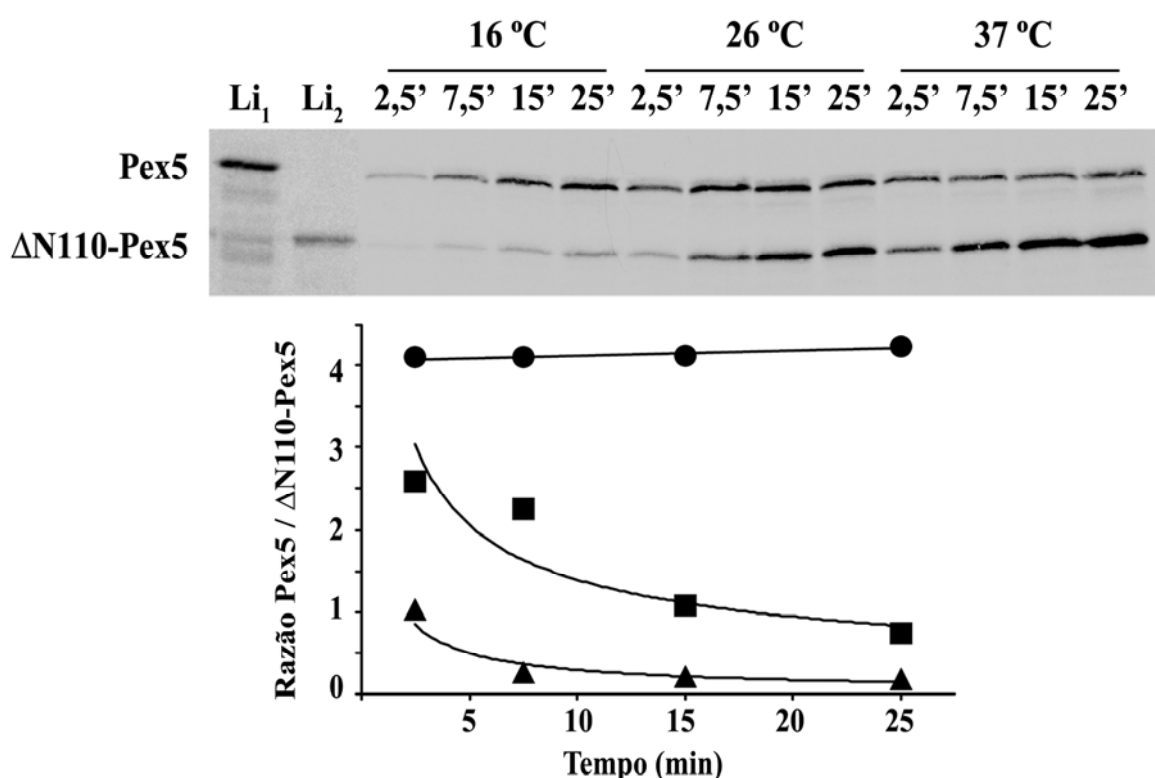


Figura 11 – Ao contrário da importação da Pex5p, a exportação da peroxina do peroxissoma para o citosol, é bloqueada a temperaturas baixas.

De forma a libertar alguns locais de acoplagem/translocação peroxissomais da Pex5p endógena [143], procedeu-se à incubação de PNS (5,4mg de proteína) em 600μL de tampão de importação na presença de 5mM ATP, durante 10 minutos a 26°C. Seguidamente a amostra foi dividida em três porções iguais (1,8mg de proteína cada) e adicionada a três tubos contendo ³⁵S-Pex5p e ³⁵S-ΔN110-Pex5p em 200μL de tampão de importação suplementado com 5mM ATP e

um sistema de regeneração de ATP, pré-equilibrado a 16°C, 26°C ou 37°C. As amostras foram depois incubadas às respectivas temperaturas, tendo sido recolhidas alíquotas de 450µg de PNS nos tempos indicados no topo da figura. Todas as alíquotas foram tratadas com PK e analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia. As linhas Li_1 e Li_2 representam os lisados de reticulócito contendo ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔN110 -Pex5p, respectivamente, utilizados nas reacções de importação. No painel inferior encontra-se apresentada uma análise densitométrica da quantidade de Pex5p e ΔN110 -Pex5p resistente à acção da PK. A razão Pex5p/ ΔN110 -Pex5p obtida a 16°C (círculos), 26°C (quadrados) e 37°C (triângulos), encontra-se representada em função do tempo.

4.2.5- Caracterização da transição de estado 2 para estado 3 da Pex5p

Analisando a Figura 11, verifica-se que apesar de a exportação da Pex5p estar inibida a 16°C, a quantidade de estado 3 da Pex5p obtida não é significativa. Esta observação sugere que a transição entre estado 2 e estado 3 da Pex5p é dependente da temperatura.

Para testar se a hipótese levantada em cima estava correcta, foi efectuada uma nova experiência de importação *in vitro*. Nessa experiência utilizou-se ^{35}S - ΔN110 -Pex5p como um controlo interno. Basicamente a experiência consistiu em incubar ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔN110 -Pex5p com PNS durante 15 minutos, a 26°C, na presença de 1mM ATP. Seguidamente foi adicionado um excesso de GST-Pex5p, de forma a bloquear a importação de mais proteína radioactiva. Procedeu-se a uma nova incubação, durante 7 minutos, no fim da qual foi retirada uma alíquota. A amostra foi dividida em três porções iguais, e transferida para três tubos contendo tampão de importação suplementado com 10mM ATP γ S, previamente equilibrado a 16°C, 26°C e 37°C. As três amostras foram incubadas às respectivas temperaturas, tendo sido retiradas alíquotas após 8 e 23 minutos de incubação. Analisando os resultados obtidos (Figura 12), verificou-se que a 16°C quase a totalidade da Pex5p resistente à acção da PK se apresentou sob a forma de estado 2. Quando a incubação foi efectuada a 26°C ou 37°C, verificou-se uma distribuição dupla da Pex5p, apresentando-se sob a forma de estado 2 e estado 3.

Demonstrou-se, portanto, que a transição entre estado 2 e estado 3 da Pex5p é um processo dependente da temperatura.

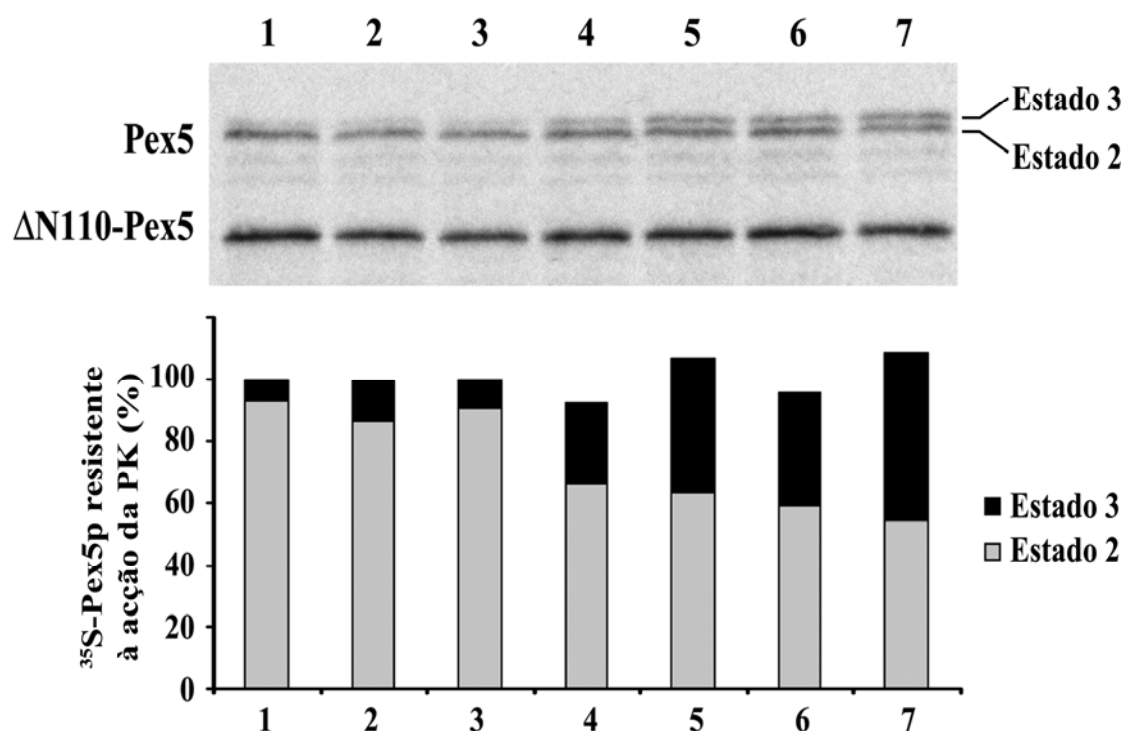


Figura 12 – A transição entre o estado 2 e o estado 3 da Pex5p é dependente da temperatura.

Após incubação de ^{35}S -Pex5p e ^{35}S - ΔN110 -Pex5p com PNS, em tampão de importação suplementado com 1mM ATP, durante 15 minutos a 26°C, foi adicionado um excesso de GST-Pex5p, de forma a bloquear a importação das proteínas radioactivas, e a mistura resultante foi incubada durante 7 minutos. Seguidamente foi recolhida uma alíquota (linha 1), e a amostra foi dividida em 3 porções iguais. Essas porções foram adicionadas a três tubos contendo tampão de importação suplementado com 10mM ATP γ S, pré-equilibrado a 16°C (linhas 2 e 3), 26°C (linhas 4 e 5) ou 37°C (linhas 6 e 7). Procedeu-se a uma incubação à temperatura respectiva, e foram recolhidas alíquotas após 8 (linhas 2, 4 e 6) e 23 minutos de incubação (linhas 3, 5 e 7). Todas as alíquotas foram tratadas com PK e analisadas por SDS-PAGE e autorradiografia. Foi efectuada uma análise densitométrica da quantidade de ^{35}S -Pex5p resistente à acção da PK (estado 2 + estado 3), e o valor obtido foi normalizado para a quantidade de ^{35}S - ΔN110 -Pex5p presente em cada linha. O valor obtido para a linha 1 foi definido como sendo 100%. Os valores obtidos para cada linha encontram-se apresentados no gráfico, onde a porção cinzenta das barras representa o estado 2 da Pex5p e a porção preta o estado 3. Os números no eixo do x representam as linhas da autorradiografia.

5- DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

5.1- Estudo de algumas das interacções proteicas centradas na Pex5p

Tal como referido no capítulo 1.3.3.4.1, a Pex5p é uma peroxina envolvida em várias interacções proteína-proteína. O ensaio de proteólise parcial por nós desenvolvido é uma ferramenta extremamente útil no estudo e caracterização dessas (e de outras) interacções envolvendo a Pex5p humana. Através da realização desse ensaio é possível, por exemplo, testar novos ligandos para a peroxina, caracterizar domínios envolvidos em determinadas interacções, bem como detectar alterações conformacionais que possam resultar da ligação da Pex5p com outras proteínas/péptidos. Além disso, com o nosso ensaio é possível, em princípio, detectar interacções fracas que envolvam a Pex5p, uma vez que, ao contrário de várias técnicas de detecção de interacções proteína-proteína *in vitro*, não é necessário efectuar lavagens dos complexos formados.

Vários trabalhos foram publicados acerca do estado oligomérico da Pex5p, tendo sido sugerido que esta proteína se encontra sob a forma tetramérica em vários organismos (ver capítulo 1.5 e [189, 191, 192, 201, 313]). O facto de a Pex5p ser o receptor das proteínas matriciais, que são importadas para o peroxissoma na sua forma nativa/oligomérica, juntamente com a propriedade de oligomerização da Pex5p, serviram de base à criação do “modelo do pré-íplex” (ver capítulo 1.5 e [42]). De uma forma geral, este modelo propunha que como cada subunidade de uma proteína matricial possui um PTS1, e a Pex5p tetramérica possui 4 locais de ligação a PTS1, esta multivalência de ligações criava uma rede de ligações, levando à formação de complexos proteicos enormes contendo Pex5p e proteínas com PTS1. Além disso, a multivalência na interacção entre a Pex5p e a Pex14p servia para aumentar o tamanho dos complexos, bem como associá-los à membrana do peroxissoma. Este fenómeno provocaria um aumento na concentração de proteínas peroxissomais junto à membrana do organelo, o que facilitaria, presumivelmente, a importação das mesmas para o interior do peroxissoma. No entanto, as evidências experimentais relativas à tetramerização da Pex5p, e que serviram de premissa à criação do “modelo do pré-íplex” podem, na realidade, ser artefactuais, ou resultar de interpretações erradas dos resultados obtidos.

Analisando a bibliografia, constata-se que a análise do estado oligomérico da Pex5p não é uma tarefa simples, uma vez que já foi demonstrado que esta peroxina possui a capacidade de se agregar [189, 201]. Por exemplo, a Pex5p humana recombinante purificada na ausência de agentes redutores apresenta uma fracção

oligomérica (dados não publicados), o mesmo sucedendo quando a proteína se encontra em soluções tampão de baixa força iónica [201]. Ou seja, é possível obter preparações proteicas heterogéneas, fruto da capacidade de agregação da Pex5p. Esta propriedade da Pex5p pode estar na origem de algumas observações incorrectas que revelaram que a peroxina é uma proteína tetramérica. Verificou-se igualmente que preparações de Pex5p humana recombinante apresentavam estruturas quadrangulares, quando observadas em microscopia electrónica, através de coloração negativa [201]. Recentemente foi publicado um trabalho onde se observou o mesmo tipo de estruturas em preparações de Pex5p de *H. polymorpha* [327]. No entanto, e apesar de ter sido sugerido que essas partículas representavam moléculas de Pex5p tetramérica, há algumas considerações que merecem ser efectuadas acerca das mesmas. Em primeiro lugar, em nenhum dos trabalhos foram obtidas as três dimensões indispensáveis para a determinação do volume das partículas. De facto, em ambos os estudos a terceira dimensão foi atribuída pelos autores de forma a originar o resultado mais compatível com uma estrutura tetramérica! Em segundo lugar, não foi demonstrado que essas estruturas quadrangulares eram de facto compostas pela peroxina. Na técnica utilizada a Pex5p foi submetida a um processo de adsorção a grelhas de microscopia previamente tratadas por *glow-discharge*, o que significa que as grelhas se encontravam carregadas negativamente. Uma vez que a Pex5p é uma proteína extremamente ácida ($pI \approx 4,5$), será que nessas condições a Pex5p adsorbe às grelhas? Neste contexto, é importante referir que 1 μ L de uma solução proteica contendo Pex5p a uma concentração de 0,1 μ g/ μ L (o volume e a concentração normalmente utilizados na técnica de coloração negativa) contém cerca de 10^{11} moléculas da peroxina. Sendo assim, será que as centenas ou poucos milhares de partículas quadrangulares observadas nestas grelhas são constituídas por Pex5p ou representam, antes, alguma proteína de *E. coli*? Resumindo, apesar de terem sido observadas partículas quadrangulares em preparações de Pex5p humana e de *H. polymorpha*, a sua composição e relevância fisiológica/funcional permanece por esclarecer.

Outra característica da Pex5p que poderá ter induzido em erro alguns autores prende-se com o facto de a peroxina apresentar uma forma não globular, tal como demonstrado pelos resultados por nós obtidos. De facto, a utilização de cromatografia de filtração em gel como única técnica para estimar a massa molecular de uma proteína só é aplicável quando essa proteína é globular. Ou seja, se a proteína possuir uma conformação diferente, o seu raio de Stokes vai aumentar, o que levará a erros na estimativa da massa molecular correspondente. Foi isto, de facto, o que aconteceu em vários trabalhos envolvendo a Pex5p [189, 192, 201]. Por exemplo, em *L. donovani* a Pex5p aparenta ser tetramérica, quando analisada em cromatografia de filtração em gel

[314]. No entanto, posteriormente verificou-se que tentativas para demonstrar a existência desses tetrâmeros através de ensaios de ligação a PTS1 falharam. Nesse trabalho verificou-se que a Pex5p apenas ligava um PTS1, tendo sido sugerido que a ligação a PTS1 provocava a monomerização da peroxina [192]. No entanto, comparando os resultados obtidos para a Pex5p de *L. donovani* com os nossos resultados envolvendo a Pex5p humana, pode-se especular que provavelmente a primeira também possui uma forma não globular, o que explicaria a suposta existência de tetrâmeros. Além disso, se se comparar os resultados obtidos em cromatografia de filtração em gel para a região N-terminal da Pex5p de *L. donovani*, e humana, verifica-se que, mais uma vez, existem semelhanças. A diferença está na forma de interpretar os resultados, pois para *L. donovani* foi proposto que essa região da Pex5p hexameriza em solução, enquanto que os nossos resultados sugerem que o comportamento da região N-terminal da Pex5p humana se deve a uma forma não globular da proteína, apesar de ser monomérica.

Em *H. polymorpha* foi sugerido que a Pex5p apresenta também uma estrutura tetramérica [191]. Neste caso, a massa molecular foi estimada a partir de espectroscopia de correlação de fluorescência, uma técnica que permite determinar a constante de difusão de proteínas. Ou seja, se a proteína não for globular (como é o caso da Pex5p humana), os resultados vão sugerir uma massa molecular superior à real. Nesse trabalho foi estimado que a Pex5p, a pH 7,2, forma um complexo heterodimérico com a Pex8p, com uma conformação globular [191]. Com base nesse resultado é possível especular que, por exemplo, a interação entre as duas peroxinas provoca na Pex5p de *H. polymorpha* alterações conformacionais significativas. Infelizmente, não foram determinados os coeficientes de sedimentação para a Pex5p e para o complexo [Pex5p.Pex8p], uma vez que através dessa determinação seria possível comprovar (ou refutar) a hipótese levantada.

Resumindo, após análise dos resultados previamente publicados, juntamente com os resultados por nós obtidos, constata-se que, muito provavelmente, o “modelo do pré-implex” não traduz o que na realidade se passa durante a importação de proteínas para a matriz do peroxissoma.

A obtenção de um valor elevado para o raio de Stokes e de um valor reduzido para o coeficiente de sedimentação da $\Delta C1$ -Pex5p revela que esta porção da peroxina não possui uma conformação globular. Existem duas possibilidades para explicar este facto: ou a proteína apresenta uma forma estruturada e alongada ou então apresenta uma conformação desordenada (*natively unfolded*, ver [328]). Os dados apresentados nesta tese sugeriam que muito provavelmente a segunda hipótese seria a correcta, uma vez que a Pex5p apresenta uma elevada susceptibilidade à acção das proteases. De facto, dados recentes obtidos no nosso laboratório vieram suportar esta hipótese.

Recorrendo a diversas técnicas biofísicas e bioquímicas verificou-se que a metade N-terminal da Pex5p humana é maioritariamente desordenada [329].

A região C-terminal da Pex5p possui vários domínios TPRs. De acordo com vários estudos publicados, essa região aparenta ser monomérica, com propriedades hidrodinâmicas de acordo com o esperado para uma proteína globular [183, 201, 314]. Estes resultados encontram-se em claro contraste com as propriedades hidrodinâmicas da região N-terminal da Pex5p. De facto, comparando os raios de Stokes e os coeficientes de sedimentação determinados para a Pex5p e para a Δ C1-Pex5p, verifica-se que as propriedades hidrodinâmicas da peroxina aparentam ser uma consequência da conformação da sua região N-terminal. Esta hipótese está de acordo com observações que revelam que pequenas deleções na região N-terminal da Pex5p podem induzir alterações acentuadas no comportamento das proteínas em cromatografia de filtração em gel ([192] e resultados não publicados).

Após análise dos resultados obtidos para os raios de Stokes da Pex5p e da Δ C1-Pex5p, verifica-se que os dois valores não são muito distintos. Essa proximidade entre os valores determinados poderá sugerir que a interacção entre a região N-terminal e a região C-terminal da Pex5p ocorre lateralmente. Neste modelo seria relativamente fácil entender porque é que, tal como descrito neste trabalho e em [185, 204] a ligação de PTS1 à Pex5p provoca alterações conformacionais na Pex5p que envolvem regiões a montante dos TPRs. Além disso, já foram descritas interacções entre as duas metades da Pex5p [330]. De facto, os TPRs podem servir como um regulador negativo no endereçamento da Pex5p para os peroxissomas [318]. Neste caso pode-se especular que os TPRs interactivam com a região N-terminal da Pex5p, e que a ligação de PTS1 aos TPRs pode induzir alterações conformacionais nesse domínio, expondo o sinal de endereçamento da peroxina (*long range interactions*). Alternativamente, pode-se supor que não ocorrem interacções laterais entre os TPRs e a região N-terminal da Pex5p, mas que a ligação de PTS1 aos TPRs induz alterações conformacionais que são propagadas ao longo da estrutura da proteína, afectando regiões da peroxina significativamente afastadas (*short range interactions*). No entanto, o facto de versões da Pex5p com deleções nos TPRs serem importadas do citosol para o peroxissoma e exportadas do organelo para o citosol ([210, 318] e capítulo 4.2.3), não é compatível com este último modelo.

5.2- Caracterização funcional do N-terminus da Pex5p humana

Nesta parte do trabalho, foram efectuadas experiências de importação *in vitro* [172], de forma a tentar caracterizar funcionalmente os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p humana.

Foi demonstrado que os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p não são indispensáveis para o reconhecimento e ligação da peroxina a PTS1, bem como para o endereçamento da Pex5p para a membrana peroxissomal. Verificou-se também que o endereçamento da Δ N110-Pex5p, tal como acontece para a Pex5p, é um processo específico. Uma vez que os locais de ligação da PTS1, Pex7p, Pex13p e Pex14p se encontram presentes na Δ N110-Pex5p (ver capítulo 1.3.3.4.1), estas observações encontram-se de acordo com o esperado.

Um dos critérios utilizados para demonstrar a especificidade da importação da Δ N110-Pex5p para os peroxissomas envolveu a utilização de anticorpos anti-Pex13p. Esta peroxina é uma proteína intrínseca da membrana do peroxissoma, cuja função permanece envolvida nalguma controvérsia (ver capítulo 1.3.3.4.4). Várias têm sido as funções atribuídas à Pex13p, nomeadamente: factor de acoplagem da Pex5p à membrana peroxissomal, factor envolvido na libertação das prot-PTS1 da Pex5p e/ou na reciclagem do receptor para o citosol. Além disso, já foi demonstrado que a Pex13p interacciona com a Pex5p e com a Pex14p ([256] e capítulo 1.3.3.4.4). O facto de fragmentos Fab anti-Pex13p, inibirem a importação de ^{35}S -Pex5p para a membrana peroxissomal, quando se utiliza PNS nas reacções de importação, pode ser interpretado de duas formas distintas. Por um lado, uma diminuição na quantidade de Pex5p radioactiva associada à membrana peroxissomal pode ser causada por uma inibição directa no processo de importação da peroxina. Alternativamente, tal diminuição pode derivar de um bloqueio no processo de exportação da peroxina para o citosol (se a Pex5p endógena não for exportada dos peroxissomas, os locais de acoplagem/translocação não vão ficar disponíveis para a peroxina sintetizada *in vitro*). De forma a tentar clarificar este aspecto, as experiências de importação *in vitro* foram também efectuadas utilizando peroxissomas purificados, uma vez que havia sido demonstrado anteriormente que estes, apesar de não serem competentes na exportação da Pex5p, apresentam uma actividade de importação da peroxina significativa. Como se verificou também uma diminuição na importação da Pex5p radioactiva para peroxissomas purificados, pode então concluir-se que a inibição causada pelos fragmentos Fab anti-Pex13p se deu ao nível da importação da peroxina para o peroxissoma, e não da sua exportação para o citosol.

Verificou-se que apesar da $\Delta N110$ -Pex5p apresentar a mesma especificidade de importação para os peroxissomas que a Pex5p, a acumulação das duas proteínas em associação com a membrana peroxissomal é distinta. Foi demonstrado que a $\Delta N110$ -Pex5p se acumula após importação porque não possui a capacidade de ser exportada da membrana peroxissomal para o citosol. Vários trabalhos demonstraram a necessidade de ATP para o processo de exportação da Pex5p [143-145]. No entanto, os detalhes mecânicos do processo permanecem por esclarecer. De facto, a exportação da Pex5p pode ser entendida como um processo em que o papel da(s) ATPase(s) é o de desmontar o complexo de acoplamento/translocação, sequestrando as peroxinas que interagem com a Pex5p, promovendo a exportação desta última para o citosol. Por outro lado, um papel mais activo pode ser sugerido para a Pex5p, uma vez que a(s) ATPase(s) podem promover a exportação da peroxina interagindo directamente com a proteína, puxando-a para o citosol. Apesar de os resultados obtidos com a $\Delta N110$ -Pex5p não revelarem inequivocamente qual das duas situações ocorre, a segunda hipótese apresenta-se como mais provável, uma vez que os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p podem ser, de facto, o local de interacção da peroxina com a(s) ATPase(s), pois são indispensáveis para o processo de exportação da Pex5p.

O facto de a quantidade de $\Delta N110$ -Pex5p resistente à acção da PK permanecer constante nas experiências de *pulse-chase* (Figura 10), significa que o processo de associação da Pex5p com a membrana peroxissomal, tornando a peroxina resistente à protease, é um processo irreversível.

Numa tentativa de mapear a região da extremidade N-terminal da Pex5p necessária para a exportação da peroxina, submeteu-se uma versão da peroxina sem os 17 aminoácidos N-terminais ($\Delta N17$ -Pex5p) a experiências de *pulse-chase*. Após análise dos resultados verificou-se que a $\Delta N17$ -Pex5p também não era exportada, o que permitiu concluir que os aminoácidos 18-110 da Pex5p não são capazes, por si só, de promover a exportação da peroxina. Apesar da estrutura primária da região N-terminal da Pex5p de diferentes espécies se apresentar muito pouco conservada, os 17 aminoácidos N-terminais da peroxina contêm uma sequência existente em quase todas as Pex5p conhecidas (Cys-X_n-Asn-Pro-Leu, com n=3-9) (dados não apresentados). Na realidade, num trabalho recente efectuado no nosso laboratório verificou-se que se se substituir o resíduo de cisteína por um resíduo de serina a Pex5p deixa de ser exportada, o que revela que esse resíduo é indispensável para o processo [331]. Curiosamente, analisando a estrutura primária da Pex20p de *N. crassa* e *Y. lipolytica* [244, 245], constata-se que estas peroxinas possuem na sua região N-terminal uma sequência semelhante (Cys-X_n-Asn-(Ala/Gly)-(Leu/Ala)). A Pex20p é uma peroxina envolvida na

importação de proteínas com PTS2, nomeadamente no endereçamento do complexo [Pex7p-proteína contendo PTS2]. Uma vez que esta função é desempenhada pela Pex5p em plantas, e pela Pex5pL em mamíferos (ver capítulo 1.3.3.4.1), a presença de uma sequência semelhante na região N-terminal destas peroxinas sugere que a sua importância para o funcionamento das peroxinas é elevada, o que ditou a conservação evolutiva da sequência.

Analisando o comportamento da Pex5p Δ C1 nas experiências de *pulse-chase*, verificou-se que esta versão da peroxina aparenta ser importada e exportada. Ou seja, uma vez que a Pex5p Δ C1 não possui a região C-terminal da Pex5p que compreende os TPRs, esta região não está envolvida em interações cruciais com a maquinaria de exportação. Portanto, a informação necessária para a exportação da Pex5p da membrana peroxissomal para o citosol reside na região N-terminal da peroxina. No entanto, o processo de exportação (que envolve a região N-terminal da Pex5p) e o processo de libertação das prot-PTS1 da Pex5p (que envolve os TPRs), têm que estar coordenados. É possível que essa coordenação ocorra através de alterações conformacionais em peroxinas de membrana que se encontrem em contacto com a Pex5p. Essas alterações podem, por um lado, promover uma diminuição da afinidade da peroxina para PTS1, e por outro lado, activar a(s) ATPase(s) envolvidas na exportação da Pex5p. Existem várias peroxinas que são potenciais candidatos a desempenhar essa função, nomeadamente, a Pex13p, Pex8p e/ou as peroxinas RING (Pex2p, Pex10p e Pex12p). Contudo, o processo de exportação da Pex5p pode ocorrer de uma forma mais directa, através de alterações conformacionais na Pex5p, resultantes, por exemplo, da libertação das prot-PTS1, ou de alterações na interacção da Pex5p com outras peroxinas. Essas alterações conformacionais podem conferir à Pex5p as propriedades estereoquímicas necessárias para o funcionamento da(s) ATPase(s), promovendo a exportação da peroxina para o citosol.

Apesar da extremidade N-terminal ser decididamente importante para a exportação da Pex5p, a forma como esse processo ocorre permanece por esclarecer. No entanto, há três observações que sugerem fortemente que a região N-terminal da Pex5p poderá ser o local de interacção da peroxina com a(s) ATPase(s). Primeiro, a Δ N110-Pex5p e a Δ N17-Pex5p não são exportadas da membrana peroxissomal para o citosol. Segundo, a passagem de estado 2 para estado 3 da Pex5p requer hidrólise de ATP, e uma vez que o estado 3 da Pex5p é caracterizado por uma resistência total da peroxina à acção proteolítica da PK, essa protecção pode ser conferida pela(s) ATPase(s) em associação com a região N-terminal da Pex5p [172]. Terceiro, quando em vez de PNS se utilizam peroxissomas para as experiências de importação *in vitro*, não se consegue

promover a exportação da Pex5p da membrana do peroxissoma, sendo que nessa condição apenas é possível obter estado 2 da Pex5p, não se obtendo estado 3. Foi proposto que, quando se utilizam peroxissomas nas experiências de importação *in vitro*, a maquinaria de exportação se encontra ausente ou inactiva [143].

De forma a tentar caracterizar melhor o processo de exportação da Pex5p, foram efectuadas determinações cinéticas do processo. Nestas experiências foi incluído um sistema de regeneração de ATP. A inclusão desse sistema de regeneração de ATP nas reacções de importação permitiu manter uma actividade peroxissomal de exportação da Pex5p por períodos mais longos (cerca de 45 minutos) (dados não apresentados). Foi demonstrado que quer o processo de importação, quer o processo de exportação da Pex5p são afectados pela temperatura. No entanto, o segundo processo apresenta uma dependência da temperatura muito mais elevada. Verificou-se que a 16°C a exportação se encontrava inibida, enquanto que a 37°C atingia o seu máximo (dentro do intervalo de temperaturas analisado). O processo de importação ocorria mesmo a 16°C. Analisando estes resultados consegue-se encontrar uma explicação mecanística para uma observação efectuada num trabalho anterior. Nesse trabalho verificou-se que diminuindo a temperatura de culturas celulares se promovia a acumulação *in vivo* de Pex5p nos peroxissomas [326]. Os autores sugeriram que essa acumulação estaria relacionada com uma inibição no processo de translocação. No entanto, a explicação para o observado apresenta-se agora distinta, uma vez que a acumulação verificada pode ser explicada por uma inibição no processo de exportação da Pex5p para o citosol.

Uma vez que se verificou que a 37°C, a Pex5p resistente à acção da PK permanece constante em todos os pontos experimentais, e que a primeira alíquota da reacção foi retirada após 2,5 minutos de incubação, pode concluir-se que o tempo de semi-vida da Pex5p em associação com a membrana do peroxissoma é inferior a 2,5 minutos. Esta conclusão tem por base que, uma vez em equilíbrio, a taxa de importação da Pex5p é igual à taxa de exportação.

Após se ter constatado que a 16°C, apesar de haver importação da Pex5p para os peroxissomas, a peroxina não era reciclada para o citosol, foi efectuada uma experiência de forma a tentar esclarecer o que se passava com a transição entre estado 2 e estado 3 da Pex5p a essa temperatura. Verificou-se que essa transição se encontrava inibida, o que permitiu concluir que a inibição no processo de exportação da Pex5p para o citosol era causada por um bloqueio na transição de estado 2 para estado 3 da peroxina.

Na Figura 13 encontra-se proposto um modelo de actuação da Pex5p no processo de importação de proteínas para a matriz do peroxissoma em mamíferos. Este modelo já foi abordado no capítulo 1.4. No entanto, nesta tese foram apresentados dados novos

que vêm acrescentar alguns detalhes mecanísticos a alguns passos do modelo de actuação da Pex5p, nomeadamente:

1. Verificou-se que a Pex5p é uma proteína monomérica, o que retira a base experimental ao “modelo do pré-implex”;
2. Verificou-se que a ligação de PTS1 à Pex5p provoca alterações conformacionais na peroxina, numa região a montante dos TPRs;
3. Verificou-se que o passo de inserção da Pex5p na membrana peroxissomal é um passo irreversível;
4. A transição entre estado 2 e estado 3 da Pex5p é extremamente dependente da temperatura, sugerindo o envolvimento de uma enzima (Pex1p e/ou Pex6p?) neste processo;
5. Os 17 aminoácidos N-terminais da Pex5p são indispensáveis para a exportação da Pex5p da membrana do peroxissoma para o citosol.

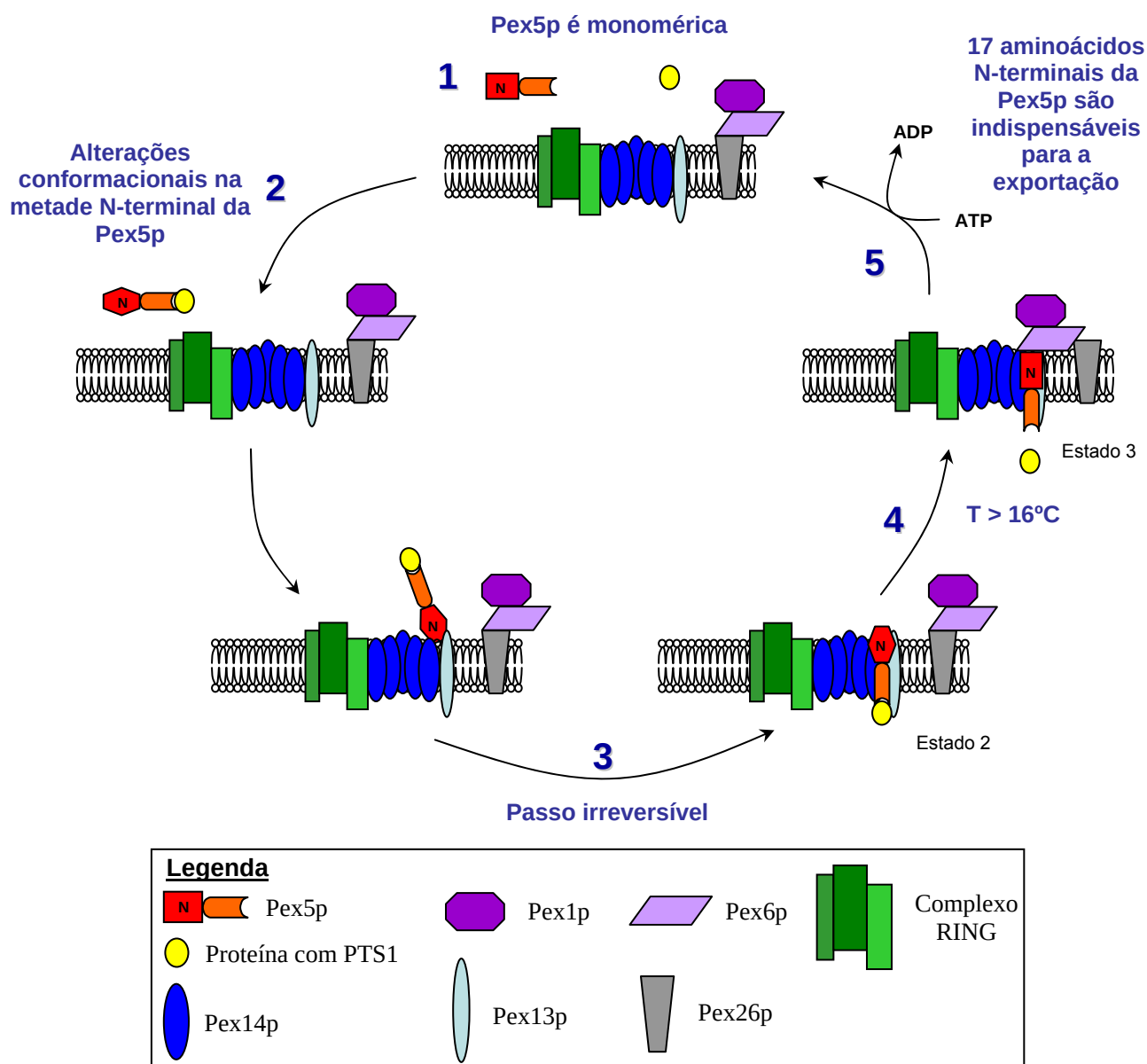


Figura 13 – Modelo de actuação da Pex5p na importação de proteínas com PTS1 para a matriz do peroxissoma em mamíferos.

Os números indicados a azul representam as contribuições do trabalho efectuado no âmbito desta tese para um esclarecimento mais detalhado do processo de importação proteica para a matriz do peroxissoma.

Finalmente, é importante referir que apesar das contribuições para um esclarecimento mais detalhado do modo de acção da Pex5p, apresentadas nesta tese, essa tarefa encontra-se ainda muito longe do seu fim. Esta foi apenas mais uma peça de um *puzzle* que ainda não está terminado...

6- PERSPECTIVAS FUTURAS

6- PERSPECTIVAS FUTURAS

O ensaio de proteólise parcial por nós desenvolvido para a Pex5p pode ser utilizado como ferramenta na pesquisa de novos ligandos para a Pex5p. Portanto, recorrendo a peroxinas recombinantes, por exemplo, pode ser possível identificar novas interações envolvendo a Pex5p. Além disso, se se identificar uma interação, é possível, por um lado, mapear as regiões da Pex5p e do ligando envolvidas na interação, recorrendo a formas truncadas e/ou péptidos das proteínas em causa. Por outro lado, também se podem estudar alterações conformacionais que ocorram na Pex5p, como resultado dessa interação, através da análise dos fragmentos proteolíticos obtidos. Finalmente, é possível também estudar a influência da presença de PTS1 nas interações envolvendo a Pex5p. Este aspecto é particularmente importante na definição da sequência de interações que a Pex5p estabelece durante o ciclo de importação e exportação. Por exemplo, se se identificar uma interação da Pex5p com uma peroxina apenas na presença de PTS1, é muito provável que essa peroxina esteja envolvida nos primeiros passos da importação da Pex5p, quando esta se encontra em complexo com uma prot-PTS1.

A caracterização hidrodinâmica da Pex5p em complexo com outras proteínas pode ajudar a definir a estequiometria de ligação entre essas proteínas. Além disso, o estudo das propriedades hidrodinâmicas da Pex5p na presença de diferentes péptidos provenientes de possíveis ligandos permite analisar possíveis alterações conformacionais/estruturais que possam ocorrer na peroxina. Uma vez que já foi demonstrado que a Pex5p apresenta uma região N-terminal maioritariamente destituída de estrutura [329], pode-se testar se a ligação de determinados péptidos à peroxina induz um rearranjo estrutural, resultando, por exemplo, numa compactização da Pex5p.

O facto de os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p estarem envolvidos no processo de exportação da peroxina para o citosol, mas os detalhes moleculares dessa observação ainda não estarem caracterizados, obriga à realização de diversas experiências de forma a tentar clarificar o assunto. Essa região da Pex5p pode ser utilizada em experiências de detecção de interações proteína-proteína, como por exemplo, *two-hybrid system*, de forma a tentar identificar possíveis interações com a mesma. Além disso, os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p podem ser utilizados em experiências de cromatografia de afinidade, de forma a identificar possíveis ligandos existentes, por exemplo, em preparações citosólicas e/ou peroxissomais. Essa região da Pex5p pode ainda ser adicionada a experiências de importação *in vitro* da Pex5p, de forma a tentar perceber se a sua adição provoca algum efeito na importação e/ou exportação da Pex5p.

Outra abordagem que pode ser efectuada, de forma a tentar identificar que proteína(s) interactiva(m) com os 110 aminoácidos N-terminais da Pex5p, envolve experiências de *crosslink*. Podem ser efectuadas experiências de importação *in vitro* paralelas, umas contendo ^{35}S -Pex5p e outras contendo ^{35}S - ΔN110 -Pex5p. Após efectuar *crosslinking* das proteínas marcadas radioactivamente o possível aparecimento de produtos de *crosslinking* diferentes nas duas versões da Pex5p poderá levar à identificação de proteínas que interactivam com os 110 aminoácidos N-terminais da peroxina.

Uma vez que no nosso sistema de importação *in vitro* existe Pex5p endógena, proveniente do fígado de rato, uma diminuição da quantidade de Pex5p resistente à PK após importação, não pode ser directamente relacionada com uma inibição do processo de importação da Pex5p. Por exemplo, se a adição de uma determinada molécula provocar uma diminuição na quantidade de Pex5p resistente à acção da PK, podemos estar perante uma substância que afecta a importação da Pex5p. No entanto, não é possível descartar a hipótese de uma diminuição da quantidade de Pex5p resistente à PK estar relacionada com uma inibição da exportação da Pex5p endógena, que como consequência se acumula nos peroxissomas, ocupando os locais de acoplagem/translocação. Portanto, a utilização de controlos internos torna-se indispensável para a distinção entre efeitos na taxa de importação e efeitos na taxa de exportação da Pex5p. O facto da ΔN110 -Pex5p ser importada para o peroxissoma mas não ser exportada para o citosol torna esta versão da Pex5p uma ferramenta extremamente útil como controlo interno das experiências de importação *in vitro*. Desta forma, é possível estudar qual o efeito de determinadas variáveis sobre o processo de importação e/ou exportação da Pex5p.

A produção e utilização de novas versões da Pex5p, com deleções nas extremidades N- e C-terminal, bem como com deleções internas, em experiências de importação *in vitro* pode ajudar a revelar aspectos mecanísticos importantes no ciclo de actuação da Pex5p.

Apesar do progresso que tem sido efectuado na área, há ainda muitos aspectos a esclarecer. Estas sugestões são apenas algumas das inúmeras experiências que podem ser efectuadas na tentativa de caracterizar o mecanismo molecular da importação proteica para os peroxissomas.

7- BIBLIOGRAFIA

7- BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Jedd, N.H. Chua, 2000, A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane, *Nat Cell Biol*, 2, 226-231.
- [2] M. Muller, 1969, Peroxisomes of protozoa, *Ann N Y Acad Sci*, 168, 291-301.
- [3] R.D. Adam, 2001, Biology of *Giardia lamblia*, *Clin Microbiol Rev*, 14, 447-475.
- [4] J. Rhodin, 1954, Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney, Stockholm University, Aktiebolaget Godvil, Stockholm, Sweden.
- [5] S. Weller, S.J. Gould, D. Valle, 2003, Peroxisome biogenesis disorders, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 4, 165-211.
- [6] S. Angermuller, C. Leupold, A. Volkl, H.D. Fahimi, 1986, Electron microscopic cytochemical localization of alpha-hydroxyacid oxidase in rat liver. Association with the crystalline core and matrix of peroxisomes, *Histochemistry*, 85, 403-409.
- [7] T. Makita, 1995, Molecular organization of hepatocyte peroxisomes, *Int Rev Cytol*, 160, 303-352.
- [8] K. Yamamoto, H.D. Fahimi, 1987, Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogeneous segments, *J Cell Biol*, 105, 713-722.
- [9] J. Yang, X. Han, R.W. Gross, 2003, Identification of hepatic peroxisomal phospholipase A(2) and characterization of arachidonic acid-containing choline glycerophospholipids in hepatic peroxisomes, *FEBS Lett*, 546, 247-250.
- [10] D. Kerssen, E. Hambruch, W. Klaas, H.W. Platta, B. de Kruijff, R. Erdmann, W.H. Kunau, W. Schliebs, 2006, Membrane association of the cycling peroxisome import receptor Pex5p, *J Biol Chem*, 281, 27003-27015.
- [11] R. Schnleiter, B. Brugger, R. Sandhoff, G. Zellnig, A. Leber, M. Lampl, K. Athenstaedt, C. Hrastnik, S. Eder, G. Daum, F. Paltauf, F.T. Wieland, S.D. Kohlwein, 1999, Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane, *J Cell Biol*, 146, 741-754.
- [12] T.B. Dansen, K.W. Wirtz, R.J. Wanders, E.H. Pap, 2000, Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH, *Nat Cell Biol*, 2, 51-53.
- [13] C.W. van Roermund, Y. Elgersma, N. Singh, R.J. Wanders, H.F. Tabak, 1995, The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions, *Embo J*, 14, 3480-3486.
- [14] E. Bellion, J.M. Goodman, 1987, Proton ionophores prevent assembly of a peroxisomal protein, *Cell*, 48, 165-173.
- [15] K. Nicolay, M. Veenhuis, A.C. Douma, W. Harder, 1987, A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes, *Arch Microbiol*, 147, 37-41.
- [16] A. Jankowski, J.H. Kim, R.F. Collins, R. Daneman, P. Walton, S. Grinstein, 2001, In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin, *J Biol Chem*, 276, 48748-48753.
- [17] S. Ferdinandusse, E.G. van Grunsven, W. Oostheim, S. Denis, E.M. Hogenhout, I.J. L, C.W. van Roermund, H.R. Waterham, S. Goldfischer, R.J. Wanders, 2002, Reinvestigation of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase deficiency: identification of the true defect at the level of d-bifunctional protein, *Am J Hum Genet*, 70, 1589-1593.
- [18] S. Ferdinandusse, M.S. Ylianttila, J. Gloerich, M.K. Koski, W. Oostheim, H.R. Waterham, J.K. Hiltunen, R.J. Wanders, T. Glumoff, 2006, Mutational spectrum of D-bifunctional protein deficiency and structure-based genotype-phenotype analysis, *Am J Hum Genet*, 78, 112-124.
- [19] P.B. Lazarow, Y. Fujiki, 1985, Biogenesis of peroxisomes, *Annu Rev Cell Biol*, 1, 489-530.

- [20] C.C. Chang, S. South, D. Warren, J. Jones, A.B. Moser, H.W. Moser, S.J. Gould, 1999, Metabolic control of peroxisome abundance, *J Cell Sci*, 112, 1579-1590.
- [21] P.E. Purdue, P.B. Lazarow, 2001, Peroxisome biogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 701-752.
- [22] H.D. Fahimi, E. Baumgart, 1999, Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review, *J Histochem Cytochem*, 47, 1219-1232.
- [23] C. De Duve, P. Baudhuin, 1966, Peroxisomes (microbodies and related particles), *Physiol Rev*, 46, 323-357.
- [24] R.J. Wanders, H.R. Waterham, 2006, Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1707-1720.
- [25] S. Ferdinandusse, T. Meissner, R.J. Wanders, E. Mayatepek, 2002, Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes, *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 269-273.
- [26] J.H. Eckert, R. Erdmann, 2003, Peroxisome biogenesis, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 147, 75-121.
- [27] L. Biardi, A. Sreedhar, A. Zokaei, N.B. Vartak, R.L. Bozeat, J.E. Shackelford, G.A. Keller, S.K. Krisans, 1994, Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders, *J Biol Chem*, 269, 1197-1205.
- [28] S.K. Krisans, J. Ericsson, P.A. Edwards, G.A. Keller, 1994, Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes, *J Biol Chem*, 269, 14165-14169.
- [29] S.K. Krisans, 1992, The role of peroxisomes in cholesterol metabolism, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7, 358-364.
- [30] J.E. Azevedo, J. Costa-Rodrigues, C.P. Guimaraes, M.E. Oliveira, C. Sa-Miranda, 2004, Protein translocation across the peroxisomal membrane, *Cell Biochem Biophys*, 41, 451-468.
- [31] G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven, 1993, Metabolic pathways in mammalian peroxisomes, *Biochimie*, 75, 147-158.
- [32] M. Veenhuis, M. Mateblowski, W.H. Kunau, W. Harder, 1987, Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 3, 77-84.
- [33] J.E. Dimmick, 1997, Pathology of peroxisomal disorders., ed. DA Applegarth, 211-232.
- [34] S. Goldfischer, C.L. Moore, A.B. Johnson, A.J. Spiro, M.P. Valsamis, H.K. Wisniewski, R.H. Ritch, W.T. Norton, I. Rapin, L.M. Gartner, 1973, Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome, *Science*, 182, 62-64.
- [35] H.W. Moser, K.D. Smith, P.A. Watkins, J.M. Powers, A.B. Moser, 2001, X-linked adrenoleukodystrophy, ed. CR Scriver, 3257-3302.
- [36] R.J. Wanders, P.G. Barth, H.S.A. Heymans, 2001, Single peroxisomal enzyme deficiencies, ed. CR Scriver, 3219-3256.
- [37] R.J. Wanders, C. Jakobs, O.H. Skjeldal, 2001, Refsum disease, ed. CR Scriver, 3303-3321.
- [38] B. Distel, R. Erdmann, S.J. Gould, G. Blobel, D.I. Crane, J.M. Cregg, G. Dodt, Y. Fujiki, J.M. Goodman, W.W. Just, J.A. Kiel, W.H. Kunau, P.B. Lazarow, G.P. Mannaerts, H.W. Moser, T. Osumi, R.A. Rachubinski, A. Roscher, S. Subramani, H.F. Tabak, T. Tsukamoto, D. Valle, I. van der Klei, P.P. van Veldhoven, M. Veenhuis, 1996, A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors, *J Cell Biol*, 135, 1-3.
- [39] S.J. Steinberg, G. Dodt, G.V. Raymond, N.E. Braverman, A.B. Moser, H.W. Moser, 2006, Peroxisome biogenesis disorders, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1733-1748.
- [40] S.J. Gould, G.V. Raymond, D. Valle, 2001, The peroxisome biogenesis disorders, ed. CR Scriver, 3181-3217.
- [41] S.J. Gould, and Valle, 2000, D., Peroxisome biogenesis disorders: Genetics and cell biology, *TIGS*, 16, 340-344.

- [42] S.J. Gould, C.S. Collins, 2002, Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex?, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 382-389.
- [43] N. Shimozawa, T. Tsukamoto, T. Nagase, Y. Takemoto, N. Koyama, Y. Suzuki, M. Komori, T. Osumi, G. Jeannette, R.J. Wanders, N. Kondo, 2004, Identification of a new complementation group of the peroxisome biogenesis disorders and PEX14 as the mutated gene, *Hum Mutat*, 23, 552-558.
- [44] N. Braverman, L. Chen, P. Lin, C. Obie, G. Steel, P. Douglas, P.K. Chakraborty, J.T. Clarke, A. Boneh, A. Moser, H. Moser, D. Valle, 2002, Mutation analysis of PEX7 in 60 probands with rhizomelic chondrodysplasia punctata and functional correlations of genotype with phenotype, *Hum Mutat*, 20, 284-297.
- [45] A.M. Motley, P. Brites, L. Gerez, E. Hogenhout, J. Haasjes, R. Benne, H.F. Tabak, R.J. Wanders, H.R. Waterham, 2002, Mutational spectrum in the PEX7 gene and functional analysis of mutant alleles in 78 patients with rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1, *Am J Hum Genet*, 70, 612-624.
- [46] K.A. Sacksteder, J.M. Jones, S.T. South, X. Li, Y. Liu, S.J. Gould, 2000, PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis, *J Cell Biol*, 148, 931-944.
- [47] N. Shimozawa, T. Tsukamoto, Y. Suzuki, T. Orii, Y. Fujiki, 1992, Animal cell mutants represent two complementation groups of peroxisome-defective Zellweger syndrome, *J Clin Invest*, 90, 1864-1870.
- [48] Y. Suzuki, N. Shimozawa, T. Orii, T. Tsukamoto, T. Osumi, Y. Fujiki, N. Kondo, 2001, Genetic and molecular bases of peroxisome biogenesis disorders, *Genet Med*, 3, 372-376.
- [49] R. Erdmann, G. Blobel, 1995, Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p, *J Cell Biol*, 128, 509-523.
- [50] R. Erdmann, G. Blobel, 1996, Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor, *J Cell Biol*, 135, 111-121.
- [51] J.J. Smith, M. Marelli, R.H. Christmas, F.J. Vizeacoumar, D.J. Dilworth, T. Ideker, T. Galitski, K. Dimitrov, R.A. Rachubinski, J.D. Aitchison, 2002, Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function, *J Cell Biol*, 158, 259-271.
- [52] K.A. Sacksteder, S.J. Gould, 2000, The genetics of peroxisome biogenesis, *Annu Rev Genet*, 34, 623-652.
- [53] J. Nunnari, P. Walter, 1996, Regulation of organelle biogenesis, *Cell*, 84, 389-394.
- [54] G. Warren, W. Wickner, 1996, Organelle inheritance, *Cell*, 84, 395-400.
- [55] S. Subramani, 1998, Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement, *Physiol Rev*, 78, 171-188.
- [56] D. Hoepfner, D. Schildknecht, I. Braakman, P. Philippsen, H.F. Tabak, 2005, Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation, *Cell*, 122, 85-95.
- [57] H.F. Tabak, D. Hoepfner, A. Zand, H.J. Geuze, I. Braakman, M.A. Huynen, 2006, Formation of peroxisomes: present and past, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1647-1654.
- [58] P.M. Novikoff, A.B. Novikoff, 1972, Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine, *J Cell Biol*, 53, 532-560.
- [59] H.F. Tabak, J.L. Murk, I. Braakman, H.J. Geuze, 2003, Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum, *Traffic*, 4, 512-518.
- [60] M. Marelli, J.J. Smith, S. Jung, E. Yi, A.I. Nesvizhskii, R.H. Christmas, R.A. Saleem, Y.Y. Tam, A. Fagarasanu, D.R. Goodlett, R. Aebersold, R.A. Rachubinski, J.D. Aitchison, 2004, Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane, *J Cell Biol*, 167, 1099-1112.

- [61] S. Otte, W.J. Belden, M. Heidtman, J. Liu, O.N. Jensen, C. Barlowe, 2001, Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex, *J Cell Biol*, 152, 503-518.
- [62] V.I. Titorenko, D.M. Ogrydziak, R.A. Rachubinski, 1997, Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Mol Cell Biol*, 17, 5210-5226.
- [63] M.J. Santos, T. Imanaka, H. Shio, G.M. Small, P.B. Lazarow, 1988, Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome--aberrant organelle assembly, *Science*, 239, 1536-1538.
- [64] M. Honsho, S. Tamura, N. Shimozawa, Y. Suzuki, N. Kondo, Y. Fujiki, 1998, Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D, *Am J Hum Genet*, 63, 1622-1630.
- [65] Y. Matsuzono, N. Kinoshita, S. Tamura, N. Shimozawa, M. Hamasaki, K. Ghaedi, R.J. Wanders, Y. Suzuki, N. Kondo, Y. Fujiki, 1999, Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2116-2121.
- [66] A.C. Muntau, P.U. Mayerhofer, B.C. Paton, S. Kammerer, A.A. Roscher, 2000, Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G, *Am J Hum Genet*, 67, 967-975.
- [67] N. Shimozawa, Y. Suzuki, Z. Zhang, A. Imamura, K. Ghaedi, Y. Fujiki, N. Kondo, 2000, Identification of PEX3 as the gene mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures, *Hum Mol Genet*, 9, 1995-1999.
- [68] S.T. South, S.J. Gould, 1999, Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes, *J Cell Biol*, 144, 255-266.
- [69] Y. Fujiki, Y. Matsuzono, T. Matsuzaki, M. Fransen, 2006, Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1639-1646.
- [70] J.M. Jones, J.C. Morrell, S.J. Gould, 2004, PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins, *J Cell Biol*, 164, 57-67.
- [71] R.J. Baerends, S.W. Rasmussen, R.E. Hilbrands, M. van der Heide, K.N. Faber, P.T. Reuvekamp, J.A. Kiel, J.M. Cregg, I.J. van der Klei, M. Veenhuis, 1996, The *Hansenula polymorpha* PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity, *J Biol Chem*, 271, 8887-8894.
- [72] E.A. Wiemer, G.H. Luers, K.N. Faber, T. Wenzel, M. Veenhuis, S. Subramani, 1996, Isolation and characterization of Pas2p, a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *J Biol Chem*, 271, 18973-18980.
- [73] J. Hohfeld, M. Veenhuis, W.H. Kunau, 1991, PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis, *J Cell Biol*, 114, 1167-1178.
- [74] M. Soukupova, C. Sprenger, K. Gorgas, W.H. Kunau, G. Dodt, 1999, Identification and characterization of the human peroxin PEX3, *Eur J Cell Biol*, 78, 357-374.
- [75] K. Ghaedi, S. Tamura, K. Okumoto, Y. Matsuzono, Y. Fujiki, 2000, The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis, *Mol Biol Cell*, 11, 2085-2102.
- [76] J.E. Hunt, R.N. Trelease, 2004, Sorting pathway and molecular targeting signals for the *Arabidopsis* peroxin 3, *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 586-596.
- [77] S. Kammerer, A. Holzinger, U. Welsch, A.A. Roscher, 1998, Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p, *FEBS Lett*, 429, 53-60.
- [78] R.J. Baerends, K.N. Faber, A.M. Kram, J.A. Kiel, I.J. van der Klei, M. Veenhuis, 2000, A stretch of positively charged amino acids at the N terminus of *Hansenula*

- polymorpha Pex3p is involved in incorporation of the protein into the peroxisomal membrane, *J Biol Chem*, 275, 9986-9995.
- [79] Y.Y. Tam, A. Fagarasanu, M. Fagarasanu, R.A. Rachubinski, 2005, Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem*, 280, 34933-34939.
 - [80] G.J. Haan, K.N. Faber, R.J. Baerends, A. Koek, A. Krikken, J.A. Kiel, I.J. van der Klei, M. Veenhuis, 2002, *Hansenula polymorpha* Pex3p is a peripheral component of the peroxisomal membrane, *J Biol Chem*, 277, 26609-26617.
 - [81] E.H. Hettema, W. Girzalsky, M. van Den Berg, R. Erdmann, B. Distel, 2000, *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins, *Embo J*, 19, 223-233.
 - [82] Y. Fang, J.C. Morrell, J.M. Jones, S.J. Gould, 2004, PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins, *J Cell Biol*, 164, 863-875.
 - [83] W.B. Snyder, K.N. Faber, T.J. Wenzel, A. Koller, G.H. Luers, L. Rangell, G.A. Keller, S. Subramani, 1999, Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, *Mol Biol Cell*, 10, 1745-1761.
 - [84] K. Gotte, W. Girzalsky, M. Linkert, E. Baumgart, S. Kammerer, W.H. Kunau, R. Erdmann, 1998, Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis, *Mol Cell Biol*, 18, 616-628.
 - [85] H. Shibata, Y. Kashiwayama, T. Imanaka, H. Kato, 2004, Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins, *J Biol Chem*, 279, 38486-38494.
 - [86] M.P. Pinto, C.P. Grou, I.S. Alencastre, M.E. Oliveira, C. Sa-Miranda, M. Fransen, J.E. Azevedo, 2006, The import competence of a peroxisomal membrane protein is determined by Pex19p before the docking step, *J Biol Chem*, 281, 34492-34502.
 - [87] P.K. Kim, R.T. Mullen, U. Schumann, J. Lippincott-Schwartz, 2006, The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER, *J Cell Biol*, 173, 521-532.
 - [88] M. Honsho, T. Hiroshige, Y. Fujiki, 2002, The membrane biogenesis peroxin Pex16p. Topogenesis and functional roles in peroxisomal membrane assembly, *J Biol Chem*, 277, 44513-44524.
 - [89] S. Thoms, R. Erdmann, 2005, Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation, *Febs J*, 272, 5169-5181.
 - [90] P.A. Marshall, Y.I. Krimkevich, R.H. Lark, J.M. Dyer, M. Veenhuis, J.M. Goodman, 1995, Pmp27 promotes peroxisomal proliferation, *J Cell Biol*, 129, 345-355.
 - [91] Y. Sakai, P.A. Marshall, A. Saiganji, K. Takabe, H. Saiki, N. Kato, J.M. Goodman, 1995, The *Candida boidinii* peroxisomal membrane protein Pmp30 has a role in peroxisomal proliferation and is functionally homologous to Pmp27 from *Saccharomyces cerevisiae*, *J Bacteriol*, 177, 6773-6781.
 - [92] M. Schrader, B.E. Reuber, J.C. Morrell, G. Jimenez-Sanchez, C. Obie, T.A. Stroh, D. Valle, T.A. Schroer, S.J. Gould, 1998, Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli, *J Biol Chem*, 273, 29607-29614.
 - [93] C.W. van Roermund, H.F. Tabak, M. van Den Berg, R.J. Wanders, E.H. Hettema, 2000, Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, 150, 489-498.
 - [94] X. Li, S.J. Gould, 2002, PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism, *J Cell Biol*, 156, 643-651.
 - [95] P.B. Lazarow, C. de Duve, 1973, The synthesis and turnover of rat liver of rat liver peroxisomes. IV. Biochemical pathway of catalase synthesis, *J Cell Biol*, 59, 491-506.

- [96] P.B. Lazarow, C. de Duve, 1973, The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. V. Intracellular pathway of catalase synthesis, *J Cell Biol*, 59, 507-524.
- [97] C. Kruse, H. Kindl, 1983, Malate synthase: aggregation, deaggregation, and binding of phospholipids, *Arch Biochem Biophys*, 223, 618-628.
- [98] J.M. Goodman, C.W. Scott, P.N. Donahue, J.P. Atherton, 1984, Alcohol oxidase assembles post-translationally into the peroxisome of *Candida boidinii*, *J Biol Chem*, 259, 8485-8493.
- [99] J.M. Cregg, I.J. van der Klei, G.J. Sulter, M. Veenhuis, W. Harder, 1990, Peroxisome-deficient mutants in *Hansenula polymorpha*, *Yeast*, 6, 87-97.
- [100] G.J. Sulter, I.J. van der Klei, W. Harder, M. Veenhuis, 1990, Expression and assembly of amine oxidase and D-amino acid oxidase in the cytoplasm of peroxisome-deficient mutants of yeast *Hansenula polymorpha* during growth on primary amines or D-alanine as sole nitrogen source., *Yeast*, 6, 501-509.
- [101] I.J. van der Klei, W. Harder, M. Veenhuis, 1991, Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts: a review., *Yeast*, 7, 195-209.
- [102] G.A. Keller, S. Gould, M. Deluca, S. Subramani, 1987, Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 3264-3268.
- [103] J.R. Glover, D.W. Andrews, R.A. Rachubinski, 1994, *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10541-10545.
- [104] J.A. McNew, J.M. Goodman, 1994, An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo, *J Cell Biol*, 127, 1245-1257.
- [105] Y. Elgersma, A. Vos, M. van den Berg, C.W. van Roermund, P. van der Sluijs, B. Distel, H.F. Tabak, 1996, Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal 1 in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem*, 271, 26375-26382.
- [106] M.S. Lee, R.T. Mullen, R.N. Trelease, 1997, Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes, *Plant Cell*, 9, 185-197.
- [107] X. Yang, P.E. Purdue, P.B. Lazarow, 2001, Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p, *Eur J Cell Biol*, 80, 126-138.
- [108] P.A. Walton, P.E. Hill, S. Subramani, 1995, Import of stably folded proteins into peroxisomes, *Mol Biol Cell*, 6, 675-683.
- [109] M.Q. Stewart, R.D. Esposito, J. Gowani, J.M. Goodman, 2001, Alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase, the abundant peroxisomal proteins of methylotrophic yeasts, assemble in different cellular compartments, *J Cell Sci*, 114, 2863-2868.
- [110] C.B. Brocard, C. Jedeszko, H.C. Song, S.R. Terlecky, P.A. Walton, 2003, Protein structure and import into the peroxisomal matrix, *Traffic*, 4, 74-82.
- [111] T. Hausler, Y.D. Stierhof, E. Wirtz, C. Clayton, 1996, Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin, *J Cell Biol*, 132, 311-324.
- [112] V.I. Titorenko, J.M. Nicaud, H. Wang, H. Chan, R.A. Rachubinski, 2002, Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*, *J Cell Biol*, 156, 481-494.
- [113] M. Schleyer, W. Neupert, 1985, Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes, *Cell*, 43, 339-350.
- [114] M. Kikuchi, N. Hatano, S. Yokota, N. Shimozawa, T. Imanaka, H. Taniguchi, 2004, Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease, *J Biol Chem*, 279, 421-428.

- [115] C. Ma, M. Haslbeck, L. Babujee, O. Jahn, S. Reumann, 2006, Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes, *Plant Physiol*, 141, 47-60.
- [116] M. Gutensohn, E. Fan, S. Frielingsdorf, P. Hanner, B. Hou, B. Hust, R.B. Klosgen, 2006, Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts, *J Plant Physiol*, 163, 333-347.
- [117] M. Russel, 1998, Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems, *J Mol Biol*, 279, 485-499.
- [118] D. Gorlich, 1997, Nuclear protein import, *Curr Opin Cell Biol*, 9, 412-419.
- [119] B.L. Timney, M.P. Rout, 2004, Robbing from the pore, *Nat Cell Biol*, 6, 177-179.
- [120] C.M. Feldherr, E. Kallenbach, N. Schultz, 1984, Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes, *J Cell Biol*, 99, 2216-2222.
- [121] S.I. Dworetzky, C.M. Feldherr, 1988, Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes, *J Cell Biol*, 106, 575-584.
- [122] K. Furuta, S. Ohno, Y. Gibo, K. Kiyosawa, S. Furuta, 1992, Three-dimensional ultrastructure of normal rat hepatocytes by quick-freezing and deep-etching method, *J Gastroenterol Hepatol*, 7, 486-490.
- [123] H. Kryvi, J. Kvannes, T. Flatmark, 1990, Freeze-fracture study of rat liver peroxisomes: evidence for an induction of intramembrane particles by agents stimulating peroxisomal proliferation, *Eur J Cell Biol*, 53, 227-233.
- [124] K. Zaar, H.D. Fahimi, 1990, A freeze-etch study of angular marginal-plate-containing peroxisomes in the proximal tubules of bovine kidney, *Cell Tissue Res*, 260, 409-414.
- [125] C. de Duve, 1983, Microbodies in the living cell, *Sci Am*, 248, 74-84.
- [126] R.D. Taylor, N. Pfanner, 2004, The protein import and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane, *Biochim Biophys Acta*, 1658, 37-43.
- [127] M. Marzioch, R. Erdmann, M. Veenhuis, W.H. Kunau, 1994, PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes, *Embo J*, 13, 4908-4918.
- [128] V. Dammai, S. Subramani, 2001, The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol, *Cell*, 105, 187-196.
- [129] S.G. Gould, G.A. Keller, S. Subramani, 1987, Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase, *J Cell Biol*, 105, 2923-2931.
- [130] S. Subramani, 1992, Targeting of proteins into the peroxisomal matrix, *J Membr Biol*, 125, 99-106.
- [131] S.J. Gould, G.A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson, S. Subramani, 1989, A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes, *J Cell Biol*, 108, 1657-1664.
- [132] S. Miura, I. Kasuya-Arai, H. Mori, S. Miyazawa, T. Osumi, T. Hashimoto, Y. Fujiki, 1992, Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions in vitro as a minimal peroxisome-targeting signal, *J Biol Chem*, 267, 14405-14411.
- [133] Y. Elgersma, H.F. Tabak, 1996, Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning, *Biochim Biophys Acta*, 1286, 269-283.
- [134] G. Lametschwandtner, C. Brocard, M. Fransen, P. Van Veldhoven, J. Berger, A. Hartig, 1998, The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it, *J Biol Chem*, 273, 33635-33643.
- [135] S. Subramani, A. Koller, W.B. Snyder, 2000, Import of peroxisomal matrix and membrane proteins, *Annu Rev Biochem*, 69, 399-418.

- [136] S.J. Gould, G.A. Keller, S. Subramani, 1988, Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins, *J Cell Biol*, 107, 897-905.
- [137] G. Neuberger, S. Maurer-Stroh, B. Eisenhaber, A. Hartig, F. Eisenhaber, 2003, Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence, *J Mol Biol*, 328, 581-592.
- [138] C. Brocard, A. Hartig, 2006, Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide?, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1565-1573.
- [139] M. Wendland, S. Subramani, 1993, Cytosol-dependent peroxisomal protein import in a permeabilized cell system, *J Cell Biol*, 120, 675-685.
- [140] S. Rapp, U. Soto, W.W. Just, 1993, Import of firefly luciferase into peroxisomes of permeabilized Chinese hamster ovary cells: a model system to study peroxisomal protein import in vitro, *Exp Cell Res*, 205, 59-65.
- [141] U. Soto, R. Pepperkok, W. Ansorge, W.W. Just, 1993, Import of firefly luciferase into mammalian peroxisomes in vivo requires nucleoside triphosphates, *Exp Cell Res*, 205, 66-75.
- [142] D.G. Brickner, L.J. Olsen, 1998, Nucleotide triphosphates are required for the transport of glycolate oxidase into peroxisomes, *Plant Physiol*, 116, 309-317.
- [143] M.E. Oliveira, A.M. Gouveia, R.A. Pinto, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2003, The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import, *J Biol Chem*, 278, 39483-39488.
- [144] H.W. Platta, S. Grunau, K. Rosenkranz, W. Girzalsky, R. Erdmann, 2005, Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol, *Nat Cell Biol*, 7, 817-822.
- [145] N. Miyata, Y. Fujiki, 2005, Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export, *Mol Cell Biol*, 25, 10822-10832.
- [146] B.W. Swinkels, S.J. Gould, A.G. Bodnar, R.A. Rachubinski, S. Subramani, 1991, A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase, *Embo J*, 10, 3255-3262.
- [147] T. Osumi, T. Tsukamoto, S. Hata, S. Yokota, S. Miura, Y. Fujiki, M. Hijikata, S. Miyazawa, T. Hashimoto, 1991, Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting, *Biochem Biophys Res Commun*, 181, 947-954.
- [148] D.M. Chudzik, P.A. Michels, S. de Walque, W.G. Hol, 2000, Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases, *J Mol Biol*, 300, 697-707.
- [149] R.A. Rachubinski, S. Subramani, 1995, How proteins penetrate peroxisomes, *Cell*, 83, 525-528.
- [150] C.R. Flynn, R.T. Mullen, R.N. Trelease, 1998, Mutational analyses of a type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes, *Plant J*, 16, 709-720.
- [151] J.R. Glover, D.W. Andrews, S. Subramani, R.A. Rachubinski, 1994, Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo, *J Biol Chem*, 269, 7558-7563.
- [152] T. Tsukamoto, S. Hata, S. Yokota, S. Miura, Y. Fujiki, M. Hijikata, S. Miyazawa, T. Hashimoto, T. Osumi, 1994, Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor, *J Biol Chem*, 269, 6001-6010.
- [153] P.B. Lazarow, 2006, The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1599-1604.
- [154] S. Subramani, 1993, Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle, *Annu Rev Cell Biol*, 9, 445-478.

- [155] V.I. Titorenko, R.A. Rachubinski, 2000, Peroxisomal membrane fusion requires two AAA family ATPases, Pex1p and Pex6p, *J Cell Biol*, 150, 881-886.
- [156] L.J. Olsen, 1998, The surprising complexity of peroxisome biogenesis, *Plant Mol Biol*, 38, 163-189.
- [157] S. Reumann, 2004, Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses, *Plant Physiol*, 135, 783-800.
- [158] A.M. Motley, E.H. Hettema, R. Ketting, R. Plasterk, H.F. Tabak, 2000, *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes, *EMBO Rep*, 1, 40-46.
- [159] I.J. van der Klei, M. Veenhuis, 2006, PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1794-1800.
- [160] A. Motley, M.J. Lumb, P.B. Oatey, P.R. Jennings, P.A. De Zoysa, R.J. Wanders, H.F. Tabak, C.J. Danpure, 1995, Mammalian alanine/glyoxylate aminotransferase 1 is imported into peroxisomes via the PTS1 translocation pathway. Increased degeneracy and context specificity of the mammalian PTS1 motif and implications for the peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of AGT in primary hyperoxaluria type 1, *J Cell Biol*, 131, 95-109.
- [161] T.G. Knott, G.M. Birdsey, K.E. Sinclair, I.M. Gallagher, P.E. Purdue, C.J. Danpure, 2000, The peroxisomal targeting sequence type 1 receptor, Pex5p, and the peroxisomal import efficiency of alanine:glyoxylate aminotransferase, *Biochem J*, 352, 409-418.
- [162] A. Koller, A.P. Spong, G.H. Luers, S. Subramani, 1999, Analysis of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene product from *Pichia pastoris* and determination of its targeting signal, *Yeast*, 15, 1035-1044.
- [163] G.M. Small, L.J. Szabo, P.B. Lazarow, 1988, Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes, *Embo J*, 7, 1167-1173.
- [164] A.T. Klein, M. van den Berg, G. Bottger, H.F. Tabak, B. Distel, 2002, *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p, *J Biol Chem*, 277, 25011-25019.
- [165] J.J. Smith, R.A. Rachubinski, 2001, A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *J Biol Chem*, 276, 1618-1625.
- [166] D. McCollum, E. Monosov, S. Subramani, 1993, The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells--the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family, *J Cell Biol*, 121, 761-774.
- [167] M. Fransen, C. Brees, E. Baumgart, J.C. Vanhooren, M. Baes, G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven, 1995, Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor, *J Biol Chem*, 270, 7731-7736.
- [168] A.M. Gouveia, C. Reguenga, M.E. Oliveira, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2000, Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein, *J Biol Chem*, 275, 32444-32451.
- [169] S.R. Terlecky, W.M. Nuttley, D. McCollum, E. Sock, S. Subramani, 1995, The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, *Embo J*, 14, 3627-3634.
- [170] E.A. Wiemer, W.M. Nuttley, B.L. Bertolaet, X. Li, U. Francke, M.J. Wheelock, U.K. Anne, K.R. Johnson, S. Subramani, 1995, Human peroxisomal targeting signal-1 receptor restores peroxisomal protein import in cells from patients with fatal peroxisomal disorders, *J Cell Biol*, 130, 51-65.

- [171] R.K. Szilard, V.I. Titorenko, M. Veenhuis, R.A. Rachubinski, 1995, Pay32p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is an intraperoxisomal component of the matrix protein translocation machinery, *J Cell Biol*, 131, 1453-1469.
- [172] A.M. Gouveia, C.P. Guimaraes, M.E. Oliveira, C. Reguenga, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2003, Characterization of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, using a cell-free in vitro import system, *J Biol Chem*, 278, 226-232.
- [173] M. Goebel, M. Yanagida, 1991, The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription, *Trends Biochem Sci*, 16, 173-177.
- [174] G.L. Blatch, M. Lasse, 1999, The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions, *Bioessays*, 21, 932-939.
- [175] J.R. Lamb, S. Tugendreich, P. Hieter, 1995, Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?, *Trends Biochem Sci*, 20, 257-259.
- [176] C. Scheufler, A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F.U. Hartl, I. Moarefi, 2000, Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine, *Cell*, 101, 199-210.
- [177] H.C. Vodermaier, C. Gieffers, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber, J.M. Peters, 2003, TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1, *Curr Biol*, 13, 1459-1468.
- [178] A.K. Das, P.W. Cohen, D. Barford, 1998, The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions, *Embo J*, 17, 1192-1199.
- [179] T. Hirano, N. Kinoshita, K. Morikawa, M. Yanagida, 1990, Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+, *Cell*, 60, 319-328.
- [180] R.S. Sikorski, M.S. Boguski, M. Goebel, P. Hieter, 1990, A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis, *Cell*, 60, 307-317.
- [181] C. Brocard, F. Kragler, M.M. Simon, T. Schuster, A. Hartig, 1994, The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL, *Biochem Biophys Res Commun*, 204, 1016-1022.
- [182] G. Dodt, N. Braverman, C. Wong, A. Moser, H.W. Moser, P. Watkins, D. Valle, S.J. Gould, 1995, Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders, *Nat Genet*, 9, 115-125.
- [183] G.J. Gatto, Jr., B.V. Geisbrecht, S.J. Gould, J.M. Berg, 2000, Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5, *Nat Struct Biol*, 7, 1091-1095.
- [184] G.J. Gatto, Jr., B.V. Geisbrecht, S.J. Gould, J.M. Berg, 2000, A proposed model for the PEX5-peroxisomal targeting signal-1 recognition complex, *Proteins*, 38, 241-246.
- [185] H. Otera, K. Setoguchi, M. Hamasaki, T. Kumashiro, N. Shimizu, Y. Fujiki, 2002, Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import, *Mol Cell Biol*, 22, 1639-1655.
- [186] A.T. Klein, P. Barnett, G. Bottger, D. Konings, H.F. Tabak, B. Distel, 2001, Recognition of peroxisomal targeting signal type 1 by the import receptor Pex5p, *J Biol Chem*, 276, 15034-15041.
- [187] W.A. Stanley, F.V. Filipp, P. Kursula, N. Schuller, R. Erdmann, W. Schliebs, M. Sattler, M. Wilmanns, 2006, Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p, *Mol Cell*, 24, 653-663.
- [188] W.A. Stanley, M. Wilmanns, 2006, Dynamic architecture of the peroxisomal import receptor Pex5p, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1592-1598.

- [189] C.C. Harper, J.M. Berg, S.J. Gould, 2003, PEX5 binds the PTS1 independently of Hsp70 and the peroxin PEX12, *J Biol Chem*, 278, 7897-7901.
- [190] G.J. Gatto, Jr., E.L. Maynard, A.L. Guerrerio, B.V. Geisbrecht, S.J. Gould, J.M. Berg, 2003, Correlating structure and affinity for PEX5:PTS1 complexes, *Biochemistry*, 42, 1660-1666.
- [191] D. Wang, N.V. Visser, M. Veenhuis, I.J. van der Klei, 2003, Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy, *J Biol Chem*, 278, 43340-43345.
- [192] K.P. Madrid, G. De Crescenzo, S. Wang, A. Jardim, 2004, Modulation of the *Leishmania donovani* peroxin 5 quaternary structure by peroxisomal targeting signal 1 ligands, *Mol Cell Biol*, 24, 7331-7344.
- [193] H. Otera, T. Harano, M. Honsho, K. Ghaedi, S. Mukai, A. Tanaka, A. Kawai, N. Shimizu, Y. Fujiki, 2000, The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p, *J Biol Chem*, 275, 21703-21714.
- [194] R.K. Szilard, R.A. Rachubinski, 2000, Tetratricopeptide repeat domain of *Yarrowia lipolytica* Pex5p is essential for recognition of the type 1 peroxisomal targeting signal but does not confer full biological activity on Pex5p, *Biochem J*, 346, 177-184.
- [195] C. Wimmer, M. Schmid, M. Veenhuis, C. Gietl, 1998, The plant PTS1 receptor: similarities and differences to its human and yeast counterparts, *Plant J*, 16, 453-464.
- [196] C.C. Chang, D.S. Warren, K.A. Sacksteder, S.J. Gould, 1999, PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import, *J Cell Biol*, 147, 761-774.
- [197] K. Okumoto, I. Abe, Y. Fujiki, 2000, Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p, *J Biol Chem*, 275, 25700-25710.
- [198] M. Albertini, P. Rehling, R. Erdmann, W. Girzalsky, J.A. Kiel, M. Veenhuis, W.H. Kunau, 1997, Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways, *Cell*, 89, 83-92.
- [199] C. Brocard, G. Lametschwandner, R. Koudelka, A. Hartig, 1997, Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p, *Embo J*, 16, 5491-5500.
- [200] M. Fransen, S.R. Terlecky, S. Subramani, 1998, Identification of a human PTS1 receptor docking protein directly required for peroxisomal protein import, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8087-8092.
- [201] W. Schliebs, J. Saidowsky, B. Agianian, G. Dodt, F.W. Herberg, W.H. Kunau, 1999, Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. Structural basis for interaction of PEX5 with PEX14, *J Biol Chem*, 274, 5666-5673.
- [202] N. Shimizu, R. Itoh, Y. Hirono, H. Otera, K. Ghaedi, K. Tateishi, S. Tamura, K. Okumoto, T. Harano, S. Mukai, Y. Fujiki, 1999, The peroxin Pex14p. cDNA cloning by functional complementation on a Chinese hamster ovary cell mutant, characterization, and functional analysis, *J Biol Chem*, 274, 12593-12604.
- [203] G.K. Will, M. Soukupova, X. Hong, K.S. Erdmann, J.A. Kiel, G. Dodt, W.H. Kunau, R. Erdmann, 1999, Identification and characterization of the human orthologue of yeast Pex14p, *Mol Cell Biol*, 19, 2265-2277.
- [204] A.J. Urquhart, D. Kennedy, S.J. Gould, D.I. Crane, 2000, Interaction of Pex5p, the type 1 peroxisome targeting signal receptor, with the peroxisomal membrane proteins Pex14p and Pex13p, *J Biol Chem*, 275, 4127-4136.
- [205] S.J. Gould, J.E. Kalish, J.C. Morrell, J. Bjorkman, A.J. Urquhart, D.I. Crane, 1996, Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTS1 receptor, *J Cell Biol*, 135, 85-95.

- [206] P. Barnett, G. Bottger, A.T. Klein, H.F. Tabak, B. Distel, 2000, The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction, *Embo J*, 19, 6382-6391.
- [207] G. Bottger, P. Barnett, A.T. Klein, A. Kragt, H.F. Tabak, B. Distel, 2000, *Saccharomyces cerevisiae* PTS1 receptor Pex5p interacts with the SH3 domain of the peroxisomal membrane protein Pex13p in an unconventional, non-PXXP-related manner, *Mol Biol Cell*, 11, 3963-3976.
- [208] Y. Elgersma, L. Kwast, A. Klein, T. Voorn-Brouwer, M. van den Berg, B. Metzger, T. America, H.F. Tabak, B. Distel, 1996, The SH3 domain of the *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal membrane protein Pex13p functions as a docking site for Pex5p, a mobile receptor for the import PTS1-containing proteins, *J Cell Biol*, 135, 97-109.
- [209] N. Braverman, G. Dodt, S.J. Gould, D. Valle, 1998, An isoform of pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes, *Hum Mol Genet*, 7, 1195-1205.
- [210] G. Dodt, D. Warren, E. Becker, P. Rehling, S.J. Gould, 2001, Domain mapping of human PEX5 reveals functional and structural similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p, *J Biol Chem*, 276, 41769-41781.
- [211] T. Matsumura, H. Otera, Y. Fujiki, 2000, Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant, *J Biol Chem*, 275, 21715-21721.
- [212] K. Nito, M. Hayashi, M. Nishimura, 2002, Direct interaction and determination of binding domains among peroxisomal import factors in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol*, 43, 355-366.
- [213] P. Rehling, A. Skaletz-Rorowski, W. Girzalsky, T. Voorn-Brouwer, M.M. Franse, B. Distel, M. Veenhuis, W.H. Kunau, R. Erdmann, 2000, Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor pex5p, *J Biol Chem*, 275, 3593-3602.
- [214] J. Saidowsky, G. Dodt, K. Kirchberg, A. Wegner, W. Nastainczyk, W.H. Kunau, W. Schliebs, 2001, The di-aromatic pentapeptide repeats of the human peroxisome import receptor PEX5 are separate high affinity binding sites for the peroxisomal membrane protein PEX14, *J Biol Chem*, 276, 34524-34529.
- [215] B. Agne, N.M. Meindl, K. Niederhoff, H. Einwachter, P. Rehling, A. Sickmann, H.E. Meyer, W. Girzalsky, W.H. Kunau, 2003, Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery, *Mol Cell*, 11, 635-646.
- [216] C. Reguenga, M.E. Oliveira, A.M. Gouveia, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2001, Characterization of the mammalian peroxisomal import machinery: Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly, *J Biol Chem*, 276, 29935-29942.
- [217] K.P. Madrid, A. Jardim, 2005, Peroxin 5-peroxin 14 association in the protozoan *Leishmania donovani* involves a novel protein-protein interaction motif, *Biochem J*, 391, 105-114.
- [218] J. Choe, J. Moyersoen, C. Roach, T.L. Carter, E. Fan, P.A. Michels, W.G. Hol, 2003, Analysis of the sequence motifs responsible for the interactions of peroxins 14 and 5, which are involved in glycosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*, *Biochemistry*, 42, 10915-10922.
- [219] A. Douangamath, F.V. Filipp, A.T. Klein, P. Barnett, P. Zou, T. Voorn-Brouwer, M.C. Vega, O.M. Mayans, M. Sattler, B. Distel, M. Wilmanns, 2002, Topography for independent binding of alpha-helical and PPII-helical ligands to a peroxisomal SH3 domain, *Mol Cell*, 10, 1007-1017.
- [220] J.R. Pires, X. Hong, C. Brockmann, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, R. Erdmann, 2003, The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p, *J Mol Biol*, 326, 1427-1435.

- [221] H. Otera, K. Okumoto, K. Tateishi, Y. Ikoma, E. Matsuda, M. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Osumi, K. Ohashi, O. Higuchi, Y. Fujiki, 1998, Peroxisome targeting signal type 1 (PTS1) receptor is involved in import of both PTS1 and PTS2: studies with PEX5-defective CHO cell mutants, *Mol Cell Biol*, 18, 388-399.
- [222] H. Einwachter, S. Sowinski, W.H. Kunau, W. Schliebs, 2001, *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfil a common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway, *EMBO Rep*, 2, 1035-1039.
- [223] A. Schafer, D. Kerssen, M. Veenhuis, W.H. Kunau, W. Schliebs, 2004, Functional similarity between the peroxisomal PTS2 receptor binding protein Pex18p and the N-terminal half of the PTS1 receptor Pex5p, *Mol Cell Biol*, 24, 8895-8906.
- [224] J.A. Kiel, K. Emmrich, H.E. Meyer, W.H. Kunau, 2005, Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import, *J Biol Chem*, 280, 1921-1930.
- [225] A. Kragt, T. Voorn-Brouwer, M. van den Berg, B. Distel, 2005, The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells, *J Biol Chem*, 280, 7867-7874.
- [226] H.W. Platta, W. Girzalsky, R. Erdmann, 2004, Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p, *Biochem J*, 384, 37-45.
- [227] L. Hicke, R. Dunn, 2003, Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 141-172.
- [228] S. Miyase, S. Tateishi, K. Watanabe, K. Tomita, K. Suzuki, H. Inoue, M. Yamaizumi, 2005, Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination, *J Biol Chem*, 280, 515-524.
- [229] M. Li, C.L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, W. Gu, 2003, Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2, *Science*, 302, 1972-1975.
- [230] J.A. Kiel, M. Otzen, M. Veenhuis, I.J. van der Klei, 2005, Obstruction of polyubiquitination affects PTS1 peroxisomal matrix protein import, *Biochim Biophys Acta*, 1745, 176-186.
- [231] S. Thoms, R. Erdmann, 2006, Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1620-1628.
- [232] H.W. Platta, F. El Magraoui, D. Schlee, S. Grunau, W. Girzalsky, R. Erdmann, 2007, Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling, *J Cell Biol*, 177, 197-204.
- [233] P. Rehling, M. Marzioch, F. Niesen, E. Wittke, M. Veenhuis, W.H. Kunau, 1996, The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PAS7 gene, *Embo J*, 15, 2901-2913.
- [234] J.W. Zhang, P.B. Lazarow, 1996, Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH2-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH2-terminal peptide, *J Cell Biol*, 132, 325-334.
- [235] K. Ghys, M. Fransen, G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven, 2002, Functional studies on human Pex7p: subcellular localization and interaction with proteins containing a peroxisome-targeting signal type 2 and other peroxins, *Biochem J*, 365, 41-50.
- [236] N. Braverman, G. Steel, C. Obie, A. Moser, H. Moser, S.J. Gould, D. Valle, 1997, Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata, *Nat Genet*, 15, 369-376.
- [237] A.M. Motley, E.H. Hettema, E.M. Hogenhout, P. Brites, A.L. ten Asbroek, F.A. Wijburg, F. Baas, H.S. Heijmans, H.F. Tabak, R.J. Wanders, B. Distel, 1997, Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor, *Nat Genet*, 15, 377-380.

- [238] P.E. Purdue, J.W. Zhang, M. Skoneczny, P.B. Lazarow, 1997, Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor, *Nat Genet*, 15, 381-384.
- [239] D.M. van den Brink, P. Brites, J. Haasjes, A.S. Wierzbicki, J. Mitchell, M. Lambert-Hamill, J. de Belleruche, G.A. Jansen, H.R. Waterham, R.J. Wanders, 2003, Identification of PEX7 as the second gene involved in Refsum disease, *Am J Hum Genet*, 72, 471-477.
- [240] J.W. Zhang, P.B. Lazarow, 1995, PEB1 (PAS7) in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a hydrophilic, intra-peroxisomal protein that is a member of the WD repeat family and is essential for the import of thiolase into peroxisomes, *J Cell Biol*, 129, 65-80.
- [241] Y. Elgersma, M. Elgersma-Hooisma, T. Wenzel, J.M. McCaffery, M.G. Farquhar, S. Subramani, 1998, A mobile PTS2 receptor for peroxisomal protein import in *Pichia pastoris*, *J Cell Biol*, 140, 807-820.
- [242] A.W. Woodward, B. Bartel, 2005, The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5, *Mol Biol Cell*, 16, 573-583.
- [243] P.E. Purdue, X. Yang, P.B. Lazarow, 1998, Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway, *J Cell Biol*, 143, 1859-1869.
- [244] M. Sichting, A. Schell-Steven, H. Prokisch, R. Erdmann, H. Rottensteiner, 2003, Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes, *Mol Biol Cell*, 14, 810-821.
- [245] V.I. Titorenko, J.J. Smith, R.K. Szilard, R.A. Rachubinski, 1998, Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome, *J Cell Biol*, 142, 403-420.
- [246] M. Otzen, D. Wang, M.G. Lunenborg, I.J. van der Klei, 2005, Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2), *J Cell Sci*, 118, 3409-3418.
- [247] S. Leon, L. Zhang, W.H. McDonald, J. Yates, 3rd, J.M. Cregg, S. Subramani, 2006, Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation, *J Cell Biol*, 172, 67-78.
- [248] D.M. Nair, P.E. Purdue, P.B. Lazarow, 2004, Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol*, 167, 599-604.
- [249] M.A. Johnson, W.B. Snyder, J.L. Cereghino, M. Veenhuis, S. Subramani, J.M. Cregg, 2001, *Pichia pastoris* Pex14p, a phosphorylated peroxisomal membrane protein, is part of a PTS-receptor docking complex and interacts with many peroxins, *Yeast*, 18, 621-641.
- [250] M.E. Oliveira, C. Reguenga, A.M. Gouveia, C.P. Guimaraes, W. Schliebs, W.H. Kunau, M.T. Silva, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2002, Mammalian Pex14p: membrane topology and characterisation of the Pex14p-Pex14p interaction, *Biochim Biophys Acta*, 1567, 13-22.
- [251] M. Komori, S.W. Rasmussen, J.A. Kiel, R.J. Baerends, J.M. Cregg, I.J. van der Klei, M. Veenhuis, 1997, The Hansenula polymorpha PEX14 gene encodes a novel peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis, *Embo J*, 16, 44-53.
- [252] M. Hayashi, K. Nito, K. Toriyama-Kato, M. Kondo, T. Yamaya, M. Nishimura, 2000, AtPex14p maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes, *Embo J*, 19, 5701-5710.
- [253] A. Jardim, N. Rager, W. Liu, B. Ullman, 2002, Peroxisomal targeting protein 14 (PEX14) from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization, *Mol Biochem Parasitol*, 124, 51-62.
- [254] K. Niederhoff, N.M. Meindl-Beinker, D. Kerssen, U. Perband, A. Schafer, W. Schliebs, W.H. Kunau, 2005, Yeast Pex14p possesses two functionally distinct Pex5p and one Pex7p binding sites, *J Biol Chem*, 280, 35571-35578.

- [255] W. Girzalsky, P. Rehling, K. Stein, J. Kipper, L. Blank, W.H. Kunau, R. Erdmann, 1999, Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes, *J Cell Biol*, 144, 1151-1162.
- [256] M. Fransen, C. Brees, K. Ghys, L. Amery, G.P. Mannaerts, D. Ladant, P.P. Van Veldhoven, 2002, Analysis of mammalian peroxin interactions using a non-transcription-based bacterial two-hybrid assay, *Mol Cell Proteomics*, 1, 243-252.
- [257] R. Itoh, Y. Fujiki, 2006, Functional domains and dynamic assembly of the peroxin Pex14p, the entry site of matrix proteins, *J Biol Chem*, 281, 10196-10205.
- [258] C. Williams, B. Distel, 2006, Pex13p: docking or cargo handling protein?, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1585-1591.
- [259] A. Schell-Steven, K. Stein, M. Amoros, C. Landgraf, R. Volkmer-Engert, H. Rottensteiner, R. Erdmann, 2005, Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import, *Mol Cell Biol*, 25, 3007-3018.
- [260] M. Fransen, I. Vastiau, C. Brees, V. Brys, G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven, 2004, Potential role for Pex19p in assembly of PTS-receptor docking complexes, *J Biol Chem*, 279, 12615-12624.
- [261] K. Stein, A. Schell-Steven, R. Erdmann, H. Rottensteiner, 2002, Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import, *Mol Cell Biol*, 22, 6056-6069.
- [262] Y. Elgersma, M. van den Berg, H.F. Tabak, B. Distel, 1993, An efficient positive selection procedure for the isolation of peroxisomal import and peroxisome assembly mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 135, 731-740.
- [263] S.J. Gould, D. McCollum, A.P. Spong, J.A. Heyman, S. Subramani, 1992, Development of the yeast *Pichia pastoris* as a model organism for a genetic and molecular analysis of peroxisome assembly, *Yeast*, 8, 613-628.
- [264] Y. Liu, J. Bjorkman, A. Urquhart, R.J. Wanders, D.I. Crane, S.J. Gould, 1999, PEX13 is mutated in complementation group 13 of the peroxisome-biogenesis disorders, *Am J Hum Genet*, 65, 621-634.
- [265] B.K. Kay, M.P. Williamson, M. Sudol, 2000, The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains, *Faseb J*, 14, 231-241.
- [266] B.J. Mayer, 2001, SH3 domains: complexity in moderation, *J Cell Sci*, 114, 1253-1263.
- [267] G.B. Cohen, R. Ren, D. Baltimore, 1995, Modular binding domains in signal transduction proteins, *Cell*, 80, 237-248.
- [268] T.W. Brown, V.I. Titorenko, R.A. Rachubinski, 2000, Mutants of the *Yarrowia lipolytica* PEX23 gene encoding an integral peroxisomal membrane peroxin mislocalize matrix proteins and accumulate vesicles containing peroxisomal matrix and membrane proteins, *Mol Biol Cell*, 11, 141-152.
- [269] Y. Huang, R. Ito, S. Miura, T. Hashimoto, M. Ito, 2000, A missense mutation in the RING finger motif of PEX2 protein disturbs the import of peroxisome targeting signal 1 (PTS1)-containing protein but not the PTS2-containing protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 717-721.
- [270] J.E. Kalish, C. Theda, J.C. Morrell, J.M. Berg, S.J. Gould, 1995, Formation of the peroxisome lumen is abolished by loss of *Pichia pastoris* Pas7p, a zinc-binding integral membrane protein of the peroxisome, *Mol Cell Biol*, 15, 6406-6419.
- [271] J.E. Kalish, G.A. Keller, J.C. Morrell, S.J. Mihalik, B. Smith, J.M. Cregg, S.J. Gould, 1996, Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins, *Embo J*, 15, 3275-3285.
- [272] N. Shimozawa, T. Tsukamoto, Y. Suzuki, T. Orii, Y. Shirayoshi, T. Mori, Y. Fujiki, 1992, A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly, *Science*, 255, 1132-1134.

- [273] D.S. Warren, J.C. Morrell, H.W. Moser, D. Valle, S.J. Gould, 1998, Identification of PEX10, the gene defective in complementation group 7 of the peroxisome-biogenesis disorders, *Am J Hum Genet*, 63, 347-359.
- [274] K. Okumoto, A. Bogaki, K. Tateishi, T. Tsukamoto, T. Osumi, N. Shimozawa, Y. Suzuki, T. Orii, Y. Fujiki, 1997, Isolation and characterization of peroxisome-deficient Chinese hamster ovary cell mutants representing human complementation group III, *Exp Cell Res*, 233, 11-20.
- [275] K. Okumoto, R. Itoh, N. Shimozawa, Y. Suzuki, S. Tamura, N. Kondo, Y. Fujiki, 1998, Mutations in PEX10 is the cause of Zellweger peroxisome deficiency syndrome of complementation group B, *Hum Mol Genet*, 7, 1399-1405.
- [276] K. Okumoto, N. Shimozawa, A. Kawai, S. Tamura, T. Tsukamoto, T. Osumi, H. Moser, R.J. Wanders, Y. Suzuki, N. Kondo, Y. Fujiki, 1998, PEX12, the pathogenic gene of group III Zellweger syndrome: cDNA cloning by functional complementation on a CHO cell mutant, patient analysis, and characterization of PEX12p, *Mol Cell Biol*, 18, 4324-4336.
- [277] R. Patarca, M.A. Fletcher, 1992, Ring finger in the peroxisome assembly factor-1, *FEBS Lett*, 312, 1-2.
- [278] X. Tan, H.R. Waterham, M. Veenhuis, J.M. Cregg, 1995, The Hansenula polymorpha PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation, *J Cell Biol*, 128, 307-319.
- [279] T. Tsukamoto, S. Miura, Y. Fujiki, 1991, Restoration by a 35K membrane protein of peroxisome assembly in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant, *Nature*, 350, 77-81.
- [280] D.S. Warren, B.D. Wolfe, S.J. Gould, 2000, Phenotype-genotype relationships in PEX10-deficient peroxisome biogenesis disorder patients, *Hum Mutat*, 15, 509-521.
- [281] S.R. Terlecky, J.E. Legakis, S.E. Hueni, S. Subramani, 2001, Quantitative analysis of peroxisomal protein import in vitro, *Exp Cell Res*, 263, 98-106.
- [282] T.L. Johnson, L.J. Olsen, 2003, Import of the peroxisomal targeting signal type 2 protein 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase into glyoxysomes, *Plant Physiol*, 133, 1991-1999.
- [283] C.C. Chang, W.H. Lee, H. Moser, D. Valle, S.J. Gould, 1997, Isolation of the human PEX12 gene, mutated in group 3 of the peroxisome biogenesis disorders, *Nat Genet*, 15, 385-388.
- [284] H.R. Waterham, Y. de Vries, K.A. Russel, W. Xie, M. Veenhuis, J.M. Cregg, 1996, The Pichia pastoris PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1, *Mol Cell Biol*, 16, 2527-2536.
- [285] R. Erdmann, F.F. Wiebel, A. Flessau, J. Rytka, A. Beyer, K.U. Frohlich, W.H. Kunau, 1991, PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases, *Cell*, 64, 499-510.
- [286] A.P. Spong, S. Subramani, 1993, Cloning and characterization of PAS5: a gene required for peroxisome biogenesis in the methylotrophic yeast Pichia pastoris, *J Cell Biol*, 123, 535-548.
- [287] S. Patel, M. Latterich, 1998, The AAA team: related ATPases with diverse functions, *Trends Cell Biol*, 8, 65-71.
- [288] P.I. Hanson, S.W. Whiteheart, 2005, AAA+ proteins: have engine, will work, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 519-529.
- [289] T. Ogura, A.J. Wilkinson, 2001, AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function, *Genes Cells*, 6, 575-597.
- [290] B.E. Reuber, E. Germain-Lee, C.S. Collins, J.C. Morrell, R. Ameritunga, H.W. Moser, D. Valle, S.J. Gould, 1997, Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders, *Nat Genet*, 17, 445-448.
- [291] J.A. Heyman, E. Monosov, S. Subramani, 1994, Role of the PAS1 gene of Pichia pastoris in peroxisome biogenesis, *J Cell Biol*, 127, 1259-1273.

- [292] W.M. Nuttley, A.M. Brade, G.A. Eitzen, M. Veenhuis, J.D. Aitchison, R.K. Szilard, J.R. Glover, R.A. Rachubinski, 1994, PAY4, a gene required for peroxisome assembly in the yeast *Yarrowia lipolytica*, encodes a novel member of a family of putative ATPases, *J Biol Chem*, 269, 556-566.
- [293] K.N. Faber, J.A. Heyman, S. Subramani, 1998, Two AAA family peroxins, PpPex1p and PpPex6p, interact with each other in an ATP-dependent manner and are associated with different subcellular membranous structures distinct from peroxisomes, *Mol Cell Biol*, 18, 936-943.
- [294] J.A. Kiel, R.E. Hilbrands, I.J. van der Klei, S.W. Rasmussen, F.A. Salomons, M. van der Heide, K.N. Faber, J.M. Cregg, M. Veenhuis, 1999, Hansenula polymorpha Pex1p and Pex6p are peroxisome-associated AAA proteins that functionally and physically interact, *Yeast*, 15, 1059-1078.
- [295] B.V. Geisbrecht, C.S. Collins, B.E. Reuber, S.J. Gould, 1998, Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8630-8635.
- [296] V.I. Titorenko, R.A. Rachubinski, 1998, Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis, *Mol Cell Biol*, 18, 2789-2803.
- [297] T. Voorn-Brouwer, I. van der Leij, W. Hemrika, B. Distel, H.F. Tabak, 1993, Sequence of the PAS8 gene, the product of which is essential for biogenesis of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim Biophys Acta*, 1216, 325-328.
- [298] S. Tamura, N. Shimosawa, Y. Suzuki, T. Tsukamoto, T. Osumi, Y. Fujiki, 1998, A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p, *Biochem Biophys Res Commun*, 245, 883-886.
- [299] I. Birschmann, K. Rosenkranz, R. Erdmann, W.H. Kunau, 2005, Structural and functional analysis of the interaction of the AAA-peroxins Pex1p and Pex6p, *Febs J*, 272, 47-58.
- [300] T. Imanaka, G.M. Small, P.B. Lazarow, 1987, Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential, *J Cell Biol*, 105, 2915-2922.
- [301] M.R. Pool, E. Lopez-Huertas, A. Baker, 1998, Characterization of intermediates in the process of plant peroxisomal protein import, *Embo J*, 17, 6854-6862.
- [302] C.S. Collins, J.E. Kalish, J.C. Morrell, J.M. McCaffery, S.J. Gould, 2000, The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p, and pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import, *Mol Cell Biol*, 20, 7516-7526.
- [303] R. Erdmann, W. Schliebs, 2005, Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 738-742.
- [304] V.I. Titorenko, H. Chan, R.A. Rachubinski, 2000, Fusion of small peroxisomal vesicles in vitro reconstructs an early step in the in vivo multistep peroxisome assembly pathway of *Yarrowia lipolytica*, *J Cell Biol*, 148, 29-44.
- [305] V.I. Titorenko, R.A. Rachubinski, 2001, Dynamics of peroxisome assembly and function, *Trends Cell Biol*, 11, 22-29.
- [306] P.B. Lazarow, 2003, Peroxisome biogenesis: advances and conundrums, *Curr Opin Cell Biol*, 15, 489-497.
- [307] N. Matsumoto, S. Tamura, Y. Fujiki, 2003, The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes, *Nat Cell Biol*, 5, 454-460.
- [308] I. Birschmann, A.K. Stroobants, M. van den Berg, A. Schafer, K. Rosenkranz, W.H. Kunau, H.F. Tabak, 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.
- [309] K. Rosenkranz, I. Birschmann, S. Grunau, W. Girzalsky, W.H. Kunau, R. Erdmann, 2006, Functional association of the AAA complex and the peroxisomal importomer, *Febs J*, 273, 3804-3815.

- [310] N. Rayapuram, S. Subramani, 2006, The importomer--a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix, *Biochim Biophys Acta*, 1763, 1613-1619.
- [311] M. Albertini, W. Girzalsky, M. Veenhuis, W.H. Kunau, 2001, Pex12p of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import, *Eur J Cell Biol*, 80, 257-270.
- [312] I. Heiland, R. Erdmann, 2005, Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins, *Febs J*, 272, 2362-2372.
- [313] R. Boteva, A. Koek, N.V. Visser, A.J. Visser, E. Krieger, T. Zlateva, M. Veenhuis, I. van der Klei, 2003, Fluorescence analysis of the *Hansenula polymorpha* peroxisomal targeting signal-1 receptor, Pex5p, *Eur J Biochem*, 270, 4332-4338.
- [314] A. Jardim, W. Liu, E. Zhelezanova, B. Ullman, 2000, Peroxisomal targeting signal-1 receptor protein PEX5 from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization, *J Biol Chem*, 275, 13637-13644.
- [315] A.F. Neuwald, L. Aravind, J.L. Spouge, E.V. Koonin, 1999, AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res*, 9, 27-43.
- [316] R.D. Vale, 2000, AAA proteins. Lords of the ring, *J Cell Biol*, 150, 13-19.
- [317] K.C. Kain, P.A. Orlandi, D.E. Lanar, 1991, Universal promoter for gene expression without cloning: expression-PCR, *Biotechniques*, 10, 366-374.
- [318] A.M. Gouveia, C.P. Guimaraes, M.E. Oliveira, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2003, Insertion of Pex5p into the peroxisomal membrane is cargo protein-dependent, *J Biol Chem*, 278, 4389-4392.
- [319] T.C. Laurent, and Killander, J., 1964, *J Chromatogr*, 14, 217-230.
- [320] L.M. Siegel, K.J. Monty, 1966, Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases, *Biochim Biophys Acta*, 112, 346-362.
- [321] A.M. Gouveia, C. Reguenga, M.E. Oliveira, C. Eckerskorn, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 1999, Alkaline density gradient floatation of membranes: polypeptide composition of the mammalian peroxisomal membrane, *Anal Biochem*, 274, 270-277.
- [322] M.M. Bradford, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- [323] M. Fransen, T. Wylin, C. Brees, G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven, 2001, Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences, *Mol Cell Biol*, 21, 4413-4424.
- [324] U.K. Laemmli, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- [325] L. Manciu, X.B. Chang, F. Buyse, Y.X. Hou, A. Gustot, J.R. Riordan, J.M. Ruysschaert, 2003, Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione, *J Biol Chem*, 278, 3347-3356.
- [326] G. Dodt, S.J. Gould, 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.
- [327] K.B. Moscicka, S.H. Klompmaker, D. Wang, I.J. van der Klei, E.J. Boekema, 2007, The *Hansenula polymorpha* peroxisomal targeting signal 1 receptor, Pex5p, functions as a tetramer, *FEBS Lett*, 581, 1758-1762.
- [328] H.J. Dyson, P.E. Wright, 2002, Coupling of folding and binding for unstructured proteins, *Curr Opin Struct Biol*, 12, 54-60.
- [329] A.F. Carvalho, J. Costa-Rodrigues, I. Correia, J. Costa Pessoa, T.Q. Faria, C.L. Martins, M. Fransen, C. Sa-Miranda, J.E. Azevedo, 2006, The N-terminal half of the peroxisomal cycling receptor Pex5p is a natively unfolded domain, *J Mol Biol*, 356, 864-875.

- [330] T. Harano, S. Nose, R. Uezu, N. Shimizu, Y. Fujiki, 2001, Hsp70 regulates the interaction between the peroxisome targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p and PTS1, *Biochem J*, 357, 157-165.
- [331] A.F. Carvalho, Grou, C. P., Pinto, M. P., Alencastre, I. S., Costa-Rodrigues, J., Fransen, M., Sá-Miranda, C. Azevedo, J. E., 2007, Functional characterization of two missense mutations in Pex5p- C11S and N526K, *Biochim Biophys Acta*, *in press*.