

ALEXANDRA MARIA MONTEIRO GOUVEIA

**CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR PEROXISSOMAL PEX5P.
DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE IMPORTAÇÃO
PROTEICA *IN VITRO***

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO-2003**

ALEXANDRA MARIA MONTEIRO GOUVEIA

**CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR PEROXISSOMAL PEX5P.
DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE IMPORTAÇÃO
PROTEICA *IN VITRO***

**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**

*Pela generosidade infinita
E apoio incondicional*

Para os meus pais, tia R. e irmãs

*Por inventares a alegria
Descobrires as rosas
Multiplicares os beijos*

Para o Paulo

ÍNDICE

PRECEITOS LEGAIS	1
AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	4
ABSTRACT	6
RÉSUMÉ	8
ABREVIATURAS	10
1. INTRODUÇÃO TEÓRICA	12
1.1. O peroxissoma: estrutura e função	13
1.2. As doenças peroxissomais	16
1.2.1. Doenças resultantes da deficiência numa única actividade enzimática	16
1.2.2. Doenças da biogénese peroxissomal	17
1.3. A biogénese peroxissomal	20
1.3.1. Biossíntese da membrana peroxissomal	20
1.3.2. Proliferação peroxissomal	22
1.3.3. O modelo da biogénese peroxissomal	23
1.3.4. Importação das proteínas da matriz do peroxissoma: os sinais de endereçamento	25
1.3.5. Caracterização dos receptores Pex5p e Pex7p	26
1.3.5.1. O receptor Pex5p	26
1.3.5.2. O receptor Pex7p	31
1.3.6. O processo de importação peroxissomal: abordagens experimentais	32
1.3.7. Importação de proteínas da matriz do peroxissoma	35
1.3.7.1. O processo de <i>Docking</i>	36
1.3.7.2. O processo de Translocação	38
1.3.7.3. O processo de reciclagem dos receptores	39
1.3.8. Modelo de importação de proteínas da matriz do peroxissoma	40
2. OBJECTIVOS	42
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	44
3.1. Isolamento de fracções subcelulares de fígado de rato	45
3.2. Extracção salina de proteínas peroxissomais	46
3.3. Isolamento e purificação de membranas peroxissomais	46

3.4. Centrifugação em gradiente de sacarose	47
3.5. <i>Protease Protection Assays</i>	48
3.6. Digestão de proteínas com a protease Genenase I	48
3.7. Isolamento de RNA e RT-PCR	48
3.8. Proteínas de fusão e péptidos	49
3.9. Produção de anticorpos	51
3.9.1. Anticorpo anti-Pex5p	51
3.9.2. Anticorpo anti-Pex12p	52
3.9.3. Anticorpo anti-Pex13p	52
3.9.4. Outros anticorpos	53
3.10. Síntese de proteínas marcadas radioativamente com [³⁵ S]Met	53
3.11. Importação <i>in vitro</i> da ³⁵ S-Pex5p para o peroxissoma	54
3.12. Centrifugação em gradiente de Nycodenz	55
3.13. Imunoprecipitação da Pex5p importada <i>in vitro</i>	55
3.14. Electroforeses	56
3.14.1. Electroforeses de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	56
3.14.2. Electroforeses em gel de poliacrilamida não desnaturante	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Caracterização da Pex5p peroxissomal	60
4.1.1. Localização subcelular da Pex5p	60
4.1.2. Topologia membranar da Pex5p peroxissomal	63
4.1.3. Análise da massa molecular aparente da Pex5p no estado nativo	67
4.2. Caracterização do sistema de importação <i>in vitro</i> da Pex5p	69
4.2.1. Determinação da dependência energética do sistema de importação <i>in vitro</i> e da topologia membranar da Pex5p importada <i>in vitro</i>	70
4.2.2. Especificidade organelar do sistema de importação <i>in vitro</i> da Pex5p	73
4.2.3. Inibição do processo de importação <i>in vitro</i> da ³⁵ S-Pex5p utilizando a GST-Pex5p _{FL}	76
4.2.4. Inter-relação entre as etapas 2 e 3 do mecanismo de importação <i>in vitro</i> da Pex5p	77
4.2.5. Análise do processo de saída da Pex5p do peroxissoma	79
4.2.6. Caracterização do processo de inserção da Pex5p na membrana peroxissomal	81
4.2.7. Determinação da dependência de carga (proteínas com PTS1) na importação da Pex5p	83
4.2.8. Importação <i>in vitro</i> de versões truncadas da Pex5p	86

5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	98
7. BIBLIOGRAFIA	102

PRECEITOS LEGAIS

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

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

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

Gouveia AM, Guimarães CP, Oliveira ME, Reguenga C, Sá-Miranda C e Azevedo JE. (2003) 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. (2003) Insertion of Pex5p into the peroxisomal membrane is cargo protein-dependent. *J Biol Chem* **278**, 4389-4392

AGRADECIMENTOS

O trabalho realizado no âmbito do projecto de doutoramento foi desenvolvido maioritariamente na Unidade da Biologia do Lisossoma e Peroxissoma do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto. Uma pequena fracção do trabalho foi realizada no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto. Às instituições referidas, os meus agradecimentos relativamente às instalações e ferramentas de trabalho disponibilizadas. Gostaria também de agradecer ao Departamento de Farmacologia e ao Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar pela cedência permanente e indispensável de animais, necessários para a realização de várias experiências.

Às pessoas que constituem a Unidade da Biologia do Lisossoma e do Peroxissoma e que me acompanharam ao longo do percurso desenvolvido no meu doutoramento, obrigada pela simpatia, amizade e incentivos permanentes. Particularmente, gostaria de sublinhar o apoio e colaboração laboratorial das pessoas que fazem ou fizeram parte do nosso grupo de investigação, nomeadamente ao Prof. Doutor Jorge Azevedo, à Doutora Clara Sá-Miranda, Doutor Carlos Reguenga, Dr.^a Márcia Oliveira, Dr.^a Carla Guimarães e Dr. João Rodrigues. Especialmente, gostaria de agradecer à Doutora Clara Sá-Miranda a disponibilidade e atenção dispensadas assim como os esforços realizados para que todas as necessidades laboratoriais fossem satisfeitas e ao Prof. Doutor Jorge Azevedo pelo empenho e acompanhamento incansável ao longo dos últimos quatro anos. A transmissão de inúmeros conhecimentos científicos, assim como a discussão e interpretação pormenorizada de cada experiência foram determinantes para a obtenção dos resultados e elaboração do trabalho que é apresentado nesta tese.

Gostaria também de agradecer à Comissão de Acompanhamento do meu trabalho de doutoramento, constituída pelo Prof. Doutor Cláudio Sunkel, Prof. Doutora Rosário Almeida e Prof. Doutor Pedro Moradas Ferreira, pela disponibilidade prestada.

Finalmente, os meus agradecimentos à Fundação para a Ciência e Tecnologia pela bolsa de doutoramento concedida (PRAXIS XXI/BD/20043/99) e, juntamente com a

Fundação Calouste Gulbenkian, pelos subsídios que possibilitaram a minha presença em variados congressos nacionais e internacionais, que tanto enriqueceram a minha formação pós-graduada. Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projectos PRAXIS XXI/2/2.1/SAU/1345/95 e POCTI/1999/BME/34648, financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

RESUMO

Segundo o modelo de biogénese peroxissomal actualmente aceite, a Pex5p, o receptor para a maior parte das proteínas da matriz do peroxissoma, circula entre o citosol e o organelo. Pensa-se que este movimento intracelular da Pex5p está associado ao transporte de proteínas sintetizadas *de novo* para a matriz do peroxissoma. No entanto, não existe nenhuma evidência directa que sustente esta hipótese.

A Pex5p apresenta assim uma dupla localização subcelular. Neste trabalho, determinou-se que cerca de 85% da proteína de fígado de rato se encontra no citosol e que os restantes 15% encontram-se associados ao peroxissoma. A população de Pex5p peroxissomal representa cerca de 0.06% da proteína total do organelo e apresenta todas as características de uma proteína intrínseca de membrana. Por centrifugação em gradiente de densidade, verificou-se que a Pex5p citosólica comporta-se como uma proteína monomérica, enquanto que a Pex5p peroxissomal parece fazer parte de um complexo proteico com cerca de 250 kDa.

A análise da topologia da Pex5p peroxissomal revelou que a Pex5p é uma proteína transmembranar, com cerca de 2 kDa do N-terminal expostos para o citosol. No entanto, a maior parte da cadeia polipeptídica da proteína está exposta no lado matricial da membrana do peroxissoma. Verificou-se ainda que a forte interacção da Pex5p com a membrana peroxissomal não depende dos domínios citosólicos da Pex13p.

O desenvolvimento de um sistema de importação *in vitro* da Pex5p, especificamente para os peroxissomas, revelou que a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal é bloqueada pela presença de IgGs anti-Pex14p e que existem duas populações de Pex5p em associação com a Pex14p (denominadas etapas 2 e 3 da Pex5p). A Pex5p na etapa 3 é detectada em condições limitantes no que diz respeito ao nível de ATP. Na presença de ATP, esta forma da Pex5p sai rapidamente do peroxissoma, predominando a Pex5p na etapa 2.

Utilizando este sistema de importação *in vitro* verificou-se também que a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal é dependente da presença de proteínas a serem endereçadas para a matriz do organelo. Por outro lado, a maquinaria de *docking/translocação* ao nível da membrana peroxissomal é também capaz de aceitar como substrato versões truncadas da Pex5p, versões estas que não possuem o domínio de ligação às proteínas com destino à matriz do peroxissoma.

Os resultados sugerem fortemente que a translocação das proteínas peroxissomais através da membrana do organelo ocorre concomitantemente com a formação do complexo membranar Pex5p-Pex14p. Os dados obtidos indicam ainda que é directamente deste complexo proteico, contendo a Pex14p, que a Pex5p retorna ao citosol. Finalmente, as observações realizadas utilizando versões truncadas da Pex5p em experiências de importação *in vitro* sugerem que o movimento da Pex5p entre o citosol e o peroxissoma é directa ou indirectamente regulado pelo próprio receptor e não pela maquinaria de *docking/translocação* peroxissomal.

ABSTRACT

According to the current model of peroxisomal biogenesis, Pex5p, the receptor for the majority of the peroxisomal matrix proteins, cycles between the cytosol and the organelle. This Pex5p intracellular trafficking is coupled to the transport of newly synthesized proteins to the peroxisomal matrix. However, direct evidence supporting this hypothesis was never provided.

As a consequence of the Pex5p cycling, this protein presents a dual subcellular location. In the present work, we have determined that about 85% of rat liver Pex5p is cytosolic and the remaining 15% is found in association with the peroxisome. The peroxisomal Pex5p represents 0.06% of the total peroxisomal protein and displays all the characteristics of an intrinsic membrane protein. Density gradient centrifugation experiments showed that cytosolic Pex5p behaves as a monomeric protein, while peroxisomal Pex5p seems to be part of a 250 kDa protein complex.

Membrane topology assays revealed that peroxisomal Pex5p is a transmembrane protein that exposes about 2 kDa of its N-terminus into the cytosol. However the bulky part of the protein is localised at the peroxisomal lumen. The strong interaction established between Pex5p and the peroxisomal membrane is not dependent on the Pex13p cytosolic domains.

The developing of a Pex5p cell-free *in vitro* import system, specifically to peroxisomes, revealed that Pex5p insertion into the peroxisomal membrane is blocked by anti-Pex14p IgGs. Also, two Pex14p associated populations of Pex5p could be resolved (stage 2 and stage 3 Pex5p). Stage 3 Pex5p is only detected under ATP limiting conditions. In the presence of ATP, it leaves the peroxisome rapidly and, in this condition, stage 2 Pex5p predominates.

Using this *in vitro* peroxisomal import system, it was possible to show that Pex5p insertion into the peroxisomal membrane requires the presence of cargo-proteins in the

cytosol. Surprisingly, the peroxisomal membrane *docking/translocation* machinery is also able to import C-terminal truncated Pex5p molecules lacking the cargo-binding domains.

The results strongly suggest that translocation of peroxisomal matrix proteins across the membrane of the organelle occurs concomitantly with formation of the Pex5p-Pex14p membrane complex, which is also probably related with Pex5p released from the peroxisome. Finally, the data obtained from the *in vitro* import assays using the Pex5p truncated versions also suggest that Pex5p cycling between cytosol and peroxisome is directly or indirectly regulated by the receptor itself and not by the *docking/translocation* peroxisomal machinery.

RÉSUMÉ

Selon le modèle de la biogénèse péroxyssomelle actuellement établi, la Pex5p, le récepteur pour la majorité des protéines de la matrice du péroxyssome, circule entre le cytosol et l'organelle. Ce mouvement intracellulaire de la Pex5p est souvent associé au transport des protéines synthétisées *de novo* dans la matrice du péroxyssome. Cependant, il n'existe aucune démonstration directe qui appuie cette hypothèse.

La Pex5p présente ainsi une double localisation subcellulaire. Dans ce travail, on a déterminé qu'environ 85% de la Pex5p de foie de rat se trouvent dans le cytosol et les restants 15% se trouvent associés au péroxyssome. La population de Pex5p péroxyssomelle représente environ 0.06% de la protéine totale de l'organelle et possède toutes les caractéristiques d'une protéine intrinsèque de membrane. Des expériences de centrifugation de gradient de densité révèlent que la Pex5p cytosolique se comporte comme une protéine monomérique, alors que la Pex5p péroxyssomelle paraît faire partie d'un complexe protéique de 250 kDa.

Des études de topologie membranaire révèlent que la Pex5p péroxyssomelle est une protéine transmembranaire, avec environ 2 kDa de son N-terminal exposés au cytosol. Néanmoins, la plupart de la chaîne polypeptidique de la protéine se trouve exposée à la matrice du péroxyssome. On a aussi vérifié que la forte interaction entre la Pex5p et la membrane péroxyssomelle ne dépend pas des domaines cytosoliques de la Pex13p.

Le développement d'un système d'import *in vitro* de la Pex5p, spécifiquement vers le péroxyssome, a permis de démontrer que l'insertion de la Pex5p dans la membrane péroxyssomelle est bloquée par la présence de IgGs anti-Pex14p et qu'il existe deux populations de Pex5p en association avec la Pex14p (dénommées étapes 2 et 3 de la Pex5p). La Pex5p à l'étape 3 est seulement détectée dans des conditions où le niveau d'ATP est limitant. En présence d'ATP, cette population de Pex5p quitte rapidement le péroxyssome, prédominant dans cette condition la Pex5p à l'étape 2.

A partir de ce système d'import *in vitro*, on a aussi vérifié que l'insertion de la Pex5p dans la membrane péroxyssomelle est dépendant de la présence de protéines qui doivent être délivrées dans la matrice de l'organelle. De plus, la machinerie de *docking/translocation* au niveau de la membrane péroxyssomelle est aussi capable de recevoir comme substrat des versions altérées de la Pex5p, celles-ci ne possuant pas le domaine de liaison aux protéines à transporter dans la matrice du péroxyssome.

Nos résultats suggèrent grandement que la translocation des protéines péroxyssomelle occur simultanément avec la formation du complexe membranair Pex5p-Pex14p. Les résultats obtis suggèrent aussi que c'est à partir directement de ce complexe protéique, contenant la Pex14p, que la Pex5p retourne vers le cytosol. Finalement, les observations réalisées utilisant des versions altérées de la Pex5p dans des expériences d'import *in vitro*, suggèrent que le mouvement de la Pex5p entre le cytosol et le péroxyssome est directement ou indirectement régulé par le prôpre récepteur et non à travers de la machinerie péroxyssomelle de *docking/translocation*.

ABREVIATURAS

AAA ATPase	ATPases associadas a diversas actividades celulares
ALDP	Proteína da adrenoleucodistrofia
AMP-PNP	Adenosina 5'-(β,γ -imino)trifosfato
ATP	Adenosina trifosfatada
ATP γ S	Adenosina 5'-(3-tiotrifosfato)
BSA	Albumina sérica bovina
CG	Grupo de complementação
Co	Coenzima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GST	Glutathione S-transferase
Hsp	Proteína de choque térmico
IgGs	Imunoglobulinas G
IRD	Doença Infantil de Refsum
MBP	Proteína de ligação à maltose
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mPTS	Sinal de endereçamento de proteínas da membrana peroxissomal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD ⁺	β -Nicotinamida-adenina dinucleótido
NADP ⁺	β -Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NALD	Adrenoleucodistrofia neonatal
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PAS	Proteína A-Sepharose [®]
PBD	Doença da biogénese peroxissomal
PBS	Tampão salino de fosfato
Pex	Peroxina

PK	Proteinase K
PMP	Proteína intrínseca da membrana do peroxissoma
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PNS	Sobrenadante pós-nuclear
PTS1	Sinal de endereçamento peroxissomal do tipo 1
PTS2	Sinal de endereçamento peroxissomal do tipo 2
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
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TPR	Repetições tetratricopeptídicas
TX-100	Triton X-100
VLCFAS	Ácidos gordos de cadeia muito longa
X-ALD	Adrenoleucodistrofia associada ao cromossoma X
WD-40	Domínio de 40 aminoácidos contendo o motivo triptofano-aspartato
ZS	Síndrome de Zellweger

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. O peroxissoma: estrutura e função

Os peroxissomas são organelos intracelulares, delimitados por uma única membrana e presentes em quase todas as células eucarióticas (Lazarow e Fujiki, 1985). De uma forma geral, uma célula humana contém entre cem a mil peroxissomas (Lazarow e Fujiki, 1985; Chang *et al.*, 1999a). Os peroxissomas possuem entre 0.1 a 1 μm de diâmetro e normalmente surgem como estruturas circulares ou ovóides, embora a sua morfologia possa ser mais complexa (Gorgas, 1984; Fahimi *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 1996; Espeel *et al.*, 1997; Schrader *et al.*, 1998a; Fahimi e Baumgart, 1999; Schrader *et al.*, 2001) (Figura 1).

Os peroxissomas e outros dois organelos relacionados, os glioxissomas de plantas (Briedenbach e Beevers, 1967) e os glicossomas de certos parasitas (Opperdoes e Borst, 1977), formam uma classe de organelos inicialmente denominada por microcorpos (Rhodin, 1954). Os dados bioquímicos que sugerem uma evolução comum para os peroxissomas, glioxissomas e glicossomas, surgiram com a descoberta das enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos gordos, que se encontram presentes nos três organelos (Cooper e Beevers, 1969; Lazarow e De Duve, 1976; Opperdoes, 1987).

A caracterização bioquímica dos peroxissomas iniciou-se com o trabalho de De Duve que definiu o peroxissoma como um organelo que contém oxidases que geram peróxido de hidrogénio e a enzima catalase que o decompõe a água e oxigénio (De Duve e Baudhuin, 1966). Para além das oxidases e da catalase, a matriz do peroxissoma contém mais de 50 enzimas diferentes, apresentando uma concentração proteica de aproximadamente 200 a 300 $\mu\text{g/ml}$ (Michels, 1989; Opperdoes e Michels, 1993). Algumas proteínas existem em concentrações tão elevadas no interior do organelo que cristalizam, provocando a formação de inclusões proteicas denominadas cristalóides (Veenhuis *et al.*, 1981; Fahimi *et al.*, 1993) (Figura 1B).

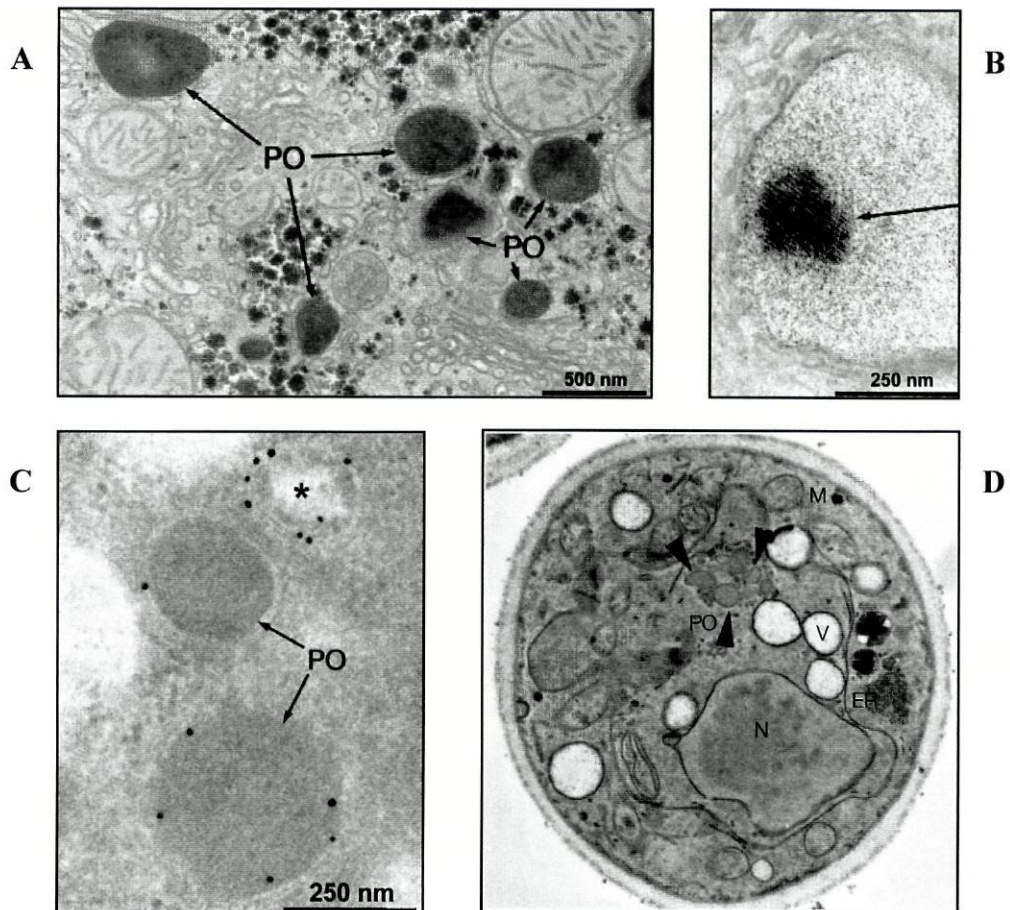


Figura 1. Morfologia do peroxissoma por microscopia electrónica.

A. Peroxissomas de fígado de rato (PO) marcados com diaminobenzidina, que detecta a actividade da catalase. **B.** Peroxissoma de fígado de rato mostrando a localização da enzima urato oxidase pela técnica do cério. **C.** Marcação, com anticorpos anti-PMP70, de peroxissomas (PO) e de uma estrutura membranar (*) de fígado de um rato tratado com uma droga hipocolesterolémica que induz a proliferação da membrana peroxissomal sem aumento correspondente da síntese de proteínas matriciais (Baumgart *et al.*, 1989, Baumgart *et al.*, 1990). As estruturas membranares são semelhantes aos *ghosts* observados em células de doentes com doenças da biogénese peroxissomal (Espeel *et al.*, 1995) (ver secção 1.2.2). **D.** Célula de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando um grupo de peroxissomas (PO), vacúolos (V), retículo endoplasmático (ER), mitocôndria (M) e núcleo (N). A, B e C-extraídas de Fahimi e Baumgart, 1999. D-extraída de Gould e Collins, 2002.

As enzimas peroxissomais participam numa variedade de processos metabólicos, muitos dos quais envolvendo lípidos. Nos mamíferos, duas das funções peroxissomais mais importantes compreendem a β -oxidação de ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCFAs) e a decomposição do peróxido de hidrogénio (Lazarow e De Duve, 1976; Kunau *et al.*, 1995; Wanders *et al.*, 2001). A nível catabólico, os peroxissomas são ainda responsáveis pela degradação de aminoácidos, purinas, prostaglandinas e poliaminas e pela

α -oxidação de ácidos gordos. Os peroxissomas estão também envolvidos na biossíntese de plasmalogénios, colesterol, ácidos biliares e ácidos gordos poli-insaturados (Wanders *et al.*, 2001).

Os peroxissomas são organelos muito frágeis, cuja membrana é facilmente quebrada durante um processo de isolamento e purificação (Subramani, 1998). A membrana do peroxissoma apresenta uma constituição típica de uma endomembrana, com 6.5-7 nm de espessura e com uma razão fosfolípido/proteína de 140-200 nmol/mg (Lazarow, 1984). Os fosfolípidos presentes na membrana peroxissomal são basicamente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Fujiki *et al.*, 1982a; Lazarow e Fujiki, 1985).

Actualmente, a permeabilidade da membrana peroxissomal constitui uma questão controversa, ainda por resolver. Os primeiros resultados obtidos revelaram que a membrana peroxissomal era permeável a pequenos solutos, o que sugere a presença de um poro formado por proteínas da membrana peroxissomal (De Duve e Baudhuin, 1966; Van Veldhoven *et al.*, 1983; Van Veldhoven *et al.*, 1987; Verleur e Wanders, 1993; Sulter *et al.*, 1993). No entanto, mais recentemente, tem sido defendido por alguns investigadores que a membrana peroxissomal é impermeável a pequenos metabolitos incluindo o NAD^+ , acetil-CoA, NADP^+ e CoA, o que proporciona um ambiente enzimático e químico específico dentro dos peroxissomas (van Roermund *et al.*, 1995; van Roermund *et al.*, 1998; Henke *et al.*, 1998; Geisbrecht *et al.* 1999; Jones *et al.*, 1999). Também os dados descritos até ao momento sobre o pH da matriz peroxissomal são totalmente contraditórios. Em fibroblastos de pele humana, dois grupos publicaram resultados inconciliáveis para o valor de pH da matriz peroxissomal: um grupo obteve um pH alcalino (pH aproximadamente de 8.2) (Dansen *et al.*, 2000) e o outro grupo um pH neutro (semelhante ao citosólico), possível de ser alterado rapidamente por alterações do pH citosólico (Jankowski *et al.*, 2001).

1.2. As doenças peroxissomais

A importância do peroxissoma no metabolismo e desenvolvimento humano é ilustrada pela existência de inúmeras doenças causadas por disfunções ao nível deste organelo. As doenças peroxissomais estão divididas em dois grandes grupos: as que derivam da deficiência de uma única actividade enzimática e as doenças da biogénese peroxissomal (PBD), que implicam a deficiência das actividades enzimáticas de um grupo, ou mesmo da totalidade, das proteínas peroxissomais.

1.2.1. Doenças resultantes da deficiência numa única actividade enzimática

Muitas destas doenças são causadas por deficiências em proteínas envolvidas no metabolismo de lípidos. A doença mais comum deste grupo é a adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD), causada por mutações na proteína ALDP, uma proteína da membrana peroxissomal (PMP) pertencente à família dos transportadores *ATP-binding cassette* (Mosser *et al.*, 1993; Mosser *et al.*, 1994). A X-ALD é bioquimicamente caracterizada pela acumulação de VLCFAs no plasma e tecidos, razão pela qual a ALDP é considerada um transportador membranar de lípidos (Moser *et al.*, 2001). Outras doenças têm sido caracterizadas e encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Doenças resultantes da deficiência de uma única actividade enzimática^{a)}

<i>Doenças</i>	<i>Proteína afectada</i>
- Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X	ALDP
- Deficiência na Acil coenzima A oxidase	Acil-CoA oxidase
- Deficiência na malonil-CoA descarboxilase	Malonil-CoA descarboxilase
- Acidúria Mevalónica	Mevalonato cinase
- Acidúria Glutárica tipo 3	Glutaril-CoA oxidase
- Deficiência na enzima Multifuncional (enzima D- bifuncional)	Domínio Enoil-CoA hidratase da enzima D-bifuncional
- Deficiência na β -oxidação	Enzima D-bifuncional
- Condrodisplasia rizomélica punctata (RCDP) tipo 2	Diidroxiaconafosfato aciltransferase
- RCDP tipo 3	Alquil-Diidroxiaconafosfato sintetase
- Doença Adulta de Refsum	Fitanoil-CoA hidroxilase
- Hiperoxalúria tipo I	Alanina-glioxilato amino transferase
- Acatalasemia	Catalase

^{a)} Adaptado de Subramani *et al.*, 2000

1.2.2. Doenças da biogénese peroxissomal

As doenças da biogénese peroxissomal são um grupo de doenças autossómicas recessivas caracterizadas por alterações numa das várias proteínas peroxissomais envolvidas na biogénese do organelo. Estas proteínas são denominadas de peroxinas (Pex) e são codificadas por genes PEX.

O estudo das doenças da biogénese peroxissomal tem contribuído significativamente para a compreensão dos mecanismos de formação, crescimento e divisão do peroxissoma. Os estudos iniciais destas doenças foram realizados por análises de fusão celular de fibroblastos de doentes que permitiram identificar 12 grupos de complementação (CG) diferentes e, em 11 deles, o gene mutado (Gould *et al.*, 2001) (Tabela 2). Onze dos grupos de complementação estão associados a fenótipos como o síndrome de Zellweger (ZS), a adrenoleucodistrofia neonatal (NALD) e a doença

infantil de Refsum (IRD). Defeitos no mesmo gene podem ter como consequência diferentes fenótipos, sendo o ZS o mais severo, a IRD o menos e a NALD de severidade intermédia. Em contraste, o fenótipo condrodysplasia rizomélica punctata (RCDP) está associada apenas ao grupo de complementação 11, com defeito na Pex7p (Braverman *et al.*, 1997; Purdue *et al.*, 1997; Motley *et al.*, 1997).

Este tipo de doenças difere das doenças resultantes da deficiência de uma única actividade enzimática pelo facto destas últimas apresentarem peroxissomas com uma estrutura intacta e os defeitos bioquímicos estarem geralmente confinados às reacções catalisadas pela enzima mutada. Em células da maior parte dos doentes com PBD foram detectados umas estruturas peroxissomais, denominadas de *ghosts*, caracterizadas por possuírem apenas uma estrutura membranar normal, desprovida de todo o conteúdo proteico matricial. Estes *ghosts* surgem em menor quantidade que o número habitual de peroxissomas, mas apresentam um tamanho maior que os organelos normais (Santos *et al.*, 1988a; Santos *et al.*, 1988b). Os doentes com PBD que apresentam este fenótipo celular, que indica uma deficiência nos genes que codificam proteínas envolvidas na importação de proteínas da matriz peroxisomal, compreendem 9 dos doze grupos de complementação conhecidos (Tabela 2). Recentemente, foram identificados alguns doentes com PBD que apresentam células onde não são detectadas quaisquer tipos de estruturas peroxissomais (Shimozawa *et al.*, 1998; Honsho *et al.*, 1998; South e Gould, 1999; Matsuzono *et al.*, 1999; South *et al.*, 2000; Sacksteder *et al.*, 2000). Sugeriu-se que os genes deficientes nestes doentes codificam proteínas envolvidas na importação de PMPs e/ou na síntese da membrana peroxisomal. A ausência de estruturas peroxissomais verifica-se apenas em 3 grupos de complementação (CG 9, 12 e 14) (ver Tabela 2).

Tabela 2. Peroxinas e doenças da biogénese peroxissomal^{a)}

<i>Peroxina</i>	<i>CG</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Características</i>
Pex1p	1	ZS, NALD, IRD	AAA ATPase necessária para a importação de proteínas matriciais ou fusão vesicular; interactua com a Pex6p
Pex2p	10	ZS, IRD	PMP com domínio C3CH4 de ligação ao zinco necessária para importação de proteínas matriciais; interactua com a Pex10p
Pex3p	12	ZS	PMP necessária para a biogénese membranar; interactua com a Pex19p
Pex4p	nd		Enzima associada à ubiquitina necessária para a importação de proteínas matriciais; interactua com a Pex22p
Pex5p	2	ZS, NALD, IRD	Receptor para proteínas contendo PTS1, mediando a sua importação; apresenta motivos TPR; interactua também com a Pex7p, Pex8p, Pex10p, Pex12p, Pex13p e Pex14p
Pex6p	4	ZS, NALD	AAA ATPase necessária para a importação de proteínas matriciais ou fusão vesicular; interactua com a Pex1p
Pex7p	11	RCDP	Receptor para proteínas contendo PTS2, mediando a sua importação; apresenta motivos WD-40; interactua também com a Pex5p, Pex13p, Pex14p, Pex18p e Pex21
Pex8p	nd		PMP envolvida na importação proteica; interactua com a Pex5p
Pex9p	nd		PMP intrínseca de membrana
Pex10p	7	ZS, NALD	PMP com domínio C3CH4 de ligação ao zinco necessária para a importação proteica; interactua com a Pex2p, Pex12p e Pex19p
Pex11p^{b)}	nd		PMP envolvida na proliferação peroxissomal; interactua com a Pex19p
Pex12p	3	ZS, NALD, IRD	PMP, com domínio C3CH4 de ligação ao zinco, necessária para importação proteica; interactua com a Pex5p, Pex10p e Pex19p
Pex13p	13	ZS, NALD	PMP com domínio SH3; proteína <i>docking</i> para os receptores Pex5p e Pex7p; interactua também com a Pex14p e Pex19p
Pex14p	nd		Proteína <i>docking</i> para os receptores Pex5p e Pex7p; interactua também com a Pex13p, Pex17p e Pex19p
Pex15p	nd		PMP identificada apenas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pex16p	9	ZS	PMP envolvida na biogénese membranar; interactua com a Pex19p
Pex17p	nd		PMP necessária para a importação de proteínas matriciais; interactua com a Pex14p e Pex19p
Pex18p	nd		Proteína necessária para a importação de proteínas contendo PTS2; interactua com a Pex7p
Pex19p	14	ZS	Proteína envolvida na importação de PMPs
Pex20p	nd		Proteína envolvida na oligomerização e endereçamento da tiolase
Pex21p	nd		Proteína necessária para a importação de proteínas contendo PTS2; interactua com a Pex7p
Pex22p	nd		PMP necessária para a importação proteica sendo a proteína de <i>docking</i> membranar para a Pex4p; interactua também com a Pex19p
Pex23p	nd		Identificada apenas em <i>Yarrowia lipolytica</i>
Pex24p ^{c)}	nd		Identificada apenas em <i>Yarrowia lipolytica</i>
Pex25p ^{d)}	nd		Identificada em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Djp1	nd		Proteína semelhante à Dnaj, necessária para a importação de proteínas matriciais

Peroxinas a negrito- identificadas em mamíferos; nd- não determinado. ^{a)}Adaptado de Sacksteder e Gould, 2000; Purdue e Lazarow, 2001 ^{b)}Em mamíferos existem 3 isoformas desta peroxina: a Pex11 α , β e γ (Li *et al.*, 2002) ^{c)}Tam e Rachubinski, 2002 ^{d)}Smith *et al.*, 2002.

1.3. A biogénese Peroxissomal

Vários modelos explicativos da formação dos peroxissomas têm sido elaborados ao longo do tempo. Inicialmente assumiu-se que os peroxissomas derivavam do retículo endoplasmático (RE). Estudos de microscopia electrónica mostrando uma proximidade física entre a membrana peroxissomal e o retículo endoplasmático apoiaram esta teoria (Novikoff e Shin, 1964). No entanto, este modelo foi colocado em causa com a observação de que todas as proteínas da matriz e da membrana do peroxissoma são codificadas por genes nucleares, sintetizadas em polissomas livres no citosol e importadas para o peroxissoma pós-traducionalmente (Fujiki *et al.*, 1984; Lazarow e Fujiki, 1985; Imanaka *et al.*, 1996). Assim, desde 1985, a denominada teoria de crescimento e divisão tem sido maioritariamente aceite para explicar a origem do peroxissoma (Lazarow e Fujiki, 1985). O modelo sugere que novos peroxissomas surgem por divisão e fissão de outros já existentes e que posteriormente importam componentes adicionais da matriz e da membrana peroxissomal. Recentemente, colocou-se a hipótese de existir outra via de formação dos peroxissomas, face à evidência de que os peroxissomas podem surgir *de novo* na ausência de peroxissomas pré-existentes (South e Gould, 1999; Matsuzono *et al.*, 1999; South *et al.*, 2000; Sacksteder *et al.*, 2000).

1.3.1. Biossíntese da membrana peroxissomal

Os fosfolípidos presentes na membrana peroxissomal são sintetizados no retículo endoplasmático e posteriormente enviados para o peroxissoma (Lazarow e Fujiki, 1985). Embora o tráfego intracelular dos lípidos da membrana peroxissomal não seja ainda bem conhecido, foi sugerido que o transporte até ao peroxissoma é mediado por vesículas (Lazarow e Fujiki, 1985; Purdue e Lazarow, 2001).

Três peroxinas têm sido envolvidas nos primeiros passos da biogénese peroxissomal: a Pex3p, Pex16p e Pex19p. Tem sido sugerido que estas peroxinas participam no recrutamento de lípidos e proteínas para inicialmente formarem a membrana peroxissomal. Uma das evidências para esta função surge da análise de

células deficientes nas peroxinas Pex3p, Pex16p ou Pex19p onde não se detectam quaisquer estruturas peroxissomais e as PMPs sintetizadas no citosol são rapidamente degradadas ou endereçadas para outros organelos (Honsho *et al.*, 1998; South e Gould, 1999; Matsuzono *et al.*, 1999; South *et al.*, 2000; Sacksteder *et al.*, 2000).

A Pex19p apresenta uma dupla localização subcelular, muito semelhante à dos receptores para as proteínas matriciais. Cerca de 95% da proteína é citoplasmática e 5% encontra-se associada ao peroxissoma (Snyder, 1999; Sacksteder *et al.*, 2000). Interações entre a Pex19p e diversas proteínas da membrana do peroxissoma têm sido identificadas, nomeadamente com as peroxinas Pex3p, Pex10p, Pex12p, Pex13p, Pex14p, Pex16p e Pex17p, com as proteínas envolvidas na proliferação peroxissomal Pex11 α e Pex11 β , com transportadores como a PMP34, PMP70, ALDP e uma proteína relacionada com a ALDP, a ALDR, e ainda com a PMP22 e PMP24 (Sacksteder *et al.*, 2000; Gloeckner *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2000; Fransen *et al.*, 2001). Estas evidências sugerem o envolvimento directo da Pex19p no tráfego de proteínas membranares para o peroxissoma. Possivelmente, a Pex19p funciona como um receptor citosólico para as PMPs, sendo a fracção peroxissomal desta peroxina um intermediário cinético envolvido na inserção das PMPs na membrana peroxissomal.

O esclarecimento do papel da Pex19p, como receptor de PMPs, está directamente relacionado com a identificação do sinal de endereçamento das proteínas da membrana peroxissomal (mPTS).

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos neste sentido e os primeiros resultados surgiram com o estudo da PMP47 de *Candida boidinii* (McCammon *et al.*, 1994). A sequência sinal foi localizada numa região hidrofílica intraperoxissomal, carregada positivamente, existente entre dois domínios membranares. No entanto, este sinal não foi encontrado ubiquamente em todas as PMPs. Por outro lado, dados mais recentes sugeriram a presença de vários sinais de endereçamento nas PMPs (Jones *et al.*, 2001), nomeadamente na PMP47 (Wang *et al.*, 2001).

Assim, concluiu-se apenas que todos os mPTSs identificados até ao momento apresentam um grupo de aminoácidos carregados positivamente (Dyer *et al.*, 1996; Biermanns e Gärtner, 2001; Honsho e Fujiki, 2001; Wang *et al.*, 2001; Brosius *et al.*, 2002) adjacente a uma sequência hidrofóbica ou domínio transmembranar (Dyer *et al.*, 1996; Soukupova *et al.*, 1999; Biermanns e Gärtner, 2001; Wang *et al.*, 2001; Brosius *et al.*, 2002).

Estudos dos domínios de interacção entre a Pex19p e diversas PMPs mostraram que a Pex19p liga-se a regiões das PMPs diferentes dos mPTSs. Estes resultados levaram à formulação de outra hipótese relativamente à função da Pex19p. Sugeriu-se que a Pex19p pode não funcionar com um receptor para as PMPs mas alternativamente ser uma chaperone molecular, facilitando a inserção das PMPs na membrana peroxissomal (Snyder *et al.*, 2000; Fransen *et al.*, 2001).

O mecanismo de inserção das PMPs na membrana, tal como o processo de endereçamento, é também ainda pouco conhecido. Com o intuito de se obterem dados importantes relativamente a este mecanismo, foram desenvolvidos alguns sistemas de importação *in vitro* de PMPs em organelos isolados de mamíferos ou plantas. A importação da PMP70 utilizando peroxissomas isolados de fígado de rato, na presença de uma fracção citosólica, revelou que o processo é específico para os peroxissomas, depende de um componente proteináceo, uma vez que é inibido após proteólise suave dos organelos intactos, e não requer ATP (Imanaka *et al.*, 1996). A importação da PMP22 em glioxissomas de cotilédones de girassol (Tugal *et al.*, 1999) ou em peroxissomas isolados a partir de fígado de rato (Diestelkötter e Just, 1993) apresenta as mesmas características que a importação da PMP70. No entanto, estes estudos permitiram determinar que a PMP22 liga-se primeiro à membrana do peroxissoma e só depois se insere na bicamada lipídica, processo este dependente de um factor proteico. Verificou-se que o pré-tratamento dos organelos com proteases impede totalmente a inserção, interferindo apenas ligeiramente na ligação da PMP22 à membrana.

1.3.2. Proliferação peroxissomal

O crescimento e o aumento do tamanho do peroxissoma são processos constitutivos que podem ser acelerados pela adição de vários agentes como metabolitos e xenobióticos (Lazarow e De Duve, 1976; Veenhuis *et al.*, 1987; Hartl e Just, 1987; Veenhuis *et al.*, 1989; Gorgas e Krisans, 1989; Sakai e Subramani, 2000). Em leveduras, onde a β -oxidação de ácidos gordos é exclusivamente peroxissomal, os níveis de peroxissomas são regulados pela fonte de carbono presente no meio de cultura. Se a fonte de carbono for um ácido gordo ou metanol, então o número de peroxissomas aumenta. Por outro lado, se as

células estão a crescer na presença de glucose, o número de organelos diminui drasticamente (Goodman, 1985; Vennhuis *et al.*, 1987; Vennhuis *et al.*, 1989; Van der Klei *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1992; Waterham *et al.*, 1992 e Sakai e Subramani, 2000). Em mamíferos, de um modo semelhante, existem substâncias que provocam proliferação peroxissomal, nomeadamente algumas drogas (tal como o clofibrato) e estímulos fisiológicos como, por exemplo, uma dieta rica em ácidos gordos (Lazarow e De Duve, 1976; Rachubinski *et al.*, 1984; Crane e Masters, 1986; Hartl e Just, 1987; Usuda *et al.*, 1988; Baumgart *et al.*, 1990).

Uma peroxina intrínseca de membrana, a Pex11p, parece ter um papel importante na regulação do crescimento e divisão peroxissomal. Estudos com células deficientes nesta peroxina mostraram que o número de peroxissomas existentes é muito menor e que estes apresentam um maior tamanho. Por outro lado, verificou-se que a sobre-expressão da Pex11p provoca uma proliferação dos peroxissomas (Erdmann e Blobel, 1995; Marshall *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1995). Em mamíferos existem três formas desta peroxina: a Pex11p α , Pex11p β e a Pex11p γ (Abe e Fujiki, 1998; Passreiter *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002). A Pex11p α é expressa diferencialmente, dependendo do tecido em questão, e os seus níveis são induzidos pela presença de proliferadores peroxissomais como o clofibrato (Schrader *et al.*, 1998b; Passreiter *et al.*, 1998). Por outro lado, a expressão da Pex11p β não depende do tecido em estudo e provoca a proliferação peroxissomal em condições basais (sem adição de estímulo metabólico externo) (Schrader *et al.*, 1998b). Assim, considera-se que a Pex11p β controla a divisão constitutiva do peroxissoma enquanto que a Pex11p α regula a abundância peroxissomal dependendo da dieta, nível hormonal ou outros estímulos (Schrader *et al.*, 1998b).

1.3.3. O modelo da biogénese peroxissomal

O modelo de biogénese peroxissomal maioritariamente aceite engloba as funções das peroxinas Pex3p, Pex16p e Pex19p na importação das PMPs e na biossíntese da membrana peroxissomal e da Pex11p na divisão dos peroxissomas existentes (Figura 2). A principal via da biogénese peroxissomal considera o crescimento de peroxissomas já existentes através da importação de proteínas matriciais e membranares, seguido de divisão (mediada pela Pex11p) (Figura 2A). A formação *de*

novo dos peroxissomas será um processo que requer pelo menos a Pex3p, Pex16p e Pex19p. O primeiro passo consiste na formação da bicamada lipídica, com origem em alguma endomembrana celular, processo dependente da Pex3p e Pex16p. A Pex19p ajudará na importação de mais PMPs para a membrana. O peroxissoma ficará então competente para importar proteínas da matriz, crescer e dividir-se (Figura 2B).

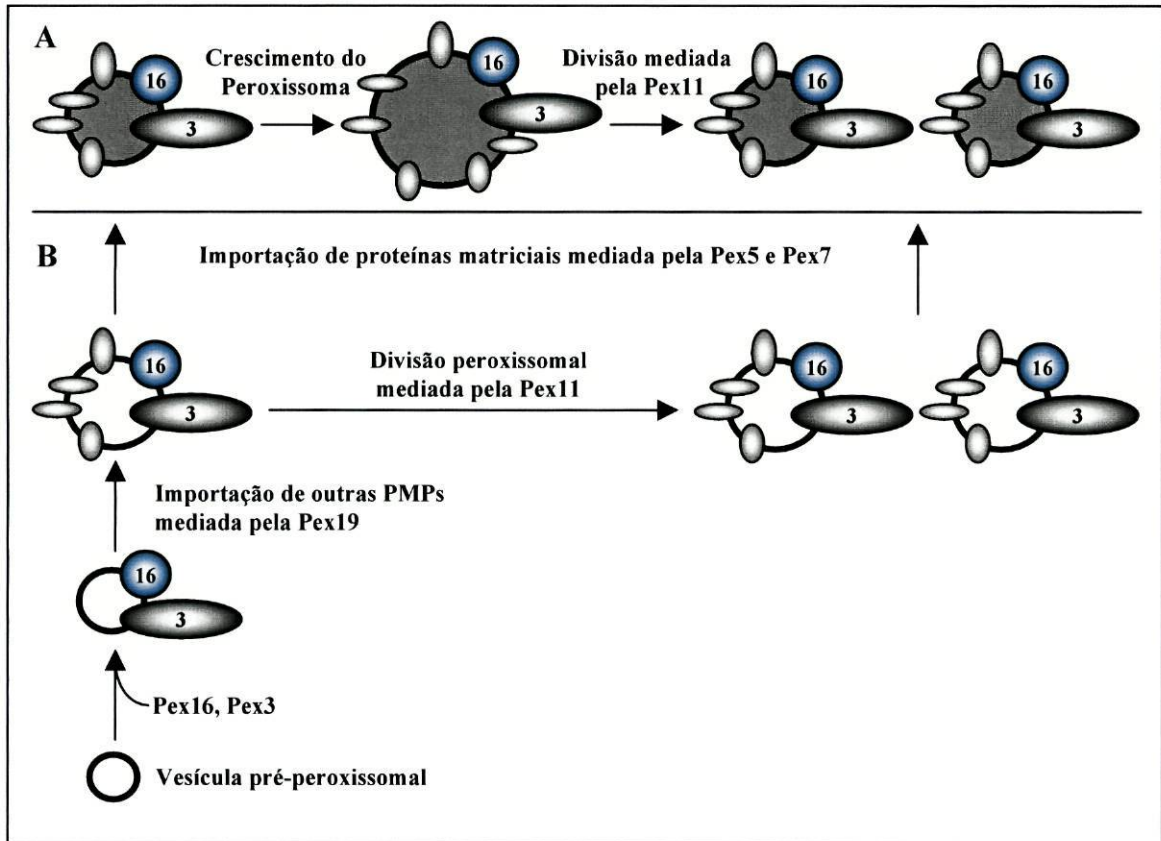


Figura 2. Modelo de biogênese peroxissomal (adaptado de Gould *et al.*, 2001).

A. O esquema representa um mecanismo em que os peroxissomas crescem importando proteínas e lípidos do citosol e dividem-se por fissão, num processo mediado pela Pex11p. B. Neste caso, os peroxissomas derivam de uma vesícula membranal pré-existente envolvendo a acção da Pex3p e Pex16p. A importação das restantes PMPs é mediada pela Pex19p, a importação das proteínas matriciais é da responsabilidade dos receptores Pex5p e Pex7p e a divisão peroxissomal depende da Pex11p. Provavelmente o mecanismo mais viável será o primeiro (A) enquanto que o segundo (B) poderá ocorrer apenas em células deficientes em peroxissomas ou em todas as células, mas a uma frequência menor.

Apesar deste modelo ser consensualmente aceite, em *Yarrowia lipolytica* os dados obtidos sugerem que os peroxissomas surgem por vesiculação do retículo endoplasmático, relembrando a teoria inicial de Novikoff e Shin (1964). Em particular, sugeriu-se que algumas proteínas peroxissomais deste organismo, tal como a própria membrana peroxissomal, têm origem no RE. O processo de biogénese peroxissomal parece ser bastante diferente em *Y. lipolytica*, relativamente aos outros organismos estudados (Titorenko e Rachubinski, 1998).

1.3.4. Importação das proteínas da matriz do peroxissoma: os sinais de endereçamento

Os primeiros estudos realizados sobre a importação de proteínas peroxissomais para a matriz do organelo revelaram que uma sequência C-terminal, presente na maior parte das proteínas peroxissomais, era importante para o seu endereçamento. A primeira proteína onde se identificou esta sequência foi a luciferase de pirilampo (Gould e Keller, 1987). Uma análise cuidada desta sequência revelou que são os três aminoácidos C-terminais (-Ser-Lys-Leu-COOH) que são responsáveis por endereçar esta proteína para o peroxissoma. Este sinal, designado por PTS1 (sinal de endereçamento peroxissomal do tipo 1), é necessário e suficiente para enviar cerca de 90% das proteínas peroxissomais para a matriz do organelo e encontra-se muito conservado entre os eucariotas (Gould *et al.*, 1988; Gould *et al.*, 1989). Experiências de mutagénese identificaram as variações conservadas na sequência PTS1 que também são funcionais: substituição da Ser, na posição -3, por Ala ou Cys (aminoácidos pequenos); substituição da Lys, na posição -2, por Arg ou His (aminoácidos carregados positivamente); e Met, substituindo a Leu na posição -1 (aminoácidos hidrofóbicos) (Gould *et al.*, 1989). Estas variações conservadas da sequência PTS1 são ainda mais pronunciadas quando se analisam proteínas peroxissomais de espécies diferentes (Elgersma *et al.*, 1996b; Lametschwandtner *et al.*, 1998).

Um número restrito de proteínas da matriz do peroxissoma não possui um PTS1, apresentando, no entanto, um sinal de endereçamento localizado perto do N-terminal constituído por 9 aminoácidos (Arg/Lys)(Leu/Val/Ile)X₅(His/Gln)(Leu/Ala)

denominado PTS2 (sinal de endereçamento peroxissomal do tipo 2). A tiolase de rato foi a primeira proteína onde o PTS2 foi identificado (Swinkels *et al.*, 1991). O segmento N-terminal das proteínas contendo PTS2 é clivado após a sua importação para a matriz do peroxissoma, ao contrário das proteínas possuidoras de PTS1 que mantêm a sequência sinal após importação (Lazarow e Fujiki, 1985; Swinkels *et al.*, 1991).

Estes sinais de endereçamento existentes nas proteínas matriciais do peroxissoma são reconhecidos no citosol por receptores solúveis, as proteínas Pex5p e Pex7p para proteínas possuidoras de PTS1 e PTS2, respectivamente.

1.3.5. Caracterização dos receptores Pex5p e Pex7p

1.3.5.1. O receptor Pex5p

A Pex5p foi inicialmente identificada em *Pichia pastoris* (McCollum *et al.*, 1993) e *Saccharomyces cerevisiae* (Van der Leij *et al.*, 1993) e só mais tarde em humanos (Fransen *et al.*, 1995; Wiemer *et al.*, 1995; Dodt *et al.*, 1995). É uma proteína com cerca de 60 a 70 kDa (dependendo das espécies em que é descrita).

Estudos de localização subcelular revelaram que a Pex5p é predominantemente citosólica e parcialmente peroxissomal (Dodt *et al.*, 1995; Van der Klei *et al.*, 1995; Dodt e Gould, 1996; Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996; Wimmer *et al.*, 1998; De Walque *et al.*, 1999; Jardim *et al.*, 2000; Harano *et al.*, 2001). Esta dualidade na localização subcelular da Pex5p, juntamente com a capacidade de interactuar com a sequência PTS1, levou à especulação que poderia funcionar como um receptor, ligando-se a proteínas possuidoras de PTS1 no citosol e endereçando-as para o peroxissoma.

Até ao momento apenas foram descritos 4 doentes com mutações na Pex5p (Dodt *et al.*, 1995; Slawewski *et al.*, 1995; Shimozawa *et al.*, 1999). Os doentes apresentam uma grande variedade fenotípica, que vai desde o síndrome de Zellweger até à IRD. As mutações conhecidas e os fenótipos desenvolvidos encontram-se resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização das mutações na Pex5pL descritas para 4 doentes PBD

<i>Células</i>	<i>Mutação*</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Características</i>	<i>Referência</i>
PBD005	R427ter	ZS	Incapacidade de importação de proteínas contendo PTS1 e PTS2; Instabilidade do mRNA da Pex5p	Dotd <i>et al.</i> , 1995 Braverman <i>et al.</i> , 1998
PBD018 PBD093	N526K	NALD	Importação normal de proteínas contendo PTS2 mas incapacidade de importar proteínas com PTS1 (diminuição da afinidade Pex5p-PTS1)	Dotd <i>et al.</i> , 1995 Slawewski <i>et al.</i> , 1995
PBD2-03	S563W	IRD	Importação de PTS2 normal Importação afectada de algumas proteínas contendo PTS1	Shimozawa <i>et al.</i> , 1999

* Todas as mutações foram encontradas em homozigotia

Verificou-se que doentes com a mutação R427ter em ambos os alelos possuem defeitos graves na importação mediada por ambos os receptores (Pex5p e Pex7p) (Dotd *et al.*, 1995) o que sugere que, em humanos, estes dois mecanismos estão interligados. Uma melhor explicação para esta observação surgiu quando se identificaram duas isoformas da HsPex5p, resultantes de *splicing* alternativo: Pex5pL e Pex5pS. Estas duas isoformas diferem apenas na presença de um exão adicional que codifica 37 aminoácidos na Pex5pL (aminoácidos 215-252) (Braverman *et al.*, 1998). Verificou-se que a Pex5pL era suficiente para repor a importação de proteínas com PTS1 e PTS2, por transfecção de células destes doentes, embora a Pex5pS só consiga repor a importação de proteínas com PTS1 (Braverman *et al.*, 1998). Estes dados sugeriram que o exão adicional presente na Pex5pL é necessário para a interacção entre as duas vias de importação peroxissomal (Braverman *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 2000; Matsumura *et al.*, 2000; Dotd *et al.*, 2001).

Um modelo animal para a deficiência da Pex5p foi desenvolvido em ratinho (Baes *et al.*, 1997). O gene da Pex5p foi inactivado por remoção de quatro exões que codificam a quase totalidade das repetições de tetratricopéptidos (34 aminoácidos) degenerados (TPRs) localizadas no C-terminal da proteína. Os ratinhos *knockout* morrem entre o primeiro e terceiro dia de vida. A análise histológica destes animais demonstrou a presença de estruturas peroxissomais com um tamanho maior mas em menor número e sem proteínas matriciais possuidoras de PTS1 e PTS2, o que vem confirmar o envolvimento da Pex5p de mamíferos na importação via Pex7p. A nível

neurológico, os ratinhos apresentam características semelhantes às observadas em doentes da biogénese peroxissomal (Baes *et al.*, 1997).

A estrutura primária da Pex5p compreende um domínio C-terminal contendo 7 TPRs e um segundo domínio caracterizado por várias cópias do pentapéptido WXXXF/Y no N-terminal. Considera-se que os TPRs formam séries de α -hélices que medeiam interacções entre proteínas (Lamb *et al.*, 1995). O domínio da Pex5p que compreende os TPRs é responsável pela ligação às proteínas possuidoras de PTS1 (Brocard *et al.*, 1994; Dodt *et al.*, 1995; Fransen *et al.*, 1995; Terlecky *et al.*, 1995; Gatto *et al.*, 2000). Um modelo estrutural de ligação entre os TPRs e o PTS1 foi descrito, após cristalização do fragmento da Pex5p humana que contém os TPRs em complexo com um pentapéptido contendo a sequência PTS1 (Gatto *et al.*, 2000). A estrutura da região C-terminal que contém os TPRs consiste em 2 conjuntos de 3 TPRs cada (TPRs 1-3 e 5-7) separados por uma região formada pelo TPR 4, que adopta uma configuração diferente relativamente aos outros TPRs (ver Figura 3). O péptido PTS1 encaixa-se numa cavidade entre os TPRs 1-3 e TPRs 5-7 (Gatto *et al.*, 2000).

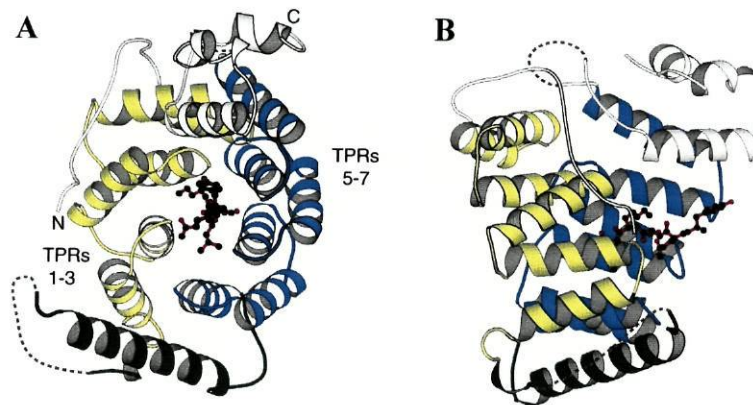


Figura 3. Imagem esquemática do complexo estabelecido entre os TPRs da Pex5p e um pentapéptido contendo a sequência PTS1 (extraído de Gatto *et al.*, 2000).

A. O péptido encontra-se representado a vermelho, os TPRs 1-3 a amarelo, os TPRs 5-7 a azul, o TPR4 a verde e as outras regiões a branco. **B.** Rotação de 90° de (A).

A constante de dissociação entre a Pex5p e o PTS1 foi determinada como sendo aproximadamente de 500 nM em *Pichia pastoris* (Terlecky *et al.*, 1995), 40 nM em *Tripanossoma brucei* (de Walque *et al.*, 1999) e 35 nM em *Homo sapiens* (Harper *et al.*, 2002). Um valor semelhante foi obtido para a constante de dissociação da interacção entre o domínio TPR e um pentapéptido contendo PTS1 (70 ± 20 nM) (Gatto *et al.*, 2000).

Apesar de a maior parte das proteínas possuindo PTS1 serem endereçadas para o peroxissoma interagindo com os TPRs da Pex5p, existem proteínas que são importadas ligando-se a outros domínios da Pex5p. É o caso da acil-CoA oxidase de *S. cerevisiae* (Dmochowska *et al.*, 1990) que, ao contrário da proteína humana (Fournier *et al.*, 1994), de rato (Miyazawa *et al.*, 1989), de ratinho (Nohammer *et al.*, 2000) e da levedura *Pichia pastoris* (Koller *et al.*, 1999b), não possui um PTS1 nem um PTS2. A proteína é importada para o peroxissoma interagindo com uma zona N-terminal da Pex5p (fora dos TPRs). O sinal de endereçamento da acil-CoA oxidase encontra-se num domínio interno da enzima e não no seu C-terminal (Klein *et al.*, 2002).

Estudos de complementação funcional, *two-hybrid assay*, análises de co-imunoprecipitação e de ligação *in vitro*, permitiram determinar mais precisamente as regiões da Pex5pL envolvidas na interacção com outras proteínas. É de notar que algumas das interacções descritas podem ser indirectas, se forem determinadas, por exemplo, por *two-hybrid assay* ou experiências de co-imunoprecipitação, seguidas de uma análise por *western-blotting*, técnicas que não discriminam entre interacções directas e indirectas.

Assim, determinou-se que a Pex5p está envolvida em interacções com as seguintes proteínas:

-Pex14p (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998; Schliebs *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Will *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2000; Reguenga *et al.*, 2001; Saidowsky *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001). O domínio N-terminal da Pex5p apresenta as repetições WXXXF/Y que funcionam como sítios de ligação a uma sequência presente no N-terminal da Pex14p (Schliebs *et al.*, 1999). No caso da proteína humana existem 7 repetições, e portanto, sete locais de ligação à Pex14p (Saidowsky *et al.*, 2001). Uma interacção directa entre a HsPex5p e a HsPex14p foi demonstrada (Fransen *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 2000; Urquhart *et al.*, 2000), envolvendo os resíduos 1-78 da Pex14p humana e os aminoácidos 1-298 da HsPex5p (Schliebs *et al.*, 1999).

-Pex13p (Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996; Erdmann e Blobel, 1996; Girzalsky *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2000; Bottger *et al.*, 2000; Barnett *et al.*, 2000; Otera *et al.*, 2002). Os aminoácidos 140-243 da Pex5p de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) que incluem os pentapéptidos WXXXF/Y 2 a 4 são responsáveis pela interação com a Pex13p (Otera *et al.*, 2002). Em *S. cerevisiae* também já foi demonstrada a importância destas repetições na interação com a Pex13p (Bottger *et al.*, 2000).

-Pex12p (Chang *et al.*, 1999b; Okumoto *et al.*, 2000; Albertini *et al.*, 2001). Um domínio C-terminal da HsPex5p é necessário para a interação com a HsPex12p (Chang *et al.*, 1999b; Fransen *et al.*, 2002).

-Pex7p (Otera *et al.*, 2000; Matsumura *et al.*, 2000; Dodt *et al.*, 2001). Os aminoácidos 191-222 da Pex5p humana estão envolvidos na interação com Pex7p. Em células humanas deficientes em Pex5p, os aminoácidos 1-230 da Pex5pL são suficientes para repor a importação de proteínas possuidoras de PTS2 (Dodt *et al.*, 2001). Estes resultados foram confirmados por Otera *et al.*, 2002.

-Hsp 70 (Harano *et al.*, 2001). É o domínio C-terminal, constituído pelos TPRs da Pex5p, que interaccua com a Hsp70.

Os aminoácidos 299-639 da Pex5p humana estão envolvidos no reconhecimento de proteínas possuidoras de PTS1 enquanto que os aminoácidos 1-214 são suficientes para o endereçamento da Pex5p para os peroxissomas (Dodt *et al.*, 2001) (ver Figura 4). Por outro lado, o domínio N-terminal da Pex5p (aminoácidos 1-213) medeia a oligomerização da proteína. Foi descrita a possibilidade de a Pex5p formar um homotetrámero (Schliebs *et al.*, 1999; Gould e Collins, 2002; Harper *et al.*, 2002).

Interações moleculares entre os domínios C-terminal e N-terminal da Pex5p e entre os domínios C-terminais de duas moléculas de Pex5p diferentes foram descritas (Harano *et al.*, 2001). Os domínios de interação da Pex5p com outras proteínas, nomeadamente com a Pex8p (Rehling *et al.*, 2000) e Pex10p (Okumoto *et al.*, 2000), permanecem por determinar.

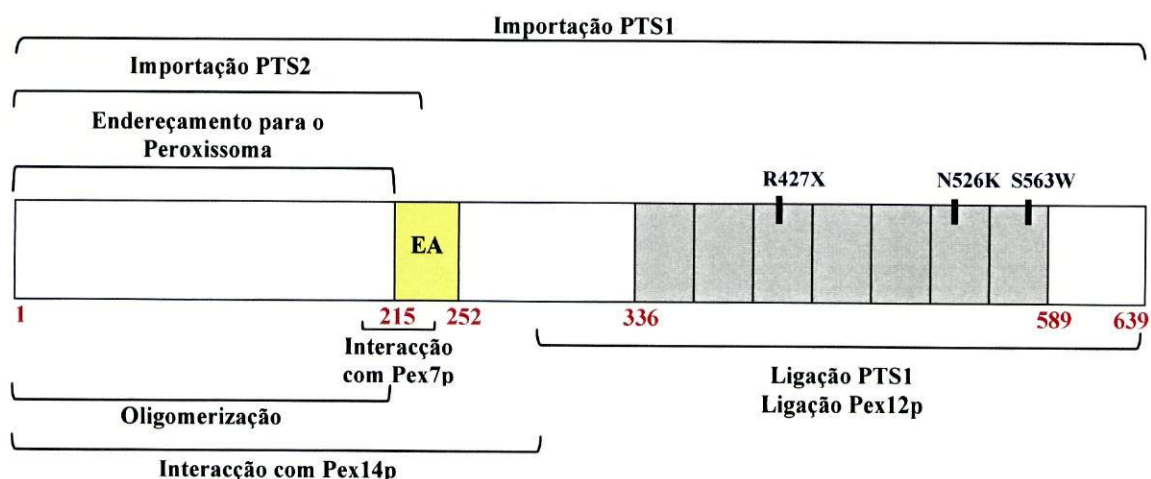


Figura 4. Diagrama dos domínios funcionais da Pex5pL humana (adaptado de Dodt *et al.*, 2001).

Os rectângulos a cinzento representam os sete domínios TPRs envolvidos na ligação ao PTS1. EA indica o exão alternativo (amarelo) que codifica 37 aminoácidos presentes na Pex5pL. Os números a azul indicam as mutações na Pex5p conhecidas. Os números a vermelho indicam os aminoácidos da Pex5pL humana (1-639).

1.3.5.2. O receptor Pex7p

A Pex7p foi inicialmente identificada em *S. cerevisiae* (Marzioch, 1994), mas actualmente já foi caracterizada em várias espécies de leveduras, plantas e mamíferos (Zhang e Lazarow, 1995; Braverman *et al.*, 1997; Motley *et al.*, 1997; Purdue *et al.*, 1997; Elgersma *et al.*, 1998). Esta proteína contém seis repetições WD-40 (repetições de aproximadamente 40 aminoácidos com um motivo Trp-Asp como característica central), que se pensa serem mediadoras de interacções entre proteínas. A Pex7p liga-se a proteínas possuidoras de PTS2 (Zhang e Lazarow, 1985; Rehling *et al.*, 1996; Elgersma *et al.*, 1998), embora os domínios de interacção não tenham sido ainda bem caracterizados. Interactua também com a Pex14p (Brocard *et al.*, 1997; Albertini *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2002) e a Pex13p (Girzalsky *et al.*, 1999; Stein *et al.*, 2002). Estudos de localização subcelular revelaram que a Pex7p, tal como a Pex5p, encontra-se principalmente no citosol mas uma fracção da proteína está associada ao peroxissoma (Zhang e Lazarow, 1995; Rehling *et al.*, 1996; Braverman *et al.*, 1997; Elgersma *et al.*, 1998).

Em *S. cerevisiae* existem outras duas peroxinas que estabelecem ligação com a Pex7p, a Pex18p e Pex21p, e que parecem ter um papel importante na importação de proteínas com PTS2 (Purdue *et al.*, 1998). Estas duas peroxinas parecem ser funcionalmente redundantes: a ausência de apenas uma destas proteínas reflecte-se num efeito modesto na importação mediada pela Pex7p mas na ausência de ambas não existe importação mediada pela Pex7p, que se localiza exclusivamente no citosol. A importação de proteínas possuidoras de PTS1 mantém-se inalterada em qualquer um destes casos (Purdue *et al.*, 1998).

Até ao presente não foram identificadas proteínas homólogas à Pex18p e Pex21p em mamíferos. No entanto, na sequência da HsPex5pL foi identificado um domínio de 21 aminoácidos (209-229), comum ao domínio necessário para importar proteínas com PTS2 e ao de interacção com a Pex7p, e que apresenta grande semelhança com uma região presente nas peroxinas Pex18p e Pex21p. Foi proposto que a HsPex5pL adquiriu algumas das funções que a Pex18p e/ou Pex21p possuem na importação peroxissomal em leveduras (Dodt *et al.*, 2001; Einwachter *et al.*, 2001; Otera *et al.*, 2002).

A Pex20p, descrita em *Y. lipolytica*, é outra proteína que parece ter um papel importante na importação de proteínas possuidoras de PTS2. É necessária para a oligomerização correcta e importação da tiolase, a única proteína possuidora de PTS2 descrita na levedura (Titorenko, 1998).

1.3.6. O processo de importação peroxissomal: abordagens experimentais

Embora a abordagem genética tenha sido uma boa estratégia no que diz respeito à identificação dos vários componentes envolvidos no sistema de importação peroxissomal, pouco se sabe sobre o mecanismo deste processo. De facto, a função da maior parte das peroxinas identificadas permanece por determinar.

Dados sobre o processo de importação de proteínas matriciais para o peroxissoma têm sido obtidos recorrendo a diferentes abordagens experimentais. Estes sistemas experimentais podem ser divididos em três categorias: os que utilizam organelos isolados ou lisados celulares (Fujiki e Lazarow, 1985; Imanaka *et al.*, 1987; Imanaka *et*

al., 1996; Tugal, 1999; Harano *et al.*, 2001), técnicas de microinjecção (Walton *et al.*, 1992) ou células semi-permeabilizadas (Wendland e Subramani 1993; Rapp *et al.*, 1993).

O primeiro sistema de importação peroxissomal *in vitro* foi desenvolvido utilizando peroxissomas ou um sobrenadante pós-nuclear (PNS), isolados a partir de fígados de ratos tratados com um agente proliferador peroxissomal, o clofibrato (Fujiki e Lazarow, 1985). As proteínas utilizadas neste sistema de importação foram a acil-CoA oxidase e a catalase, duas proteínas possuidoras de um PTS1 em mamíferos. O critério de selecção para as proteínas importadas baseou-se no uso de proteases e na aquisição, ou não, de resistência à digestão proteolítica. Os resultados obtidos mostraram que o processo de importação da acil-CoA oxidase apresenta especificidade organelar, é dependente da temperatura, tempo e concentração peroxissomal e requer a hidrólise de ATP (Imanaka *et al.*, 1987). Recentemente, verificou-se que anticorpos contra a Pex5p e a Hsp70 inibem a importação da acil-CoA oxidase e que a Hsp70 e o ATP, em sinergia, regulam a interacção estabelecida entre a Pex5p e as proteínas possuidoras de PTS1 (Harano *et al.*, 2001).

Outros sistemas de importação *in vitro* de proteínas da matriz do peroxissoma foram desenvolvidos utilizando organelos isolados de diferentes organismos. Em plantas, desenvolveu-se um sistema de importação *in vitro* para glioxissomas isolados a partir de cotilédones de girassol (Behari e Baker, 1993). Verificou-se que anticorpos dirigidos contra a Pex14p inibem a interacção com a membrana peroxissomal de proteínas possuidoras de PTS1 e PTS2 utilizadas no sistema de importação *in vitro*, independentemente da hidrólise de ATP (Lopez-Huertas *et al.*, 1999). Os resultados sugerem que a Pex14p funciona num passo anterior ao de inserção na membrana, este sim dependente de ATP (Lopez-Huertas *et al.*, 1999; Pool *et al.*, 1998).

Estudos de importação da enzima isocitrato liase em glioxissomas de cotilédones de abóbora mostraram que a importação desta proteína é um processo inibido pela presença de anticorpos contra as chaperones Hsp70 e Hsp90. Verificou-se a interacção entre a isocitrato liase e a Hsp70 e que a importação da proteína monomérica é mais eficiente do que o da proteína oligomérica (Crookes e Olsen, 1998).

O desenvolvimento de sistemas *in vitro* utilizando peroxissomas de rato e de plantas revelou inúmeras propriedades do sistema de importação peroxissomal. No entanto, um estudo mais profundo da importação peroxissomal utilizando estas metodologias não foi realizado uma vez que os peroxissomas são organelos muito

frágeis (Subramani, 1998). Por outro lado, muitas proteínas peroxissomais apresentam uma resistência intrínseca à digestão com proteases o que, frequentemente, impossibilita a utilização deste critério experimental na avaliação do processo de importação *in vitro*.

Assim, houve necessidade de desenvolver novas metodologias, como por exemplo o sistema de importação baseado na microinjecção de substractos no citosol de células em cultura. Os primeiros trabalhos com este sistema experimental consistiram na microinjecção da proteína luciferase (Walton *et al.*, 1992a), da albumina conjugada com um péptido possuindo a sequência Ser-Lys-Leu no seu C-terminal (Walton *et al.*, 1992a) e da proteína álcool oxidase (Walton *et al.*, 1992b) em células de mamíferos em cultura. Estes estudos vieram confirmar o envolvimento das proteínas de choque térmico da família da Hsp70 na importação de proteínas peroxissomais (Walton *et al.*, 1994) e mostraram que as proteínas em trânsito não necessitam de apresentar uma estrutura *unfolded* para que ocorra a sua importação para o peroxissoma (Walton *et al.*, 1995). De facto, os peroxissomas parecem possuir a capacidade de importar grandes moléculas, tal como sugere a observação de que partículas de ouro, com cerca de 9 nm, conjugadas com proteínas possuidoras de PTS1 são translocadas para a matriz peroxissomal (Walton *et al.*, 1995).

Por fim, a outra metodologia desenvolvida nos ensaios de importação peroxissomal *in vitro* consistiu no uso de células de mamíferos semi-permeabilizadas com estreptolisina-O (Wendland e Subramani, 1993; Rapp e Just, 1993). Com este método a membrana plasmática é selectivamente permeabilizada, mantendo-se a integridade da membrana peroxissomal. Verificou-se que a importação das proteínas peroxissomais é um mecanismo dependente de factores citosólicos e do sinal de endereçamento do tipo 1. Particularmente foi mostrada a necessidade da presença da Pex5p (Wiemer *et al.*, 1995) e da Pex14p no processo de importação via PTS1 (Fransen *et al.*, 1998).

Tendo como base ainda o sistema de importação peroxissomal para células semi-permeabilizadas, foi desenvolvido um método quantitativo para medir a importação de proteínas possuidoras de PTS1 (Terlecky *et al.*, 2001). Para além da confirmação de muitos dos resultados referidos anteriormente, determinou-se que a presença de zinco estimulava a importação e que a adição de anticorpos anti-Pex2p inibia a importação de proteínas contendo PTS1. Estes resultados sugerem o envolvimento de proteínas possuidoras de domínios de ligação ao zinco neste processo, tais como a Pex2p, Pex10p e Pex12p.

Resumidamente, todos os estudos de importação *in vitro* de proteínas peroxissomais possuidoras de PTS1 mostram que existe um processo de translocação que é dependente do tempo, temperatura, ATP e de factores citosólicos. Algumas chaperones têm sido identificadas e implicadas no processo de importação peroxissomal, nomeadamente a Hsp70 e a Hsp90. A proteína citosólica Djplp, da família da DnaJ de *Escherichia coli*, uma proteína que possivelmente actua em cooperação com chaperones da família da Hsp70, foi também implicada no processo de importação proteica peroxissomal (Hettema *et al.*, 1998). Relativamente a outras proteínas, as peroxinas Pex5p, Pex2p e Pex14p foram directamente envolvidas no mecanismo referido, embora as funções desempenhadas pelas duas últimas peroxinas mencionadas (Pex2p e Pex14p) permaneçam completamente desconhecidas.

Apesar do grande número de trabalhos realizados sobre a importação de proteínas contendo PTS1, pouco se publicou sobre a importação via PTS2. De facto apenas dois trabalhos foram realizados nesta área (Miura *et al.*, 1994; Legakis e Terlecky, 2001). À semelhança dos resultados obtidos para a via de importação envolvendo PTS1, a importação de uma molécula repórter contendo PTS2 é um processo dependente do tempo, temperatura, ATP e citosol. Requer a acção da chaperone Hsc70, da co-chaperone Hsp40 e das peroxinas Pex5p e Pex14p.

1.3.7. Importação de proteínas da matriz do peroxissoma

O mecanismo de importação das proteínas da matriz do peroxissoma actualmente aceite engloba três processos principais: o *docking*, ao nível da membrana, dos receptores carregando as proteínas em trânsito, a translocação das proteínas para o interior do organelo e a reciclagem dos receptores de novo para o citosol.

1.3.7.1. O processo de Docking

Os receptores Pex5p e Pex7p ligam-se no citosol às proteínas possuidoras de PTS1 e PTS2, respectivamente, e o complexo proteico formado é direccionado para o peroxissoma onde se liga a um complexo de *docking* membranar formado pelas peroxinas Pex13p e Pex14p.

A Pex13p é uma proteína intrínseca de membrana que contém um domínio SH3 (Src homology 3) no C-terminal, exposto no lado citosólico da membrana (Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996; Erdmann e Blobel, 1996). Este domínio parece ser importante na interacção quer com a Pex5p quer com a Pex14p, embora os locais de ligação a estas duas peroxinas sejam diferentes no domínio SH3 (Girzalsky *et al.*, 1999; Bottger *et al.*, 2000; Barnett *et al.*, 2000; Urquhart *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002). No entanto, existe um resultado contraditório publicado sugerindo que é o domínio N-terminal da Pex13p que está envolvido na ligação à Pex5p e não o C-terminal (Otera *et al.*, 2002).

A Pex14p é uma proteína membranar envolvida na importação de proteínas para a matriz do peroxissoma (Albertini *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1999; Will *et al.*, 1999). Em todos os organismos estudados, a inactivação da Pex14p resulta na ausência de importação de proteínas contendo PTS1 e PTS2 (Albertini *et al.*, 1997; Girzalsky *et al.*, 1999). Em mamíferos, a Pex14p é uma proteína intrínseca de membrana. Topologicamente, o C-terminal da Pex14p encontra-se exposto para o citosol enquanto que a localização do N-terminal permanece ainda por determinar (Shimizu *et al.*, 1999; Will *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002).

Em *S. cerevisiae*, a Pex14p interactua com ela própria e com as peroxinas Pex5p, Pex7p, Pex13p e Pex17p (Albertini *et al.*, 1997). Em mamíferos, parece apresentar afinidade para as mesmas proteínas (exceptua-se a Pex17p, que até ao momento não foi identificada em mamíferos) (Fransen *et al.*, 1998; Will *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999). A interacção entre a Pex5p e a Pex14p estabelece-se entre os domínios N-terminal de ambas as peroxinas. A Pex14p liga-se directamente à Pex13p sendo a interacção mediada pelo motivo PXXP da Pex14p e o motivo SH3 da Pex13p (Fransen *et al.*, 1998; Girzalsky *et al.*, 1999; Bottger *et al.*, 2000) (Figura 5).

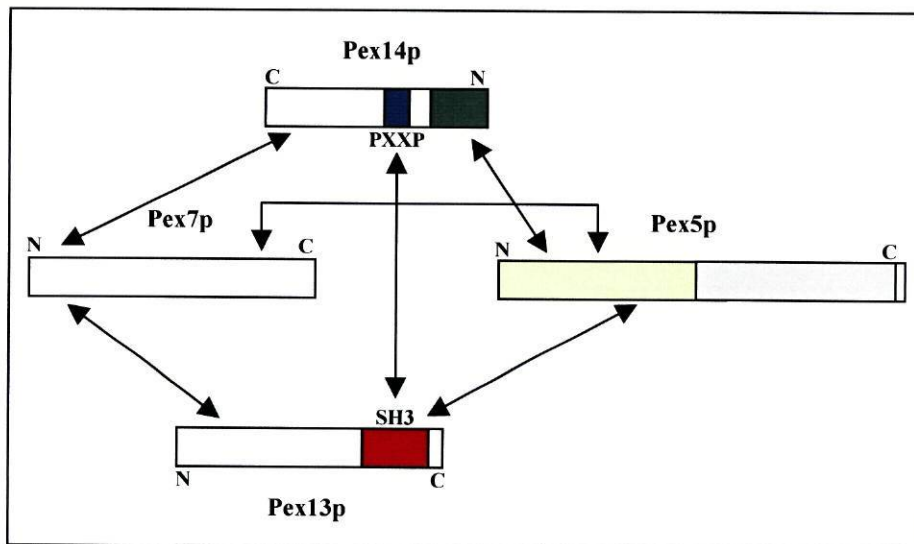


Figura 5. Interações estabelecidas entre os receptores (Pex5p e Pex7p) e os elementos do complexo de *docking* peroxissomal (Pex13p e Pex14p) (adaptado de Purdue e Lazarow, 2001).

A interacção entre a Pex14p e Pex13p é mediada pela clássica ligação entre os motivos PXXP da Pex14p (azul) e o SH3 da Pex13p (vermelho). Este domínio da Pex13p liga-se também a uma região N-terminal da Pex5p contendo os pentapéptidos WXXXF/Y (amarelo). Esta região da Pex5p interactiva também com o N-terminal da Pex14p (verde) e com a Pex7p. Os domínios específicos da Pex7p envolvidos nestas interações não são ainda conhecidos.

Resultados contraditórios, relativamente à função da Pex13p, surgiram por estudos da intensidade de interações proteicas em *Pichia pastoris*. A intensidade da interacção da Pex13p com a Pex5p parece diminuir quando o receptor se encontra ligado a uma proteína contendo PTS1 e aumenta quando a Pex5p se encontra livre, sem interactivar com a proteína-carga. Por outro lado, a afinidade da Pex14p para a Pex5p é aumentada quando a Pex5p está complexada com proteínas possuidoras de PTS1 (Urquhart *et al.*, 2000; Jardim *et al.*, 2002). Face a estes resultados, um modelo de translocação proteica diferente foi postulado em *P. pastoris*: o complexo Pex5p-PTS1, quando atinge a membrana peroxissomal, liga-se inicialmente à Pex14p; subsequentemente ocorre a dissociação e libertação da proteína-carga para o interior do organelo e ligação da Pex5p à Pex13p para ser exportada para o citosol (Urquhart *et al.*, 2000). A Pex13p passa assim a fazer parte do processo de reciclagem da Pex5p para o citosol.

1.3.7.2. O processo de Translocação

Depois do processo de *docking* membranar dos receptores carregados com proteínas em trânsito, estas têm de se dissociar dos receptores e ser translocadas para o organelo.

Várias peroxinas têm sido implicadas nos processos de importação subsequentes ao processo de *docking*, com base nos fenótipos de certos mutantes PEX. Células deficientes em elementos do processo de translocação não devem apresentar qualquer problema no processo de *docking* e, por isso, devem ter um aumento do nível de receptor associado à membrana. Por outro lado, as proteínas envolvidas na translocação devem interagir com os receptores ou com as proteínas matriciais que transportam.

A Pex2p, Pex10p e Pex12p são três peroxinas intrínsecas de membrana directamente implicadas no passo de translocação peroxissomal. Estas peroxinas contêm um domínio C3HC4 de ligação ao zinco que se pensa mediar inúmeras interacções entre proteínas (Borden, 2000). De facto, interacções entre a Pex5p e a Pex12p e Pex10p já foram demonstradas (Chang *et al.*, 1999b; Okumoto *et al.*, 2000). Células de doentes com defeitos nestas peroxinas não apresentam nenhum problema no *docking* da Pex5p mas acumulam este receptor à superfície da membrana peroxissomal (Dodt e Gould, 1996; Chang *et al.*, 1999a; Chang *et al.*, 1999b).

A necessidade de se considerar a existência de dois processos diferentes espaçados no tempo, o *docking* e a translocação, foi recentemente posta em causa com a identificação de um único complexo constituído pelas peroxinas Pex5p, Pex14p, Pex12p e Pex2p na membrana do peroxissoma de fígado de rato (Reguenga *et al.*, 2001) e em *S. cerevisiae* (Albertini *et al.*, 2001; Kunau *et al.*, 2001). Foi proposto que ambos os passos do processo de importação peroxissomal (isto é, os processos de *docking* e translocação) ocorrem no mesmo complexo proteico.

Relativamente ao mecanismo de translocação, três hipóteses foram propostas considerando que os peroxissomas apresentam a capacidade de importar moléculas de grandes dimensões (Walton *et al.*, 1995). Considerou-se a existência de um poro, de um canal ou de um mecanismo de invaginação da membrana peroxissomal (num processo semelhante à endocitose da membrana plasmática). No entanto, não existe qualquer evidência que sustente preferencialmente uma destas hipóteses. Um poro com as

dimensões necessárias nunca foi observado em peroxissomas por microscopia electrónica. Por outro lado, se existir um canal, a sua abertura e fecho teria de ser regulada, uma vez que a membrana peroxissomal parece ser impermeável a pequenas moléculas (van Roermund *et al.*, 1995) (ver secção 1.1). Quanto à existência de um processo endocítico, foram observados peroxissomas com estruturas membranares internas (McNew e Goodman, 1996), mas não existem mais evidências que suportem esta hipótese.

Um outro aspecto importante deste processo de translocação proteica reside na questão, ainda sem resposta, se a Pex5p e a Pex7p entram no lúmen peroxissomal juntamente com a proteína que transportam, tal como assumido por alguns investigadores. A interacção descrita entre a Pex5p e a Pex8p é um dos factores que indicia a entrada, pelo menos parcial, da Pex5p na matriz do peroxissoma, uma vez que a Pex8p é uma proteína intraperoxisomal, periférica de membrana (Rehling *et al.*, 2000). Uma evidência mais forte surgiu com os estudos de Dammai e Subramani (2001), que mostraram o envolvimento da Pex5p em múltiplos ciclos de transporte entre o citosol e o peroxissoma, presumivelmente entrando na matriz em cada ciclo de importação. Os processos de translocação e de reciclagem foram monitorizados através da acção de uma protease intraperoxisomal sobre proteínas de fusão contendo a Pex5p (Dammai e Subramani, 2001). Apesar de os dados mostrarem que a proteína de fusão é clivada, não eliminam a possibilidade de só a parte da Pex5p contendo a sequência de clivagem ter sido inserida na matriz, ficando exposta à acção da protease. Não é possível concluir, com toda a certeza, que a Pex5p é totalmente translocada para a matriz peroxissomal (Kunau, 2001).

Relativamente ao receptor Pex7p, o mecanismo de translocação ainda está menos estudado mas pensa-se que se desenrola por um processo semelhante ao da Pex5p (Terlecky e Fransen, 2000; Purdue e Lazarow, 2001).

1.3.7.3. O processo de reciclagem dos receptores

Depois da proteína transportada pelos receptores ser libertada para a matriz peroxissomal, estes são redireccionados novamente para o citosol. Uma análise epistática em *Pichia pastoris*, utilizando mutantes em diversas peroxinas, revelou que a

Pex1p, Pex4p, Pex6p e Pex22p actuam tardiamente no processo de importação proteico peroxissomal, depois do passo de translocação (Collins *et al.*, 2000).

A Pex1p e a Pex6p pertencem a uma família de proteínas com actividade ATPase denominada AAA (ATPases associadas a diversas actividades celulares). Estas peroxinas interactuam uma com a outra, num processo dependente de ATP (Faber *et al.*, 1998; Geisbrecht *et al.*, 1998; Tamura *et al.*, 1998; Kiel *et al.*, 1999). Linhas celulares humanas deficientes em Pex1p e Pex6p apresentam níveis muito baixos de Pex5p (Dodt e Gould, 1996; Yahraus *et al.*, 1996; Reuber *et al.*, 1997), tal com os correspondentes mutantes em *Pichia pastoris* (Yahraus *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2000). Este fenótipo, juntamente com os dados da análise epistática que indicam um papel tardio (depois da acção da Pex2p/Pex10p/Pex12p) para ambas as peroxinas (Collins *et al.*, 2000), permitiram sugerir que a Pex1p e a Pex6p têm um papel importante na estabilidade da Pex5p após o processo de translocação. No entanto, contrastando com estes dados, uma função na biogénese da membrana peroxissomal foi atribuída à Pex1p e Pex6p (Titorenko *et al.*, 2000). Serão necessários mais estudos envolvendo estas peroxinas para se obter uma informação mais precisa e consensual quanto à função da Pex1p e Pex6p.

A Pex4p pertencente à família E2 de enzimas envolvidas no processo de ubiquitinação (Wiebel e Kunau, 1992). É uma proteína ancorada à membrana peroxissomal através da Pex22p, uma proteína intrínseca de membrana identificada em *Pichia pastoris* (Koller *et al.*, 1999a). A análise epistática do envolvimento da Pex4p e Pex22p no mecanismo de importação proteica peroxissomal demonstrou que estas peroxinas actuam depois de todas as peroxinas já descritas (Collins *et al.*, 2000). Foi sugerido um envolvimento das peroxinas no processo de reciclagem da Pex5p para o citosol (van der Klei *et al.*, 1998).

1.3.8. Modelo de importação de proteínas da matriz do peroxissoma

Com base em todos os dados descritos, um modelo de importação proteica peroxissomal foi postulado (Sacksteder e Gould, 2000; Gould e Collins, 2002) (Figura 6). Sucintamente, as proteínas da matriz peroxissomal são sintetizadas em ribossomas livres no citosol e reconhecidas pelos receptores Pex5p ou Pex7p. Os receptores, em

complexo com as proteínas que transportam, dirigem-se para o peroxissoma onde interactivam inicialmente com as peroxinas constituintes do complexo de *docking* (Pex13p e Pex14p) e posteriormente com o de translocação (Pex2p, Pex10p e Pex12p). Neste passo, os receptores dissociam-se da proteína que é direccionada para o interior do organelo. A Pex5p e a Pex7p são novamente endereçadas para o citosol, num processo mediado pela Pex1p, Pex6p, Pex4p e Pex22p.

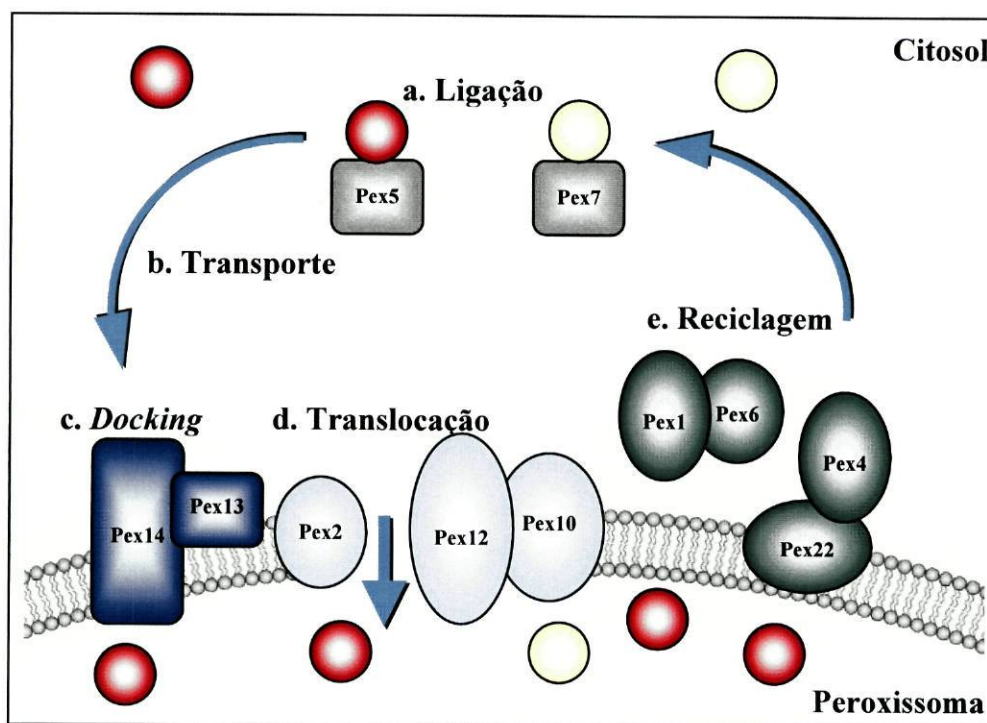


Figura 6. Modelo de importação proteica peroxissomal (Adaptado de Sacksteder e Gould, 2000; Gould e Collins, 2002).

O modelo de importação peroxissomal actualmente aceite considera o movimento intracelular dos receptores peroxissomais Pex5p e Pex7p, que ligam proteínas possuidoras de PTS1 (círculos vermelhos) ou PTS2 (círculos amarelos), respectivamente, no citosol (a. Ligação) e as transportam para o peroxissoma (b. Transporte). Ao nível da membrana interactivam com elementos do complexo de *docking*, tais como a Pex13p e Pex14p (c. *Docking*). A ligação entre os receptores e as proteínas-carga é destruída, possibilitando a translocação das mesmas para a matriz peroxissomal (d. Translocação). Finalmente, os receptores são reciclados de novo para o citosol, processo mediado por diversas peroxinas indicadas a verde (e. Reciclagem).

2. OBJETIVOS

2. OBJECTIVOS

O mecanismo de importação proteica peroxissomal considera a existência de dois receptores que reconhecem as proteínas da matriz peroxissomal, após serem sintetizadas no citosol, e as enviam para o organelo. Um dos receptores, a Pex5p, é responsável por reconhecer a maior parte destas proteínas e, portanto, desempenha um papel central e fundamental em todo este processo.

No entanto, dados conclusivos e inequívocos que permitam obter um conhecimento concreto sobre este mecanismo são muito escassos. Mesmo relativamente à função da Pex5p, não existem provas directas de que o movimento intracelular da Pex5p esteja relacionado com o transporte de proteínas possuidoras de PTS1 para o peroxissoma. As únicas evidências que sustentam o mecanismo de importação peroxissomal surgem de estudos de interacção entre peroxinas ou da determinação dos níveis em *steady-state* da Pex5p em linhagens celulares mutadas.

Assim, o objectivo central deste estudo consistiu em estudar o mecanismo de importação das proteínas possuidoras de PTS1. Uma abordagem experimental sobre este processo não poderia deixar de envolver a Pex5p. Numa primeira fase tornou-se importante caracterizar estruturalmente a Pex5p peroxissomal, utilizando como material base de estudo amostras de fígado de rato. Para isso, a produção de um anticorpo direccionado contra a Pex5p era essencial, para permitir o desenvolvimento de uma análise bioquímica da proteína. Seguidamente, tentou-se estudar a função da Pex5p e o seu comportamento durante o ciclo que estabelece entre o citosol e o peroxissoma. Para atingir este objectivo tornou-se importante desenvolver uma metodologia diferente que possibilitasse uma análise directa e dinâmica do processo de *docking/translocação* membranar.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Isolamento de fracções subcelulares de fígado de rato

Peroxisomas de fígado de rato foram isolados a partir de ratos machos Wistar, com cerca de 2 meses, mantidos com uma dieta normal e água *ad libitum* e com um ciclo de luz de 12 horas.

O fraccionamento celular, através de centrifugações diferenciais, foi realizado tal como descrito por Hartl e Just (1987). As centrifugações iniciais foram efectuadas a 4°C, num rotor SS-34 da centrífuga Sorvall (DuPont Instruments). Numa experiência típica, os fígados de 4 ratos foram homogeneizados com um homogeneizador do tipo *Potter Elvehjem* no tampão SEI (0.25 M sacarose, 5 mM imidazole-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA-NaOH, pH 7.2) suplementado com 0.1% (v/v) etanol, 50 µg/ml PMSF e 2 µg/ml leupeptina). O homogeneizado total foi centrifugado a 600 g durante 10 min e o sobrenadante obtido foi centrifugado 5 min a 2350 g. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 20 min a 12 300 g, de modo a obter-se um sedimento enriquecido em peroxissomas. O sobrenadante desta centrifugação foi sujeito a uma centrifugação a 100 000 g, durante 1 h a 4°C, no rotor angular 75 Ti da ultracentrifuga Beckman, de modo a obter-se uma fracção enriquecida em microssomas (sedimento) e uma fracção citosólica (sobrenadante). Os peroxissomas presentes no sedimento obtido a 12 300 g foram posteriormente purificados por centrifugação em gradiente de densidade num gradiente descontínuo de Nycodenz. O gradiente apresentava a seguinte composição: 1 ml 25% (m/v) e 7 ml 33% (m/v) de Nycodenz em 1 mM EDTA-NaOH, pH 7.2, 5 mM imidazole-HCl, pH 7.2, 0.1% (v/v) etanol, 50 µg/ml PMSF e 2 µg/ml leupeptina. A centrifugação foi realizada num rotor angular (75 Ti, Beckman Instruments) a 60 000 g, durante 20 min, a 4°C. O sedimento peroxissomal obtido apresentava uma pureza de cerca de 94%, valor calculado tendo em conta as actividades específicas de várias enzimas: catalase (Leighton *et al.*, 1968), citocromo c-oxidase (Cooperstein e Lazarow, 1951), esterase (Beaufay *et al.*, 1974) e β-glucuronidase (Glaser e Sly, 1973). A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Peterson, 1983).

3.2. Extração salina de proteínas peroxissomais

A extração dos peroxissomas utilizando soluções de baixa e elevada força iónica foi realizada sonicando peroxissomas isolados no próprio dia (a uma concentração proteica de 1 mg/ml) no tampão SEI ou SEI com 0.5 M NaCl. As amostras foram sonicadas três vezes durante 10 s (com um intervalo de 30 s em gelo) utilizando o sonicador da Heat Systems/Ultrasonics (modelo W-375) equipado com um *microtip* e ajustado para 50% *duty cycle*, *output 2*. Depois da sonicação as amostras foram divididas: uma parte foi mantida em gelo (controlo) e a outra foi separada numa fracção membranar (sedimento) e numa solúvel (sobrenadante) por centrifugação a 135 000 g durante 1 h. As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) adicionado para uma concentração final de 10% (m/v). Após 30 min em gelo, as proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a 15 000 g durante 15 min e lavadas com acetona, tal como descrito em Peterson (1983).

3.3. Isolamento e purificação de membranas peroxissomais

O isolamento de membranas peroxissomais foi realizado utilizando o método de extração alcalina descrito por Fujiki *et al.* (1982b). Essencialmente, os peroxissomas foram incubados em 0.10 M Na₂CO₃, pH 11.5, durante 30 min a 4°C. A utilização de um pH muito alcalino transforma estruturas membranares esféricas em membranas isoladas de aspecto laminar. Após a incubação alcalina, as amostras foram centrifugadas a 100 000 g durante 1 h a 4°C. As proteínas periféricas de membrana e matriciais são removidas e aparecem no sobrenadante. Por outro lado, as proteínas intrínsecas de membrana resistem ao processo de extração e surgem no sedimento da centrifugação. Antes de serem analisadas por SDS-PAGE, as proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas com TCA.

No método de flutuação de membranas em gradiente alcalino de sacarose o sedimento peroxissomal, obtido após purificação por centrifugação em gradiente de Nycodenz (ver secção 3.1), foi ressuscitado em 2 ml de 52% (m/v) sacarose em

0.10 M Na₂CO₃, pH 11.5, e colocado no fundo de um tubo. Sobre a amostra foram colocados 9 ml de um gradiente contínuo de 40 a 15% (m/v) sacarose em 0.10 M Na₂CO₃, pH 11.5. O pH alcalino foi mantido durante o gradiente para aumentar a resolução deste, evitando a formação de agregados proteicos que se formariam a pH neutro. O gradiente foi então centrifugado a 200 000 g durante 18 h no rotor SW41 (Beckman Instruments) e fracionado em 14 fracções de 0.8 ml desde o fundo até ao topo. As proteínas presentes em cada fracção foram precipitadas com TCA.

3.4. Centrifugação em gradiente de sacarose

As amostras proteicas (2 mg de proteína peroxissomal ou citosólica) foram incubadas em 600 µl de 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% (m/v) desoxicolato de sódio, 1% (m/v) Nonidet-P40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8.0, 50 µg/ml fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzeno-sulfonil, 5 µg/ml pepstatina A, 2 µg/ml *trans*-epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)butano, 40 µg/ml bestatina, 5 µg/ml leupeptina e 2 µg/ml aprotinina. Após 30 min a 4°C, as amostras foram aplicadas no topo de gradientes descontínuos de sacarose (1.5 ml 25%, 1.7 ml 21%, 2.1 ml 15.5%, 2.5 ml 10% e 2.7 ml 7.5% (m/v) de sacarose em 50 mM Tris-Ácido acético, pH 8.0, 0.1% Nonidet-P40 e 1 mM EDTA-NaOH, pH 8.0), que foram centrifugados a 165 000 g durante 16 h a 4°C no rotor TST 41.14 (Sorvall). Recolheram-se 13 fracções de 0.85 ml desde o fundo até ao topo do gradiente. As proteínas de cada fracção foram precipitadas com TCA e analisadas por SDS-PAGE.

Os marcadores nativos de massa molecular utilizados para calibrar os gradientes foram a ovalbumina da clara do ovo (45 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), fosforilase b do músculo do coelho (97 kDa) e miosina do músculo de coelho (470 kDa).

3.5. Protease protection assays

Peroxisomas acabados de isolar, ressuspensos no tampão SEI a uma concentração proteica final de 2 mg/ml, foram incubados em gelo, durante 30 min, na presença de diferentes quantidades das proteases proteinase K (PK) ou tripsina dissolvidas em SEI. Quando indicado, o detergente Triton X-100 (TX-100) a 0.1% (m/v) de concentração final foi adicionado às amostras antes da adição da protease. A digestão com proteases de organelos sonicados consistiu na sonicação das amostras, tal como descrito na secção 3.2, logo depois da adição da protease. As proteases foram inibidas incubando as amostras em gelo, durante 2 min, com 2 mM PMSF. Seguidamente as proteínas foram precipitadas com TCA e analisadas por SDS-PAGE.

3.6. Digestão de proteínas com a protease Genenase I

A digestão de proteínas com a protease Genenase I (New England Biolabs) foi realizada na presença de 0.25 M sacarose, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8.0, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 50 µg/ml PMSF e 1% TX-100, num volume final de 40 µl. Por digestão foram adicionadas 2 unidades de Genenase I e a reacção foi realizada a 23°C, durante 30 min. A acção proteolítica da Genenase I foi inibida com TCA e as amostras foram analisadas por SDS-PAGE.

3.7. Isolamento de RNA e RT-PCR

RNA total de fígado de rato e de fibroblastos de pele humana foram isolados utilizando o *kit* da Roche Molecular Biochemicals denominado “High Pure RNA Isolation”. As reacções de RT-PCR foram realizadas utilizando o *kit* “Titan™ One Tube Reverse Transcription-PCR System” essencialmente como descrito pelo fornecedor (Roche Molecular Biochemicals).

3.8. Proteínas de fusão e péptidos

O cDNA que codifica a Pex5pL humana foi amplificado por RT-PCR utilizando os oligonucleótidos mPex5p-1 e jPex5p-1 (ver Tabela 4) desenhados de acordo com a sequência publicada (Fransen *et al.*, 1995; Braverman *et al.*, 1998). A molécula de DNA amplificada foi clonada no vector pGEM[®]-T easy, seguindo as instruções do fabricante (Promega). O plasmídeo recombinante (pGEMT-Pex5p) foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI* e a inserção obtida foi clonada nos vectores de expressão proteica pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences) e pMAL-c2 (New England Biolabs). As proteínas recombinantes, contendo os aminoácidos 142-639 da Pex5p em fusão com a GST (glutathiona S-transferase) ou MBP (proteína de ligação à maltose), foram expressas utilizando as estirpes XL1-Blue ou TB1 de *Escherichia coli*, respectivamente. A proteína GST-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ foi purificada por SDS-PAGE enquanto que a MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma resina de amilose e seguindo as instruções do fabricante (New England Biolabs).

Tabela 4. Oligonucleótidos utilizados nas clonagens

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Sequência</i>
mPex5p-1	5'-CCGGTTCGACATGGCAATGCGGGAGCTGGTGGGA-3'
jPex5p-1	5'-GCGGTTCGACCTGTCACTGGGGCAGGCCAAACATAG-3'
mPex5p-2	5'-GGCGTTCGACTGGAGATCTATGGCAATGCGGGAGCTGGTGGGA-
jPex5p-2	5'-GGGTCTAGAGCGGCCGCGTTCGACCTGTCACTGGGGCAGGCC-3'
mPex5p-3	5'-GCGAGAATTCATGGATGACCTTACGTCAGCTACCTATGA-3'
jPex5p-3	5'-GGGTCTAGAGCGGCCGCGTTCGACCTGTCACTGGGGCAGGCC-3'
mSKL	5'-GATCCCCACAATTCCCAGGTCGATCCAAGCTTTGAGC-3'
jSKL	5'-GGCCGCTCAAAGCTTGGATCGACCTGGGAATTGTGGG-3'
mLKS	5'-GATCCCCACAATTCCCAGGTCGACTTAAGTCCTAAGC-3'
jLKS	5'-GGCCGCTTAGGACTTAAGTCGACCTGGGAATTGTGGG-3'
mPex12p	5'-GCGGAATTCACGCAGGAACTATGGCTGAGC-3'
jPex12p	5'-GGCCTGCAGAGACATGATTCCCTTTCAGTTCTCAGG-3'
mPex13p	5'-GCGGAATTCATGACAAGACCTGGACAACCAGC-3'
jPex13p	5'-GGCCTGCAGTCAAAGATCTTGCTTTTCTCCATC-3'
mΔC	5'-AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGC-3'
jΔC1	5'-CGCGCTCTTTCATTAGTACCCCTTATCATA-3'
jΔC2	5'-GTCCCGCTATTACGTGTGCTGCAGATCCTC-3'

Para a expressão da proteína de fusão GST-Pex5p_{FL} (proteína recombinante GST com a sequência completa da Pex5pL humana), o plasmídeo pGEMT-Pex5 foi sujeito a uma reacção de PCR utilizando os oligonucleótidos mPex5p-2 e jPex5p-2 (Tabela 4), com o intuito de se alterarem os locais de restrição existentes nas extremidades da sequência da Pex5pL. O fragmento de DNA amplificado foi digerido com as enzimas *Bgl*III e *Not*I e foi clonado nos sítios *Bam*HI e *Not*I do vector pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences). As proteínas GST-Pex5p_{FL} e GST foram expressas na estirpe XL1-Blue de *Escherichia coli*, purificadas por cromatografia de afinidade utilizando a glutationa-sepharose[®] 4B (Amersham Biosciences) e dializadas contra o tampão SEM (0.25 M sacarose, 5 mM MOPS-KOH, pH 7.2 e 1 mM EDTA-NaOH, pH 7.2).

Uma proteína recombinante contendo a GST e os aminoácidos 312-639 da Pex5p (GST-TPRs) foi obtida da seguinte forma: o plasmídeo pGEM4-Pex5p foi sujeito a uma reacção de PCR utilizando os oligonucleótidos mPex5p-3 e jPex5p-3 (Tabela 4). O fragmento de DNA amplificado foi inserido nos sítios *Eco*RI e *Not*I do plasmídeo pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences). A proteína GST-TPRs foi expressa, purificada e dializada como referido no parágrafo anterior.

Para a produção das proteínas de fusão GST-SKL e GST-LKS, os oligonucleótidos mSKL e jSKL (para GST-SKL) e mLKS e jLKS (para GST-LKS) (Tabela 4), ressuspendidos em 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA-NaOH, pH 8.0 e 50 mM NaCl, foram emparelhados sujeitando quantidades equimolares dos oligonucleótidos a um aquecimento a 95°C durante 3 min, seguido de um arrefecimento gradual até 25°C durante 1 h. Os dímeros de DNA foram purificados por electroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (ver secção 3.14.2), eluídos do gel por incubação com uma solução salina (1 M NaCl), precipitados com etanol e inseridos no vector pGEX-4T-3 (Amersham Biosciences) previamente digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I. As proteínas de fusão foram expressas e purificadas como descrito previamente.

Os péptidos CRYHLKPLQSKL (Pep-SKL) e CRYHLKPLQLKS (Pep-LKS) foram sintetizados por Sigma Genosys.

3.9. Produção de Anticorpos

3.9.1. Anticorpo anti-Pex5p

A proteína recombinante GST-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ foi purificada por SDS-PAGE e utilizada na imunização de coelhos. O protocolo de imunização consistiu em injectar subcutaneamente, em quatro locais diferentes do animal, 0.6 ml de uma mistura contendo 300 µg de proteína de fusão em PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄.7H₂O e 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.3 com NaOH) e 0.6 ml de adjuvante completo de Freund. Passados 21 dias voltou-se a injectar proteína, desta vez misturada com adjuvante incompleto de Freund, processo que se repetiu de quinze em quinze dias. Sete dias após cada imunização (excepto da primeira) retirou-se sangue para analisar o soro relativamente ao título em anticorpos.

O soro anti-Pex5p foi imunopurificado utilizando a proteína MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ imobilizada numa membrana de nitrocelulose, tal como descrito (Harlow e Lane, 1998). Resumidamente, a nitrocelulose contendo as bandas de MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ (cerca de 100 µg de proteína) foi cortada, lavada com TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 e 0.9% (m/v) NaCl) para retirar o excesso de Ponceau S e incubada com 0.2 M glicina-HCl, pH 2.3, durante 15 min. Foi novamente lavada com TBS e bloqueada com 5% BSA em TBS, durante 1 h, à temperatura ambiente. Seguidamente incubou-se a nitrocelulose contendo a MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ com soro anti-Pex5p (1 ml), diluído para 50 ml com 0.1% BSA em TBS, durante 16 h, a 4°C. Depois da ligação das imunoglobulinas à MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉, lavou-se a nitrocelulose sequencialmente com 0.1% BSA em TBS, 0.1% BSA em TBS com 0.05% Triton X-100 e 0.1% BSA em TBS. A eluição das IgGs foi feita com 2 ml de 0.2 M glicina-HCl, pH 2.3, cujo pH foi seguidamente neutralizado com Tris base. O anticorpo imunopurificado foi diluído para 30 ml com 0.1% BSA em TBS.

3.9.2. Anticorpo anti-Pex12p

Para a produção de um anticorpo contra a Pex12p humana (Chang *et al.*, 1997), o cDNA codificante dos aminoácidos 1-359 da proteína foi amplificado a partir de RNA total de fibroblastos da pele humana por RT-PCR utilizando os oligonucleótidos mPex12p e jPex12p (Tabela 4). O fragmento de DNA de 1.1 kb foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* e clonado no vector de expressão pGEX-5X-1 (Amersham Biosciences). A proteína de fusão GST-Pex12p foi expressa na estirpe XL1-Blue de *Escherichia coli* e obtida na forma de corpos de inclusão. Estes foram isolados, as proteínas de fusão foram purificadas por SDS-PAGE e utilizadas na imunização de coelhos (ver protocolo de imunização descrito anteriormente na secção 3.9.1).

3.9.3. Anticorpo anti-Pex13p

O cDNA codificante dos resíduos de aminoácidos 40 a 403 da sequência humana da Pex13p foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA total extraído de fibroblastos de pele humana. Os oligonucleótidos usados, mPex13p e jPex13p (Tabela 4), foram desenhados de acordo com a sequência publicada (Bjorkman *et al.*, 1998). O fragmento de DNA de 1.1 kb foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* e foi clonado no vector de expressão proteica pMal-c2 (New England Biolabs). A proteína de fusão MBP-Pex13p foi expressa na estirpe TB1 de *Escherichia coli*, isolada por cromatografia de afinidade utilizando uma resina de amilose (New England Biolabs), purificada por SDS-PAGE e utilizada na imunização de coelhos (ver secção 3.9.1). Quando utilizado em análises de *western-blotting* de proteínas peroxissomais de fígado de rato, o anticorpo obtido reconhece uma proteína intrínseca de membrana com uma massa molecular de aproximadamente 52 kDa, a Pex13p.

3.9.4. Outros anticorpos

O anticorpo dirigido contra a catalase (uma proteína da matriz do peroxissoma) foi fornecido por Research Diagnostics, Inc. O anticorpo monoclonal (clone 7H10-BD4) contra a subunidade α da ATPase mitocondrial (anti-F1 α), uma proteína periférica de membrana (Stock *et al.*, 1999), foi fornecido por Molecular Probes. O anticorpo direccionado contra a PMP70 de rato (Kamijo *et al.*, 1990) foi fornecido por Zymed Laboratories, INC. O anticorpo anti-GST foi comprado à Amersham Biosciences. O anticorpo anti-Pex14p foi produzido pela Dr^a Márcia Oliveira e encontra-se descrito em Reguenga *et al.* (2001).

Os anticorpos primários foram imunodetectados com anticorpos secundários (Sigma) ligados à fosfatase alcalina ou à peroxidase para detecção cromogénica ou quimioluminescente, respectivamente.

As IgGs foram purificadas a partir dos soros pré-imune, anti-Pex14p ou anti-PMP70 utilizando a proteína A-sepharose[®] (PAS) e seguindo as instruções do fabricante (Amersham Biosciences). Resumidamente, os soros (cerca de 60 μ l) foram diluídos com 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, para um volume final de 1 ml, e centrifugados a 15 000 g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi incubado com 20 mg de proteína A-sepharose[®], previamente hidratada, durante 2 h à temperatura ambiente. A PAS foi lavada duas vezes com 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 e com 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. As IgGs foram eluídas com 100 mM glicina-HCl, pH 3.0, que foi imediatamente neutralizada com Tris-HCl, pH 8.0.

A preparação de fragmentos Fab das IgGs utilizando papaína imobilizada foi realizada utilizando o *kit* denominado “ImmunoPure Fab Preparation” da Pierce.

3.10. Síntese de proteínas marcadas radioactivamente com [³⁵S]Met

O cDNA que codifica a Pex5p_{FL} (retirado do vector pGEMT-Pex5p por digestão com a enzima de restrição *SaII*) foi subsequentemente inserido no sítio *SaII* do plasmídeo pGEM-4 (Promega), originando o vector PGEM4-Pex5p. Este plasmídeo foi

linearizado com a enzima *NheI* e transcrito *in vitro* utilizando a T7 RNA polimerase, seguindo as instruções do fabricante (“T7 Cap-Scribe”, Roche Molecular Biochemicals). A Pex5p marcada radioativamente foi sintetizada num lisado de reticulócitos de coelho na presença de [³⁵S]metionina (actividade específica superior a 1000 Ci/mmol; ICN Biomedicals, Inc.), seguindo as instruções do fabricante (“Translation Kit Reticulocyte Type II”, Roche Molecular Biochemicals).

Os cDNAs codificantes das proteínas Δ C1Pex5p e Δ C2Pex5p (aminoácidos 1-324 e 1-197 da Pex5p, respectivamente), precedidos pelo promotor da T7 RNA polimerase, foram obtidos por amplificação por PCR do vector pGEM4-Pex5p utilizando o oligonucleótido m Δ C e os oligonucleótidos j Δ C1 (para Δ C1Pex5p) e j Δ C2 (para Δ C2Pex5p) (Tabela 4). Estes fragmentos de DNA foram transcritos e traduzidos *in vitro* tal como descrito anteriormente.

3.11. Importação *in vitro* da ³⁵S-Pex5p para o peroxissoma

Sobrenadantes pós-nuclear (PNS) de fígado de rato foram preparados por homogeneização do fígado dos animais em tampão SEM e centrifugação do homogeneizado total duas vezes a 600 g, durante 10 min, a 4°C. Aliquotas de PNS (com uma concentração proteica de 40-60 mg/ml) foram rapidamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -70°C. Estas fracções permanecem competentes para importação *in vitro* durante aproximadamente 1 mês.

As reacções de importação (100 μ l de volume final) foram realizadas na solução de importação (0.25 M sacarose, 50 mM KCl, 5 mM MOPS-KOH, pH 7.2, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA-NaOH, pH 7.2, 0.2% (m/v) albumina sérica bovina deslipidada e 20 μ M metionina) utilizando 150 μ g de PNS e lisado de reticulócitos contendo as proteínas marcadas radioativamente (0.5 μ l no caso da Pex5p e 2 μ l no caso das versões truncadas no C-terminal). Em algumas experiências, a concentração de BSA deslipidada na solução de importação foi diminuída para 0.002% (m/v) (solução de importação B). Todos os nucleótidos foram usados a uma concentração final de 1 mM, adicionados de soluções *stock* a 100 mM com pH acertado para 7.2 com NaOH. Apesar

de os níveis de ATP endógenos não terem sido determinados, estima-se que a contribuição do lisado de reticulócitos (Roche Molecular Biochemicals) e do PNS de fígado de rato (Zuurendonk e Tager, 1974) não deva ultrapassar os 36 μM .

Terminada a reacção de importação (normalmente incubada durante 30 min a 26°C), as amostras foram tratadas com proteinase K (concentração final de 300 $\mu\text{g/ml}$), durante 30 min, a 4°C. A acção proteolítica da proteinase K foi inibida com 500 $\mu\text{g/ml}$ PMSF (adicionado de um *stock* a 50 mg/ml em etanol), durante 2 min, em gelo. As reacções de importação foram então diluídas para 1 ml com SEM e os organelos foram isolados por centrifugação a 15 000 g, durante 15 min, a 4°C. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e o sinal das proteínas marcadas com ^{35}S detectado por auto-radiografia.

3.12. Centrifugação em gradiente de Nycodenz

Reacções de importação foram aplicadas no topo de gradientes de Nycodenz com a seguinte composição: 1.5 ml 45% (m/v), 6.5 ml 30% (m/v) e 1 ml 25% (m/v) de Nycodenz em 5 mM MOPS-KOH, pH 7.2 e 1 mM EDTA-NaOH, pH 7.2. Os gradientes foram centrifugados no rotor angular 65.13 (Sorvall) a 60 000 g, durante 45 min, a 4°C. Os gradientes foram fraccionados em 12 fracções desde o fundo até ao topo. A distribuição dos diferentes organelos no gradiente foi analisada por determinação da actividade das enzimas referenciadas na secção 3.1.

3.13. Imunoprecipitação da Pex5p importada *in vitro*

Duas alíquotas de 1.3 mg de PNS foram incubadas em solução de importação na presença ou ausência (amostra controlo) de 5 μl de lisado de reticulócitos contendo a Pex5p marcada com ^{35}S . Após 30 min de incubação a 26°C, ambas as amostras foram tratadas com proteinase K, durante 30 min em gelo (concentração final 300 $\mu\text{g/ml}$). A

protease foi inibida com 500 µg/ml PMSF, os organelos foram diluídos para 1 ml com SEM contendo 50 µg/ml PMSF e 1:100 (v/v) do *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos (Sigma) e sedimentados por centrifugação a 15 000 g, durante 15 min, a 4°C. A proteína ³⁵S-Pex5p (0.1 µl de lisado de reticulócitos) foi então adicionada à amostra controlo. Para evitar interações entre a Pex5p e a Pex14p, não relacionadas com a importação, após solubilização dos organelos, adicionaram-se 10 µg da proteína de fusão GST-Pex5_{pFL} a cada tubo. As amostras foram solubilizadas em 1.3 ml de solução de imunoprecipitação (1% (m/v) Nonidet-P40, 100 mM acetato de potássio-ácido acético, pH 7.4, 2 mM EDTA-NaOH, pH 8.0, 100 µg/ml PMSF e 1:100 (v/v) do *cocktail* de inibidores de proteases de mamíferos), durante 15 min em gelo, e foram centrifugadas a 60 000 g durante 15 min a 4°C de modo a se remover algum material insolúvel. Uma alíquota (100 µl) de cada sobrenadante foi mantida em gelo durante o restante procedimento e antes da análise em SDS-PAGE foi sujeita a precipitação com TCA. Os restantes sobrenadantes foram divididos em duas alíquotas iguais: uma recebeu 5 mg de proteína A-sepharose[®] pré-incubada com 5 µl de soro anti-Pex14p e a outra recebeu a mesma quantidade de PAS pré-incubada com um soro pré-imune. As amostras foram incubadas com agitação suave durante 60 min a 4°C, a PAS foi sedimentada por centrifugação e lavada três vezes com 1 ml de solução de imunoprecipitação. As proteínas imunoprecipitadas foram eluídas com 60 µl de tampão de solubilização de amostras (secção 3.14.1) e analisadas por SDS-PAGE.

3.14. Electroforeses

3.14.1. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As amostras proteicas a analisar por SDS-PAGE foram aquecidas no tampão de solubilização de amostras (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 10% glicerol, 2 mM EDTA-NaOH, pH 8.0 e 0.1 M DTT) a 65°C durante aproximadamente 20 min. Antes da aplicação no gel, as amostras foram centrifugadas a

15 000 g à temperatura ambiente, durante 5 min, para remoção de algum material insolúvel.

Os géis utilizados, com espessura de 1 ou 0.75 mm, foram preparados com um gel de empacotamento de 5% poliacrilamida (razão acrilamida/bisacrilamida 75:1) em 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 e 0.1% (m/v) SDS e um gel de separação de 11 ou 12% acrilamida (razão acrilamida/bisacrilamida 75:1) em 750 mM Tris-HCl, pH 8.8 e 0.1% (m/v) SDS. A separação electroforética das proteínas foi realizada na presença do tampão contendo 0.025 M Tris, 0.25 M glicina e 0.10% (m/v) SDS, utilizando o sistema descontínuo de Laemmli (Laemmli, 1970).

Após a separação electroforética, os géis foram corados com uma solução de 0.2% (m/v) azul de Coomassie R-250 em 10% (v/v) ácido acético e 50% (v/v) metanol durante algumas horas e descorados com uma solução de 8% (v/v) ácido acético e 25% (v/v) etanol.

Nas electroforeses de poliacrilamida desnaturantes utilizadas para purificar proteínas de fusão utilizaram-se géis de 3 mm de espessura com um gel de separação de 8%. A separação proteica foi realizada na presença do tampão contendo 0.025 M Tris, 0.25 M glicina, 0.05% (m/v) SDS e 25 mg/L azul de Coomassie R-250. As proteínas eram coradas à medida que eram separadas electroforéticamente. No final do SDS-PAGE, a zona do gel contendo a banda correspondente à proteína de fusão foi cortada e finamente fragmentada com um *polytron* (Kinematica) na presença de 50 ml da solução de eluição (0.02% (m/v) SDS e 5 mM DTT). A proteína foi eluída do gel durante 16 h a 4°C, concentrada por liofilização, precipitada com acetona e ressuspendida em PBS ficando pronta para ser utilizada nos ensaios de imunização.

A transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell) foi realizada, seguindo as instruções do fornecedor, num sistema *semi-dry* da Amersham Pharmacia Biotech.

A análise densitométrica dos *immunoblots* foi efectuada utilizando o densitómetro LKB BROMMA.

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

3.14.2. Electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante

A utilização deste tipo de electroforese teve como finalidade a separação de pequenos fragmentos de DNA de cadeia dupla. Os géis utilizados, com espessura de 3 mm, possuíam uma concentração de 15% poliacrilamida (razão acrilamida/bisacrilamida 29:1) em TBE (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA-NaOH, pH 8.0). A separação electroforética dos fragmentos de DNA foi realizada na presença do tampão TBE. O gel foi submetido a uma pré-corrída realizada durante 30 min a 100 V. As amostras de DNA foram ressuspendidas em 50 mM EDTA-NaOH, pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6% glicerol, 0.05% azul de bromofenol e 0.05% de xilenocianol e aplicadas no gel. No final da electroforese, as bandas de DNA foram visualizadas por irradiação com luz ultra-violeta (Chory e Pollard, 1999). A zona do gel contendo o DNA foi cortada, o DNA foi eluído do gel com uma solução de 1 M NaCl e precipitado com etanol.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da Pex5p peroxissomal

4.1.1. Localização subcelular da Pex5p

A Pex5p é uma proteína com uma localização predominantemente citosólica mas com uma pequena fracção associada ao peroxissoma (Dodt *et al.*, 1995; Van der Klei *et al.*, 1995; Dodt e Gould, 1996; Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996; Wimmer *et al.*, 1998; De Walque *et al.*, 1999; Jardim *et al.*, 2000; Harano *et al.*, 2001). O primeiro passo realizado no sentido da caracterização da Pex5p de fígado de rato consistiu em determinar a percentagem de Pex5p que co-sedimenta com os peroxissomas e a que se encontra no citosol. Neste contexto, quantidades determinadas de peroxissomas purificados e de homogeneizado total de fígado de rato foram analisadas por *western-blotting* utilizando o anticorpo produzido contra a Pex5p (Figura 7A). Os valores obtidos por análise densitométrica dos *western-blots* permitiram determinar qual a quantidade de Pex5p associada aos peroxissomas, tendo em consideração que a proteína peroxissomal corresponde a 2% da proteína total de fígado de rato (Hartl *et al.*, 1985). Assim, cerca de 15% da Pex5p localiza-se no peroxissoma, encontrando-se os restantes 85% no citosol. De igual forma, analisaram-se por *western-blotting*, utilizando o anticorpo anti-Pex5p, quantidades determinadas de peroxissomas purificados de fígado de rato e da proteína de fusão MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ (Figura 7B). A análise densitométrica do resultado obtido revelou que a abundância da Pex5p no peroxissoma é cerca de 0.6 ng de Pex5p por micrograma de proteína peroxissomal. É de notar que este valor deve ser considerado como valor mínimo, uma vez que o anticorpo dirigido contra a Pex5p humana pode reconhecer menos intensamente a proteína de rato.

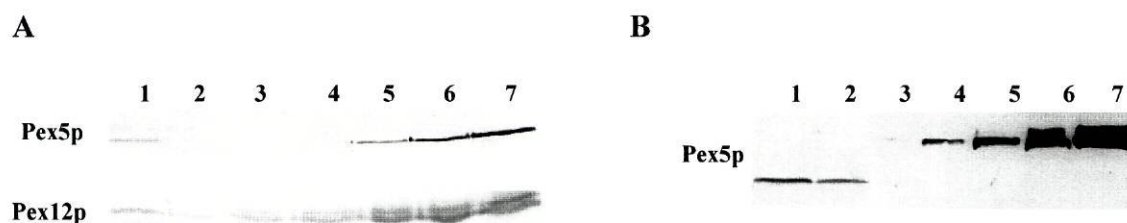


Figura 7. Uma fracção da Pex5p encontra-se associada ao peroxissoma

A. Análise por *western-blotting*, utilizando os anticorpos anti-Pex5p e anti-Pex12p, de 100 µg de homogeneizado total (linha 1) e de quantidades crescentes de peroxissomas purificados de fígado de rato (1, 3, 8, 16, 32 e 80 µg de proteína peroxissomal aplicadas nas linhas 2 a 7, respectivamente). **B.** Peroxissomas purificados de fígado de rato (70 e 35 µg nas linhas 1 e 2, respectivamente) e quantidades crescentes da proteína de fusão MBP-Pex5p₁₄₂₋₆₃₉ humana (11, 33, 100, 300 e 900 ng de proteína nas linhas 3 a 7, respectivamente) foram analisados por *immunoblotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p imunopurificado. É de notar que este anticorpo não reage com a proteína MBP.

O passo seguinte baseou-se na determinação da localização específica da Pex5p associada ao peroxissoma. Este aspecto foi abordado realizando extracções a baixa e elevada força iónica ou a pH alcalino de peroxissomas purificados. A análise da Figura 8A mostra que a enzima catalase se encontra sempre na fracção solúvel, comportamento esperado para uma proteína da matriz do peroxissoma. A subunidade F1 α do complexo ATPase mitocondrial é extraída a pH 11.5 mas permanece associada à membrana após extracção salina, apresentando o comportamento típico de uma proteína periférica de membrana. Por outro lado, a Pex5p peroxissomal, tal como a Pex13p e a Pex12p (duas proteínas intrínsecas de membrana), não é extraída do peroxissoma em nenhuma das condições anteriores, ou seja, a Pex5p peroxissomal comporta-se como uma proteína intrínseca de membrana. Esta característica observada para a Pex5p não é facilmente justificável face ao modelo de importe proteico actualmente aceite (secção 1.3.8) e ao facto de que a Pex5p não apresenta quaisquer domínios transmembranares putativos. Assim, colocaram-se duas hipóteses para a obtenção do resultado anterior: a Pex5p sedimenta pelo facto de não ser solúvel nas condições descritas ou por estabelecer uma ligação tiol com proteínas da membrana do peroxissoma.

Para testar a primeira hipótese, peroxissomas incubados a pH alcalino foram sujeitos a flutuação em gradiente de densidade alcalino (Gouveia *et al.*, 1999). A análise por *western-blotting* das fracções recolhidas do gradiente revelou que a Pex5p se

encontra nas fracções do topo, tal como a Pex12p (Figura 8B) e todas as outras proteínas intrínsecas de membrana (Gouveia *et al.*, 1999). As proteínas da matriz do peroxissoma, tal como a catalase, permanecem no fundo do gradiente.

O segundo ponto foi abordado tratando-se peroxissomas com e sem DTT antes destes serem sujeitos a análise por SDS-PAGE. Nestas condições, o comportamento da Pex5p peroxissomal não é alterado (Figura 8C) o que indica que a Pex5p não estabelece nenhuma ponte dissulfureto com proteínas da membrana peroxissomal. A Pex5p associada aos peroxissomas é, sem dúvida, uma proteína intrínseca de membrana.

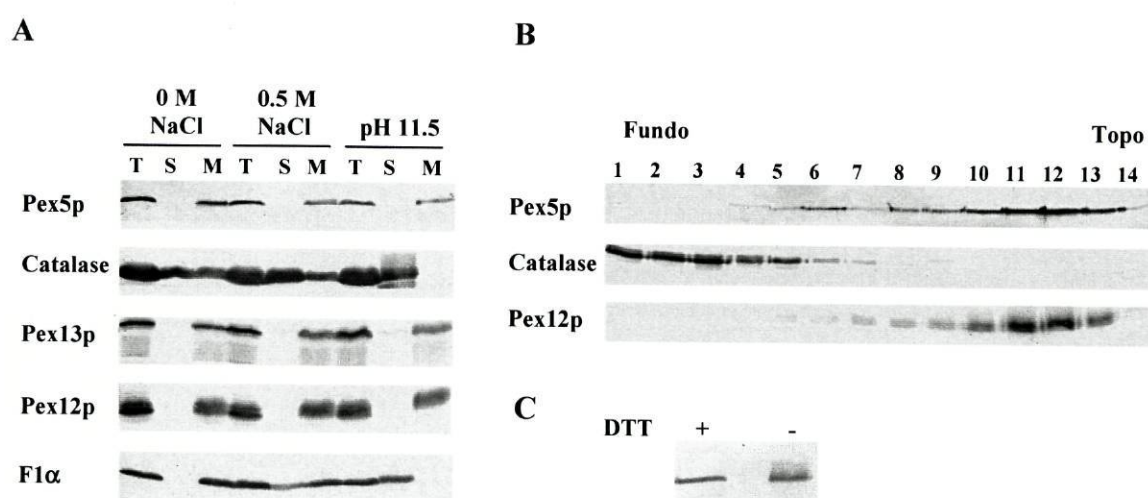


Figura 8. A Pex5p peroxissomal é uma proteína intrínseca de membrana

A. Peroxissomas purificados de fígado de rato (200 μ g) foram sonicados na presença do tampão SEI (linhas 0 M NaCl), SEI com 0.5 M NaCl (linhas 0.5 M NaCl) ou foram ressuscitados em 0.1 M Na_2CO_3 , pH 11.5 (linhas pH 11.5). Metade das amostras (correspondendo a 100 μ g de proteína peroxissomal) foi mantida em gelo para determinação de rendimentos de extração (linhas T). A outra metade foi centrifugada 1 h a 135 000 g de modo a se obter uma fracção membranar (linhas M) e uma solúvel (linhas S). Após precipitação com TCA, as amostras foram analisadas por *western-blotting* utilizando os anticorpos anti-Pex5p, catalase, Pex13p, Pex12p e F1 α . **B.** Peroxissomas (2 mg) foram sujeitos a flutuação em gradiente alcalino de densidade. Após fraccionamento do gradiente e precipitação das amostras com TCA, quantidades equivalentes de cada fracção (derivadas de 150 μ g de proteína peroxissomal) foram analisadas por *western-blotting* utilizando os anticorpos dirigidos contra a Pex5p, catalase e Pex12p. **C.** Peroxissomas de fígado de rato (80 μ g) foram ressuscitados em tampão de solubilização de amostras, com ou sem DTT (100 mM), como indicado na figura. A análise das amostras foi realizado por *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p.

4.1.2. Topologia da Pex5p peroxissomal

Uma vez que em peroxissomas de fígado de rato a Pex5p se encontra integrada na membrana, a questão levantada no seguimento do trabalho prendeu-se com a topologia da proteína. A metodologia utilizada para se determinar a topologia da Pex5p peroxissomal baseou-se em experiências de *protease protection assays*. Assim, peroxissomas de fígado de rato foram digeridos com diferentes quantidades de proteinase K. Após inactivação da protease, as proteínas foram precipitadas com TCA e analisadas por *western-blotting* usando os anticorpos anti-Pex13p e Pex5p (Figura 9). A análise dos resultados obtidos por digestão proteolítica de peroxissomas intactos demonstra que a Pex5p apresenta um pequeno domínio de cerca de 2 kDa que é completamente degradado a concentrações mais elevadas de proteinase K. Quando a matriz do peroxissoma é exposta à acção da protease, quer por solubilização da membrana com Triton X-100, quer por perda da integridade por sonicação, a Pex5p é totalmente digerida. Estes resultados indicam que a Pex5p é uma proteína transmembranar.

Nestas experiências, a Pex13p foi utilizada como controlo, uma vez que existem na literatura alguns dados sobre a sua topologia. A Pex13p humana é uma proteína intrínseca de membrana que apresenta, pelo menos, o domínio SH3 C-terminal exposto para o citosol (Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996). Confirmando este resultado, parte da Pex13p é digerida quando peroxissomas intactos são tratados com proteinase K, permanecendo intacto um domínio de aproximadamente 28 kDa. Este polipéptido é digerido apenas quando a membrana peroxissomal é destruída.

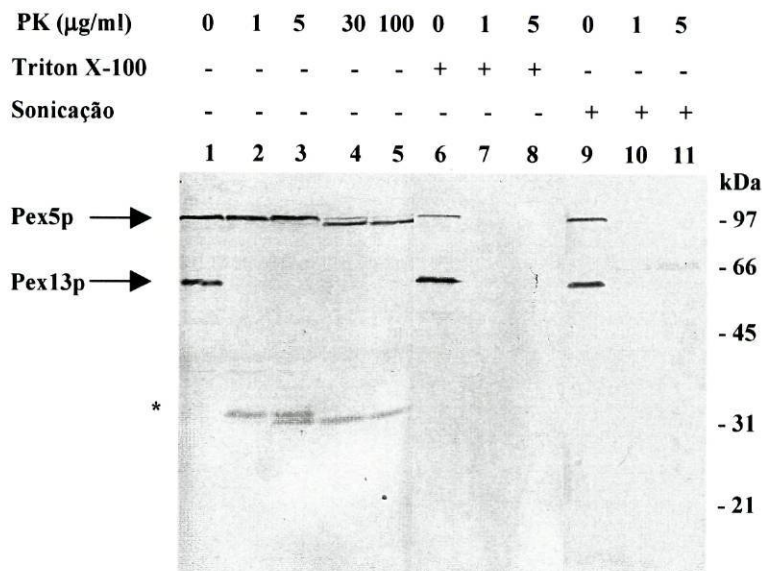


Figura 9. A Pex5p peroxissomal é uma proteína transmembranar

Peroxisomas (100 µg) isolados no próprio dia e ressuspendidos cuidadosamente em SEI foram incubados em gelo durante 30 min com diferentes quantidades de proteinase K. Algumas amostras foram tratadas com Triton X-100 (concentração final 0.1%) e outras foram sonicadas, tal como indicado na figura. Após inativação da protease, as proteínas foram precipitadas com TCA e analisadas por *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p. A mesma membrana de nitrocelulose foi posteriormente incubada com o anticorpo anti-Pex13p. O asterisco representa os fragmentos da Pex13p obtidos após digestão com PK. Os números à direita representam as massas moleculares (em kDa) dos marcadores utilizados.

Apesar de se ter determinado que um pequeno fragmento de 2 kDa da Pex5p peroxissomal se encontra exposto para o citosol, os resultados anteriores não permitiram localizar este domínio na sequência da Pex5p. Na tentativa de se clarificar a topologia da Pex5p utilizaram-se as propriedades proteolíticas da enzima Genenase I. Esta protease cliva uma única vez a proteína de fusão GST-Pex5p_{FL} e a Pex5p sintetizada *in vitro* na presença de [³⁵S]Met, tal como se pode concluir por análise da Figura 10A. A análise por *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-GST e a determinação do tamanho dos fragmentos obtidos após digestão da proteína de fusão com a Genenase I, permitiram concluir que esta enzima corta no N-terminal da Pex5p. Este resultado possibilitou a elaboração de uma nova experiência com vista à identificação da extremidade da Pex5p que é clivada pela proteinase K. Assim, peroxissomas intactos foram digeridos com a proteinase K e, seguidamente, com a Genenase I. Verificou-se que após digestão com proteinase K, a Pex5p deixa de ser sensível à acção da

Genenase I (Figura 10B), o que indica que ambas as proteases clivam a Pex5p na mesma extremidade, ou seja, no N-terminal que se encontra exposto para o citosol.

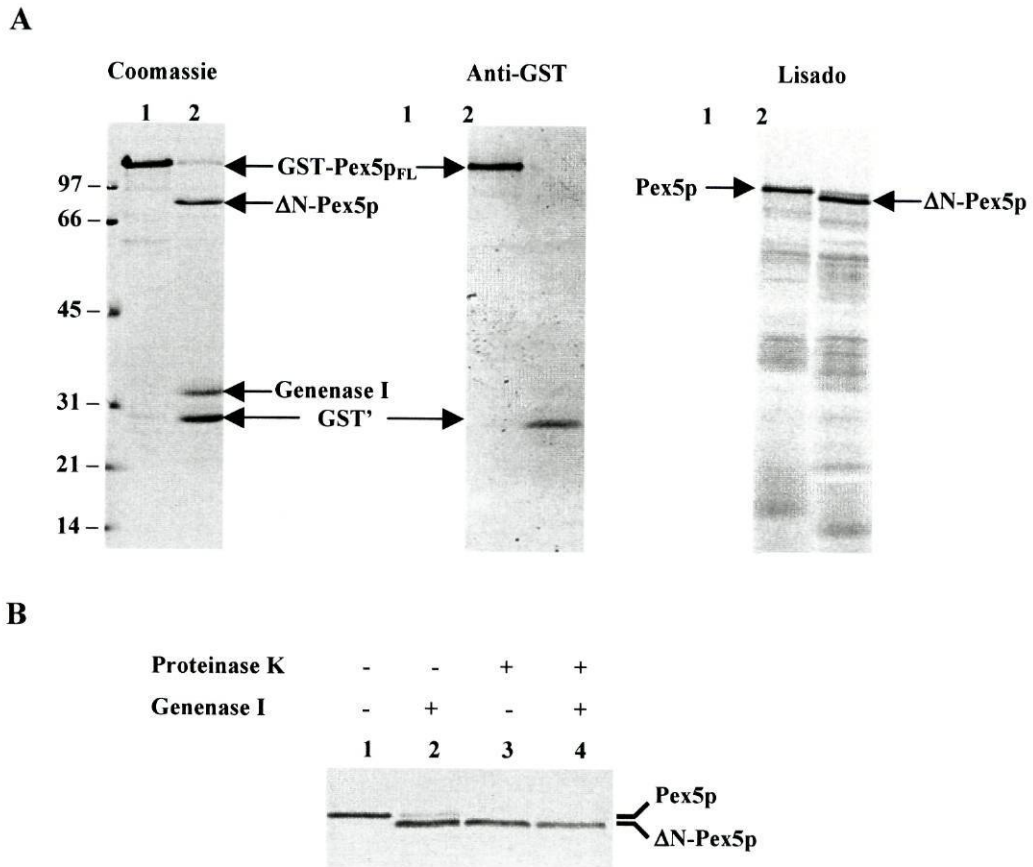


Figura 10. O N-terminal da Pex5p encontra-se exposto para o citosol

A. A proteína de fusão GST-Pex5p_{FL} (2 µg/linha) e a proteína sintetizada *in vitro* ³⁵S-Pex5p (1 µl de lisado de reticulócitos/linha) foram incubadas em 40 µl de solução de digestão da Genenase I na ausência (linhas 1) ou presença (linhas 2) de Genenase I. No final da digestão, as amostras foram precipitadas com TCA e analisadas por SDS-PAGE. A digestão da GST-Pex5p_{FL} foi monitorizada por coloração com azul de Coomassie (Coomassie) ou por *western-blotting* usando o anticorpo anti-GST (anti-GST). ΔN-Pex5p representa a Pex5p clivada no seu N-terminal; GST' representa a proteína GST com alguns aminoácidos da Pex5p no C-terminal. Os números indicados à esquerda representam a massa molecular, em kDa, dos marcadores aplicados. **B.** Peroxissomas purificados a partir de fígado de rato (100 µg) foram incubados na ausência (linhas 1 e 2) ou presença (linhas 3 e 4) de proteinase K durante 30 min a 4°C. A protease foi inibida com PMSF, os organelos foram reisolados por centrifugação e ressuspendidos na solução de digestão da Genenase I. Após 30 min a 23°C, a protease foi inibida com TCA, as proteínas foram precipitadas e analisadas por *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p.

A descoberta das propriedades proteolíticas da Genenase I (e também da proteinase K) sobre a Pex5p resultou de uma análise intensa da acção de inúmeras proteases em peroxissomas de fígado de rato. Nestes estudos, verificou-se também que a protease tripsina não cliva a Pex5p em peroxissomas intactos, mesmo a concentrações elevadas (até 100 µg/ml). Contudo, nestas condições, a Pex13p é parcialmente digerida originando o fragmento de baixa massa molecular. As propriedades da tripsina sobre as duas peroxinas referidas foram utilizadas para determinar se a Pex5p permanecia integrada na membrana peroxissomal na ausência do(s) domínio(s) citosólico(s) da Pex13p. É de notar que uma interacção directa entre o complexo Pex5p-proteína possuidora de PTS1 e o domínio citosólico da Pex13p tem sido descrita durante o processo de *docking* da importação peroxissomal (Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996; Erdmann e Blobel, 1996; Girzalsky *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2000; Bottger *et al.*, 2000; Barnett *et al.*, 2000). Por outro lado, a estrutura primária da Pex5p não apresenta nenhum domínio transmembranar putativo que justifique a sua localização membranar. A forte interacção com a membrana peroxissomal deve, por isso, ser mediada por um ou vários componentes proteicos.

Assim, após incubação de peroxissomas intactos com tripsina e inactivação da protease, os organelos foram sujeitos a uma extracção alcalina de modo a se isolarem as proteínas intrínsecas de membrana. Como se pode ver na Figura 11, linha M, o fragmento de 30 kDa da Pex13p resistente à digestão da tripsina apresenta ainda as características típicas de um componente intrínseco de membrana, de acordo com o modelo topológico da Pex13p. A Pex5p permaneceu também resistente à extracção alcalina, o que sugere que o domínio citosólico da Pex13p não é necessário para manter a Pex5p fortemente associada à membrana peroxissomal.

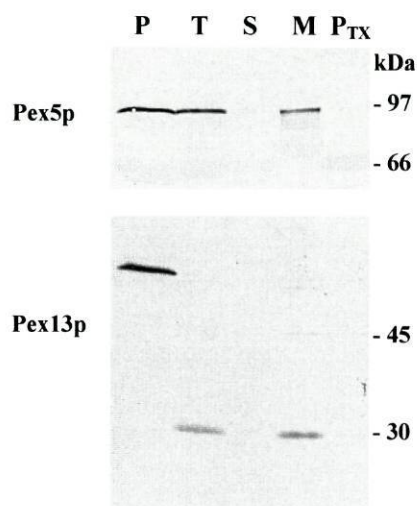


Figura 11. A Pex5p permanece fortemente associada à membrana na ausência do(s) domínio(s) citosólico(s) da Pex13p

Peroxisomas purificados a partir de fígado de rato (200 µg) foram tratados com tripsina (50 µg/ml) durante 30 min em gelo. Após inibição da tripsina, os peroxissomas foram sujeitos a tratamento alcalino por diluição com carbonato de sódio 0.1 M, pH 11.5, e mantidos em gelo durante 30 min. Metade da amostra foi centrifugada a 135 000 g durante 1 h a 4 °C e as proteínas membranares (M) e solúveis (S) foram analisadas. A outra metade da amostra foi mantida em gelo para determinação de rendimentos (T). As linhas P e P_{TX} representam 100 µg de peroxissomas intactos não tratados com tripsina ou solubilizados com TX-100 e incubados com tripsina, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas por *western-blotting* usando os anticorpos anti-Pex5p e Pex13p. Os números à direita indicam as massas moleculares dos marcadores utilizados.

4.1.3. Análise da massa molecular aparente da Pex5p no estado nativo

Para além da interacção com a Pex13p, a Pex5p tem sido envolvida numa rede complexa de muitas outras interacções, quer ao nível citosólico, quer ao nível da membrana peroxissomal. No entanto, pouco se sabe acerca da estrutura e composição do(s) complexo(s) proteico(s) envolvendo a Pex5p.

Neste sentido, realizaram-se experiências que visaram a determinação da massa nativa da Pex5p por centrifugação de peroxissomas solubilizados ou de citosol em gradientes de densidade (Figura 12). A análise das fracções dos gradientes por *western-blotting*, usando o anticorpo contra a Pex5p, revelou que esta proteína existe no peroxissoma sob a forma de um complexo de elevada massa molecular (cerca de

250 kDa). No entanto, a Pex5p citosólica revelou-se monomérica. Como controlo, analisou-se o comportamento da catalase, uma proteína homotetramérica presente na matriz do peroxissoma, com cerca de 240 kDa (De Hoop *et al.*, 1993). A existência da catalase na fracção citosólica resulta, muito provavelmente, da quebra de alguns peroxissomas durante o processo de isolamento peroxissomal, com subsequente libertação das proteínas matriciais para o citosol.

A observação de que a Pex5p peroxissomal é um componente integrante de um complexo de elevada massa molecular, ao nível da membrana do organelo, foi o ponto de partida para a elaboração de um projecto de investigação que levou ao isolamento e caracterização deste complexo proteico. Verificou-se que a Pex5p faz parte de um complexo estável envolvendo a Pex14p, Pex12p e Pex2p (Reguenga *et al.*, 2001; Reguenga, 2002).

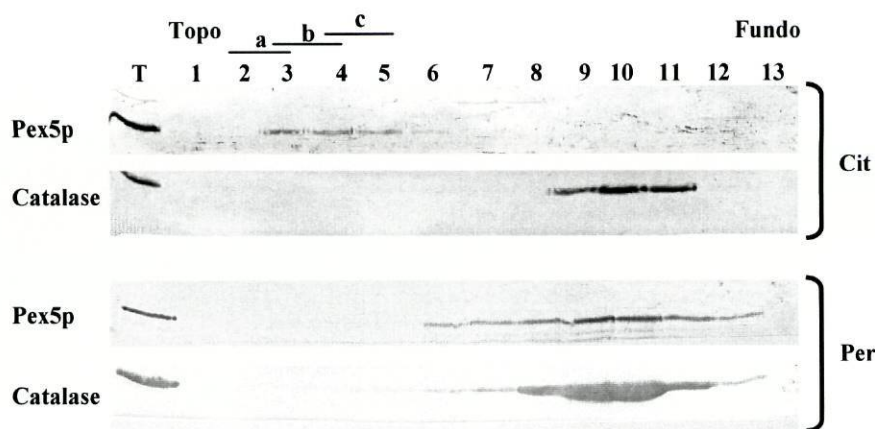


Figura 12. A Pex5p peroxissomal faz parte de um complexo de elevada massa molecular

Peroxisomas (Per) e uma fracção citosólica (Cit) (200 µg de proteína) foram incubados com um detergente suave (Triton X-100) e foram submetidos a centrifugação em gradiente de sacarose. As fracções dos gradientes foram analisadas por *western-blotting* utilizando os anticorpos anti-Pex5p e anti-catalase. A linha marcada por "T" corresponde a 40 µg de proteínas peroxissomais (Per) ou citosólicas (Cit). As letras a-c indicam a posição dos marcadores de massa molecular usados para calibrar o gradiente: a- ovalbumina da clara do ovo (45 kDa); b- albumina sérica bovina (66 kDa); c- fosforilase b do músculo de coelho (97 kDa). O marcador de 470 kDa (miosina) foi encontrado no sedimento do gradiente.

4.2. Caracterização do sistema de importação *in vitro* da Pex5p

De acordo com o modelo actualmente aceite de importação proteica peroxissomal (Figura 6) (Sacksteder e Gould, 2000; Gould e Collins, 2002), a Pex5p circula entre o citosol e o peroxissoma endereçando para o organelo proteínas possuidoras de PTS1 sintetizadas *de novo*. O facto de a Pex5p peroxissomal apresentar as características de uma proteína intrínseca de membrana levantou a hipótese de se estar a analisar um passo intermediário do processo de translocação peroxissomal envolvendo a Pex5p.

Assim, o passo seguinte consistiu em caracterizar o mecanismo de importação das proteínas matriciais que apresenta como proteína central a Pex5p. O conhecimento real sobre este processo, no qual assenta o modelo desenvolvido, é ainda muito reduzido. A grande maioria da informação disponível resulta do estudo dos níveis peroxissomais de Pex5p em linhas celulares deficientes na biogénese peroxissomal (por exemplo, Collins *et al.*, 2000) e na caracterização de interações estabelecidas entre as diversas peroxinas (Fransen *et al.*, 2002). Desenvolver uma metodologia que permitisse o estudo directo e a obtenção de uma perspectiva cinética do processo de importação de proteínas para o peroxissoma tornou-se um objectivo importante a alcançar.

Os sistemas de importação de proteínas *in vitro* para outros organelos têm fornecido dados fundamentais para a compreensão dos mecanismos moleculares de translocação proteica da mitocôndria, cloroplastos e retículo endoplasmático (Baker, 1996). A metodologia desenvolvida nos sistemas de importação *in vitro* para os organelos referidos, serviu de base para a elaboração de um método semelhante que permitisse o estudo da importação proteica peroxissomal.

Relativamente aos sistemas de importação *in vitro* já desenvolvidos para o peroxissoma (secção 1.3.6), a abordagem escolhida apresenta uma diferença fundamental: tentou-se desenvolver um sistema que permitisse estudar a importação do próprio receptor peroxissomal (Pex5p) em vez de se caracterizar a importação de uma proteína possuidora de PTS1 ou PTS2. A vantagem principal desta estratégia reside no facto de que o estudo da importação da Pex5p, considerando que o receptor só é importado quando transporta proteínas a serem endereçadas para a matriz do peroxissoma, ser mais geral e permitir estudar globalmente o processo de importação

peroxissomal em vez de se estudar isoladamente o mecanismo de importe de apenas uma proteína. Por outro lado, as proteínas possuidoras de PTS1 não são proteoliticamente processadas nem pós-traducionalmente modificadas quando são importadas para o peroxissoma (Lazarow e Fujiki, 1985; Swinkels *et al.*, 1991). Portanto, a discriminação de importação proteica depende de estudos de resistência a proteases. A obtenção de um padrão proteolítico específico para a Pex5p integrada na membrana, após digestão com proteinase K, facilitou o desenvolvimento do método de importação *in vitro* da Pex5p.

Como base do sistema peroxissomal de importação *in vitro* utilizou-se um sobrenadante pós-nuclear (PNS). A utilização deste tipo de material (em vez de peroxissomas purificados em conjunto com uma fração citosólica) aumenta a probabilidade de todos os componentes necessários para a importação da Pex5p estarem presentes no sistema de importação. Por outro lado, se se verificar importação específica para o peroxissoma utilizando um material de complexidade elevada como o PNS, que contém praticamente todos os organelos presentes num hepatócito, então será de esperar que o sistema *in vitro* reflecta o processo *in vivo*.

4.2.1. Determinação da dependência energética do sistema de importação *in vitro* e da topologia membranar da Pex5p importada *in vitro*

Com o intuito de se testar a validade do referido sistema de importação *in vitro* da Pex5p, começou-se por determinar a dependência energética do processo de importação da Pex5p sintetizada *in vitro* na presença de [³⁵S]Met.

Assim, a proteína ³⁵S-Pex5p foi incubada com PNS, na solução de importação, na presença de 1 mM ATP, ATPγS ou na ausência de nucleótidos exógenos. Após 30 min a 26°C, os organelos foram incubados com proteinase K (de modo a degradar toda a ³⁵S-Pex5p que não tivesse sido importada), isolados por centrifugação e analisados em SDS-PAGE (ver Figura 13A).

Na presença de ATP exógeno (Figura 13A, linha 2), uma fracção da Pex5p marcada radioactivamente resiste ao processo de digestão com a proteinase K e

apresenta a mesma topologia que a proteína endógena de peroxissomas purificados de fígado de rato (ver secção 4.1.2). A Figura 13B mostra ainda que a Pex5p importada não é posteriormente clivada com a Genenase I após digestão com a proteinase K. Estes resultados indicam que, tal como para a proteína endógena, é o N-terminal da ^{35}S -Pex5p que se encontra exposto para o citosol. Concluindo, os resultados anteriores sugerem que a Pex5p foi correctamente inserida na membrana peroxissomal.

Na ausência de nucleótidos exógenos, identificam-se duas populações de Pex5p após digestão com a proteinase K (Figura 13A, linha 1). Uma delas é completamente resistente, enquanto que a outra é parcialmente acessível à acção da protease, sendo digeridos cerca de 2 kDa. Por razões que serão evidenciadas na secção 4.2.4, denominou-se a primeira população por etapa 3 da Pex5p e a segunda por etapa 2 da Pex5p. Quando se incorpora $\text{ATP}\gamma\text{S}$, um análogo não hidrolisável do ATP, no sistema de importação, a quantidade de ^{35}S -Pex5p resistente à acção da proteinase K diminui significativamente (Figura 13A, linha 3). Estes resultados indicam uma dependência de ATP no processo de translocação da Pex5p, e sugerem que os níveis endógenos de ATP (presentes na fracção de PNS e no lisado de reticulócitos) são suficientes para promover o processo.

Uma inibição semelhante à obtida com o $\text{ATP}\gamma\text{S}$ na importação da ^{35}S -Pex5p foi obtida utilizando AMP-PNP (outro análogo do ATP não hidrolisável) ou tratando os componentes da reacção com apirase (enzima com actividade de ATPase e ADPase) (resultados não mostrados).

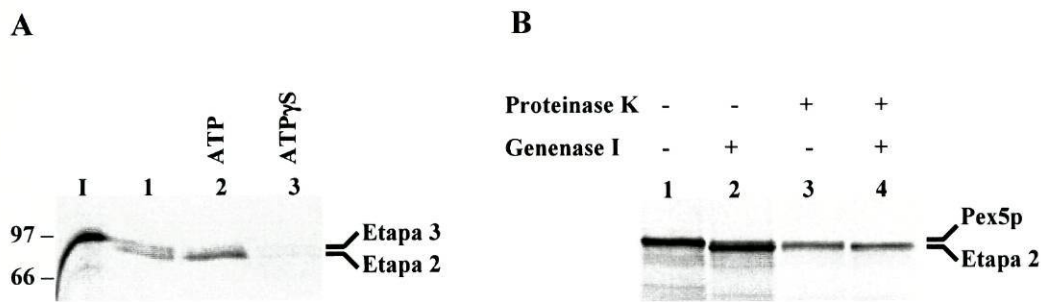


Figura 13. A importação da Pex5p marcada com [^{35}S]Met é dependente de ATP

A. A proteína Pex5p sintetizada *in vitro* na presença de [^{35}S]Met foi incubada com uma fracção de PNS em solução de importação contendo 1 mM ATP (linha 2), 1 mM ATPγS (linha 3) ou sem nucleótidos exógenos (linha 1). No final da incubação, as amostras foram tratadas com proteinase K, os organelos foram sedimentados por centrifugação, as proteínas analisadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. O sinal da ^{35}S -Pex5p foi detectado por auto-radiografia. A linha I representa 5% da quantidade de ^{35}S -Pex5p utilizada em cada reacção de importação. Os números indicados à esquerda representam a massa molecular, em kDa, dos marcadores aplicados. **B.** A proteína ^{35}S -Pex5p foi incubada com PNS em solução de importação na presença de 1 mM ATP. Após importação, os organelos foram isolados por centrifugação e ressuspensos em solução SEM. Metade da amostra foi tratada com proteinase K (linhas 3 e 4). Adicionou-se PMSF a todas as amostras, os organelos foram re-isolados por centrifugação, ressuspensos na solução da Genenase I e incubados com esta protease (2 U/digestão) durante 30 min a 23°C. Após precipitação com TCA, as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. O sinal da proteína ^{35}S -Pex5p foi detectado por auto-radiografia.

Uma das limitações inerentes ao facto de se terem realizado experiências de topologia analisando por *western-blotting* o comportamento da proteína endógena residiu no facto de não se conhecerem os epítomos que o anticorpo anti-Pex5p reconhece. Em experiências anteriores, o grau de exposição da Pex5p na matriz do peroxissoma ficou por determinar.

Com o intuito de se abordar este assunto, experiências de importação *in vitro* foram realizadas na ausência de ATP exógeno, de modo a se obter a Pex5p nas etapas 2 e 3. Após importação, os organelos foram isolados por centrifugação, ressuspensos com o máximo de cuidado e digeridos com proteinase K. Quando os organelos deixam de estar intactos porque a membrana é solubilizada com detergente ou perde integridade por sonicação, a Pex5p é digerida sendo apenas visualizados alguns péptidos de baixa

massa molecular (Figura 14). Estes resultados indicam que a maior parte da Pex5p se encontra voltada para a matriz do peroxissoma.

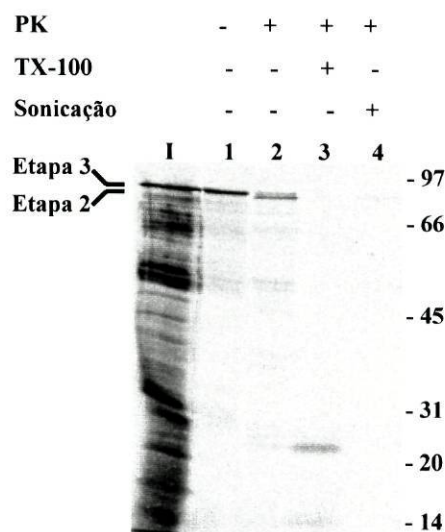


Figura 14. A maior parte da Pex5p encontra-se na matriz peroxissomal

A proteína ^{35}S -Pex5p foi incubada com PNS (600 μg) em solução de importação na ausência de ATP exógeno durante 30 min a 26°C. Os organelos foram isolados por centrifugação e ressuspendidos em SEM. A amostra foi dividida em quatro alíquotas iguais e três delas foram digeridas com proteinase K (linhas 2-4). Uma das alíquotas foi tratada com TX-100 (linha 3) e outra foi sonicada logo após adição da protease (linha 4). Após precipitação com TCA, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Uma auto-radiografia da membrana é mostrada. A linha I representa ^{35}S -Pex5p (1% da quantidade incluída na reação de importação). Os números à direita indicam a massa molecular, em kDa, dos padrões utilizados.

4.2.2. Especificidade organelar do sistema de importação *in vitro* da Pex5p

Com o intuito de se determinar qual a localização subcelular da ^{35}S -Pex5p importada *in vitro*, realizaram-se experiências de centrifugação em gradientes de Nycodenz, um método que permite a separação dos diversos organelos, em particular dos peroxissomas, de acordo com a sua densidade.

Assim, experiências de importação *in vitro* foram realizadas na presença ou ausência de ATP. No final da reação as amostras foram divididas e uma metade foi tratada com proteinase K (a outra metade recebeu apenas a mesma quantidade da

solução em que a proteinase K foi ressuspensa). As amostras foram centrifugadas em gradientes de Nycodenz, os gradientes foram fraccionados e as várias fracções analisadas por SDS-PAGE. A distribuição subcelular da Pex5p sintetizada *in vitro*, da Pex14p e de várias enzimas controlo é apresentada na Figura 15. Por análise dos painéis A e B da figura referida, a catalase e a Pex14p apresentam uma distribuição bimodal no gradiente. Uma fracção, correspondendo a peroxissomas altamente purificados, é recuperada nas fracções 2 e 3. Nestas fracções a actividade da catalase é elevada, sendo quase nula a actividade das enzimas marcadoras de outros organelos celulares, nomeadamente da citocromo c-oxidase (mitocôndria), esterase (retículo endoplasmático) e β -glucuronidase (lisossoma). Outra fracção da catalase e da Pex14p permanece no topo do gradiente, representando provavelmente a existência de peroxissomas de menor densidade (Luers *et al.*, 1993) e/ou proteínas resultantes da quebra de alguns peroxissomas. A proteína ^{35}S -Pex5p importada *in vitro* na presença de ATP, apresenta uma distribuição mais assimétrica (painel C). A maior parte da proteína encontra-se presente no topo do gradiente representando principalmente proteína não importada. No entanto uma pequena fracção é encontrada nas fracções 2 e 3, indicando que uma parte da ^{35}S -Pex5p foi importada para os peroxissomas. Quando reacções de importação tratadas com proteinase K são analisadas pelo mesmo processo, uma situação de certo modo semelhante ao comportamento da Pex14p endógena é observada. O comportamento da etapa 2 da Pex5p (painel D) e das etapas 2 e 3 da Pex5p (painel E) indica que quer os peroxissomas purificados (fracções 2 e 3) quer os peroxissomas de menor densidade (topo do gradiente) são competentes no que diz respeito à importação da ^{35}S -Pex5p.

Assim, todos os resultados obtidos indicam que a ^{35}S -Pex5p é especificamente importada para os peroxissomas.

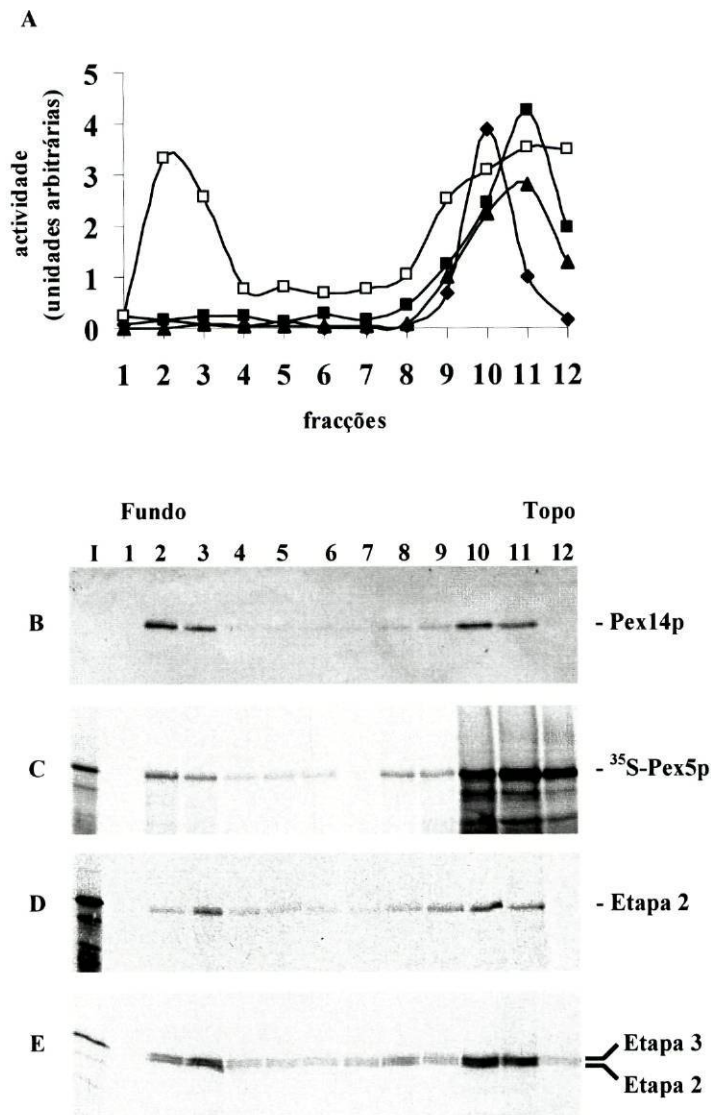


Figura 15. A ³⁵S-Pex5p é especificamente importada *in vitro* para os peroxissomas

Reacções de importação foram realizadas incubando 1.5 mg de PNS com ³⁵S-Pex5p na presença (painéis A-D) ou ausência (painel E) de 1 mM ATP. No final da incubação a 26°C, algumas amostras foram tratadas com proteinase K (painéis D e E) e seguidamente todas as amostras foram aplicadas no topo de gradientes de Nycodenz. Após centrifugação a 60 000 g durante 45 min a 4°C, os gradientes foram fraccionados desde o fundo (fracção 1) até ao topo (fracção 12) e a distribuição da ³⁵S-Pex5p (painéis C-E), da Pex14p endógena (painel B) e de várias enzimas marcadoras da localização de diversos organelos celulares (painel A) foram analisadas. ■- esterase (retículo endoplasmático); ▲- β-glucuronidase (lisossoma); ◆- citocromo c-oxidase (mitocôndria); □- catalase (peroxissoma). Na linha I foi aplicado lisado de reticulócitos contendo a ³⁵S-Pex5p.

4.2.3. Inibição do processo de importação *in vitro* da ^{35}S -Pex5p utilizando a GST-Pex5p_{FL}

A proteína de fusão GST-Pex5p_{FL} mostrou-se uma ferramenta muito útil no estudo do processo de importação *in vitro* da Pex5p. Verificou-se que esta proteína possui a capacidade de inibir fortemente a importação da ^{35}S -Pex5p (ver Figura 16A). Quer na ausência, quer na presença de ATP, quando a proteína de fusão é adicionada juntamente com a proteína radioactiva na reacção de importação ($t = 0$ min), a importação da ^{35}S -Pex5p para os peroxissomas é praticamente nulo.

Por outro lado, quando a importação da ^{35}S -Pex5p ocorre durante um certo período de tempo após o qual se adiciona a proteína de fusão GST-Pex5p_{FL} ou a GST (como controlo), verificam-se duas situações diferentes. Na ausência de ATP exógeno, a quantidade de ^{35}S -Pex5p presente na membrana peroxissomal mantém-se constante ao longo do tempo após adição da GST-Pex5p_{FL}. Pelo contrário, na presença de ATP exógeno a Pex5p importada *in vitro* (na etapa 2) diminui ao longo do tempo (ver Figura 16B). Para interpretar e explicar este resultado duas hipóteses podem ser colocadas. Por um lado, a GST-Pex5p_{FL} pode estar a desalojar a ^{35}S -Pex5p da membrana peroxissomal através de um processo dependente de ATP. Por outro lado, pode-se considerar que a GST-Pex5p_{FL} bloqueou a importação de novas moléculas de ^{35}S -Pex5p e que se está a visualizar a saída da ^{35}S -Pex5p, um mecanismo dependente de ATP. Esta última hipótese será a mais provável, uma vez que experiências analisando a saída da Pex5p do peroxissoma, por estudo do comportamento da proteína endógena, indicam a dependência de ATP no processo (ver secção 4.2.5).

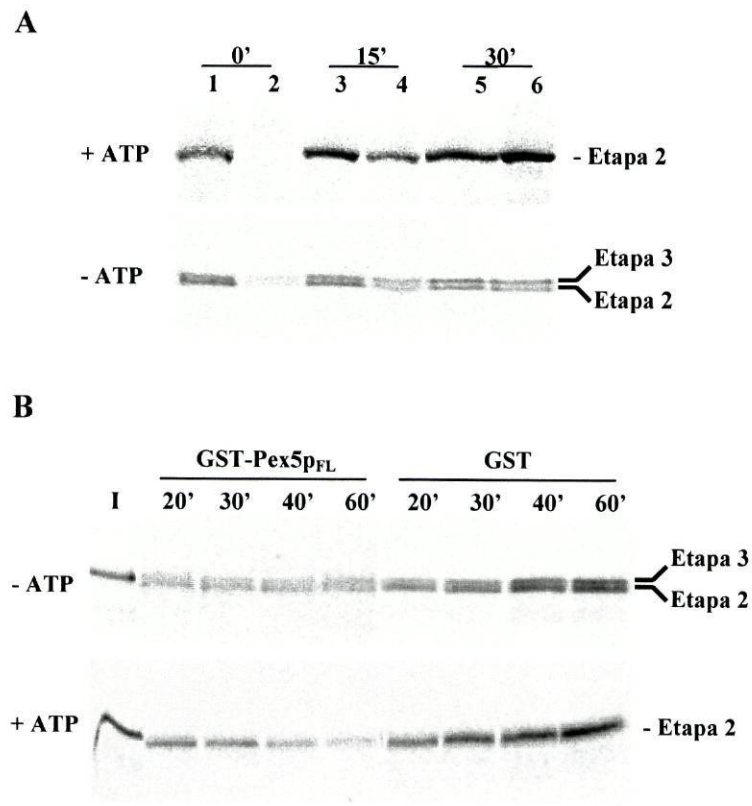


Figura 16. A GST-Pex5p_{FL} bloqueia a importação *in vitro* da ³⁵S-Pex5p

A. As proteínas de fusão GST-Pex5p_{FL} (linhas 2, 4 e 6) ou GST (linhas 1, 3 e 5) foram adicionadas aos tempos indicados (0, 15 ou 30 min) a reações de importação realizadas na presença (painel +ATP) ou ausência de ATP exógeno (painel -ATP). Após 30 min de importação, as amostras foram digeridas com proteinase K, os organelos foram sedimentados por centrifugação e o conteúdo proteico analisado por SDS-PAGE. Depois de transferidas as proteínas para membrana de nitrocelulose, o sinal da ³⁵S-Pex5p foi detectado por auto-radiografia. **B.** Reações de importação foram realizadas na presença (painel +ATP) ou na ausência (painel -ATP) de ATP exógeno durante 18 min. Seguidamente as proteínas GST-Pex5p_{FL} ou GST foram adicionadas às reações e alíquotas iguais foram retiradas aos tempos indicados (20, 30, 40 e 60 min). As amostras foram analisadas como descrito anteriormente. A linha I representa 1% da quantidade de ³⁵S-Pex5p utilizada nas reações de importação.

4.2.4. Inter-relação entre as etapas 2 e 3 do mecanismo de importação *in vitro* da Pex5p

Quando a ³⁵S-Pex5p é importada *in vitro* na ausência de ATP exógeno detectam-se duas formas da Pex5p resistentes à digestão com proteinase K (correspondendo à Pex5p nas etapas 2 e 3), tal como descrito anteriormente. Uma das questões colocadas

no desenrolar deste trabalho consistiu em determinar qual a relação existente entre as duas formas, ou seja, se uma delas aparece primeiro e é precursora da outra, ou não.

Assim, realizou-se uma análise cinética do aparecimento destas duas formas na membrana peroxissomal (ver Figura 17A). Como a razão entre a intensidade das duas bandas não é significativamente diferente nas alíquotas recolhidas aos vários tempos, não se pode claramente estabelecer uma relação entre as duas formas da Pex5p, embora os resultados obtidos pareçam sugerir que a etapa 2 da Pex5p surge anteriormente à etapa 3.

Na tentativa de se esclarecer o assunto anterior, foram realizadas experiências de *pulse-chase* de importação *in vitro* da ^{35}S -Pex5p. A primeira experiência consistiu na importação da ^{35}S -Pex5p para os peroxissomas durante 20 min na ausência de ATP exógeno (*pulse*). Seguidamente adicionou-se GST-Pex5p_{FL} para parar a importação de novas moléculas de ^{35}S -Pex5p. Após 7 min, adicionou-se ATP (1 mM de concentração final) e retiraram-se alíquotas aos 35 e 50 min. Por análise da Figura 17B, verifica-se que a Pex5p nas etapas 2 e 3 sai do peroxissoma, sendo a saída da Pex5p na etapa 3 muito mais rápida. Na segunda experiência, a proteína ^{35}S -Pex5p foi sujeita a uma reacção de importação na presença de 1 mM de ATP exógeno (*pulse*). Após 20 min de importação foi adicionada a GST-Pex5p_{FL} e 7 min depois adicionou-se ATP γ S (concentração final 1 mM) para se realizar o *chase*. A importação da Pex5p na presença de quantidades equimolares de ATP e ATP γ S resulta no surgimento das etapas 2 e 3 (resultados não mostrados). O resultado obtido (Figura 17B) mostra que após adição do ATP γ S, a Pex5p passa parcialmente da etapa 2 para a etapa 3.

Concluindo, estes dados sugerem que a etapa 2 da Pex5p é a precursora da etapa 3 e que a Pex5p na etapa 3 sai da membrana peroxissomal num processo dependente de ATP.

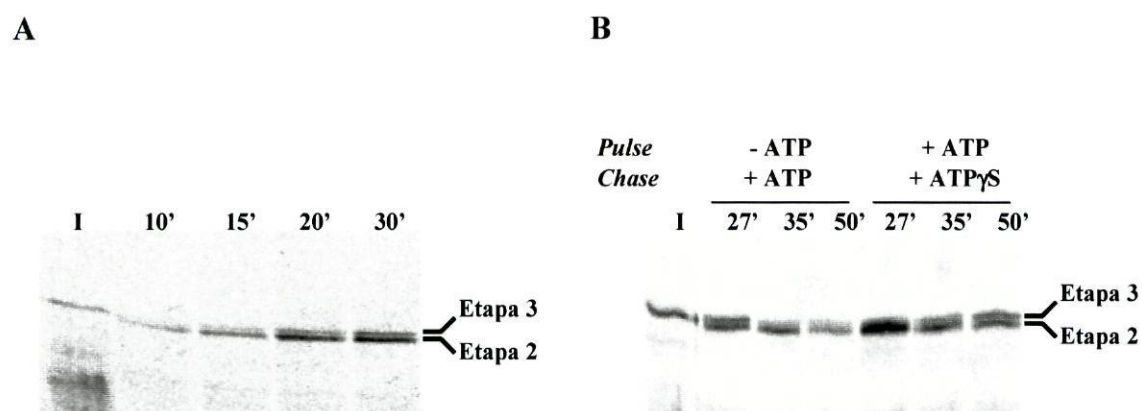


Figura 17. Relação entre as etapas 2 e 3 da Pex5p

A. A proteína ^{35}S -Pex5p foi incubada com 600 μg de PNS em solução de importação na ausência de nucleótidos exógenos. Aos tempos indicados na figura, alíquotas de 150 μg de PNS foram removidas e sujeitas a digestão com proteinase K. A análise do perfil proteico foi realizada por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e o sinal da ^{35}S -Pex5p foi detectado por auto-radiografia. **B.** A proteína ^{35}S -Pex5p foi importada para os peroxissomas na ausência (*pulse -ATP*) ou presença (*pulse +ATP*) de ATP exógeno durante 20 min. A proteína de fusão GST-Pex5p_{FL} foi adicionada a ambas as reacções, de modo a impedir a importação de novas moléculas de Pex5p marcadas radioactivamente, e 7 min depois uma alíquota foi retirada (linhas 27'). Seguidamente adicionou-se ATP (*chase +ATP*) ou ATP γ S (*chase +ATP γ S*), a 1 mM concentração final. Alíquotas das reacções de importação foram retiradas 8 e 23 min depois (linhas 35' e 50', respectivamente). Todas as amostras foram digeridas com proteinase K e o sinal relativo à ^{35}S -Pex5p analisado como descrito no ponto A desta legenda. As linhas I representam 1% da quantidade de ^{35}S -Pex5p utilizada nas reacções de importação.

4.2.5. Análise do processo de saída da Pex5p do peroxissoma

Um dos problemas na análise da importação da Pex5p e da correlação deste processo com a dependência de ATP prende-se com o facto de ser bastante difícil analisar o processo de saída da Pex5p do peroxissoma independentemente do de entrada. Algumas experiências utilizando a ^{35}S -Pex5p foram realizadas neste sentido: a ^{35}S -Pex5p foi sujeita a uma reacção de importação, a proteína não importada foi digerida com tripsina, esta foi inibida, os organelos foram isolados e as condições de importação foram novamente restabelecidas. Tentaram medir-se os níveis de ^{35}S -Pex5p que, na presença de ATP, saíam agora do organelo para o citosol. No entanto estas

experiências não se mostraram viáveis, isto é, a quantidade de Pex5p associada aos organelos permaneceu inalterada em função do tempo, provavelmente porque o mecanismo envolvido na saída da Pex5p do peroxissoma depende de factores proteicos que ficaram inactivos após digestão com tripsina.

Assim, a única estratégia desenvolvida, que se mostrou capaz de analisar a saída da Pex5p da membrana peroxissomal, consistiu na análise da proteína endógena, após incubação dos organelos nas condições normais utilizadas nas experiências de importação *in vitro*. Deste modo, alíquotas de PNS foram incubadas na solução de importação em várias condições energéticas e a diferentes temperaturas. Após 30 min de incubação as amostras foram divididas em duas fracções iguais. Uma fracção das amostras foi digerida com proteinase K, os organelos foram isolados por centrifugação e o comportamento da Pex5p foi analisado por *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p (ver painel A da Figura 18). A Pex5p nas etapas 2 e 3 é detectada em organelos incubados a 4°C na ausência de ATP exógeno (linha 1). Resultados semelhantes são obtidos quando as reacções são realizadas na ausência de nucleótidos exógenos (linha 2) ou na presença de 1 mM ATP γ S (linha 4) a 26°C. Pelo contrário, quando os organelos são incubados a 26°C na presença de 1 mM ATP (linha 3), a razão de sinal entre a Pex5p na etapa 2 e na etapa 3 é muito aumentada, indicando que uma quantidade significativa da Pex5p na etapa 3 foi exportada para o citosol. O outro conjunto de amostras foi directamente centrifugado e a quantidade de Pex5p foi determinada no sedimento organelar (painel C) e no sobrenadante (painel D). Em concordância com os resultados anteriores, a quantidade de Pex5p diminui na fracção organelar e aumenta ligeiramente no sobrenadante, indicando a saída da Pex5p da membrana peroxissomal para o citosol.

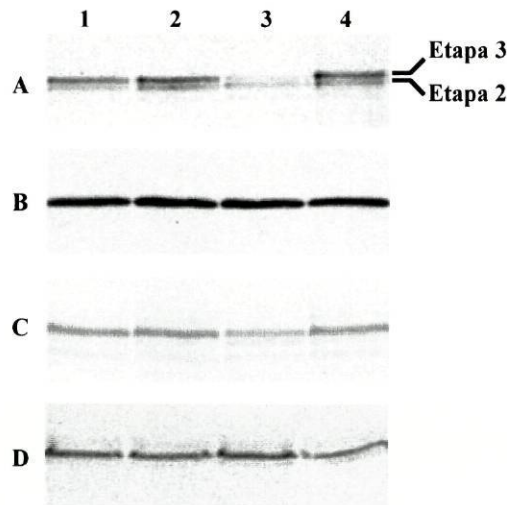


Figura 18. A saída da Pex5p do peroxissoma é dependente de ATP

Aliquotas de PNS (300 µg de proteína) foram incubadas durante 30 min a 4°C (linhas 1) ou a 26°C (linhas 2-4) em solução de importação B na ausência de nucleótidos exógenos (linhas 1 e 2) ou na presença de 1 mM ATP (linhas 3) ou 1 mM ATPγS (linhas 4). No final do tempo de incubação, as amostras foram divididas em duas alíquotas iguais. Uma foi digerida com proteinase K, os organelos foram isolados por centrifugação e sujeitos a *western-blotting* utilizando os anticorpos anti-Pex5p (painel A) e anti-catalase (painel B). A outra metade foi centrifugada e os sedimentos organelares (painel C) e os sobrenadantes (painel D) foram analisados por *western-blotting* utilizando o anticorpo anti-Pex5p.

4.2.6. Caracterização do processo de inserção da Pex5p na membrana peroxissomal

Uma das interações mais estudada, envolvendo a Pex5p, é a estabelecida com a Pex14p, uma proteína proposta como *docking* da Pex5p ao nível da membrana peroxissomal (Albertini *et al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998; Otera *et al.*, 2000). Um complexo proteico envolvendo a Pex5p e a Pex14p foi também descrito em mamíferos, nomeadamente em peroxissomas de fígado de rato (Reguenga *et al.*, 2001; Reguenga, 2002). Assim, um dos aspectos importantes neste trabalho consistiu em determinar qual o papel da Pex14p na importação da Pex5p.

A primeira experiência realizada teve como objectivo determinar se anticorpos produzidos contra a Pex14p tinham alguma interferência no processo de importação *in vitro* da ³⁵S-Pex5p. Neste sentido, fracções de PNS foram incubadas com IgGs purificadas que reagem contra a Pex14p e a PMP70, a proteína mais abundante da

membrana peroxissomal (Kamijo *et al.*, 1990), e posteriormente sujeitas a reacções de importação na ausência de ATP exógeno. Como se pode verificar por análise da Figura 19A, as IgGs anti-Pex14p inibem fortemente a importação da ³⁵S-Pex5p.

Na interpretação deste resultado teve que se considerar a hipótese de que a inibição observada com as IgGs anti-Pex14p podia resultar de um efeito estereoquímico e não de um bloqueamento directo do domínio da Pex14p de ligação à Pex5p. Para testar esta ideia isolaram-se fragmentos Fab a partir das IgGs anti-Pex14p. Apesar dos fragmentos Fab reconhecerem a Pex14p por *western-blotting* tão fortemente como as IgGs (resultados não mostrados), não exercem um efeito inibitório na importação da ³⁵S-Pex5p. Por outro lado, o domínio de ligação da Pex14p à Pex5p (os 78 aminoácidos N-terminais) (Schliebs *et al.*, 1999) provavelmente não se encontra exposto para o citosol (Will *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002). Por isso, quer as IgGs, quer os fragmentos Fab, possivelmente não bloqueiam directamente esse domínio de ligação. As IgGs, por ocuparem um volume maior do que os Fabs, poderão indirectamente impedir a interacção entre a Pex5p e a Pex14p. Assim, estes dados não provam inequivocamente que a Pex14p é a proteína *docking* da Pex5p. Contudo, permitem sugerir que a Pex14p e/ou algum componente ligado à Pex14p ou existente na sua vizinhança está funcionalmente envolvido na importação da Pex5p, mais concretamente na formação das etapas 2 e 3 da Pex5p.

Dados mais conclusivos, demonstrando o envolvimento da Pex14p na importação da Pex5p, resultaram de experiências de imunoprecipitação. Neste sentido, reacções de importação foram realizadas na ausência de ATP exógeno. Após digestão com proteinase K, os organelos foram solubilizados com um detergente suave (que não interfere com as interacções estabelecidas entre a Pex5p e a Pex14p) e a Pex14p foi imunoprecipitada utilizando-se o anticorpo anti-Pex14p. A Figura 19B mostra que a Pex5p (nas etapas 2 e 3) é especificamente co-imunoprecipitada com a Pex14p. Estes resultados indicam que a Pex5p, em ambas as etapas, faz parte do complexo envolvendo a Pex14p.

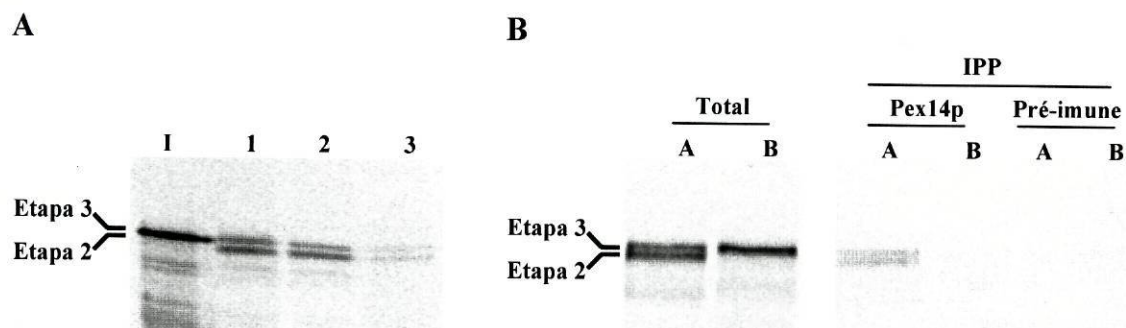


Figura 19. A Pex14p está envolvida no processo de importação *in vitro* da Pex5p

A. Aliquotas de PNS (150 μg de proteína) foram pré-incubadas com IgGs pré-ímmunes (linha 1), anti-PMP70 (linha 2) ou anti-Pex14p (linha 3) e subsequentemente sujeitas a reacções de importação na ausência de nucleótidos exógenos. Após digestão com proteinase K, os organelos foram isolados por centrifugação, o conteúdo proteico foi analisado por SDS-PAGE, transferido para membranas de nitrocelulose e o sinal da ^{35}S -Pex5p detectado por auto-radiografia. Na linha I aplicou-se 5% da proteína ^{35}S -Pex5p utilizada em cada reacção de importação. **B.** Duas alíquotas de 1.3 mg de PNS foram incubadas em solução de importação na presença (amostras A) ou ausência (amostras B) de ^{35}S -Pex5p. Após digestão com proteinase K, 2% da quantidade de lisado de reticulócitos contendo a proteína ^{35}S -Pex5p utilizada na reacção de importação da amostra A foi adicionada à amostra B. Seguidamente, a proteína GST-Pex5p_{FL} foi adicionada a ambas as amostras para evitar interacções entre a Pex5p e a Pex14p, não relacionadas com a importação da Pex5p, que se pudessem estabelecer após solubilização. Os organelos foram então solubilizados e alíquotas correspondentes a 600 μg de proteína inicial foram imunoprecipitadas (IPP) utilizando as IgGs anti-Pex14p (Pex14p, linhas A e B) ou pré-ímmunes (Pré-ímmune, linhas A e B). As linhas indicadas como “Total” correspondem a alíquotas das amostras A e B, equivalentes a 100 μg de PNS, retiradas após o processo de solubilização. O sinal da ^{35}S -Pex5p foi detectado por auto-radiografia, tal como descrito anteriormente. As amostras das linhas indicadas por “IPP” foram sujeitas a um tempo de exposição seis vezes superior relativamente às amostras das linhas “Total”.

4.2.7. Determinação da dependência de carga (proteínas com PTS1) na importação da Pex5p

Para além da interacção estabelecida entre a Pex5p e a Pex14p, a ligação entre a Pex5p e as proteínas detentoras de PTS1 tem sido muito estudada e intensamente descrita. No entanto, não existe nenhuma evidência directa provando que o movimento intracelular da Pex5p esteja directamente acoplado ao transporte de proteínas com PTS1

para a matriz peroxissomal. Este foi um dos objectivos principais a atingir utilizando o sistema de importação *in vitro* da Pex5p.

Assim, a primeira abordagem consistiu em testar se a importação *in vitro* da ³⁵S-Pex5p era estimulado pela presença de proteínas possuidoras de um PTS1. Como se pode concluir por análise da Figura 20, painel A, não existe qualquer estimulação de importação da Pex5p na presença de GST-SKL. Como controlos desta experiência utilizaram-se as proteínas GST e GST-LKS, esta última contendo no seu C-terminal uma sequência não funcional semelhante a SKL (Fransen *et al.*, 1998). A quantidade de GST-SKL utilizada nestas experiências foi de 8 µM, um valor cerca de 100 vezes superior ao da constante de dissociação determinada para o complexo Pex5p-péptido com PTS1 (Harper *et al.*, 2002). Considerando que a Pex5p é uma proteína pouco abundante em fígado de rato, a quantidade utilizada de proteína recombinante seria suficiente para complexar quase toda a Pex5p existente.

Estas experiências foram repetidas utilizando péptidos contendo no seu C-terminal as sequências SKL e LKS (Pep-SKL e Pep-LKS), cuja actividade biológica está bem determinada e documentada (Wendland e Subramani, 1993; Fransen *et al.*, 1998). Novamente não se conseguiu obter nenhuma estimulação da importação da Pex5p na presença de Pep-SKL (ver Figura 20, painel B).

Face a estes resultados, aparentemente negativos, uma hipótese explicativa foi levantada. A quantidade de proteínas possuidoras de PTS1 poderia já ser muito elevada na reacção de importação, de modo que a inserção da Pex5p na membrana não era estimulada por adição de mais SKLs. Para testar esta possibilidade, outra experiência foi idealizada. Desta vez, antes de se tentar estimular a importação da proteína ³⁵S-Pex5p com adição de uma proteína ou péptido detentores de um PTS1, sequestraram-se as proteínas possuidoras de PTS1 presentes na reacção de importação. Para este efeito utilizou-se uma nova proteína de fusão, denominada GST-TPRs, constituída pela GST e pelos aminoácidos 312-639 da Pex5p. Este fragmento da Pex5p contém apenas os domínios de interacção com o PTS1 e com a proteína Pex12p. Não apresenta a informação de endereçamento da Pex5p para o peroxissoma, isto é, os domínios de interacção com a Pex14p e Pex13p, nem o domínio de interacção com a Pex7p (ver Figuras 4 e 5).

Verificou-se que a proteína de fusão GST-TPRs, tal como a GST-Pex5p, inibe fortemente a importação *in vitro* da ^{35}S -Pex5p (Figura 20, painéis C e D, linhas 6). Por outro lado, a adição de GST não interfere com a importação da ^{35}S -Pex5p (painéis C e D, linhas 3). As propriedades inibitórias da GST-TPRs permanecem inalteradas quando as reacções de importação são realizadas na presença da proteína de fusão GST-LKS ou do péptido Pep-LKS (painéis C e D, linhas 5). No entanto, quando se adiciona GST-SKL ou Pep-SKL (painéis C e D, linhas 4), a inibição é parcialmente revertida. O facto de a inibição não ser totalmente revertida pode resultar da interacção da GST-TPRs com outro(s) componente(s) necessário(s) para a importação da Pex5p, para além das proteínas contendo o sinal PTS1. No entanto, estes resultados indicam claramente que a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal depende da presença de proteínas possuidoras de PTS1.

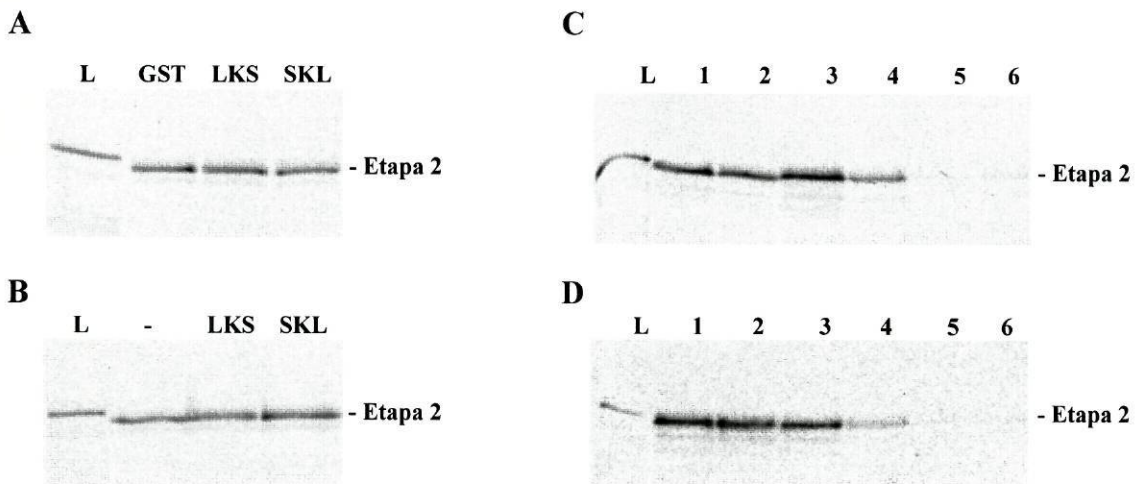


Figura 20. A inserção da Pex5p na membrana é dependente da presença de proteínas com PTS1

A. As reacções de importação foram realizadas incubando alíquotas de PNS com lisado de reticulócitos contendo a proteína ³⁵S-Pex5p, em solução de importação possuindo 5 mM ATP, na presença de 8 μM das proteínas GST (linhas GST), GST-LKS (linhas LKS) ou GST-SKL (linhas SKL). **B.** Alíquotas de PNS foram incubadas com ³⁵S-Pex5p, na solução de importação contendo 5 mM ATP, na ausência (linha -) ou na presença de 25 μM dos péptidos sintéticos: CRYHLKPLQSKL (linha SKL) e CRYHLKPLQLKS (linha LKS). **C.** A Pex5p sintetizada *in vitro* foi incubada com alíquotas de PNS na presença de 0.17 μM de GST (linhas 1-3) ou GST-TPRs (linhas 4-6). As proteínas de fusão GST-SKL (linhas 1 e 4) ou GST-LKS (linhas 2 e 5) foram também incluídas na reacção de importação a uma concentração final de 8 μM. **D.** As reacções de importação foram realizadas na presença de GST (linhas 1-3) ou GST-TPRs (linhas 4-6). Neste grupo de experiências as reacções de importação ou não receberam a adição de nenhum péptido (linhas 3 e 6), ou receberam os péptidos SKL (linhas 1 e 4) ou LKS (linhas 2 e 5) a uma concentração final de 25 μM. Após 30 min a 26°C as amostras referidas em todos os painéis foram tratadas com proteinase K, os organelos foram separados por centrifugação, o conteúdo proteico foi analisado por SDS-PAGE e transferido para membranas de nitrocelulose. Auto-radiografias das membranas são mostradas. As linhas L representam 10% da quantidade de ³⁵S-Pex5p utilizada nas reacções de importação.

4.2.8. Importação *in vitro* de versões truncadas da Pex5p

Dados recentes foram obtidos relativamente ao domínio da Pex5p que contém a informação suficiente para endereçar a proteína para o peroxissoma. Estudos de microscopia de imunofluorescência de fibroblastos humanos transfectados com

plasmídios, que expressam versões truncadas da Pex5p, permitiram determinar que um, possuindo os 214 aminoácidos N-terminais, apresentava uma localização peroxissomal (Dodt *et al.*, 2001). O domínio da Pex5p que compreende os aminoácidos 1-214 não apresenta o domínio de interacção às proteínas possuidoras de PTS1 mas endereça correctamente a Pex5p para os peroxissomas. Por outro lado, no trabalho aqui apresentado (ver secção 4.2.7), verificou-se que a importação da Pex5p depende da sua interacção com proteínas detentoras de PTS1. Assim sendo, a utilização de versões truncadas da Pex5p, que compreendem apenas o N-terminal da proteína, no sistema de importação pareceu ser uma boa estratégia no estudo do mecanismo de regulação de todo este processo.

Neste sentido, duas proteínas truncadas no C-terminal da Pex5p foram sintetizadas *in vitro* na presença de [³⁵S]Met. As proteínas, denominadas de ³⁵S-ΔC1Pex5p e ³⁵S-ΔC2Pex5p, compreendem os aminoácidos 1-324 e 1-197 da Pex5p, respectivamente. Reacções de importação destas proteínas foram realizadas na presença e ausência de ATP exógeno (Figura 21A) e verificou-se que ambas as versões N-terminais da Pex5p são correctamente inseridas na membrana peroxissomal. Como a importação destas proteínas é realizada na presença de Pex5p endógena e já foi descrita a capacidade da Pex5p formar homo-tetrámeros (Schliebs *et al.*, 1999; Harper *et al.*, 2002; Gould e Collins, 2002), colocou-se a hipótese de que as versões truncadas poderiam interagir com a Pex5p endógena. Seria esta interacção que conduziria as proteínas ³⁵S-ΔC1Pex5p e ³⁵S-ΔC2Pex5p até ao peroxissoma. Se esta hipótese se verificasse, então condições que inibissem a importação da ³⁵S-Pex5p resultariam também na inibição da importação de ³⁵S-ΔC1Pex5p e ³⁵S-ΔC2Pex5p. Com este propósito, realizaram-se reacções de importação na presença de GST-TPRs (ver Figura 21B). Como se pode verificar, a importação da ³⁵S-Pex5p é inibida (como esperado) mas a GST-TPRs não induz qualquer efeito na importação das versões truncadas ³⁵S-ΔC1Pex5p e ³⁵S-ΔC2Pex5p.

Estes resultados demonstram que os aminoácidos 1-197 da Pex5p são suficientes para promover o processo de inserção da proteína na membrana do peroxissoma.

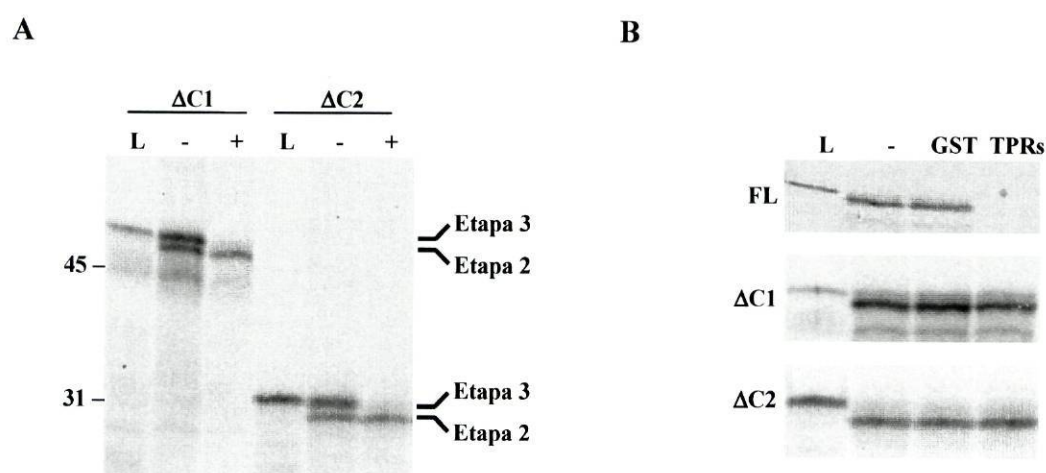


Figura 21. Proteínas truncadas no C-terminal da Pex5p são correctamente importadas *in vitro* para o peroxissoma

A. As proteínas ^{35}S - $\Delta\text{C1Pex5p}$ e ^{35}S - $\Delta\text{C2Pex5p}$ foram importadas *in vitro* na ausência (linha -) ou na presença (linhas +) de ATP exógeno (5 mM concentração final). Após 30 min a 26°C, as amostras foram digeridas com proteinase K, os organelos sedimentados por centrifugação, o conteúdo proteico foi analisado por SDS-PAGE e transferido para membranas de nitrocelulose. O sinal radioactivo foi detectado por auto-radiografia. As linhas L representam 1% da quantidade das proteínas $\Delta\text{C1Pex5p}$ e $\Delta\text{C2Pex5p}$ marcadas com ^{35}S utilizadas nas reacções de importação. Os números à esquerda indicam a massa molecular, em kDa, dos padrões aplicados no SDS-PAGE. **B.** As proteínas ^{35}S -Pex5p (painel FL), ^{35}S - $\Delta\text{C1Pex5p}$ (painel ΔC1) e ^{35}S - $\Delta\text{C2Pex5p}$ (painel ΔC2) foram sujeitas a reacções de importação na ausência (linhas -) ou na presença das proteínas GST (linhas GST) ou GST-TPRs (linhas TPRs), a uma concentração final de 0.17 μM . As reacções de importação foram realizadas na presença de 5 mM ATP durante 30 min a 26°C. Após importação, as amostras foram tratadas como referido anteriormente. As linhas L representam lisado de reticulócitos contendo a proteína ^{35}S -Pex5p (painel FL) ou as versões truncadas da Pex5p ^{35}S - $\Delta\text{C1Pex5p}$ e ^{35}S - $\Delta\text{C2Pex5p}$ (painéis ΔC1 e ΔC2 , respectivamente).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O estudo da maquinaria de importação proteica aqui desenvolvido apresenta, como objecto central, a Pex5p de fígado de rato que se encontra associada ao peroxissoma. Verificou-se que a Pex5p peroxissomal apresenta todas as características de uma proteína intrínseca de membrana, tal como descrito por Wiemer *et al.* (1995) e Terlecky *et al.* (1995) e mais recentemente por Harano *et al.* (2001). Esta observação implica que a Pex5p está directamente em contacto com a bicamada lipídica, e/ou a sua localização membranar depende de interacções estabelecidas com outras proteínas ao nível da membrana. Uma vez que a Pex5p não apresenta nenhum domínio transmembranar putativo e estabelece interacções com várias peroxinas intrínsecas de membrana, nomeadamente com a Pex14p (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998; Schliebs *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Will *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2000; Reguenga *et al.*, 2001; Saidowsky *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001), Pex13p (Elgersma *et al.*, 1996a; Gould *et al.*, 1996; Erdmann e Blobel, 1996; Girzalsky *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2000; Bottger *et al.*, 2000; Barnett *et al.*, 2000; Otera *et al.*, 2002) e Pex12p (Chang *et al.*, 1999b; Okumoto *et al.*, 2000; Albertini *et al.*, 2001), a segunda hipótese considerada será a mais provável. No entanto, não são apresentados dados suficientes para inequivocamente distinguir as duas hipóteses.

Informações importantes sobre o modo de integração da Pex5p na membrana peroxissomal foram obtidas por estudos da topologia da Pex5p membranar. Pela primeira vez, detectou-se que um pequeno domínio N-terminal de cerca de 2 kDa se encontra exposto para o citosol e que a maior parte da proteína se encontra virada para a matriz peroxissomal. A localização citosólica do N-terminal da Pex5p foi revelada pela acção proteolítica da enzima Genenase I. Esta protease, geneticamente modificada, hidrolisa ligações peptídicas no contexto His-Tyr ou Tyr-His mas o grau de digestão depende dos aminoácidos na vizinhança das sequências referidas (Carter *et al.*, 1987; Carter *et al.*, 1991). A análise da estrutura primária do N-terminal da Pex5p humana não revela a existência de qualquer histidina neste contexto. No entanto, uma sequência muito semelhante surge no resíduo 23 desta peroxina (His₂₃-Phe₂₄). Considerando que a digestão com esta protease ocorre no N-terminal da Pex5p e origina a remoção de um pequeno fragmento da Pex5p, de cerca de 2 kDa, este é, muito provavelmente, o sítio de clivagem da Genenase I.

Os dados encontrados na bibliografia relativamente à topologia das peroxinas que interactivam com a Pex5p e aos domínios envolvidos nessas interacções, juntamente com os dados obtidos relativamente à topologia da Pex5p, podem ser analisados em conjunto e fornecer algumas pistas relativamente à estrutura do complexo membranar.

A interacção estabelecida entre a Pex13p e a Pex5p envolve o domínio SH3 que se situa no C-terminal da Pex13p (Girzalsky *et al.*, 1999; Bottger *et al.*, 2000; Barnett *et al.*, 2000; Urquhart *et al.*, 2000; Douangamath *et al.*, 2002) e a região N-terminal da Pex5p (Otera *et al.*, 2002; Bottger *et al.*, 2000). Estudos preliminares em leveduras mutantes na Pex13p mostrando um defeito no processo de *docking* dos receptores, juntamente com o facto de o domínio SH3 da Pex13p estar voltado para o citosol, levaram a que se considerasse inicialmente como a peroxina *docking* para a Pex5p. No entanto, estudos em células de ovário de *hamster* chinês mutantes em Pex13p revelaram que a Pex5p continua associada ao peroxissoma na ausência de Pex13p (Otera *et al.*, 2000), o que sugere que, pelos menos em mamíferos, a Pex13p não está envolvida no primeiro passo de *docking* da Pex5p. Por outro lado, determinou-se que a Pex5p de fígado de rato estabelece uma interacção, resistente à extracção alcalina, com a membrana peroxissomal mesmo quando os domínios da Pex13p expostos para o citosol são removidos proteoliticamente. Estes resultados não excluem a hipótese de que a Pex13p esteja envolvida no complexo de *docking* ou na libertação da Pex5p para o citosol como também sugerido (Urquhart *et al.*, 2000) mas provam que, após inserida na membrana, a Pex5p não depende da interacção estabelecida com os domínios citosólicos da Pex13p para permanecer fortemente associada à membrana peroxissomal.

A Pex14p é outra proteína com capacidade de interacção com a Pex5p (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998; Schliebs *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999; Will *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2000; Reguenga *et al.*, 2001; Saidowsky *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001). Em humanos, esta interacção é mediada pelos aminoácidos 1-78 da Pex14p e o N-terminal da Pex5p (Schliebs *et al.*, 1999). Relativamente à localização do N-terminal da Pex14p de mamíferos, todos os resultados publicados indiciam que é um domínio protegido, embora a sua localização precisa não tenha sido determinada (Shimizu *et al.*, 1999; Will *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002). De qualquer forma terá de apresentar uma conformação tal que seja acessível ao domínio N-terminal da Pex5p, com o qual interactiva.

Relativamente à Pex5p citosólica, a análise da massa nativa determinou que é uma proteína monomérica. Este resultado torna-se difícil de interpretar face à evidência

de que, pelo menos, a Pex5p interaccua com proteínas possuidoras de PTS1 e com a Pex7p no citosol. Uma hipótese explicativa seria admitir que as interacções descritas não resistem ao método de solubilização utilizado na experiência, apesar de se terem utilizado detergentes suaves. Outra possibilidade seria considerar que, após ligação da Pex5p às proteínas-carga, este complexo é rapidamente endereçado para o peroxissoma. De facto, experiências de pulse-chase *in vivo* revelaram que são necessários apenas 2 a 3 minutos para que uma proteína detentora de um sinal de endereçamento para o peroxissoma, acabada de sintetizar, chegue à matriz peroxissomal (Lazarow e Fujiki, 1985).

Com o intuito de se estudar mais precisamente a função/estrutura da Pex5p peroxissomal, desenvolveu-se um sistema de importação *in vitro* da proteína marcada radioactivamente utilizando um sobrenadante pós-nuclear de fígado de rato. Demonstrou-se que a importação da ^{35}S -Pex5p ocorre especificamente para os peroxissomas, uma vez que a análise por centrifugação de gradientes de Nycodenz de reacções de importação mostraram uma distribuição peroxissomal típica para a Pex5p sintetizada *in vitro*. Adicionalmente, as evidências de que a ^{35}S -Pex5p adquire a mesma topologia membranar que a proteína endógena, e que a inserção da Pex5p na membrana é fortemente inibida pela presença de IgGs anti-Pex14p, confirmam uma inserção correcta da Pex5p na membrana peroxissomal.

A dependência de energia no mecanismo de endereçamento das proteínas possuidoras de PTS1 pela Pex5p tem sido abordada por alguns grupos e sempre se detectou a influência do ATP no processo (Imanaka, 1987; Pool *et al.*, 1998; Lopez-Huertas *et al.*, 1999; Terlecky *et al.*, 2001; Harano *et al.*, 2001). A realização de reacções de importação da ^{35}S -Pex5p, na ausência de ATP exógeno, revelou a existência de dois intermediários cinéticos da Pex5p, que também foram detectados com a proteína endógena. A primeira população, denominada por etapa 2 da Pex5p, encontra-se numa conformação tal que expõe cerca de 2kDa do seu N-terminal para o citosol. A Pex5p na etapa 3 encontra-se totalmente protegida da acção da proteinase K.

A Pex5p na etapa 3 poderia representar uma população intraperoxissomal da Pex5p, o que estaria de acordo com a versão do modelo de importação peroxissomal que considera a entrada da Pex5p, juntamente com a proteína que transporta, para o interior do peroxissoma (Dammai e Subramani, 2001). No entanto, este não parece ser o caso, uma vez que ambas as populações da Pex5p se encontram associadas à Pex14p, tal como mostrado pela sua co-imunoprecipitação com a Pex14p. Portanto, o aparecimento

da Pex5p na etapa 3 pode ser a consequência de um pequeno movimento da Pex5p para o interior do organelo, ficando totalmente protegida pela membrana da acção da proteinase K mas permanecendo em associação com a Pex14p, ou pode também resultar da interacção com outra(s) proteína(s) em condições deficientes em ATP, proteína(s) esta(s) que poderão proteger a Pex5p da acção proteolítica da proteinase K.

A inter-relação entre as duas populações de Pex5p identificadas, ou seja, que a etapa 2 da Pex5p é a precursora da etapa 3 e que esta última sai rapidamente do peroxissoma na presença de ATP, foi determinada através de experiências de *pulse-chase*. Os estudos realizados analisando a proteína endógena confirmaram os resultados anteriores, ou seja, na presença de ATP a Pex5p endógena na etapa 3 é libertada do peroxissoma. Se a necessidade de energia sob a forma de ATP parece ser claramente necessária para a exportação da Pex5p, a dependência energética para a importação da proteína permanece por determinar. Se todos os sítios de *docking* na membrana peroxissomal estiverem ocupados pela Pex5p endógena nas fracções de PNS usadas, então terá de ser gasta alguma energia a libertar Pex5p para que a ³⁵S-Pex5p possa ser importada. Poderá ser esta a razão explicativa para a visualização de estimulação de importação da Pex5p na presença de ATP (Figura 13A). Na ausência de dados relativamente a este assunto e com base nos resultados obtidos apenas se pode concluir que a exportação da Pex5p, relativamente à importação, requer concentrações mais elevadas de ATP.

Uma vez que a Pex5p na etapa 3 sai rapidamente do peroxissoma num processo dependente de ATP, então alguma ATPase deve estar envolvida no mecanismo. Apesar de não se conhecer a identidade da(s) ATPase(s), dois possíveis candidatos podem ser nomeados: a Pex1p e Pex6p, duas ATPases presumivelmente envolvidas no processo de reciclagem da Pex5p para o citosol (Collins *et al.*, 2000). A interacção da Pex1p e/ou Pex6p com elementos da maquinaria de translocação peroxissomal pode também ser responsável pela protecção conferida à etapa 3 da Pex5p relativamente à acção da proteinase K. Estas proteínas podem interagir com a Pex5p nesta fase, escudando-a da acção da proteinase K e promovendo a sua libertação num processo dependente de ATP. Uma função semelhante para a Pex1p e Pex6p foi descrita recentemente com a elaboração do modelo hipotético *trap-door* (Gould e Collins, 2002). É considerado que a dissociação das proteínas em trânsito da Pex5p é mediada pela Pex1p e Pex6p, processo que antecede a libertação da Pex5p de novo para o citosol.

Por outro lado, a presença de chaperones, tal como proteínas da família da Hsp70 e proteínas relacionadas, que também apresentam actividade de ATPase, tem sido descrita na importação das proteínas possuidoras de PTS1 (Walton *et al.*, 1994; Crookes *et al.*, 1998; Hettema *et al.*, 1998; Harano *et al.*, 2001). Assim, não será de excluir o envolvimento destas chaperones na exportação da Pex5p.

O facto de em peroxissomas purificados de fígado de rato só se detectar a Pex5p endógena na etapa 2 (Figura 10B) pode reforçar a ideia de que a protecção da Pex5p nesta fase relativamente à acção da proteinase K resulta de um efeito de escudagem por outra proteína e não do movimento do N-terminal da Pex5p para o interior do peroxissoma. Em organelos purificados, a(s) proteína(s) que escudam a Pex5p podem ter sido perdidas durante a purificação, mas estão certamente presentes quando se usa um sobrenadante pós-nuclear.

Uma das conclusões mais importantes obtidas neste trabalho consistiu em provar que o transporte subcelular da Pex5p está realmente acoplado ao endereçamento de proteínas para a matriz do peroxissoma. Por outro lado, versões da Pex5p truncadas no C-terminal, que não apresentam capacidade para ligar as proteínas possuidoras de PTS1, são correctamente importadas para o peroxissoma. Esta observação tem fortes implicações na regulação do processo de *docking*/translocação da Pex5p na membrana peroxissomal. De facto, estes resultados sugerem a inexistência de interacções importantes entre a maquinaria de importação ao nível da membrana peroxissomal e o domínio C-terminal da Pex5p ou as proteínas em trânsito. Na presença destes dados, coloca-se a questão de como é regulado o processo de *docking*/translocação da Pex5p, de modo a serem evitados ciclos fúteis de *docking*/reciclagem, com o consequente dispêndio energético. A explicação mais plausível será assumir que o mecanismo de regulação deste processo reside na própria Pex5p. Por exemplo, a ligação de uma proteína possuidora de PTS1 à Pex5p poderá induzir nesta proteína alterações conformacionais de modo que o domínio responsável pelo endereçamento da Pex5p para a membrana peroxissomal fique exposto. No caso das versões truncadas no C-terminal, o mecanismo que regula esta alteração conformacional poderá ter sido perdido, resultando numa activação constitutiva do domínio de endereçamento peroxissomal. Dados indicando uma interacção entre o N e o C-terminal da Pex5p já foram publicados e podem apoiar esta hipótese (Harano *et al.*, 2001).

Alternativamente, poderá ser a interacção com outro componente proteico, através do domínio C-terminal contendo os TPRs, que indirectamente regulará o processo. Este elemento proteico poderá ligar-se à Pex5p enquanto esta não interaccuar com nenhuma proteína em trânsito, impedindo-a de ser endereçada para o organelo. No caso das versões truncadas da Pex5p ($\Delta C1$ e $\Delta C2$), esta regulação teria sido perdida.

Os dados obtidos mostram que a importação da Pex5p para o peroxissoma é fortemente inibida pela presença de IgGs direccionadas contra a Pex14p e que a Pex5p nas etapas 2 e 3 é imunoprecipitada com anticorpos contra a Pex14p. Por outro lado a inserção da Pex5p na membrana peroxissomal, possivelmente expondo a maior parte da sua estrutura (incluindo os TPRs) na matriz, está relacionada com o transporte de proteínas possuidoras de PTS1. Assim, a translocação de proteínas sintetizadas *de novo* possuindo um PTS1 através da membrana peroxissomal ocorre com a formação simultânea do complexo Pex5p-Pex14p. Provavelmente, a Pex14p não faz parte apenas do complexo de *docking* da Pex5p mas é um membro integrante do complexo de translocação proteica peroxissomal. Dados recentes eliminando a necessidade conceptual da existência de dois complexos distintos e mostrando a Pex14p em associação com elementos quer do complexo de *docking* quer do de translocação foram publicados (Reguenga *et al.*, 2001; Albertini *et al.*, 2001). Outros estudos de interacção entre a Pex5p e a Pex14p propuseram que a Pex14p, em humanos, é o primeiro lugar de *docking* para a Pex5p (Saidowsky *et al.*, 2001).

Os resultados apresentados permitem propor um modelo para a importação peroxissomal de proteínas matriciais possuidoras de PTS1 (Figura 22). Este modelo assume que, num primeiro passo, a Pex5p citosólica (definida como Pex5p na etapa 0) interaccua com o motivo PTS1 das proteínas peroxissomais sintetizadas *de novo* (etapa 1 da Pex5p). O complexo Pex5p-proteína carga dirige-se para a membrana peroxissomal onde interaccua com elementos do complexo de *docking*/translocação (etapa 2 da Pex5p). Os dados obtidos não permitem excluir a possibilidade de a Pex5p interaccuar com um ou mais elementos deste complexo da membrana do peroxissoma, como por exemplo a Pex13p ou a Pex12p, antes de se ligar à Pex14p. Os resultados obtidos só se referem a populações de Pex5p resistentes à acção da proteinase K. A etapa 3 surge por uma alteração conformacional ou por modificação do contexto circundante da Pex5p. Nada se determinou relativamente ao passo de libertação da proteína carga, mas poderá ser esta alteração da conformação ou das interacções estabelecidas com outras proteínas,

nomeadamente com a Pex1p e/ou Pex6p, que provocará a libertação das proteínas para a matriz do peroxissoma. Finalmente, a Pex5p na etapa 3 será libertada para o citosol, num processo catalisado por um componente que hidrolisa ATP originando novamente a etapa 0.

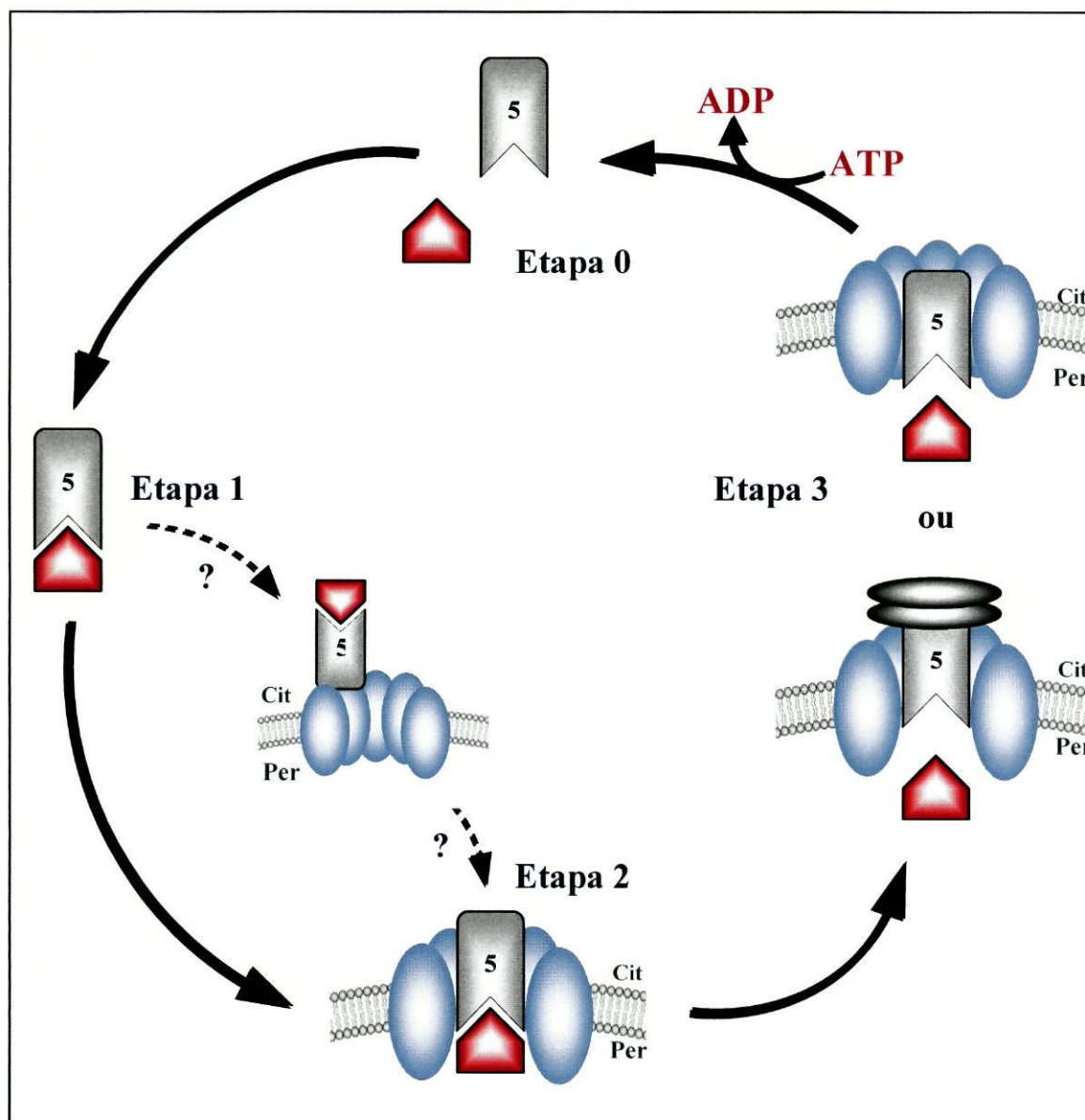


Figura 22. Modelo de translocação proteica peroxissomal mediada pela Pex5p.

Tal como no modelo actualmente aceite de importação proteica (Figura 6), a Pex5p citosólica (Etapa 0) liga-se a proteínas possuidoras de PTS1 (indicadas a vermelho) (Etapa 1). Seguidamente dirige-se para a membrana peroxissomal onde pode interagir com proteínas do complexo de *docking*/translocação (indicadas a azul), nomeadamente com a Pex14p. A Pex5p insere-se na membrana, interagindo com a Pex14p, e expondo cerca de 2 kDa do N-terminal para o citosol (Etapa 2). A Pex5p poderá interagir com outros elementos do complexo de *docking*/translocação, como por exemplo a Pex13p, Pex12p ou Pex2p, antes de interagir com a Pex14p (trajecto a tracejado). A Etapa 3 surge por alteração conformacional da Pex5p, por exemplo entrando um pouco mais na matriz peroxissomal, ou por interacção com outra(s) proteína(s) (como por exemplo as ATPases Pex1p e/ou Pex6p, indicadas a verde). As alterações da Pex5p que ocorrem durante esta fase poderão ser responsáveis pela libertação das proteínas possuidoras de PTS1 para a matriz peroxissomal. Finalmente, a Pex5p é libertada para o citosol, num processo dependente da hidrólise de ATP. Cit-citosol; Per-matriz peroxissomal.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O sistema de importação peroxissomal *in vitro* aqui descrito, que reproduz o mecanismo de importação de proteínas para o peroxissoma, fornece os meios necessários para uma análise bioquímica detalhada do sistema de translocação peroxissomal. Para além dos resultados já obtidos e que constituem esta tese, penso que este sistema pode continuar a ser utilizado uma vez que certos aspectos do processo de importação não foram abordados.

Uma das diferenças do sistema de translocação proteica peroxissomal nos mamíferos relativamente a outros organismos, baseia-se no facto de a importação mediada pela Pex7p estar interligado com o da Pex5p. Verificou-se que mutações na Pex5p que interferem com a ligação à Pex7p, têm como consequência a inibição da importação de proteínas possuidoras de PTS2 para o peroxissoma. Assim, penso que uma abordagem interessante seria analisar o papel da Pex7p e de proteínas com PTS2 na importação da Pex5p. Por exemplo, seria de verificar se a adição de uma proteína de fusão ou de um péptido sintético contendo a sequência PTS2 conseguiria estimular a importação da Pex5p. Uma experiência semelhante à mostrada na Figura 20, poderia ser realizada com este intuito.

Por outro lado, a disponibilidade de anticorpos de elevada afinidade contra outras peroxinas (nomeadamente contra a Pex7p, Pex13p, Pex12p e as ATPases Pex1p e Pex6p) poderia possibilitar a realização de experiências visando a determinação do papel destas peroxinas no processo de importação da Pex5p. Um dos aspectos limitantes neste trabalho foi a disponibilidade de apenas um único anticorpo com as propriedades referidas (o anticorpo anti-Pex14p).

A utilização de peroxissomas purificados de fígado de rato como material base das reacções de importação servirá também para distinguir as etapas do sistema de importação que dependem de factores citosólicos. Se alguma das etapas estudadas requerer componentes do citosol, então provavelmente ficará bloqueada.

Uma outra estratégia possível poderia envolver a utilização de sobrenadantes pós-nucleares isolados a partir de células deficientes em diversas peroxinas. A utilização de células dos diferentes grupos de complementação ou de células extraídas

de ratinhos *knockout* poderia permitir o estudo da importação das proteínas possuidoras de PTS1 mediado pela Pex5p na ausência de apenas um componente da maquinaria de translocação peroxissomal. Penso que seria uma ferramenta importante para destringir as diferentes etapas percorridas pela Pex5p e os componentes proteicos envolvidos em cada uma delas.

O estudo do mecanismo de importação em células de doentes da biogénese peroxissomal poderia ser útil no estabelecimento de uma melhor correlação genótipo-fenótipo. Por exemplo, uma deficiência na peroxina Pex5p revela-se com um leque fenotípico tão grande que vai desde os casos mais severos de Síndrome de Zellweger até aos mais suaves de IRD. Apesar destes doentes apresentarem defeitos na mesma proteína, diferem na extensão do defeito na importação das proteínas peroxissomais.

Uma questão central relativamente ao processo de translocação proteico prende-se com o facto de não se ter a menor ideia sobre como as proteínas são importadas para o interior do organelo. Existirá realmente um canal de translocação? Directamente relacionado com este assunto surge a pergunta de como é que as proteínas da matriz do peroxissoma se desligam dos receptores. Seria também importante obter dados inequívocos relativamente à existência de alguma alteração conformacional da Pex5p quando se liga a proteínas possuidoras de PTS1. A determinação da estrutura terciária, por cristalografia de raios-x, da Pex5p na presença e ausência de uma proteína com PTS1, seria fundamental neste sentido. Até ao momento os únicos estudos estruturais da Pex5p referem-se apenas ao C-terminal da proteína interagindo com um péptido contendo PTS1 (Gatto *et al.*, 2000).

Apesar do sistema de importação peroxissomal ter sido desenvolvido para a Pex5p, este poderá ser futuramente aplicado a outras proteínas. No entanto será fundamental e limitante para este processo que as proteínas apresentem um perfil proteolítico específico que permita distinguir a proteína importada da que permanece no citosol ou não especificamente associada ao peroxissoma. O estudo do processo de importação, por exemplo, das peroxinas intrínsecas de membrana poderia trazer novos dados relativamente ao mecanismo de biogénese peroxissomal.

Embora alguns dados interessantes acerca do processo de translocação proteica peroxissomal tenham sido obtidos neste trabalho, muitas questões foram levantadas e

outras permaneceram por responder. Tão importante como obter respostas, é também fazer perguntas que permitam o desenvolvimento de novas linhas de investigação.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

A

Abe I e Fujiki Y. (1998) cDNA cloning and characterization of a constitutively expressed isoform of the human peroxin Pex11p. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 529-533

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

Baes M, Gressens P, Baumgart E, Carmeliet P, Casteels M, Franssen M, Evrard P, Fahimi D, Declercq PE, Collen D, van Veldhoven PP e Mannaerts GP. (1997) A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet* **17**, 49-57

Baker A. (1996) In vitro systems in the study of peroxisomal protein import. *Experientia* **52**, 1055-62

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

Baumgart E, Volkl A, Hashimoto T e Fahimi HD. (1989) Biogenesis of peroxisomes: immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J Cell Biol* **108**, 2221-2231

Baumgart E, Volkl A, Pill J e Fahimi HD. (1990) Proliferation of peroxisomes without simultaneous induction of the peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *FEBS Lett* **264**, 5-9

Beaufay H, Amar-Costesec A, Feytmans E, Thines-Sempoux D, Wibo M, Robbi M e Berthet J. (1974) Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods. *J Cel Biol* **61**, 188-200

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

Biermanns M e Gartner J. (2001) Targeting elements in the amino-terminal part direct the human 70-kDa peroxisomal integral membrane protein (PMP70) to peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 649-655

Bjorkman J, Stetten G, Moore CS, Gould SJ e Crane DI. (1998) Genomic structure of PEX13, a candidate peroxisomal biogenesis disorder gene. *Genomics* **54**, 521-528

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

Braverman N, Steel G, Obie C, Moser A, Moser H, Gould SJ e Valle D. (1997) Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat Genet* **15**, 369-376

Breidenbach RW e Beevers H. (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 462-469

Brocard C, Kragler F, Simon MM, Schuster T e Hartig A (1994) The tetratricopeptide repeat-domain of the PAS10 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for binding the peroxisomal targeting signal-SKL. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 1016-1022

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

Carter P e Wells JA. (1987) Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". *Science* **237**, 394-399

Carter P, Abrahmsen L e Wells JA. (1991) Probing the mechanism and improving the rate of substrate-assisted catalysis in subtilisin BPN'. *Biochemistry* **30**:6142-6148

Chang CC, Lee WH, Moser H, Valle D e Gould SJ. (1997) Isolation of the human PEX12 gene, mutated in group 3 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* **15**, 385-388

Chang CC, South S, Warren D, Jones J, Moser AB, Moser HW e Gould SJ. (1999a) Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci* **112**, 1579-1590

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

Chory J e Pollard JD Jr. (1999) Separation of small DNA fragments by conventional gel electrophoresis. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA e Struhl K (Eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., USA

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

Cooper TG e Beevers H. (1969) Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J Biol Chem* **244**, 3514-3520

Cooperstein SJ e Lazarow A. (1951) A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J Bio Chem* **189**, 665-670

Crane DI e Masters CJ. (1986) The effect of clofibrate on the phospholipid composition of the peroxisomal membranes in mouse liver. *Biochim Biophys Acta* **876**, 256-263

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

Dansen TB, Wirtz KW, Wanders RJ e Pap EH. (2000) Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. *Nat Cell Biol* **2**, 51-53

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

de Hoop MJ, Holtman WL e Ab G. (1993) Human catalase is imported and assembled in peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 59-69

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

Diestelkotter P e Just WW. (1993) In vitro insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* **123**, 1717-1725

Dmochowska A, Dignard D, Maleszka R e Thomas DY. (1990) Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* POX1 gene encoding acyl-coenzyme A oxidase. *Gene* **88**, 247-252

Dotd 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

Dotd 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

Dotd 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

Douangamath A, Filipp FV, Klein AT, Barnett P, Zou P, Voorn-Brouwer T, Vega MC, Mayans OM, Sattler M, Distel B e Wilmanns M. (2002) Topography for independent binding of alpha-helical and PPII-helical ligands to a peroxisomal SH3 domain. *Mol Cell* **10**, 1007-1017

Dyer JM, McNew JA e Goodman JM. (1996) The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J Cell Biol* **133**, 269-280

E

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 der Berg M, Metzger B, America T, Tabak HF e Distel B. (1996a) 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, Vos A, van den Berg M, van Roermund CW, van der Sluijs P, Distel B e Tabak HF. (1996b) Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal 1 in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 26375-26382

Erdmann R e Blobel G. (1995) Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J Cell Biol* **128**, 509-523

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

Espeel M, Depreter M, Nardacci R, D'Herde K, Kerckaert I, Stefanini S e Roels F. (1997) Biogenesis of peroxisomes in fetal liver. *Microsc Res Tech* **39**, 453-466

Espeel M, Roels F, Giros M, Mandel H, Peltier A, Poggi F, Poll-The BT, Smeitink JA, Van Maldergem L e Santos MJ. (1995) Immunolocalization of a 43 kDa peroxisomal membrane protein in the liver of patients with generalized peroxisomal disorders. *Eur J Cell Biol* **67**, 319-327

F

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, Baumgart E e Volkl A. (1993) Ultrastructural aspects of the biogenesis of peroxisomes in rat liver. *Biochimie* **75**, 201-208

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

Fahimi HD, Reich D, Volkl A e Baumgart E. (1996) Contributions of the immunogold technique to investigation of the biology of peroxisomes. *Histochem Cell Biol* **106**, 105-114

Fournier B, Saudubray JM, Benichou B, Lyonnet S, Munnich A, Clevers H e Poll-The BT. (1994) Large deletion of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene in pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest* **94**, 526-531

Fransen M, Brees C, Baumgart E, Vanhooren JC, Baes M, Mannaerts GP e Van Veldhoven PP. (1995) Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J Biol Chem* **270**, 7731-7736

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 USA* **95**, 8087-8092

Fransen M, Wylin 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

Fujiki Y e Lazarow PB. (1985) Post-translational import of fatty acyl-CoA oxidase and catalase into peroxisomes of rat liver in vitro. *J Biol Chem* **260**, 5603-5609

Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL e Lazarow PB. (1982a) 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, Hubbard AL, Fowler S e Lazarow PB. (1982b) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **93**, 97-102

Fujiki Y, Rachubinski RA e Lazarow PB. (1984) Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 7127-7131

G

Gatto GJJr, 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

Geisbrecht BV, Collins CS, Reuber BE e Gould SJ. (1998) Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8630-8635

Geisbrecht BV e Gould SJ. (1999) The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* **274**, 30527-30533

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

Glaser JH e Sly WS. (1973) Beta-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis: methods for enzymatic diagnosis. *J Lab Clin Med* **82**, 969-977

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

Goodman JM. (1985) Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J Biol Chem* **260**, 7108-7113

Gorgas K e Krisans SK. (1989) Zonal heterogeneity of peroxisome proliferation and morphology in rat liver after gemfibrozil treatment. *J Lipid Res* **30**, 1859-1875

Gorgas K. (1984) Peroxisomes in sebaceous glands. V. Complex peroxisomes in the mouse preputial gland: serial sectioning and three-dimensional reconstruction studies. *Anat Embryol* **169**, 261-270

Gould SG, Keller GA e Subramani S. (1987) Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* **105**, 2923-2931

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, 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, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J e Subramani S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**, 1657-1664

Gould SJ, Keller GA e Subramani S. (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol* **107**, 897-905

Gould SJ, McCollum D, Spong AP, Heyman JA e Subramani S. (1992) Development of the yeast *Pichia pastoris* as a model organism for a genetic and molecular analysis of peroxisome assembly. *Yeast* **8**, 613-628

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, 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

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

Harlow E e Lane D. (1998) Cold Spring Harbor Laboratory (Eds), *Antibodies- A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York

Harper CC, Berg JM e Gould SJ. (2002) PEX5 binds the PTS1 independently of Hsp70 and the peroxin PEX12. *J Biol Chem* (In press)

Hartl FU e Just WW. (1987) Integral membrane polypeptides of rat liver peroxisomes: topology and response to different metabolic states. *Arch Biochem Biophys* **255**, 109-119

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

Henke B, Girzalsky W, Berteaux-Lecellier V e Erdmann R. (1998) IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **273**, 3702-3711

Hettema EH, Ruigrok CC, Koerkamp MG, van den Berg M, Tabak HF, Distel B e Braakman I. (1998) The cytosolic DnaJ-like protein djplp is involved specifically in peroxisomal protein import. *J Cell Biol* **142**, 421-434

Honsho M e Fujiki Y. (2001) Topogenesis of peroxisomal membrane protein requires a short, positively charged intervening-loop sequence and flanking hydrophobic segments. Study using human membrane protein PMP34. *J Biol Chem* **276**, 9375-9382

Honsho M, Tamura S, Shimosawa N, Suzuki Y, Kondo N e Fujiki Y. (1998) Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet* **63**, 1622-1630

I

Imanaka T, Shiina Y, Takano T, Hashimoto T e Osumi T. (1996) Insertion of the 70-kDa peroxisomal membrane protein into peroxisomal membranes *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* **271**, 3706-3713

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

Jankowski A, Kim JH, Collins RF, Daneman R, Walton P e Grinstein S. (2001) In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin. *J Biol Chem* **276**, 48748-48753

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

Jardim A, Rager N, Liu W e Ullman B. (2002) Peroxisomal targeting protein 14 (PEX14) from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization. *Mol Biochem Parasitol* **124**, 51-62

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, Nau K, Geraghty MT, Erdmann R e Gould SJ. (1999) Identification of peroxisomal acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. *J Biol Chem* **274**, 9216-9223

K

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

Kiel JA, Hilbrands RE, van der Klei IJ, Rasmussen SW, Salomons FA, van der Heide M, Faber KN, Cregg JM e Veenhuis M. (1999) *Hansenula polymorpha* Pex1p and Pex6p are peroxisome-associated AAA proteins that functionally and physically interact. *Yeast* **15**, 1059-1078

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. (1999a) 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

Koller A, Spong AP, Luers GH e Subramani S. (1999b) Analysis of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene product from *Pichia pastoris* and determination of its targeting signal. *Yeast* **15**, 1035-1044

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

Kunau WH, Dommes V e Schulz H. (1995) Beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* **34**, 267-342

Kunau WH. (2001) Peroxisomes: the extended shuttle to the peroxisome matrix. *Curr Biol* **11**, R659-662

Kunau WH, Agne B e Girzalsky W. (2001) The diversity of organelle protein import mechanisms. *Trends Cell Biol* **11**, 358-361

L

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

Lamb JR, Tugendreich S e Hieter P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* **20**, 257-259

Lametschwandtner G, Brocard C, Fransen M, Van Veldhoven P, Berger J e Hartig A. (1998) The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between

yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* **273**, 33635-33643

Lazarow PB (1984) The peroxisomal membrane. Em: EE Bittar (Eds), *Membrane Structure and Function*, pp 1-31, Wiley, New York

Lazarow PB e De Duve C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2043-2046

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

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

Leighton F, Poole B, Beaufay H, Baudhuin P, Coffey JW, Fowler S e De Duve C. (1968) The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J Cell Biol* **37**, 482-513

Li X, Baumgart E, Dong GX, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Valle D, Smith KD e Gould SJ. (2002) PEX11alpha is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated peroxisome proliferation. *Mol Cell Biol* **22**, 8226-8240

Lopez-Huertas E, Oh J e Baker A. (1999) Antibodies against pex14p block ATP-independent binding of matrix proteins to peroxisomes in vitro. *FEBS Lett* **459**, 227-229

Luers G, Hashimoto T, Fahimi HD e Volkl A. (1993) Biogenesis of peroxisomes: isolation and characterization of two distinct peroxisomal populations from normal and regenerating rat liver. *J Cell Biol* **121**, 1271-1280

M

Marshall PA, Krimkevich YI, Lark RH, Dyer JM, Veenhuis M e Goodman JM. (1995) Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J Cell Biol* **129**, 345-355

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, Shimosawa 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 USA* **96**, 2116-2121

McCammon MT, McNew JA, Willy PJ e Goodman JM. (1994) An internal region of the peroxisomal membrane protein PMP47 is essential for sorting to peroxisomes. *J Cell Biol* **124**, 915-925

McCullum D, Monosov E e Subramani S. (1993) The *pas8* mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells. The PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *J Cell Biol* **121**, 761-774

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

Michels PA. (1989) The glycosome of trypanosomes: properties and biogenesis of a microbody. *Exp Parasitol* **69**, 310-315

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, Smith, KB, Watkins PA, Powers J e Moser AB (2001) X-linked adrenoleukodystrophy 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

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

Motley AM, Hetteema EH, Hogenhout EM, Brites P, ten Asbroek AL, Wijburg FA, Baas F, Heijmans HS, Tabak HF, Wanders RJ e Distel B. (1997) Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nat Genet* **15**, 377-380

N

Nohammer C, El-Shabrawi Y, Schauer S, Hiden M, Berger J, Forss-Petter S, Winter E, Eferl R, Zechner R e Hoefler G. (2000) cDNA cloning and analysis of tissue-specific expression of mouse peroxisomal straight-chain acyl-CoA oxidase. *Eur J Biochem* **267**, 1254-1260

Novikoff AB e Shin WY (1964) The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microsc* **3**, 187-206

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

Oliveira ME, Reguenga C, Gouveia AM, Guimarães CP, Schliebs W, Kunau WH, 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

Opperdoes FR e Michels PA. (1993) The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie* **75**, 231-234

Opperdoes FR e Borst P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* **80**, 360-364

Opperdoes FR. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* **41**, 127-151

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

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

Purdue PE, Zhang JW, Skoneczny M e Lazarow PB. (1997) Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat Genet* **15**, 381-384

R

Rachubinski RA, Fujiki Y, Mortensen RM e Lazarow PB. (1984) Acyl-Coa oxidase and hydratase-dehydrogenase, two enzymes of the peroxisomal beta-oxidation system, are synthesized on free polysomes of clofibrate-treated rat liver. *J Cell Biol* **99**, 2241-2246

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

Reguenga C. (2002) A membrana peroxissomal de fígado de rato (*Rattus norvegicus*): identificação e caracterização dos seus componentes proteicos. Tese de Doutoramento, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

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, Marzioch M, Niesen F, Wittke E, Veenhuis M e Kunau WH. (1996) The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PAS7 gene. *EMBO J* **15**, 2901-2913

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

Rodhin J. (1954) Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted cells of the mouse kidney. Ph.D. thesis, Stockholm

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

Sakai Y, Marshall PA, Saiganji A, Takabe K, Saiki H, Kato N e Goodman JM. (1995) The *Candida boidinii* peroxisomal membrane protein Pmp30 has a role in peroxisomal proliferation and is functionally homologous to Pmp27 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**, 6773-6781

Sakai Y e Subramani S. (2000) Environmental response of yeast peroxisomes. Aspects of organelle assembly and degradation. *Cell Biochem Biophys* **32**, 51-61

Santos MJ, Imanaka T, Shio H e Lazarow PB. (1988a) Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem* **263**, 10502-10509

Santos MJ, Imanaka T, Shio H, Small GM e Lazarow PB. (1988b) Peroxisome membrane ghosts in Zellweger syndrome- aberrant organelle assembly. *Science* **239**, 1536-1538

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

Schrader M, Burkhardt JK, Baumgart E, Luers G, Spring H, Volkl A e Fahimi HD. (1996) Interaction of microtubules with peroxisomes. Tubular and spherical peroxisomes in HepG2 cells and their alterations induced by microtubule-active drugs. *Eur J Cell Biol* **69**, 24-35

Schrader M, Krieglstein K e Fahimi HD. (1998a) Tubular peroxisomes in HepG2 cells: selective induction by growth factors and arachidonic acid. *Eur J Cell Biol* **75**, 87-96

Schrader M, Reuber BE, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Obie C, Stroh TA, Valle D, Schroer TA e Gould SJ. (1998b) Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* **273**, 29607-29614

Schrader M. (2001) Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. *J Histochem Cytochem* **49**, 1421-1429

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

Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Imamura A, Kondo N, Kinoshita N, Fujiki Y, Tsukamoto T, Osumi T, Imanaka T, Orii T, Beemer F, Mooijer P, Dekker C e Wanders RJ. (1998) Genetic basis of peroxisome-assembly mutants of humans, Chinese hamster ovary cells, and yeast: identification of a new complementation group of peroxisome-biogenesis disorders apparently lacking peroxisomal-membrane ghosts. *Am J Hum Genet* **63**, 1898-1903

Shimozawa N, Zhang Z, Suzuki Y, Imamura A, Tsukamoto T, Osumi T, Fujiki Y, Orii T, Barth PG, Wanders RJ e Kondo N. (1999) Functional heterogeneity of C-terminal peroxisome targeting signal 1 in PEX5-defective patients. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 504-508

Slawecki ML, Dodt G, Steinberg S, Moser AB, Moser HW e Gould SJ. (1995) Identification of three distinct peroxisomal protein import defects in patients with peroxisome biogenesis disorders. *J Cell Sci* **108**, 1817-1829

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. (1999) 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 e Subramani S. (2000) The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* **149**, 1171-1178

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

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, Koller A e Snyder WB. (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **69**, 399-418

Subramani S. (1998) Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev* **78**, 171-188

Sulter GJ, Verheyden K, Mannaerts G, Harder W e Veenhuis M. (1993) The in vitro permeability of yeast peroxisomal membranes is caused by a 31 kDa integral membrane protein. *Yeast* **9**, 733-742.

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

Tam YY e Rachubinski RA. (2002) *Yarrowia lipolytica* cells mutant for the PEX24 gene encoding a peroxisomal membrane peroxin mislocalize peroxisomal proteins and accumulate membrane structures containing both peroxisomal matrix and membrane proteins. *Mol Biol Cell* **13**, 2681-2691

Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Tsukamoto T, Osumi T e Fujiki Y. (1998) A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 883-886

Terlecky SR e Fransen M. (2000) How peroxisomes arise. *Traffic* **1**, 465-473

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. (1998) The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* **23**, 231-233

Titorenko VI, Smith JJ, Szilard RK e Rachubinski RA. (2000) Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem Biophys* **32**, 21-26

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

Tugal HB, Pool M e Baker A. (1999) Arabidopsis 22-kilodalton peroxisomal membrane protein. Nucleotide sequence analysis and biochemical characterization. *Plant Physiol* **120**, 309-320

U

Usuda N, Reddy MK, Hashimoto T, Rao MS e Reddy JK. (1988) Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Lab Invest* **58**, 100-111

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, Kiel JA, Rasmussen SW, Cregg JM e Veenhuis M. (1998) The ubiquitin-conjugating enzyme Pex4p of *Hansenula polymorpha* is required for efficient functioning of the PTS1 import machinery. *EMBO J* **17**, 3608-3618

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**, 17229-36

van der Klei IJ, Veenhuis M, Nicolay K e Harder W. (1989) In vivo inactivation of peroxisomal alcohol oxidase in *Hansenula polymorpha* by KCN is an irreversible process. *Arch Microbiol* **151**, 26-33

Van der Leij I, Franse MM, Elgersma Y, Distel B e Tabak HF (1993) PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11782-11786

van Roermund CW, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJ e Tabak HF. (1995) The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J* **14**, 3480-3486

van Roermund CW, Hettema EH, Kal AJ, van den Berg M, Tabak HF e Wanders RJ. (1998) Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *EMBO J* **17**, 677-687

Van Veldhoven P, Debeer LJ e Mannaerts GP. (1983) Water- and solute-accessible spaces of purified peroxisomes. Evidence that peroxisomes are permeable to NAD⁺. *Biochem J* **210**, 685-693

Van Veldhoven PP, Just WW e Mannaerts GP. (1987) Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of beta-oxidation. Evidence for the presence of a pore-forming protein. *J Biol Chem* **262**, 4310-4318

Veenhuis M, Harder W, van Dijken JP e Mayer F. (1981) Substructure of crystalline peroxisomes in methanol-grown *Hansenula polymorpha*: evidence for an in vivo crystal of alcohol oxidase. *Mol Cell Biol* **1**, 949-957

Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH e Harder W. (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**, 77-84

Veenhuis M, Sulter G, van der Klei I e Harder W. (1989) Evidence for functional heterogeneity among microbodies in yeasts. *Arch Microbiol* **151**, 105-110

Verleur N e Wanders RJ. (1993) Permeability properties of peroxisomes in digitonin-permeabilized rat hepatocytes. Evidence for free permeability towards a variety of substrates. *Eur J Biochem.* **218**, 75-82

W

Walton PA, Gould SJ, Feramisco JR e Subramani S. (1992a) 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, Gould SJ, Rachubinski RA, Subramani S e Feramisco JR. (1992b) Transport of microinjected alcohol oxidase from *Pichia pastoris* into vesicles in mammalian cells: involvement of the peroxisomal targeting signal. *J Cell Biol* **118**, 499-508

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

Wanders, RJA, Barth, PG e Heymans HSA. (2001) Single peroxisomal enzyme deficiencies. 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

Wang X, Unruh MJ e Goodman JM. (2001) Discrete targeting signals direct Pmp47 to oleate-induced peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 10897-10905

Waterham HR, Keizer-Gunnink I, Goodman JM, Harder W e Veenhuis M. (1992) Development of multipurpose peroxisomes in *Candida boidinii* grown in oleic acid-methanol limited continuous cultures. *J Bacteriol* **174**, 4057-4063

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

Wiebel FF e Kunau WH. (1992) The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Nature* **359**, 73-76

Wiemer EA, Nuttley WM, Bertolaet BL, Li X, Francke U, Wheelock MJ, Anne UK, Johnson KR e Subramani S. (1995) Human peroxisomal targeting signal-1 receptor restores peroxisomal protein import in cells from patients with fatal peroxisomal disorders. *J Cell Biol* **130**, 51-65

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

Wimmer C, Schmid M, Veenhuis M e Gietl C. (1998) The plant PTS1 receptor: similarities and differences to its human and yeast counterparts. *Plant J* **16**, 453-464

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. (1995) PEB1 (PAS7) in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a hydrophilic, intra-peroxisomal protein that is a member of the WD repeat family and is essential for the import of thiolase into peroxisomes. *J Cell Biol* **129**, 65-80

Zuurendonk PF e Tager JM. (1974) Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolate rat-liver cells. *Biochim Biochys Acta* **333**, 393-399