

MÁRCIA EDUARDA MACIEL DE OLIVEIRA

**A MAQUINARIA DE IMPORTAÇÃO PROTEICA
PEROXISSOMAL: UMA CARACTERIZAÇÃO
ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

**Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
Porto, 2004**

MÁRCIA EDUARDA MACIEL DE OLIVEIRA

**A MAQUINARIA DE IMPORTAÇÃO PROTEICA
PEROXISSOMAL: UMA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
FUNCIONAL**

**Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor em
Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar**

**ORIENTADOR: Prof. Doutor Jorge Azevedo
CO-ORIENTADORA: Doutora Clara Sá Miranda**

ÍNDICE

PRECEITOS LEGAIS	1
AGRADECIMENTOS	2
1. RESUMO	3
2. ABSTRACT	5
3. RÉSUMÉ	7
4. ABREVIATURAS UTILIZADAS	9
5. INTRODUÇÃO GERAL	12
5.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS PEROXISSOMAS	13
5.2. DOENÇAS PEROXISSOMAS	17
5.3. MODELOS ACTUAIS DE BIOGÉNESE PEROXISSOMAL	19
5.4. BIOGÉNESE DA MEMBRANA PEROXISSOMAL	21
5.4.1. Peroxinas envolvidas na biogénese da membrana peroxissomal	23
5.5. IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O PEROXISSOMA	24
5.5.1. Importação de proteínas para a matriz	24
5.5.1.1. <i>Sinais de endereçamento e receptores peroxissomais</i>	24
5.5.1.2. <i>Modelos actuais de importação matricial</i>	25
5.5.1.3. <i>Pex5p, o receptor das proteínas PTS1</i>	26
5.5.1.4. <i>Pex7p, o receptor das proteínas PTS2</i>	29
5.5.1.5. <i>O evento de docking na membrana peroxissomal</i>	30
5.5.1.6. <i>O evento de translocação através da membrana peroxissomal</i>	31
5.5.1.7. <i>A reciclagem dos receptores livres para o citosol</i>	33
5.5.1.8. <i>O papel das ATPases</i>	34
5.5.2. Modelos experimentais para o estudo do mecanismo de importação proteica peroxissomal	34
6. OBJECTIVOS	37
7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	39
7.1. ISOLAMENTO DE FRACÇÕES SUBCELULARES DE FÍGADO DE RATO	40
7.2. <i>PROTEASE PROTECTION ASSAYS</i>	41
7.3. EXTRACÇÃO ALCALINA COM CARBONATO	42
7.4. CLIVAGEM QUÍMICA COM BROMETO DE CIANOGENIO	42
7.5. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO	42

7.6. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS	44
7.7. SÍNTESE <i>IN VITRO</i> DE PROTEÍNAS MARCADAS RADIOATIVAMENTE	45
7.8. CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTES DE DENSIDADE	46
7.9. <i>BLOT-OVERLAY ASSAYS</i>	47
7.10. REACÇÕES DE IMPORTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	48
7.11. ELECTROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTES	49
7.12. <i>WESTERN-BLOTTING</i>	50
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
8.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PEX14p DE MAMÍFEROS	53
8.1.1. Topologia membranar da Pex14p de mamíferos	55
8.1.2. Caracterização dos homopolímeros formados pela Pex14p recombinante	59
8.1.3. Mapeamento do domínio envolvido na ligação Pex14-Pex14p	62
8.1.4. Discussão	64
8.2. ENERGÉTICA DE IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PTS1 PARA A MATRIZ PEROXISSOMAL	66
8.2.1. Influência dos níveis de Pex5p peroxissomal endógena na importação da ³⁵ S-Pex5p	68
8.2.2. A importação da Pex5p para peroxissomas purificados	72
8.2.3. Caracterização do evento de inserção da Pex5p na membrana do peroxissoma	73
8.2.4. A inserção da Pex5p na membrana peroxissomal é independente de ATP	75
8.2.5. Discussão	76
9. CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	79
10. BIBLIOGRAFIA	82

PRECEITOS LEGAIS

De acordo com o disposto no Decreto-Lei n.º 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 de Doutoramento foram apresentados os resultados contidos nos artigos publicados seguidamente discriminados:

Oliveira ME, Reguenga C, Gouveia AM, Guimarães CP, Schliebs W, Kunau W-H, Silva MT, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (2002) Mammalian Pex14p: membrane topology and characterisation of the Pex14p-Pex14p interaction. *Biochim Biophys Acta* **1567**, 13-22

Oliveira ME, Gouveia AM, Pinto RA, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (2003) The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *J Biol Chem* **278**, 39483-39488

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que directamente ou indirectamente contribuíram para este trabalho, ajudando ao seu crescimento e desenvolvimento.

Este trabalho foi realizado na Unidade de Enzimologia do Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães (IGMJM)/Unidade de Biologia do Lisossoma e do Peroxissoma (Unilipe) do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto.

Os meus primeiros agradecimentos são dirigidos aos meus orientadores. Ao Prof. Doutor Jorge Azevedo pela dedicação constante, pelo apoio sempre disponível e pelos valores científicos transmitidos. À Doutora Clara Sá Miranda pelo apoio incondicional, pelo entusiasmo e pelo exemplo de empenho na vida científica.

Quero também expressar a minha gratidão a todos os elementos da Unidade de Enzimologia do IGMJM/Unilipe do IBMC - os do presente e os que por lá passaram - que ajudaram a criar o bom ambiente de trabalho que vivi neste laboratório. Um agradecimento especial para aqueles que trabalharam directamente comigo - Alexandra, Carla, Carlos e João - pelo apoio contínuo e estimulante, pela amizade e pelo espírito de entreajuda que fez de nós uma equipa.

Gostaria ainda de agradecer ao Dr. Rui Pinto e ao Prof. Doutor Teixeira da Silva o auxílio prestado quando as suas competências foram necessárias para complementar as nossas.

Finalmente, os meus agradecimentos à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e ao Fundo Social Europeu (FSE) pelo apoio financeiro atribuído a este trabalho no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio (Bolsa de Doutoramento PRAXIS XXI/BD/21819/99), e à Sociedade Portuguesa de Bioquímica e à Fundação Calouste Gulbenkian pelos subsídios concedidos à minha participação em diversas reuniões científicas nacionais e internacionais. Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projectos PRAXIS XXI/2/2.1/SAU/1345/95 e POCTI/1999/BME/34648 financiados pela FCT e pelo FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio.

1. RESUMO

1. RESUMO

Segundo o modelo actualmente aceite relativo à biogénese peroxissomal, a importação de proteínas para a matriz do peroxissoma é mediada por dois receptores citosólicos, que reconhecem os sinais de endereçamento destas proteínas e efectuem o seu transporte até ao peroxissoma. Este transporte é seguido pela translocação das proteínas peroxissomais através da membrana e pela reciclagem dos receptores livres para o citosol, onde iniciam novos ciclos de transporte. Este processo de importação é dependente, para além dos receptores, de uma complexa maquinaria de importação proteica que inclui diversas peroxinas (proteínas essenciais para a biogénese do peroxissoma) associadas à membrana peroxissomal. Um dos componentes centrais desta maquinaria é a Pex14p.

Neste trabalho foi caracterizada a topologia membranar da Pex14p através de *protease protection assays* e técnicas de clivagem química. Os resultados obtidos sugerem que: o domínio C-terminal desta peroxina (compreendido entre os aminoácidos 130 a 377) está localizado no lado citosólico da membrana peroxissomal; o domínio constituído pelos primeiros 130 aminoácidos N-terminais apresenta o principal (senão o único) domínio de associação da Pex14p à membrana peroxissomal.

A análise do coeficiente de sedimentação da Pex14p recombinante revelou que esta proteína forma homopolímeros de estequiometria variada. O domínio envolvido nesta interacção foi identificado por *blot-overlay assays*. Os dados obtidos sugerem que este domínio está localizado entre os aminoácidos 147-278 da Pex14p, uma região que contém um motivo *coiled-coil* putativo.

É unanimemente aceite que o processo de importação proteica para o peroxissoma requer hidrólise de ATP. No entanto, o(s) passo(s) onde este ATP é consumido nunca foi(foram) determinado(s).

Utilizando um sistema de importação proteica peroxissomal *in vitro* foi possível demonstrar que a inserção da Pex5p na membrana é um processo independente de ATP. Esta observação, juntamente com resultados anteriores relativos à topologia membranar da Pex5p peroxissomal, permitiu-nos propor que a translocação de proteínas através da membrana peroxissomal tem como força motriz o estabelecimento de interacções proteína-proteína.

2. ABSTRACT

2. ABSTRACT

According to the model described for peroxisomal biogenesis, the import of proteins to the peroxisomal matrix is mediated by two cytosolic receptors, which recognize their peroxisomal targeting signals and transport them to the peroxisome. This event is followed by protein translocation across the peroxisomal membrane and recycling of the free receptors to the cytosol, where they start new transport cycles. The import mechanism depends on a complex protein machinery which includes several peroxins (proteins that are essential to peroxisomal biogenesis) associated with the peroxisomal membrane. One central component of this machinery is Pex14p.

In this work the membrane topology of Pex14p was characterised using a combination of protease protection assays and chemical cleavage reactions. The data obtained suggest that: the C-terminal domain of this peroxin (corresponding to amino acid residues 130-377) is localised on the cytosolic side of the peroxisomal membrane; the first 130 N-terminal amino acid residues contain the major (if not the only) domain responsible for Pex14p membrane association.

The sedimentation analysis of recombinant Pex14p showed that this protein forms homopolymers of variable stoichiometry. The domain involved in this interaction was identified by blot-overlay assays. The data obtained suggest that this domain corresponds to amino acid residues 147-278 of Pex14p, a region containing a putative coiled-coil motif.

It is known for long that peroxisomal protein import is an ATP-dependent process. However, the steps where this energy is needed have never been determined.

Using an *in vitro* peroxissomal import system it was concluded that the association of Pex5p with peroxisomal membrane is independent on ATP hydrolysis. This result and the data available on Pex5p membrane topology suggest that the driving force for protein translocation across the peroxisomal membrane derives from protein-protein interactions.

3. RÉSUMÉ

3. RÉSUMÉ

Selon le model actuellement en vogue relativement à la biogénèse du peroxyssome, l'importation des protéines vers la matrice peroxyssomelle est médiée par deux récepteurs cytosoliques, qui reconnaissent les signaux de transports de ces protéines et effectuent son transport jusqu'aux peroxyssomes. Ce transport est suivi de la translocation des protéines peroxyssomelles à travers de sa membrane et du recyclage des récepteurs libres vers le cytosol, où s'initient de nouveaux cycles de transport. Ce processus d'importation est dépendent d'une complexe machinerie d'importation protéique qui inclut diverses peroxyxines (protéines essentiel à la biogénèse du peroxyssome) associées à la membrane peroxyssomelle. La Pex14p est l'un des constituents central de cette machinerie.

Dans ce travail la topologie membranaire de la Pex14p a été caractérisé à travers de *protease protection assays* et de techniques de clivage chimique. Les résultats obtenus suggèrent que: le domaine C-terminal de cette peroxyxine (entre les acides aminés 130 à 377) se trouve localiser du côté cytosolique de la membrane peroxyssomelle; le domaine constitué par les premiers 130 acides aminés N-terminaux est le principal (peut-être même le seul) domaine de liaison de la Pex14p à la membrane du peroxyssome.

L'analyse du coefficient de sédimentation de la Pex14p recombinante a révélé que cette protéine forme des homopolymères de diverse stéchiométrie. Le domaine qui participe dans cette interaction a été identifié par *blot-overlay assays*. Les résultats obtenus suggèrent que ce domaine se trouve localiser entre les acides aminés 147-278 de la Pex14p, une région qui contient le motif *coiled-coil*.

Le processus de transport des protéines vers le peroxyssome est dépendent de l'hydrolyse de l'ATP. Néanmoins, les étapes où cet ATP est consommé n'ont jamais été déterminé.

À travers d'un système d'import *in vitro* on a démontré que l'insertion de la Pex5p dans la membrane du peroxyssome est un processus indépendant d'ATP. Cette observation, conjuguée avec les résultats relatifs à la topologie membranaire de la Pex5p peroxyssomelle, nous ont permis de postuler que la translocation des protéines à travers la membrane du peroxyssome utilise come force motrice l'établissement d'interactions protéines-protéines.

4. ABREVIATURAS UTILIZADAS

4. ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AGCMs	Ácidos gordos de cadeia média
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATP γ S	Adenosina 5'-(3-tiotrifosfato)
ATPases AAA	ATPases associadas a diversas actividades celulares
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CG	Grupo de complementação
CoA	Coenzima A
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
Djp	<i>DnaJ-like protein</i>
Dlp	<i>Dynammin-like protein</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
GST	Glutathiona S-transferase
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IgGs	Imunoglobulinas G
IRD	Doença Infantil de Refsum
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mPTS	Sinal de endereçamento para o peroxissoma das proteínas de membrana
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NALD	Adrenoleucodistrofia Neonatal
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PAS	Proteína A ligada a Sepharose
PBD	Doença da Biogénese Peroxissomal
PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pex	Peroxina
PK	Proteinase K
PMP	Proteína da membrana do peroxissoma
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PNS	Sobrenadante pós-nuclear
PTS	Sinal de endereçamento para o peroxissoma
PTS1	Sinal de endereçamento para o peroxissoma de tipo 1
PTS2	Sinal de endereçamento para o peroxissoma de tipo 2
PTS3	Sinal de endereçamento para o peroxissoma de tipo 3
RCDP	Condrodisplasia Rizomélica Punctata
RE	Retículo endoplasmático
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SH3	<i>Src homology domain 3</i>

TCA	Ácido tricloroacético
TPR	Repetição tetratricopeptídica
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TX-100	Triton X-100
UOX	Urato oxidase
X-ALD	Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X
WD-40	Domínio de 40 aminoácidos que contém um motivo do tipo triptofano-aspartato
WT	Estirpe selvagem
ZS	Síndrome de Zellweger

5. INTRODUÇÃO GERAL

5. INTRODUÇÃO GERAL

5.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS PEROXISSOMAS

Os peroxissomas constituem uma família de organelos que se podem encontrar em quase todas as células eucarióticas (Purdue e Lazarow 2001a).

Estruturalmente os peroxissomas são organelos circulares delimitados por uma única membrana e com cerca de 0.1-1 μm de diâmetro (Figura 5.1). Contudo, os peroxissomas podem ainda apresentar formas tubulares e reticulares (Sacksteder e Gould 2000).

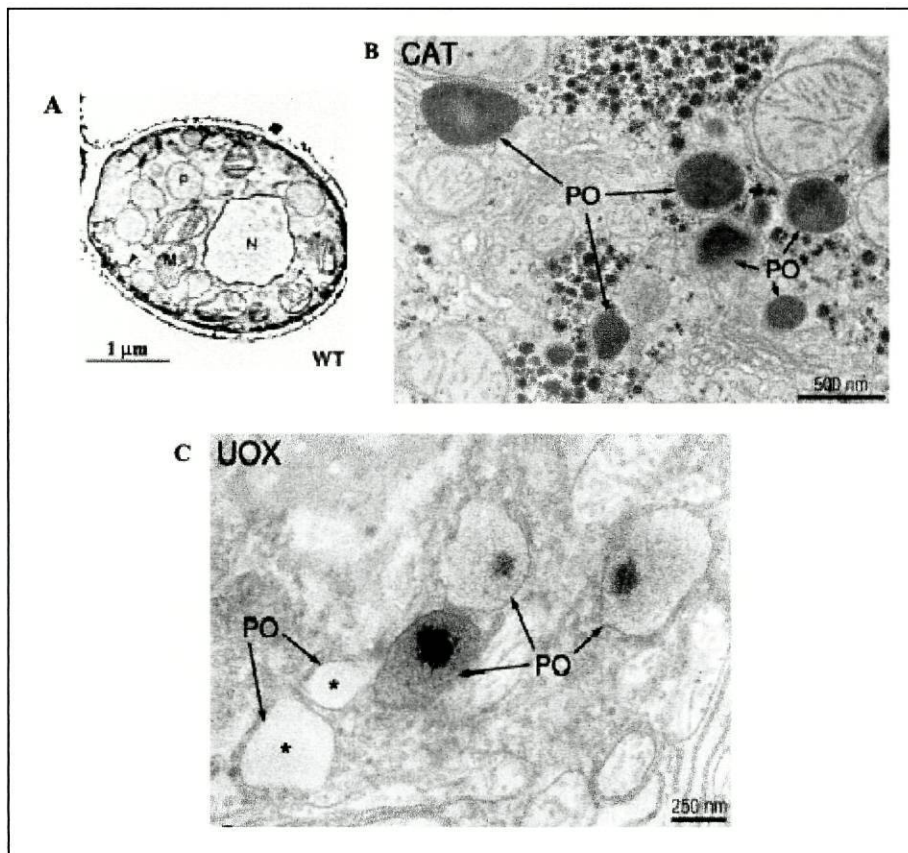


Figura 5.1. Observação de peroxissomas através de microscopia electrónica.

Fotografias de peroxissomas de uma estirpe selvagem (*WT*) de *Yarrowia lipolytica* (A) e de fígado de rato (B e C). (A) As células foram fixadas com KMnO_4 e processadas para microscopia electrónica. P, peroxissoma; M, mitocôndria; N, núcleo. (B) Os peroxissomas foram sujeitos à técnica de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) alcalina para detecção da actividade peroxidativa da catalase (CAT). PO, peroxissoma. (C) Os peroxissomas foram sujeitos à técnica do cério para detecção da actividade da urato oxidase (UOX). PO, peroxissoma. A, extraída de Titorenko *et al.* 1998 e B e C, extraídas de Fahimi e Baumgart 1999.

A matriz (ou lúmen) peroxissomal tem um aspecto granular quando observada por microscopia electrónica e possui a maior parte das enzimas peroxissomais. Em alguns organismos, esta matriz pode apresentar inclusões cristalinas facilmente identificadas por microscopia electrónica (Purdue e Lazarow 2001a). No caso do fígado de rato, estas inclusões são essencialmente constituídas pela enzima urato oxidase (ver Figura 5.1 e Lazarow e Fujiki 1985).

O corpo de Woronin identificado no fungo *Neurospora Crassa* é uma classe excepcional de peroxissomas que apresenta essencialmente uma função estrutural. Este organelo contém uma estrutura cristalóide hexagonal que parece ser responsável pelo fecho dos poros septais de hifas danificadas, evitando o derramamento do citoplasma celular (Jedd e Chua 2000).

Os peroxissomas são caracterizados por uma acentuada variabilidade funcional. O seu tamanho, número, composição proteica e função bioquímica varia dependendo do organismo, tipo celular e/ou condições ambientais. A β -oxidação de ácidos gordos e a decomposição do peróxido de hidrogénio pela enzima catalase são as funções peroxissomais mais conservadas ao longo da escala filogenética (Tabela 5.1 e Titorenko e Rachunbinski 2001a).

Tabela 5.1. **Funções metabólicas dos peroxissomas.**^a

<p>Leveduras <i>Biossíntese:</i> lisina <i>Degradação:</i> aminoácidos, metanol, β-oxidação de ácidos gordos, decomposição de peróxido de hidrogénio, ciclo do glioxilato</p>
<p>Fungos <i>Biossíntese:</i> penicilina <i>Degradação:</i> β-oxidação de ácidos gordos, decomposição de peróxido de hidrogénio, ciclo do glioxilato</p>
<p>Plantas <i>Degradação:</i> purinas, algumas reacções da fotorespiração (a conversão do glicolato a glicina e da serina a glicerato), β-oxidação de ácidos gordos, decomposição de peróxido de hidrogénio, ciclo do glioxilato</p>
<p>Mamíferos <i>Biossíntese:</i> éter-fosfolípidos (plasmalogenos), colesterol, ácidos biliares, ácidos gordos polinsaturados <i>Degradação:</i> aminoácidos, purinas, prostaglandinas, poliaminas, α-oxidação de ácidos gordos, β-oxidação de ácidos gordos, decomposição de peróxido de hidrogénio</p>

^aAdaptada de Titorenko e Rachunbinski 2001a.

Como os peroxissomas não possuem DNA, todas as proteínas peroxissomais da matriz e da membrana são codificadas por genes nucleares, sintetizadas em ribossomas

livres no citosol e transportadas para o organelo através de uma complexa maquinaria de importação peroxissomal (Lazarow e Fujiki 1985).

As proteínas essenciais para a biogénese dos peroxissomas denominam-se por peroxinas ou pelo acrónimo PexNp, em que N é um número que está relacionado com a ordem da sua descoberta, e são codificadas pelos genes *PEX_N* (Distel *et al.* 1996).

Actualmente são conhecidas 33 peroxinas (Rottensteiner *et al.* 2003, Tam *et al.* 2003, Vizeacoumar *et al.* 2003 e 2004 e Weller *et al.* 2003). Na grande maioria dos casos, estas peroxinas foram identificadas pela primeira vez em eucariotas inferiores (como por exemplo em *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*). O facto da β -oxidação de ácidos gordos ser um processo exclusivamente peroxissomal nestes organismos facilita enormemente a selecção de mutantes deficientes na biogénese peroxissomal (Waterham e Cregg 1997 e Faber *et al.* 2002). Buscas de homologia em bases de dados utilizando as peroxinas destes organismos como “sondas” levaram à identificação da maior parte das peroxinas dos eucariotas superiores. O êxito de tal estratégia ilustra o facto da maquinaria da biogénese peroxissomal ter sido relativamente bem conservada ao longo da escala filogenética (Sparkes e Baker 2002).

No Homem, mutações em pelo menos 12 destes genes dão origem às denominadas doenças da Biogénese Peroxissomal (PBDs) (Weller *et al.* 2003), enfatizando o papel dos peroxissomas na saúde humana.

A Tabela 5.2 apresenta uma descrição sumária de algumas das características das peroxinas até ao momento conhecidas. Os processos de crescimento e divisão peroxissomais são regulados por estas peroxinas. Contudo, os mecanismos moleculares que estão na base destes processos estão ainda longe de ser conhecidos.

Tabela 5.2. Descrição de algumas características das peroxinas conhecidas.^a

Peroxina	Domínio funcional/Família proteica	Interações proteicas (Pexp)	Função proposta
Pex1p	ATPase AAA	6	Importação de proteínas da matriz, fusão de vesículas
Pex2p	Domínio RING de ligação ao zinco	10, 19	Translocação, reciclagem do receptor
Pex3p		19	Importação de PMPs
Pex4p	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>	22	<i>Turnover</i> da Pex18p/Pex21p
Pex5p	Domínios TPR e repetições do tipo WXXXF/Y	5, 7, 8, 10, 12, 13, 14	Importação de proteínas PTS1 (leveduras) e PTS1+PTS2 (mamíferos), receptor cíclico
Pex6p	ATPase AAA	1	Importação de proteínas da matriz, fusão de vesículas
Pex7p	Repetições WD-40	5L, 13, 14, 18, 20, 21	Importação de proteínas PTS2 (dependente da interação com a Pex5pL nos mamíferos), receptor cíclico
Pex8p		5, 20	Importação de proteínas da matriz
Pex9p			Importação de proteínas da matriz
Pex10p	Domínio RING de ligação ao zinco	2, 5, 10, 12, 19	Translocação, reciclagem do receptor
Pex11p ^b	Motivo dilisina (só na Pex11αp)	11, 19, 25, 27	Regulação da abundância peroxissomal, oxidação de AGCMs
Pex12p	Domínio RING de ligação ao zinco	5, 10, 19	Translocação, reciclagem do receptor
Pex13p	Domínio SH3	5, 7, 14, 19	<i>Docking</i> dos receptores, reciclagem do receptor
Pex14p	Motivo PXXP de ligação ao domínio SH3	5, 7, 13, 14, 17, 19	<i>Docking</i> dos receptores
Pex15p			Importação de proteínas da matriz; <i>docking</i> do complexo Pex1p-Pex6p na membrana peroxissomal (<i>S. cerevisiae</i>)
Pex16p		19	Importação de PMPs
Pex17p		14, 19	Importação de proteínas da matriz
Pex18p		7	Importação de proteínas PTS2 na <i>S. cerevisiae</i>
Pex19p	Farnesilada	2, 3, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 22	Receptor das PMPs, chaperone
Pex20p		7, 8, 13, 14	Importação de proteínas PTS2, oligomerização e importação da tiolase na <i>Y. lipolytica</i>
Pex21p		7, 13, 14	Importação de proteínas PTS2 na <i>S. cerevisiae</i>
Pex22p		4, 19	Âncora da Pex4p na membrana, reciclagem do receptor
Pex23p			Importação de proteínas da matriz
Pex24p			Importação de proteínas da matriz e PMPs
Pex25p		25, 27	Regulação da abundância peroxissomal
Pex26p		6	Importação de proteínas da matriz, <i>docking</i> do complexo Pex1p-Pex6p na membrana peroxissomal (mamíferos)
Pex27p		25, 27	Regulação da abundância peroxissomal
Pex28p			Regulação da abundância peroxissomal
Pex29p			Regulação da abundância peroxissomal
Pex30p			Regulação da abundância peroxissomal
Pex31p			Regulação da abundância peroxissomal
Pex32p			Regulação da abundância peroxissomal
Djp1	<i>DnaJ-like protein</i>		Importação de proteínas da matriz
Dlp1	<i>Dynamamin-like protein</i>		Regulação da abundância peroxissomal

^aAdaptada de Purdue e Lazarow 2001a, Smith *et al.* 2002, Eckert e Erdmann 2003, Rottensteiner *et al.* 2003, Tam *et al.* 2003, Vizeacoumar *et al.* 2003 e 2004 e Weller *et al.* 2003. ^bNos mamíferos existem três

genes diferentes para a Pex11p: *PEX11 α* , *PEX11 β* e *PEX11 γ* . As proteínas realçadas a negrito estão identificadas em mamíferos.

5.2. DOENÇAS PEROXISSOMAIS

As doenças peroxissomais são divididas em dois grupos distintos: as doenças da Biogénese Peroxissomal (PBDs) e as doenças relacionadas com alterações funcionais apenas numa enzima peroxissomal (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. **Doenças peroxissomais.**^a

Deficiências enzimáticas numa única enzima	Doenças da Biogénese
Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X	Síndrome de Zellweger
Acil-CoA oxidase (pseudo-Adrenoleucodistrofia Neonatal)	Adrenoleucodistrofia Neonatal
Enzima multifuncional (enzima bifuncional)	Doença de Refsum Infantil
Tiolase (pseudo-Zellweger)	Condrodisplasia Rizomélica Punctata do tipo I
DHAP ^b -acil transferase	
Alquil-DHAP ^b sintetase	
Doença de Refsum Adulta	
Hiperoxaluria tipo I	
Acatalasemia	

^aAdaptada de Raymond 2001. ^bDHAP, Dihidroxiacetona fosfato.

As PBDs são definidas como um grupo de doenças autossómicas recessivas geneticamente heterogéneas podendo, no entanto, ser classificadas em dois espectros distintos: o espectro Zellweger constituído pelos doentes com Síndrome de Zellweger (ZS), a Doença de Refsum Infantil (IRD) e Adrenoleucodistrofia Neonatal (NALD), e o espectro RCDP do tipo I (doentes que apresentam Condrodisplasia Rizomélica Punctata do tipo I) (Gould *et al.* 2001).

Estudos de complementação através de fusão celular tornaram possível a divisão dos doentes PBD em doze grupos de complementação (CGs) e a identificação dos genes mutados associados a cada CG (ver Tabela 5.4; Fujiki 2000 e Gould e Valle 2000). Pelo menos doze genes estão relacionados com a biogénese dos peroxissomas humanos.

A maior parte dos doentes PBD são deficientes na importação de proteínas PTS1 e PTS2 para a matriz do peroxissoma, provocando alterações em diversas funções peroxissomais. Estes doentes (dos CGs 1-4, 7-8, 10 e 13) conseguem importar proteínas

da membrana do peroxissoma (PMPs) e apresentam os denominados *ghosts* peroxissomais. Estas estruturas correspondem a membranas peroxissomais vazias de conteúdo matricial que aparecem nas células destes doentes, normalmente em menor número e de tamanho superior aos peroxissomas normais. Uma pequena fracção dos doentes com PBDs é deficiente na importação quer de proteínas matriciais quer de PMPs, não apresentando qualquer tipo de estrutura peroxissomal (estes doentes pertencem aos CGs 9, 12 e 14) (Weller *et al.* 2003).

Tabela 5.4. Fenótipo e proporção de doentes PBD, gene mutado e respectiva localização cromossomal de cada grupo de complementação.^a

CG	Fenótipos	%	Gene	Localização
CG1	ZS, NALD, IRD	57	<i>PEX1</i>	7q21-q22
CG2	ZS, NALD	1	<i>PEX5</i>	12p13.3
CG3	ZS, NALD, IRD	4	<i>PEX12</i>	17q12
CG4	ZS, NALD	9	<i>PEX6</i>	6p21.1
CG7	ZS, NALD	2	<i>PEX10</i>	1p36.32
CG8	ZS, NALD, IRD	4	<i>PEX26</i>	22q11.1
CG9	ZS	<1	<i>PEX16</i>	11p11.11
CG10	ZS, IRD	3	<i>PEX2</i>	8q21.11
CG11	RCDP	17	<i>PEX7</i>	6q21-q22.2
CG12	ZS	1	<i>PEX3</i>	6q23-q24
CG13	ZS, NALD	1	<i>PEX13</i>	2p14-p16
CG14	ZS	<1	<i>PEX19</i>	1q22

^aAdaptada de Moser 1999, Fujiki 2000, Gould *et al.* 2001, Titorenko e Rachubinski 2001a e Weller *et al.* 2003. CG, grupo de complementação, ZS, Síndrome de Zellweger, NALD, Adrenoleucodistrofia Neonatal e IRD, Doença de Refsum Infantil.

Os doentes RCDP do tipo I pertencem apenas a um CG (CG 11) com defeitos no gene *PEX7* que se traduzem no não endereçamento de enzimas contendo a sequência PTS2 para o peroxissoma (Gould *et al.* 2001).

As doenças peroxissomais com alterações funcionais numa única enzima são explicadas pela ocorrência de mutações num único gene que vão comprometer a actividade e/ou a localização da proteína correspondente (i.e., só uma função metabólica vai estar afectada). Este grupo é dominado pelos doentes com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD), a doença peroxissomal de maior incidência (Raymond 2001). A X-ALD resulta de mutações num gene que codifica um transportador peroxissomal de função desconhecida (Mosser *et al.* 1993 e 1994).

5.3. MODELOS ACTUAIS DE BIOGÉNESE PEROXISSOMAL

O primeiro modelo elaborado para explicar a biogénese peroxissomal foi proposto por Lazarow e Fujiki em 1985. Este modelo (conhecido por modelo de “crescimento e divisão”) defende que as proteínas peroxissomais são transportadas após a sua tradução para peroxissomas pré-existentes. Deste processo resulta o crescimento dos peroxissomas os quais sofrem posteriormente um processo de divisão dando origem a peroxissomas novos. Esta teoria implicava que os peroxissomas nunca se formavam *de novo*.

Recentemente, dois modelos de biogénese peroxissomal foram propostos com base em observações realizadas em leveduras e mamíferos: o primeiro modelo coloca a hipótese de formação de peroxissomas maduros através de fusão de vesículas precursoras peroxissomais; o segundo modelo sugere que os peroxissomas se formam *de novo* a partir de vesículas de origem desconhecida (Titorenko e Rachubinski 2001a).

O modelo de fusão de vesículas emergiu após a detecção de diversas formas precursoras peroxissomais em *Y. lipolytica* (ver Figura 5.2) (Titorenko e Rachubinski 2001b). Segundo estes autores, dois precursores peroxissomais P1 e P2 (que são sujeitos a importação selectiva de proteínas matriciais e já contêm algumas das PMPs encontradas nos peroxissomas maduros) sofrem fusão e dão origem a um peroxissoma P3 maior e mais denso. A conversão posterior de P3 até ao peroxissoma maduro P6 envolve outros intermediários sucessivos, para os quais vão sendo importados fosfolípidos e um número limitado de proteínas matriciais até à formação final de um peroxissoma maduro que é distinto, mais denso e maior que todos os seus precursores.

A caracterização de células de doentes pertencentes aos CGs 9, 12 e 14 esteve na origem do modelo de formação de peroxissomas *de novo*. Como já referido, as células destes doentes não contêm *ghosts* peroxissomais ou qualquer outro tipo de estrutura peroxissomal. No entanto, quando estas células são transfectadas com o cDNA codificante da versão normal da peroxina em falta, surgem peroxissomas em número e tamanho normal (Gould e Valle 2000). Assim, estes resultados parecem indicar que a formação dos peroxissomas é independente de estruturas peroxissomais pré-existentes.

As várias etapas que constituem este segundo modelo são apresentadas na Figura 5.3. Inicialmente, supõe-se o aparecimento de uma vesícula membranar (de origem desconhecida) por acção das peroxinas Pex3p e Pex16p. De seguida, ocorre a

importação de outras PMPs para esta membrana. Desta forma, esta membrana passa a estar competente para a importação de proteínas da matriz peroxissomal originando peroxissomas maduros. Este modelo prevê ainda a ocorrência de divisão mediada pela Pex11p de acordo com o modelo clássico de “crescimento e divisão” de Lazarow e Fujiki (1985). Neste caso, esta via dependente da Pex11p (e também da Pex3p, Pex16p e Pex19p) é responsável pela formação de peroxissomas novos a partir de peroxissomas já existentes (Sacksteder e Gould 2000).

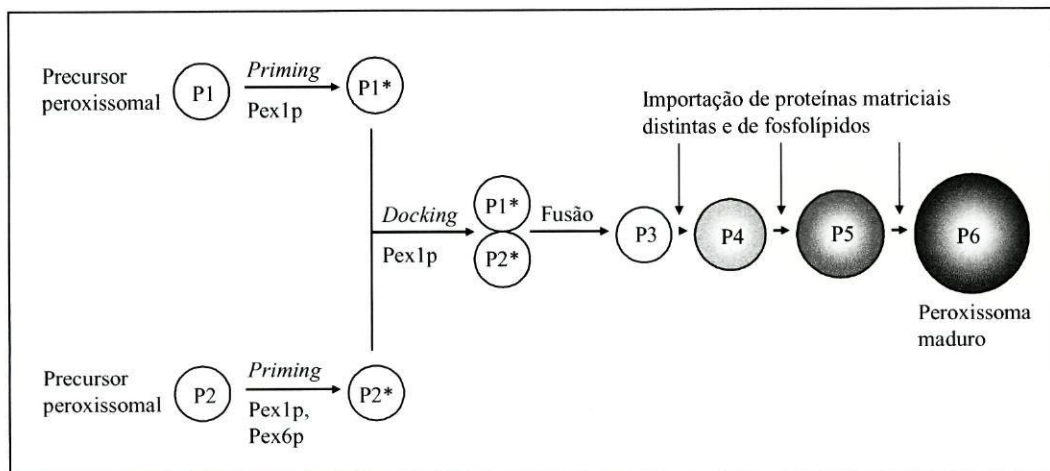


Figura 5.2. **Modelo de biogénese peroxissomal baseado na fusão de vesículas** (adaptada de Titorenko e Rachubinski 2001a).

Na levedura *Y. lipolytica*, 6 sub-formas peroxissomais, denominadas P1-6, estão organizadas num processo de biogénese que culmina na formação de peroxissomas maduros (P6). A fusão dos precusores peroxissomais P1 e P2 resulta na formação do intermediário P3 que é dependente das peroxinas Pex1p e Pex6p e inclui eventos de *priming*, *docking* e fusão. A maturação do intermediário P3 até ao peroxissoma maduro P6 engloba a importação selectiva de proteínas para a matriz e também de fosfolípidos.

Recentemente, a formação de peroxissomas *de novo* foi posta em causa com a detecção de *ghosts* peroxissomais em alguns mutantes *pex3* e *pex19* (Faber *et al.* 1998, Snyder *et al.* 1999a, Lambkin e Rachubinski 2001 e Hazra *et al.* 2002). Tais observações sugerem que algumas das técnicas anteriormente utilizadas na análise destes mutantes não apresentam a sensibilidade adequada para identificar estas estruturas peroxissomais (Hazra *et al.* 2002).

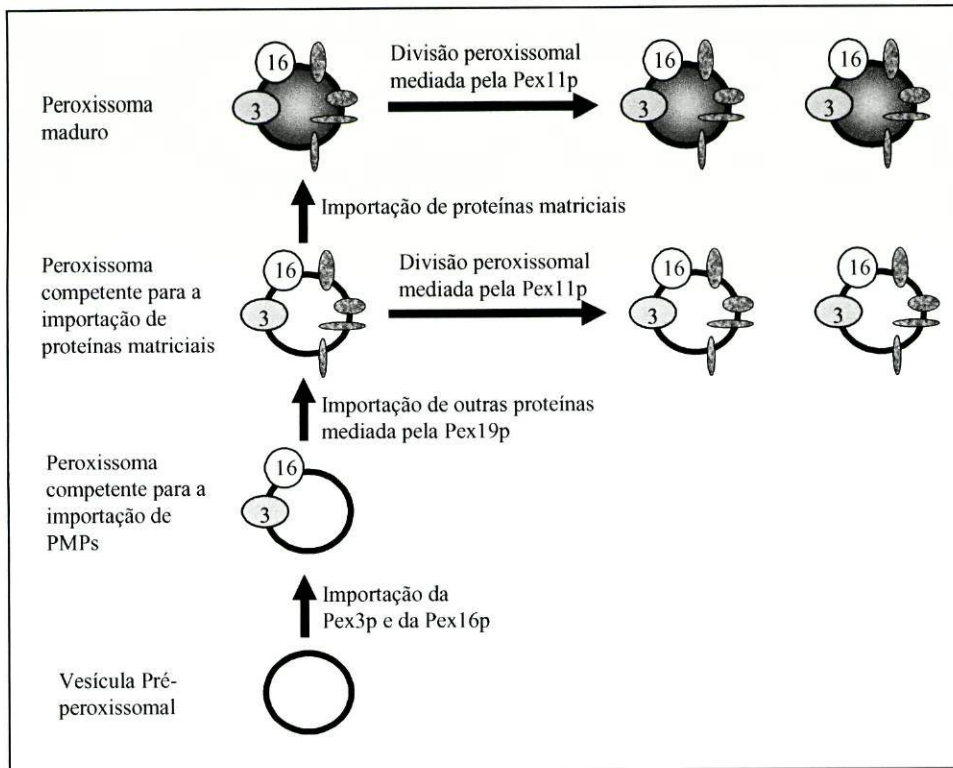


Figura 5.3. **Modelo de biogênese peroxissomal na ausência de peroxissomas pré-existent** (adaptada de Sacksteder e Gould 2000).

Após a importação de Pex3p e Pex16p para vesículas pré-peroxissomais formam-se peroxissomas competentes para a importação de outras PMPs mediada pela peroxina Pex19p. Este evento é seguido pela importação de proteínas para a matriz que termina na formação de peroxissomas maduros. A importação da peroxina Pex11p permite que estas estruturas sofram divisão peroxissomal.

5.4. BIOGÊNESE DA MEMBRANA PEROXISSOMAL

O primeiro passo dos dois modelos atrás descritos para a biogênese peroxissomal corresponde à importação de um número limitado de peroxinas para membranas precursoras, que vão posteriormente originar o primeiro intermediário peroxissomal para onde vão ser importadas as restantes proteínas peroxissomais. Duas hipóteses foram formuladas para explicar a origem destas membranas precursoras. Uma das hipóteses sugere o retículo endoplasmático (RE) como elemento precursor destas membranas. A segunda hipótese propõe a existência destas membranas no citosol para onde são importadas as proteínas peroxissomais e termina com a formação de peroxissomas maduros (Titorenko e Rachubinski 2001a e Lazarow 2003).

De acordo com a primeira hipótese, o RE funciona como dador directo de lípidos membranares e de algumas proteínas peroxissomais (Kunau e Erdmann 1998, Titorenko e Rachubinski 1998a e Lazarow 2003).

Dados que parecem suportar esta contribuição do RE para a biogénese peroxissomal derivaram de experiências que sugerem a acumulação de algumas peroxinas no RE em determinadas condições experimentais, tais como: em situações de sobreexpressão (Elgersma *et al.* 1997), quando as células foram crescidas na presença de Brefeldina A (uma toxina fúngica que previne a formação de vesículas derivadas do RE) (Salomons *et al.* 1997) ou em mutantes deficientes na secreção de proteínas a partir do RE (Titorenko *et al.* 1997 e Titorenko e Rachubinski 1998b).

Adicionalmente foi proposta a existência de um sinal de endereçamento para o RE nos primeiros 16 aminoácidos N-terminais da Pex3p de *Hansenula polymorpha* (Baerends *et al.* 1996).

Finalmente, Passreiter *et al.* (1998) propuseram que os peroxissomas têm a capacidade de interactuar com factores envolvidos nos processos de transporte mediado por vesículas.

Contudo, os resultados obtidos em células de mamífero não apoiam este modelo de participação do RE na biogénese da membrana peroxissomal. De facto, experiências de importação de PMPs em fibroblastos humanos mostraram que o endereçamento peroxissomal da Pex2p, Pex3p e Pex16p não é afectado por inibidores do tráfego de vesículas (South *et al.* 2000 e Voorn-Brouwer *et al.* 2001).

Por outro lado, foi mostrado que alguns dos resultados referidos anteriormente derivam de artefactos provocados pela sobreexpressão das proteínas ou da truncagem das proteínas estudadas (Lazarow 2003).

O segundo modelo de biogénese peroxissomal baseado na existência de mutantes com total incapacidade para importar PMPs (i.e., sem *ghosts* peroxissomais) e no modelo clássico de Lazarow e Fujiki (1985) descreve a formação de peroxissomas *de novo* após a expressão dos genes *PEX3*, *PEX16* e *PEX19* nas células deficientes (Sacksteder e Gould 2000). Segundo este modelo, os precursores destes peroxissomas “novos” podem corresponder a vesículas membranares “pré-peroxissomais” já existentes no citosol das células, para as quais são importadas inicialmente um número limitado de peroxinas, mas cuja origem não é conhecida.

5.4.1. Peroxinas envolvidas na biogénese da membrana peroxissomal

A ausência singular de *ghosts* peroxissomais nos mutantes *pex3*, *pex16* e *pex19* (contrariamente aos mutantes das outras peroxinas conhecidas) é o principal indicador da participação de, pelo menos, estas peroxinas nos eventos iniciais do processo de biogénese da membrana peroxissomal.

O papel da Pex3p e da Pex19p na biogénese peroxissomal foi pela primeira vez demonstrado a partir do estudo cinético do aparecimento de peroxissomas novos após expressão de Pex3p e Pex19p de mamíferos nos mutantes respectivos. Esta análise mostrou a formação de vesículas membranares contendo PMPs (como a Pex3p e a PMP70), seguida da importação de proteínas da matriz (Matsuzono *et al.* 1999 e Ghaedi *et al.* 2000), o que indicou que a Pex3p e a Pex19p podem actuar nos passos iniciais da biogénese peroxissomal como factores necessários para a importação de PMPs ou para a formação de vesículas membranares.

Estudos de interacção entre estas duas proteínas sugeriram que a Pex3p pode funcionar como uma âncora membrana para a Pex19p (Muntau *et al.* 2003). *In vivo*, esta população de Pex19p peroxissomal corresponde a cerca de 5% da Pex19p total, enquanto que os restantes 95% se localizam no citosol (Götte *et al.* 1998 e Sacksteder *et al.* 2000). Por outro lado, a inserção da Pex3p na membrana não é dependente da Pex19p, uma vez que esta peroxina é encontrada nos *ghosts* peroxissomais dos mutantes *pex19Δ* de *P. pastoris* (Snyder *et al.* 1999a).

O papel da Pex19p na importação de PMPs para a membrana foi revelado por experiências de *two-hybrid* e de imunoprecipitação, *blot-overlay assays* e experiências nas quais a Pex19p era propositadamente endereçada para o núcleo. No seu conjunto, estes trabalhos mostraram que a Pex19p tem a capacidade de interactuar com várias PMPs (incluindo a Pex3p e a Pex16p) (Snyder *et al.* 1999a e b e 2000, Soukopova *et al.* 1999, Ghaedi *et al.* 2000, Gloeckner *et al.* 2000, Sacksteder *et al.* 2000, Muntau *et al.* 2000 e 2003, Fransen *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001 e 2004, Brosius *et al.* 2002 e Mayerhofer *et al.* 2002), e que alguns dos sinais de endereçamento para a membrana do peroxissoma (mPTSs) são também domínios de ligação à Pex19p (Sacksteder *et al.* 2000, Jones *et al.* 2001 e 2004 e Brosius *et al.* 2002). Foi assim proposto que a Pex19p pode funcionar como uma proteína de ligação às PMPs, que transita entre o citosol e a membrana peroxissomal, actuando como chaperone ou como receptor das PMPs (Sacksteder *et al.* 2000, Snyder *et al.* 2000, Fransen *et al.* 2001 e Jones *et al.* 2001 e 2004).

Contudo, Fransen *et al.* (2001) demonstraram que no caso da Pex3p, da Pex12p e da Pex13p, os mPTSs e os domínios de ligação à Pex19p são diferentes. Adicionalmente, Snyder *et al.* (2000) observaram que a interacção Pex19p-PMPs ocorre nos peroxissomas, e não no citosol. Estes dois resultados apoiam a hipótese da Pex19p funcionar apenas como chaperone das PMPs.

O aparecimento de peroxissomas antes inexistentes após a expressão da HsPex16p em fibroblastos de doentes ZS com mutações no gene *PEX16* levou South e Gould (1999) a sugerir que esta peroxina é o primeiro factor a ser importado para estruturas peroxissomais pré-existentes, transformando-as em peroxissomas nascentes, para onde vão ser importadas outras PMPs e proteínas matriciais até à formação de peroxissomas maduros.

5.5. IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA O PEROXISSOMA

5.5.1. Importação de proteínas para a matriz

5.5.1.1. Sinais de endereçamento e receptores peroxissomais

O transporte de proteínas para a matriz peroxissomal envolve o reconhecimento dos seus sinais de endereçamento para o peroxissoma (PTS) por receptores citosólicos (Subramani *et al.* 2000).

Mais de 90% das proteínas matriciais conhecidas possui um sinal de endereçamento para o peroxissoma denominado PTS1. O PTS1 consiste num tripéptido C-terminal com a sequência S-K-L (ou variante) (Gould e Valle 2000). As enzimas acil-CoA oxidase de rato (Miyazawa *et al.* 1989) e catalase humana (Purdue *et al.* 1996) são exemplos de proteínas com PTS1.

Uma pequena fracção de proteínas destinadas à matriz do peroxissoma contém um sinal de endereçamento do tipo 2 (PTS2) existente no domínio N-terminal e com a sequência *consensus* (R/K)-(L/V/I)-X₅-(Q/H)-(L/A) (Purdue e Lazarow 2001a). Esta sequência foi pela primeira vez identificada na tiolase de rato (Swinkels *et al.* 1991).

Estes dois sinais de endereçamento peroxissomal vão ser reconhecidos no citosol por dois receptores, denominados Pex5p e Pex7p, responsáveis pela importação das proteínas PTS1 e PTS2, respectivamente (Sparkes e Baker 2002 e Eckert e Erdmann 2003).

Alguns estudos tornaram evidente o transporte de algumas proteínas matriciais para o peroxissoma à custa de PTSs internos (denominados PTS3) via Pex5p, como é o caso da catalase A de *S. cerevisiae* (Kragler *et al.* 1993). Por outro lado, foi ainda demonstrado que algumas proteínas sem uma sequência PTS podem ser endereçadas para o peroxissoma através da formação de complexos oligoméricos com proteínas PTS1 (Glover *et al.* 1994 e McNew e Goodman 1994).

5.5.1.2. Modelos actuais de importação matricial

O modelo actualmente aceite para explicar a importação de proteínas para a matriz peroxissomal foi denominado “*shuttle model*”, e considera que o receptor efectua múltiplos ciclos de transporte de proteínas matriciais do citosol para o peroxissoma (Kunau 2001). Segundo este modelo, as proteínas matriciais peroxissomais são sintetizadas em ribossomas livres no citoplasma e reconhecidas pelos receptores respectivos: as proteínas PTS1 ligam-se ao receptor Pex5p, enquanto que as proteínas PTS2 interactuam com a Pex7p. Os dois receptores transportam as proteínas até ao peroxissoma, efectuando o *docking* na membrana peroxissomal através de um complexo membranar envolvendo a Pex13p, a Pex14p e a Pex17p. Este complexo desloca o complexo receptor-proteína PTS para o complexo de translocação (que inclui pelo menos as peroxinas Pex2p, Pex10p e Pex12p). À translocação das proteínas para a matriz segue-se a reciclagem dos receptores livres para o citosol por acção das peroxinas Pex4p e Pex22p e, possivelmente, também da Pex1p e da Pex6p (Sacksteder e Gould 2000). Este modelo teve, principalmente, como base a localização subcelular dupla dos receptores entre o citosol e a membrana peroxissomal em mutantes em diferentes peroxinas (Purdue e Lazarow 2001a, Eckert e Erdmann 2003 e Weller *et al.* 2003).

Recentemente, o isolamento de complexos proteicos membranares envolvendo a Pex5p, a Pex14p e as peroxinas envolvidas na translocação sugeriu a ocorrência dos eventos de *docking* e translocação num complexo membranar único constituído pelas várias peroxinas envolvidas nestes eventos (Albertini *et al.* 2001, Reguenga *et al.* 2001 e Agne *et al.* 2003). Desta forma, o modelo de importação peroxissomal pode ser representado pelo esquema da Figura 5.4.

Uma segunda versão mais elaborada deste modelo foi proposta após a detecção dos receptores na matriz peroxissomal. Neste caso, o “*extended shuttle model*” considera que o receptor também é translocado juntamente com a proteína para o lúmen

do peroxissoma (Kunau 2001). A evidência experimental que suporta a existência de uma pequena fração dos receptores na matriz peroxissomal e, conseqüentemente, este modelo é, no entanto, discutível (van der Klei *et al.* 1995).

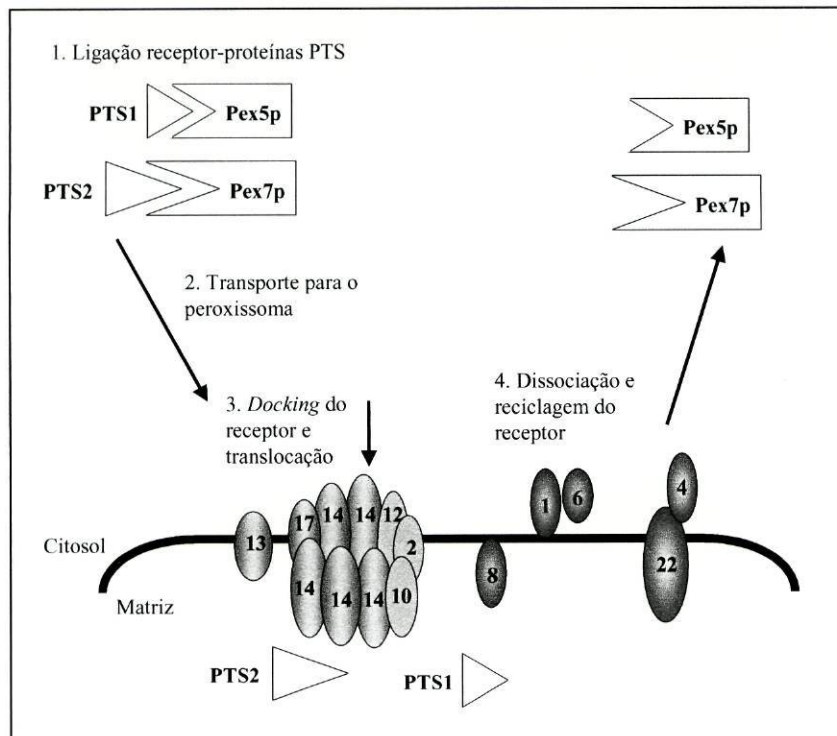


Figura 5.4. Um modelo para a importação de proteínas para a matriz do peroxissoma (adaptada de Sacksteder e Gould 2000).

As proteínas peroxissomais são reconhecidas pelo receptor das proteínas PTS1 (Pex5p) ou das proteínas PTS2 (Pex7p) no citosol. Os complexos formados entre o receptor e a proteína PTS são endereçados para a membrana peroxissomal, onde ocorre o *docking* através da interação com o complexo de *docking* e/ou translocação aparentemente constituído pela Pex2p, Pex10p, Pex12p, Pex14p (que corresponde ao primeiro local de *docking*) e Pex17p. A peroxina Pex13p pode também estar envolvida nestes eventos através da interação com este complexo. A dissociação dos receptores da proteína PTS durante o evento de translocação é seguida pela reciclagem dos receptores livres para o citosol mediada pelas peroxinas Pex1p, Pex4p, Pex6p, Pex8p e Pex22p.

5.5.1.3. Pex5p, o receptor das proteínas PTS1

A peroxina Pex5p é o receptor da maioria das proteínas matriciais peroxissomais que contêm a sequência PTS1, e já foi identificada nas mais variadas espécies, desde os mamíferos até aos fungos (Purdue e Lazarow 2001a).

Relativamente à sua localização subcelular, a Pex5p é uma proteína maioritariamente citosólica sendo possível, no entanto, detectar uma pequena fração desta peroxina em associação com os peroxissomas (Dodt *et al.* 1995, van der Klei *et al.* 1995,

Doty e Gould 1996, Elgersma *et al.* 1996, Gould *et al.* 1996, de Walque *et al.* 1999, Jardim *et al.* 2000 e Harano *et al.* 2001).

O domínio de ligação da Pex5p às proteínas PTS1 é constituído por sete repetições tetratricopeptídicas (TPRs) de 34 aminoácidos degenerados e está localizado na extremidade C-terminal do receptor (Doty *et al.* 2001). Mas existem excepções a esta “regra” como é o caso da acil-CoA de *S. cerevisiae*, cuja importação para o peroxissoma é mediada através da interacção entre um domínio interno desta enzima e uma região no domínio N-terminal da Pex5p sem quaisquer motivos TPR (Klein *et al.* 2002).

A determinação da constante de dissociação da interacção Pex5p-proteína PTS1 resultou em valores inferiores a 100 nM no Homem, nos Tripanossomas e na *Leishmania* (de Walque *et al.* 1999, Gatto *et al.* 2000, Jardim *et al.* 2000 e Harper *et al.* 2003), ou igual a 500 nM nas leveduras (Terlecky *et al.* 1995).

A cristalização de um complexo envolvendo o domínio C-terminal da Pex5p humana (que inclui os motivos TPRs) e um pentapéptido contendo uma sequência PTS1 permitiu determinar os elementos estruturais envolvidos nesta interacção (Gatto *et al.* 2000). A análise dos resultados obtidos mostrou que este domínio da Pex5p é formado por dois grupos de três motivos TPRs (o primeiro grupo formado pelos TPRs 1-3 e o segundo grupo formado pelos TPRs 5-7) ligados pelo TPR4, que apresenta uma conformação distinta dos anteriores. A sequência PTS1 liga-se a uma cavidade existente no meio destes dois grupos de TPRs (Gatto *et al.* 2000).

Harano *et al.* (2001) sugeriram que a ligação da Hsp70 ao C-terminal da Pex5p regula a interacção entre a Pex5p e as proteínas PTS1. Recentemente, esta hipótese foi contrariada por outros autores que, após o estudo da interacção entre a Pex5p recombinante e um péptido PTS1, concluíram que a afinidade da Pex5 para o péptido PTS1 não é influenciada pela Hsp70 ou pela Pex12p (uma proteína que também interacciona com o domínio C-terminal da Pex5p) e que a Hsp70 actua nas proteínas PTS1 sintetizadas *de novo*, aumentando a acessibilidade da sequência PTS1 à Pex5p (Harper *et al.* 2003).

Em mamíferos, o gene codificante da Pex5p dá origem a duas isoformas da proteína por um processo de *splicing* alternativo: a Pex5pS, uma forma mais pequena e uma forma maior denominada Pex5pL, com 37 aminoácidos adicionais, que são codificados pelo exão 8 do gene humano e correspondem aos aminoácidos 215-251 desta peroxina (Braverman *et al.* 1998 e Otera *et al.* 1998). Esta sequência adicional possui

parte do domínio responsável (aminoácidos 191-222) pela ligação da Pex5pL à Pex7p, o receptor das proteínas matriciais peroxissomais contendo a sequência PTS2 (Dodt *et al.* 2001 e Otera *et al.* 2002). De facto, os aminoácidos 1-243 da Pex5pL são necessários e suficientes para repor a importação de proteínas PTS2 em células humanas sem Pex5p (mas não são suficientes para permitir a importação de proteínas PTS1) (Dodt *et al.* 2001 e Otera *et al.* 2002). Estes resultados vieram fornecer a explicação para alguns estudos mais antigos nos quais tinha sido observado que alguns mutantes *pex5* apresentavam defeitos não só na importação de proteínas PTS1 como também de proteínas PTS2 (Dodt *et al.* 1995, Braverman *et al.* 1998, Otera *et al.* 1998 e Matsumura *et al.* 2000).

A interacção da Pex5pL com a Pex7p é, assim, necessária para o *docking* do complexo Pex7p-proteína PTS2 na membrana peroxissomal (Otera *et al.* 2000 e 2002). Desta forma, a Pex7p poderá ser perspectivada como uma proteína “adaptadora” aumentando o número de sinais de endereçamento reconhecidos pela Pex5p (Weller *et al.* 2003).

A extremidade N-terminal da Pex5p contém seis (na Pex5pS) ou sete (na Pex5pL) repetições pentapeptídicas diaromáticas do tipo WXXXF/Y, que estão envolvidas na ligação da Pex5p às peroxinas Pex13p e Pex14p na membrana peroxissomal (Otera *et al.* 2002).

A interacção directa verificada entre a Pex5p e a Pex14p nos humanos envolve os aminoácidos 1-298 do receptor e os primeiros 78 aminoácidos N-terminais da Pex14p e apresenta uma constante de dissociação que não excede os 10 nM (Schliebs *et al.* 1999). O isolamento e a caracterização de complexos membranares envolvendo a Pex5p e a Pex14p nos mamíferos permitiram a determinação de uma razão Pex5p:Pex14p de 1:5-7 (Schliebs *et al.* 1999, Gouveia *et al.* 2000 e Reguenga *et al.* 2001). Estes valores são concordantes com a multivalência existente na ligação Pex5p-Pex14p, porque cada um dos sete domínios WXXXF/Y da Pex5p pode ligar-se separadamente à Pex14p com elevada afinidade (Saidowsky *et al.* 2001).

A interacção entre a Pex5p e a Pex13p envolve um motivo SH3 (*Src homology domain 3*) existente no C-terminal da Pex13p. Geralmente, as proteínas possuidoras deste domínio estabelecem interacções com sequências do tipo PXXP de outras proteínas (Mayer 2001). Pelo contrário, a interacção da Pex5p à Pex13p não é feita por uma sequência do tipo PXXP, mas antes por uma sequência constituída por domínios do tipo WXXXF/Y existentes nos aminoácidos 100-213 da PpPex5p (Urquhart *et al.* 2000) e 203-227 da ScPex5p (Barnett *et al.* 2000 e Bottger *et al.* 2000). Em mamíferos, esta ligação

parece ser estabelecida entre o domínio N-terminal da Pex13p e os domínios 2-4 do tipo WXXXF/Y da Pex5p humana (Otera *et al.* 2002).

Os primeiros 213 aminoácidos N-terminais da Pex5p são suficientes para endereçar este receptor para o peroxissoma, e parecem ainda ser responsáveis pela sua homotetramerização (Schliebs *et al.* 1999, Dodt *et al.* 2001 e Gould e Collins 2002).

Além da Pex13p e da Pex14p, a Pex5p estabelece ainda interações com outras peroxinas membranares, nomeadamente com a Pex10p e a Pex12p (através do domínio C-terminal da Pex5p) (Chang *et al.* 1999 e Okumoto *et al.* 2000) e uma peroxina associada ao lado matricial da membrana do peroxissoma, a Pex8p, uma proteína conhecida apenas em eucariotas inferiores (Rehling *et al.* 2000).

5.5.1.4. Pex7p, o receptor das proteínas PTS2

A Pex7p é o receptor das proteínas peroxissomais PTS2 e é constituída por sete repetições do tipo WD-40 (domínios de aproximadamente 40 aminoácidos com um motivo central triptofano-aspartato) (Purdue e Lazarow 2001a).

À semelhança da Pex5p, a Pex7p apresenta uma localização subcelular dupla distribuída pelo citosol e pela membrana do peroxissoma, embora também tenha sido sugerida a sua presença apenas na matriz do peroxissoma (Marzioch *et al.* 1994, Zhang e Lazarow 1996 e Elgersma *et al.* 1998). Estas observações permitem sugerir o mesmo modelo de importação para os dois receptores peroxissomais.

A importação de proteínas PTS2 é independente da Pex5p nas leveduras, porque a forma Pex5pL não existe nestes organismos. Neste caso, o endereçamento da Pex7p para o peroxissoma parece ser mediado pelas peroxinas Pex18p e Pex21p em *S. cerevisiae* e Pex20p em *N. crassa* e *Y. lipolytica*. A ligação destas peroxinas à Pex7p é feita por um domínio semelhante a parte do domínio envolvido na interacção Pex5pL-Pex7p (compreendido entre os aminoácidos 209-229 da Pex5pL) (Dodt *et al.* 2001, Einwachter *et al.* 2001, Otera *et al.* 2002 e Sichtung *et al.* 2003). Purdue *et al.* (1998) verificaram que a ScPex18p e a ScPex21p apresentam uma redundância funcional parcial na importação de proteínas PTS2: a ausência de cada um destes genes tem efeitos modestos na importação destas proteínas. Pelo contrário, este processo é completamente inibido na ausência dos dois genes, sem nunca se afectar a importação de proteínas PTS1.

A Pex13p e Pex14p estão ainda incluídas na lista de peroxinas que se ligam à Pex7p de eucariotas inferiores (Albertini *et al.* 1997, Brocard *et al.* 1997 e Girzalsky *et al.* 1999), mas os domínios envolvidos nestas interacções ainda não são conhecidos.

5.5.1.5. O evento de docking na membrana peroxissomal

Como os receptores peroxissomais são proteínas solúveis, a importação dos complexos receptores-proteínas PTS implica a ocorrência de um passo de *docking* na membrana peroxissomal. Este papel parece ser desempenhado por um complexo de *docking* localizado na membrana peroxissomal que inclui, pelo menos, as peroxinas Pex13p e Pex14p (Hettema *et al.* 1999, Holroyd e Erdmann 2001, Titorenko e Rachubinski 2001a, Sparkes e Baker 2002 e Eckert e Erdmann 2003).

A participação da Pex14p neste evento foi proposta inicialmente após observação da acumulação peroxissomal do receptor Pex5p após sobreexpressão da Pex14p em mutantes deficientes nesta peroxina (Otera *et al.* 2000).

O tipo de interacção da Pex14p com a membrana peroxissomal tem sido motivo de alguma controvérsia, porque a Pex14p parece comportar-se como uma proteína intrínseca de membrana em mamíferos e em *H. polymorpha* (Komori *et al.* 1997, Shimizu *et al.* 1999 e Will *et al.* 1999), enquanto que na levedura *S. cerevisiae* é classificada como uma proteína periférica de membrana (Albertini *et al.* 1997 e Brocard *et al.* 1997). Existem também contradições relativamente à topologia membranar da Pex14p de mamíferos; os dois estudos realizados são unânimes quanto à exposição citosólica da extremidade C-terminal da Pex14p, mas divergem quanto à localização do domínio N-terminal: este parece estar protegido dentro do peroxissoma ou ser detectado no lado citosólico da membrana peroxissomal (Shimizu *et al.* 1999 e Will *et al.* 1999).

A Pex14p interactua ainda com a Pex13p, sendo esta uma ligação clássica entre um motivo PXXP (na Pex14p) e um motivo SH3 (na Pex13p) (Fransen *et al.* 1998, Girzalsky *et al.* 1999 e Bottger *et al.* 2000).

A Pex13p é uma PMP com as duas extremidades localizadas no citosol e um motivo SH3 no C-terminal, motivo este responsável pela interacção com a Pex5p e a Pex14p. Estas interacções envolvem zonas distintas do motivo SH3 (Elgersma *et al.* 1996, Erdmann e Blobel 1996, Gould *et al.* 1996 e Albertini *et al.* 1997). O domínio N-terminal da Pex13p possui o local de ligação para o receptor Pex7p (Girzalsky *et al.* 1999 e Stein *et al.* 2002).

A análise de complexos proteicos membranares peroxissomais em mamíferos e leveduras permitiu a identificação de interações entre a Pex13p e a Pex14p e outras peroxinas, tais como as proteínas presumivelmente envolvidas na translocação peroxissomal (Pex2p, Pex10p e Pex12p), a Pex8p e a Pex17p (Huhse *et al.* 1998, Snyder *et al.* 1999b, Albertini *et al.* 2001, Jonhson *et al.* 2001, Reguenga *et al.* 2001 e Agne *et al.* 2003).

A análise *in vitro* das interações da Pex5p com a Pex13p e a Pex14p mostrou que o complexo Pex5p-proteína PTS1 liga-se preferencialmente à Pex14p e que a Pex5p livre tem uma maior afinidade para a Pex13p, o que sugere que a Pex13p tem uma acção posterior ao evento de *docking* efectuado pela Pex14p e à libertação da proteína PTS1 pela Pex5p (Urquhart *et al.* 2000 e Otera *et al.* 2002). É possível que a Pex13p desempenhe um papel na reciclagem da Pex5p de volta para o citosol, uma vez que este receptor parece acumular-se em *ghosts* peroxissomais de células com mutações no gene *PEX13* (Otera *et al.* 2000).

Evidência experimental implicando a Pex14p no passo inicial de *docking* também para as proteínas PTS2 de eucariotas inferiores foi recentemente descrita (Stein *et al.* 2002). Neste estudo foi demonstrada a capacidade da tiolase (uma proteína PTS2) interagir com a Pex14p (interacção esta dependente da Pex7p e da Pex18p/Pex21p), mas não com a Pex13p. Em mamíferos, o *docking* do complexo Pex7p-PTS2 requer a acção da Pex5pL, como referido anteriormente.

5.5.1.6. O evento de translocação através da membrana peroxissomal

Após o evento de *docking* dos complexos receptor-proteína PTS na membrana peroxissomal, a proteína PTS sofre translocação através da membrana.

Dois modelos foram propostos na tentativa de explicar o mecanismo de translocação: 1) a formação de um poro ou canal ou 2) a ocorrência de um processo de invaginação e formação de vesículas na membrana peroxissomal (McNew e Goodman 1996).

O complexo proteico contendo as peroxinas *docking* Pex14p e Pex13p e as peroxinas Pex2p, Pex10p e Pex12p (Albertini *et al.* 2001, Reguenga *et al.* 2001 e Agne *et al.* 2003) já identificado é um dos complexos membranares candidatos à formação de um poro (ou canal) peroxissomal. Neste caso, a existência deste complexo pode ser interpretada como a primeira evidência experimental da associação física e temporal dos eventos de *docking* e translocação peroxissomais (Holroyd e Erdmann 2001, Reguenga *et*

al. 2001 e Sparkes e Baker 2002). Mas a ligação destes dois eventos e a formação de um poro (ou canal) transmembranar pode ser atribuída apenas ao complexo membranar Pex5p-Pex14p (Schliebs *et al.* 1999, Gouveia *et al.* 2000 e Reguenga *et al.* 2001), o que sugeriria a participação da Pex14p também no evento de translocação.

Relativamente às funções desempenhadas pelas peroxinas Pex2p, Pex10p e Pex12p (três peroxinas que possuem domínios RING na extremidade C-terminal) foi proposto o seu envolvimento no passo de translocação e/ou na reciclagem da Pex5p de volta para o citosol. Tal hipótese baseia-se no facto de se verificar acumulação de Pex5p nos peroxissomas de células mutantes *pex2*, *pex10* e *pex12* (Dodt e Gould 1996, Okumoto *et al.* 1998 e 2000, Chang *et al.* 1999 e Otera *et al.* 2000).

Apesar de não existirem evidências directas para a ocorrência de endocitose nos peroxissomas, o segundo modelo de translocação proposto implicaria: 1) a entrada das proteínas PTS nos peroxissomas por invaginação da membrana peroxissomal, 2) a libertação de vesículas membranares contendo as proteínas PTS para a matriz peroxissomal, 3) a abertura destas vesículas para libertação do conteúdo na matriz peroxissomal e 4) a reciclagem dos receptores de volta para o citosol (Subramani 1996, Waterham e Cregg 1997 e Tabak *et al.* 1999).

Apesar do mecanismo da translocação peroxissomal não ser conhecido, um dos passos deste evento ainda sem resposta corresponde à hipótese de internalização do receptor juntamente com a proteína PTS na matriz peroxissomal referida no “*extended shuttle model*”.

A evidência experimental que tem sido utilizada para suportar esta hipótese foi apresentada por Dammai e Subramani (2001). Neste trabalho, os autores exprimiram em células de mamíferos uma proteína de fusão contendo um local de clivagem para uma protease localizada na matriz do peroxissoma e a Pex5p, na tentativa de monitorizar o percurso seguido por esta proteína de fusão. Assim, foi observada a digestão do local de clivagem no domínio N-terminal da Pex5p, o que foi interpretado como uma evidência para a internalização da proteína de fusão contendo a Pex5p neste organelo. Por outro lado, a forma clivada desta proteína de fusão foi ainda detectada no citosol, comprovando a ocorrência de reciclagem da Pex5p (após a libertação da proteína PTS1) do peroxissoma para o citosol. No entanto, apesar da forma clivada da proteína de fusão envolvendo a Pex5p ter sido detectada nestas experiências, não pode ser excluída a hipótese de apenas o N-terminal da proteína de fusão ficar exposto ao

interior do organelo durante uma qualquer fase do ciclo de transporte, sofrendo assim clivagem pela protease (Kunau 2001).

5.5.1.7. A reciclagem dos receptores livres para o citosol

Após a translocação da proteína em trânsito para a matriz do peroxissoma, os receptores são reciclados para o citosol para iniciarem novos ciclos de transporte. Uma análise epistática de mutantes *P. pastoris* de diferentes peroxinas revelou que as peroxinas Pex1p, Pex4p, Pex6p e Pex22p podem estar envolvidas tardiamente neste evento (Collins *et al.* 2000).

A Pex4p é um membro da família E2 das *ubiquitin-conjugating enzymes* essencial para a importação das proteínas PTS1 e PTS2 em todos os organismos estudados, com excepção da *H. polymorpha* (Eckert e Erdmann 2003). Koller *et al.* (1999) verificaram que a Pex22p é necessária para ancorar a Pex4p na membrana peroxissomal. Dos estudos epistáticos concluiu-se que a Pex4p e a Pex22p actuam posteriormente às outras peroxinas analisadas (Pex1p, Pex2p, Pex3p, Pex6p, Pex8p, Pex10p, Pex12p, Pex13p, Pex14p e Pex17p) (Collins *et al.* 2000).

As peroxinas ScPex18p/ScPex21p são potenciais substratos do processo de ubiquitinação realizado pela Pex4p, porque Purdue e Lazarow (2001b) verificaram que estas peroxinas são constitutivamente degradadas *in vivo* apresentando um tempo de semi-vida curto, além de terem detectado diferentes formas ubiquinadas da ScPex18p. Estas observações sugeriram ainda um papel na reciclagem do receptor das proteínas PTS2 para estas peroxinas.

Recentemente, as peroxinas RING foram associadas ao papel da Pex4p na ubiquitinação, uma vez que foi detectada uma interacção entre a Pex4p e a Pex10p dependente da Pex22p (Eckert e Johnsson 2003). Como referido anteriormente, as peroxinas Pex2p, Pex10p e Pex12p contêm domínios RING, que são elementos característicos das proteínas E3, denominadas recogninas, que estão envolvidas no reconhecimento do substrato no processo de ubiquitinação (Borden 2000). Assim, Eckert e Erdmann (2003) especularam que a Pex22p pode recrutar a Pex4p solúvel para junto das recogninas Pex2p, Pex10p e Pex12p na membrana peroxissomal.

5.5.1.8. O papel das ATPases

Vários dados experimentais sugerem que a hidrólise de ATP é necessária para o processo de importação peroxissomal (Imanaka *et al.* 1987, Behari e Baker 1993, Rapp *et al.* 1993, Soto *et al.* 1993, Wendland e Subramani 1993, Horng *et al.* 1995, Dodt e Gould 1996, Brickner *et al.* 1997, Pool *et al.* 1998, Terlecky *et al.* 2001 e Gouveia *et al.* 2003a). A Pex1p e a Pex6p parecem ser os candidatos naturais para desempenhar esta função, pois são as únicas peroxinas conhecidas com domínios de ligação/hidrólise de ATP.

A participação destas peroxinas na biogénese peroxissomal foi confirmada por observação de *ghosts* peroxissomais e detecção de níveis reduzidos de Pex5p em mutantes *pex1* e *pex6*, o que sugere que estas peroxinas são necessárias para a estabilidade do receptor das proteínas PTS1 (Dodt e Gould 1996, Yahraus *et al.* 1996 e Reuber *et al.* 1997).

Este resultado (i.e., os níveis reduzidos de Pex5p nos mutantes) foi utilizado para determinar as relações epistáticas entre diferentes peroxinas na *P. pastoris* e a partir das quais se concluiu que a Pex1p e a Pex6p têm um papel tardio no processo de importação, depois dos eventos de *docking* e translocação, mas anterior ao funcionamento das peroxinas Pex4p e Pex22p. Assim foi sugerida uma função na reciclagem da Pex5p para o citosol para estas duas peroxinas (Collins *et al.* 2000).

Pelo contrário, Gould e Collins (2002) propuseram recentemente um papel anterior ao evento de translocação das proteínas para a matriz do peroxissoma para a Pex1p e a Pex6p.

5.5.2. Modelos experimentais para o estudo do mecanismo de importação proteica peroxissomal

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de caracterizar o mecanismo de importação proteica peroxissomal, de identificar factores envolvidos no processo e de testar a função destes factores.

Inicialmente, estes métodos envolviam a incubação de proteínas traduzidas *in vitro* na presença de metionina radioactiva com peroxissomas de fígado de rato ou de levedura. A quantidade de proteína importada era monitorizada por *protease protection assays*, tendo como premissa de que a proteína importada é aquela que está completamente protegida do ataque proteolítico (Subramani 1993 e Baker 1996).

Contudo, estes sistemas *in vitro* apresentam como principais desvantagens o facto dos peroxissomas serem organelos extremamente frágeis (o que se traduz em baixos rendimentos de importação) e a falta de outros parâmetros indicadores de importação. De facto, quer a ausência de modificações covalentes das proteínas importadas (como por exemplo clivagem da sequência sinal, glicosilação, etc) quer a resistência intrínseca de muitas das proteínas peroxissomais à acção de proteases complicaram a utilização generalizada deste sistema experimental (Subramani 1993).

Dadas estas limitações, Walton *et al.* (1992) desenvolveram um novo modelo experimental que consiste na microinjecção de proteínas no citosol de células de mamíferos em cultura. Neste caso, a monitorização da importação da proteína em estudo para os peroxissomas é efectuada por microscopia de imunofluorescência.

Mais tarde, foi desenvolvido uma terceira técnica para o estudo de importação peroxissomal que consiste na utilização de estreptolisina O, uma toxina bacteriana, para permeabilizar a membrana plasmática de células de mamíferos sem perda da integridade da membrana peroxissomal (Rapp *et al.* 1993 e Wendland e Subramani 1993).

No seu conjunto, os resultados obtidos com estas três estratégias experimentais revelaram características importantes do processo de importação de proteínas para o peroxissoma. Assim, foi mostrado que este processo é dependente da temperatura e requer hidrólise de ATP (Bellion e Goodman 1987, Imanaka *et al.* 1987, Walton *et al.* 1992, Behari e Baker 1993, Rapp *et al.* 1993, Soto *et al.* 1993, Wendland e Subramani 1993, Horng *et al.* 1995, Dodt e Gould 1996, Brickner *et al.* 1997, Pool *et al.* 1998, Terlecky *et al.* 2001 e Gouveia *et al.* 2003a). A utilização de ionóforos neste tipo de ensaios revelou que não é requerido qualquer potencial de membrana para a importação proteica peroxissomal (Imanaka *et al.* 1987, Wendland e Subramani 1993 e Brickner e Olsen 1998). Adicionalmente, foi mostrado que a Pex2p e a Pex14p estão envolvidas neste processo, pois a inclusão de anticorpos dirigidos contra estas peroxinas nos ensaios *in vitro* inibem a importação de proteínas pelo peroxissoma (Miura *et al.* 1994, Legakis e Terlecky 2001 e Terlecky *et al.* 2001). Evidência experimental para o envolvimento de chaperones citosólicas na importação de proteínas PTS1 foi também obtida (Miura *et al.* 1994, Walton *et al.* 1994, Crookes e Olsen 1998 e Legakis e Terlecky 2001). Finalmente, e talvez mais surpreendentemente, foi mostrado que os peroxissomas têm a capacidade de importar proteínas que já possuem estrutura terciária e mesmo quaternária (Walton *et al.* 1995 e Brocard *et al.* 2003).

Recentemente, Gouveia *et al.* (2003a) desenvolveram um sistema *in vitro* para estudar a importação da Pex5p para a membrana peroxissomal. Este sistema consiste na

incubação de fracções de sobrenadantes pós-nucleares (PNS) de fígado de rato com Pex5p traduzida num lisado de reticulócitos de coelho na presença de ^{35}S -metionina. A inserção da Pex5p na membrana é monitorizada com recurso a *protease protection assays*. Os dados obtidos mostraram duas formas de Pex5p associadas ao peroxissoma: uma forma denominada etapa 3 da Pex5p completamente resistente à protease e uma forma com 2 kDa na extremidade N-terminal expostos à acção da protease (etapa 2 da Pex5p). O estudo cinético deste processo na presença de ATP mostrou que a primeira forma a surgir associada aos peroxissomas é a etapa 2 da Pex5p e que esta origina a etapa 3 da Pex5p. Esta forma é depois libertada do peroxissoma num processo que requer ATP. É de salientar, que estas duas formas peroxissomais da Pex5p são imunoprecipitadas utilizando um anticorpo dirigido contra a Pex14p. Esta observação sugere que a Pex14p permanece em contacto com a Pex5p ao longo de todos os passos que ocorrem na membrana peroxissomal (Gouveia *et al.* 2003a). Finalmente, foi ainda mostrado que o processo de inserção da Pex5p na membrana peroxissomal requer Pex14p disponível e depende da existência de proteínas PTS1 no meio de importação (Gouveia *et al.* 2003a e b).

6. OBJETIVOS

6. OBJECTIVOS

Muitos dos componentes essenciais à biogénese peroxissomal, assim como as interacções por eles estabelecidas foram já identificados. Contudo, a função da maior parte deles permanece desconhecida. Conhecer a estrutura destes componentes, perceber como actuam molecularmente e como regulam a biogénese peroxissomal são os passos necessários para definir a sua função.

Um destes componentes é a Pex14p que, ao contrário da maior parte das peroxinas cuja função não é conhecida, tem uma função de *docking* na membrana peroxissomal dos receptores Pex5p e Pex7p. Contudo, a estrutura actualmente conhecida da Pex14p não é suficiente para explicar a associação entre esta função e as interacções estabelecidas entre a Pex14p e um grande número de componentes membranares do peroxissoma, principalmente com acções no *docking* e/ou translocação do processo de importação para a matriz do peroxissoma (e que podem ser indicativas de outras funções para a Pex14p).

O primeiro objectivo deste trabalho consistiu na caracterização estrutural da Pex14p de mamíferos. Esta caracterização foi dividida entre o refinamento da topologia membranar da Pex14p de mamíferos e o estudo dos homopolímeros formados pela Pex14p recombinante humana. A interacção Pex14p-Pex14p foi pela primeira vez caracterizada através de estudos *in vitro*.

Estudos publicados até ao momento relativamente ao processo de importação proteica para a matriz peroxissomal foram unânimes em referir a necessidade de hidrólise de ATP neste processo, mas o(s) passo(s) que especificamente são dependente(s) da hidrólise de ATP nunca foi(foram) identificado(s).

O segundo objectivo deste trabalho correspondeu ao estudo da energética da importação proteica para a matriz do peroxissoma mediada pela Pex5p. Esta análise foi realizada num sistema *in vitro* de importação peroxissomal apropriado para estudar o processo de importação/exportação da Pex5p. A monitorização da associação peroxissomal da Pex5p neste sistema revelou que a hidrólise de ATP é necessária apenas para a exportação deste receptor do peroxissoma.

7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7.1. ISOLAMENTO DE FRACÇÕES SUBCELULARES DE FÍGADO DE RATO

Os peroxissomas de fígado de rato e de ratinho foram isolados de ratos Wistar e de ratinhos C57Bl/6, do sexo masculino, com 1-2 meses de idade, colocados numa dieta normal e água *ad libitum* e sujeitos a um ciclo de luz de 12 h.

O fraccionamento celular foi efectuado de acordo com o protocolo de centrifugações diferenciais sequenciais descrito por Hartl *et al.* (1985), mas com algumas alterações (Gouveia *et al.* 1999). Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C no rotor SS-34 de uma centrífuga Sorvall® (Dupont Instruments). Numa experiência típica, os fígados de quatro ratos ou ratinhos foram homogeneizados em tampão SEI (sacarose 0.25 M, EDTA/NaHO 1 mM pH 7.2, imidazol/HCl 5 mM pH 7.2, PMSF 50 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml e 1:200 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos (Sigma)). O homogeneizado total foi inicialmente centrifugado 10 min a 600 g. O sobrenadante obtido foi depois centrifugado durante 10 min a 2350 g. No final desta centrifugação, o sobrenadante obtido foi centrifugado 20 min a 12300 g, dando origem a um sedimento rico em peroxissomas. Estes organelos foram depois purificados por centrifugação em gradientes de densidade, nomeadamente, num gradiente de Nycodenz descontínuo (constituído por 1 ml de 25% (m/v) e 7 ml de 33% (m/v) de Nycodenz em EDTA/NaHO 1 mM pH 7.2, imidazol/HCl 5 mM pH7.2, PMSF 50 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml e 1:200 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos). Este gradiente foi centrifugado num rotor angular (75 Ti, Beckman Instruments) a 60000 g durante 20 min a 4°C.

Os peroxissomas de fígado de rato que foram sujeitos a reacções de importação foram preparados através de centrifugações diferenciais e purificados em gradientes de Nycodenz como anteriormente, mas utilizando tampão SEM (sacarose 0.25 M, EDTA/NaHO 1 mM pH. 7.4 e MOPS/KHO 20 mM pH 7.4) na homogeneização dos fígados e na ressuspensão final dos peroxissomas (a uma concentração final de 20-40 mg/ml). Os peroxissomas foram congelados em azoto líquido e guardados a -70°C.

Este protocolo de preparação de peroxissomas de fígado de rato permite a

obtenção de peroxissomas com um grau de pureza de 94% e uma contaminação com RE (3.6%) e mitocôndrias (1.8%) (Gouveia *et al.* 1999).

Os sobrenadantes pós-nucleares (PNS) de fígado de rato utilizados nas experiências de importação *in vitro* foram preparados após remoção rápida dos fígados e posterior homogeneização em tampão SEM. As fracções PNS foram obtidas por centrifugação do homogeneizado total duas vezes a 600 g durante 10 min a 4°C. Aliquotas da fracção PNS (a 40-60 mg/ml) foram congeladas em azoto líquido e guardadas a -70°C. Estas fracções permaneceram competentes para importação, pelo menos, durante um mês (Gouveia *et al.* 2003a).

A quantificação de proteínas foi efectuada pelo método de Lowry usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Peterson 1983).

7.2. *PROTEASE PROTECTION ASSAYS*

Os *protease protection assays* foram realizados de acordo com o protocolo publicado por Gouveia *et al.* (2000). Quarenta microgramas de peroxissomas isolados de fígado de rato ou de ratinho em tampão SEI foram incubados em gelo na presença de proteinase K (PK) (adicionada a partir de uma solução no mesmo tampão) durante 30 min. As membranas peroxissomais foram completamente solubilizadas em algumas amostras por adição de Triton X-100 (TX-100) 1% (m/v) antes da adição da protease. O mesmo tratamento com PK foi realizado a algumas amostras na presença de organelos sonicados (imediatamente após a adição da PK) da seguinte forma: as amostras foram sonicadas três vezes durante 10 s (com intervalos de 30 s em gelo) com um sonicador Heat systems/Ultrasonics (modelo W-375), equipado com um *microtip* e acertado para *duty cycle* de 50% e *output* igual a 2. Os organelos permaneceram em gelo na presença da PK durante 30 min. No final da incubação, a PK foi inactivada por incubação com PMSF 2 mM (adicionado a partir de uma solução 0.2 M em etanol) em gelo durante 2 min. As proteínas foram depois precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) (adicionado a partir de uma solução a 100% (m/v)). Depois de 30 min em gelo, as proteínas precipitadas foram sedimentadas (por centrifugação durante 15 min a 15000 g), lavadas com acetona, solubilizadas em tampão de amostra Laemmli (Laemmli 1970) e separadas por electroforese em géis de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).

7.3. EXTRACÇÃO ALCALINA COM CARBONATO

A extracção alcalina com carbonato (Fujiki *et al.* 1982) foi realizada após a digestão de peroxissomas de fígado de rato (80 µg) com PK (a uma concentração final de 100 µg/ml). Os peroxissomas tratados com PK foram sujeitos a uma incubação alcalina na presença de Na₂CO₃ 0.1 M pH 11.5 durante 30 min em gelo. No final desta incubação, as amostras foram centrifugadas a 100000 g durante 1 h a 4°C. Este processo permite a extracção das proteínas matriciais e periféricas de membrana para o sobrenadante da centrifugação, enquanto que as proteínas intrínsecas de membrana resistem à extracção alcalina e surgem no sedimento da centrifugação. Estas duas fracções (solúvel e membranas) foram precipitadas com TCA e analisadas por SDS-PAGE.

7.4. CLIVAGEM QUÍMICA COM BROMETO DE CIANOGENIO

As experiências de clivagem química com brometo de cianogénio (Gross 1967) foram realizadas após a digestão de peroxissomas de fígado de rato ou de ratinho com PK. Depois da inactivação da PK com PMSF, as amostras foram diluídas com 900 µl de SEI e 1:100 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos e centrifugadas a 15000 g durante 15 min a 4°C. Os sedimentos peroxissomais foram solubilizados com 5 µl de SDS 1% (m/v) e submetidos a clivagem com CNBr através da adição de 40 µl de CNBr 57 mg/ml em ácido fórmico 79% (v/v) suplementado com 1:100 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos. As amostras controlo foram sujeitas à adição de igual volume de ácido fórmico 79% (v/v). Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 h e submetidas a liofilização.

7.5. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

O RNA total de fibroblastos de pele humana e de fígado de rato foi isolado com o *Kit* “High Pure RNA Isolation” seguindo as instruções do fabricante (Roche).

As reacções de RT-PCR foram realizadas utilizando o *Kit* “Titan™ One Tube Reverse Transcription-PCR System” de acordo com o protocolo do fabricante (Roche).

O cDNA codificante dos aminoácidos 1-373 da Pex3p humana foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA total de fibroblastos de pele humana utilizando os oligonucleótidos apresentados na Tabela 7.1. O cDNA da Pex3p foi clonado no vector pGEM®-T Easy, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Este vector recombinante foi depois digerido com *SalI*, e a inserção clonada no vector de expressão pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences).

Tabela 7.1. Oligonucleótidos utilizados nas reacções de RT-PCR e PCR para expressão das diferentes proteínas de fusão com a GST.

Proteínas	Sequência dos oligonucleótidos (5'→3')	Referências
GST-Pex3p	cgcgtcgacatgctgaggtctgtatg cgcgtcgactcattctccagtgtct	(Kammerer <i>et al.</i> 1998)
GST-Pex11p	cgcgtcgacgccatggacgccttcacc cgcaagctcctaaaaacaccctaacg	(Abe <i>et al.</i> 1998)
GST-Pex14p	cgcgtcgacatggcgtcctcggagcaggcaga cgcgccctagtccgctcactctc	(Fransen <i>et al.</i> 1998 e Will <i>et al.</i> 1999)
GST-Pex19p	cgcggatccaagatggccgctgaggaa cgcaagctgtttcacatgatcagacactg	(Matsuzono <i>et al.</i> 1999)

O cDNA codificante dos aminoácidos 1-247 da Pex11p humana foi amplificado a partir de RNA total de fibroblastos de pele humana por RT-PCR utilizando os oligonucleótidos descritos na Tabela 7.1. Este fragmento de cDNA foi clonado no vector pGEM®-T Easy. O vector recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *SalI* e *NotI* e a inserção obtida foi clonada no vector de expressão pGEX-4T-3.

O cDNA relativo aos aminoácidos 1-377 da Pex14p humana foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA total de fibroblastos de pele humana e dos oligonucleótidos descritos na tabela 7.1. O fragmento de cDNA foi clonado no vector pGEM®-T Easy. O vector recombinante foi digerido com a enzima de restrição *SalI*, e a inserção foi clonada no vector de expressão pGEX-4T-3.

O cDNA da Pex19p humana correspondente aos aminoácidos 1-299 foi amplificado a partir de RNA total de fibroblastos de pele humana utilizando os oligonucleótidos apresentados na Tabela 7.1. Depois de clonar este fragmento de cDNA amplificado no vector pGEM®-T Easy, o vector recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *NotI* e a inserção clonada no vector de expressão pGEX-4T-3.

Todas as proteínas de fusão foram expressas na estirpe XL₁ Blue da *Escherichia coli*. As proteínas de fusão GST-Pex3p e GST-Pex11p foram obtidas como corpos de inclusão, e estes foram depois purificados através de géis preparativos de SDS-PAGE. Este método foi também aplicado à fracção insolúvel de GST-Pex14p.

A proteína GST-Pex19p foi obtida na forma solúvel, o que permitiu a sua purificação por cromatografia de afinidade utilizando Glutathione ligada a Sepharose 4B (Amersham Biosciences).

A fracção solúvel de GST-Pex14p foi sujeita ao seguinte procedimento: um sedimento equivalente a 100 ml de cultura induzida foi ressuscitado em 2 ml de tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 4.3 mM e KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.3 com NaHO), EDTA 1mM, DTT 5 mM, PMSF 50 µg/ml e 1:500 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos e sonicação duas vezes durante 25 s (com 1 min de intervalo em gelo) com um sonicador Vibra Cell/Sonics and Materials (modelo VC130). A suspensão celular sonicada foi depois submetida a uma centrifugação para remover paredes celulares e material insolúvel (15000 g, 15 min, 4°C). Aproximadamente 70% da GST-Pex14p total foi recuperada no sobrenadante.

As proteínas GST, GST-Pex5p, GST-TPRs, GST-SKL e GST-LKS utilizadas nas reacções de importação foram preparadas pela Doutora Alexandra Gouveia (Gouveia *et al.* 2003a e b).

A GST, GST-Pex5p, GST-TPRs, GST-SKL e GST-LKS foram utilizadas nas reacções de importação a uma concentração final de 10, 10, 62.5, 200 e 200 µg/ml, respectivamente.

7.6. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Como referido anteriormente, a proteína GST-Pex14p foi expressa em *E. coli* e a sua fracção insolúvel purificada por géis preparativos de SDS-PAGE e utilizada na imunização de coelhos para a produção de anticorpos anti-Pex14p. O protocolo de imunização consistiu na injeção subcutânea (em quatro locais diferentes do coelho) de uma mistura de 600 µl de Adjuvante completo de Freund (Sigma) e 600 µl de uma suspensão proteica com aproximadamente 300 µg de GST-Pex14p em PBS. Esta imunização foi repetida após 21 dias, mas a suspensão proteica injectada foi misturada com Adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Esta mistura foi novamente

administrada no animal mais duas vezes com intervalos de quinze dias. Sete dias após cada imunização (com exceção da primeira) foram feitas pequenas colheitas de sangue para análise da resposta imunológica no soro do coelho. Após o último teste, o animal foi sacrificado para recolha do sangue total. O soro foi separado após coagulação do sangue total e utilizado nas análises de *western-blotting*.

A produção e a caracterização do anticorpo contra a Pex5p humana (Gouveia *et al.* 2000) foram realizadas pela Doutora Alexandra Gouveia. O anticorpo anti-Pex14(1-134)p (Will *et al.* 1999) foi gentilmente cedido pelo Doutor Wolfgang Schliebs e pelo Prof. Doutor Wolf-Hubert Kunau da Universidade de Bochum na Alemanha.

O anticorpo monoclonal (clone 7H10-BD4) dirigido contra a subunidade α da ATPase mitocondrial (uma proteína periférica de membrana (Stock *et al.* 1999)) foi fornecido pela Molecular Probes. Os anticorpos dirigidos contra a PMP70 de rato (Kamijo *et al.* 1990) e a catalase (uma proteína da matriz do peroxissoma (Purdue *et al.* 1996)) foram fornecidos pela Zymed Laboratories, Inc. e pela Research Diagnostics, Inc, respectivamente.

As imunoglobulinas foram purificadas a partir dos soros utilizando Proteína A ligada a Sepharose (PAS) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Amersham Biosciences).

7.7. SÍNTESE *IN VITRO* DE PROTEÍNAS MARCADAS RADIOATIVAMENTE

O cDNA da Pex5p humana foi obtido a partir do plasmídeo pGEM4-Pex5p (Gouveia *et al.* 2003b). Este plasmídeo recombinante foi linearizado com *NheI* e transcrito *in vitro* utilizando T7 RNA polimerase de acordo com as instruções do fabricante (“T7 Cap-Scribe”, Roche). A Pex5p marcada radioativamente foi depois sintetizada num lisado de reticulócitos de coelho na presença de ^{35}S -metionina, de acordo com o protocolo fornecido com o *Kit* (“Translation Kit Reticulocyte Type II”, Roche).

O cDNA codificante da Pex14p humana *full-length* inserido no vector pGEM®-T Easy foi extraído deste vector por digestão com *SalI* e *SphI* e clonado no vector pGEM-4, dando origem a pGEM4-Pex14p. Este vector foi linearizado com a enzima de restrição *HindIII* e transcrito *in vitro* utilizando SP6 RNA Polimerase, de acordo com as instruções do fabricante (“SP6-Cap Scribe”, Roche). A Pex14p marcada radioativamente foi obtida da mesma forma descrita anteriormente para a Pex5p.

As diferentes formas truncadas de ^{35}S -Pex14p foram obtidas usando a técnica de PCR de expressão (Kain *et al.* 1991). Dois PCRs sequenciais foram realizados para amplificar o fragmento relevante de cDNA e para introduzir a sequência promotora da T7 RNA polimerase antes das sequências dos fragmentos da Pex14p. No primeiro PCR, o vector pGEM4-Pex14p foi submetido a amplificação utilizando os pares de oligonucleótidos da Tabela 7.2. Todos os oligonucleótidos 5' contêm a sequência de ligação "gggagagccacc" antes do codão de iniciação e todos os oligonucleótidos 3' contêm três codões "ATG" antes do codão "Stop" para intensificar o sinal detectado na autorradiografia. Os fragmentos de cDNA obtidos desta forma foram submetidos a uma segunda amplificação por PCR utilizando o oligonucleótido 3' respectivo descrito na Tabela 7.2 e o seguinte oligonucleótido 5' (que contém a sequência promotora da T7 RNA polimerase seguida da sequência de ligação): 5'-gaattcctaatacactcactatagggagagccactg-3'. Estes fragmentos de DNA foram depois submetidos a transcrição e tradução *in vitro* como referido anteriormente.

Tabela 7.2. Oligonucleótidos utilizados nas reacções de PCR de expressão das versões truncadas da Pex14p.

Proteínas Pex14p truncadas	Sequência dos oligonucleótidos (5'→3')
Pex14(1-155)p	gggagagccaccatggcgtcctcggagcag ctacatcatcatcagctcagagagaccggc
Pex14(1-79)p	gggagagccaccatggcgtcctcggagcag ctacatcatcatggacgaaggctcatcggc
Pex14(147-377)p	gggagagccaccatggaggccggctctct ctacatcatcatgtcccgtcactctcggt
Pex14(140-278)p	gggagagccaccatggacagaagcagctggag ctacatcatcatcttcccaggcgaggacga
Pex14(262-377)p	gggagagccaccatggacatctcactgtcag ctacatcatcatgtcccgtcactctcggt

7.8. CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTES DE DENSIDADE

Uma fracção da GST-Pex14p solúvel (1 ml do sobrenadante obtido como anteriormente) foi aplicada no topo de um gradiente de sacarose (2.2 ml de 10%, 2 ml de 15.5%, 1.8 ml de 21%, 1.6 ml de 25%, 1.3 ml de 30% e 1 ml de 35% (m/v) de sacarose em Tris/ácido acético 50 mM pH 8.0, TX-100 0.1% (m/v), EDTA 1 mM, DTT 1 mM e 1:500 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos) e o gradiente centrifugado a 185000 g durante 14 h a 4°C no rotor TST41.14 (Sorvall®

Instruments). No final da centrifugação, o gradiente foi fraccionado em 13 alíquotas de 850 µl recolhidas a partir do fundo do tubo. Quantidades iguais de cada fracção foram precipitadas com TCA e analisadas por SDS-PAGE.

Com o objectivo de analisar o coeficiente de sedimentação da Pex14p sem a GST no mesmo gradiente, a GST-Pex14p presente nas fracções 5 e 6 do gradiente anterior foi inicialmente concentrada pela adição de uma solução saturada de sulfato de amónio (pH 7.0 acertado com NH_4HO) até ser atingido um valor de saturação igual a 35%. Depois de 15 min no gelo, a suspensão proteica foi centrifugada (15000 g durante 15 min a 4°C) e o sedimento obtido foi ressuscitado em 300 µl de Tris/ácido acético 50 mM pH 8.0, TX-100 0.1% (m/v), CaCl_2 2.5 mM, EDTA 1 mM e DTT 5 mM. A GST-Pex14p foi depois clivada com 5 Unidades de Trombina (Sigma T4648; adicionada a partir de uma solução *stock* a 5 mg sólido/ml em Tris/HCl 50 mM pH 7.5). No final da incubação de 1 h à temperatura ambiente, a protease foi inactivada pela adição de 1:500 (v/v) de um *cocktail* de inibidores de proteases de mamífero e de PMSF (para uma concentração final de 50 µg/ml). Finalmente, uma pequena quantidade (~5 µg) de ^{35}S -Pex5p sintetizada *in vitro* foi adicionada à Pex14p recombinante clivada antes da aplicação no topo de um gradiente de densidade de sacarose idêntico ao anterior.

Um segundo gradiente de densidade de sacarose idêntico aos anteriores foi centrifugado após a aplicação de apenas uma pequena quantidade de ^{35}S -Pex5p sintetizada *in vitro*.

Os marcadores moleculares utilizados para calibrar os gradientes de densidade de sacarose foram os seguintes: albumina sérica bovina (66 kDa), lactato desidrogenase de coração de vaca (140 kDa) e catalase de fígado de vaca (232 kDa).

7.9. *BLOT-OVERLAY ASSAYS*

As proteínas de fusão GST-Pex2p, GST-Pex3p, GST-Pex5p, GST-Pex11p, GST-Pex14p e GST-Pex19p foram separadas por SDS-PAGE (aproximadamente 1-2 µg/linha) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Estas membranas foram depois incubadas num tampão de renaturação constituído por Tris/HCl 50 mM pH 7.5, acetato de potássio/ácido acético 100 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, MgCl_2 5

mM, EDTA 1 mM, ZnCl₂ 100 µM, metionina 100 mM, Tween-20 0.3% (m/v) e leite em pó magro 5% (m/v) durante 2 h a 4°C (Fransen *et al.* 1998). Cada uma das membranas foi incubada individualmente com quantidades iguais (estimadas por fluorografia de géis de poliacrilamida secos) das diferentes proteínas ³⁵S-Pex14p (foram usados 1 a 4 µl de lisado de reticulócitos em 2 ml de tampão de renaturação). No final da incubação (durante a noite a 4°C), as membranas foram lavadas duas vezes com tampão de renaturação e, posteriormente, secas e sujeitas a autorradiografia.

7.10. REACÇÕES DE IMPORTAÇÃO *IN VITRO*

As reacções de importação *in vitro* foram realizadas a 26°C durante 30 min (excepto quando indicado em contrário) em 100 µl de tampão de importação A (sacarose 0.25 M, KCl 50 mM, MOPS/KHO 20 mM pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, albumina sérica bovina deslipidada 0.2% (m/v) e metionina 20 µM) na presença de 0.5 µl de lisado de reticulócitos contendo ³⁵S-Pex5p e 80 µg de peroxissomas purificados ou 150 µg de PNS de fígado de rato. Em algumas experiências, tampão de importação sem MgCl₂ foi também utilizado (tampão de importação B). Todos os nucleótidos foram usados a partir de uma solução *stock* a 100 mM em MOPS/KHO pH 7.4 acertada para pH igual a 7.4 com NaHO. No final da reacção de importação, as amostras foram tratadas com PK (a uma concentração final de 300 µg/ml) durante 30 min a 4°C. A protease foi inibida com 500 µg/ml de PMSF (adicionado de uma solução *stock* a 50 mg/ml em etanol) durante 2 min em gelo. A reacção de importação foi depois diluída para 1 ml com tampão SEM e os organelos foram isolados por centrifugação a 15000 g durante 15 min a 4°C. As amostras foram sujeitas a SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose, e as proteínas radioactivas foram detectadas por autorradiografia.

Nas experiências de inibição com anticorpos, 80 µg de peroxissomas de fígado de rato foram pré-incubados com 30 µg de imunoglobulinas purificadas em 100 µl do tampão de importação A durante 20 min em gelo, antes da reacção de importação ser iniciada com a adição de ³⁵S-Pex5p.

O tratamento dos peroxissomas purificados com EDTA/NaHO pH 7.4 (a uma concentração final de 12 mM) foi efectuado em gelo durante 10 min em tampão de

importação B. Algumas amostras foram depois incubadas com 1,10-fenantrolina 1 mM (adicionada de uma solução 100X concentrada em etanol) em gelo durante 5 min. Todas as amostras receberam o mesmo volume de etanol. Os lisados de reticulócitos foram tratados de igual forma depois de diluir as amostras 1:10 com tampão de importação B.

A depleção de ATP dos peroxissomas purificados e do lisado de reticulócitos foi realizada de acordo com um protocolo publicado (Glick 1995). Resumidamente, os peroxissomas purificados (equivalentes a 80 µg de proteína) em 90 µl de tampão de importação A foram incubados durante 10 min a 30°C na presença de 10 Unidades de hexocinase (Sigma H6380) e 2-deoxi-D-glucose 1 mM (Sigma). O lisado de reticulócitos diluído 1:20 com tampão de importação A foi tratado com a mesma concentração de hexocinase, mas com 2-deoxi-D-glucose 10 mM. As reacções de importação foram iniciadas com a mistura dos dois componentes depletados de ATP. No final da reacção de importação, o mesmo protocolo descrito anteriormente foi seguido a partir do tratamento com PK.

7.11. ELECTROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTES

As amostras proteicas sujeitas a análise por SDS-PAGE foram submetidas a um aquecimento a 65°C durante aproximadamente 20 min na presença do tampão de solubilização (Tris/HCl 50 mM pH 8.8, EDTA/NaHO 2 mM pH 8.8, SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0.02% (m/v), glicerol 10% (m/v), e DTT 0.1 M). No final desta incubação, as amostras foram centrifugadas a 15000 g à temperatura ambiente durante 5 min para remoção de algum material insolúvel. Finalmente, os sobrenadantes desta centrifugação foram aplicado nos géis de poliacrilamida.

A separação electroforética foi realizada de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (Laemmli 1970) utilizando o seguinte tampão de electroforese: Tris 0.025 M, glicina 0.25 M e SDS 0.1% (m/v). Os géis de poliacrilamida apresentavam uma espessura de 0.75 ou 1 mm e eram constituídos por um gel de empacotamento de poliacrilamida 5% (Razão de acrilamida:bisacrilamida igual a 75:1) em Tris/HCl 125 mM pH 6.8 e SDS 0.1% (m/v) e um gel de separação de poliacrilamida 11 ou 12% (na mesma razão anterior) em Tris/HCl 750 mM pH 8.8 e SDS 0.1% (m/v). Nas electroforeses desnaturantes realizadas na presença de SDS e ureia (ureia-SDS-PAGE)

foi seguido o mesmo protocolo, mas com as seguintes alterações: os géis de poliacrilamida utilizados apresentavam 1 mm de espessura, ureia 6 M na sua composição e concentração da poliacrilamida do gel de separação igual a 14% (Schlenstedt *et al.* 1990).

No final da electroforese, os géis de poliacrilamida foram corados com uma solução de azul de Coomassie R-250 0.2% (m/v) em ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) durante 1 h e descorados com uma solução de ácido acético 8% (v/v) e etanol 25% (v/v) até obtenção da coloração pretendida.

A purificação das proteínas de fusão por SDS-PAGE foi realizada utilizando os géis descritos anteriormente, mas neste caso com 3 mm de espessura e um gel de separação de poliacrilamida 8%. A separação electroforética foi efectuada na presença de um tampão de electroforese com a seguinte composição: Tris/HCl 0.025 M, glicina 0.25 M, SDS 0.05% (m/v) e azul de Coomassie R-250 25 mg/l. No final da electroforese, as bandas proteicas coradas no gel (devido à presença de azul de Coomassie no tampão da electroforese) foram cortadas e trituradas com Polytron (Kinematica) em 50 ml SDS 0.02% (m/v) e DTT 5 mM para eluição da proteína do gel (durante 16 h a 4°C). No final desta incubação, a suspensão proteica foi liofilizada e a proteína foi precipitada com acetona e ressuspendida em PBS para ser utilizada nas imunizações.

Os marcadores de massa molecular utilizados na calibração dos géis de SDS-PAGE foram os seguintes: lisozima da clara do ovo (14 kDa), inibidor da tripsina de soja (21 kDa), anidrase carbónica bovina (31 kDa), ovalbumina da clara do ovo (45 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa).

7.12. WESTERN-BLOTTING

A transferência das amostras proteicas dos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante (Schleicher & Schuell), num sistema *semi-dry* da Amersham Biosciences.

As membranas de nitrocelulose foram coradas com uma solução de Ponceau S 0.2% (m/v) em ácido tricloroacético 3% (m/v) durante alguns segundos e descoradas em água até à coloração pretendida.

Os anticorpos primários foram detectados nos *western-blots* com anticorpos secundários anti-IgGs ligados à fosfatase alcalina (Sigma) ou à peroxidase (Amersham Biosciences) de um forma cromogénica ou quimioluminescente, respectivamente.

A análise densitométrica dos *western-blots* foi realizada num sistema digitalizador automático UN-SCAN-IT.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PEX14p DE MAMÍFEROS

8.1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA PEX14p DE MAMÍFEROS

A Pex14p é uma das proteínas chave no *docking* dos complexos receptores-proteínas PTS na membrana peroxissomal. Mas, a sua função pode não ser desempenhada individualmente, pois esta peroxina tem sido encontrada em complexos membranares constituídos por outras peroxinas actualmente aceites como estando envolvidas nos eventos de *docking* e/ou translocação (Okumoto *et al.* 2000, Otera *et al.* 2000, Albertini *et al.* 2001, Jonhson *et al.* 2001, Reguenga *et al.* 2001, Hazra *et al.* 2002, Agne *et al.* 2003 e Eckert e Erdmann 2003).

Estudos de interacção entre a Pex14p e a Pex5p mostraram que os primeiros 78 aminoácidos N-terminais da Pex14p correspondem ao domínio de ligação a este receptor (Schliebs *et al.* 1999). Uma questão que se coloca depois do mapeamento deste domínio é onde ocorre a interacção Pex5p-Pex14p face à divergência encontrada na localização do domínio N-terminal da Pex14p reportada na literatura (Shimizu *et al.* 1999 e Will *et al.* 1999). De facto, a localização deste domínio é crucial para definir o papel da Pex14p na membrana do peroxissoma. Se a extremidade N-terminal da Pex14p estiver exposta para o lado citosólico da membrana, é provável que esta peroxina actue fundamentalmente como o primeiro local de *docking* para a Pex5p na membrana do peroxissoma. Por outro lado, se o N-terminal desta proteína estiver de alguma forma protegido no interior do peroxissoma, a Pex14p poderá fazer parte de um complexo membranar com actividade de translocase.

Perante a controvérsia existente em relação à localização do domínio N-terminal da Pex14p, o primeiro objectivo deste trabalho correspondeu ao estudo da topologia membranar da Pex14p com recurso a experiências de *protease protection assays* e de clivagem química.

O segundo objectivo deste trabalho esteve relacionado com a interacção Pex14p-Pex14p. Esta interacção já foi detectada através de experiências de *two-hybrid system* e estudos de ligação *in vitro* (Albertini *et al.* 1997, Brocard *et al.* 1997 e Shimizu *et al.* 1999). Contudo, o domínio envolvido na ligação Pex14p-Pex14p nunca foi mapeado. Assim, a caracterização dos homopolímeros de Pex14p foi realizada utilizando uma fracção solúvel de Pex14p recombinante humana, e o mapeamento do domínio envolvido na interacção da Pex14p com ela própria foi abordado através de *blot-overlay assays*.

8.1.1. Topologia membranar da Pex14p de mamíferos

O estudo da topologia membranar da Pex14p de mamíferos foi iniciado com recurso a *protease protection assays*. Assim, peroxissomas intactos de fígado de rato foram tratados com concentrações crescentes de proteinase K (PK). Nesta experiência (Figura 8.1A), verificou-se que uma grande porção da Pex14p é completamente digerida, dando origem a um fragmento de cerca de 16 kDa resistente à PK, mesmo a elevadas concentrações desta protease (superiores a 0.5 mg/ml; resultados não mostrados). É de referir que este fragmento de 16 kDa é reconhecido por um anticorpo anti-Pex14p dirigido contra os primeiros 134 aminoácidos N-terminais desta proteína (Will *et al.* 1999), pelo que este fragmento contém pelo menos parte deste domínio da Pex14p. O mesmo padrão proteolítico foi obtido quando a matriz peroxissomal foi exposta à acção da protease, i.e., utilizando organelos sonicados. Contudo, este fragmento de 16 kDa é completamente digerido pela protease quando a integridade das membranas peroxissomais é perdida por solubilização com Triton X-100.

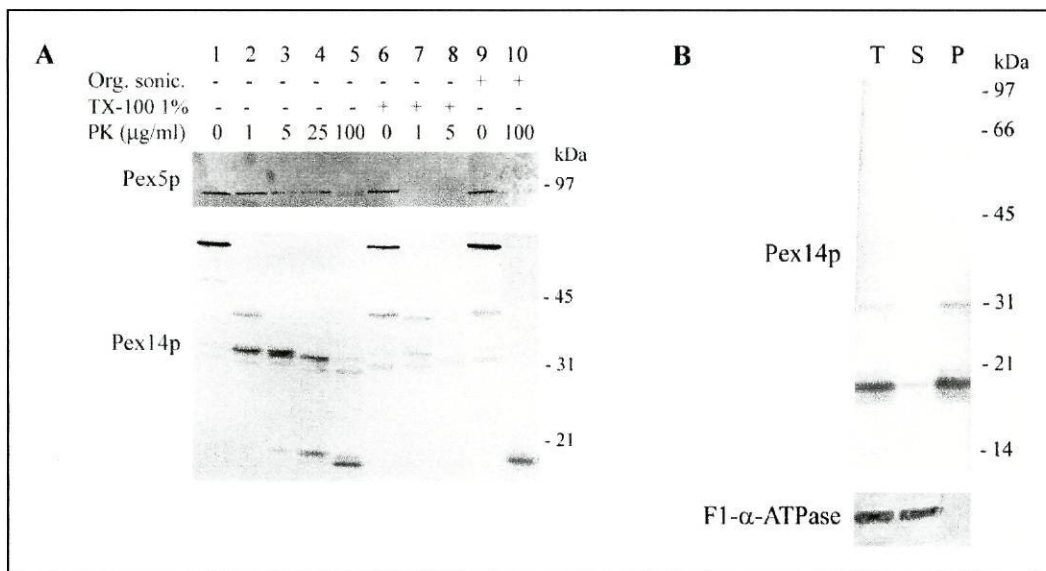


Figura 8.1. Topologia membranar da Pex14p.

(A) Peroxissomas isolados de fígado de rato (40 µg) foram incubados na presença de diferentes concentrações de proteinase K (PK). Em algumas amostras, os organelos foram solubilizados com Triton X-100 (linhas TX-100 1%) antes da adição da protease, ou sonicados logo após a adição da protease (linhas *Org. sonic.*) Depois da inactivação da protease, as amostras foram precipitadas com TCA, separadas por ureia-SDS-PAGE e analisadas por *western-blotting* com os anticorpos anti-Pex5p (painel superior) e anti-Pex14(1-134)p (painel inferior). A actividade proteolítica da PK e a integridade dos organelos foram controladas através da análise do padrão proteolítico da Pex5p endógena (Gouveia *et al.* 2000). A Pex5p peroxissomal é completamente degradada pela PK quando a integridade da membrana peroxissomal é perdida, mas é sujeita

apenas a uma clivagem de aproximadamente 2 kDa pela PK quando presente em organelos intactos. (B) Oitenta microgramas de peroxissomas isolados foram tratados com PK (a uma concentração final de 100 µg/ml). Depois da inativação da protease, os organelos foram submetidos a uma extração alcalina. Metade da amostra foi mantida em gelo para determinação do rendimento da extração (linha *T*), enquanto a outra metade foi separada numa fração membrana (linha *P*) e outra solúvel (linha *S*) por centrifugação. Depois da precipitação com TCA, as proteínas foram analisadas por *western-blotting* utilizando os anticorpos contra a Pex14(1-134)p (painel superior) e a subunidade α da ATPase mitocondrial (painel inferior). Os números à direita representam as massas moleculares em kDa dos marcadores utilizados.

Este fragmento de 16 kDa é encontrado na fração membrana peroxissomal após extração alcalina dos organelos intactos tratados com PK para separação das proteínas matriciais e periféricas de membrana das proteínas intrínsecas de membrana (Figura 8.1B). Este comportamento foi detectado anteriormente para a Pex14p de mamíferos (Fransen *et al.* 1998, Shimizu *et al.* 1999 e Will *et al.* 1999). Este resultado sugere que o fragmento de 16 kDa contém o domínio de associação à membrana peroxissomal existente na Pex14p.

Os resultados anteriores sugerem também que uma grande porção C-terminal da Pex14p está exposta para o lado citosólico da membrana do peroxissoma (ver também abaixo), mas não permitiram tirar conclusões relativamente à topologia membrana do fragmento de 16 kDa. Existe, contudo, a possibilidade da extremidade N-terminal da Pex14p estar pelo menos parcialmente acessível do lado citosólico da membrana peroxissomal.

Para testar esta hipótese mapeou-se a sequência correspondente ao fragmento de 16 kDa, sujeitando peroxissomas isolados de fígado de rato e de ratinho a *protease protection assays* seguidos por uma clivagem com brometo de cianogénio.

A Figura 8.2 é uma representação esquemática da posição relativa dos resíduos de metionina existentes nas sequências primárias da Pex14p de rato e de ratinho.

Quando peroxissomas de fígado de rato são incubados na presença de CNBr, verifica-se a formação de um fragmento de 18 kDa resultante da clivagem da metionina 148 da Pex14p de rato (Figura 8.3, linha 3). Por outro lado, quando os peroxissomas de fígado de rato são tratados com PK e sujeitos a clivagem química com CNBr, é detectado um fragmento mais pequeno de 16 kDa que corresponde ao mesmo fragmento obtido a partir do tratamento da Pex14p de rato apenas com PK (Figura 8.3, linhas 1 e 4). Este resultado levanta duas hipóteses: 1) o local de digestão da PK no domínio C-terminal da Pex14p está localizado na vizinhança da metionina 148 e a PK digere aproximadamente 2 kDa da extremidade N-terminal (o que indicaria que o N-

terminal desta peroxina está acessível à PK do lado citosólico da membrana peroxissomal); ou 2) a PK degrada o domínio C-terminal da Pex14p de rato até uma sequência anterior e distante aproximadamente 2 kDa da metionina 148.

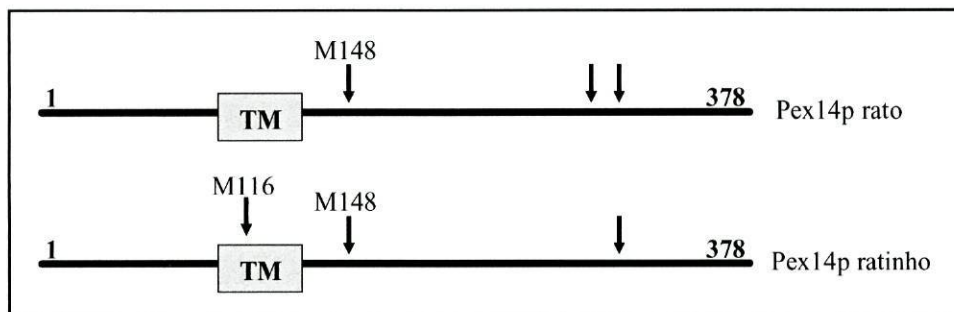


Figura 8.2. Representação esquemática das sequências primárias da Pex14p de rato e de ratinho.

As caixas *TM* representam as regiões transmembranares putativas da Pex14p de rato e de ratinho. As setas mostram a posição relativa dos resíduos de metionina destas peroxinas, com exceção da primeira metionina N-terminal. Os resíduos de metionina nas posições 116 (*M116*) e 148 (*M148*) estão indicados.

Na tentativa de se validar uma destas hipóteses, estas experiências foram repetidas com peroxissomas de fígado de ratinho. A Pex14p de ratinho apresenta uma metionina adicional na posição 116 (localizada no domínio transmembranar putativo) (Figura 8.2). A clivagem da Pex14p de ratinho com CNBr origina um fragmento de 18 kDa, correspondente à clivagem na metionina 148 comum às proteínas dos dois mamíferos (Figura 8.2; *GenBank accession nr.* AAF04616 e Shimizu *et al.* 1999), e um fragmento de 15 kDa que corresponde à clivagem na metionina 116 da Pex14p de fígado de ratinho (Figuras 8.2 e 8.3, linha 7; *GenBank accession nr.* AAF04616). O aparecimento destes dois fragmentos (e não apenas do fragmento mais pequeno correspondente à clivagem na metionina 116) deve-se ao facto do rendimento da clivagem de resíduos de metionina com CNBr ser influenciado pelo contexto onde essa metionina existe (Gross 1967). O fragmento de 16 kDa que surge após digestão da Pex14p de ratinho com PK é idêntico ao obtido com a Pex14p de rato (Figura 8.3, linha 6). Quando peroxissomas de fígado de ratinho são sujeitos a digestão com PK seguida de clivagem química com CNBr, verifica-se apenas o aparecimento do fragmento de 15 kDa (relativo à clivagem da metionina 116 com CNBr), e ainda o fragmento de 16 kDa resultante da digestão com PK (devido ao fraco rendimento na clivagem da metionina 116 com CNBr) (Figura 8.3, linha 8). A obtenção destes dois fragmentos mostra que: a)

o fragmento de 16 kDa corresponde aos primeiros 130 aminoácidos da Pex14p; b) a extremidade N-terminal não está acessível à PK pelo lado citosólico da membrana peroxissomal (porque o fragmento de 15 kDa obtido após digestão com PK e clivagem química apresenta o mesmo tamanho que o fragmento obtido na clivagem com CNBr da Pex14p de ratinho).

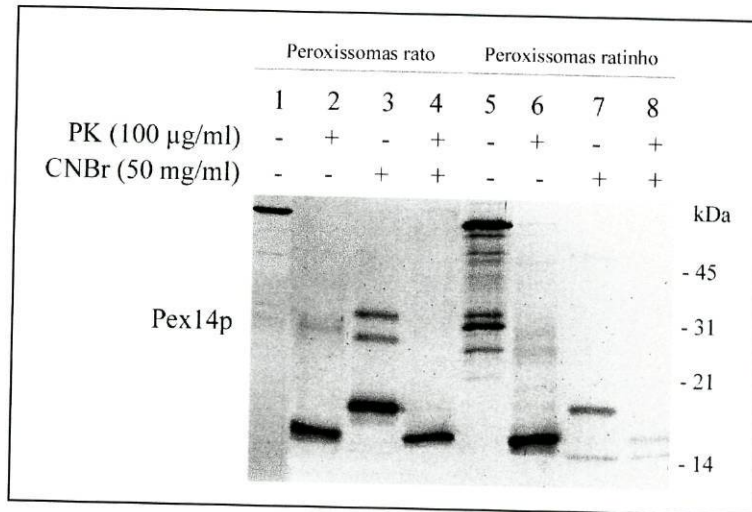


Figura 8.3. O fragmento de 16 kDa da Pex14p resistente à proteinase K corresponde aos primeiros 130 aminoácidos N-terminais.

Quarenta microgramas de peroxissomas de fígado de rato e de ratinho foram tratadas com proteinase K (PK) à concentração indicada. Após a inativação da protease, as amostras foram diluídas com tampão SEI e centrifugadas para sedimentação dos organelos. As proteínas peroxissomais foram submetidas a clivagem com CNBr em ácido fórmico 70% (v/v). As amostras controlo receberam apenas a mesma quantidade da solução de ácido fórmico. No final da incubação de 5 h à temperatura ambiente, as amostras foram liofilizadas e separadas por ureia-SDS-PAGE. O anticorpo anti-Pex14(1-134)p foi utilizado na análise por *western-blotting*. Os números à direita representam as massas moleculares em kDa dos marcadores utilizados.

Os resultados mostrados na Fig. 8.1 sugerem que uma grande porção C-terminal da Pex14p está voltada para o citosol e que é extremamente sensível à acção de proteases. Este facto também pode ser evidenciado quando organelos intactos de fígado de rato são sujeitos a digestão com concentrações crescentes de tripsina (Figura 8.4). A Pex14p vai sendo progressivamente digerida originando diferentes fragmentos truncados no C-terminal até à formação de um fragmento de 16 kDa. Este, por sua vez, corresponde aos primeiros 130 aminoácidos N-terminais da Pex14p e possui (talvez) o único domínio de associação à membrana peroxissomal, pois apresenta as características de uma proteína intrínseca de membrana. Este fragmento é extremamente resistente à acção de proteases quando a membrana peroxissomal está

intacta porque, apenas na presença de detergentes como Triton X-100 ou digitonina (resultados não mostrados), este domínio é completamente digerido.

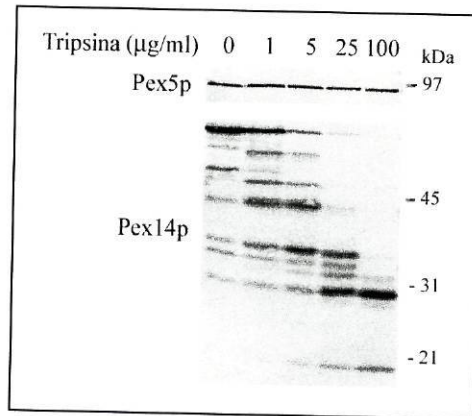


Figura 8.4. O domínio C-terminal da Pex14p está exposto para o citosol.

Peroxisomas purificados de fígado de rato foram incubados com diferentes concentrações de tripsina. Depois da inativação da protease, as amostras foram precipitadas com TCA, separadas por ureia-SDS-PAGE e analisadas por *western-blotting* usando os anticorpos anti-Pex5p (painel superior) e anti-Pex14(1-134)p (painel inferior). Os números à direita representam as massas moleculares em kDa dos marcadores utilizados.

8.1.2. Caracterização dos homopolímeros formados pela Pex14p recombinante

Alguns trabalhos efectuados anteriormente utilizando Pex14p recombinante em fusão com a GST referiram um comportamento duplo para esta proteína: parte da GST-Pex14p era obtida sob a forma de corpos de inclusão e uma fracção era detectada no sobrenadante de extractos celulares de *E. coli* (Will *et al.* 1999 e Sacksteder *et al.* 2000). Este comportamento foi também detectado neste trabalho durante a preparação de grandes quantidades de GST-Pex14p usadas na produção de anticorpos contra a Pex14p humana: aproximadamente 70% de GST-Pex14p foi recuperada na forma solúvel após lise das células transformadas por sonicação na presença de Triton X-100 0.1% (m/v).

A existência desta forma solúvel de Pex14p recombinante abriu a possibilidade de se estudar em fase aquosa o grau de polimerização da Pex14p.

O primeiro passo desta abordagem consistiu na determinação da massa molecular da proteína recombinante GST-Pex14p através da aplicação de sobrenadante de células *E. coli* transformadas com GST-Pex14p no topo de gradientes de densidade de sacarose.

A análise por SDS-PAGE de todas as fracções deste gradiente revelou que a GST-Pex14p apresenta um comportamento heterogéneo aparecendo em várias fracções

do gradiente, nomeadamente desde a fracção 9 (possivelmente correspondente a uma forma dimérica) até à fracção 1 (correspondente a complexos de massa molecular muito elevada) (Figura 8.5). Nenhuma outra proteína da *E. coli* apresenta estas características de sedimentação, o que sugere que a GST-Pex14p forma complexos com ela própria de estequiometrias variadas. Esta heterogeneidade foi também observada numa análise de preparações coradas negativamente de Pex14p recombinante por microscopia electrónica (resultados não mostrados).

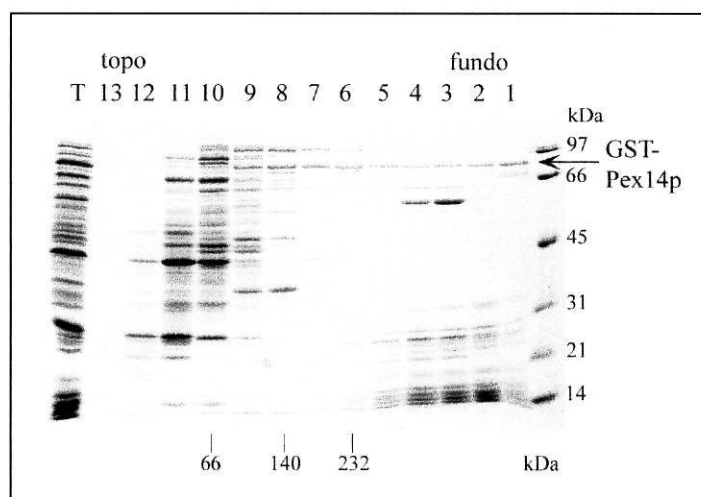


Figura 8.5. A GST-Pex14p é um homopolímero de tamanho heterogéneo.

As proteínas solúveis totais de células de *E. coli* exprimindo GST-Pex14p (obtidas após lise das células por sonicação) foram submetidas a centrifugação em gradientes de densidade de sacarose. O gradiente foi fraccionado a partir do fundo do tubo em 13 aliquotas. A quantidade correspondente a 1 ml da cultura inicial de cada uma das 13 aliquotas foi analisada por SDS-PAGE e o gel corado com *Coomassie-blue*. A identidade da banda proteica correspondente à proteína de fusão GST-Pex14p (indicada do lado direito do gel) foi confirmada por *western-blotting* (resultados não mostrados). A linha T representa a fracção de proteínas solúveis totais existentes em 0.5 ml da cultura inicial. Os números à direita representam as massas moleculares em kDa dos marcadores utilizados. Os números no fundo do gel indicam as massas moleculares em kDa dos marcadores usados para calibrar os gradientes de densidade.

Contudo, o facto da GST ser uma proteína dimérica, levantou a possibilidade da formação dos homopolímeros de GST-Pex14p resultarem em parte da interacção GST-GST (McTigue *et al.* 1995).

Assim, a GST-Pex14p das fracções 5 e 6 do gradiente de sacarose anterior (massa molecular aparente de 250-500 kDa) foi digerida com trombina para remoção da GST. A Pex14p clivada foi ainda incubada com uma pequena quantidade de ^{35}S -Pex5p humana sintetizada *in vitro* e aplicada novamente no topo de um gradiente de sacarose. Como demonstrado na Figura 8.6A, a maioria da Pex14p proveniente das

fracções 5 e 6 do primeiro gradiente encontra-se nas fracções 5-8 do segundo gradiente. Esta observação indica que: a) a interacção GST-GST não é responsável pela formação dos homopolímeros de GST-Pex14p; b) os homopolímeros de Pex14p são entidades estáveis nas condições experimentais utilizadas. É de salientar que a GST obtida após clivagem da GST-Pex14p com trombina encontra-se nas fracções 10-11 do gradiente (correspondente à proteína nas formas monomérica/dimérica), sugerindo que pelo menos o terço N-terminal da proteína de fusão GST-Pex14p apresenta a sua conformação correcta.

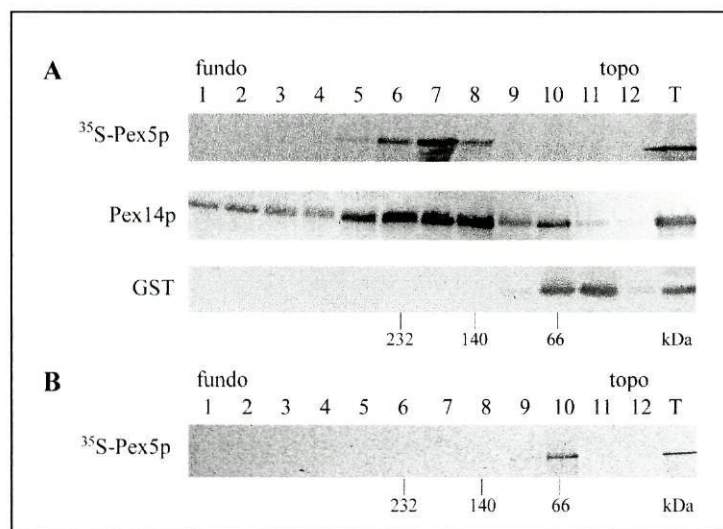


Figura 8.6. A Pex14p recombinante na forma homopolimérica liga-se à ³⁵S-Pex5p. ³⁵S-Pex5p sintetizada *in vitro* foi pré-incubada com (painéis A) ou sem (painel B) Pex14p recombinante humana e sujeita a centrifugação em gradientes de densidade de sacarose. A Pex14p recombinante humana foi obtida após concentração (com uma solução de sulfato de amónio saturada) e clivagem com trombina (para remoção da GST) da GST-PEX14p existente nas fracções 5 e 6 do gradiente apresentado na Figura 8.5. Os gradientes foram fraccionados em 12 aliquotas a partir do fundo do gradiente. A mesma quantidade de cada uma das 12 aliquotas foi analisada por *western-blotting* utilizando os anticorpos anti-Pex14p (painel *Pex14p*) e anti-GST (painel *GST*). A ³⁵S-Pex5p foi detectada por autorradiografia da membrana de nitrocelulose seca (painéis ³⁵S-Pex5p). A linha T representa 1/5 da amostra inicial que foi aplicada nos gradientes de sacarose. Os números no fundo dos gradientes representam as massas moleculares em kDa dos marcadores usados para calibrar os gradientes de densidade.

A adição de uma pequena quantidade de ³⁵S-Pex5p à Pex14p recombinante clivada antes da centrifugação do gradiente de sacarose permitiu ainda analisar a conformação da proteína recombinante. Na ausência de Pex14p, a Pex5p radioactiva comporta-se como uma proteína monomérica, encontrando-se na fracção 10 do gradiente (Figura 8.6B). Um resultado idêntico foi obtido com a Pex5p citosólica de fígado de rato (Gouveia *et al.* 2000). Contudo, quando esta proteína é pré-incubada com

Pex14p recombinante antes da aplicação no topo do gradiente de sacarose, verifica-se que a Pex5p é detectada como um constituinte de um complexo de massa molecular elevada que inclui a Pex14p recombinante (Figura 8.6A). Assim, pelo menos uma fracção dos homopolímeros de Pex14p parece apresentar a sua conformação correcta o que permite a sua ligação à ^{35}S -Pex5p.

8.1.3. Mapeamento do domínio envolvido na ligação Pex14-Pex14p

A estrutura primária da Pex14p revela a existência de pelo menos um domínio *coiled-coil* na parte central da proteína (Albertini *et al.* 1997, Brocard *et al.* 1997, Fransen *et al.* 1998, Shimizu *et al.* 1999, Will *et al.* 1999 e Johnson *et al.* 2001). Estes domínios estão envolvidos em interacções proteína-proteína que podem dar origem a estruturas diméricas, triméricas, tetraméricas e, possivelmente, pentaméricas (Lupas 1996). Assim, este domínio poderá ser o responsável pela capacidade de homopolimerização detectada na Pex14p recombinante. No entanto, dados experimentais que suportem esta possibilidade nunca foram descritos.

Para clarificar esta questão, procedeu-se à síntese de várias formas radioactivas com diferentes porções da Pex14p e testaram-se as suas capacidades de ligação à Pex14p recombinante humana por *blot-overlay assays*. Cinco peroxinas recombinantes foram utilizadas como controlo, nomeadamente a Pex2p, a Pex3p, a Pex5p, a Pex11p e a Pex19p.

Os resultados desta experiência estão apresentados na Figura 8.7. Assim, nenhuma interacção é detectada entre as diferentes formas truncadas da Pex14p e a Pex2p, a Pex3p e a Pex11p. Por outro lado, é observada uma ligação forte entre a Pex5p e todas as formas truncadas da Pex14p que contêm o domínio de ligação desta à Pex5p (correspondente aos primeiros 78 aminoácidos N-terminais (Schielbs *et al.* 1999)). Da mesma forma é detectada uma interacção mais fraca entre a Pex19p e todas as formas truncadas da Pex14p que contêm os aminoácidos 108-147 necessários para a ligação à Pex19p (Sacksteder *et al.* 2000).

Em relação à interacção Pex14p-Pex14p verifica-se uma ligação específica entre a Pex14p recombinante e a versão *full-length* da proteína e as formas truncadas ^{35}S -Pex14(147-377)p e ^{35}S -Pex14(140-278)p, o que indica que os aminoácidos 147-248 estão envolvidos na ligação da Pex14p com ela própria. Esta região contém o motivo

coiled-coil da Pex14p (previsto entre os resíduos de aminoácidos 163-198 pelo programa SMART (Schultz *et al.* 1998 e 2000). Finalmente, é detectada ainda uma interacção fraca, mas específica entre a Pex14p recombinante e a versão radioactiva ^{35}S -Pex14(1-155)p, que não se verifica com a versão mais pequena ^{35}S -Pex14(1-79)p. Esta interacção pode ser justificada de duas formas diferentes: ou a) existe um segundo domínio de ligação Pex14p-Pex14p, ou b) existem alguns resíduos C-terminais da ^{35}S -Pex14(1-155)p que ainda pertencem ao domínio *coiled-coil*, mas que não foram considerados como tal pelo programa SMART.

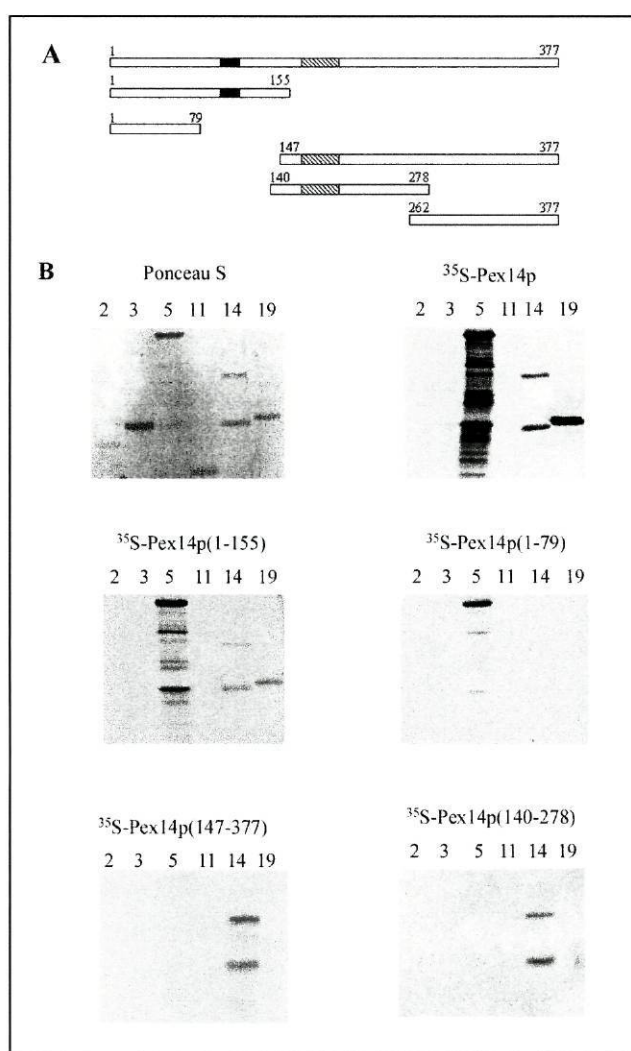


Figura 8.7. Mapeamento do domínio envolvido na interacção Pex14p-Pex14p.

(A) Representação esquemática das versões *full-length* e das formas truncadas da Pex14p utilizadas no *blot-overlay assay*. As caixas pretas e com riscas representam os domínios transmembranar e *coiled-coil* putativos, respectivamente. (B) Um a dois microgramas de GST-Pex2p, GST-Pex3p, GST-Pex5p, GST-Pex11p, GST-Pex14p e GST-Pex19p (indicadas pelos números 2, 3, 5, 11, 14 e 19, respectivamente) foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. O painel *Ponceau S* corresponde a uma membrana corada

com Ponceau S. Várias membranas iguais foram incubadas individualmente com as seguintes proteínas marcadas radioativamente: ^{35}S -Pex14(1-79)p, ^{35}S -Pex14(1-155)p, ^{35}S -Pex14(140-278)p e ^{35}S -Pex14(147-377)p. As interações foram detectadas por autorradiografia e apresentadas nos painéis identificados. Uma preparação de GST-Pex14p parcialmente clivada com trombina foi utilizada nestas experiências. As bandas proteicas detectadas nas linhas 14 com maior massa molecular aparente e com maior migração representam GST-Pex14p e Pex14p *full-length*, respectivamente.

Quando a versão ^{35}S -Pex14p(262-377) foi utilizada no ensaio não foram detectadas quaisquer tipo de interações específicas (resultados não mostrados).

8.1.4. Discussão

A observação de que a Pex14p de mamíferos apresenta todas as características de uma proteína intrínseca de membrana já não é recente (Komori *et al.* 1997, Shimizu *et al.* 1999 e Will *et al.* 1999). No entanto, e apesar disto, a sua topologia membranar nunca foi determinada com precisão. Os resultados aqui apresentados sugerem fortemente que os resíduos de aminoácidos 130-377 da Pex14p estão completamente expostos para o citosol, enquanto que os primeiros 130 aminoácidos se encontram protegidos do ataque proteolítico pela membrana peroxissomal. Esta resistência à protease não é uma propriedade intrínseca deste fragmento de 16 kDa, porque quando a membrana peroxissomal é solubilizada com detergentes, ele é completamente digerido. Por outro lado, este fragmento não está acessível ao ataque proteolítico pelo lado matricial da membrana e comporta-se como uma proteína intrínseca de membrana. Tais resultados podem sugerir que este domínio da Pex14p se encontra completamente embebido na membrana peroxissomal. No entanto, considerando o carácter predominantemente hidrofílico deste fragmento de 16 kDa (excepção feita aos aminoácidos 109-127), tal topologia só será possível se se assumir a existência de uma descontinuidade na hidrofobicidade da membrana na região onde a Pex14p existe, por outras palavras, se se assumir que a Pex14p é um componente de um poro/canal membranar.

Existem, no entanto, outras possibilidades para explicar os resultados obtidos. A resistência deste domínio da Pex14p à acção proteolítica da PK pode ser explicada por impedimentos estereoquímicos resultantes do facto deste domínio se encontrar muito próximo da membrana ou associado a outras proteínas. A Pex5p e a Pex19p são duas peroxinas candidatas para esta ligação nesta região da Pex14p (este trabalho, Schielbs *et al.* 1999 e Sacksteder *et al.* 2000).

Por outro lado, se se considerar que o domínio C-terminal da Pex14p (que começa a partir do resíduo 130) está voltado para o citosol (como demonstrado neste trabalho) e de que é válida a observação obtida por Shimizu *et al.* (1999) de que a extremidade N-terminal da Pex14p está exposta para o citosol, duas possibilidades podem ser sugeridas em relação à topologia do domínio N-terminal da Pex14p: 1) o domínio N-terminal (entre os aminoácidos 1-130) da Pex14p de mamíferos nunca atravessa completamente a membrana, apenas se encontra associado lateralmente à membrana; ou 2) este domínio atravessa a membrana um número par de vezes.

Neste trabalho foi ainda possível localizar pela primeira vez o domínio envolvido na interacção Pex14p-Pex14p utilizando *blot-overlay assays*. Tal domínio está compreendido entre os resíduos de aminoácidos 147-278 da Pex14p. Esta região possui um domínio *coiled-coil* putativo. Simultaneamente foi demonstrado que a interacção Pex14p-Pex14p dá origem à formação de homopolímeros de Pex14p de estequiometria variável. Este comportamento pode ser justificado de diferentes formas, como a ocorrência de associação não específica entre o domínio *coiled-coil* da Pex14p, a existência de domínios de ligação adicionais não identificados neste estudo, ou o facto da proteína recombinante GST-Pex14p não estar na sua conformação correcta. Contudo, várias observações experimentais obtidas contradizem esta última possibilidade: 1) as proteínas com uma conformação incorrecta são geralmente insolúveis; 2) a clivagem de GST-Pex14p com trombina deu origem a GST solúvel, apresentando-se num estado monomérico/dimérico, observação esta que sugere que pelo menos esta porção da proteína de fusão se apresenta no seu estado nativo; e 3) a Pex14p clivada manteve a capacidade de interagir com a Pex5p radioactiva, o que sugere que ela apresenta a mesma conformação que a proteína endógena. Desta forma, estes resultados podem sugerir que a Pex14p funciona como uma proteína multivalente capaz de juntar no mesmo local da membrana todos os componentes envolvidos na importação peroxissomal.

8.2. ENERGÉTICA DE IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PTS1 PARA A MATRIZ PEROXISSOMAL

8.2. ENERGÉTICA DE IMPORTAÇÃO DE PROTEÍNAS PTS1 PARA A MATRIZ PEROXISSOMAL

Os diferentes estudos até agora realizados que abordaram a energética da importação proteica peroxissomal evidenciaram a dependência deste processo na hidrólise de ATP (Imanaka *et al.* 1987, Behari e Baker 1993, Rapp *et al.* 1993, Soto *et al.* 1993, Wendland e Subramani 1993, Horng *et al.* 1995, Dodt e Gould 1996, Brickner *et al.* 1997, Pool *et al.* 1998, Terlecky *et al.* 2001 e Gouveia *et al.* 2003a), mas o(s) passo(s) verdadeiramente dependente(s) de ATP nunca foi(foram) identificado(s). Esta conclusão foi obtida por comparação da eficiência de importação de proteínas repórter para o peroxissoma em diferentes condições, como na presença de análogos não hidrolisáveis de ATP (ATP γ S, etc.) ou na remoção do ATP endógeno. Tais observações levaram alguns autores a sugerir que o passo de translocação peroxissomal é dependente de ATP (Imanaka *et al.* 1987, Dodt e Gould 1996 e Pool *et al.* 1998).

Contudo, no estudo deste problema há que considerar que as proteínas peroxissomais acabadas de sintetizar e em trânsito para o peroxissoma interactivam com chaperones citosólicas (Walton *et al.* 1994, Crookes e Olsen 1998 e Harano *et al.* 2001), interacção esta que requer hidrólise de ATP (Frydman 2001). Desta forma, muitos dos resultados citados anteriormente podem simplesmente derivar desta dependência.

Por outro lado, foi recentemente mostrado que a reciclagem da Pex5p peroxissomal para o citosol é um passo dependente da hidrólise de ATP (Gouveia *et al.* 2003a). Desta forma, a inibição da importação peroxissomal detectada por vários autores na ausência de ATP pode ser o resultado da não disponibilidade de locais de *docking*/translocação livres na membrana peroxissomal para a ligação do complexo proteína PTS1-Pex5p e não da inibição da actividade de alguma proteína dependente de ATP responsável pela translocação da proteína PTS1 através da membrana.

Assim, o principal objectivo deste trabalho consistiu na análise da energética do processo de importação peroxissomal, começando por abordar a influência da disponibilidade dos locais de *docking*/translocação na membrana peroxissomal na inserção da Pex5p nesta membrana e a dependência deste processo na hidrólise de ATP.

8.2.1. Influência dos níveis de Pex5p peroxissomal endógena na importação da ³⁵S-Pex5p

O modelo experimental utilizado neste trabalho foi o sistema *in vitro* desenvolvido para o estudo da associação/dissociação peroxissomal da Pex5p (Gouveia *et al.* 2003a).

Resumidamente, este sistema consiste na incubação de Pex5p sintetizada *in vitro* na presença de ³⁵S-metionina com fracções PNS de fígado de rato. A inserção correcta da ³⁵S-Pex5p na membrana peroxissomal é estabelecida por comparação do padrão proteolítico da proteína radioactiva com o da forma endógena. Após digestão com proteinase K (PK), a forma não importada é completamente digerida, enquanto que a proteína inserida na membrana peroxissomal adquire resistência à acção da PK e dá origem a duas formas distintas de Pex5p: uma população denominada etapa 2 da Pex5p que corresponde a uma forma da Pex5p com uma região N- terminal de aproximadamente 2 kDa acessível à PK, e a etapa 3 da Pex5p, uma população completamente resistente ao ataque proteolítico.

A caracterização deste processo permitiu concluir que a etapa 2 da Pex5p é a forma precursora da etapa 3 da Pex5p, e que esta é exportada para o citosol de uma forma dependente de ATP. Por outro lado, verificou-se que a inserção da Pex5p na membrana é inibida na ausência de ATP ou na presença de ATP γ S (um análogo não hidrolisável do ATP), o que pode indicar que a importação da Pex5p é dependente de ATP. No entanto, a possibilidade da maioria dos locais de *docking*/translocação da membrana peroxissomal estarem ocupados pela Pex5p endógena não pode ser excluída.

Assim, a influência da exportação da Pex5p endógena na importação da ³⁵S-Pex5p começou por ser estudada através da separação temporal destes dois eventos: uma fracção PNS foi incubada na presença de ATP 1 mM a 26°C durante 15 min (i.e., em condições em que é promovida a exportação da Pex5p endógena peroxissomal; Gouveia *et al.* 2003a); no final deste período, ATP γ S (a uma concentração final de 10 mM) foi adicionado à reacção de importação; e dois minutos depois a ³⁵S-Pex5p foi adicionada.

Em paralelo, foram realizadas duas reacções controlo. Numa das reacções, a fracção PNS foi primeiro incubada com ATP γ S 1 mM durante 15 min (i.e., esta condição não permite a exportação da população endógena de Pex5p) e só depois uma mistura de ATP e ATP γ S foi adicionada. As concentrações finais de ATP e ATP γ S

foram iguais às da reacção anterior (1 e 10 mM, respectivamente) e a reacção de importação foi iniciada da mesma forma. Na segunda reacção controlo, apenas ATP foi usado na primeira (1 mM) incubação e na reacção de importação a uma concentração final de 11 mM. As três reacções foram comparadas após tratamento proteolítico com PK das várias aliquotas retiradas 5 e 15 min após o início da reacção de importação com ^{35}S -Pex5p.

Relativamente à primeira reacção, a pré-incubação na presença de ATP 1 mM seguida da adição de ATP γ S 10 mM origina a formação de duas bandas de ^{35}S -Pex5p correspondentes às etapas 2 e 3 (Figura 8.8A, painel superior, linhas 5 e 8).

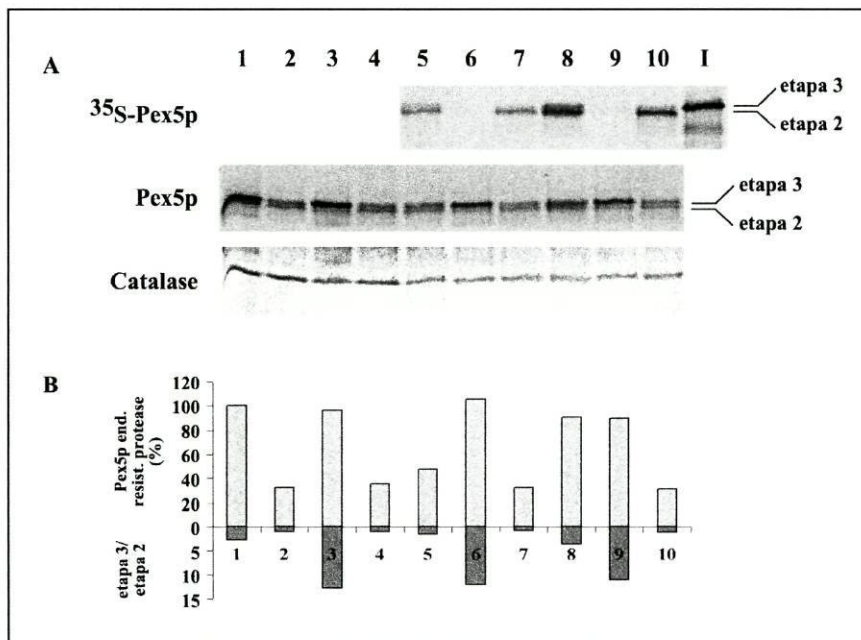


Figura 8.8. A importação *in vitro* de ^{35}S -Pex5p é influenciada pelos níveis de Pex5p peroxissomal endógena.

(A) Uma fracção PNS (450 μg de proteína) foi incubada durante 15 min a 26°C em tampão de importação A contendo ATP 1 mM. Após este período de tempo, uma aliquota da reacção foi removida (linha 2). Em seguida, procedeu-se à adição de ATP γ S (a uma concentração final de 10 mM) à mistura da reacção e 2 min depois, a reacção de importação foi iniciada com a adição de ^{35}S -Pex5p. Aliquotas da reacção de importação foram retiradas passados 5 (linha 5) e 15 min (linha 8). Duas reacções controlo foram efectuadas simultaneamente. Numa das reacções, uma fracção PNS foi pré-incubada no tampão de importação A contendo ATP 1 mM durante 15 min a 26°C. Depois de remover uma aliquota (linha 4), ATP (a uma concentração final de 11 mM) foi adicionado à reacção. A reacção de importação foi iniciada 2 min mais tarde como descrito anteriormente. Aliquotas da reacção de importação foram também removidas 5 min (linha 7) e 15 min (linha 10) depois. Na segunda reacção controlo, uma fracção PNS foi incubada no tampão de importação A contendo ATP γ S 1 mM durante 15 min a 26°C. Depois de remover uma aliquota (linha 3), uma mistura de ATP γ S mais ATP (a uma concentração final de 10 mM e 1 mM, respectivamente) foi adicionada à reacção. A importação foi iniciada 2 min mais tarde. Aliquotas desta reacção de importação foram removidas 5 min (linha 6) e 15 min (linha 9) depois. Uma fracção PNS (equivalente a 150 μg de proteína) em tampão de importação A não

sujeita a qualquer incubação foi também analisada (linha 1). As amostras tratadas com protease (150 µg de proteína por linha) foram analisadas por SDS-PAGE seguida de autorradiografia (painel superior) ou *western-blotting* utilizando os anticorpos dirigidos contra a Pex5p (painel central) e a catalase (painel inferior). A linha 1 representa 5% da quantidade de lisado de reticulócitos contendo ³⁵S-Pex5p utilizada nas reacções de importação. (B) Análise densitométrica da Pex5p endógena resistente à protease. As quantidades de Pex5p total resistente à protease (A, painel central) foram normalizadas em relação à quantidade de catalase (A, painel inferior) aplicada em cada linha. Os valores para cada linha são expressos como percentagem da quantidade de Pex5p protegida do ataque proteolítico presente na linha 1. A razão etapa 3/etapa 2 da Pex5p foi também determinada. Os números no eixo do x referem-se às linhas de A.

Em relação às reacções controlo, a pré-incubação realizada na presença de ATPγS anterior à adição da mistura de ATP e ATPγS leva à ausência de importação (Figura 8.8A, painel superior, linhas 6 e 9), enquanto que a utilização apenas de ATP ao longo de toda a reacção permite a detecção de ³⁵S-Pex5p logo após os primeiros 5 min da reacção, sendo a etapa 2 da Pex5p a forma predominantemente detectada, como descrito anteriormente (Figura 8.8A, painel superior, linha 7 e Gouveia *et al.* 2003a).

O painel central da Figura 8.8A mostra o comportamento da Pex5p peroxissomal endógena durante as incubações descritas anteriormente. A Figura 8.8B corresponde à análise densitométrica da Pex5p endógena protegida proteoliticamente. As quantidades de Pex5p protegida da acção da PK e as razões entre as etapas 3 e 2 da Pex5p foram comparadas com as quantidades presentes numa amostra que não foi sujeita a pré-incubação com nucleótidos exógenos (Figura 8.8A, painel central, linha 1).

A pré-incubação na presença de ATPγS 1 mM seguida de uma incubação na presença de ATPγS 10 mM e ATP 1 mM de uma fracção PNS não altera significativamente a quantidade de Pex5p resistente à acção da PK (comparar linhas 3, 6 e 9 com linha 1 do painel central da Figura 8.8A). Pelo contrário, a Pex5p resistente à PK é sujeita a uma redução de aproximadamente 65% quando a pré-incubação é feita na presença de ATP 1 mM em duas das reacções efectuadas (comparar linhas 2 e 4 com linha 1 do painel central da Figura 8.8A; ver também Figura 8.8B), o que indica que a maioria da Pex5p endógena é exportada do peroxissoma nestas condições.

A incubação posterior de uma destas reacções na presença de ATP 11 mM não altera a quantidade de Pex5p protegida da acção proteolítica, o que indica que os níveis de Pex5p *steady-state* foram atingidos nos primeiros 15 min de incubação (comparar linhas 4, 7 e 10 do painel central da Figura 8.8A, ver também Figura 8.8B). Pelo contrário, a incubação de uma fracção PNS (tratada previamente com ATP 1 mM) com

ATP γ S 10 mM leva a um aumento de Pex5p endógena resistente à protease, assim como ao aumento da razão entre as etapas 3 e 2 da Pex5p ao fim de 15 min do início da reacção (comparar linha 8 com linha 2 do painel central da Figura 8.8A; ver também Figura 8.8B). Este resultado sugere que após o pré-tratamento com ATP, os peroxissomas importam uma pequena quantidade de Pex5p solúvel, que só é detectada quando a exportação da Pex5p é bloqueada (por adição de ATP γ S ao meio da reacção de importação). Contudo, a razão entre as etapas 3 e 2 da Pex5p endógena nesta amostra é superior à mesma razão observada para a Pex5p sintetizada *in vitro*. Duas razões diferentes contribuem para esta diferença. (1) No caso da Pex5p endógena, esta razão é obtida numa situação em que os peroxissomas contendo quantidades consideráveis da etapa 2 da Pex5p (o precursor da etapa 3 da Pex5p) foram submetidos a uma incubação de 17 min na presença de ATP γ S 10 mM, que tem como resultado a acumulação da etapa 3 da Pex5p. No caso da proteína radioactiva, os peroxissomas foram sujeitos a importação da peroxina sintetizada *in vitro* durante apenas 15 min (i.e., não havia Pex5p radioactiva da etapa 2 quando o ATP γ S foi adicionado à mistura da reacção). Assim, a Pex5p radioactiva tem primeiro que ser importada para os peroxissomas para dar origem à etapa 2 da Pex5p e, depois, originar a etapa 3 da Pex5p. Considerando que esta transição da etapa 2 para a etapa 3 requer alguns minutos para ocorrer (ver Figura 3 de Gouveia *et al.* 2003a), uma pequena razão etapa 3/etapa 2 da Pex5p é esperada neste caso. (2) Ao contrário dos resultados obtidos para ³⁵S-Pex5p, existe uma pequena quantidade de Pex5p endógena completamente resistente à protease que é detectada nas fracções PNS incubadas com ATP 11 mM (Figura 8.8A, painel central, linhas 4, 7, e 10). Esta população pode representar Pex5p endógena inactiva (i.e., Pex5p presente em locais de *docking*/translocação que já não estão activos na exportação da peroxina) e/ou inacessível (i.e., Pex5p “sequestrada” em vesículas de origem não peroxissomal). Estes dois factores não afectam o comportamento da Pex5p sintetizada *in vitro* nestas experiências, tornando os seus resultados mais claros que os obtidos com a Pex5p endógena.

No seu conjunto estes resultados mostram que o processo de importação peroxissomal é altamente dependente da exportação da população endógena de Pex5p. A importação mais eficiente da Pex5p radioactiva é verificada naquela condição em que os peroxissomas são previamente incubados com ATP para libertar a Pex5p endógena dos locais de *docking*/translocação da membrana do peroxissoma.

8.2.2. A importação da Pex5p para peroxissomas purificados

O modelo experimental utilizado para estudar a dependência energética do processo de importação peroxissomal deve permitir a quantificação da eficiência de importação na presença e ausência de ATP. Contudo, no caso específico da importação da Pex5p e segundo os resultados obtidos anteriormente, este processo é dependente da saída da população endógena de Pex5p da membrana peroxissomal, um processo que requer hidrólise de ATP. Por outro lado, o rendimento da exportação desta população endógena de Pex5p após uma pré-incubação na presença de ATP não é 100%.

Logo, a situação ideal para determinar a dependência de ATP na eficiência da importação da Pex5p seria a de utilizar um sistema no qual a exportação da Pex5p endógena não seja uma variável experimental. Esta situação foi conseguida com a utilização de peroxissomas purificados em reacções de importação. De facto, ao contrário do sistema descrito usando fracções PNS de fígado de rato e que origina duas populações de Pex5p, quando peroxissomas purificados de fígado de rato são sujeitos a *protease protection assays* e analisados por *western-blotting* usando um anticorpo anti-Pex5p, apenas a banda correspondente à etapa 2 da Pex5p é detectada (Gouveia *et al.* 2000 e 2003a). Esta observação sugere que os peroxissomas isolados não são capazes de efectuar a transição da Pex5p da etapa 2 para a etapa 3 e, consequentemente, de exportar a Pex5p do peroxissoma.

De forma a testar esta possibilidade foram realizadas experiências de *pulse-chase in vitro*, experiências estas que compreendem três passos distintos: 1) a Pex5p é importada para o peroxissoma por um período curto de tempo (“*pulse*”); 2) a importação é bloqueada por adição de um excesso da proteína de fusão recombinante GST-Pex5p; e 3) o comportamento da Pex5p radioactiva importada é seguido em função do tempo (“*chase*”). A análise por SDS-PAGE e autorradiografia desta experiência é mostrada na Figura 8.9.

Quando a importação é iniciada na presença de ATP e o período de *chase* é mantido na presença do mesmo nucleótido, não se verifica nenhuma diminuição da quantidade da etapa 2 da Pex5p (Figura 8.9, linhas + ATP/+ ATP). Pelo contrário, quando esta experiência foi efectuada utilizando fracções PNS, foi demonstrado que a Pex5p radioactiva é exportada na presença de ATP (Gouveia *et al.* 2003a).

Na ausência de ATP também não é detectada a etapa 3 da Pex5p (Figura 8.9, linhas - ATP/- ATP), mesmo quando ATP γ S é adicionado antes do período de *chase* (Figura 8.9, linhas - ATP/+ ATP γ S).

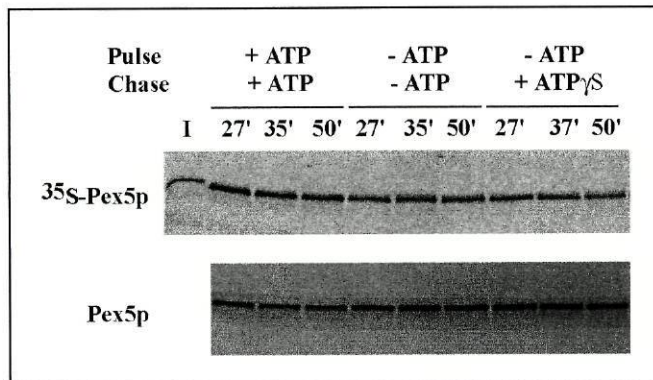


Figura 8.9. Peroxissomas purificados não exportam Pex5p.

³⁵S-Pex5p foi incubada com peroxissomas purificados de fígado de rato em tampão de importação A contendo ATP 10 mM (linhas *Pulse/+ ATP*) ou na ausência de ATP exógeno (linhas *Pulse/- ATP*). Após 20 min a 26°C, GST-Pex5p foi adicionada às reacções para bloquear a importação. Uma aliquota foi removida passados 7 min (linhas 27') e ATP 10 mM (linhas *Chase/+ ATP*) ou ATP γ S 10 mM (linhas *Chase/+ ATP γ S*) foram adicionados a duas das reacções de importação. Oito e 23 min depois, aliquotas das reacções de importação foram removidas (linhas 35' e 50' *min*, respectivamente). Todas as amostras foram digeridas com PK, submetidas a SDS-PAGE e analisadas por autorradiografia (painel superior) e *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p (painel inferior). A linha *I* representa 5% da quantidade de lisado de reticulócitos contendo ³⁵S-Pex5p utilizada nas reacções de importação.

Os resultados obtidos sugerem, de facto, que os peroxissomas purificados não conseguem exportar Pex5p, muito possivelmente porque algum componente necessário para este evento foi perdido ou inactivado durante o processo de isolamento dos organelos de fígado de rato. As várias tentativas de reposição da exportação de Pex5p peroxissomal através da suplementação das reacções de importação com fracções citosólicas de fígado de rato sugerem que a segunda hipótese tem mais possibilidades de ser verdadeira (resultados não mostrados).

8.2.3. Caracterização do evento de inserção da Pex5p na membrana do peroxissoma

A importação da Pex5p para o peroxissoma requer a presença de proteínas contendo sequências PTS1 no meio da reacção (Gouveia *et al.* 2003b).

Esta dependência de proteínas PTS1 foi também testada no sistema de importação *in vitro* descrito neste trabalho. A ausência de proteínas PTS1 exógenas no meio da reacção não impede a inserção da Pex5p na membrana (Figura 8.10A, linha 1), pois durante a preparação de peroxissomas uma quantidade significativa de proteínas detentoras de PTS1 é libertada destes organelos. Contudo, uma inibição completa da inserção membranar da Pex5p é observada quando a reacção de importação é realizada na presença de uma proteína de fusão entre a GST e os resíduos de aminoácidos 312-639 da Pex5p correspondentes ao domínio de ligação da Pex5p à sequência PTS1 (Figura 8.10A, linha 5). Uma reversão parcial desta acção inibitória é obtida incluindo uma proteína PTS1 (GST-SKL) na reacção de importação (Figura 8.10A, linha 4). Este resultado sugere que a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal é dependente da presença de proteínas PTS1.

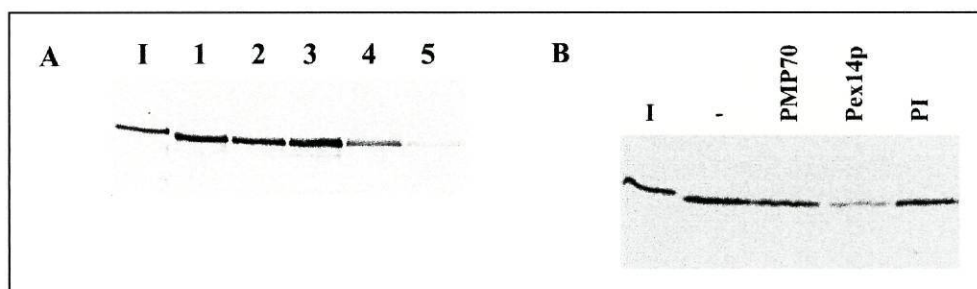


Figura 8.10. A inserção da Pex5p na membrana de peroxissomas purificados é dependente de proteínas PTS1 e é inibida por anticorpos anti-Pex14p.

(A) Peroxissomas purificados de fígado de rato foram submetidos a reacções de importação na ausência (linha 1) ou na presença de GST (linhas 2 e 3) ou GST-TPRs (linhas 4 e 5) e de GST-SKL (linhas 2 e 4) ou GST-LKS (linhas 3 e 5) durante 30 min a 26°C no tampão de importação A contendo ATP 10 mM. (B) Peroxissomas isolados de fígado de rato foram pré-incubados em tampão de importação A na ausência (linha -) ou presença de imunoglobulinas anti-PMP70 (linha PMP70), anti-Pex14p (linha Pex14p) ou pré-ímmunes (linha PI). As reacções de importação (contendo ATP 10 mM) foram iniciadas após a adição de ³⁵S-Pex5p. Todas as amostras foram sujeitas a proteólise com proteinase K seguida de SDS-PAGE e análise por autorradiografia. A linha I representa 5% da quantidade de lisado de reticulócitos contendo ³⁵S-Pex5p utilizada nas reacções de importação.

A Pex14p é um componente do complexo peroxissomal de *docking/translocação* (Subramani *et al.* 2000, Purdue e Lazarow 2001a e Sparkes e Baker 2002) e anticorpos dirigidos contra esta proteína são capazes de inibir a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal (Gouveia *et al.* 2003b). A mesma observação foi feita para os peroxissomas isolados quando incubados na presença de anticorpos contra a HsPex14p (Figura 8.10B).

Apesar destes resultados mostrarem que os peroxissomas isolados de fígado de rato apresentam duas características comuns às fracções PNS utilizadas nas reacções de importação (dependência da proteína PTS e da peroxina Pex14p), os níveis de importação de ^{35}S -Pex5p são iguais quando se utilizam 80 μg de peroxissomas purificados ou 150 μg de uma fracção PNS. Assim, considerando que as proteínas peroxissomais correspondem a 2% do total das proteínas de fígado de rato (Hartl *et al.* 1985), a eficiência de importação é reduzida pelo menos 26 vezes depois do isolamento dos organelos. Provavelmente este factor é ainda superior porque a importação da Pex5p sintetizada *in vitro* não sofre competição pela Pex5p endógena citosólica quando se utilizam organelos isolados.

8.2.4. A inserção da Pex5p na membrana peroxissomal é independente de ATP

Tendo sido demonstrado que peroxissomas purificados de fígado de rato são competentes na importação de Pex5p (mas não na sua exportação), a energética deste processo foi analisada.

Para este efeito, peroxissomas isolados e lisado de reticulócitos contendo ^{35}S -Pex5p foram sujeitos separadamente a um tratamento enzimático para deplecção do ATP endógeno. As reacções de importação foram iniciadas com a mistura destes dois componentes na presença ou ausência de nucleótidos exógenos.

Como mostrado na Figura 8.11A não é detectada qualquer alteração na intensidade da banda correspondente à Pex5p da etapa 2 na ausência de nucleótidos ou na presença de ATP ou ATP γ S 10 mM.

Muitas enzimas que hidrolisam ATP usam ATP $\cdot\text{Mg}^{2+}$ como verdadeiro substrato. Assim, a necessidade do ião Mg^{2+} neste processo foi também abordada experimentalmente.

A ausência do ião Mg^{2+} ou a sua deplecção com agentes quelantes (nomeadamente EDTA e 1,10-fenantrolina) do meio de importação não foram suficientes para introduzir algum efeito inibitório na importação da ^{35}S -Pex5p para o peroxissoma (Figura 8.11B).

As duas observações anteriores sugerem que a inserção de Pex5p na membrana peroxissomal não requer a hidrólise de ATP.

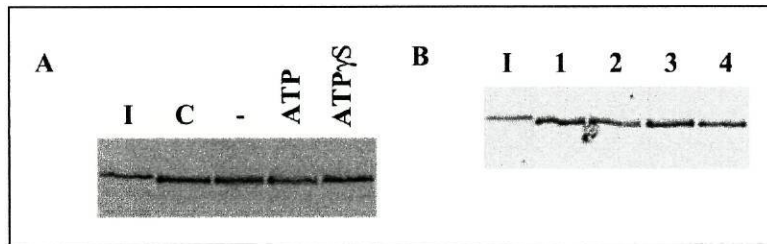


Figura 8.11. **A inserção da Pex5p em peroxissomas purificados não requer a hidrólise de ATP.**

(A) Peroxissomas depletados de ATP e lisado de reticulócitos contendo ^{35}S -Pex5p foram submetidos a reacções de importação no tampão de importação A contendo ATP 10 mM (linha *ATP*), ATP γ S 10 mM (linha *ATP γ S*) ou na ausência de qualquer nucleótido exógeno (linha -). Uma reacção *standard* de importação (em tampão de importação A contendo ATP 10 mM) foi realizada como controlo. (linha *C*). (B) Peroxissomas purificados de fígado de rato foram submetidos a reacções de importação em tampão de importação B (linha *I*), tampão de importação B contendo EDTA 12 mM (linha 2) ou EDTA 12 mM + 1,10-fenantrolina 1 mM (linha 3) ou tampão de importação A (linha 4). Todas as amostras foram digeridas com PK, submetidas a SDS-PAGE e analisadas por autorradiografia. A linha *I* representa 5% da quantidade de lisado de reticulócitos contendo ^{35}S -Pex5p utilizada nas reacções de importação.

8.2.5. Discussão

Os diferentes autores que estudaram a energética da importação peroxissomal foram unânimes em afirmar que este processo é dependente de ATP. No entanto, nunca foi possível determinar qual o passo que requer hidrólise de ATP.

Os resultados aqui apresentados indicam que a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal não depende de ATP; por outro lado, como a exportação deste receptor é inibida pelo ATP γ S (Gouveia *et al.* 2003a; ver também Figura 8.8), estas duas observações sugerem que o ATP é essencial ao nível da membrana peroxissomal apenas para reciclar a Pex5p para o citosol. Esta conclusão é discordante da formulada por Dodt e Gould (1996), que depois de verificarem que a Pex5p e as proteínas PTS1 sintetizadas *de novo* acumulavam na membrana peroxissomal em condições limitativas de energia, concluíram que a translocação proteica depende de energia. Estas observações não são no entanto mutuamente exclusivas. Bastará para tal assumir que o complexo de *docking*/translocação na membrana peroxissomal apresenta dois locais de ligação para a Pex5p (como por exemplo, um com função de *docking* e outro de translocação) e que a ligação da Pex5p a cada um destes locais é independente de ATP; contudo, na ausência desta forma de energia, a Pex5p acumula nos locais de *docking*, uma vez que a exportação da Pex5p a partir dos locais de translocação se encontra bloqueada e estes permanecem ocupados.

É de referir que o sistema de importação *in vitro* utilizado neste trabalho inclui proteínas PTS1 já na sua conformação correcta que foram libertadas pelos organelos durante a preparação das fracções de fígado de rato utilizadas nestas experiências. Por este facto, nenhuma conclusão pode ser retirada relativamente às necessidades energéticas de processos que ocorram a montante do *docking* e translocação das proteínas PTS1 através da membrana peroxissomal.

A Pex1p e a Pex6p são proteínas candidatas para a participação em eventos dependentes de energia no processo de importação peroxissomal, porque são as únicas peroxinas conhecidas que possuem domínios de ligação ao ATP. A análise epistática dos níveis de *steady-state* da Pex5p em várias linhas celulares deficientes na importação de proteínas PTS1 permitiram concluir que a Pex1p e a Pex6p podem estar envolvidas na reciclagem da Pex5p para o citosol (Collins *et al.* 2000). Posteriormente, estes resultados foram reinterpretados pelos mesmos autores que propuseram que afinal estas duas peroxinas podem desempenhar uma função anterior e/ou simultânea ao evento de translocação e/ou um papel na formação do complexo de *docking*/translocação (Gould e Collins 2002). Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com a primeira hipótese colocada relativamente à função destas proteínas, i.e., um papel para a Pex1p e a Pex6p na reciclagem da Pex5p para o citosol.

Se o ATP for necessário apenas para a exportação da Pex5p do peroxissoma, a energia necessária para a translocação de proteínas através da membrana peroxissomal pode derivar das interacções estabelecidas directamente entre a Pex5p e algumas peroxinas da maquinaria de *docking*/translocação existente na membrana peroxissomal (como a Pex14p, a Pex13p ou a Pex12p).

Destas interacções, apenas a ligação Pex5p-Pex14p foi estudada com algum detalhe. Como referido anteriormente, esta interacção tem um carácter multivalente, pelo facto: a) da Pex14p interactuar com ela própria através do domínio *coiled-coil* (ver secção anterior); b) da Pex5p de mamíferos possuir sete domínios de ligação à Pex14p com afinidade elevada (Schliebs *et al.* 1999 e Saidowsky *et al.* 2001); e c) desses locais estarem muito provavelmente ocupados *in vivo* (Gouveia *et al.* 2000). A energia associada à formação do complexo Pex5p-Pex14p ainda não é conhecida. No entanto, a energia libertada da interacção de apenas uma molécula de Pex14p com a Pex5p ($\sim 45 \text{ kJmol}^{-1}$) seria suficiente para permitir a entrada de uma proteína do citosol para a matriz peroxissomal contra um gradiente de concentração elevado (como por exemplo 1:10000). A translocação de complexos proteicos através de membranas de uma forma

independente da hidrólise de ATP já foi descrita no caso da translocação proteica através de poros nucleares (Komeli e O'Shea 2001).

9. CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

9. CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho relativamente à Pex14p mostraram que esta proteína é capaz de formar homopolímeros. A existência de domínios *coiled-coil* putativos na sua sequência primária e o isolamento de complexos membranares envolvendo várias unidades de Pex14p, o receptor Pex5p e as peroxinas envolvidas no *docking* e/ou translocação peroxissomais, já tinham sugerido esta hipótese (Albertini *et al.* 1997 e 2001, Brocard *et al.* 1997, Fransen *et al.* 1998, Shimizu *et al.* 1999, Will *et al.* 1999, Johnson *et al.* 2001, Reguenga *et al.* 2001 e Agne *et al.* 2003). A formação destes homopolímeros é dependente da interacção dos domínios *coiled-coil* das várias unidades de Pex14p. É de referir que enquanto estes resultados estavam a ser submetidos a um processo de revisão com vista à sua publicação, outros dados experimentais foram publicados que permitiram confirmar o domínio de interacção da Pex14p com ela própria com base em estudos de *two-hybrid* em sistemas bacterianos e de mamíferos (Fransen *et al.* 2002).

Apesar das tentativas realizadas, o grau de homopolimerização da Pex14p não foi determinado neste trabalho. Contudo, é possível que este problema possa ser abordado utilizando outras técnicas analíticas (como por exemplo electroforese em géis de poliacrilamida nativos ou semi-desnaturantes).

Os homopolímeros de Pex14p ou os complexos formados por várias unidades de Pex14p e as peroxinas associadas à translocação (Pex2p, Pex10p e Pex12p) são, actualmente, os principais candidatos para a constituição de um poro membranar envolvido nos eventos de *docking* e translocação peroxissomais. Esta hipótese poderia ser testada após reconstituição *in vitro* dos complexos proteicos constituídos pela Pex14p (sozinha ou associada à Pex2p, Pex10p e Pex12p) em vesículas membranares. Tais experiências poderiam revelar a funcionalidade destes complexos, nomeadamente a sua participação nos eventos de *docking* e translocação de proteínas PTS1 através da membrana peroxissomal.

A reconstituição dos complexos proteicos envolvendo a Pex14p possibilitaria ainda uma nova abordagem estrutural da Pex14p associada ao estudo das modificações estruturais a que esta peroxina é sujeita durante o processo de importação peroxissomal.

O estudo da energética do processo de importação peroxissomal realizado neste trabalho permitiu verificar que a exportação da Pex5p da membrana peroxissomal é dependente da hidrólise de ATP.

As peroxinas Pex1p e Pex6p são duas proteínas candidatas para a participação no evento dependente de ATP da importação peroxissomal, pelo facto de serem as únicas peroxinas até ao momento conhecidas com actividade de ATPase. Esta hipótese poderia ser testada utilizando fracções PNS de células deficientes nestas peroxinas nas reacções de importação, ou verificando a influência de anticorpos contra estas peroxinas na eficiência de importação da Pex5p.

A utilização de fracções PNS de células deficientes nas peroxinas Pex2p, Pex10p, Pex12p, Pex13p e Pex14p poderia constituir uma estratégia experimental para definir a participação destas peroxinas no processo de translocação de proteínas para os peroxissomas. Seria talvez possível atribuir uma ordem à acção destas peroxinas na importação da Pex5p para o peroxissoma.

Em mamíferos, o endereçamento das proteínas PTS2 para o peroxissoma está dependente da ligação da Pex7p à Pex5p e do *docking* do complexo Pex7p-proteínas PTS2 na membrana peroxissomal mediado pela ligação da Pex5p à Pex14p. Assim, seria também interessante estudar o efeito das proteínas PTS2 na eficiência de importação da Pex5p para os peroxissomas isolados, tal como estudado neste trabalho em relação às proteínas PTS1.

A utilização de formas truncadas/mutadas da Pex5p nas reacções de importação poderia também ser uma estratégia importante para verificar quais os domínios necessários para a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal. Esta estratégia poderia ainda ser aplicada para detectar domínios necessários para os diferentes passos que constituem o percurso da Pex5p desde o citosol até ao peroxissoma, seguido de exportação para o citosol.

Finalmente, este sistema de importação peroxissomal *in vitro* poderia ser aplicado no estudo do endereçamento para o peroxissoma de outras proteínas envolvidas na biogénese peroxissomal, desde que apresentem um padrão proteolítico que permita distinguir a proteína importada correctamente da proteína apenas associada aos organelos. A aplicação deste sistema ao receptor das proteínas PTS2 (a Pex7p), ao possível receptor das PMPs (a Pex19p) e às PMPs em geral poderia contribuir para alargar o nosso conhecimento sobre a biogénese do peroxissoma.

10. BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

A)

Abe I, Okumoto K, Tamura S e Fujiki Y. (1998) Clofibrate-inducible, 28-kDa peroxisomal integral membrane protein is encoded by PEX11. *FEBS Lett* **431**, 468-472

Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwachter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W e Kunau WH. (2003) Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* **11**, 635-646

Albertini M, Girzalsky W, Veenhuis M e Kunau WH. (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

Albertini M, Rehling P, Erdmann R, Girzalsky W, Kiel JA, Veenhuis M e Kunau WH. (1997) Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* **89**, 83-92

B)

Baerends RJ, Rasmussen SW, Hilbrands RE, van der Heide M, Faber KN, Reuvekamp PT, Kiel JA, Cregg JM, van der Klei IJ e Veenhuis M. (1996) The *Hansenula polymorpha* PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J Biol Chem* **271**, 8887-8894

Baker A. (1996) *In vitro* systems in the study of peroxisomal protein import. *Experientia* **52**, 1055-1062

Barnett P, Bottger G, Klein AT, Tabak HF e Distel B. (2000) The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction. *EMBO J* **19**, 6382-6391

Behari R e Baker A. (1993) The carboxyl terminus of isocitrate lyase is not essential for import into glyoxysomes in an *in vitro* system. *J Biol Chem* **268**, 7315-7322

Bellion E e Goodman JM. (1987) Proton ionophores prevent assembly of a peroxisomal protein. *Cell* **48**, 165-173

Borden KL. (2000) RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* **295**, 1103-1112

Bottger G, Barnett P, Klein AT, Kragt A, Tabak HF e Distel B. (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

Braverman N, Dodt G, Gould SJ e Valle D. (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

Brickner DG, Harada JJ e Olsen LJ. (1997) Protein transport into higher plant peroxisomes. *In vitro* import assay provides evidence for receptor involvement. *Plant Physiol* **113**, 1213-1221

Brickner DG e Olsen LJ. (1998) Nucleotide triphosphates are required for the transport of glycolate oxidase into peroxisomes. *Plant Physiol* **116**, 309-317

Brocard CB, Jedeszko C, Song HC, Terlecky SR e Walton PA. (2003) Protein structure and import into the peroxisomal matrix. *Traffic* **4**, 74-82

Brocard C, Lametschwandtner G, Koudelka R e Hartig A. (1997) Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. *EMBO J* **16**, 5491-5500

Brosius U, Dehmel T e Gartner J. (2002) Two different targeting signals direct human peroxisomal membrane protein 22 to peroxisomes. *J Biol Chem* **277**, 774-784

C)

Chang CC, Warren DS, Sacksteder KA e Gould SJ. (1999) PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* **147**, 761-774

Collins CS, Kalish JE, Morrell JC, McCaffery JM e Gould SJ. (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

Crookes WJ e Olsen LJ. (1998) The effects of chaperones and the influence of protein assembly on peroxisomal protein import. *J Biol Chem* **273**, 17236-17242

D)

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

de Walque S, Kiel JA, Veenhuis M, Opperdoes FR e Michels PA. (1999) Cloning and analysis of the PTS-1 receptor in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **104**, 106-119

Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW, Kiel JA, Kunau WH, Lazarow PB, Mannaerts GP, Moser HW, Osumi T, Rachubinski RA, Roscher A, Subramani S, Tabak HF, Tsukamoto T, Valle D, van der Klei I, van Veldhoven PP e Veenhuis M. (1996) A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol* **135**, 1-3

Dodt G, Braverman N, Wong C, Moser A, Moser HW, Watkins P, Valle D e Gould SJ. (1995) Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* **9**, 115-125

Dodt G e Gould SJ. (1996) Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* **135**, 1763-1774

Dodt G, Warren D, Becker E, Rehling P e Gould SJ. (2001) Domain mapping of human PEX5 reveals functional and structural similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p. *J Biol Chem* **276**, 41769-41781

E)

Eckert JH e Erdmann R. (2003) Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **147**, 75-121

Eckert JH e Johnsson N. (2003) Pex10p links the ubiquitin conjugating enzyme Pex4p to the protein import machinery of the peroxisome. *J Cell Sci* **116**, 3623-3634

Einwachter H, Sowinski S, Kunau WH e Schliebs W. (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

Elgersma Y, Elgersma-Hooisma M, Wenzel T, McCaffery JM, Farquhar MG e Subramani S. (1998) A mobile PTS2 receptor for peroxisomal protein import in *Pichia pastoris*. *J Cell Biol* **140**, 807-820

Elgersma Y, Kwast L, Klein A, Voorn-Brouwer T, van den Berg M, Metzger B, America T, Tabak HF e Distel B. (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

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

Erdmann R e Blobel G. (1996) Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J Cell Biol* **135**, 111-121

F)

Faber KN, Haan GJ, Baerends RJ, Kram AM e Veenhuis M. (2002) Normal peroxisome development from vesicles induced by truncated *Hansenula polymorpha* Pex3p. *J Biol Chem* **277**, 11026-11033

Faber KN, Heyman JA e Subramani S. (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

Fahimi HD e Baumgart E. (1999) Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review. *J Histochem Cytochem* **47**, 1219-1232

Fransen M, Brees C, Ghys K, Amery L, Mannaerts GP, Ladant D e Van Veldhoven PP. (2002) Analysis of mammalian peroxin interactions using a non-transcription-based bacterial two-hybrid assay. *Mol Cell Proteomics* **1**, 243-252

Fransen M, Terlecky SR e Subramani S. (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

Fransen M, Wylín T, Brees C, Mannaerts GP e Van Veldhoven PP. (2001) Human Pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol Cell Biol* **21**, 4413-4424

Frydman J. (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**, 603-647

Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL e Lazarow PB. (1982) Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol* **93**, 103-110

Fujiki Y. (2000) Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett* **476**, 42-46

G)

Gatto GJ Jr, Geisbrecht BV, Gould SJ e Berg JM. (2000) Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol* **7**, 1091-1095

Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y e Fujiki Y. (2000) The peroxin Pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**, 2085-2102

Girzalsky W, Rehling P, Stein K, Kipper J, Blank L, Kunau WH e Erdmann R. (1999) Involvement of Pex13p in Pex14p localization and peroxisomal targeting signal 2-dependent protein import into peroxisomes. *J Cell Biol* **144**, 1151-1162

Glick BS. (1995) Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **260**, 224-231

Gloeckner CJ, Mayerhofer PU, Landgraf P, Muntau AC, Holzinger A, Gerber JK, Kammerer S, Adamski J e Roscher AA. (2000) Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein Pex19p. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 144-150

- Glover JR, Andrews DW e Rachubinski RA. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10541-10545
- Götte K, Girzalsky W, Linkert M, Baumgart E, Kammerer S, Kunau WH e Erdmann R. (1998) Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 616-628
- Gould SJ e Collins CS. (2002) Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 382-389
- Gould SJ e Valle D. (2000) Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet* **16**, 340-345
- Gould SJ, Kalish JE, Morrell JC, Bjorkman J, Urquhart AJ e Crane DI. (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
- Gould SJ, Raymond GV e Valle D. (2001) The peroxisome biogenesis disorders. Em: Scriver CR, Beaudet AL, Slyer S e Valle D (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th Ed. McGraw-Hill, New York
- Gouveia AM, Guimarães CP, Oliveira ME, Reguenga C, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (2003a) Characterization of the peroxisomal cycling receptor, Pex5p, using a cell-free *in vitro* import system. *J Biol Chem* **278**, 226-232
- Gouveia AM, Guimarães CP, Oliveira ME, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (2003b) Insertion of Pex5p into the peroxisomal membrane is cargo protein-dependent. *J Biol Chem* **278**, 4389-4392
- Gouveia AM, Reguenga C, Oliveira ME, Eckerskorn C, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (1999) Alkaline density gradient floatation of membranes: polypeptide composition of the mammalian peroxisomal membrane. *Anal Biochem* **274**, 270-277
- Gouveia AM, Reguenga C, Oliveira ME, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (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
- Gross E. (1967) The Cyanogen Bromide Reaction. *Methods Enzymol* **11**, 238-255
- H)**
- Harano T, Nose S, Uezu R, Shimizu N e Fujiki Y. (2001) Hsp70 regulates the interaction between the peroxisome targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p and PTS1. *Biochem J* **357**, 157-165
- Harper CC, Berg JM e Gould SJ. (2003) PEX5 binds the PTS1 independently of Hsp70 and the peroxin PEX12. *J Biol Chem* **278**, 7897-7901
- Hartl FU, Just WW, Koster A e Schimassek H. (1985) Improved isolation and purification of rat liver peroxisomes by combined rate zonal and equilibrium density centrifugation. *Arch Biochem Biophys* **237**, 124-134
- Hazra PP, Suriapranata I, Snyder WB e Subramani S. (2002) Peroxisome remnants in *pex3Δ* cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes. *Traffic* **3**, 560-574
- Hettema EH, Distel B e Tabak HF. (1999) Import of proteins into peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 17-34
- Holroyd C e Erdmann R. (2001) Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Lett* **501**, 6-10
- Hornig JT, Behari R, Burke LE e Baker A. (1995) Investigation of the energy requirement and targeting signal for the import of glycolate oxidase into glyoxysomes. *Eur J Biochem* **230**, 157-163

Huhse B, Rehling P, Albertini M, Blank L, Meller K e Kunau WH. (1998) Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J Cell Biol* **140**, 49-60

D)

Imanaka T, Small GM e Lazarow PB. (1987) Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. *J Cell Biol* **105**, 2915-2922

J)

Jardim A, Liu W, Zheleznova E e Ullman B. (2000) Peroxisomal targeting signal-1 receptor protein PEX5 from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization. *J Biol Chem* **275**, 13637-13644

Jedd G e Chua NH. (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**, 226-231

Johnson MA, Snyder WB, Cereghino JL, Veenhuis M, Subramani S e Cregg JM. (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

Jones JM, Morrell JC e Gould SJ. (2001) Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **153**, 1141-1150

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

K)

Kain KC, Orlandi PA e Lanar DE. (1991) Universal promoter for gene expression without cloning: expression-PCR. *Biotechniques* **10**, 366-374

Kamijo K, Taketani S, Yokota S, Osumi T e Hashimoto T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem* **265**, 4534-4540

Kammerer S, Holzinger A, Welsch U e Roscher AA. (1998) Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p. *FEBS Lett* **429**, 53-60

Klein AT, van den Berg M, Bottger G, Tabak HF e Distel B. (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

Koller A, Snyder WB, Faber KN, Wenzel TJ, Rangell L, Keller GA e Subramani S. (1999) Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* **146**, 99-112

Komeili A e O'Shea EK. (2001) New perspectives on nuclear transport. *Annu Rev Genet* **35**, 341-364

Komori M, Rasmussen SW, Kiel JA, Baerends RJ, Cregg JM, van der Klei IJ e Veenhuis M. (1997) The *Hansenula polymorpha* PEX14 gene encodes a novel peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *EMBO J* **16**, 44-53

Kragler F, Langeder A, Raupachova J, Binder M e Hartig A. (1993) Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**, 665-673

Kunau WH e Erdmann R. (1998) Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr Biol* **8**, R299-R302

Kunau WH. (2001) Peroxisomes: the extended shuttle to the peroxisome matrix. *Curr Biol* **11**, R659-R662

L)

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lambkin GR e Rachubinski RA. (2001) *Yarrowia lipolytica* cells mutant for the peroxisomal peroxin Pex19p contain structures resembling wild-type peroxisomes. *Mol Biol Cell* **12**, 3353-3364

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

Lazarow PB. (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 489-497

Legakis JE e Terlecky SR. (2001) PTS2 protein import into mammalian peroxisomes. *Traffic* **2**, 252-260

Lupas A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-382

M)

Marzioch M, Erdmann R, Veenhuis M e Kunau WH. (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

Matsumura T, Otera H e Fujiki Y. (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

Matsuzono Y, Kinoshita N, Tamura S, Shimozawa N, Hamasaki M, Ghaedi K, Wanders RJ, Suzuki Y, Kondo N e Fujiki Y. (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

Mayer BJ. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* **114**, 1253-1263

Mayerhofer PU, Kattenfeld T, Roscher AA e Muntau AC. (2002) Two splice variants of human PEX19 exhibit distinct functions in peroxisomal assembly. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 1180-1186

McNew JA e Goodman JM. (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes *in vivo*. *J Cell Biol* **127**, 1245-1257

McNew JA e Goodman JM. (1996) The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem Sci* **21**, 54-58

McTigue MA, Williams DR e Tainer JA. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione-S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol* **246**, 21-27

Miura S, Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T e Fujiki Y. (1994) Post-translational import of 3-ketoacyl-CoA thiolase into rat liver peroxisomes *in vitro*. *J Biochem* **115**, 1064-1068

Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T, Ohno K, Miura S e Fujiki Y. (1989) Peroxisome targeting signal of rat liver acyl-coenzyme A oxidase resides at the carboxy terminus. *Mol Cell Biol* **9**, 83-91

Moser HW. (1999) Genotype-phenotype correlations in disorders of peroxisome biogenesis. *Mol Genet Metab* **68**, 316-327

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL e Aubourg P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**, 726-730

Mosser J, Lutz Y, Stoeckel ME, Sarde CO, Kretz C, Douar AM, Lopez J, Aubourg P e Mandel JL. (1994) The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Mol Genet* **3**, 265-271

Muntau AC, Mayerhofer PU, Paton BC, Kammerer S e Roscher AA. (2000) Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G. *Am J Hum Genet* **67**, 967-975

Muntau AC, Roscher AA, Kunau WH e Dodt G. (2003) Interaction of PEX3 and PEX19 visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Adv Exp Med Biol* **544**, 221-224

O)

Okumoto K, Abe I e Fujiki Y. (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

Okumoto K, Itoh R, Shimozawa N, Suzuki Y, Tamura S, Kondo N e Fujiki Y. (1998) Mutations in PEX10 is the cause of Zellweger peroxisome deficiency syndrome of complementation group B. *Hum Mol Genet* **7**, 1399-1405

Otera H, Harano T, Honsho M, Ghaedi K, Mukai S, Tanaka A, Kawai A, Shimizu N e Fujiki Y. (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

Otera H, Okumoto K, Tateishi K, Ikoma Y, Matsuda E, Nishimura M, Tsukamoto T, Osumi T, Ohashi K, Higuchi O e Fujiki Y. (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

Otera H, Setoguchi K, Hamasaki M, Kumashiro T, Shimizu N e Fujiki Y. (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

P)

Passreiter M, Anton M, Lay D, Frank R, Harter C, Wieland FT, Gorgas K e Just WW. (1998) Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatamer. *J Cell Biol* **141**, 373-383

Peterson GL. (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol* **91**, 95-119

Pool MR, Lopez-Huertas E e Baker A. (1998) Characterization of intermediates in the process of plant peroxisomal protein import. *EMBO J* **17**, 6854-6862

Purdue PE, Castro SM, Protopopov V e Lazarow PB. (1996) Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel C-terminal peroxisomal targeting sequence. *Ann N Y Acad Sci* **804**, 775-776

Purdue PE e Lazarow PB. (2001a) Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 701-752

Purdue PE e Lazarow PB. (2001b) Pex18p is constitutively degraded during peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* **276**, 47684-47689

Purdue PE, Yang X e Lazarow PB. (1998) Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* **143**, 1859-1869

R)

Rapp S, Soto U e Just WW. (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

Raymond GV. (2001) Peroxisomal disorders. *Curr Opin Neurol* **14**, 783-787

Reguenga C, Oliveira ME, Gouveia AM, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (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

Rehling P, Skaletz-Rorowski A, Girzalsky W, Voorn-Brouwer T, Franse MM, Distel B, Veenhuis M, Kunau WH e Erdmann R. (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

Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D e Gould SJ (1997) Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* **17**, 445-448

Rottensteiner H, Stein K, Sonnenhol E e Erdmann R. (2003) Conserved function of Pex11p and the novel Pex25p and Pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 4316-4328

S)

Sacksteder KA e Gould SJ. (2000) The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet* **34**, 623-652

Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Liu Y e Gould SJ. (2000) PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* **148**, 931-944

Saidowsky J, Dodt G, Kirchberg K, Wegner A, Nastainczyk W, Kunau WH e Schliebs W. (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

Salomons FA, van der Klei IJ, Kram AM, Harder W e Veenhuis M. (1997) Brefeldin A interferes with peroxisomal protein sorting in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett* **411**, 133-139

Schlendested G, Gudmundsson GH, Boman HG e Zimmermann R. (1990) A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem* **265**, 13960-13968

Schliebs W, Saidowsky J, Agianian B, Dodt G, Herberg FW e Kunau WH. (1999) Recombinant human peroxisomal targeting signal receptor PEX5. Structural basis for interaction of PEX5 with PEX14. *J Biol Chem* **274**, 5666-5673

Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP e Bork P. (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 231-234

Schultz J, Milpetz F, Bork P e Ponting CP. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864

- Shimizu N, Itoh R, Hirono Y, Otera H, Ghaedi K, Tateishi K, Tamura S, Okumoto K, Harano T, Mukai S e Fujiki Y. (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
- Sichting M, Schell-Steven A, Prokisch H, Erdmann R e Rottensteiner H. (2003) Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes. *Mol Biol Cell* **14**, 810-821
- Smith JJ, Marelli M, Christmas RH, Vizeacoumar FJ, Dilworth DJ, Ideker T, Galitski T, Dimitrov K, Rachubinski RA e Aitchison JD. (2002) Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *J Cell Biol* **158**, 259-271
- Snyder WB, Faber KN, Wenzel TJ, Koller A, Luers GH, Rangell L, Keller GA e Subramani S. (1999a) Pex19p interacts with Pex3p and Pex10p and is essential for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* **10**, 1745-1761
- Snyder WB, Koller A, Choy AJ, Johnson MA, Cregg JM, Rangell L, Keller GA e Subramani S. (1999b) Pex17p is required for import of both peroxisome membrane and luminal proteins and interacts with Pex19p and the peroxisome targeting signal-receptor docking complex in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* **10**, 4005-4019
- Snyder WB, Koller A, Choy AJ e Subramani S. (2000) The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* **149**, 1171-1178
- Soto U, Pepperkok R, Ansorge W e Just WW. (1993) Import of firefly luciferase into mammalian peroxisomes *in vivo* requires nucleoside triphosphates. *Exp Cell Res* **205**, 66-75
- Soukupova M, Sprenger C, Gorgas K, Kunau WH e Dodt G. (1999) Identification and characterization of the human peroxin PEX3. *Eur J Cell Biol* **78**, 357-374
- South ST e Gould SJ. (1999) Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol* **144**, 255-266
- South ST, Sacksteder KA, Li X, Liu Y e Gould SJ. (2000) Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* **149**, 1345-1360
- Sparkes IA e Baker A. (2002) Peroxisome biogenesis and protein import in plants, animals and yeasts: enigma and variations? (Review). *Mol Membr Biol* **19**, 171-185
- Stein K, Schell-Steven A, Erdmann R e Rottensteiner H. (2002) Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import. *Mol Cell Biol* **22**, 6056-6069
- Stock D, Leslie AG e Walker JE. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705
- Subramani S. (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 445-478
- Subramani S. (1996) Protein translocation into peroxisomes. *J Biol Chem* **271**, 32483-32486
- Subramani S, Koller A e Snyder WB. (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **69**, 399-418
- Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA e Subramani S. (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* **10**, 3255-3262

T)

Tabak HF, Braakman I e Distel B. (1999) Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol* **9**, 447-453

Tam YY, Torres-Guzman JC, Vizeacoumar FJ, Smith JJ, Marelli M, Aitchison JD e Rachubinski RA. (2003) Pex11-related proteins in peroxisome dynamics: a role for the novel peroxin Pex27p in controlling peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 4089-4102

Terlecky SR, Legakis JE, Hueni SE e Subramani S. (2001) Quantitative analysis of peroxisomal protein import *in vitro*. *Exp Cell Res* **263**, 98-106

Terlecky SR, Nuttley WM, McCollum D, Sock E e Subramani S. (1995) The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *EMBO J* **14**, 3627-3634

Titorenko VI e Rachubinski RA. (1998a) The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* **23**, 231-233

Titorenko VI e Rachubinski RA. (1998b) 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

Titorenko VI e Rachubinski RA. (2001a) The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 357-368

Titorenko VI e Rachubinski RA. (2001b) Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends Cell Biol* **11**, 22-29

Titorenko VI, Ogrydziak DM e Rachubinski RA. (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

Titorenko VI, Smith JJ, Szilard RK e Rachubinski RA. (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

U)

Urquhart AJ, Kennedy D, Gould SJ e Crane DI. (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

V)

van der Klei IJ, Hilbrands RE, Swaving GJ, Waterham HR, Vrieling EG, Titorenko VI, Cregg JM, Harder W e Veenhuis M. (1995) The *Hansenula polymorpha* *PER3* gene is essential for the import of PTS1 proteins into the peroxisomal matrix. *J Biol Chem* **270**, 17229-17236

Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, Aitchison JD e Rachubinski RA. (2004) Pex30p, Pex31p and Pex32p Form a Family of Peroxisomal Integral Membrane Proteins Regulating Peroxisome Size and Number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 665-677

Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Tam YY, Aitchison JD e Rachubinski RA. (2003) YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **161**, 321-332

Voorn-Brouwer T, Kragt A, Tabak HF e Distel B. (2001) Peroxisomal membrane proteins are properly targeted to peroxisomes in the absence of COPI- and COPII-mediated vesicular transport. *J Cell Sci* **114**, 2199-2204

W)

Walton PA, Gould SJ, Feramisco JR e Subramani S. (1992) Transport of microinjected proteins into peroxisomes of mammalian cells: inability of Zellweger cell lines to import proteins with the SKL tripeptide peroxisomal targeting signal. *Mol Cell Biol* **12**, 531-541

Walton PA, Hill PE e Subramani S. (1995) Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* **6**, 675-683

Walton PA, Wendland M, Subramani S, Rachubinski RA e Welch WJ. (1994) Involvement of 70-kD heat-shock proteins in peroxisomal import. *J Cell Biol* **125**, 1037-1046

Waterham HR e Cregg JM. (1997) Peroxisome biogenesis. *Bioessays* **19**, 57-66

Weller S, Gould SJ e Valle D. (2003) Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **4**, 165-211

Wendland M e Subramani S. (1993) Cytosol-dependent peroxisomal protein import in a permeabilized cell system. *J Cell Biol* **120**, 675-685

Will GK, Soukupova M, Hong X, Erdmann KS, Kiel JA, Dodt G, Kunau WH e Erdmann R. (1999) Identification and characterization of the human orthologue of yeast Pex14p. *Mol Cell Biol* **19**, 2265-2277

Y)

Yahraus T, Braverman N, Dodt G, Kalish JE, Morrell JC, Moser HW, Valle D e Gould SJ. (1996) The peroxisome biogenesis disorder group 4 gene, PXAAA1, encodes a cytoplasmic ATPase required for stability of the PTS1 receptor. *EMBO J* **15**, 2914-2923

Z)

Zhang JW e Lazarow PB. (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