

УДК 576.32/.36+576.382

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОГЕНЕЗА ПЕРОКСИСОМ У ДРОЖЖЕЙ

© 2012 г. А. А. Сибирный^{1, 2*}

¹Институт биологии клетки Национальной академии наук Украины, Львов 79005 Украина

²University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601 Poland

Поступила в редакцию 28.04.2011 г.

Принята к печати 01.06.2011 г.

Пероксисомы содержат оксидазы, продуцирующие перекись водорода, а также каталазу, деградирующую это токсическое соединение. Другая функция пероксисом — β -окисление жирных кислот, характерна для всех эукариот, от дрожжей до человека. Однако пероксисомы служат также местом локализации компонентов различных метаболических путей. У грибов в пероксисомах находятся ферменты, вовлеченные в катаболизм необычных источников углерода и азота (метанол, пурины, D-аминокислоты, пипеколиновая кислота, саркозин, гликолат, спермидин и др.), а также в биосинтез лизина у дрожжей и пенициллина у мицелиальных грибов. Нарушение структуры и функций пероксисом приводит к развитию многих заболеваний человека. Идентифицированы мутанты дрожжей с дефектами биогенеза пероксисом, у которых мутированы гомологи генов, поврежденных у больных с нарушением функций пероксисом. Биогенез пероксисом интенсивно изучают в течение последних двух десятилетий с использованием одно- и многоклеточных модельных систем. Оказалось, что многие черты механизмов биогенеза пероксисом и белки, участвующие в этом процессе, обладают удивительным сходством у всех эукариот — от дрожжей до человека. Дрожжи представляют удобную модель для такого рода исследований. В представленном обзоре обобщены данные о молекулярных факторах биогенеза пероксисом, функциях белков-пероксинов, импорте матричных и мембранных белков пероксисом, а также о механизмах деления и наследования пероксисом у дрожжей.

Ключевые слова: пероксисомы, дрожжи, пероксины, биогенез органелл, деление и наследование пероксисом, импорт белков в пероксисомы, гены *PEX*.

MOLECULAR MECHANISMS OF PEROXISOME BIOGENESIS IN YEASTS, by A. A. Sibirny^{1, 2*} (¹Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv 79005 Ukraine, *e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua; ²University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601 Poland). Peroxisomes contain oxidases generating hydrogen peroxide, and catalase degrading this toxic compound. Another characteristic function of each eukaryotic peroxisome, from yeast to man, is fatty acid β -oxidation. However, in peroxisomes a variety of other metabolic pathways are located. In fungi, peroxisomes contain enzymes involved in catabolism of unusual carbon and nitrogen sources (methanol, purines, D-amino acids, pipercolonic acid, sarcosine, glycolate, spermidine etc) as well as biosynthesis of lysine in yeasts and penicillin in mycelial fungi. Impairment of peroxisomal structure and functions causes many human disorders. The similar defects have been identified in yeast mutants defective in peroxisomal biogenesis. Peroxisomal biogenesis is actively studied during last two decades using uni- and multicellular model systems. It was observed that many aspects of peroxisomal biogenesis and proteins involved in this process display striking similarity between all eukaryotes, from yeasts to humans. Yeast is a convenient model system for this kind of research. Current review summarizes data on molecular events of peroxisomal biogenesis, functions of peroxine proteins, import of peroxisomal matrix and membrane proteins and on mechanisms of peroxisomedivision and inheritance.

Keywords: peroxisomes, yeasts, peroxins, organelle biogenesis, peroxisome division and inheritance, protein import in peroxisomes, *PEX* genes.

ВВЕДЕНИЕ

Пероксисомы — это органеллы, содержащие оксидазы, которые продуцируют перекись водорода, а также каталазу, разлагающую это токсиче-

ское соединение. Вообще говоря, набор ферментов и их содержание в пероксисомах могут варьировать, влияя таким образом на функции этих органелл. Единственной общей для всех пероксисом функцией считается детоксикация реактивных форм кислорода. Важной функцией перок-

* Эл. почта: sibirny@cellbiol.lviv.ua

сисом, характерной для всех эукариот, от дрожжей до человека, является β -окисление жирных кислот. Однако пероксисомы служат также местом локализации компонентов разнообразных метаболических путей. У грибов пероксисомы содержат ферменты, участвующие в катаболизме необычных источников углерода и азота (метанол, пурины, D-аминокислоты, пипеколиновая кислота, саркозин, гликолат, спермидин и др.), а также в биосинтезе лизина у дрожжей и пенициллина у мицелиальных грибов [1–4]. В клетках млекопитающих пероксисомы принимают участие в ряде катаболических и анаболических процессов, таких как окислительная деградация длинноцепочечных жирных кислот, а также пуринов, некоторых аминокислот, пипеколиновой кислоты, в биосинтезе плазмалогенов, холестерина и желчных кислот [5].

У паразитических простейших родов *Trypanosoma* и *Leishmania* ферменты гликолиза находятся в специализированной пероксисоме, называемой гликосомой. Такая компартментализация ферментов гликолиза необходима для выживания этих простейших. Тельца Воронина у мицелиальных грибов, служащие для запечатывания септальных пор, также представляют собой специализированные пероксисомы. Пероксисомы растений можно разделить на три группы: глиоксисомы, пероксисомы листьев и неспециализированные пероксисомы. Все они содержат каталазу, однако в остальном сильно различаются. Глиоксисомы преимущественно вовлечены в глиоксилатный цикл и β -окисление жирных кислот, тогда как пероксисомы листьев участвуют в метаболизме гликолевой кислоты. Пероксисомы животных клеток и грибов содержат примерно по 50 белков, растений — около 100. При помощи протеомики и генетических исследований обнаруживаются все новые функции пероксисом [1, 6].

Нарушение структуры и функций пероксисом лежит в основе многих заболеваний человека. В 1964 г. появилось описание так называемого синдрома Цельвегера, однако лишь в конце 1980-х стало ясно, что клетки больных этим синдромом вместо пероксисом содержат лишь их рудименты, лишённые нескольких матриксных белков [7]. Затем показали, что по нарушению транспорта белков в пероксисомы можно выделить четыре группы больных синдромом Цельвегера: нарушен транспорт пероксисомных белков, в котором участвует лишь сигнал PTS1 (peroxisome targeting signal, PTS); лишь PTS2; одновременно PTS1 и PTS2; наконец нарушены оба пути транслокации белков (PTS1 и PTS2), а также биогенез мембраны пероксисом [5]. Повреждение пероксисом имеет очень серьезные последствия и часто заканчивается летальным исходом в течение первого года жизни [8]. Интересно, что идентичные генетические дефекты обнаружены у дрожжей с нарушением биогенеза пероксисом (так называемые мутанты

rex) [9]. В общем, пероксисомы представляют собой удивительно динамичную органеллу, размеры которой, количество в клетке и содержание белков изменяются в ответ на изменения внешней среды. Биогенезу пероксисом сопутствуют другие процессы, включая передачу сигнала [10], модификацию хроматина [11], реорганизацию трансскрипционных сетей [12, 13] и изменения протеома пероксисом [14, 15].

Биогенез пероксисом и их деградация активно изучаются в течение последних двух десятилетий с использованием одно- и многоклеточных модельных систем. Механизмы биогенеза пероксисом и импорт белков в эту органеллу рассмотрены в ряде обзоров, опубликованных в последние годы [1, 3, 4, 6, 16–20]. Представленный обзор в основном ограничен данными, полученными при изучении дрожжей. Однако поскольку многие аспекты механизмов биогенеза пероксисом и белки, вовлеченные в этот процесс, обладают удивительным сходством у всех эукариот — от дрожжей до человека, для полноты картины в ряде случаев цитируются работы, выполненные на высших эукариотах.

Дрожжи представляют собой удобную модель для изучения механизмов биогенеза пероксисом, поскольку перенос клеток со среды с глюкозой в среду с олеатом и/или метанолом в случае метилотрофных дрожжей ведет к индукции синтеза пероксисомных ферментов, росту и делению пероксисом. В определенных условиях при росте на среде с метанолом пероксисомы могут занимать до 80% объема клеток [21]. Если же перенести клетки, растущие на среде с метанолом либо олеатом, в среду с глюкозой, либо со среды с метанолом в среду с этанолом, то наступает достаточно быстрая автофагическая деградация большинства пероксисом (пексофагия), однако одна пероксисома каким-то пока не совсем понятным образом избегает такой деградации [22]. Настоящий обзор посвящен молекулярным механизмам регуляции биогенеза, деления и наследования пероксисом у дрожжей.

БИОГЕНЕЗ ПЕРОКСИСОМ

Всего на сегодняшний день идентифицировано более 30 генов, продукты которых участвуют в биогенезе пероксисом. Это так называемые гены *PEX* (от **peroxin**, продукты этих генов называются пероксидами). Пероксины обозначают PexNp либо PexN, где N — порядковый номер пероксида. Большинство пероксинов принимает участие в импорте белков матрикса пероксисом [23]. Два гена *PEX* (*PEX3* и *PEX19*) вовлечены в доставку пероксисомных мембранных белков, некоторые участвуют в определении размера и количества пероксисом в клетке [24]. Длительное время доминировало представление, согласно которому

пероксисомы — это автономные образования, которые размножаются лишь путем деления предсуществующих пероксисом. Эта модель исходила из наблюдений синтеза матричных и мембранных белков пероксисом на свободных полисомах с последующим посттрансляционным включением в предсуществующие органеллы. Недавно получили данные в пользу модели, в которой пероксисомы могут возникать *de novo* из эндоплазматического ретикулула. С использованием трансформации клеток дрожжей вектором, несущим ген *PEX*, который комплементирует мутационный дефект, этот феномен обнаружили у мутантов *pex*, лишенных даже рудиментов пероксисомных мембран [25, 26]. Теперь ясно, что одновременно действуют два механизма — синтез *de novo* из эндоплазматического ретикулула и деление существующих пероксисом, в частности, у высших эукариот и *Yarrowia lipolytica* [20, 27–29]. Однако у штаммов дикого типа *Saccharomyces cerevisiae* и *Hansenula polymorpha* пероксисомы размножаются исключительно делением [30, 31]. Образование пероксисом *de novo* у этих видов происходит лишь в условиях, когда клетка не содержит пероксисом.

Большинство известных генов *PEX* были идентифицированы с использованием мутантов дрожжей, дефектных по биогенезу пероксисом. Сначала у *S. cerevisiae* и метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* и *Pichia pastoris* такие мутанты были выделены при помощи негативной селекции, когда отбирали клетки, утратившие способность расти на среде с олеиновой кислотой и/или метанолом, но не с другими источниками углерода [32–34]. Впоследствии предложили несколько методов позитивной селекции мутантов *pex* дрожжей. Так, ингибирование каталазы либо ее генетический дефект делают невозможным рост дрожжей на среде с олеатом, в то время как мутанты *pex* не синтезируют активную ацил-КоА-оксидазу (пероксисомный фермент) и способны расти в данных условиях [35, 36]. Штаммы, у которых белок, определяющий устойчивость к блеомицину, локализован в пероксисомах (вследствие присутствия в нем сигнала PTS1), не могли расти в среде с блеомицином, поскольку антибиотик не доставлялся в пероксисомы. Мутанты, устойчивые к блеомицину, имели дефект в биогенезе пероксисом [37]. Еще два метода позитивной селекции разработаны на дрожжах *P. pastoris*. Они основаны на наблюдении, что мутанты *pex* практически не обладают алкогольоксидазной активностью. В одной схеме в качестве селекционного агента использовали аллиловый спирт, окисляемый алкогольоксидазой до чрезвычайно токсичного акролеина. Клетки дикого типа, содержащие алкогольоксидазу, не росли на среде с аллиловым спиртом в отличие от мутантов *pex*. Во второй схеме использовали мутант *P. pastoris* с дефектом гена формальдегиддегидрогеназы, *fld1*. Клетки этого мутанта были чрезвычай-

но чувствительны к формальдегиду и метанолу, окисляемому алкогольоксидазой до формальдегида. В то же время мутант *fld1pex* был устойчив к экзогенному метанолу. Используя оба метода селекции, удалось выделить десятки *pex*-мутантов, среди которых оказались представители трех новых групп комплементации [38].

Анализ фенотипа мутантов *pex* и характеристика соответствующих пероксинов позволили примерно к 2000 г. описать 17 генов *PEX* (таблица). Механизмы функционирования пероксинов установлены благодаря анализу фенотипа мутантов, использованию дрожжевой двухгибридной системы и разработке методов биохимического анализа этих белков. В группу пероксинов входят рецепторы PTS1 (*Pex5p*) [39–41] и PTS2 (*Pex7p*) [42–44], ассоциированный с пероксисомами докинг-белок (*Pex13p*) для рецептора PTS1 (*Pex5p*) [37, 45, 46], а также еще один докинг-белок (*Pex14p*), который связывается с рецепторами PTS1 (*Pex5p*) и PTS2 (*Pex7p*) [47]. Три белка *Pex* (*Pex2p*, *Pex10p* и *Pex12p*) содержат цинковые пальцы и являются интегральными мембранными белками [48–50], два (*Pex1p* и *Pex6p*) — это АТРазы семейства AAA [51–53], *Pex4p* относится к убиквитин-конъюгирующим ферментам [54, 55], *PxF* — фарнезилированный белок, связанный с пероксисомами [56, 57], *Pex11p* принимает участие в пролиферации пероксисом [58–60], матриксный белок *Pex8p* содержит обе сигнальные последовательности доставки — PTS1 и PTS2, и участвует в биогенезе пероксисом [61], два белка (*Pex16p* и *Pex17p*), ассоциированных с внешней стороной мембраны, скорее всего прямо или косвенно вовлечены в импорт ряда матричных белков [62, 63] и, наконец, несколько пероксинов кодируют мембранные белки, возможно, участвующие в транслокации белков через мембрану [51, 57, 64].

К настоящему времени описаны 34 гена *PEX* и соответствующие им пероксины.

Ряд пероксинов проявляют видоспецифичность. Так, известны пероксины, которые не встречаются у метилотрофных дрожжей, а лишь у других аскомицетов (*S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *Neurospora crassa*), например *Pex16p*, *Pex23p*, *Pex24p*, *Pex33p*. Известен также пероксин, характерный только для млекопитающих (*Pex26p*).

ИМПОРТ МАТРИКСНЫХ БЕЛКОВ ПЕРОКСИСОМ

Известно три типа сигналов доставки, или таргетинга (targeting signals) пероксисомных белков (PTS). В белках пероксисомного матрикса таких сигналов два — PTS1 и PTS2, в то время как мембранные белки пероксисом используют сигналы, называемые mPTS. У большинства матричных

Функции генов *PEX*

Ген	Функция
<i>PEX1</i>	Семейство AAA АТРаза, локализован в цитозоле и везикулах, участвует в биогенезе пероксисом
<i>PEX2</i>	C ₃ HС ₄ цинк-связывающий интегральный мембранный белок
<i>PEX3</i>	Интегральный мембранный белок, участвующий в биогенезе; mPTS локализован в первых 40 аминокислотных остатках
<i>PEX4</i>	Ассоциированный с пероксисомами убиквитин-конъюгирующий фермент
<i>PEX5</i>	Рецептор PTS1; семь TPR-доменов, локализован в цитозоле и пероксисомах
<i>PEX6</i>	Принадлежит к АТРадам семейства AAA; локализация цитозольная и связанная с везикулами
<i>PEX7</i>	Пероксисомный рецептор PTS2; семь WD-повторов
<i>PEX8</i>	Ассоциированный с пероксисомами белок, содержит PTS1
<i>PEX9</i>	Интегральный мембранный белок пероксисом
<i>PEX10</i>	C ₃ HС ₄ цинк-связывающий интегральный мембранный белок
<i>PEX11</i>	Ассоциированный с пероксисомами белок, участвующий в пролиферации пероксисом
<i>PEX12</i>	C ₃ HС ₄ цинк-связывающий интегральный мембранный белок
<i>PEX13</i>	SH3-домен-содержащий интегральный мембранный белок
<i>PEX14</i>	39 кДа мембранный белок пероксисом, дрожжевой Pex14p взаимодействует с Pex5p, Pex7p, Pas9 и Pex13p
<i>PEX15</i>	Фосфорилированный интегральный мембранный пероксин, необходим для биогенеза пероксисом. Клетки, лишенные Pex15p, накапливают матриксные пероксины в цитозоле, тогда как его сверхэкспрессия приводит к нарушению сборки пероксисом. N-конец белка обращен в цитозоль, С-конец внутрь пероксисомы [66]. Pex15p обнаруживается также во фракции эндоплазматического ретикулума [67]
<i>PEX16</i>	Белок, локализованный с внутренней стороны пероксисом; необходим для импорта ряда матриксных белков; сверхэкспрессия вызывает накопление увеличенных пероксисом.
<i>PEX17</i>	Белок, периферически ассоциированный с пероксисомной мембраной. Клетки, лишенные Pex17p, обладают большими мультимембранными структурами и селективным повреждением импорта матриксных белков
<i>PEX18</i>	Участвует в импорте пероксисомных матриксных белков, содержащих PTS2, взаимодействует с Pex7p; его функции частично может заменить пероксин Pex21p [68, 69]
<i>PEX19</i>	Фарнезилированный белок, действующий как шаперон новосинтезируемых пероксисомных мембранных белков класса I. Наряду с Pex3p, Pex19p необходим для правильной локализации и стабильности мембранных белков пероксисом [70, 71]
<i>PEX20</i>	Вспомогательный цитозольный белок, участвующий в доставке пероксисомных белков, содержащих PTS2, его отсутствие ведет к неправильной локализации другого пероксина, Pex8p [72–74]
<i>PEX21</i>	Пероксин Pex21p, необходимый для доставки матриксных пероксисомных белков, содержащих PTS2, посредством взаимодействия с Pex7p. Функции Pex21p может частично заменить пероксин Pex18p [68, 69]
<i>PEX22</i>	Мембранный белок пероксисом, необходимый для импорта белков матрикса пероксисом, содержит на N-конце сигнал мембранного транспорта. Белок взаимодействует с убиквитин-конъюгирующим ферментом Pex4p и необходим для его локализации в пероксисомах, поскольку у <i>delta pex22</i> -штаммов Pex4p нестабильный и локализуется в цитозоле. Мутанты с дефектами <i>PEX4</i> и <i>PEX22</i> имеют сходный фенотип и не содержат Pex5p, что свидетельствует об участии Pex4p или Pex22p в том же этапе биогенеза пероксисом [75]
<i>PEX23</i>	Интегральный мембранный пероксин; мутанты с дефектом этого гена не содержат различных пероксисом, и белки матрикса пероксисом локализируются в цитозоле. Олеиновая кислота индуцирует синтез этого пероксина. Мутанты <i>pex23</i> накапливают везикулярные структуры, содержащие мембранные и матриксные белки пероксисом [76]

Таблица. Окончание

Ген	Функция
<i>PEX24</i>	Интегральный мембранный пероксин, синтез которого индуцируется олеатом. Мутанты <i>pep24</i> имеют дефекты в доставке матриксных и мембранных белков в пероксисому, хотя мембранные структуры таких мутантов содержат некоторые пероксисомные белки [77]. Вместе с пероксидами <i>Pex28p</i> и <i>Pex29p</i> участвует в регуляции определения количества пероксисом. Образует семейство пероксинов <i>Pex24</i> (<i>Pex24p</i> , <i>Pex28p</i> , <i>Pex29p</i>)
<i>PEX25</i>	Мембранный белок пероксисом, необходимый для регуляции размера и поддержания пероксисом в клетке. Образует вместе с <i>Pex27p</i> и <i>Pex11p</i> семейство пероксинов <i>Pex11</i> . Индуцируется олеатом, взаимодействует с гомологичным белком <i>Pex27p</i> [78]
<i>PEX26</i>	Мембранный белок пероксисом, участвующий в импорте белков в митохондрию посредством связывания с <i>Pex1p</i> и <i>Pex6p</i> с образованием гетеромерных АТФ-зависимых комплексов семейства AAA, необходимых для импорта белков в митохондрию [79]
<i>PEX27</i>	Мембранный белок <i>Pex27p</i> – участвует в делении пероксисом и вместе с <i>Pex25p</i> и <i>Pex11p</i> образует семейство пероксинов <i>Pex11</i> . Делеция гена приводит к появлению пероксисом большого размера [78, 80]
<i>PEX28</i>	Интегральный мембранный пероксин, участвует в регуляции размера, числа и распределения пероксисом; вместе с белками <i>Pex24p</i> и <i>Pex29p</i> образует семейство пероксинов <i>Pex24</i> . Делеция <i>PEX28</i> сопровождается увеличением количества пероксисом уменьшенного размера [81]
<i>PEX29</i>	Интегральный мембранный пероксин, вместе с <i>Pex24p</i> и <i>Pex28p</i> образует семейство пероксинов <i>Pex24</i> . Участвует в регуляции размера и количества пероксисом в клетке. Делеция <i>PEX29</i> приводит к увеличению количества пероксисом уменьшенного размера [81]
<i>PEX30</i>	Интегральный мембранный пероксин, участвующий в регуляции количества пероксисом в клетке, частично может быть заменен <i>Pex31p</i> . Генетические данные указывают на функционирование после пероксинов <i>Pex28p</i> и <i>Pex29p</i> . Индуцируется олеатом. Белки <i>Pex30p</i> , <i>Pex31p</i> , <i>Pex32p</i> <i>S. cerevisiae</i> гомологичны белку <i>Pex23p</i> <i>Y. lipolytica</i> [82]. У <i>P. pastoris</i> пероксины <i>Pex30p</i> и <i>Pex31p</i> – интегральные мембранные белки, содержащие так называемый домен Dysferlin, локализируются как в пероксисомах, так и в эндоплазматическом ретикулуме [83]
<i>PEX31</i>	Интегральный мембранный пероксин, участвует в регуляции размера и количества пероксисом в клетке. Частично комплементируется <i>Pex30p</i> и <i>Pex32p</i> [82]. <i>Pex31p</i> <i>P. pastoris</i> , как указывалось выше, локализуется и в пероксисомах, и в эндоплазматическом ретикулуме [83]
<i>PEX32</i>	Интегральный мембранный пероксин, участвует в регуляции размера пероксисом, отсутствие может быть частично компенсировано <i>Pex31p</i> . Генетические данные указывают на функционирование после пероксинов <i>Pex28p</i> и <i>Pex29p</i> [82]
<i>PEX33</i>	Компонент докинг-комплекса гриба <i>N. crassa</i> , взаимодействует с <i>Pex14p</i> и PTS1-рецептором <i>Pex5p</i> . Делеция <i>PEX33</i> ведет к дефекту глиоксисом и телец Воронина. Функционально <i>Pex33p</i> напоминает <i>Pex17p</i> , несмотря на отсутствие структурного сходства с ним [84]
<i>PEX34</i>	Интегральный мембранный пероксин дрожжей. Позитивный эффектор деления пероксисом, сверхэкспрессия <i>Pex34p</i> ведет к увеличению количества пероксисом в клетке. Взаимодействует с пероксидами семейства <i>Pex11p</i> : <i>Pex11p</i> , <i>Pex25p</i> и <i>Pex27p</i> , активируя деление пероксисом [85]

Примечание. Характеристика пероксинов *Pex1p*–*Pex17p* взята из ранних обзоров [6, 65], детали в тексте; остальных пероксинов (*Pex18p*–*Pex34p*) – из работ, цитированных после краткого описания функций соответствующего пероксина.

белков имеется лишь один PTS (PTS1 либо PTS2), причем пероксин *Pex8p* *P. pastoris*, содержащий оба сигнала, является исключением [74]. В то же время, многие мембранные белки пероксисом содержат множественные взаимозаменяемые сигналы mPTS [86]. Сигналы доставки матриксных

белков распознаются специфическими цитозольными рецепторами и/или корецепторами, которые сопровождают переносимый белок до мембраны пероксисом [73]. При этом матриксные белки и их рецепторы проникают в матрикс [73, 87–89], где перенесенный белок отделяется от рецептора, а

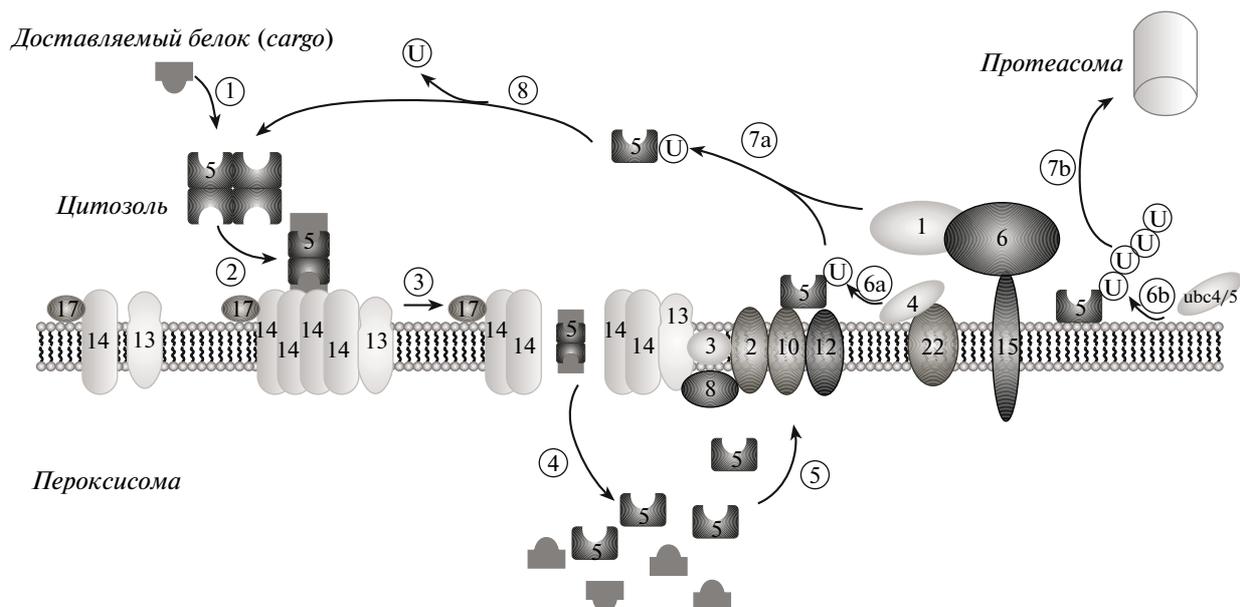


Рис. 1. Импорт белков матрикса пероксисом (согласно [18] с модификациями). 1 – Доставляемый белок связывается с растворимым рецептором (Pex5 для белков, содержащих PTS1-сигнал, Pex7 и PTS2-коррецепторы для белков, содержащих сигнал PTS2). 2 – Комплекс рецептор-доставляемый белок связывается на пероксисомной мембране с так называемым докинг-комплексом. 3 – Происходит сборка транслокона, после чего комплекс доставляемого белка с рецептором транслоцируется в пероксисомный матрикс. 4 – Комплекс белок-рецептор распадается в пероксисомном матриксе, вызывая освобождение переносимого белка. 5 – Рецепторы экспортируются на пероксисомную мембрану. Рецепторы моноубиквитируются путем взаимодействия с Pex4 (для рециклизации) (6a) или полиубиквитируются (6b) путем взаимодействия с Ubc4/5 (для деградации в так называемом пути RADAR). Рецепторы рециклируются в цитозоле под действием АТФазы AAA, а также пероксинов Pex1 и Pex6 (7a), либо деградируют в так называемом пути RADAR с участием протеасомы (7b). 8 – Рецепторы деубиквитируются и используются в следующем раунде импорта. Цифры обозначают порядковый номер гена и белка-пероксиана.

свободный рецептор сначала поступает на пероксисомную мембрану путем ретротранслокации [73], после чего возвращается назад в цитозоль с участием АТФ-зависимого механизма рециклизации [90]. На последнем этапе часто, хотя и не всегда, происходит моноубиквитинирование, как правило, необычного остатка цистеина, а не лизина [91–94]. Во время рециклизации рецептора убиквитин удаляется при помощи еще не идентифицированного деубиквитирующего фермента, и такой рециклизованный рецептор способен участвовать в следующих циклах импорта матриксных белков [73]. Схематическое изображение импорта матриксных белков в пероксисому представлено на рис. 1.

Таргетинг посредством PTS1

Импорт начинается в цитозоле, где доставляемый белок распознается растворимым белком-рецептором. На С-конце доставляемого белка находится PTS1, первоначально идентифицированный как трипептид SKL в составе люциферазы светлячков [95]. Впоследствии нашли целый ряд С-концевых трипептидов, действующих в качестве сигналов PTS1 *in vivo*. Эти трипептиды в ос-

новном укладываются в последовательность [S/A/C]–[K/R/H]–[L/M], хотя обнаружены структуры, согласующиеся с указанным консенсусом лишь по двум из трех аминокислотных остатков [6, 96]. PTS1-содержащие белки распознаются цитозольным рецептором Pex5p [40, 97], который состоит по крайней мере из двух доменов. N-концевой домен выполняет две функции, включая доставку к пероксисомной мембране и рециклизацию рецептора после завершения импорта, и связывание рецептора для альтернативного (PTS2) пути импорта. С-концевая последовательность Pex5p содержит домен, специфически распознающий PTS1 путем взаимодействия с четырьмя остатками аспарагина TPR (тетратрикопептидный повтор, tetratricopeptide repeat) на N-конце Pex5p [98]. Мутации остатков Pex5p, участвующих в связывании PTS1, вовлечены в развитие различных пероксисомных заболеваний, включая неонатальную адренолейкодистрофию и синдром Целвегера [2].

Таргетинг посредством PTS2

Значительно меньше белков пероксисомного матрикса доставляется при помощи N-концевого

PTS2 – консервативного нонапептида с консенсусной последовательностью [R/K]–[L/V/I]–X5–[H/Q]–[L/A] (где X – любой аминокислотный остаток). Интересно, что в клетках *S. cerevisiae* PTS2 используется исключительно для транспорта 3-кетоацилтиолазы, тогда как у нематоды *Caenorhabditis elegans* этот путь не работает, а у модельного растения *Arabidopsis thaliana* при помощи PTS2 в пероксисому переносятся не менее 60 матриксных белков [4, 6]. Биологическая роль таких различий неизвестна. PTS2 обычно отщепляется от переносимого белка после импорта в пероксисому (что не наблюдается у PTS1-содержащих белков). Однако, например, содержащая PTS2 тиолаза *S. cerevisiae* не процессируется после импорта в пероксисому.

PTS2 распознается рецептором Pex7p [99]. В отличие от Pex5p, Pex7p нуждается в белках-помощниках, действующих как корецепторы. Рецепторный белок Pex7p находится преимущественно в цитозоле, а небольшое его количество обнаруживается в пероксисомах [87, 100, 101]. Pex7p очевидно является мономером, о чем свидетельствует анализ комплекса PTS2 *S. cerevisiae*, содержащего Fox3p (тиолаза)/Pex7p/Pex18p в соотношении 2 : 1 : 1 [102]. Разные организмы различаются природой белков-помощников для Pex7p. У *S. cerevisiae* это Pex18p и Pex21p [103]; тогда как у *H. polymorpha*, *P. pastoris* и *Y. lipolytica* это Pex20p [86, 104, 105]. Мутации в гене *PEX7* человека приводят к развитию точечной хондродисплазии ризомелического типа [43, 106].

В отдельных случаях в доставку матриксных белков пероксисом вовлечены уникальные белки. В качестве примера можно привести участие пируваткарбоксилазы (Puc1p) в доставке в пероксисому *H. polymorpha* матриксного белка алкогольоксидазы [107]. В отличие от многих других олигомерных белков октамерная пероксисомная FAD-содержащая алкогольоксидаза проникает в пероксисому в форме мономера [108]. Установлено, что связывание с FAD является обязательным условием импорта алкогольоксидазы *H. polymorpha* в пероксисому, так как точечная мутация (G15A), предотвращающая связывание FAD, полностью блокирует импорт этого фермента. Это особенно интересно, поскольку мутантная алкогольоксидаза содержит сигнал PTS1. Возможно, у алкогольоксидазы *H. polymorpha* PTS1 не распознается Pex5p [109]. Точные причины этого явления не выяснены. Октамеризация алкогольоксидазы происходит уже внутри пероксисомы. Считается, что в связывании FAD с мономерами алкогольоксидазы в пероксисоме принимает участие Puc1p, одновременно он препятствует сборке мономеров в цитозоле. Последнее особенно важно, поскольку октамер алкогольоксидазы не способен проникать в пероксисому [110]. Мутанты *puc1 H. polymorpha* и *P. pastoris* не растут на

метаноле, имеют очень низкую алкогольоксидазную активность, и в цитозоле у них накапливаются мономеры алкогольоксидазы, не содержащие FAD [107]. Установлено, что для сборки алкогольоксидазы не нужна активность пируваткарбоксилазы, по-видимому, за сборку отвечает транскарбоксилазный домен этого фермента [111].

Не все этапы импорта матриксных белков вполне понятны. Основной нерешенный вопрос – идентификация пероксинов, непосредственно участвующих в этапе транслокации белков через пероксисомную мембрану. Известные свойства мутантов, у которых блокирован импорт белков, содержащих PTS1 и PTS2, позволяют считать, что компоненты субкомплексов докинг-белков и белка с RING-доменом образуют импортомер (либо транслон) [112, 113]. Однако изучение проникновения Pex8p в пероксисому выявило неожиданные и важные детали. Pex8 – это единственный матриксный пероксин, содержащий оба сигнала доставки – PTS1 и PTS2, причем любой из них обеспечивает импорт. Показано, что даже Pex13p (эволюционно консервативный белок) и Pex17p нельзя считать белками, совершенно необходимыми для импорта Pex8p, хотя они и делают процесс более эффективным [18]. По-видимому, по крайней мере в случае Pex8p, Pex14p самостоятельно может действовать как минимальный транслон в мембране. Пока неясно, входят ли рецепторы PTS в состав транслона, однако следует напомнить, что Pex5, возможно, включается в липидные бислои с образованием поры [114].

Неизвестно как освобождается пероксин, перенесенный в пероксисому. Показано, что матриксный белок Pex8p взаимодействует с Pex5p стехиометрически, и такое взаимодействие способствует освобождению матриксного белка Pex8p [115]. Установлено, что импорт рецепторов не зависит от АТФ [89, 116]. Не исключено, что Pex5p образует в мембране пору для проникновения импортируемых белков (так называемая модель “временной поры” [117]).

Несмотря на то, что рецепторы Pex5p и Pex7p, участвующие в путях переноса с использованием PTS1 и PTS2, обладают очень незначительной гомологией, они проявляют замечательное сходство в поведении и динамике во время импорта пероксинов. Оба белка образуют олигомеры, связывают пероксин, после чего переходят в димерную форму. Сначала они взаимодействуют с Pex14p, а затем с Pex8p, Pex13p и Pex12p. Механизм входа и выхода пероксина одинаков [73].

Пока очень мало известно о роли цитозольных шаперонов в импорте пероксисомных белков и биогенезе пероксисом. Показано, что для импорта матриксных пероксинов необходим белок Djplp [118]. Наиболее вероятно, что качество пе-

роксисомных белков контролируется убиквитин-протеасомной системой (UPS), одной из основных клеточных систем, участвующих в процессах деградации белков. Подобный мультиферментный комплекс опознает модифицированные белки при помощи нескольких молекул убиквитина, ковалентно связываемых с деградируемым белком (так называемое полиубиквитинирование) [119]. Поскольку убиквитин-протеасомная система находится лишь в цитозоле и ядре, белки, локализованные в других компартментах, как правило, не могут служить ее субстратами. Хорошо охарактеризованное исключение представляет эндоплазматический ретикулум, в котором функционирует связанная с ним система деградации белков (endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system). Эта система распознает цитозольные и мембранные белки с неправильной пространственной структурой, убиквитинирует их, а затем удаляет из эндоплазматического ретикулума и деградирует в протеасоме [120]. По-видимому, существуют системы деградации, подобные ERAD, связанные с внешней мембраной митохондрий (the outer mitochondrial membrane-associated protein degradation pathway, или OMMAD) [121] и с пероксисомами (receptor accumulation and degradation in the absence of recycling, или RADAR) [92]. Однако следует помнить, что пероксисомы содержат собственные специфические протеазы, способные распознавать и деградировать поврежденные белки внутри органеллы. По-видимому, внутрипероксисомная система деградации дополняет цитозольную протеасомную убиквитин-зависимую систему [3]. Впрочем, о механизмах деградации нефункциональных и поврежденных белков внутри пероксисом известно очень мало. Пероксисомы *Candida boidinii* содержат протеазную активность [122], однако ген, кодирующий эту активность, не идентифицирован. Недавно в пероксисомах мышей обнаружили протеазу Lon [123], а у *H. polymorpha* – ее ортолог [124], обладающий скорее всего также протеазной активностью. Протеазу Lon впервые нашли в клетках *E. coli* [125], а в дальнейшем и у большинства других организмов, причем ее структура оказалась на удивление консервативной. Все дрожжи, за исключением *S. cerevisiae* и *C. glabrata*, содержат две изоформы Lon, одна из которых потенциально локализована в митохондриях, а другая, скорее всего, в пероксисомах [124]. Пероксисомная протеаза Lon (pLon) *H. polymorpha* содержит PTS1, участвующий, по-видимому, в деградации белков пероксисомного матрикса, распознающих неправильную пространственную структуру. Пероксисомная протеаза pLon относится, очевидно, к так называемым белкам домашнего хозяйства, которые предотвращают повреждение пероксисом, вызванное генерацией свободных радикалов.

ИМПОРТ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ПЕРОКСИСОМ

У большинства мутантов *rex* с дефектами в биогенезе пероксисом и с нарушениями импорта белков матрикса не изменен импорт мембранных белков пероксисом (PMP) в ремнанты, или “тени” (ghosts) пероксисом [2, 17]. Это свидетельствует о принципиальных различиях в механизмах импорта матриксных и мембранных белков пероксисом [46, 126].

Известно, что биогенез мембранных белков пероксисом зависит от эндоплазматического ретикулума. Следует сказать, что доставка мембранных белков и происхождение пероксисом тесно связаны. Ранее считалось, что органеллы (митохондрии, хлоропласты, пероксисомы) размножаются делением предсуществующих органелл [127, 128]. Новые данные, однако, указывают на важную роль эндоплазматического ретикулума в биогенезе как мембранных белков, так и пероксисом в целом. Показано, что при экспрессии гена *PEX3* дикого типа в клетках мутанта *rex3* белок Pex3p сначала включается в эндоплазматический ретикулум, после чего удаляется оттуда через небольшие везикулы, в дальнейшем дозревающие до пероксисом [25, 129, 130]. Согласно модели биогенеза пероксисом *de novo*, большинство, если не все, мембранные белки попадают в пероксисому через эндоплазматический ретикулум [131]. В настоящее время считается, что пероксисомы могут возникать как из везикул, производных эндоплазматического ретикулума, так и путем деления предсуществующих пероксисом [30, 131, 132]. Однако обсуждается вопрос, образуются ли пероксисомы дрожжей *de novo* постоянно или лишь в определенных необычных условиях, как, например, в мутантных клетках, лишенных пероксисом [18].

Неясными остаются детали доставки мембранных пероксинов. Следует подчеркнуть, что известно два класса мембранных пероксинов – с последовательностями типа хвост-якорь, как у Pex15p, а также обычные мембранные белки с одним или несколькими трансмембранными доменами, например Pex2p. Пероксины Pex3p, Pex16p, Pex19p, по-видимому, участвуют в ранних этапах пути ретикулум-пероксисома. Это самые ранние мембранные пероксины, связывающиеся с эндоплазматическим ретикулумом [133, 134]. В клетках *Y. lipolytica* и млекопитающих новосинтезированный мембранный пероксин Pex16p включается в эндоплазматический ретикулум и служит каркасом для связывания других пероксинов из цитоплазмы, таких как Pex3p и PMP34p [28, 135]. У дрожжей, не содержащих гомолога *PEX16*, процесс несколько отличается. Например, у *S. cerevisiae* Pex3p сначала направляется в эндоплазматический ретикулум, после чего сегрегирует в препен-

роксисомное образование вместе с мембранным пероксином Pex19p, который действует в качестве рецептора и во взаимодействии с Pex3p обеспечивает импорт других мембранных пероксинов в пероксисому [136]. Однако временная локализация некоторых мембранных пероксинов в эндоплазматическом ретикулуме, например Pex30p и Pex31p у *P. pastoris* [137], может быть связанной с другими процессами. Предполагается возможность существования пути везикулярного транспорта, посредством которого липиды из эндоплазматического ретикулума вместе с некоторыми мембранными белками поступают в пероксисомы, хотя последние данные свидетельствуют о прямом переносе фосфолипидов из эндоплазматического ретикулума в пероксисомы без везикулярного транспорта [138]. Таким образом, физиологическая роль локализации некоторых мембранных пероксинов в эндоплазматическом ретикулуме нуждается в дальнейшем изучении.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЛЕНИЯ ПЕРОКСИСОМ

Основываясь на функциях белка Pex11B млекопитающих, предположили, что существуют четыре частично перекрывающихся этапа деления пероксисом, а именно: (а) включение Pex11B в мембрану; (б) элонгация пероксисом; (в) сегрегация Pex11B и образование обогащенных Pex11B участков; и наконец (г) деление пероксисом [139, 140]. Дрожжевым гомологом Pex11B млекопитающих является белок Pex11p. При сверхэкспрессии *PEX11* *S. cerevisiae* в клетках образуются удлиненные кластеры пероксисом, и их количество увеличивается [59, 78]. Наоборот, делеция гена *PEX11* ведет к сильному уменьшению числа пероксисом в клетке и одновременно к значительному увеличению их размеров. Подобная картина наблюдается и у других организмов (мицелиальные грибы, трипаносомы), что свидетельствует о высококонсервативной функции Pex11p в элонгации пероксисом у всех эукариот [78]. Экспрессия именно гена *PEX11* более значительно усиливается после индукции пролиферации пероксисом, например, после переноса клеток *S. cerevisiae* со среды с глюкозой на олеат [12, 141], а клеток *H. polymorpha* — со среды с глюкозой в среду с метанолом [142]. Таким образом, модуляция уровня Pex11p является важным способом регуляции количества пероксисом в клетке. У *S. cerevisiae* мембранный белок пероксисом Pex11p представлен двумя формами: фосфорилированной и дефосфорилированной, причем в клетках с активно делящимися пероксисомами Pex11p фосфорилирован и локализуется преимущественно в пероксисомах, и наоборот. В клетках без активно пролиферирующих пероксисом Pex11p представлен в основном нефосфорилированной формой и выявляется во фракции эндоплазматического ретикулума [143]. Штаммы с

конститутивно дефосфорилированным Pex11p имеют такой же фенотип, как и мутанты *Δpex11*. Клетки этих штаммов содержат небольшое количество пероксисом, тогда как в штаммах с конститутивно фосфорилированным Pex11p пероксисом много и в них находится этот белок. Сверхэкспрессия циклин-зависимой протеинкиназы Pho85p приводит к фосфорилированию Pex11p и пролиферации пероксисом.

Изучение 249 мутантов *S. cerevisiae* с делециями генов киназ и фосфатаз показало, что фосфорилирование белков играет важную роль в регуляции пролиферации пероксисом. В частности, делеция гена *PHO85*, кодирующего циклин-зависимую киназу, вызывает значительное уменьшение количества пероксисом в клетке [144].

Второй класс белков, необходимых для деления пероксисом, — семейство так называемых динамин-подобных белков, больших GTPаз, принимающих участие в делении и слиянии мембран. У *S. cerevisiae* два динамин-подобных белка, Vps1p и Dnm1p, вовлечены в деление пероксисом. Dnm1p участвует в делении митохондрий, он необходим также для деления пероксисом в условиях индукции олеатом, тогда как Vps1p необходим для деления пероксисом в условиях репрессии их биогенеза (например, в среде с глюкозой) [145]. Dnm1p переносится в пероксисому при помощи двух гомологичных белков — Mdv1p и Caf4p, ассоциированных с мембраной через белок Fis1, содержащий последовательность типа хвост-якорь [146]. Mdv1p принадлежит к семейству белков с повторами из остатков триптофана и аспартата (так называемые WD repeat proteins), которых нет у высших эукариот. Caf4 является паралогом Mdv1p. Показано, что у *H. polymorpha*, в отличие от *S. cerevisiae*, белок Vps1p не участвует в делении пероксисом [31]. В этом отношении *H. polymorpha* ближе к клеткам растений и животных, у которых в делении пероксисом участвует лишь белок Dpl1p.

Как сказано выше, в ходе клеточного цикла белок Dnm1p участвует в регуляции деления как пероксисом, так и митохондрий. Методом флуоресцентной микроскопии показано, что в клетках *H. polymorpha* Dnm1p, конъюгированный с зеленым флуоресцентным белком (GFP), неравномерно распределен в цитозоле и образует большое число пятен, каждое из которых содержит множество молекул GFP-Dnm1p. Интересно, что Mdv1p локализуется вместе с пятнами Dnm1p. Такие пятна динамически ассоциируют и диссоциируют с митохондриями и пероксисомами, подчеркивая, что белок Dnm1p участвует в делении обеих органелл [147]. У *H. polymorpha* деление пероксисом полностью блокируется при делеции *DNMI* [31]. Мутантные клетки содержат одну большую пероксисому, конец которой вытягивается с образованием удлинения, проникающего в

развивающуюся почку. Подобных удлинений нет у пероксисом в клетках мутантов *dnm1 pex11*, что согласуется с представлениями о важной роли Pex11p в элонгации пероксисом.

Кроме динамин-подобных белков Pex3p, Pex11p и Fis1p идентифицированы и другие белки, также участвующие в регуляции деления пероксисом, в том числе белки, первоначально идентифицированные как компоненты секреторного пути, а также новые, недавно открытые пероксинины. Белки секреторного пути оказались необходимыми для образования пероксисом *de novo* либо для доставки липидов, происходящих из эндоплазматического ретикула, в мембрану пероксисом. Постулирована возможная роль генов *SEC39*, *SEC21* и *DSL* *S. cerevisiae* в переносе мембранных белков пероксисом из эндоплазматического ретикула в пероксисому [148]. Белки *ARF1* и *ARF3* *S. cerevisiae* играют, по-видимому, противоположные роли в пролиферации пероксисом [149]. Emp24 входит в семейство белков p24 и локализуется в комплексе Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме и везикулах COP-I и COP-II (coat protein complex) [150]. Позже, однако, появились данные в пользу пероксисомной локализации Emp24p у *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* [151, 152]. Интересно, что делеция гена *EMP24* у *H. polymorpha* приводила к сильному уменьшению числа пероксисом в клетках, вызванному, вероятно, дефектом в делении пероксисом. Не исключено, что белки p24 необходимы для доставки различных компонентов, участвующих в делении пероксисом и их элонгации на начальных этапах деления.

Помимо самого Pex11p, два других белка, входящих в это семейство у *S. cerevisiae* (Pex25p и Pex27p), участвуют в пролиферации пероксисом, особенно в условиях репрессии их пролиферации [78]. Число пероксисом регулируется белками семейства Pex24p (Pex24p, Pex28p и Pex29p). Все три белка входят в состав мембраны пероксисом, и среди них Pex24p, но не Pex28p или Pex29p, индуцируются в условиях, активирующих пролиферацию пероксисом (например, на среде с олеатом). Делеция *PEX28* и *PEX29* у *S. cerevisiae* сопровождается увеличением числа пероксисом уменьшенного размера [81]. Три других индуцируемых олеатом белка *S. cerevisiae* (Pex30p, Pex31p, Pex32p), обладающие гомологией с Pex23p *Y. lipolytica*, также участвуют в регуляции количества пероксисом в клетке [82].

НАСЛЕДОВАНИЕ ПЕРОКСИСОМ

У *H. polymorpha* и *S. cerevisiae* наследование свойств дочерними пероксисомами зависит от белков Inp1p и Inp2p, белков класса V миозинового мотора (Myo2) и актина [153, 154]. Среди этих белков Inp1p представляет собой специфичный

фактор удержания пероксисом, соединяющий пероксисомы материнской клетки с пока не идентифицированной якорной структурой [155]. Оказалось, что в отсутствие Pex11p в клетках *H. polymorpha* нарушается удерживание пероксисом, несмотря на правильную локализацию Inp1p в пероксисоме [155]. Таким образом Pex11p участвует не только в делении пероксисом, в его функции может входить и ее удерживание. Определенную роль в наследовании пероксисом играет Pex3p [156]. Этот, по-видимому, многофункциональный белок взаимодействует с Inp1p на пероксисомной мембране. Он участвует в образовании мембраны пероксисом и наследовании органеллы. Inp2p является мембранным пероксином, который действует как рецептор Myo2p и обеспечивает таким образом транспорт органеллы в почку [153].

Недавно показали, что Inp2p — это уникальный для *S. cerevisiae* и близкородственных видов белок. У таксономически удаленного вида *Y. lipolytica* специфическими пероксисомными рецепторами Myo2p служат Pex3p и его паралог Pex3Bp [157]. В дальнейшем показали, что Inp2p, хотя и проявляет низкую гомологию, но все же присутствует в клетках других видов, включая *H. polymorpha* [132]. Данные о взаимодействии Inp2p *H. polymorpha* с Myo2p свидетельствуют о консервативности такой функции у аскомицетов. Интересно, что у *H. polymorpha* образование комплекса Myo2–Inp2 зависит от Pex19p. По-видимому, Pex19p стабилизирует взаимодействие между Inp2p и Myo2p [158]. Модель биогенеза пероксисом представлена на рис. 2.

Неизученным остается вопрос о том, как регулируется размер пероксисом и как клетка определяет момент начала деления пероксисомы. Такая модель предложена пока лишь для *Y. lipolytica* [159]. В этой модели связывание Pex16p с ацил-КоА-синтетазой индуцирует изменения мембран, благоприятствующие правильному функционированию комплекса белков, участвующих в делении. Для индукции биогенеза пероксисом необходимы факторы транскрипции Pip2p, Oaf1p и Adg1p, причем последний фактор участвует в индукции первого фермента пути β -окисления жирных кислот, ацил-КоА-оксидазы.

Делеции структурных генов алкогольоксидазы, дигидроксиацетонсинтазы и каталазы, основных компонентов матрикса пероксисом у метилотрофно растущих клеток *H. polymorpha*, ведут к суперпролиферации пероксисом [23]. Причины обнаруженного явления пока непонятны. Невыясненными остаются также и другие стороны регуляции биогенеза и деления пероксисом. В частности, идентифицированы гены *DNM1* и *MDV1*, участвующие в регуляции деления как пероксисом, так и митохондрий. Однако неясно, каким

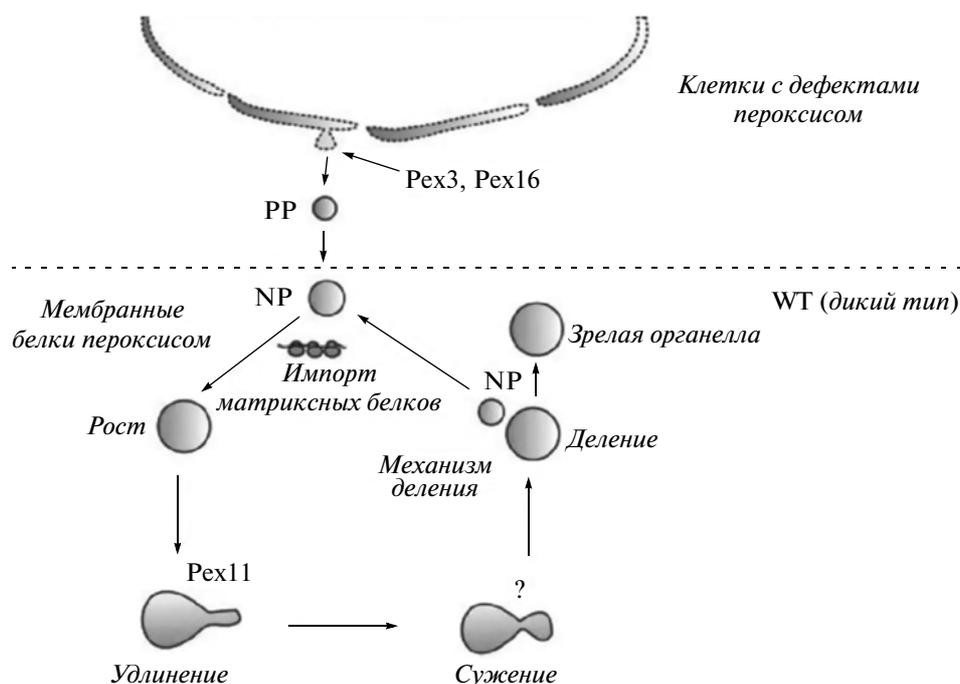


Рис. 2. Гипотетическая модель пролиферации пероксисом (согласно [20] с модификациями). У клеток штамма дикого типа (WT) мембранные пероксисомные белки (Peroxisomal Membrane Proteins, PMPs) доставляются к импорт-компетентной зарождающейся пероксисоме (NP). Эта пероксисома растет за счет импорта новосинтезируемых пероксисомных мембранных белков (PMPs) и белков матрикса пероксисом. Мембранный пероксин Pex11p необходим для элонгации мембран перед их делением. Конечный этап разделения пероксисом зависит от специального комплекса, состоящего из гомологов динамин-подобных белков, белков типа хвост-якорь Fis1p и Mff1p (высшие эукариоты), белка с повторяющимися остатками триптофана и аспартата (WD) Mdv1p (грибы) и Caf4p (*Saccharomyces* sp.). Деление ведет к появлению новых импорт-компетентных зарождающихся пероксисом (NP), которые постепенно превращаются в зрелые пероксисомы. Белки Pex3p/Pex16p — мембранные пероксины (PMPs), абсолютно необходимые для образования пероксисом. В клетках, лишенных этих белков, пероксисомы обнаружить не удастся. После комплементации соответствующими генами белки Pex3p и Pex16p появляются в эндоплазматическом ретикулуме, где формируют препероксисому (PP).

образом определяется правильная локализация белковых продуктов в клетке, с какими компонентами органелл эти белки взаимодействуют, и существует ли обмен белками и липидами между двумя органеллами. Если такой обмен существует, то при помощи какого механизма транспорта он осуществляется (везикулярного или невезикулярного).

ПЕКСОФАГИЯ

Количество пероксисом в клетке строго контролируется не только посредством регуляции их роста и деления, но также в результате специфической автофагической деградации пероксисом, известной как пексофагия [22]. В результате координации процессов роста и деления пероксисом, с одной стороны, и пексофагии, с другой, обеспечивается гомеостаз количества и ферментативного содержания этих органелл. Рассмотрение механизмов автофагии и пексофагии выхо-

дит за рамки этого обзора. Укажем лишь на существование пероксинов, участвующих не только в регуляции биогенеза пероксисом, но и в пексофагии. Установлено, что у *P. pastoris* пероксины Pex3p (участвует в биогенезе пероксисом) и Pex14p (необходим для импорта белков матрикса) вовлечены в регуляцию пексофагии [160]. Pex14p участвует в пексофагии у *H. polymorpha* [161, 162]. Показано, что при макропексофагии у *H. polymorpha* Pex3 удаляется из пероксисом и не подвергается деградации [163]. У *P. pastoris* идентифицирован ген, условно обозначенный *PDG1*, мутации в котором нарушают деградацию пероксисом [22, О.В. Стасык, А.А. Сибирный, неопубликованные данные]. Подобные мутации нарушают локализацию пероксисомных белков, которые оказывались не только в пероксисомах, но и в цитозоле, что указывает на повреждение биогенеза пероксисом у мутантов *pdg1*. Соответствующий белок Pdg1 относится к мембранным пероксином, что подтверждает его участие в биогенезе пероксисом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пероксисомы не перестают удивлять своей способностью выполнять разнообразные метаболические функции, своими не до конца понятными механизмами роста и деления, импорта матриксных и мембранных белков. Какова природа сигнала, инициирующего рост и деление пероксисом? Как определяется размер пероксисом и их количество в клетке? На эти и другие вопросы можно ожидать ответа в ближайшем будущем. Совершенно недостаточно изучена регуляция гомеостаза пероксисом, заключающаяся в координации процессов роста и деления этих органелл и пексофагии.

Можно ожидать дополнительных сюрпризов в области изучения факторов биогенеза, общих у пероксисом, митохондрий и эндоплазматического ретикула. Одну из наиболее “горячих” точек в изучении биогенеза пероксисом представляют механизмы индукции биогенеза этих органелл в среде с так называемыми пролифераторами пероксисом – жирными кислотами у дрожжей, а также метиловым спиртом – у метилотрофных дрожжей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michels P.A., Moyersoen J., Krazy H., Galland N., Herman M., Hannaert V. 2005. Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review). *Mol. Membr. Biol.* **22**, 133–145.
2. Schrader M., Fahimi H.D. 2008. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 421–440.
3. Aksam E.B., de Vries B., van der Klei I.J., Kiel J.A. 2009. Preserving organelle vitality: peroxisomal quality control mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **9**, 808–820.
4. Mast F.D., Fagarasanu A., Knoblauch B., Rachubinski R.A. 2010. Peroxisome biogenesis: something old, something new, something borrowed. *Physiology (Bethesda)*. **25**, 347–356.
5. Subramani S. 1997. *PEX* genes on the rise. *Nat. Genet.* **15**, 331–333.
6. Lanyon-Hogg T., Warriner S.L., Baker A. 2010. Getting a camel through the eye of a needle: the import of folded proteins by peroxisomes. *Biol. Cell.* **102**, 245–263.
7. Santos M.J., Imanaka T., Shio H., Small G.M., Lazarow P.B. 1988. Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome – aberrant organelle assembly. *Science*. **239**, 1536–1538.
8. Steinberg S.J., Dodt G., Raymond G.V., Braverman N.E., Moser A.B., Moser H.W. 2006. Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 1733–1748.
9. Subramani S. 1998. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.* **78**, 171–188.
10. Saleem R.A., Knoblauch B., Mast F.D., Smith J.J., Boyle J., Dobson C.M., Long-O'Donnell R., Rachubinski R.A., Aitchison J.D. 2008. Genome-wide analysis of signaling networks regulating fatty acid-induced gene expression and organelle biogenesis. *J. Cell Biol.* **181**, 281–292.
11. Wan Y., Saleem R.A., Ratushny A.V., Roda O., Smith J.J., Lin C.H., Chiang J.H., Aitchison J.D. 2009. Role of the histone variant H2A.Z/Htz1p in TBP recruitment, chromatin dynamics, and regulated expression of oleate-responsive genes. *Mol. Cell Biol.* **29**, 2346–2358.
12. Smith J.J., Marelli M., Christmas R.H., Vizeacoumar F.J., Dilworth D.J., Ideker T., Galitski T., Dimitrov K., Rachubinski R.A., Aitchison J.D. 2002. Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *J. Cell Biol.* **158**, 259–271.
13. Smith J.J., Ramsey S.A., Marelli M., Marzolf B., Hwang D., Saleem R.A., Rachubinski R.A., Aitchison J.D. 2007. Transcriptional responses to fatty acid are coordinated by combinatorial control. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 115.
14. Marelli M., Smith J.J., Jung S., Yi E., Nesvizhskii A.I., Christmas R.H., Saleem R.A., Tam Y.Y., Fagarasanu A., Goodlett D.R., Aebersold R., Rachubinski R.A., Aitchison J.D. 2004. Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *J. Cell Biol.* **167**, 1099–1112.
15. Saleem R.A., Smith J.J., Aitchison J.D. 2006. Proteomics of the peroxisome. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 1541–1551.
16. Курбатова Е.М., Дутова Т.А., Троценко Ю.А. 2005. Структурные, функциональные и генетические аспекты биогенеза пероксисом. *Генетика*. **41**, 149–165.
17. Brown L.A., Baker A. 2008. Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 363–375.
18. Ma C., Subramani S. 2009. Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *IUBMB Life*. **61**, 713–722.
19. Girzalsky W., Saffian D., Erdmann R. 2010. Peroxisomal protein translocation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1803**, 724–731.
20. Nagotu S., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2010. Divide et impera: the dictum of peroxisomes. *Traffic*. **11**, 175–184.
21. Veenhuis M., van Dijken J.P., Harder W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **24**, 1–82.
22. Dunn W.A. Jr., Cregg J.M., Kiel J.A., van der Klei I.J., Oku M., Sakai Y., Sibirny A.A., Stasyk O.V., Veenhuis M. 2005. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy*. **1**, 75–83.
23. Heiland I., Erdmann R. 2005. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* **272**, 2362–2372.
24. Kiel J.A., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2006. *PEX* genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic*. **7**, 1291–1303.
25. Tam Y.Y., Fagarasanu A., Fagarasanu M., Rachubinski R.A. 2005. Pex3p initiates the formation of a

- preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 34933–34939.
26. Haan G.J., Baerends R.J., Krikken A.M., Otzen M., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2006. Reassembly of peroxisomes in *Hansenula polymorpha pex3* cells on re-introduction of Pex3p involves the nuclear envelope. *FEMS Yeast Res.* **6**, 186–194.
 27. Mullen R.T., Trelease R.N. 2006. The ER-peroxisome connection in plants: development of the “ER semiautonomous peroxisome maturation and replication” model for plant peroxisome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 1655–1668.
 28. Kim P.K., Mullen R.T., Schumann U., Lippincott-Schwartz J. 2006. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo *PEX16*-dependent pathway from the ER. *J. Cell Biol.* **173**, 521–532.
 29. Titorenko V.I., Smith J.J., Szilard R.K., Rachubinski R.A. 2000. Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell Biochem. Biophys.* **32**, 21–26.
 30. Motley A.M., Hetteema E.H. 2007. Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J. Cell Biol.* **178**, 399–410.
 31. Nagotu S., Saraya R., Otzen M., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2008. Peroxisome proliferation in *Hansenula polymorpha* requires Dnm1p which mediates division but not de novo formation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 760–769.
 32. Erdmann R., Veenhuis M., Mertens D., Kunau W.H. 1989. Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **86**, 5419–5423.
 33. van der Klei I.J., Harder W., Veenhuis M. 1991. Selective inactivation of alcohol oxidase in two peroxisome-deficient mutants of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast.* **7**, 813–821.
 34. Liu H., Tan X., Veenhuis M., McCollum D., Cregg J.M. 1992. An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*. *J. Bacteriol.* **174**, 4943–4951.
 35. van der Leij I., van den Berg M., Boot R., Franse M., Distel B., Tabak H.F. 1992. Isolation of peroxisome assembly mutants from *Saccharomyces cerevisiae* with different morphologies using a novel positive selection procedure. *J. Cell Biol.* **119**, 153–162.
 36. Zhang J.W., Han Y., Lazarow P.B. 1993. Novel peroxisome clustering mutants and peroxisome biogenesis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **123**, 1133–1147.
 37. Elgersma Y., van den Berg M., Tabak H.F., Distel B. 1993. An efficient positive selection procedure for the isolation of peroxisomal import and peroxisome assembly mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **135**, 731–740.
 38. Johnson M.A., Waterham H.R., Ksheminska G.P., Fayura L.R., Cereghino J.L., Stasyk O.V., Veenhuis M., Kulachkovsky A.R., Sibirny A.A., Cregg J.M. 1999. Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics.* **151**, 1379–1391.
 39. McCollum D., Monosov 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.
 40. Terlecky S.R., Nuttley W.M., McCollum D., Sock 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.
 41. van der Klei I.J., Hilbrands R.E., Swaving G.J., Waterham H.R., Vrieling E.G., Titorenko V.I., Cregg J.M., Harder W., Veenhuis M. 1995. The *Hansenula polymorpha PER3* gene is essential for the import of PTS1 proteins into the peroxisomal matrix. *J. Biol. Chem.* **270**, 17229–17236.
 42. Marzioch M., Erdmann R., Veenhuis M., Kunau W.H. 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.
 43. Purdue P.E., Zhang J.W., Skoneczny M., Lazarow P.B. 1997. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human *PEX7*, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat. Genet.* **15**, 381–384.
 44. Zhang J.W., Cai X., Lazarow P.B. 1996. Pex1p (Pas7p) is an intra-peroxisomal receptor for the N-terminal, type 2, peroxisomal targeting signal of thiolase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **804**, 654–655.
 45. Erdmann R., Blobel G. 1996. Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J. Cell Biol.* **135**, 111–121.
 46. Gould S.J., Kalish J.E., Morrell J.C., Bjorkman J., Urquhart A.J., Crane D.I. 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.
 47. Albertini M., Rehling P., Erdmann R., Girzalsky W., Kiel J.A., Veenhuis M., Kunau W.H. 1997. Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell.* **89**, 83–92.
 48. Kalish J.E., Theda C., Morrell J.C., Berg J.M., Gould S.J. 1995. Formation of the peroxisome lumen is abolished by loss of *Pichia pastoris* Pas7p, a zinc-binding integral membrane protein of the peroxisome. *Mol. Cell Biol.* **15**, 6406–6419.
 49. Kalish J.E., Keller G.A., Morrell J.C., Mihalik S.J., Smith B., Cregg J.M., Gould S.J. 1996. Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins. *EMBO J.* **15**, 3275–3285.
 50. Tan X., Waterham H.R., Veenhuis M., Cregg J.M. The *Hansenula polymorpha PER8* gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation. *J. Cell Biol.* **128**, 307–319.
 51. Heyman J.A., Monosov E., Subramani S. 1994. Role of the *PAS1* gene of *Pichia pastoris* in peroxisome biogenesis. *J. Cell Biol.* **127**, 1259–1273.
 52. Spong A.P., Subramani S. 1993. Cloning and characterization of *PAS5*: a gene required for peroxisome bio-

- genesis in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Biol.* **123**, 535–548.
53. Waterham H.R., de Vries Y., Russel K.A., Xie W, Veenhuis M., Cregg J.M. 1996. The *Pichia pastoris* *PER6* gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2527–2536.
 54. Crane D.I., Kalish J.E., Gould S.J. 1994. The *Pichia pastoris* *PAS4* gene encodes a ubiquitin-conjugating enzyme required for peroxisome assembly. *J. Biol. Chem.* **269**, 21835–21844.
 55. Wiebel F.F., Kunau W.H. 1992. The Pas2 protein essential peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Nature.* **359**, 73–76.
 56. James G.L., Goldstein J.L., Pathak R.K., Anderson R.G., Brown M.S. PxF, a prenylated protein of peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 14182–14190.
 57. Kunau W.H., Beyer A., Franken T., Gotte K., Marzioch M., Saidowsky J., Skalets-Rorowski A., Wiebel F.F. 1993. Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie.* **75**, 209–224.
 58. Erdmann R., Blobel G. 1995. Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J. Cell Biol.* **128**, 509–523.
 59. Marshall P.A., Krimkevich Y.I., Lark R.H., Dyer J.M., Veenhuis M., Goodman J.M. 1995. Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J. Cell Biol.* **129**, 345–355.
 60. Marshall P.A., Dyer J.M., Quick M.E., Goodman J.M. 1996. Redox-sensitive homodimerization of Pex11p: a proposed mechanism to regulate peroxisomal division. *J. Cell Biol.* **135**, 123–137.
 61. Waterham H.R., Titorenko V.I., Haima P., Cregg J.M., Harder W., Veenhuis M. 1994. The *Hansenula polymorpha* *PER1* gene is essential for peroxisome biogenesis and encodes a peroxisomal matrix protein with both carboxy- and amino-terminal targeting signals. *J. Cell Biol.* **127**, 737–749.
 62. Eitzen G.A., Szilard R., Rachubinski R.A. 1997. Enlarged peroxisomes are present in oleic acid-grown *Yarrowia lipolytica* overexpressing the *PEX16* gene encoding an intraperoxisomal peripheral membrane protein. *J. Cell Biol.* **137**, 1265–1278.
 63. Smith J.J., Szilard R.K., Marelli M., Rachubinski R.A. 1997. The peroxin Pex17p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is associated peripherally with the peroxisomal membrane and is required for the import of a subset of matrix proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2511–2520.
 64. Liu H., Tan X., Russel K.A., Veenhuis M., Cregg J.M. 1995. *PER3*, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J. Biol. Chem.* **270**, 10940–10951.
 65. Distel B., Erdmann R., Gould S.J., Blobel G., Crane D.I., Cregg J.M., Dodt G., Fujiki Y., Goodman J.M., Just W.W., Kiel J.A., Kunau W.H., Lazarow P.B., Mannaerts G.P., Moser H.W., Osumi T., Rachubinski R.A., Roscher A., Subramani S., Tabak H.F., Tsukamoto T., Valle D., van der Klei I., van Veldhoven P.P., Veenhuis M. 1996. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J. Cell Biol.* **135**, 1–3.
 66. Elgersma Y., Kwast L., van den Berg M., Snyder W.B., Distel B., Subramani S., Tabak H.F. 1997. Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S. cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* **16**, 7326–7341.
 67. Kunau W.H., Erdmann R. 1998. Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr. Biol.* **8**, R299–R302.
 68. Purdue P.E., Yang X., Lazarow P.B. 1998. Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J. Cell Biol.* **143**, 1859–1869.
 69. Stein K., Schell-Steven A., Erdmann R., 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.
 70. Hetteema E.H., Girzalsky W., van den Berg M., Erdmann R., Distel B. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J.* **19**, 223–233.
 71. Fang Y., Morrell J.C., Jones J.M., Gould S.J. 2004. *PEX3* functions as a *PEX19* docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **164**, 863–875.
 72. Smith J.J., Rachubinski R.A. 2001. A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **276**, 1618–1625.
 73. Leon S., Zhang L., McDonald W.H., Yates J., 3rd, Cregg J.M., Subramani S. 2006. Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *J. Cell Biol.* **172**, 67–78.
 74. Zhang L., Leon S., Subramani S. 2006. Two independent pathways traffic the intraperoxisomal peroxin PpPex8p into peroxisomes: mechanism and evolutionary implications. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 690–699.
 75. Koller A., Snyder W.B., Faber K.N., Wenzel T.J., Rangell L., Keller G.A., Subramani S. 1999. Pex22p of *Pichia pastoris*, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane. *J. Cell Biol.* **146**, 99–112.
 76. Brown T.W., Titorenko V.I., Rachubinski R.A. 2000. Mutants of the *Yarrowia lipolytica* *PEX23* gene encoding an integral peroxisomal membrane peroxin mislocalize matrix proteins and accumulate vesicles containing peroxisomal matrix and membrane proteins. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 141–152.
 77. Tam Y.Y., Rachubinski R.A. 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.
 78. Rottensteiner H., Stein K., Sonnenhol E., Erdmann R. 2003. Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 4316–4328.

79. Matsumoto N., Tamura S., Furuki S., Miyata N., Moser A., Shimozawa N., Moser H.W., Suzuki Y., Kondo N., Fujiki Y. 2003. Mutations in novel peroxin gene *PEX26* that cause peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 233–246.
80. Tam Y.Y.C., Torres-Guzman J.C., Vizeacoumar F.J., Smith J.J., Marelli M., Aitchison J.D., Rachubinski R.A. 2003. Pex11-related proteins in peroxisome dynamics: a role for the novel peroxin Pex27p in controlling peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 4089–4102.
81. Vizeacoumar F.J., Torres-Guzman J.C., Tam Y.Y., Aitchison J.D., Rachubinski R.A. 2003. YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **161**, 321–332.
82. Vizeacoumar F.J., Torres-Guzman J.C., Bouard D., Aitchison J.D., Rachubinski R.A. 2004. Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal integral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 665–677.
83. Yan M., Rachubinski R.A., Joshi S., Rachubinski R.A., Subramani S. 2008. Dysferlin domain-containing proteins, Pex30p and Pex31p, localized to two compartments, control the number and size of oleate-induced peroxisomes in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 885–898.
84. Managadze D., Wurtz C., Wiese S., Schneider M., Girzalsky W., Meyer H.E., Erdmann R., Warscheid B., Rottensteiner H. 2010. Identification of *PEX33*, a novel component of the peroxisomal docking complex in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 955–964.
85. Tower R.J., Fagarasanu A., Aitchison J.D., Rachubinski R.A. 2011. The peroxin Pex34p functions with the Pex11 family of peroxisomal divisional proteins to regulate the peroxisome population in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 1727–1738.
86. Jones J.M., Morrell J.C., Gould S.J. 2004. *PEX19* is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **164**, 57–67.
87. Nair D.M., Purdue P.E., Lazarow P.B. 2004. Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **167**, 599–604.
88. Salomons F.A., Kiel J., Faber K.N., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2000. Overproduction of Pex5p stimulates import of alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase in a *Hansenula polymorpha* pex14 null mutant. *J. Biol. Chem.* **275**, 12603–12611.
89. Miyata N., Fujiki Y. 2005. Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol. Cell Biol.* **25**, 10822–10832.
90. Platta H.W., Grunau S., Rosenkranz K., Girzalsky W., Erdmann R. 2005. Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat. Cell Biol.* **7**, 817–822.
91. Grou C.P., Carvalho A.F., Pinto M.P., Wiese S., Piechura H., Meyer H.E., Warscheid B., Sa-Miranda C., Azevedo J.E. 2008. Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 14190–14197.
92. Leon S., Subramani S. 2007. A conserved cysteine residue of *Pichia pastoris* Pex20p is essential for its recycling from the peroxisome to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **282**, 7424–7430.
93. Platta H.W., El Magraoui F., Schlee D., Grunau S., Girzalsky W., Erdmann R. 2007. Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J. Cell Biol.* **177**, 197–204.
94. Williams C., van den Berg M., Sprenger R.R., Distel B. 2007. A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *J. Biol. Chem.* **282**, 22534–22543.
95. Gould S.J., Keller G.A., Subramani S. 1987. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of reye luciferase. *J. Cell Biol.* **105**, 2923–2931.
96. Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G.E., Rasche N., Luder F., Weckworth W., Jahn O. 2007. Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell.* **19**, 3170–3193.
97. Brocard C., Kragler F., Simon M.M., Schuster T., 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.
98. Gatto G.J., Geisbrecht B.V., Gould S.J., Berg J.M. 2000. Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1091–1095.
99. Rehling P., Marzioch M., Niesen F., Wittke E., Veenhuis M., Kunau W.H. 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.
100. Elgersma Y., Tabak H.F. 1996. Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**, 269–283.
101. Mukai S., Ghaedi K., Fujiki Y. 2002. Intracellular localization, function, and dysfunction of the peroxisome-targeting signal type 2 receptor, Pex7p, in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 9548–9561.
102. Grunau S., Schliebs W., Linnepe R., Neufeld C., Cizmowski C., Reinartz B., Meyer H.E., Warscheid B., Girzalsky W., Erdmann R. 2009. Peroxisomal targeting of PTS2 pre-import complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Trafc.* **10**, 451–460.
103. Purdue P.E., Yang X.D., Lazarow P.B. 1998. Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J. Cell Biol.* **143**, 1859–1869.
104. Otzen M., Wang D.Y., Lunenborg M.G.J., van der Klei I.J. 2005. *Hansenula polymorpha* Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *J. Cell Sci.* **118**, 3409–3418.
105. Einwachter H., Sowinski S., Kunau W.H., Schliebs W. 2001. *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL full a

- common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO Rep.* **2**, 1035–1039.
106. Motley A.M., Hettema E.H., Hogenhout E.M., Brites P., ten Asbroek A., Wijburg F.A., Baas F., Heijmans H.S., Tabak H.F., Wanders R.J.A., Distel B. 1997. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nat. Genet.* **15**, 377–380.
 107. Ozimek P., van Dijk R., Latchev K., Gancedo C., Wang D.Y., van der Klei I.J., Veenhuis M. 2003. Pyruvate carboxylase is an essential protein in the assembly of yeast peroxisomal oligomeric alcohol oxidase. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 786–797.
 108. Stewart M.Q., Esposito R.D., Gowani J., Goodman J.M. 2001. Alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase, the abundant peroxisomal proteins of methylotrophic yeasts, assemble in different cellular compartments. *J. Cell Sci.* **114**, 2863–2868.
 109. Gunkel K., van Dijk R., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2004. Routing of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1347–1355.
 110. Faber K.N., van Dijk R., Keizer-Gunnink I., Koek A., van der Klei I.J., Veenhuis M. 2002. Import of assembled PTS1 proteins into peroxisomes of the yeast *Hansenula polymorpha*: yes and no! *Biochim. Biophys. Acta.* **1591**, 157–162.
 111. Ozimek P.Z., Klompmaker S.H., Visser N., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2007. The transcarboxylase domain of pyruvate carboxylase is essential for assembly of the peroxisomal flavoenzyme alcohol oxidase. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1082–1092.
 112. Agne B., Meindl N.M., Niederhoff K., Einwachter H., Rehling P., Sickmann A., Meyer H.E., Girzalsky W., Kunau W.H. 2003. Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol. Cell.* **11**, 635–646.
 113. Rayapuram N., Subramani S. 2006. The importomer – a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 1613–1619.
 114. Kerksen D., Hambruch E., Klaas W., Platta H.W., de Kruijff B., Erdmann R., Kunau W.H., Schliebs W. 2006. Membrane association of the cycling peroxisome import receptor Pex5p. *J. Biol. Chem.* **281**, 27003–27015.
 115. Wang D.Y., Visser N.V., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2003. Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor Pex5p, studied by uorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **278**, 43340–43345.
 116. Oliveira M.E., Gouveia A.M., Pinto R.A., Samiranda C., Azevedo J.E. 2003. The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* **278**, 39483–39488.
 117. Erdmann R., Schliebs W. 2005. Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 738–742.
 118. Hettema E.H., Ruigrok C.C., Koerkamp M.G., van den Berg M., Tabak H.F., Distel B., Braakman I. 1998. The cytosolic DnaJ-like protein djp1p is involved specifically in peroxisomal protein import. *J. Cell Biol.* **142**, 421–434.
 119. Ciechanover A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 79–87.
 120. Nakatsukasa K., Brodsky J.L. 2008. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Trafc.* **9**, 861–870.
 121. Neutzner A., Youle R.J., Karbowski M. 2007. Outer mitochondrial membrane protein degradation by the proteasome. *Novart. Fdn. Symp.* **287**, 4–14.
 122. Stewart M.Q., van Dijk R., Veenhuis M., Goodman J.M. 2002. Monomeric alcohol oxidase is preferentially digested by a novel protease from *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1542**, 160–172.
 123. Kikuchi M., Hatano N., Yokota S., Shimozawa N., Imanaka T., Taniguchi H. 2004. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J. Biol. Chem.* **279**, 421–428.
 124. Aksam E.B., Koek A., Kiel J.A.K.W., Jourdan S., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2007. A peroxisomal Lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy.* **3**, 96–105.
 125. Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A. 1981. ATP hydrolysis-dependent protease activity of the lon (capR) protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **78**, 4728–4732.
 126. Erdmann R., Blobel G. 1996. Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J. Cell. Biol.* **135**, 111–121.
 127. Lazarow P.B., Fujiki Y. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 489–530.
 128. Purdue P.E., Lazarow P.B. 2001. Pex18p is constitutively degraded during peroxisome biogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 47684–47689.
 129. Hoepfner D., Schildknecht D., Braakman I., Philippsen P., Tabak H.F. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell.* **122**, 85–95.
 130. Kragt A., Brouwer T.V., van den Berg M., Distel B. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 7867–7874.
 131. Tabak H.F., van der Zand A., Braakman I. 2008. Peroxisomes: minted by the ER. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 393–400.
 132. Saraya R., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2010. Peroxisomes as dynamic organelles: peroxisome abundance in yeast. *FEBS J.* **277**, 3279–3288.
 133. Sacksteder K.A., Jones J.M., South S.T., Li X., Liu Y., Gould S.J. 2000. PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J. Cell Biol.* **148**, 931–944.
 134. South S.T., Gould S.J. 1999. Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J. Cell Biol.* **144**, 255–266.
 135. Titorenko V.I., Rachubinski R.A. 1998. Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2789–2803.
 136. Platta H.W., Erdmann R. 2007. Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol.* **17**, 474–484.
 137. Yan M., Rachubinski D.A., Joshi S., Rachubinski R.A., Subramani S. 2008. Dysferlin domain-containing pro-

- teins, Pex30p and Pex31p, localized to two compartments, control the number and size of oleate-induced peroxisomes in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 885–898.
138. Raychaudhuri S., Prinz W.A. 2008. Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **105**, 15785–15790.
139. Schrader M., Reuber B.E., Morrell J.C., Jimenez-Sanchez G., Obie C., Stroh T.A., Valle D., Schroer T.A., Gould S.J. 1998. Expression of *PEX11 beta* mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J. Biol. Chem.* **273**, 29607–29614.
140. Thoms S., Erdmann R. 2005. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J.* **272**, 5169–5181.
141. Koerkamp M.G., Rep M., Bussemaker H.J., Hardy G.P., Mul A., Piekarska K., Szigyarto C.A., De Mattos J.M., Tabak H.F. 2002. Dissection of transient oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 2783–2794.
142. van Zutphen T., Baerends R.J., Susanna K.A., de Jong A., Kuipers O.P., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics.* **11**, 1.
143. Knoblauch B., Rachubinski R.A. 2010. Phosphorylation-dependent activation of peroxisome proliferator protein PEX11 controls peroxisome abundance. *J. Biol. Chem.* **285**, 6670–6680.
144. Saleem R.A., Long-O'Donnell R., Dilworth D.J., Armstrong A.M., Jamakhandi A.P., Wan Y., Knijnenburg T.A., Niemistö A., Boyle J., Rachubinski R.A., Shmulevich I., Aitchison J.D. 2010. Genome-wide analysis of effectors of peroxisome biogenesis. *PLoS One.* **5**(8), e11953.
145. Kuravi K., Nagotu S., Krikken A.M., Sjollem K., Deckers M., Erdmann R., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2006. Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **119**, 3994–4001.
146. Mozdy A.D., McCaffery J.M., Shaw J.M. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* **151**, 367–380.
147. Nagotu S., Krikken A.M., Otzen M., Kiel J.A.K.W., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2008. Peroxisome division in *Hansenula polymorpha* requires Mdv1 and Fis1, two proteins also involved in mitochondrial fission. *Traf.* **9**, 1471–1484.
148. Perry R.J., Mast F.D., Rachubinski R.A. 2009. Endoplasmic reticulum-associated secretory proteins Sec20p, Sec39p, and Dsl1p are involved in peroxisome biogenesis. *Euk. Cell.* **8**, 830–843.
149. Lay D., Grosshans B.L., Heid H., Gorgas K., Just W.W. 2005. Binding and functions of ADP-ribosylation factor on mammalian and yeast peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 34489–34499.
150. Carney G.E., Bowen N.J. 2004. p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biol. Cell.* **96**, 271–278.
151. Marelli M., Smith J.J., Jung S., Yi E., Nesvizhskii A.I., Christmas R.H., Saleem R.A., Tam Y.Y.C., Fagarasanu A., Goodlett D.R., Aebersold R., Rachubinski R.A., Aitchison J.D. 2004. Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *J. Cell Biol.* **167**, 1099–1112.
152. Kurbatova E., Otzen M., van der Klei I.J. 2009. p24 proteins play a role in peroxisome proliferation in yeast. *FEBS Lett.* **583**, 3175–3180.
153. Fagarasanu A., Fagarasanu M., Eitzen G.A., Aitchison J.D., Rachubinski R.A. 2006. The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Cell.* **10**, 587–600.
154. Hoepfner D., van den Berg M., Philippson P., Tabak H.F., Hettema E.H. 2001. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **155**, 979–990.
155. Krikken A.M., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2009. *Hansenula polymorpha pex11* cells are affected in peroxisome retention. *FEBS J.* **276**, 1429–1439.
156. Munck J.M., Motley A.M., Nuttall J.M., Hettema E.H. 2009. A dual function for Pex3p in peroxisome formation and inheritance. *J. Cell Biol.* **187**, 463–471.
157. Chang J., Mast F.D., Fagarasanu A., Rachubinski R.A., Eitzen G.A., Dacks J.B., Rachubinski R.A. 2009. Pex3 peroxisome biogenesis proteins function in peroxisome inheritance as class V myosin receptors. *J. Cell Biol.* **187**, 233–246.
158. Otzen M., Krikken A.M., Ozimek P.Z., Kurbatova E., Nagotu S., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2006. In the yeast *Hansenula polymorpha*, peroxisome formation from the ER is independent of Pex19p, but involves the function of p24 proteins. *FEMS Yeast Res.* **6**, 1157–1166.
159. Guo T., Kit Y.Y., Nicaud J.M., Le Dall M.T., Sears S.K., Vali H., Chan H., Rachubinski R.A., Titorenko V.I. 2003. Peroxisome division in the yeast *Yarrowia lipolytica* is regulated by a signal from inside the peroxisome. *J. Cell Biol.* **162**, 1255–1266.
160. Farre J.C., Manjithaya R., Mathewson R.D., Subramani S. 2008. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev. Cell.* **14**, 365–376.
161. Bellu A.R., Komori M., van der Klei I.J., Kiel J.A., Veenhuis M. 2001. Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p. *J. Biol. Chem.* **276**, 44570–44574.
162. van Zutphen T., van der Klei I.J., Kiel J.A. 2008. Pexophagy in *Hansenula polymorpha*. *Meth. Enzymol.* **451**, 197–215.
163. Bellu A.R., Salomons F.A., Kiel J.A., Veenhuis M., van der Klei I.J. 2002. Removal of Pex3p is an important initial stage in selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.* **277**, 42875–42880.