

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Alexander Kreiselmeier

aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Funktionelle Aspekte der zwei Pex11-Homologe Pex11-1 und  
Pex11-2 bei der Peroxisomenbiogenese in Säugern**

Gutachter:

Prof. Dr. Felix T. Wieland

PD Dr. Dieter Kübler

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Dr. Felix T. Wieland für die Aufnahme in das Institut und seine Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Biologie zu vertreten.

P.D. Dr. Dieter Kübler für sein Interesse an diesem Thema und seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Prof. Dr. Wilhelm W. Just für das interessante und komplexe Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie der Materialien und Mittel und für die zahlreichen Anregungen während der Entstehung dieser Arbeit. Er half mir stets den Blick für das Wesentliche zu bewahren.

Prof. Dr. Karin Gorgas für die Anfertigung des exzellenten elektronenmikroskopischen Bildmaterials.

Thanh-Phuong Thai für die intensive Betreuung während meiner Anfangszeit am BZH.

Dr. Herbert Tschochner für seine Unterstützung vor allem während der Abschlußphase dieser Arbeit.

Andreas Hunziker (DKFZ) für die prompten Sequenzanalysen der cDNA-Konstrukte.

Dr. Rainer Pepperkok (EMBL) für die Klonierung von CFP-Pex11-1 und Pex11-1-YFP.

Dipl.-Biol. Dorothee Lay und Dipl.-Biol. Claus Rodemer, sowie den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die stete Diskussionsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Barbara Schröter, Dr. Bernd Helms, Dr. Nicole Jenne und allen anderen Mitarbeitern am BZH, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Meinen Eltern, die mich stets unterstützt und meinen Werdegang überhaupt erst ermöglicht haben.

## Abkürzungen

A	Adenin
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
C	Cytosin
CDNA	cyklische DNA
CFP	Cyan Fluorescent Protein, eine Farbvariante von GFP (Mutationen im Vgl. zum wt-GFP: K26R, F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A, N164H, und H231L), Exzitation: 433(453) nm – Emission: 475(501) nm
CMV	Cytomegalievirus
COP	Coatprotein
dC	delta C (verkürzt am C-Terminus)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dN	delta N (verkürzt am N-Terminus)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat(e)
DOC	Natriumdesoxycholat
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	N,'N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Stabilere Variante des grün fluoreszierenden Proteins (Enhanced Green Fluorescent Protein), Exzitation: 488 nm – Emission: 507 nm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
X x g	X x normale Erdbeschleunigung (9,81x m x s <sup>-1</sup> )
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein), Exzitation: 395(470) nm – Emission: 509 nm
GpppG	P <sup>1</sup> -5'-(7-Methyl)-guanosin-P <sup>3</sup> -5'-guanosin-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	milli-
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MEM	minimum essential medium

min	Minute(n)
OD...	optische Dichte bei spezifischer Wellenlänge (Angabe im Index)
p...	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pex...	Peroxin
PMP	peroxisomales Membranprotein
PNS	postnukleärer Überstand
PTS	peroxisomales Targetingsignal
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)
T	Thymidin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat
Triton X-100	Oktylphenol-polyethylenglykolether
U	Unit(s)
U	Uracil
ÜN	über Nacht (15-18 h)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Wt	Wildtyp
YFP	Yellow Fluorescent Protein , eine Farbvariante von GFP (Mutationen im Vgl. zum wt-GFP: S65G, S72A, T203Y, and H231L)), Exzitation: 513 nm – Emission: 527 nm
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1. Einleitung

## 1.1 Peroxisomen: Vorkommen und Morphologie

Peroxisomen wurden erstmals von Rhodin (1954) beschrieben. Diese Zellorganellen sind von einer einfachen Lipiddoppelschicht umgeben, die von granulär bis tubulär und netzartig vielerlei Gestalt annehmen kann. Sie besitzen eine Größe von 100 nm bis 1,5 µm, je nach vorliegendem Zelltyp und Differenzierungszustand (Lazarow und Fujiki, 1985; Gorgas, 1984, 1985, 1987; Kunau, 1998).

Peroxisomen tauchen in den verschiedensten Organismen und unterschiedlichen Geweben bzw. Organen auf. Besonders große bzw. zahlreiche Peroxisomen kommen z.B. in den Zellen der Leber und der Niere vor, wobei Leberzellen der Ratte in den vorliegenden Experimenten bevorzugt verwendet wurden, wenn größere Mengen gewonnen werden sollten.

## 1.2 Funktionen der Peroxisomen

Die vorherrschenden metabolischen Vorgänge in den Peroxisomen variieren in den verschiedenen Organismen bzw. Organen. Namensgebend war das Auftreten von unterschiedlichen Oxidasen - wie Uratoxidase, D-Aminosäureoxidase u.a. - in diesem Organell (de Duve und Baudhuin, 1966; de Duve C., 1983; Latruffe und Vamecq, 2000). Diese Oxidasen reduzieren Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und produzieren somit als Abfallprodukt ein Zellgift, das umgehend durch Umsetzung in molekularen Sauerstoff und Wasser mittels Katalase entsorgt wird. In der Peroxisomenmatrix herrscht zumeist ein reduzierendes Milieu vor. Die Katalase repräsentiert das Leitenzym der Peroxisomen, welches zum Nachweis von Peroxisomen z.B. in Präparaten aus Zellaufschlüssen routinemäßig herangezogen wird.

Die  $\beta$ -Oxidation langkettiger und verzweigter Fettsäuren stellt einen weiteren Aufgabenbereich der Peroxisomen, z.B. in Säugerzellen und Hefe, dar (Lazarow und de Duve, 1976; Wanders und Tager, 1998; van Roermund et al., 2000). Kurze und unverzweigte Fettsäuren werden in den Mitochondrien metabolisiert (Lindmark und Müller, 1973; Draye et al., 1987). Die besondere Bedeutung der Peroxisomen im Lipidstoffwechsel manifestiert sich am augenfälligsten in Erkrankungen wie dem Zellweger-Syndrom, Neonataler Adrenoleukodystrophie u.a., die auf schwere Peroxisomendefekte, wie den Ausfall des Matrixprotein-Imports, zurückgehen (Singh et al., 1984; Gould und Valle, 2000).

Eine weitere bedeutsame Aufgabe fällt den Peroxisomen bei der Entgiftung von Säugerzellen im Zusammenhang des Katabolismus von Polyaminen und Purinen (Takada & Noguchi, 1986), sowie bei der Oxidation von Alkoholen, Phenolen und Aldehyden zu (Tolbert, 1981; Soto et al., 1993). Dies geschieht vornehmlich in Organen, denen naturgemäß die Entgiftung des Organismus zukommt, wie z.B. der Niere und der Leber.

In höheren Pflanzen spielen spezialisierte Peroxisomen beim Glykolat-Abbau, welches bei der photosynthetischen Sauerstofffixierung anfällt (Heupel und Heldt, 1992) eine Rolle. Am Abbau von Triglyceriden zu Succinat in den Keimblättern fettspeichernder Früchte während der Keimung sind die hier als Glyoxisomen bezeichneten Peroxisomen maßgeblich beteiligt (Breidenbach und Beevers, 1967). Dieses hieraus erhaltene Succinat kann zur Glucosesynthese verwendet werden.

Auch im Reich der Einzeller sind spezialisierte Peroxisomen präsent: z.B. in Flagellaten, wie etwa den *Trypanosoma*, ist die Glykolyse vom Zytoplasma komplett in die dafür spezialisierten Glycosomen verlagert worden (Opperdoes und Borst, 1977).

In Hefen, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, findet der gesamte Prozeß der  $\beta$ -Oxidation der Lipide in den Peroxisomen statt (van Roermund et al., 2000).

Auch die *Synthese* von wichtigen Produkten hat ihren Anfang in den Peroxisomen von Säugerzellen, z.B. die ersten Schritte der Synthese der Plasmalogene (Etherlipide) und Teile

der Cholesterinsynthese (Hajra et al., 1979; Krisans, 1992), wobei die Aufrechterhaltung der Etherlipidsynthese in engem Zusammenhang mit den oben erwähnten Erkrankungen steht (Thai et al., 2001).

### **1.3 Peroxisomenbiogenese**

Für die Biogenese der Peroxisomen werden zur Zeit zwei Hypothesen diskutiert. Erstens die Neubildung von Peroxisomen aus bereits vorhandenem peroxisomalem Material (Lazarow und Fujiki, 1985; Purdue und Lazarow, 2001) und zweitens die Entstehung aus dem Endomembransystem, vor allem aus dem ER (Novikoff und Shin, 1964; Novikoff und Novikoff, 1982; Kunau und Erdmann 1998; Titorenko und Rachubinski, 1998; Titorenko et al., 2000).

### **1.4 Peroxisomale Proteine: Targeting, Regulation und Aufgaben**

Peroxisomale Proteine werden an freien Polyribosomen im Zytoplasma und nicht am rauhen ER synthetisiert. Der Import in die peroxisomale Matrix oder Membran erfolgt posttranslational (Lazarow & Fujiki, 1985; McNew & Goodman, 1996; Jones et al., 2001; Purdue und Lazarow, 2001).

Postrtranslationale Modifikationen in Form einer Glykosylierung sind bislang nicht belegt. Es scheint bei Pex14 und Pex15 jedoch Phosphorylierungen und bei Pex19 eine Farnesylierung zu geben (Purdue und Lazarow, 2001).

Die für die Aufrechterhaltung des peroxisomalen Kompartimentes zuständigen Proteine, die sogenannten Peroxine (Pex-Proteine) sind zumeist an dem Import von löslichen peroxisomalen Enzymen in die peroxisomale Matrix beteiligt, welcher über einen verzweigten Pathway bewerkstelligt wird (Purdue und Lazarow, 1994). Bislang sind 23 Mitglieder der Pex-Familie beschrieben.



Zum Aufbau und zur Aufrechterhaltung der peroxisomalen Membran sind nach heutigem Wissensstand mindestens drei Peroxine (Pex3, Pex16, Pex19) und evt. auch noch Pex17 von zentraler Bedeutung. Diese Maschinerie ist unabhängig vom Matrixprotein-Import (Sacksteder et al., 2000; Purdue und Lazarow, 2001), welches sich auch in der Symptomatik des Zellweger-Syndroms zeigt, bei dem nur der Matrixprotein-Import unterbunden ist (Santos et al., 1988a und 1988b).

#### **1.4.1 Peroxisomaler Matrixprotein-Import mittels PTS**

Der Matrixprotein-Import ist vielfach beschrieben und erfolgt mittels drei verschiedener Importwege, von denen bislang zwei zuverlässig erforscht sind, während beim dritten noch Forschungsbedarf besteht, da die Signalsequenz sich als sehr heterogen darstellt. Für die verschiedenen Importwege (Purdue und Lazarow, 2001) sind drei unterschiedliche PTS-Typen (peroxisomale Targeting Signale) vorhanden, wobei die Translokations-Maschinerie zweien davon, d.h. PTS1 und PTS2, gemeinsam zu sein scheint. Das PTS3 ist bislang nur unzureichend charakterisiert und scheint eher heterogener Natur zu sein (Small et al. 1988). Es kommt z.B. in der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase von *S. cerevisiae* vor, die keines der beiden anderen PTS besitzt (Skoneczny und Lazarow, 1998).

Für die beiden anderen PTS sind lösliche cytosolische Rezeptoren bekannt: Pex5 für das PTS1 (Dodt et al., 1995; Dodt & Gould, 1996; Jardim et al., 2000) und Pex7 für das PTS2 (Zhang & Lazarow 1996; Braverman et al., 1997; Elgersma et al., 1998).

An der Peroxisomenmembran docken diese Rezeptoren über Pex13, Pex14 und Pex17 an, gefolgt von einem bisher nicht vollständig verstandenen Translokationsmechanismus, an dem Pex2, Pex8, Pex10 und Pex12 beteiligt sind (Gould et al., 1996; Rehling et al., 1996; Huhse et al., 1998; Girzalsky et al., 1999; Urquhart et al., 2000; Purdue und Lazarow, 2001).

Bislang wird davon ausgegangen, daß zumindest Pex5 - nach Ablieferung des neusynthetisierten Cargo-Proteins beim Peroxisom - wieder zum Cytosol recycelt wird (Dammai und Subramani, 2001). Für Pex7 gibt es bisher keine dahingehenden Erkenntnisse.

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen ein PTS1, welches am äußersten C-Terminus lokalisiert ist und aus einer Sequenz besteht, die im Laufe der Evolution auf das Tripeptid SKL eingengt wurde (Gould et al., 1989; Miura et al., 1992; Sacksteder et al., 1999; zur Übersicht siehe McNew und Goodman, 1996).

Das PTS2 stellt im Gegensatz hierzu eine breitgefächerte Konsensus-Sequenz dar, die aus einem Nonapeptid [-(R/K)-(L/V/I)-(XXXXX)-(H/Q)-(L/A/F)-] besteht und am äußersten N-Terminus oder nahe daran lokalisiert ist (Swinkels et al., 1991). Das PTS2 ist z.B. in der Malatdehydrogenase von einigen Pflanzen und in der Thiolase von Ratten enthalten, wobei die Thiolase insofern eine Besonderheit darstellt, als hier das PTS2 nach dem Import abgespalten wird, was sonst allgemein nicht der Fall ist (Miura et al., 1984; Swinkels et al., 1991; Chudzik et al., 2000). Der Verbleib einer Targeting-Sequenz am Protein - die eigentlich nach dem Import des betreffenden Proteins ihre Aufgabe erfüllt hat - stellt eine Ausnahme dar. Beim Import von Proteinen in andere Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, das ER usw., findet abschließend üblicherweise eine Abspaltung von Signalsequenzen statt (Just und Soto, 1992; Danpure 1996).

### **1.4.2 Peroxisomaler Membranprotein-Import**

Für einige wenige peroxisomale Membranproteine wurden mPTS (membrane-PTS) vorgeschlagen, deren Sequenzen jedoch so heterogen sind, daß nicht von einem Konsensus-Motiv gesprochen werden kann. Hierbei ist zu beachten, daß Targeting und Insertion des Proteins in die peroxisomale Membran getrennte Schritte darstellen (Diestelkötter und Just, 1993). Das erste mPTS wurde im Pmp47 von *Candida boidinii* - später auch in *Saccharomyces cerevisiae* - identifiziert (McCammon et al., 1994; Dyer et al., 1996), wobei

das entsprechende Signal im luminalen Loop zwischen der 4. und der 5. Transmembrandomäne des Pmp47 lokalisiert ist (Dyer et al., 1996). Die Lokalisierung dieses Signals im bereits integrierten Protein scheint fast immer auf der Matrixseite der Peroxisomen zu liegen, wie sich anhand von Pex3 aus *Hansenula polymorpha* sowie Pex15 und Pex22 aus *Saccharomyces cerevisiae* demonstrieren ließ (Baerends et al., 1996+2000; Elgersma et al., 1997; Koller et al., 1999). Eine Ausnahme stellt das mPTS von Pmp22 aus Ratten dar, welches innerhalb der ersten 37, cytosolisch gelagerten, Aminosäuren des in die Peroxisomenmembran integrierten Proteins liegt (Pause et al., 2000). Eine Gemeinsamkeit aller bisher vorgeschlagenen mPTS-Sequenzen sind positiv geladene Seitengruppen, die innerhalb eines hydrophilen Proteins mit einem hydrophoben Bereich verbunden sind, z.B. Transmembrandomänen (Purdue und Lazarow, 2001).

### 1.4.3 Regulation der Peroxine

Die Regulation der Expression vieler Proteine der Peroxisomen erfolgt u.a. über Transkriptionsfaktoren, die zur PPAR-Familie (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor) gehören. Hierbei wird der Rezeptor-gebundene Aktivator (Ligand) in den Kern transportiert, wo eine Induktion der Transkription über Anbindung an geeignete Promotoren erfolgt. Dies führt letztendlich zu einer Regulation der peroxisomalen Proliferation über die PPARs (Issemann und Green, 1990; Dreyer et al., 1992; Lee et al., 1995). Natürliche Aktivatoren der PPARs scheinen mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu sein (Rustan et al., 1992). Zu den synthetischen Peroxisomenproliferatoren gehören z.B. Pharmaka wie Clofibrat, die den Lipidspiegel senken und die PPARs aktivieren (Hess et al., 1965; Lazarow und de Duve, 1976; Dreyer et al., 1992). Dieser Effekt wird bei der Gewinnung von peroxisomalen Präparaten genutzt, indem z.B. Ratten mit Clofibrat-versetztem Futter ernährt werden, um die Peroxisomenausbeute zu maximieren.

## 1.5 Die Pex11-Homologe induzieren peroxisomale Proliferation

Die Pex11 (ehemals Pmp26 bzw. Pmp27)-Homologe Pex11-1 und Pex11-2, auch als Pex11 $\alpha$  und Pex11 $\beta$  bezeichnet, schließlich sind auf der Ebene der Peroxine für die peroxisomale Proliferation in Säugerzellen verantwortlich (Marshall et al., 1995; Abe und Fujiki, 1998; Schrader et al., 1998). Die Polypeptid-Sequenzen von Pex11-1 (246 Aminosäuren) und Pex11-2 (259 Aminosäuren) sind in der Maus (*Mus musculus forma domestica*) zu 41% identisch und zu 70% einander ähnlich (Abb. 1).

Das Pex11-1 induziert mit einer Verdoppelung der Ursprungszahl eine mäßige Proliferation der Peroxisomen (Passreiter et al., 1998), während die Überexpression von Pex11-2 eine starke peroxisomale Proliferation erzeugt. Hier wird die ursprüngliche Anzahl auf das 8- bis 10-fache erhöht (Schrader et al., 1998). Nach Pex11-2-Überexpression entstehen deutlich kleinere Peroxisomen.

In Ratten wurde beobachtet, daß Pex11-2 für die konstitutive peroxisomale Proliferation verantwortlich zu sein scheint, da es in den verschiedenen Geweben in etwa einheitlich stark exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu schwankt das Pex11-1-Level erheblich und ist durch Gabe von extrazellulären Stimuli, z.B. Clofibrat, stark induzierbar. Das mRNA-Niveau von Pex11-1 steigt nach Stimulation bis auf das 10fache (Schrader et al. 1998), was auf eine bedarfsorientierte Funktion schließen läßt.

### 1.5.1 Vorkommen von Pex11-Proteinen in niederen Organismen

In Hefen existiert nur ein Pex11-Protein, das als peripherisches Protein auf der Matrixseite der peroxisomalen Membran lokalisiert zu sein scheint (Marshall et al., 1996). Hefe-Mutanten, die kein Pex11 exprimieren, weisen im Gegensatz zu den normalen Zellen nur wenige aber sehr große Peroxisomen auf, die nicht auf Tochterzellen übertragen werden können und somit

deren Wachstum unterbinden (Erdmann und Blobel, 1995; Marshall et al., 1995; Sakai et al., 1995).

Auch in Flagellaten, z.B. den Trypanosomen, existiert nur ein Pex11-Protein, dessen Überexpression zu veränderten Phänotypen führt (Lorenz et al., 1998). Die Funktionsfähigkeit des trypanosomalen Pex11 ist aber nicht von einem intakten C-Terminus bzw. Dilysinmotiv abhängig (Maier et al., 2000).

### 1.5.2 Topologie und wichtige Domänen der Pex11-Homologe

Den beiden Pex11-Homologen ist eine auffällige Topologie gemeinsam. Sie besitzen, z.B. in der Maus, laut Hydrophobizitätsanalyse zwei putative Transmembrandomänen. Der N- und der C-Terminus weisen beide in das Cytosol und eine große luminal Schleife ist in das Innere des Peroxisoms gelagert (Abb. 2-1; Abb. 2-2; Passreiter et al., 1998). Die im Vergleich zu Pex11-1 zusätzlich vorhandenen 13 Aminosäuren des Pex11-2 befinden sich in dieser luminalen Schleife.

Zudem befindet sich im N-Terminus ein PTS2 (Aminosäure 16-24), das bei Pex11-1 völlig mit dem beschriebenen Konsensusmotiv übereinstimmt (Osumi et al., 1991; Subramani, 1993). In der Pex11-2-Sequenz ist die 8. Position des PTS2-Nonapeptids ein Tyrosin, welches nicht im bekannten Konsensusmotiv vertreten ist. Es ist jedoch möglich, daß die PTS2-Konsensus-Sequenz bisher zu restriktiv definiert wurde, wie Untersuchungen in Säugern, Hefen und Pflanzen vermuten lassen (Tsukamoto et al., 1994; Glover et al., 1994; Flynn et al., 1998), und daß die PTS2-Sequenz in Pex11-2 eher einer erweiterten Definition entspricht.

Am C-Terminus des Pex11-1 befindet sich ein Dilysinmotiv (*hier*: -KLKAR; Jackson et al., 1990; Passreiter et al., 1998), das als Retentionssignal für ER-residente Membranproteine bekannt ist (Nilsson et al., 1989). Über die Bindung von Coatmer und somit den Aufbau des Coats am Vesikel, wird die Vesikulierung und damit der vesikuläre Transport zwischen ER und Golgiapparat, sowie der intra-Golgi-Transport, ermöglicht (Cosson und Letourneur, 1994

und 1997; Letourneur et al., 1994; Cosson et al., 1996; Nickel et al., 1998). Die kleine GTPase ARF1 ist zusammen mit dem Dilysinmotiv an der COPI-Coat-Anbindung beteiligt und ermöglicht so die Vesikulierung der Golgi-Membran (Harter et al., 1996; Zhao et al., 1997).

Auch das Dilysinmotiv in Pex11-1 ist in der Lage, ARF und COP I zu binden und so evt. eine *peroxisomale* Vesikulierung zu vermitteln (Passreiter et al., 1998; Anton et al., 2000).

Während das Dilysinmotiv in Pex11-1 dem Konsensusmotiv (-KXXXX) voll entspricht, ist in Pex11-2 mit (-RLKP) ein Motiv vorhanden, das im Vergleich zum Pex11-1 um eine Aminosäure verkürzt ist und statt dem ersten Lysin ein Arginin besitzt (Abb. 1). Zwar sind an dieser Stelle mit Arginin und Lysin nach wie vor zwei positive Ladungen präsent, jedoch ist die Sequenz im Vergleich zu Pex11-1 deutlich verändert.

Außerdem befindet sich innerhalb der luminalen Loop-Region der Pex11-Homologe eine Sequenz (Position 156-170 in Maus und Ratte), die mit ihren positiv geladenen Aminosäuren einem mPTS ähnelt (Passreiter et al., 1998; Anton et al., 2000).

## 1.6 Zielsetzung

Es liegt nahe, daß die cytosolisch orientierten Termini eine Kontaktaufnahme zu möglichen Interaktionspartnern im Cytosol ermöglichen. Experimentell bietet sich daher eine Funktionsanalyse der Pex11-Proteine über eine genauere Untersuchung dieser Termini an. Da Pex11-2 offensichtlich den stärkeren Peroxisomen-proliferierenden Effekt der beiden Homologe aufweist (Schrader et al., 1998) konzentrierten sich die Untersuchungen vor allem auf dieses Protein. Insbesondere der Pex11-2-N-Terminus sollte sich im Laufe der Experimente als interessanter Kandidat zur funktionellen Charakterisierung erweisen.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob die beiden Homologe - auf mehr oder weniger direkte Weise - interagieren oder isoliert arbeiten und welche spezifische Rolle die einzelnen Proteine

bzw. deren funktionelle Domänen bei der peroxisomalen Vesikulierung und der Aufrechterhaltung der Peroxisomen-Morphologie spielen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten verschiedene cDNA-(Deletions- und Fusions-) -Konstrukte hergestellt und einzeln oder kombiniert in Säugerzellen exprimiert und die resultierenden Phänotypen analysiert werden (Abb. 3 und Abb. 4). Für die Transfektionsansätze wurden in den vorliegenden Experimenten CHO-Zellen (Zellen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters / *Cricetulus griseus*) und AT3-Zellen (Hepatomzellen einer transgenen Maus / *Mus musculus forma domestica*) verwendet, da diese Zellen gut identifizierbare peroxisomale Strukturen und einen nicht zu großen Zellkern besitzen.

Ergänzend sollten Interaktions-Experimente der Homologe untereinander oder mit anderen möglichen, z.B. cytosolischen, Bindungspartnern durchgeführt werden.

## 2.Materialien

### 2.1 Verwendete Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Spezielle Chemikalien

Acrylamid, Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)

Agarose NEEO, Ultra-Qualität, Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)

AMCA blue-(Sulfo-NHS), Pierce

Ammoniumperoxodisulfat (APS), Merck AG (Darmstadt)

Ampicillin, Boehringer Mannheim

Apyrase, Sigma

ATP, Sigma (Deisenhofen)

Bacto-Agar, DIFCO Laboratories (Detroit, MI, USA)

Bacto-Tryptone, DIFCO Laboratorie s (Detroit, MI, USA)

Bisacrylamid (N, N'-Methylenbisacrylamid), Serva (Heidelberg)

BMH (Bismaleimidohexan), Pierce (Rockford, IL ,USA)

Bromphenolblau, Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA)

BSA (Rinderserumalbumin) FraktionV, Biomol Feinchemikalien (Hamburg)

Cell labelling Mix, Amersham Buchler (Braunschweig)

Coomassie Brilliant Blau R250, Serva (Heidelberg)

CTP, Sigma (Deisenhofen)

Cytochalasin B, Sigma (Deisenhofen)

Dexamethason, Serva (Heidelberg)

DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma Aldrich (Deisenhofen)

DNA-Leiter (1kb), GIBCO BRL (Eggenstein)

DTT (Dithiothreitol), Biomol Feinchemikalien (Hamburg)



EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Merck AG (Darmstadt)

Essigsäure, Merck AG (Darmstadt)

Ethanol absolut, Riedel-de-Haën (Hannover)

Ethidiumbromid, Boehringer Mannheim

Fluos, Sigma

G418-Sulfat, Sigma (Deisenhofen)

GTP, Sigma (Deisenhofen)

Hefeextrakt, DIFCO Laboratories (Detroit, MI, USA)

HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure) ), Sigma (Deisenhofen)

Insulin, Hoechst (Frankfurt)

Lyso-Tracker (rot) DND-99, Molecular Probes (Leiden, NL)

$\beta$ -Mercaptoethanol, Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA)

Mito-Tracker (grün) M-7514, Molecular Probes (Leiden, NL)

Mito-Tracker (rot) M-7513, Molecular Probes (Leiden, NL)

Mowiol, Polyscience Inc. (Warrington, PA, USA)

Nocodazol [Methyl-(5-(2-Thienylcarbonyl)-1 H-Benzimidazol-2-yl)carbamat], (M1404),  
Sigma (Deisenhofen)

dNTP-Mix für PCR, Pharmacia (Freiburg)

Nycodenz, Immuno (Heidelberg)

Oligonukleotide, Eurogentec (Seraing, Belgien)

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Boehringer Mannheim

2-Propanol, Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)

Röntgenfilm-Entwickler, Kodak LX24, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)

Röntgenfilm-Fixierbad, Kodak AL4, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)

SDS (Natrium-Dodecylsulfat), Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA)

Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat), Pierce  
(Rockford, IL ,USA)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA)

TCA (Trichloressigsäure), Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)

Thiopropylsepharose 6B (TPS), Pharmacia (Freiburg)

Triiodothyronin, Sigma (Deisenhofen)

Triton X-100, Boehringer Mannheim

Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), Merck AG (Darmstadt)

Tween 20, Serva (Heidelberg)

UTP, Sigma (Deisenhofen)

Zeocin, CAYLA (Toulouse, F)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Merck AG (Darmstadt), Riedel-de-Haen AG (Hannover) und Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) bezogen. Das verwendete Wasser (bidest-Qualität) entstammte einer Milli-Q-Anlage der Firma Millipore.

### **2.1.2. Vorgefertigte Materialien**

Filterpapiere (190g bzw. 330g/ m<sub>2</sub>)

Whatman

Membranfilter (Ø 0,45 µm)

Millipore

Fluorotrans PVDF-Blot-Membran, Pall (Portsmouth, GB)

Röntgenfilme für: - <sup>35</sup>S, Hyperfilm™-βmax, Amersham Buchler (Braunschweig)

- Western Blot, Kodak X-omat XAR5, Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)

### **2.1.3. Enzyme und Inhibitoren**

Antipain, Bachem (Heidelberg)

Leupeptin, Bachem (Heidelberg)

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer, New England Biolabs (Schwalbach)

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Puffer, USB (Cleveland, OH, USA)

Taq-PWO-Polymerase und Puffer, Hybaid (Heidelberg)

T4-DNA-Ligase und Puffer, Fermentas (Vilnius, Litauen)

## 2.1.4 Antiseren

### -Erstantikörper:

In der Immunfluoreszenz bzw. im Western Blot wurden benutzt:

- anti-Acyl-CoA-Oxidase, polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das Gesamtprotein, im Labor (1:200)

- anti-Calreticulin, polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das Gesamtprotein, bezogen von affinity bioreagents (über Alexis Deutschland GmbH (Grünberg) )

- anti-Katalase (K1), polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das Gesamtprotein (1:200 in IF verwendet, im Labor vorhanden).

Entsprechende Antiseren gegen Katalase aus Schaf und Maus (1:50 verwendet) wurden wahlweise benutzt.

- anti-myc (9E10), monoklonaler Antikörper aus Maus myc-Epitop-spezifisch, Gabe von Nicole Jenne BZH Heidelberg (als 1:4 Verdünnung in IF verwendet)

- anti PMP26p (Pex11-1p), polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das Gesamtprotein, im Labor (1:100)

- anti-PMP69p (Pep3, 96) polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das synthetische C-terminale Peptid des Pmp69p, im Labor (als 1:300-1:500 Verdünnung in IF verwendet)

- anti-PMP69p (Pep3, 96) polyklonales Antiserum aus Maus gegen das synthetische C-terminale Peptid des Pmp69p, im Labor (1:25 in IF verwendet).

- anti- $\alpha$ -Tubulin (1:70 in IF verwendet) monoklonales Antiserum aus Maus (Amersham Buchler, Art.Nr. N 356)

### -Zweitantikörper:

In der Immunfluoreszenz wurden verwendet:

Sekundäre Antikörper aus Ziege anti-Maus bzw. anti-Kaninchen IgG-Gesamtantikörper (H+L) AffiniPure wurden jeweils als Konjugate mit Fluorescein(FITC) oder Rhodamin(TRITC) von der Firma Dianova-immunotech (Hamburg) bezogen (1:80 bis 1:100 verdünnt benutzt).

Beim Western Blot wurden benutzt:

Peroxidase-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Maus bzw. anti-Kaninchen IgG-Gesamtantikörper (H+L), dianova-immunotech (Hamburg) (1:10.000 verdünnt verwendet).

## 2.1.5 Größenmarker für Elektrophorese

### 2.1.5.1 Agarosegelelektrophorese

- **1 kB-DNA-Leiter** (GIBCO BRL):

Ein synthetisches Vielfaches eines 1014bp-grossen Fragmentes kombiniert mit Fragmenten aus dem Plasmid pBR322 (alle Fragmente, die weniger als 1000bp besitzen).

Die Größen der Einzelfragmente (in bp) sind:

12216,11190,10180,9126,8144,7126,6108,5090,4072,3054,2036,1636,1016,506/517,  
396,344,298,220,201,154,134

Es wurde jeweils eine Konzentration von 50ng/μl verwendet.

### 2.1.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- **Laborstandard:**

Zusammensetzung aus 6 verschiedenen Proteinen:

Phosphorylase b (97kD), BSA (67kD), Ovalbumin (45kD), Carboanhydrase (29kD),  
Trypsininhibitor (21kD), Lysozym (14kD)

- **vorgefärbter Standard, sogenannter *prestain* (Sigma):**

Zusammengesetzt aus 7 Proteinen:

α-Makroglobulin (190kD) β-Galactosidase (125kD), Fructose-6-Phosphatkinase (88kD),  
Pyruvatkinase (65kD), Fumarase (56kD), Lactatdehydrogenase (38kD),  
Triosephosphatisomerase (33,5kD)

- **Radioaktiv-Standard (Amersham):**

Bestehend aus 6 verschiedenen <sup>14</sup>C-markierten Proteinen:

Myosin (200kD), Phosphorylase b (92,5kD), BSA (69 kD), Ovalbumin (46kD),  
Carboanhydrase (30kD), Lysozym (14,3kD)

## 2.1.6 Reagentiensätze

QIAfilter Plasmid Maxi/Midi Kit, QIAGEN GmbH (Hilden)

QIAprep Spin Plasmid Kit (Miniprep), QIAGEN GmbH (Hilden)

Qiaquick Gel Extraction Kit, QIAGEN GmbH (Hilden)

Wahlweise wurden entsprechende Produkte von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) bezogen.

## 2.1.7. Bakterienstämme

E. coli XL1-blue: Stratagene (La Jolla, CA, USA) zur Amplifikation von verwendeten Plasmiden

[Genotyp: supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>

F'(proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(te<sup>r</sup>) ) ] Blau-Weiss-Selektion wird durch das

F'-Plasmid bei einem geeigneten Vektor auf X-Gal-versetzten Agarplatten möglich.

E. coli BL21(DE3)pLysS: Novagen (Darmstadt, D) als kompetente Zellen geliefert, zur Überexpression von Proteinen, trägt ein Plasmid zur Lyse der Zellen (bei Gefrieren) [Genotyp: F ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal dcm (DE3) pLysS (cam<sup>R</sup>)]. Zur rekombinanten Gewinnung von reinen Proteinpräparaten.

### 2.1.8. Zelllinien

mhAT3F: Adhärent wachsende Leberzellen aus dem Hepatom einer transgenen Maus (*Mus musculus forma domestica*). Das T-Antigen wird unter der Kontrolle von Antithrombin III (regulatorische Region) exprimiert. Gabe von B. Antoine, Institut Cochin, Paris (F).

CHO-K1, ATCC CCL 61: Adhärent wachsende Zellen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (chinese hamster ovary/ *Cricetulus griseus*). Es handelt sich um pseudohaploide Zellen.

### 2.1.9 Klonierungsvektoren

pBluescript KS (+/-) von Stratagene (La Jolla, CA, USA):

Dieser Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen, ermöglicht eine Blau-Weiss-Selektion von transformierten Bakterien (die multiple cloning site unterbricht das Lac Z Gen) und besitzt einen T7-Promotor von dem aus eine *in vitro*- Transkription möglich ist.

pcDNA 3.1(1) Invitrogen BV (Leek, NL):

Hierbei handelt es sich um einen Säugerexpressionsvektor, der über einen CMV-Promotor (Cytomegalovirus) für eine hohe konstitutive Expression des einklonierten Gens sorgt.

Die Vorwärtsselektion erfolgt mittels einer G418-Resistenz (pcDNA 3) bzw. mit einer Zeocin-Resistenz. (pcDNA 3.1) wodurch Säugerzellen-Klone gewonnen werden können. Auch hier wird durch eine Ampicillin-Resistenz eine Amplifikation des Plasmids in *E. coli* ermöglicht.

Eine *in vitro*- Transkription ist auch hier per T7-Promotor ausführbar.

pEGFP-C(1,2,3), (Clontech, Heidelberg):

Dieser eukaryontische Expressionsvektor enthält hinter einem CMV-Promotor die cDNA der stabileren Form des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) und ermöglicht die Klonierung eines Proteins an den C-Terminus des EGFP. Die Ziffern in der Klammer stehen für drei mögliche Leseraster (verwendet wurde C1). Die cDNA-Sequenz wurde an die in der Säugerzelle am häufigsten auftretenden Codons angepaßt und ermöglicht so eine verstärkte Expression.

pEGFP-N(1,2,3), (Clontech, Heidelberg):

Die Eigenschaften dieses Vektors entsprechen im Wesentlichen denen des oben beschriebenen pEGFP-C(1,2,3). Hier erfolgt aber eine Fusion des einklonierten Proteins an den C-Terminus des EGFP (Vgl. s.o.). Verwendet wurde das Raster von N2.

Alle diese Vektoren sind *high-copy-number* Plasmide.

pAD-Gal4 (Stratagene, Heidelberg):

Dies ist ein Hefeexpressionsvektor, mit dessen Hilfe Fusionsproteine mit der Aktivierungsdomäne des Gal4-Proteins der Hefe exprimiert werden können. Die Selektion erfolgt nach der Klonierung über die Leucinautotrophie. In diesem Fall enthielt dieser Vektor bereits die Genbank (im Labor).

pBD-Gal4 (Stratagene, Heidelberg):

Dies ist ein Hefeexpressionsvektor, mit dessen Hilfe Fusionsproteine mit der Bindungsdomäne des Gal4-Proteins der Hefe exprimiert werden können. Die Selektion erfolgt nach der Klonierung über die Tryptophanautotrophie.

PGemT (Promega, Mannheim):

Dieser Vektor wird zur Klonierung von PCR-Produkten genutzt (mit A-Überhang) und wurde in diesem Fall benutzt, wenn eine direkte Klonierung in den Zielvektor zu umständlich war.

pQE60 (QIAGEN):

Dies ist ein *low-copy*-Plasmid zur bakteriellen Expression eines Fusionsproteins mit einem 6xHis-tag (C-terminal) über einen T5-Promotor (*in vitro*- Transkription). Die Selektion erfolgt über Ampicillin.

**2.1.10 Geräte**

Brutschränke, Heraeus

Gelelektrophorese-Apparatur, Bio-Rad

Elektroblot-Apparatur, Bio-Rad

Thermomixer 5436, Eppendorf

**2.1.11 Medien und Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur**

Dulbecco's modified eagle medium / Nutrient Mix F12 (1:1) = D-MEM F12 in Pulverform

Dulbecco's modified eagle medium = D-MEM und die Variante  $\alpha$ -MEM in Pulverform

Alle Zellkultur-Medien wurden von GIBCO BRL (Eggenstein) bezogen.

Weitere Chemikalien und Präparate für die Kultur von Säugierzellen wurden von der Biochrom KG (Berlin) und Sigma (Deisenhofen) erworben.

Kunststoff-Petrischalen und weitere Plastikwaren stammten von folgenden Firmen:

Costar (Bodenheim)

Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg)

Greiner (Nürtingen)

Nunc (Wiesbaden)

## 3.Methoden

### 3.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Arbeiten mit E. coli

##### 3.1.1.1 Kultur von E. coli Bakterien (XL1-blue)

###### - In der Flüssigkultur:

Zur Anzucht grösserer Bakterienmengen werden sogenannte Übernachtskulturen angesetzt, wobei sich die Bakterien bis zur stationären Phase ( $2 \times 10^9$  Zellen/ml) vermehren und dann geerntet werden. Zum Animpfen wird eine einzelne Kolonie von einer Agarplatte per Impföse in einen zu ca. 25% mit Medium (mit zugesetztem Selektionsantibiotikum) befüllten Erlenmeyerkolben überführt (oder es werden einige Mikroliter einer vorhergehenden Flüssigkultur verwendet). Inkubiert wird ca. 16h bei 37°C unter ständiger Rotation (180 Upm).

Zur Untersuchung einzelner Kolonien auf das transformierte Plasmid hin, wurden 5 ml-Kulturen in 10 ml-Wassermannröhrchen unter entsprechenden Bedingungen angeimpft (Minipreps). Diese Kulturen wurden max. 72h bei 4°C gelagert.

LB-Medium: 1% Bacto-Tryptone  
0,5% Hefeextrakt  
0,5% NaCl  
pH 7,5 mit NaOH, autoklavieren, bei RT lagern

Antibiotikum: Ampicillin-Stocklösung: 100 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O (1000x)  
bei -20°C lagern  
Enkonzentration im Medium: 100 µg/ml

###### - Auf Agarplatten:

Zum Beispiel nach einer Transformation zur Vereinzelung von Klonen. Hierzu wird dem LB-Medium (s.o.) 1,5 % Bacto-Agar zugesetzt bevor autoklaviert wird. Ist die Lösung nach der Sterilisation auf ca. 50°C abgekühlt, wird das hitzeempfindliche Ampicillin bzw ein anderes Antibiotikum) beigemischt und anschliessend die Platten gegossen. Nach dem Erstarren werden die Platten bei 4°C gelagert (bis zu 6 Wochen; mit Kolonien bewachsen bis zu 4 Wochen).

###### - Anlegen von Dauerkulturen:

Sollen erfolgreich transformierte Klone oder Bakterienstämme gelagert werden, werden 500-1000 µl einer Flüssigkultur in einem Kryoröhrchen mit 15 % (v/v) sterilem Glycerol versetzt. Nach Schockfrost in flüssigem N<sub>2</sub> sind diese Kulturen bei -80 °C unbegrenzt haltbar und damit reaktivierbar. Hierzu wurde mit einer heissen Impföse ein kleines Aliquot abgeschmolzen und zum Animpfen in eine neue Flüssigkultur überführt.

### 3.1.1.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Um Bakterien in die Lage zu versetzen, frei in der Lösung vorhandene (Plasmid-)DNA absorbieren zu können, müssen diese zuvor einer speziellen Prozedur unterzogen werden. Hierbei wird die bakterielle Plasmamembran mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für exogene DNA durchlässig gemacht.

Es wurde die modifizierte Methode von Cohen et al. (1972) angewandt:

- 100 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) werden mit 1% Vol. einer frischen Übernacht-Kultur versetzt. Diese Kultur wird bis zum Erreichen der logarithmischen Phase ( $\text{OD}_{600} = 0,4-0,5$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 Upm geschüttelt.
- Diese Suspension wird auf einem Salz-Eisbad in bereit vorgekühlte Zentrifugen-Plastikröhrchen umgefüllt und verbleibt für 10 min auf Eis
- Hiernach wird die Suspension bei  $3000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert wonach das Sediment in 20 ml auf Eis gekühlte Calcium-Glycerol-Lösung resuspendiert wird. Diese Suspension verbleibt neuerlich für 30 min im Salz-Eisbad.
- Abermals wird bei  $3000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert.
- Das so gewonnene Bakterienpellet wird behutsam in 4 ml eisgekühlte Calcium-Glycerol-Lösung resuspendiert und in Aliquots zu  $100\mu\text{l}$  in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gefüllt.
- Schockfrozen in flüssigem  $\text{N}_2$  und Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  für maximal 6 Monate.

#### Verwendete Calcium-Glycerol-Lösung:

60 mM  $\text{CaCl}_2$   
 10 mM PIPES, pH 7,0  
 15% Glycerol  
 sterilfiltriert und bei RT gelagert

### 3.1.2 Amplifikation von Plasmiden

#### 3.1.2.1 Mini-Präparation durch QIAprep Spin Miniprep Kit

Zum Beispiel zur Identifikation von Transformanden, etwa nach einer Ligation, werden nur kleine Mengen von DNA benötigt, welche bei dieser Methode gewonnen werden.

Es werden je 5 ml-Übernachtskulturen (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) für jeden zu untersuchenden Klon angesetzt.

- Am nächsten Tag werden je Klon  $500\mu\text{l}$  Suspension als Reserve in Plastikröhrchen gefüllt, um aus diesen später eventuell Maxi-Präparationen anzuzüpfen (Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$ ).
- Die restliche Suspension wird bei  $6000$  Upm und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert.
- Jedes Pellet wird in  $250\mu\text{l}$  Puffer P1 resuspendiert.
- Durch Zugabe von je  $250\mu\text{l}$  Puffer P2 und anschliessendes behutsames Überkopf-Mischen erfolgt eine alkalische Lyse der Bakterienzellen für maximal 5 min bei RT.



- Die Lösung wird durch Zugabe von je 500µl Puffer N3 und abermaliges Überkopf-Mischen neutralisiert.
- Zur Entfernung von bakterieller DNA, SDS-Präzipitat und Zellresten wird bei 13000 Upm und 4°C für 10 min zentrifugiert (Haereus Biofuge).
- Zeitgleich werden die Säulchen des Präparations-Kits zum Adsorbieren der Plasmid-DNA auf leere 1,5 ml-Eppendorfröhrchen aufgesetzt.
- Die Überstände aus der Zentrifugation werden nun auf je ein Säulchen gegeben und diese durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 1 min beladen. Der Durchfluss wird verworfen.
- Zum zweimaligen Waschen wird je 650µl Puffer PE auf die Säulchen gegeben und bei 13000 Upm und 4°C für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird wieder verworfen.
- Zum Entfernen des letzten Restes ethanolischer Pufferlösung wird nochmals bei 13000 Upm und 4°C für 1 min zentrifugiert. und der Durchfluss verworfen.
- Zum Eluieren der Plasmid-DNA werden die Säulchen auf frische 1,5 ml-Eppendorfröhrchen aufgesetzt. Dann werden je 50µl ddH<sub>2</sub>O/Tris zentral auf die Säulenmatrix pipettiert und das Ganze nach 1 min (zum Einziehen der Lösung) bei 13000 Upm und 4°C für 1 min zentrifugiert.

Die DNA wurde anschliessend zum analytischen Restriktionsverdau benutzt, um eventuell erfolgreiche Ligationen nachzuweisen.

### 3.1.2.2 QIAfilter Plasmid Maxi/MidiPrep

Wurde ein DNA-Konstrukt erfolgreich ligiert oder wurde von einem bereits vorhandenen Plasmid eine grössere Menge benötigt um z.B. Zellen zu transfizieren oder ein Konstrukt zur näheren Analyse zu sequenzieren, wurden Midi- bzw. Maxipräparationen (Ergebnis= ca. 100µg bzw. 500µg DNA) ausgeführt. Das Standardprotokoll wurde nach Herstellerangaben (QIAGEN bzw. Macherey-Nagel) durchgeführt.

### 3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Je nach Ladungsverhältnissen, Grösse/Masse und räumlicher Anordnung eines Moleküls weist dieses ein unterschiedliches Wanderungsverhalten in einem elektrischen Spannungsfeld auf.

Da Nukleinsäuren in basischen Lösungen als mehrfach negativ geladene Moleküle mit homogener Ladungsdichte vorliegen, eignen sie sich zur Separation über ihre Masse und räumliche Struktur. Aufgetrennt werden z.B. Plasmide oder Nukleinsäurefragmente, etwa nach einem analytischen Restriktionsverdau oder zur Aufreinigung vor einer Umklonierungsprozedur.

Die Auftrennung geschieht in einer Gelmatrix aus aufgekochter und anschliessend geliertes Agarose (ein Heteropolysaccharid), wobei über Agarosekonzentration (= Porengrösse) festgelegt wird in welchem Größenbereich. Grosse DNA-Moleküle (bis 20.000 bp) werden hierbei bei geringen Agarosekonzentrationen (bis 0,5%) und kleine DNA-Fragmente (bis etwa 150 bp) in höher konzentrierten Gelen (bis 3%) aufgetrennt, wobei 3 ng pro Bande die unterste Grenze für den optischen Nachweis per Ethidiumbromid-Färbung darstellt. Üblicherweise wurden Agarosekonzentrationen von 1-2% für analytische und präparative Gele eingesetzt.

- Um ein Gel zu giessen wurde die benötigte Menge Agarosepulver abgewogen und in 250 ml (1x)TAE-Puffer gegeben, worin dieses im Mikrowellenofen gelöst wurde. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde Ethidiumbromid-Stocklösung hinzugegeben (ca. 0,5 µg/ml Endkonzentration), gut gemischt und die Lösung zum Erstarren in eine Flachbettgel-Vorrichtung aus Plexiglas gegossen (im Abzug!). Probenaschen werden hierbei durch einen speziell dafür angefertigten Kamm freigehalten. Lagerung bei 4°C unter Küchenfolie für ca. 1 Woche.
- Die so hergestellten Flachbettgele werden zu einer horizontalen Auftrennung von DNA eingesetzt. Dies geschieht in einem Gel, das hierzu dünn mit (1x)TAE-Puffer überschichtet wird (ca. 5mm). Die Proben werden 1:6 mit (6x)-Beladungspuffer vermischt und in die Probenaschen gefüllt. Die Elektrophorese findet bei einer Feldstärke von 3-7 V/cm statt, was bei den eingesetzten Gelen und Apparaturen etwa 100-220V Spannungsbegrenzung entspricht). Die Grösse der aufgetrennten DNA wurde über einen parallel mitaufgetrennten Grössenstandard bestimmt.
- Der Lauf wurde üblicherweise gestoppt, wenn das Bromphenolblau des Beladungspuffers etwa die Hälfte der Gellänge durchquert hatte. Die Einzelbanden wurden über ihre Ethidiumbromidfluoreszenz auf einem UV-Transilluminator ( $\lambda=312\text{nm}$ ) analysiert und mittels Videokamera und angeschlossenen Thermodrucker dokumentiert.

#### Verwendete Lösungen:

##### *(50x)-TAE-Puffer:*

2 M Tris/Acetat, pH 8,5

50 mM EDTA

(121,13 g Tris in 350 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, 28,5 ml Eisessig und 9,31 g EDTA hinzugeben, lösen und titrieren. Nach Einstellung des pH-Wertes ad 500 ml mit ddH<sub>2</sub>O ergänzen) Lagerung: RT

##### *Ethidiumbromid-Stocklösung:*

10 mg/ml Ethidiumbromid in ddH<sub>2</sub>O

Lagerung: 4°C

##### *(6x)-Beladungspuffer:*

40% (w/v) Saccharose

0,1% Bromphenolblau

gelöst in ddH<sub>2</sub>O

Grössenstandard: 1 kb-DNA-Leiter (GIBCO), 50ng/µl

### **3.1.4 Quantifizierung, Verdau und Extraktion von Nukleinsäuren**

#### **3.1.4.1 Ermittlung über die optische Dichte**

Die effizienteste Methode zur Ermittlung der Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung ist die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm, da hier die aromatischen Ringsysteme der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum aufweisen. Die Vermessung erfolgt in einer Quarzküvette, um dem kurzwelligeren Licht ein Durchdringen des Materials zu ermöglichen. Die ursprüngliche Lösung wurde meist 1:100 verdünnt.

Die gemessene optische Dichte wird hiernach mit verschiedenen Multiplikations-Faktoren auf die

aktuelle Konzentration in der vermessenen Lösung umgerechnet:

$OD_{260}=1,0$  entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  Doppelstrang-DNA

$OD_{260}=1,0$  entspricht 40  $\mu\text{g/ml}$  Einzelstrang-DNA oder RNA

$OD_{260}=1,0$  entspricht 33  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotide (Primer)

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die DNA-Lösungen mehr oder weniger stark mit RNA oder Proteinen aus den Präparationen verunreinigt sein können. Dies läßt sich durch die Bestimmung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  überprüfen. Ist dieser Wert um 1,80, handelt es sich um reine DNA; ist der Wert kleiner liegt eine Verunreinigung mit Proteinen vor; ist der Wert größer stammt die Verunreinigung von RNA in der Lösung.

### 3.1.4.2 Ermittlung über die Bandenstärke in der Gelmatrix

Hierbei handelt es sich um eine Abschätzung der Bandenintensität bei UV-Fluoreszenz nachdem eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt wurde. Hierzu wird die Bandenintensität der zu ermittelnden Proben mit der Bandenintensität eines DNA-Standards verglichen, bei dem die 1600 bp-Bande 1/10 der aufgetragenen Gesamt-DNA-Menge darstellt. Da eine Konzentration von 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  aufgetragen wurde, sind bei einem Auftrag von 10  $\mu\text{l}$  Volumen 500  $\text{ng}$  DNA in der entsprechenden Bande präsent. Bei dieser Methode wird gleichzeitig die Größe der DNA ersichtlich und, insbesondere nach analytischen Restriktionsverdauen, ob ein Konstrukt die gewünschte Zusammensetzung aufweist, d.h. ob ein zu klonierendes Fragment korrekt inseriert wurde.

### 3.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Basensequenzen und schneiden DNA an diesen definierten Stellen. Sie werden kommerziell aus Bakterien gewonnen. Beim Klonieren werden vorzugsweise die Enzyme verwendet, die überhängende (sticky) Enden erzeugen, da dies die erfolgreiche Ligation erleichtert. Doppelverdau von zwei Enzymen gleichzeitig sind nur möglich, wenn ein möglichst optimaler gemeinsamer Reaktionspuffer gefunden werden kann und eine einheitliche Inkubationstemperatur vorliegt. Sonst muß sequentiell verdaut werden.

#### - Analytische Verdau:

Nach der Transformation eines Ligationsansatzes wurde die aus den Einzelklonen gewonnene DNA (Miniprep) einem analytischen Verdau unterzogen; z.B. 20  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung in einem Endvolumen von 40  $\mu\text{l}$ . Die Anzahl eingesetzter Enzymeinheiten (10-20 U) und die Inkubationstemperatur (25-37°C) hängen dabei von der Art des benutzten Enzyms ab.

#### - Präparative Verdau:

Bei dieser Art des Verdaues wurden größere Mengen von DNA (max. 40  $\mu\text{g}$ , meist 20  $\mu\text{g}$ ) in einem Ansatz verdaut, z.B. um DNA für Klonierungen oder Transfektionen (Linearisierung) vorzubereiten. Hierbei galt es den Verdau in einem möglichst kleinen Flüssigkeitsvolumen (max. 80  $\mu\text{l}$ , meist 20-40  $\mu\text{l}$ ) durchzuführen, da naturgemäß ein möglichst kompletter Verdau der eingesetzten DNA in einer so hoch wie möglich konzentrierten DNA/Enzym-Lösung angestrebt wird (das Ergebnis wurde routinemäßig im Agarosegel überprüft).

Um dies zu erreichen kann entweder länger verdaut werden oder es werden mehr Enzymeinheiten benutzt, wobei Letzteres nicht bei besonders aggressiven Enzymen (z.B. EcoRI) zu empfehlen ist. Im allgemeinen wurden 80-120 U Enzym pro 40  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt und dieses für 2 Stunden inkubiert. Da das Glycerin der Enzymlösungen (50% Vol.) beim Verdau stört, sollte der Anteil der

Enzymlösung am Endvolumen jedes Ansatzes unter 10% liegen. War ein Verdau erfolgreich wurde die DNA mittels QIAquick-Säulchen gereinigt.

Bei Linearisierungen erfolgte dies – nach Hitzeinaktivierung des Enzyms - direkt aus dem Verdau heraus (hierzu wird zuvor mit einem Bindungspuffer gemischt / siehe Herstellerangaben), beim Herausschneiden eines Fragmentes aus einem Vektor heraus wurde eine elektrophoretische Trennung auf dem Agarosegel vorgeschaltet.

#### Verwendete Restriktionsendonukleasen und Puffer:

Enzym	(10x)-Puffer	Besonderes
Apa I	NEB4	verdaut bei 25°C
Bam HI	NEB2 (Eco RI-Puffer)	
Bgl II	NEB3	für Linearisierungen
Bsp EI	NEB3	
Eco RI	Eco RI-Puffer (NEB3)	
Hind III	NEB2	
Kpn I	NEB2	Temp.-empfindlich
Not I	NEB2	
Sma I	NEB4	verdaut bei 25°C
XhoI	NEB2	

Es wurde allgemein BSA zum Ansatz zugesetzt.

NEB=New England Biolabs-Buffer

(X)= Puffer für Doppelverdaue, aus Tabelle nach Herstellerangaben ermittelt

Apa I und Sma I dienen zu analytischen Verdauen, wenn es galt den Einbau von Fragmenten in sense-Richtung zu verifizieren, sobald mit nur einer Schnittstelle umkloniert wurde.

### **3.1.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel mit QIAquick-Säulchen**

Die Isolierung von DNA aus einem Agarosegel erfolgte nach dem QIAquick Gelextraktions-Kit Protokoll, wobei die Variante für die Benutzung einer Zentrifuge verwendet wurde.

- Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der Produkte eines Restriktionsverdaues werden die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, wobei die Gelstücke so klein wie möglich gehalten werden sollen. Diese Stücke werden in vorher gewogenen Plastikröhrchen abgewogen.

- Nach Abzug des Röhrchen-Eigengewichtes entsprechen 100 mg Agrosegel 100 µl Volumen (maximal 400mg Gel bzw. 10µg DNA pro QIAquick-Säulchen).

Zu dem Gel wird das Dreifache des Eigenvolumens an Puffer QG (z.B. 300 µl QG bei 100µl Gel) hinzugefügt

- Gel und Puffer QG werden 10 min bei 50°C erhitzt und alle 2-3 min gevortext, bis sich die Agarose komplett aufgelöst hat. Die gelbe Färbung des Puffers zeigt den gewünschten pH von etwa 7,5 an. Sollte dies nicht der Fall sein (orange/violette Farbe), so muß mit 3 M NaAc nachgesäuert werden.

- Daraufhin wird die Lösung mit einem ursprünglichen Gelvolumen (z.B. 100 µl, s.o.) Isopropanol ergänzt und gemischt (nur nötig bei DNA >4 kb oder <500bp).

- Diese Lösung wird nun auf QIAquick-Säulchen gegeben, die zuvor auf 2 ml- Plastikröhrchen gesetzt wurden, und 1 min bei  $>10.000 \times g$  (13.000 Upm) zentrifugiert, wobei die Säulchen mit höchstens 800  $\mu\text{l}$  Lösung pro Zentrifugationsschritt beladen werden können. Bei diesem Schritt bindet die DNA aus der Lösung an das Säulenmaterial.
- Dann wird die Säule 2x mit 750  $\mu\text{l}$  Puffer PE gewaschen (ethanolisch) und jeweils 1 min bei  $>10.000 \times g$  (13.000 Upm) zentrifugiert. Der Durchfluß wird immer verworfen.
- Abschliessend wird nochmals 1 min bei  $>10.000 \times g$  (13.000 Upm) zentrifugiert, um den letzten Rest an ethanolischer Lösung von der Säule zu entfernen (stört bei der Elution).
- Die Säulchen werden zur Elution der DNA auf frische 1,5 ml Plastikröhrchen gesetzt, woraufhin je 50  $\mu\text{l}$  (bzw. 30  $\mu\text{l}$ ) Elutionspuffer EB (= Tris-Cl/H<sub>2</sub>O pH 8,5) zentral auf die Säulenmembran aufgetragen werden. Abermals wird 1 min bei  $>10.000 \times g$  (13.000 Upm) zentrifugiert.

Die erhaltene DNA-Lösung wird bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, nachdem ihre Konzentration bestimmt wurde.

### 3.2 Klonierung von Pex11-1- und Pex11-2-Konstrukten

Soll ein bestimmtes DNA-Fragment, welches ein zu analysierendes Gen trägt, in einen Vektor eingefügt werden, so muß dieser verschiedene Eigenschaften besitzen:

- die Möglichkeit zur Amplifikation des neu rekombinierten (bakteriellen) Plasmids in Bakterien
- die Fähigkeit zur Expression des Gens, z.B. in Säugerzellen mit evt. anschließender (Antibiotika-) Selektion von Klonen, die einen bestimmten Phänotyp aufweisen

Die Insertion des Fragments in den Vektor geschieht mittels einer *multiple cloning site*, d.h. über einen Bereich im Vektor, an dem mehrere Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen konzentriert sind. Vektor und Fragment müssen zueinander passende Schnittstellen besitzen, um eine Ligation zu ermöglichen. Vorzugsweise sollten zwei verschiedene Schnittstellen vorhanden sein, da dies den spezifischen Einbau des Fragments in einer (sense) Richtung festlegt. Manchmal zwingt dies zu mehrstufigen Ligationsstrategien.

Oft ist aber nur eine gemeinsame Schnittstelle auffindbar, was nach erfolgter Ligation einen analytischen Verdau zur Feststellung der Einbaurichtung des Fragments notwendig macht. Auch sollte der Vektor in diesem Fall vor der Ligation dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu vermeiden. Dies geschieht mittels einer alkalischen Phosphatase (SAP), gewonnen aus einer arktischen Garnelenart.

Weiterhin sollten die gewählten Enzyme nicht an weiteren Stellen im Klonierungsvektor oder im Fragment (Insert) schneiden und auch keine Veränderung im Leseraster erzeugen.

Nach Transformation und Selektion eines Plasmid-DNA-Klones in Bakterien-Wirtszellen (*E. coli*) ist das rekombinante Konstrukt unbegrenzt vermehrbar und kann zur Überprüfung analytisch verdaut und sequenziert werden. Dies ist insbesondere deswegen notwendig, weil Bakterien von Zeit zu Zeit spontane Rekombinationen erzeugen, was z.B. zur Inaktivierung eines Terminations-Codons führen kann. War eine Ligation erfolgreich und hat das Konstrukt alle Qualitätskontrollen passiert, kann das rekombinante Plasmid z.B. in Expressionsexperimenten eingesetzt werden.

### 3.2.1 Hergestellte cDNA-Konstrukte

#### 3.2.1.1 Pex11-1-Konstrukte

Das wt-Pex11-1 (ehem. Pmp26, Pex11 $\alpha$ ) stammt aus der Ratte (*Rattus norvegicus*), nur codierende Sequenz.

##### Konstrukte mit GFP-Varianten:

CFP-Pex11-1

Pex11-1-YFP

##### Myc-Konstrukte:

Myc-Pex11-1

Pex11-1-Myc

Myc-(N -74)-Pex11-1

(N -74)-Pex11-1-Myc

Myc-Pex11-1-(C -5)

Pex11-1-(C -5)-Myc

Myc-(N -74)-Pex11-1-(C -5)

(N -74)-Pex11-1-(C -5)-Myc

##### unmarkierte Konstrukte:

Pex11-1 Gesamtprotein

(N -74)-Pex11-1

Pex11-1-(C -5)

(N -74)-Pex11-1-(C -5)

Bei CFP und YFP handelt es sich um Farbvarianten von GFP. Die Insertion in den Vektor (pcDNA3 bzw. pcDNA3.1) erfolgte bei den Myc-Varianten und den unmarkierten Konstrukten über Bam HI (5'-Ende) und Eco RI (3'-Ende). Schnittstellen wurden per PCR in die zu klonierende Sequenz integriert. Genauere Informationen zu den Verkürzungen befinden sich in Kapitel 4.1.

#### 3.2.1.2 Pex11-2-Konstrukte

Pex11-2 (human oder aus der Maus, codierende Sequenz im Labor vorhanden), als konstitutiv aktivem Protein, galt das besondere Interesse, da es bereits als unverändertes Molekül in Säugerzellen und Hefen zu einer deutlichen Proliferation der Peroxisomen führt.

##### (E)GFP-Konstrukte:

GFP-Pex11-2

EGFP-Pex11-2

EGFP-(N -24 )-Pex11-2

EGFP-(N -74 )-Pex11-2

Pex11-2-(N 1-84)

Pex11-2-(N 1-84)-EGFP

##### Myc-Konstrukte:

Myc-Pex11-2

Pex11-2-Myc

Myc-(N -74)-Pex11-2

(N -24)-Pex11-2 -Myc

Myc-Pex11-2-(C- 4)

Pex11-2-(C- 4)- Myc

Myc-(N -74)-Pex11-2-(C -4)

(N -24)- Pex11-2-(C -4)-Myc

unmarkierte Konstrukte:

Pex11-2 Gesamtprotein

(N -24)-Pex11-2

Pex11-2-(C -4)

(N -24)-Pex11-2-(C -4)

Alle (E)GFP-Konstrukte sind humanen Ursprungs, die myc-markierten Varianten wurden mit Pex11-2 aus der Maus (*Mus musculus forma domestica*) erstellt.

Die Insertion in den Vektor (pcDNA3 bzw. pcDNA3.1) erfolgte bei den unmarkierten Konstrukten und den myc-Varianten über Bam HI (5'-Ende) und Eco RI (3'-Ende), bei den EGFP-Konstrukten über Bsp EI und Eco RI.

Das N-terminale Fragment von Pex11-2 ohne Markerprotein wurde über Bam HI und Eco RI in pcDNA3 kloniert. Zur Fusionierung von EGFP an den C-Terminus des Fragments wurde dieses über eine EcoRI-Schnittstelle in den Vektor pEGFP-N2 (Neomycin-Resistenz) umkloniert. Schnittstellen wurden per PCR in die zu klonierende Sequenz integriert. Weitere Informationen zu den cDNA-Konstrukten sind in Kapitel 4.1 zu finden.

### 3.2.2 Praktische Durchführung der Klonierung

#### 3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen einen DNA-Einzelstrang zu einem Doppelstrang ergänzen zu können. Um der Polymerase einen Startbereich für die Synthese zu liefern, werden synthetisch hergestellte Einzelstrang-Oligonukleotide (primer) benötigt, die zu den beiden Enden des gewünschten DNA-Fragmentes komplementär sind (sense- und antisense-primer). Die Amplifikation des somit genau definierten Fragments erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen: *Denaturierung* der DNA, *Hybridisierung* der primer an die entsprechenden Einzelstränge und *Synthese* durch Verlängerung der Hybride zu kompletten Doppelsträngen durch die DNA- Polymerase. Die hierbei verwendete Taq-PWO-Polymerase muß naturgemäß sehr hitzeresistent sein, da sie die Denaturierungsphase unbeschadet überstehen soll. Bei ausreichend vorhandenem Ausgangsmaterial (Nukleotide, primer) erfolgt die Amplifikation durch die Zunahme von kopierbarer DNA exponentiell.

Die PCR wurde in den vorliegenden Experimenten genutzt, um zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und/oder Markerproteinsequenzen (z.B. Myc-Epitop) in eine DNA-Sequenz einzuführen (z.B.: Neue Schnittstelle -- START-Codon -- Pex11-Sequenz -- Myc -- neues STOP-Codon -- neue Schnittstelle).

Dies machte das Umklonieren von DNA-Fragmenten z. T. überhaupt erst möglich bzw. erleichterte im Falle von Myc die Identifikation von erfolgreich transfizierten Zellen.

Als Template dienten Vektoren, die die gewünschten cDNA-Sequenzen (Pex11-1 oder Pex11-2) bereits enthielten (im Labor vorhanden). Die Primer wurden von Eurogentec (Köln) bezogen.

PCR-Protokoll:

Es werden 0,5 ml Plastik-Reaktionsgefäße verwendet, wobei die Einzelkomponenten der Ansätze auf Eis zusammenpipettiert werden.

Die Oligonukleotide, als Lyophilisat geliefert, werden in ddH<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 400 pmol/µl gelöst. Hieraus wird eine 1:20-Stocklösung (20 pmol/µl) für die PCR-Ansätze

hergestellt.

Das Endvolumen der Ansätze beträgt jeweils 100 µl:

Die nicht variierenden Bestandteile wurden für alle Ansätze als Master-Mix angesetzt, auf die Einzelgefäße verteilt und um die variierenden Primer-Lösungen im Reaktionsgefäß ergänzt.

Kompletter Einzelansatz:

10 µl (10x)-Proof complete Buffer (incl MgCl<sub>2</sub>) / PCR-Fertigpuffer  
 2 µl 5'-Primer-Lösung (20 pmol/µl)  
 2 µl 3'-Primer-Lösung (20 pmol/µl)  
 5 µl dNTP-Mix (10 mM Stocklösung)  
 1 µl Template-Lösung (= ca. 100 ng DNA)

-ad 99 µl mit ddH<sub>2</sub>O (optional: 4,5 min auf 95°C erhitzen)

-je 1 µl Taq-PWO-Polymerase (2,5 U/µl) zugeben und Probengefäße in die PCR-Maschine stellen  
 -Programm starten (s.u.), eine Übersichtung mit Mineralöl war in diesem Fall unnötig, da eine Maschine mit beheiztem Deckel benutzt wurde (*PCR-Sprint* von Hybaid).

(10x)-PCR-Fertigpuffer:

100 mM Tris/HCl, pH 8,3  
 500 mM KCl  
 25 mM MgCl<sub>2</sub>

dNTP-Mix:

20 mM pro dNTP

Programmierung der PCR-Maschine (Abfolge der Zyklen):

**0** → 95°C → 5 min (Hochheizen)  
**1** → 95°C → 30 sec (Denaturieren)  
**2** → 55°C → 30 sec (Hybridisieren)  
**3** → 68°C → 2 min (Polymerasereaktion)  
**4** → 68°C → 15 min (Doppelstrang-Synthese)  
**5** → 4°C → ∞

(Schritt **5** ist vor allem für ÜN-PCR-Läufe wichtig)

-Schritt **1-3** werden in 35 Zyklen wiederholt.

-5 µl aus jedem Ansatz werden zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen, der Rest wird bei -20°C aufbewahrt

-Für die Ligation werden die PCR-Produkte dann mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (wie beim Vektor) verdaut (s. Kap. 3.1.5) und über QIAquick-Säulchen gereinigt.

### 3.2.2.2 Vektor-Dephosphorylierung durch SAP

Wie bereits erwähnt, ist beim Klonieren mit nur einer Restriktions-Schnittstelle die Gefahr sehr groß, daß der Vektor mit sich selbst zu einer cDNA religiert, ohne das zu klonierende Fragment zu integrieren. Dies wird durch Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe des Vektors mit SAP (shrimp alkaline phosphatase) unterbunden. Die Insertion des Fragments ist danach jedoch unverändert



über die 3'-Hydroxylgruppe des Vektors möglich.

Beispiel-Ansatz: (70 µl Endvolumen):

40 µl Vektor-DNA-Lösung (10 µg) aus Säulenreinigung nach Verdau

7 µl (10x)-SAP-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>)

20 µl SAP (1U/µl)

3 µl ddH<sub>2</sub>O

Inkubation für 1 h bei 37°C

-Hitzeinaktivierung 20 min bei 65°C (nur falls nicht direkt weiterverwendet)

-Reinigung über QIA-quick-Säulchen (siehe dort).

### 3.2.2.3 Ligationen

Bei Ligationen werden umklontiertes DNA-Fragment und Klonierungsvektor über kovalente Bindungen zu einer einheitlichen cDNA vereint. Die hierfür genutzte T4-DNA-Ligase verknüpft die freie 5'-Phosphatgruppe des Inserts mit der freien 3'-Hydroxylgruppe des Vektors, wobei ATP verbraucht wird.

Standard-Ligationsprotokoll:

Für Fragment und Vektor wird ein Verhältnis von etwa 3:1 angestrebt.

Es werden jeweils 100-200ng Vektor-DNA eingesetzt.

Insert und Vektor sind zueinander passend verdaut.

Ein Kontrollansatz enthält statt Insert-DNA Wasser und zeigt die Anzahl der Vektor-Religanten.

In einem Endvolumen von je 20 µl werden die Einzelansätze bei RT in einem Reaktionsgefäß gemischt:

Vektor-DNA (restriktionsverdaut, bei Bedarf dephosphoryliert)

Fragment-DNA (evt. aus PCR / restriktionsverdaut)

2 µl (10x)-Ligasepuffer

2,5 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl)

14 µl H<sub>2</sub>O

Methodik:

-Puffer, Ligase und 7 µl H<sub>2</sub>O wurden auf Eis vorgelegt.

-Der DNA-Mix mit den restlichen 7 µl H<sub>2</sub>O wurde 10 min bei 72°C erhitzt (denaturiert Tertiärstruktur), kurz bei RT und 13000Upm zentrifugiert und schnell zu dem Ligase-Mix gegeben.

-Nach dem Mischen erfolgt die eigentliche Ligation erst für 30 min bei RT und dann bei 4-15°C für ca. 18h ÜN.

Die Ligationsprodukte werden hiernach in Bakterien transformiert (E. coli /XL1 blue).

### 3.2.2.4 Transformation von DNA in Bakterien

Hierzu werden Transformations-kompetente Zellen benötigt, deren Herstellung an anderer Stelle beschrieben ist (E.coli XL1-blue; siehe Kapitel 3.1.1.2).

- Die bei -80°C aufbewahrten Zellen werden auf Eis soweit aufgetaut, daß der größte Teil der Suspension (100 µl) verflüssigt ist (8-10 min).

- Zu dieser Suspension werden entweder der komplette Ligationsansatz oder die Hälfte davon pipettiert (100-200ng Gesamt-DNA/ neu rekombinierte Plasmid-DNA) oder zu amplifizierende Plasmid-DNA von der größere Mengen benötigt werden zugegeben und vorsichtig von Hand gemischt (nicht gevortext!).
- Diese Mischung verbleibt für 30 min auf Eis.
- Anschließend wird für 90 sec bei 42°C ein Hitzeschock ausgeübt (Porenweitung bei den Bakterien; erleichtert die DNA-Aufnahme).
- Die Lösung wird danach für weitere 2 min auf Eis gehalten.
- Das bereits im Reaktionsgefäß befindliche Flüssigkeitsvolumen wird mit LB-Medium ad 1 ml Endvolumen ergänzt.
- Der Ansatz wird nun bei 37°C im Heizblock inkubiert (mittelstarke Rotation) um die Bakterien zu vermehren. Die Luftzufuhr wird durch perforierte Gefäßdeckel ermöglicht.
- Hierauf wird die Suspension in zwei Aliquots aufgeteilt (200 und 800 µl) und auf Agarplatten (mit geeignetem Selektionsantibiotikum versetzt) ausgebracht. Das 800 µl-Aliquot wird durch Zentrifugation und Entfernung von 600 µl Volumen aus dem Überstand auf 200 µl reduziert (besser ausplattierbar).
- Die Kolonien der erfolgreich transformierten Klone wachsen ÜN (16 h) bei 37°C. Der Vergleich von Kolonienzahl nach Religation im Kontrollansatz zu den eigentlichen Ligationsansätzen zeigt, wieviele Klone potentiell ein Fragment im Vektor integriert haben.
- Die Klone werden am nächsten Tag steril von der Platte gepickt und zum Animpfen von Minipreps benutzt deren DNA analytisch verdaut wird, um den Ligationserfolg zu überprüfen. Die Platten mit den restlichen Klonen werden bei 4°C aufbewahrt.

### 3.3 Zellbiologische Methoden

Die verwendeten Medien D-MEM, D-MEM F12 (Dulbecco et al. 1959) und  $\alpha$ -MEM wurden nach Herstellerangaben angesetzt und wie folgt ergänzt:

- 5% FKS (Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert, v/v) / Aliquots bei -20°C
- 1% Penicillin/Streptomycin (w/v) / (100x)-Stocklösung bei -20°C
- 1% L-Glutamin (w/v) / (100x)-Stocklösung bei -20°C

und des weiteren nur im Falle von D-MEM F12:

- 0,01 µM Insulin (33 µl Stammlösung auf 500 ml Medium) / 400 I.E./10 ml bei 4°C
- 1 µM Dexamethason (5 µl Stammlösung auf 500 ml Medium) / 32,9 mg/ml DMSO bei -20°C
- 1 µM Triiodothyronin (50 µl Stammlösung auf 500 ml Medium) / 6,73 mg/ml in 0,1 M NaOH bei -20°C

Sollen Klone selektioniert werden, so wird das Medium mit dem geeigneten Antibiotikum ergänzt; in den vorliegenden Fällen handelt es sich um G418 (500 µg/ml, gelagert als (100x)-Stocklösung) und Zeocin (100 µg/ml, gelagert als (100x)-Stocklösung)

### 3.3.1 Passagieren und Lagerung von Zellen

Die Kultur von Säugerzellen erfolgt allgemein in 6cm-Plastikpetrischalen mit 5 ml Medium die in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit gehalten werden. Um die Zellen in einem kontinuierlichen Wachstumsprozeß zu halten, werden diese fortwährend abtrypsiniert (von der Unterlage abgedaut) - nachdem eine Platte vollständig mit Zellen bedeckt (d.h. zu 100% konfluent) ist - und verdünnt neu ausgesät. Der Verdünnungsfaktor (1:5 bis 1:30) hängt dabei vom Zelltyp und dessen gegenwärtiger Wachstumsaktivität ab. Das Verdünnen und neu Aussäen wird als Umsetzen bezeichnet, die Zeit des Wachstums dazwischen (ca. 4-7Tage) als Passage. Die Zellen sollten über die 40.-50. Passage hinaus nicht mehr für Experimente genutzt werden und müssen durch eine frisch aufgetaute Charge ersetzt werden.

#### Umsetzen von Zellen:

- Die adhären wachsenden Zellen werden 1-2 mal mit 3 ml PBS-ZK gewaschen, nachdem das alte Medium entfernt wurde, und mit 500 µl Trypsinlösung je 6cm-Schale von der Unterlage abgedaut.
- Das Trypsin wirkt für ca. 5 min ein (teilweise, z.B. bei CHO-Zellen, wird zusätzlich bei 37°C statt bei RT trypsiniert).
- Sobald sich die Zellen zu lösen beginnen, wird auf 5 ml mit Medium ergänzt, die Zellen werden resuspendiert und entsprechend verdünnt neu ausgesät.

#### Zur dauerhaften Lagerung von Zellen werden diese wie folgt eingefroren:

- Nach dem Trypsinieren (s.o.) werden die Zellen in 3-4 ml Medium resuspendiert.
- Danach werden die Zellen 3 min bei 4°C und 1000 Upm in 15 ml-Zentrifugenröhrchen sedimentiert (Heraeus-Zentrifuge).
- Der Überstand wird entfernt und das Zell-Pellet in 1,8 ml FKS oder Medium resuspendiert.
- Die Suspension wird in ein 2,5 ml Kryoröhrchen gegeben, in das zuvor 200 µl DMSO gefüllt wurden.
- In Isolierfolie gewickelt und/oder in einer Styropor-Box verpackt wird die Suspension bei -80°C langsam eingefroren.
- Nach 1-3 Tagen erfolgt die endgültige Lagerung in flüssigem N<sub>2</sub>.

#### Auftauen von Zellen / Beginn einer neuen Kultur:

- Die Zellen werden aus dem N<sub>2</sub> geholt und möglichst rasch bei 37°C aufgetaut.
- Wenn nur noch ein kleiner Rest Eis in der Suspension vorhanden ist, wird sofort in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, in dem 10 ml Medium vorgelegt wurden, um das toxische DMSO aus der Suspension zu entfernen.
- Anschließend werden die Zellen 3 min bei 4°C und 1000 Upm sedimentiert (Heraeus-Zentrifuge).
- Der Überstand wird verworfen und das Zell-Pellet in 5 ml Medium resuspendiert neu ausgesät.

#### **Verwendete Lösungen in der Zellkultur:**

PBS-ZK (PBS für Zellkultur): ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, isotone Lösung

0,8% NaCl

0,02% KCl

0,115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Trypsinlösung:

0,05% Na<sub>2</sub>-EDTA

0,125% Trypsin

in (2,5x)-PBS-ZK

### 3.3.2 Transfektion und Markierung von Zellen

Bei der Transfektion von eukaryotischen Zellen wird eine (rekombinante) Plasmid-DNA in eine Zelle mittels verschiedener Techniken eingeschleust, um dort exprimiert zu werden. Dies kann mit zwei Zielsetzungen erfolgen:

Erstens kann diese Transfektion transient erfolgen, d.h. man betrachtet den erzeugten Phänotyp innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes (wenige Stunden bis Tage) und verwirft diese Zellen dann. Zweitens können Zellen stabil transfiziert werden, wobei die exogene DNA in das Genom der Zelle stabil integriert/rekombiniert wird. Die mittels Antibiotikaselektion erzeugten Klone exprimieren das integrierte Plasmid stabil über einen langen Zeitraum und ermöglichen z.B. auch sequentielle Mehrfachtransfektionen. Zur Expression in Säugerzellen wurden Varianten des pcDNA3-Vektors mit verschiedenen Antibiotikaresistenzen bzw. Vektoren mit Farbvarianten von GFP genutzt.

#### 3.3.2.1 Lipofektion von Zellen

Die Lipofektion repräsentiert eine der Transfektionstechniken mittels Komplexbildung der Plasmid-DNA mit amphiphilen Lipiden (DOTAP, Effectene, Fugene 6, Lipofectamin 2000, Superfect, etc. ...). In den vorliegenden Experimenten hat sich Effectene von QIAGEN als besonders effizient erwiesen. Der Komplex verbindet sich mit den Phospholipiden der Zellmembran und sorgt so für einen Import der komplexierten DNA in das Cytoplasma.

Im Falle von transienten Transfektionen wird zirkuläre DNA verwendet. Bei stabilen Transfektionen erleichtert zuvor linearisierte DNA die Integration in das Zellgenom, ist aber nicht unerlässlich. Zur Linearisierung wurde mit Bgl II ein Restriktionsverdau durchgeführt, wodurch das Plasmid kurz vor den einklonierten Fragmenten geöffnet wird.

Das Standardprotokoll wurde im wesentlichen nach Herstellerangaben (QIAGEN) durchgeführt:

- Verwendet werden 50-80% konfluente 6cm-Zellkulturschalen – je nach Zelllinie.
  - 2 µg Plasmid-DNA werden mit EC-Puffer ad 150 µl Volumen ergänzt und gemischt.
  - Hierzu werden 16 µl Enhancer-Lösung gegeben und gemischt.
  - Die Mischung wird 5 min bei RT inkubiert.
  - Dann werden 25 µl Effectene hinzugegeben und wieder gemischt.
  - Während der nun folgenden 10 min Inkubation bei RT bilden sich die DNA-Effectene-Komplexe.
  - Zu dieser Lösung wird 1 ml geeignetes Zellkultur-Medium pipettiert und gemischt.
  - Die DNA-Komplexe werden nun zu den Zellen gegeben, die zuvor einmal mit PBS-ZK gewaschen und anschließend mit 4 ml Medium überschichtet wurden. Durch rotierende Bewegungen wird das Medium mit der DNA-Lösung vermischt.
  - Die Zellen werden nun mit dieser Lösung für 3 - 3,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die DNA wird nun ins Cytoplasma und später in den Kern importiert.
  - Abschließend wird 1x mit PBS-ZK gewaschen und frisches Medium hinzugegeben. Nur im Falle stabiler Transfektionen wird das zur Kultur benutzte Medium mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum ergänzt, um resistente Klone zu erhalten.
- Die Zellkulturschalen für transiente Transfektionen wurden vor der Aussaat der Zellen mit runden Deckgläsern bestückt, auf denen die transfizierten Zellen dann zur Analyse per Immunfluoreszenz entnommen werden können.
  - Die Selektion von stabilen Klonen, die das transfizierte DNA-Konstrukt ständig exprimieren, wird sofort nach der Transfektion begonnen. Hierzu dient das Resistenzgen auf dem Klonierungsvektor (Neomycin/Zeocin). Nach ca. 1-2 Tagen beginnt die Absterbephase, während der Zellen, die nicht

transfiziert wurden oder die durch zu starke Überexpression der Plasmid-DNA geschädigt sind, eingehen. Während dieser Zeit wird das Selektionsmedium alle 1-2 Tage ersetzt. Nach ca. 2 Wochen werden Kolonien von Klonen sichtbar, die vorsichtig antrypsiniert, von der Platte gepickt, vereinzelt und weiterkultiviert werden.

### 3.3.2.2 Mikroinjektion von Säugerzellen

Zur gezielten Transfektion von Einzelzellen mit einem DNA-Konstrukt wurde die Methodik der Mikroinjektion nach Ansorge und Pepperkok (1988) verwendet, wobei stets zu beachten ist, daß diese Methode gewisse Schwankungen bei der Reproduktion beinhaltet. Dies ergibt sich aus natürlichen und physikalischen Variationen bei unterschiedlichen Experimenten (Zellgröße, injiziertes Flüssigkeitsvolumen im Zusammenhang mit Pipettendruck und Viskosität, u.ä.). Diese Parameter bewegen sich jedoch in einem Rahmen, der eine objektive Reproduzierbarkeit z.B. von einheitlichen Phänotypen innerhalb eines Expressionsexperimentes für ein bestimmtes Plasmid-Konstrukt zuläßt. Expressionsvektoren wurden nur von hochreinen Chargen verwendet (Midi-/Maxiprep) und zur Entfernung von unerwünschten Partikeln, die die Injektionskanülen verstopfen würden, kurz vor der Verwendung für 10 min bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Allgemeinen wurde eine DNA-Konzentration von 10 µg/ml in PBS aus der Zellkultur (autoklaviert) verwendet. Diese Konzentration wurde in Vorversuchen als optimal ermittelt, da sie eine hohe Expression des Vektors (über einen im Vektor enthaltenen CMV-Promotor gesteuert) aber noch keine wahrnehmbare Schädigung der Zelle zur Folge hat - welches bei einer Konzentration von 100 µg/ml durchaus oft der Fall war. Eine gute Möglichkeit zur Überprüfung der Expression eines bestimmten Konstruktes ist die Verwendung verschiedener Marker (tags), wie z.B. das *myc*-Epitop oder GFP (green fluorescent protein) mittels indirekter Immunfluoreszenz, oder im Fall von GFP direkt – auch anhand der lebenden Zellen - im Fluoreszenz-Mikroskop. Gängige „Modellorganismen“ waren hierbei CHO-Zellen und AT3-Zellen.

### 3.3.2.3 Butyratstimulation von schwach exprimierenden Zellklonen

Nach ca. 10-20 Passagen wird es notwendig, die Expression der rekombinanten Plasmid-DNA im Zellgenom zu stimulieren, da diese naturgemäß im Laufe der Zeit stark abnimmt. Dies geschieht via dem im Vektor enthaltenen CMV-Promotor, der für die konstitutive Expression des klonierten Gens verantwortlich ist.

Hierzu werden die Zellen für 24-48 h mit 5 mM Natriumbutyrat im Medium stimuliert. Die so stimulierten Zellen werden z.B. zur Immunfluoreszenz weiterverwendet.

#### Natriumbutyrat-Stocklösung:

500 mM Na-Butyrat gelöst in ddH<sub>2</sub>O  
sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

### 3.3.2.4 Markieren von Lysosomen mit Lyso-Tracker

Hierzu werden mit Zellen bewachsene 12 mm- Deckgläser in 3,5 cm - Petrischalen transferiert. Der LysoTracker (DND 99 von Molecular Probes) wird in DMSO als 1 mM Stammlösung angesetzt. Die Enkonzentration im Medium während der Inkubation mit den Zellen (30-40 min bei 37°C im Brutschrank) ist 100-200 nM.

Danach wird 3x mit PBS aus der Zellkultur gewaschen und die Probe für weitere 10 min in PBS inkubiert (bei RT und im Dunkeln). Danach können die Zellen PFA- oder Digitonin-fixiert und der Immunfluoreszenz zur Anfärbung weiterer Zellstrukturen zugeführt werden.

### 3.3.2.5 Markieren von Mitochondrien mit Mito-Tracker

Es wird prinzipiell wie beim Lyso-Tracker verfahren, nur daß die DMSO-Stammlösung des Mito-Trackers (M-7513 von Molecular Probes) in einer Konzentration von 500 mM vorliegt.

### 3.3.2.6 Luciferasetest

Im Luciferasetest sollte die Herkunft bzw. Entstehungsweise von peroxisomalen Clustern in stabil transfizierten Zellen geklärt werden.

#### 3.3.2.6.1 Markieren von Luciferase mit TRNHS

Um die Luciferase nach dem Import in die Peroxisomen der mikroinjizierten Zellen eindeutig identifizieren zu können, wird diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRNHS (rot) gekoppelt.

##### -Gießen der Säule:

- Hierzu wird mit Sephadex G-50 fine (Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg) – vorgequollen in Wasser, inkl. 0,02%  $\text{NaN}_3$  zur Konservierung - in einer Pasteurpipette (vertikal montiert in einen Ständer) eine Säule gegossen. Die Spitze der Pipette wird hierzu mit etwas Glaswolle abgedichtet, um Lösungen durchzulassen, das Granulat jedoch zurückzuhalten. Die Pipette wird bis kurz vor der oberen Verengung befüllt.
- Um das Zellgift  $\text{NaN}_3$  auszuwaschen und das Säulenmaterial zu equilibrieren, werden mehrere Volumina entgaster Mikroinjektionspuffer (15 min Ultraschall) auf die Säule gegeben.

##### -Ansetzen des Fluoreszenzfarbstoffes in wasserfreiem DMSO:

- Dies geschieht unmittelbar vor Zugabe zur Luciferase in dunklen Glasröhrchen.
- Angesetzt wird TRNHS (5(6)-Carboxytetramethylrhodamin N-hydroxysuccinimidester) in einer Konzentration von 1,72 mg/ml wasserfreiem DMSO (Sigma / Kat.Nr. C 4759; MW= 528,5).

##### -Markieren der Luciferase:

- 200  $\mu\text{g}$  Luciferase werden in ein eiskaltes Glasröhrchen eingewogen.
- Es werden 50  $\mu\text{l}$  eiskalter Mikroinjektionspuffer zugegeben und danach nicht geschüttelt, um Luftblasen zu vermeiden.
- Die Mischung wird zum Lösen des Proteins 10 min auf Eis inkubiert.
- Danach werden 3  $\mu\text{l}$  der TRNHS-Lösung hinzugefügt.
- Dieses Gemisch wird für 20 min bei RT inkubiert (TRNHS-Kopplung an die Luciferase).

##### -Trennung der markierten Luciferase vom überschüssigen freien Farbstoff:

- Kurz vorher läßt man die Sephadex-Säule leer laufen, um unmittelbar darauf die Lösung aus dem Markierungsansatz aufzutragen. Hierauf wird – nach dem Einziehen der Lösung - vorsichtig mit Mikroinjektionspuffer überschichtet.
- 150-200  $\mu\text{l}$  der 1. Farbfront / Peakfraktion werden in einem dunklen Glasröhrchen aufgefangen, wobei die Konzentration der Farbstoff-gekoppelten Luciferase etwa 2 mg/ml beträgt.

Direkt nach der Separation der gekoppelten Luciferase wird diese in die zu untersuchenden Zellen injiziert (Zeit bis zur Injektion, beginnend mit dem Lösen der Luciferase,  $t < 60$  min). Nach der Injektion der Luciferaselösung wird sofort das Medium gegen frisches ausgetauscht und die Zellen in den Brutschrank verbracht (Import der Luciferase in die Peroxisomen ÜN).

Verwendeter Puffer:*Mikroinjektionspuffer:*14 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O48 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x3H<sub>2</sub>O4,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**3.3.2.6.2 Luciferaseimport und deren Nutzung als „Herkunftsnachweis“**

Nachdem die Luciferase ÜN in die Peroxisomen der injizierten Zellen importiert wurde ( die markierten Organellen sind nun mit dem TRITC-Filter sichtbar, was anhand der lebenden Zellen zu überprüfen ist) folgt der 2.Schritt dieser Methode.

In diesem Ansatz wurden Zellen benutzt, die stabil das N-terminal GFP-markierte humane Pex11-2 exprimieren. Da es sich hier um Zellen einer höheren Passage handelte, waren granuläre Peroxisomen mit GFP-Markierung vorhanden, jedoch keine peroxisomalen Cluster. Nachdem die Peroxisomen einiger Zellen mit TRNHS-Luciferase markiert worden waren, wurden die Zellen mit 5 mM Butyrat ÜN stimuliert, woraufhin die Expression der rekombinanten DNA wieder ansteigt und die zuvor beobachteten peroxisomalen Cluster wieder auftauchen. Diese beinhalten in den entsprechenden Zellen nun auch TRNHS-Luciferase aus den vorher markierten Einzel-Peroxisomen. Dieses Experiment diente als Vortest zu den Kinetiken mit Nocodazol bzw. Cytochalasin B.

Zur bildlichen Darstellung des Clustering wurden die Inhibitor-Experimente (s. Kapitel 4.4.3.2) mit Verlaufs-Kinetiken der Clusterbildung gewählt.

**3.3.2.7 Farbstoffkopplung an BSA**

Ansetzen der Farbstofflösung (z.B. Fluos) nach Herstellerangaben. Kopplung mit 3 mg/ml BSA-Lösung in 50 mM Na-Borat, 1h bei RT. 500 µl wie unter Kap. 3.3.2.6.1 beschrieben auftrennen.

**3.3.3 Immunfluoreszenz**

Mit dieser Methode werden subzelluläre Strukturen durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper mittels spezifischer Antigene detektiert. In diesem Falle geschieht dies auf indirektem Wege in zwei Schritten, da die Antigene erst mit spezifischen Erstantikörpern (erzeugt in bestimmten Spezies) markiert werden und diese Antikörper wiederum mit Spezies-spezifischen und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern detektiert werden. Da hierbei die Antigene von mehreren Erstantikörpern markiert werden, die wiederum mehrfach von Zweitantikörpern erkannt werden, kommt es zu einer Potenzierung des Signaleffektes. Zum Teil werden die Strukturen auch direkt von „Zweitantikörpern“ detektiert, z.B. FITC-Phalloidin an das Aktinskelett, wobei der Verstärkungseffekt allerdings ausbleibt.

Standard-Immunfluoreszenz-Protokoll:

Es werden mit Zellen bewachsene 13mm-Deckgläschen verwendet, die zum Prozessieren durch die verschiedenen Schritte der Prozedur in kleinen Plexiglasgestellen vertikal stehend aufbewahrt werden, wobei je Gestell 7 Deckgläschen aufgenommen werden können, die dadurch gleichzeitig prozessiert werden können. Die verschiedenen Inkubationen mit den Gestellen finden in Costar-6fach-Schalen (mit 6 Vertiefungen) statt.

- Nach Entnahme der Deckgläschen aus dem Medium werden diese kurz in PBS-ZK gewaschen und anschließend über den Deckglasrand auf Zellstoff abgetupft, wobei die Zellen natürlich nicht berührt und dadurch beschädigt werden dürfen.
- Die Fixierung erfolgt für 20 min in 3% Paraformaldehyd und 1% Pikrinsäure in PBS-IF.

- Die Permeabilisierung geschieht für 5 min in 1% Triton X-100 oder für 10 min in 25 µg/ml Digitonin in PBS-IF (dieses wird zuvor frisch als 10 µg /ml Stocklösung in DMSO angesetzt).
- Danach wird 2x für 10 min in PBS-IF gewaschen.
- Erstantikörper-Inkubation: die Antiseren werden geeignet verdünnt in PBS-IF (incl. 0,5% BSA) angesetzt, wobei 38 µl Verdünnung je Deckglas verwendet werden. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 40 min oder bei 4°C ÜN in einer feuchten Kammer.
- Für Doppelimmunfluoreszenzen , bei denen zwei verschiedene Antigene gleichzeitig detektiert werden, wird eine Mischung beider Erstantikörper und danach der Zweitantikörper appliziert. Hierbei sind in verschiedenen Spezies erzeugte Antiseren, die zudem nicht miteinander kreuzreagieren, zu verwenden.
- Danach wird 2x für 10 min in PBS-IF gewaschen.
- Zweitantikörper-Inkubation (FITC- oder TRITC-markiert): die Antikörper werden 1:80 bis 1:100 wie gehabt verdünnt und je Deckglas 38 µl Verdünnung verwendet. Abermals wird für diesmal 35 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Bei diesem Schritt muß die Verwendung der richtigen Spezies-Spezifität und (bei Doppelinkubationen sich unterscheidenden) Fluoreszenzfarbe(n) der Zweitantikörper beachtet werden.
- Hiernach wird 2x für 10 min in PBS-IF gewaschen.
- Um Salzkristalle zu vermeiden werden die Proben kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült.
- Abschließend werden die Deckgläser mit je 6 µl Mowiol-Lösung luftblasenfrei eingebettet, wozu das Mowiol auf einen Objektträger pipettiert wird auf den dann das Deckglas vorsichtig aufgelegt wird. Es ist darauf zu achten, daß die mit Zellen bewachsene Seite zum Objektträger weist. Die Aushärtung des Mowiols dauert bei 4°C 30 min bis ÜN, je nachdem wie trocken die Deckgläser vor dem Einbetten waren (ein Minimum an Feuchtigkeit wird zum Aushärten jedoch benötigt!). Diese Einbettung sichert die Zellen mechanisch, schützt den Fluoreszenzfarbstoff und erhöht den optischen Kontrast.

Die Dokumentation erfolgte meist am selben oder spätestens am 2 Tag nach der Immunfluoreszenz mit einer digitalen Kamera, da die Präparate zunehmend ausbleichen. Gelagert werden die Proben bei 4°C und im Dunkeln. Zur Betrachtung wurde ein Zeiss Axiovert 35 Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampf-Lampe und dazugehörigen FITC- bzw. TRITC-Filtern und digitaler gekühlter CCD-Kamera (Axiovision Software) benutzt.

#### Verwendete Lösungen in der Immunfluoreszenz:

##### *PBS-ZK:*

siehe Kapitel zur Zellkultur

##### *PBS für die Immunfluoreszenz (PBS-IF):*

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

150 mM NaCl

2,5 mM KCl

pH 7,4 (Vorrat als 5x-Lösung angesetzt)

##### *Paraformaldehyd-Stocklösung:*

9% Paraformaldehyd in PBS-IF

##### *Pikrinsäure (2,3,4-Trinitrophenol)-Stocklösung:*

gesättigte Lösung mit Festphase

##### *Mowiol-Lösung:*

Mischung aus Mowiol und Paraphenyldiamin (10:1)

Mowiol: 6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol, 6 ml ddH<sub>2</sub>O, 12 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5

Paraphenyldiamin: 10 mg/ml in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,8 (frisch angesetzt)



## 3.4 Biochemische Methoden

Um die Produkte der chemischen Quervernetzung (Kap. 3.4.6) und der *in vitro*-Translation (Kap. 3.4.4.2) zu analysieren, wurden biochemische Techniken verwendet. Die Isolation von peroxisomalen Proteinen aus Rattenleber diente zur Gewinnung von Vergleichsproben im SDS-Gel.

### 3.4.1 Einkonzentrieren und Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Gelöste Proteine aus den Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation oder anderen zu stark verdünnte Proteinpräparate wurden durch folgende Methoden angereichert :

#### 3.4.1.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Fällung der Proteine werden die jeweiligen Lösungen mit 0.1 Volumenanteilen TCA (konz.) versetzt. Die Präzipitation erfolgt 10 min auf Eis in einer Endkonzentration von 10 % TCA. Danach wird 20 min bei 13000 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und einmal mit 500 µl Wasser je Probe (durch vorsichtiges Schwenken der Reaktionsgefäße) gewaschen. Dann wird nochmals 5 min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand abermals abgesaugt. Hierdurch wird störende TCA entfernt, die bei späterem Erhitzen der Proben sonst eine Hydrolyse der Proteine verursachen würde. Hierauf werden die Proben-Pellets per Vortexer in je 30 µl SDS – Probenpuffer gelöst. Verfärbt sich der pH - Indikator im Puffer gelb, so wird die Lösung mit 1 M Tris -Lösung (ca. 1 µl) neutralisiert, bis die Blaufärbung des Puffers stabil bleibt. Bei Bedarf wird über längere Zeit (30 min bis mehrere Stunden) bei 37°C vor-solubilisiert. Daraufhin werden die Proteine 5 min bei 95°C denaturiert und nach Abkühlen der Lösung entweder gleich auf Gele aufgetragen oder erst bei -20°C gelagert, nochmals 5min bei 95°C gekocht und dann aufgetragen.

#### 3.4.1.2 Carbonatextraktion von Membranen

Organell-Membranen sind mit einer Lösung von 100 mM Natriumcarbonat extrahierbar (Fujiki et al., 1982). Im carbonatresistenten Sediment nach der Extraktion verbleiben die integralen Membranproteine und werden somit von Matrixproteinen und peripheren Proteinen separiert. In den vorliegenden Experimenten wurde Wert auf die Identifizierung als integrales (peroxisomales) Membranprotein gelegt.

#### Verwendetes Standardprotokoll:

- Ein Aliquot einer Nycodenzfraktion (enthält nicht mehr als 1 mg Protein) muß erst vom Nycodenzanteil befreit werden, wozu es mit 4-5 Volumina ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 20 min in einem stabilen Polyallomer-Röhrchen (Beckmann) bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert wird (Optima TLX, Beckmann; Rotor TLA 45) oder 10 min bei 17.000 x g (Biofuge 17 RS, Heraeus) in normalen Eppendorf-Röhrchen.
- Das Organell-Sediment wird in 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (100 mM) mit einem Pistill resuspendiert und dann für 10 min in einem Eisbad mit Ultraschall behandelt.
- Anschließend werden die Proben für weitere 20 min auf Eis geschüttelt.

- Danach wird für 1 h bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert (Optima TLX, s.o.), wobei die Matrixproteine und periphere Proteine im Überstand verbleiben.
- Die Pellets (Membranen mit integralen Proteinen) werden vorsichtig mit je 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um restliches Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zu entfernen.
- Nach dem Entfernen des Wassers wird das Pellet in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer erst mehrere min bis h bei 37°C und schließlich für 5 min bei 95°C solubilisiert (siehe SDS-PAGE).
- Diese extrahierten Proben können nun in der SDS-PAGE weiterverwendet werden.

### 3.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über eine Farbreaktion, die optisch im Photometer vermessen wird. Hierzu wird mit der modifizierten Methode nach Lowry (1951) gearbeitet, da diese Methode erheblich unempfindlicher gegen SDS-Anteile in der Probenlösung (aufgrund der Arbeit mit schlecht löslichen Membranproteinen unabdingbar) ist, als z.B. die Methode nach Bradford (M. Bradford, 1976). Im Zusammenspiel mit Proteinen in der eingesetzten Probenlösung bildet das Kupfersulfat mit der Phenolreagenz (ursprünglich gelb) einen blauen Farbstoffkomplex der bei einer spezifischen Wellenlänge (620 nm) absorbiert. Durch diese Messung läßt sich anhand einer vorher mit BSA-Lösung erstellten Eichkurve (2x 0/blank > 2,5 µg > 5 µg > 10 µg > 15 µg > 20 µg > 25 µg > 30 µg BSA pro 1 ml) die Proteinkonzentration in den Proben bestimmen.

-Die Proben werden zuvor grundsätzlich TCA-präzipitiert:

- Hierzu wird die Probe in z.B. 100 µl Endvolumen mit TCA (Trichloressigsäure, 10% Endkonzentration) und DOC (Deoxycholat, 0,01% Endkonzentration) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert; anschließend wird 20 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

-Lowry-Standardprotokoll:

- Das Sediment wird im vorliegenden Fall mit 225 µl Lowry A (inklusive 0.2% SDS zum besseren Solubilisieren von Membranproteinen) gemischt und 10 min bei 50°C im rotierenden Heizblock inkubiert.
- In einem zweiten Heizblock werden die Proben auf RT gekühlt (ca. 8 min).
- Dann werden je Probe 25 µl Lowry B zugesetzt, gemischt und 15 min bei RT im rotierenden Heizblock inkubiert.
- Schließlich werden je Probe 750 µl Lowry C (1:10 aus Fertiglösung) hinzugefügt, gemischt und abermals 10 min bei 50°C im rotierenden Heizblock inkubiert.
- Wieder werden die Proben auf RT gekühlt (ca. 8 min, s.o.).
- Die Proben können nun zu je 200 µl in Elisaplatten (96-Loch-Mikrotiterplatten) gelesen werden (Anthos-ELISA-Reader, Messung gegen die Nullwerte der Eichkurve) oder in Küvetten zu 1 ml im Photometer vermessen werden (OD bei 620 nm / Referenz 405 nm)

Verwendete Lösungen:

*Lowry A:*

2 mg/ml Na<sub>2</sub>-tartrat

0,1 g/ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

z.B. in 50 ml 1 N NaOH lösen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen.

*Lowry B:*20 mg/ml Na<sub>2</sub>-tartrat10 mg/ml CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>Oz.B. in 90 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und mit 10 ml 1 N NaOH auffüllen.*Lowry C:*

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (als Fertiglösung von Merck bezogen)

wird kurz vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

**3.4.2 SDS-PAGE und Proteindetektion****3.4.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Methodik der SDS-PAGE erlaubt es, Proteine im elektrischen Feld, aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte und sterischen Orientierung, in einer Polyacrylamid-Matrix (dikontinuierliches Gelsystem) zu trennen (Laemmli, 1970). Eine homogene Ladungsverteilung wird durch das eingesetzte SDS erreicht, das sich an die Proteinmoleküle anlagert, sie denaturiert und die Eigenladung des jeweiligen Proteins überlagert. Die Größe bestimmt somit die Ladungsstärke. Die zu analysierenden Proteinpräparate wurden in SDS-Probenpuffer solubilisiert, 5min bei 95°C erhitzt und dann entweder erst bei -20°C gelagert und vor Verwendung nochmals für 5min bei 95°C erhitzt, oder sofort in die Probenaschen des Sammelgels aufgetragen. Hierbei war darauf zu achten, daß die Proben einen neutralen pH (Blaufärbung) aufweisen; sonst wird mit konzentrierter Tris-Lösung neutralisiert, damit beim folgenden Erhitzen keine saure Hydrolyse stattfindet. Außerdem sollen vergleichbare Proteinmengen in den einzelnen Spuren aufgetragen wurden. Es wurden durchweg Minigele mit einer Dicke von 0,7 mm verwendet (BIO-RAD-Minigelapparatur). Die Gesamt-Acrylamidkonzentration (Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid) im Trenngel variierte, je nach Proteinpräparat, lag aber meist bei 10-12%, um für die untersuchten Proteine (ca. 26-52 kD) eine gute Auftrennung zu erreichen. Die Elektrophorese selbst erfolgte bei ca. 15V/cm (entsprechend 20 mA pro Minigel) in einer Elektrophoreseapparatur für Minigele von BIO-RAD.

Verwendete Lösungen:*-(4x)-Trenngelpuffer:*

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

0,4% SDS

*-Trenngel-Acrylamidstocklösung:*

30% Acrylamid

2,7% Bisacrylamid

*-(4x)-Sammelgelpuffer:*

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

0,4% SDS

*-Sammelgel-Acrylamidstocklösung:*

4% Acrylamid

15% Bisacrylamid

Die Polymerisation wird durch Zugabe von 0,1% TEMED und 1% Vol. einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung gestartet woraufhin die Lösungen sofort in die

Gießvorrichtung für Minigele zum Auspolymerisieren gegossen werden.  
Zuerst wird das Trenngel gegossen (überschichtet mit ddH<sub>2</sub>O, um eine ebene Oberfläche zu erhalten) und anschließend das Sammelgel, bei dem vor dem Erhärten ein Kamm zum Freihalten der Probenaschen eingesetzt wird.

-(10x)-Elektrophorese-Laufpuffer:

1% SDS  
250 mM Tris-Base  
1,9 M Glycin

-(4x)-SDS-Probenpuffer :

10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA  
10% Glycerin  
4% SDS  
10% β-Mercaptoethanol  
0,016 % (w/v) Bromphenolblau (Lagerung bei -20°C)

Alle übrigen Lösungen werden bei RT gelagert.

Die Länge der Trennstrecke wurde oft nicht voll - oft nur zu ca. 90 % - ausgenutzt, um ein Auslaufen kleiner Proteinmoleküle zu verhindern, d.h. die Bromphenolblau-Front verblieb im Gel.  
(Mitaufgetrennte Molekulargewichtsstandards: s.s.o.)

Nach der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet oder für den Western Blot verwendet.

### 3.4.2.2 Autoradiographie:

Zur Detektion radioaktiver Proteine werden getrocknete Gele einem Kodak X-Omat/AR-Film bei Raumtemperatur exponiert (meist ÜN oder mehrere Tage). Die Entwicklung der Röntgenfilme wird mit einer automatischen Entwicklermaschine durchgeführt.

### 3.4.2.3 Coomassie -Blau-Färbung

	<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
Coomassie Blau R-250	0,125 % (w/v)	-----
Methanol	50 % (v/v)	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)	10 % (v/v)

Nach der SDS-PAGE werden die Gele in der Färbelösung 60 min bis maximal 18 h gefärbt und fixiert. Danach werden sie ca. 2 h entfärbt, bis Proteinbanden klar differenzierbar sind. Dann werden die Gele bei 70°C für 1,5-2 h unter Vakuum auf 3mm-Whatman-Papier getrocknet. Diese Art der Färbung wurde verwendet, wenn das Gel nicht für einen Western Blot verwendet wurde.

### 3.4.2.4 Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung sind auch noch kleinste Mengen (bis 10 ng pro Bande) an Protein nachweisbar, z.B. wenn nach einem Western Blot die im Gel verbliebene Restmenge an Proteinen im Gel analysiert werden soll.

#### Verwendetes Standardprotokoll zur Silberfärbung:

- Hierzu wird das Gel 1 Stunde fixiert (30% Ethanol, 10% Essigsäure) und anschließend 2x für 15 min in 10% Ethanol bei leichtem Schwenken gewaschen.
- Nach 1 min Inkubation in Natriumthiosulfat-Lösung wird das Gel (für ca. 20 sec) mit ddH<sub>2</sub>O kurz gespült.
- Dann wird das Gel 15 min in einer Silbernitrat-Lösung geschwenkt.
- Nach abermaligem kurzem Spülen mit Wasser wird das Gel in Natriumcarbonat-Lösung entwickelt.
- Dieser Entwicklungsprozeß wird durch Zugabe von 7%iger Essigsäure gestoppt.
- Das Gel wird nochmals 10 min in Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

#### Verwendete Lösungen:

##### *Natriumthiosulfat-Lösung:*

10 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
ad 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O

##### *Silbernitrat-Lösung:*

100 mg AgNO<sub>3</sub>  
50 µl Formalin  
ad 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O

##### *Natriumcarbonat-Lösung:*

8 g NaCO<sub>3</sub> x 10 H<sub>2</sub>O  
25 µl Formalin  
1 ml Natriumthiosulfat-Lösung

### 3.4.3 Transfer und Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen („Western Blotting“)

Nach der SDS-PAGE wurden die separierten Proteinbanden aus dem Gel in einer Elektroblobt - Apparatur im Naßverfahren auf eine PVDF-Membran quantitativ transferiert. Zu diesem Zweck wird die Membran zunächst in Methanol benetzbar gemacht und anschließend in Boratpuffer equilibriert. Die so vorbehandelte Membran wird auf eine Lage in Boratpuffer getränktes Filterpapier (Whatman) gelegt. Auf die Membran kommt das SDS-Gel und hierauf eine weitere Lage Filterpapier. Bei der Schichtung diese Stapels ist darauf zu achten, daß keine Luftblasen enthalten sind, da an diesen Stellen kein Proteintransfer stattfinden könnte. Um dies sicherzustellen wurde der Stapel kurz vor dem Einlegen in die Blotapparatur mit einer Glaspipette vorsichtig ausgerollt. Der Transfer erfolgt in der Naß-Blotkammer (Bio-Rad Laboratories) unter Eiskühlung bei 1 mA/cm<sup>2</sup> (200mA) für 3-4 Stunden. Bevor der Blot weiteren analytischen Verfahren unterzogen wird, trennt man die Spur die den Laborstandard enthält mit einem Skalpell ab und färbt die Markerproteine ca. 5 min mit einer Amidoschwarz-Lösung. Amidoschwarz-Entfärbelösung entfernt überschüssigen, unspezifisch angelagerten Farbstoff in einem anschließenden Schritt. Dieser Streifen dient später zur Abschätzung der Molekulargewichte der Banden auf dem Blot. Die Blot-Membran wird nach dem Abtrennen des Proteinmarker-Streifens direkt in eine Schale mit Blockierungspuffer (Blot-PBS mit 5% (w/v) Milchpulver) überführt, um nicht von Proteinen besetzte

Stellen auf der PVDF-Membran abzudecken. Die Inkubation wurde bei RT für mindestens 1 h (meist jedoch über Nacht bei 4°C) auf dem Schütteltisch durchgeführt. (Die geblotteten Gele werden z.T. mit Coomassie Blau gefärbt, um verbleibende Proteine nachzuweisen.)

Anschliessend wird die Membran kurz mit Blot-PBS vorgespült und dann 2x für 10 min in PBS-TNS gewaschen (auf dem Schüttler).

Der Erstantikörper wird geeignet verdünnt in PBS-TNS (incl. 10% Vol. des Blockierungspuffers) zusammen mit der Membran für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Nach kurzem Vorspülen mit PBS-TNS wird 2x für 30 min mit PBS-TNS gewaschen.

Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, geeignet verdünnt in PBS-TNS (incl. 10% Vol. des Blockierungspuffers), erfolgt hierauf für 1 h bei RT auf dem Schüttler.

Hierauf folgt ein kurzes Vorspülen mit PBS-TNS und anschliessendes Waschen (2x für 30 min mit PBS-TNS).

Die Detektion der Banden erfolgt schließlich über die Chemolumineszenz eines Substrates, welches durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase freigesetzt wird (Thorpe und Kricka, 1986).

Hierzu dient das *enhanced chemoluminescence*-System (ECL):

Die zuvor in Blot-PBS gelagerte Membran wird feucht auf eine glatte Plastikunterlage gelegt und mit ca. 600 µl ECL-Lösung (1:1 Gemisch aus zwei Fertiglösungen; Amersham Buchler, Braunschweig) je Blot-Membran beträufelt. Hierüber wird luftblasenfrei eine Plastikfolie gelegt, um den anschliessend aufgelegten Röntgenfilm (Kodak X-omat XAR5) zu schützen. Die Expositionszeiten variieren dabei je nach Stärke des Signals.

#### Verdünnungen der Antikörper:

Die Antikörper wurden in PBS-TNS verdünnt auf die Membranen gegeben :

**1. Antikörper** rabbit-anti-Pmp69 (bzw. mouse-anti-Pmp69) und andere:  
wurden 1:1000 bis 1:3000 verdünnt.

**2. Antikörper** goat-anti-rabbit (bzw. goat-anti-mouse)-POX :  
wurden 1:10.000 verdünnt.

#### Verwendete Lösungen:

- *Boratpuffer:*

50 mM B(OH)<sub>3</sub>; pH 9,0 (50% NaOH)

5% Methanol

0,05% SDS

- *Amidoschwarzlösung:*

0,1% Amidoschwarz

20% Methanol

5% Eisessig

- *Amidoschwarz-Entfärberlösung:*

45% Methanol

10% Eisessig

- *(20x)-Blot-PBS:*

200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

2,8 M NaCl

- *PBS-TNS*:  
 (1x)-Blot-PBS  
 0,05% Tween 20

### 3.4.4 In vitro-Transkription und –Translation

#### 3.4.4.1 In vitro-Transkription

Die Plasmide pBluescript und pcDNA3 enthalten einen T7-Promotor, der es ermöglicht, in einem zellfreien System mit Hilfe von T7-Polymerase mRNA zu synthetisieren. Um der Gefahr einer Transkription über den gesamten Vektor oder Teile des Vektors vorzubeugen, wurde das Plasmid zuvor mit einer Restriktionsendonuklease direkt am hinteren Ende der zu transkribierenden Sequenz geschnitten und damit linearisiert:

DNA-Konstrukt / Plasmid	benutztes Restriktionsenzym
Pmp22 (pos. Kontrolle) / in pBluescript	Bam HI
Myc-Pex11-1 / pcDNA3	Eco RI
Myc-Pex11-2 / pcDNA3	Eco RI
Pex11-1-Myc / pcDNA3	Eco RI
Pex11-1-(C -5)-Myc / pcDNA3	Eco RI
Pex11-2-(C -4)-Myc / pcDNA3	Eco RI

#### Transkriptionsansatz:

1 ìg linearisierte DNA  
 5 ìl T7-RNA-Polymerase-Puffer (10x)  
 1 ìl GpppG (cap-Struktur / 10 mM in ddH<sub>2</sub>O)  
 1 ìl NTP -Mix (Nukleotid-Premix)  
 0,5 ìl RNAsin (40 U/ìl von Promega)  
 2,5 ìl T7-Polymerase (20 U/ìl von MBI)  
 ad 50 ìl mit ddH<sub>2</sub>O

Die Ansätze werden 30 min bei 37°C im Thermomixer geschüttelt, dann werden die Ansätze um je 1 ìl NTP-Mix und 0,5 ìl cap/GpppG ergänzt, um die Transkriptionsrate zu erhöhen. Danach wird für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Elektrophorese im Agarosegel zeigte nur die eingesetzte linearisierte cDNA, nicht jedoch die gesuchte mRNA, deren Level zur optischen Erfassung aber eventuell zu gering war. Daher wurde mit den Ansätzen trotzdem eine *in vitro*-Translation durchgeführt.

#### Zusammensetzung des NTP-Mixes:

50 mM ATP  
 50 mM CTP  
 50 mM UTP  
 10 mM GTP  
 in 10 mM HEPES-KOH, pH 7,4

### 3.4.4.2 In vitro-Translation in Retikulozytenlysat

Die mRNA aus der *in vitro*-Transkription sollte nun in Kaninchen-Retikulozytenlysat (Flexi-Lysat) translatiert werden (siehe Herstellerprotokoll). Die Bedingungen hierzu waren schon zuvor im Labor optimiert worden. Zur Inhibierung der im Lysat natürlicherweise vorkommenden Proteasen wurden die Proteaseinhibitoren Antipain und Leupeptin zum Translationsansatz hinzugegeben.

#### Translationsansatz:

16  $\mu$ l Flexi-Lysat (Promega)  
 1  $\mu$ l Aminosäuren-Mix ohne Methionin (19 A.S./ jeweils 1mM)  
 2  $\mu$ l  $^{35}$ S Met/Cys-Labeling-Mix (14,3  $\mu$ Ci/  $\mu$ l ; Amersham Buchler)  
 0,25  $\mu$ l Proteaseinhibitoren-Mix (2 mM Leupeptin/10 mM Antipain)  
 4,75  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
 1  $\mu$ l mRNA-Lösung  
 ergibt je 25  $\mu$ l Volumen

Die Ansätze wurden 90 min bei 30°C im Thermomixer inkubiert und anschließend zur Entfernung von Ribosomen und Proteinaggregaten 60 min bei 4°C und 150.000 x g zentrifugiert (TLA120.2-Rotor). Je 2  $\mu$ l der Überstände wurden zur Überprüfung des Einbaus von Radioaktivität in die Proteine in SDS-PA-Gelen aufgetrennt und einer anschließenden Autoradiographie unterzogen. Es waren keine radioaktiven Banden zu detektieren.

### 3.4.5 Überexpression des Pex11-2-(N 1-84) in Bakterien

Um mit dem rekombinant exprimierten N-Terminus von Pex11-2 eventuelle Bindungs- bzw. Interaktionspartner zu isolieren, wurde dieses in *E. coli* transformiert und sollte, durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert, überexprimiert werden, um später aus den Bakterien isoliert und zu Bindungsassays genutzt zu werden. Hierzu wurde das Pex11-2-(N 1-84) in einen QE60-Vektor umklontiert (über zwei Bam HI-Schnittstellen, die per PCR-kreiert wurden.), der die Überexpression des Peptids in Bakterien ermöglicht und gleichzeitig einen 6xHis-tag an das C-terminale Ende des Peptids anfügt. Der His-tag erlaubt die Kopplung des Peptids an eine Nickel-Agarose-Säule (QIAGEN) und sukzessive eine Anbindung von cytosolischen Interaktionspartnern, indem Cytosol auf die Säule mit den gekoppelten Pex11-2-Fragmenten gegeben wird. Imidazol-Lösung erlaubt das Entfernen der Proteine von der Säule und deren anschließende Identifikation. Leider schlug bereits die Überexpression des Fragments, trotz Variation verschiedener Parameter (wie z.B. der IPTG-Konzentration [0,5-1 mM] und der Inkubationsdauer [1-5 h]), in *E. coli* fehl.

#### 3.4.5.1 Überexpression des N-Terminalen Pex11-2-Fragments in *E. coli*

Der Vektor mit dem inklonierten Pex11-2-(N- 1-84) wurde nach Herstellerangaben in die BL21(DE3)pLysS-Bakterien transformiert die dann auf Ampicillinplatten  $\Delta$  N selektioniert wurden. Eine 5 ml Vorkultur (LB mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin), die  $\Delta$  N bei 37°C und 180 rpm anwuchs, wurde am nächsten Morgen auf OD<sub>600</sub>=0,2 verdünnt und wuchs bis OD<sub>600</sub>=0,6-0,8 heran. Hier wurden die uninduzierten Proben entnommen und dann mit der IPTG-Induktion begonnen (z.B. 1 mM Enkonz.). Nach 1-5 h wurden 500  $\mu$ l-Proben entnommen, die später zur Proteinextraktion benutzt wurden.



### 3.4.5.2 Aufschluß der Bakterien mit dem überexprimierten rekombinanten Proteinfragment

Die Sedimente der entnommenen Proben (1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert) wurden in 300  $\mu$ l Aufschlußpuffer (s.u.) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Antauen in der Hand wurden kurz vor dem völligen Auftauen Proteaseinhibitoren hinzugefügt:

1  $\mu$ M Leupeptin in PBS  
 10  $\mu$ M Antipain in PBS  
 100  $\mu$ M PMSF in DMSO  
 (alles Endkonz. in der Lösung)

Nach dem Mischen wurden je 3  $\mu$ l Lysozym und 3  $\mu$ l DNase I beigemischt (beides 40 mg/ml Stocklösungen) und das Ganze 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 min bei 4°C und 13.000 rpm) erhält man ein Sediment aus unlöslichen Proteinen und einen Überstand mit den löslichen Proteinen, wobei an diesem Punkt noch nicht klar ist, wo das überexprimierte Proteinfragment zu finden ist. Beides wird zur Analyse in der SDS-PAGE in SDS-Probenpuffer gelöst (10  $\mu$ l von den Überständen, Pellets komplett).

### 3.4.5.3 Aufreinigen der His-getaggten Proteinfragmente per Nickel-Agarose-Säule

Die Restvolumina der Überstände (mit den löslichen Proteinen) werden auf Eis mit Imidazol-Lösung (500 mM in Aufschlußpuffer) auf 10 mM Imidazol eingestellt. Das Säulenmaterial (Ni-NTA-Agarose von QIAGEN) hat eine Bindungskapazität von 5-10 mg Protein pro 1 ml Agarose, weshalb hier bei erwarteten 25  $\mu$ g Protein pro Probe je 20  $\mu$ l Agarosesuspension (4facher Überschuß) verwendet wurden.

Das Säulenmaterial wurde zuvor 2x in 10 mM Imidazolösung (immer in Aufschlußpuffer) gewaschen.

Die Proteinhaltigen Überstände werden mit dem gewaschenen Säulenmaterial gemischt und 1 h - ÜN bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 100  $\mu$ l 10 mM Imidazolpuffer wird das Säulenmaterial bei 3000 rpm (Biofuge von Heraeus) sedimentiert. Die Überstände enthalten die ungebundenen Proteine.

Die Sedimente werden 2x mit 10 mM Imidazolpuffer gewaschen. Hierauf folgt die Elution der gebundenen Proteine vom Säulenmaterial mittels Inkubation mit Lösungen ansteigender Imidazolkonzentrationen (100, 200, 300, 400, 500 mM Imidazol in Aufschlußpuffer).

Hierzu wurden 15  $\mu$ l Imidazolpuffer auf das Sediment gegeben, gemischt, 5min bei RT inkubiert, die Agarose sedimentiert, der Überstand mit den eluierten Proteinen entnommen und dann die Lösung mit der nächsthöheren Konzentration appliziert, usw... (Zentrifugation je für 5 min bei 13.000 rpm in der Biofuge). Die Überstände mit den eluierten Proteinen wurden mit je 5  $\mu$ l (4x)-SDS-Probenpuffer versetzt 5 min bei 95°C erhitzt und später auf das SDS-PAG aufgetragen.

Nach der Elution mit 500 mM Imidazolösung wurde das verbleibende Sediment mit 10  $\mu$ l (4x)-SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht, um verbleibende Proteine vom Säulenmaterial zu lösen. Die Analyse der Proben erfolgte im 15%igen SDS-PAG (Minigel).

#### Verwendeter Aufschlußpuffer:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 300 mM NaCl , pH 8,0 (mit NaOH)  
 ergänzt mit der benötigten Konzentration Imidazol

### 3.4.6 Quervernetzung von Pex11-1 bzw. Pex11-2 mit seinen Interaktionspartnern

Zur Identifikation der physiologischen Interaktionspartner von Pex11-1 bzw. Pex11-2 und deren Herkunft (cytosolisch, in der peroxisomalen Membran, in der peroxisomalen Matrix, am Cytoskelett,

o.ä.) wurde versucht, Pex11-1 bzw. Pex11-2 mit diesen Partnern über bifunktionelle Quervernetzungs-substanzen (hydrophil oder hydrophob) kovalent zu binden und diese Produkte dann in der SDS-PAGE und mit anschließender Proteinsequenzierung zu identifizieren und zu charakterisieren.

- Hierzu wurden je 60 mg Primärhepatocyten in collagenbeschichteten 10 cm-Zellkulturschalen bei 37°C über 3 - 4 h zum Anwachsen gebracht ( $\alpha$ -MEM mit den üblichen Zusätzen und Insulin sowie Dexamethason, Vgl. AT3-Zellen).
- Nach einem Mediumwechsel (zu DMEM ohne Met/Cys) wurden die Zellen 25 min bei 37°C „ausgehungert“.
- Dann wurden je Schale 286  $\mu$ Ci  $^{35}$ S-Met/Cys „Cell-labelling-mix“ zugegeben um den Puls  $^{35}$ S zu lassen (3 ml Vol.).
- Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml  $\alpha$ -MEM (komplett) wurde die Reaktion auf Eis gestoppt.
- Die Zellen wurden abgeschabt, homogenisiert und der PNS wurde auf zwei Nycodenzgradienten zur Isolierung der Peroxisomen aufgetragen (s. Kap. 3.6.2).
- Aus den Nycodenzfraktionen wurde mittels Verdünnung mit Homopuffer das Nycodenz entfernt. Die resultierenden radioaktiven Peroxisomen wurden für die Crosslinkansätze verwendet.
- Die Hälfte der Ansätze wurde mit ARS (s.o.) vorinkubiert (30 min bei 37°C und 30 min auf Eis). Die anderen Ansätze wurden auf Eis gehalten.
- Die Peroxisomen wurden gleichmäßig auf alle Ansätze verteilt und sedimentiert (10 min 15.000 x g). Die Sedimente wurden dann mit Crosslink-Puffer mit dem benötigten pH-Wert zum Waschen resuspendiert (für BMH pH 6,5 für s-SMCC pH 8,0) und nach der Entfernung des Überstandes nochmals resuspendiert.
- Beide Crosslinker (beide von Pierce, Rockford, IL, USA) wurden in verschiedenen Konzentrationen angewendet (0,4, 1,0 und 2,0 mM). BMH wurde in DMSO (hydrophob) und s-SMCC in HCl (10  $\mu$ M / hydrophil) gelöst. In der Kontrolle wurde kein Crosslinker zugesetzt. Folglich wurden je Crosslinker je 4 Ansätze mit ARS und 4 Ansätze ohne ARS verwendet.
- Die Ansätze wurden zum Crosslinken 45 min auf Eis inkubiert.
- Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt.
- Die Proteine wurden 30 min bei 37°C vorgelöst und dann 5 min bei 95°C gekocht.
- Die Analyse der Produkte erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie.

Crosslink-Puffer:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

250 mM Sucrose

pH 6,5 oder pH 8,0 (je nach Crosslinker)

### 3.5 Hefe-Doppelhybrid-System (Two-Hybrid-System)

Gal4p ist ein Hefetranskriptionsfaktor, der sich aus zwei Domänen zusammensetzt: einer DNA-Bindungsdomäne (BD) und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD), welche auf cDNA-Ebene voneinander getrennt werden können, wobei die Funktionen der getrennten Domänen jeweils erhalten bleiben.

Das Köderprotein (in diesem Fall der N-Terminus von Pex11-2), zu dem Interaktionspartner gesucht werden, wird als Fusionsprotein mit der Bindungsdomäne im Hefestamm YRG2 exprimiert (dieser enthält zwei gut nachweisbare Reportergene hinter seinem Gal-Promotor).

Zudem wird eine cDNA-Genbank (aus der Leber eines Kaukasiers) als Fusionsprotein mit der AD in diesem Hefestamm coexprimiert (im hypothetischen Idealfall enthält jede Hefezelle ein anderes Genbank-Protein). Solange nur das Köderprotein mit der BD an den Gal-Promotor bindet, ohne mit Genbankproteinen zu interagieren, erfolgt keine Transkription der Reportergene, da die AD fehlt. Sobald aber ein Protein der Genbank mit dem Köderprotein in Wechselwirkung tritt, werden BD und AD räumlich zusammengebracht und eine Transkription erfolgt. Die Reportergene HIS3 und LacZ ermöglichen eine Selektion der Klone auf Histidin-freiem Medium und eine anschließende blau-weiß-Selektion über die Aktivierung des LacZ-Gens.

### 3.5.1 Feste und flüssige Kulturmedien

Um den Einfluß der Erhitzung auf die Glucose zu vermeiden, werden die Medien primär grundsätzlich ohne Glucose angesetzt und nach der Titration für 20 min autoklaviert. Die sterilfiltrierte Glucoselösung (50%ig) wird zum erkalteten Medium in benötigter Menge nachträglich hinzugegeben.

Um den Agarplatten die notwendige Festigkeit zu verleihen, wird dem Medium zum Gießen von Platten schon vor dem Autoklavieren 1,5% Agarose (Bacto-Agar) zugesetzt. Diese Lösung wird zum Erstarren in 10cm- bzw. 15cm-Plastikpetrischalen gegossen, nachdem diese zuvor bereits auf ca. 50°C abgekühlt wurde. Sollte die Selektion von Klonen über Histidinautotrophie erfolgen, so wurde dem Selektionsmedium noch 15 mM 3-Amino-1,2,4-triazol hinzugefügt, um Synthese-Seitenwege für endogenes Histidin zu blockieren.

#### Aminosäure-Stocklösungen:

Histidin (500x)	10 g/l
Leucin (333x)	33 g/l
Tryptophan (333x)	6,6 g/l

#### Aminotriazol-Stocklösung:

Aminotriazol (133x / 2 M) 168 g/l

#### SD-Medium (Selektionsmedium):

Stickstoff-Base ohne Aminosäuren (Gibco BRL) 6,7 g/l  
 D-Sorbit 182,2 g/l  
 CSM-Aminosäuremischung ohne Trp/Leu/His (Dianova) 620 mg/l  
 Glucose 2% (w/v)  
 Ergänzt mit Trp-, Leu- und/oder His-Stocklösung bzw. Aminotriazol-Stocklösung, je nach Bedarf.  
 pH 5,8

#### YPD-Medium (Vollmedium):

Difco®-Pepton 20 g/l  
 Hefe-Extrakt 10 g/l  
 Glucose 2% (w/v) pH 5,8

### 3.5.2 Transformation von Hefen

Von einer YPD-Agarplatte wird eine YRG2-Kolonie gepickt und ÜN bei 30°C in 150 ml Vollmedium bei ca. 180 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wird am nächsten Morgen in 1 Liter eine Verdünnung hergestellt ( $OD_{600} = 0,2$ ), die bei gleicher Temperatur weiterkultiviert wird, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,5 erreicht hat.

Diese Suspension wird bei RT bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wird einmal mit 500 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wird das Sediment in 8 ml TE/LiOAc-

Puffer resuspendiert und mit 2 ml gescherter Lachssperm-DNA (10 mg/ml) und 250 µg Genbank-Plasmid-DNA (aus humaner Leber eines Kaukasiers/ pADGal4-2.1-Genbank) gründlich gemischt. Der Ansatz wird mit 60 ml PEG/LiOAc-Lösung vermengt (Vortex) und dann für 30 min bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Der Hefesuspension werden anschließend 7ml DMSO beigemischt, woraufhin dieses Gemisch 15 min bei 42°C inkubiert wird, wobei der Ansatz immer wieder gut durchmischt wird (kein Vortex!). Anschließend werden die Zellen wieder zentrifugiert (s.o.) und dann in 10 ml TE-Puffer resuspendiert. Aus dieser Lösung werden 200 µl – Aliquots entnommen, die je auf einer 15 cm – Selektionsplatte ausgebracht werden, die bei 30°C bis zu 4 Wochen im Brutschrank inkubiert werden, um die Klone hochwachsen zu lassen.

Für die Transformation des *Köderproteins* [pBDGal4 mit N-terminalem Fragment von Pex11-2(mm)] und der Kontrollen (Vgl. Protokoll des Herstellers / Stratagene) wurde ein *kleinerer Ansatz* benutzt:

- Für alle Ansätze zusammen: 100 ml ÜN-Kultur verdünnt in 300 ml; gewaschen in 50 ml ddH<sub>2</sub>O; aufgenommen in 1,5 ml TE/LiOAc-Lösung.
- Je Ansatz: 100 ng Plasmid, 100 µg Lachssperm-DNA, 100 µl Zellsuspension, dann 600 µl PEG/LiOAc-Lösung, 70 µl DMSO; Aufnahme nach Hitzeschock in 500 µl TE -Puffer. Es wurden je 100 µl Suspension auf einer 10 cm-Selektionsplatte ausgestrichen, wobei z.B. für das Plasmid mit dem N-terminalen Fragment von Pex11-2 kein Tryptophan im Medium enthalten war. Klone erscheinen nach ca. 4 Tagen auf den Platten.

Zur *Coexpression* der beiden Plasmide in einem Hefestamm wurde zuerst das Köderprotein - d.h. der cytoplasmatisch orientierte N-Terminus von Pex11-2 (über EcoRI in pBDGal4 kloniert) in YRG2 transformiert und anschließend die menschliche Genbank (in pADGal4-2.1). Die finale Selektion erfolgte über Histidinautotrophie der gesuchten Klone.

#### Verwendete Lösungen:

*TE-Puffer (10x):*  
100 mM Tris-HCL, pH 7,5  
10 mM EDTA

*LiOAc-Puffer :*  
1 M LiOAc, pH 7,5

*TE/LiOAc-Puffer (10x) :*  
1 ml TE-Puffer  
1 ml LiOAc-Puffer  
8 ml ddH<sub>2</sub>O

*PEG/LiOAc-Lösung:*  
1 ml TE-Puffer  
1 ml LiOAc-Puffer  
8 ml 50% PEG 4000

*Gescherte Lachssperm-DNA :*  
Hierzu wird 1g Lachssperm-DNA in 100 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und geschert, indem die Lösung mehrfach durch eine 0,3 mm-Kanüle gezogen wird. Die anschließende Erhitzung für 5 min bei 95°C soll eventuell vorhandene Sekundärstrukturen entfernen. Die Lösung wird sofort auf Eis gestellt und portioniert eingefroren.

### 3.5.3 Nachweis der Galaktosidase-Aktivität in selektierten Klonen

Klone, die über Histidinautotrophie als positiv identifiziert wurden, wuchsen - von mehreren verschiedenen Platten auf eine frische Selektionsplatte vereinigt - zu neuen Kolonien hoch. Von diesen wurde mit einem speziellen Nylonfilter (Hybond, Schleicher und Schuell) ein Abklatsch angefertigt, der 1 min in flüssigem N<sub>2</sub> tiefgefroren wurde. Der aufgetaute Abklatsch wurde mit den Hefen nach oben auf ein mit Z-Puffer/X-Gal durchtränktes Whatman-Filterpapier aufgelegt und für einige Stunden bei 30°C inkubiert. Nur die echt-positiven Klone sind in der Lage über den Umsatz des X-Gal einen blauen Farbstoff zu bilden („blau-weiß-Selektion“).

#### Verwendete Lösungen:

##### Z-Puffer:

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 10 mM KCl  
 1 mM MgSO<sub>4</sub>

##### X-Gal-Stocklösung:

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid in DMF

##### Z-Puffer/X-Gal:

100 ml Z-Puffer  
 0,27 ml β-Mercaptoethanol  
 1,67 ml X-Gal-Stocklösung

## 3.6 Spezielle Methoden

### 3.6.1 Isolierung von Primärhepatocyten

Hierzu wurde die veränderte Methode nach Berry und Friend (1969) angewendet. Die Ratten wurden mit 70 µl Nembutal je 100 g Körpergewicht betäubt und erhielten eine Heparininjektion (100 I.E. je 100 g Körpergewicht / Liquemin N 10.000) zur Unterbindung der Blutgerinnung. Abdomen und Thorax werden geöffnet, um über Kanülen (die in Pfortader (= Zulauf) und vena cava eingeführt werden) die Leber mit verschiedenen Lösungen zu durchspülen. Zuerst wird Carbogen-gesättigtes Medium III 10 min bei 37°C in die Leber geleitet, dann Carbogen-gesättigtes DMEM (incl. 0,05% Collagenase aber ohne Met/Cys) bei gleicher Temperatur für dieselbe Dauer, um das Bindegewebe anzudauen und hierdurch zu lockern. Die Leber wird anschließend entnommen und grob zerkleinert. Der Zellverband der Leberstücke wird dann unter Schütteln in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Glaskolben weiter desintegriert. Daraufhin wird die Zellsuspension durch Nylonfilter mit abnehmender Maschenweite (250, 100, 60 µm) filtriert. Die Zellen werden, mit eiskaltem DMEM (ohne Met/Cys) ergänzt, in zwei Schraubzentrifugationsröhrchen (zu zwei gleichen Aliquots aufgeteilt) gefüllt und 5-10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen werden bei 10 x g 3min bei 4°C sedimentiert und dann in einem Röhrchen vereinigt. Der Waschschritt wird insgesamt dreimal durchgeführt. Letztlich werden die Zellen in 10 ml DMEM (ohne Met/Cys) aufgenommen (1 - 1,5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml).

Die Vitalitätsprüfung wurde mit 0,5%iger Trypanblau-Lösung anhand eines kleinen Suspensions-Aliquots im Lichtmikroskop durchgeführt (Mischung der Lösungen 1:2). Tote Zellen zeigen gefärbte Kerne. Die Suspension wurde verwendet, wenn mindestens 85% der Zellen lebten.

Medium III (Ca<sup>2+</sup>-frei):

136 mM NaCl  
 5 mM KCl  
 0,8 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 0,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
 12,5 mM HEPES , pH 7,4 (mit NaOH)  
 12 mM NaHCO<sub>3</sub>  
 7,5 mM Glucose  
 sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

**3.6.2 Isolierung von Peroxisomen aus Hepatocyten**

Es wurde nach der modifizierten Methode von Hartl et al. (1985) gearbeitet, wobei ein Zellhomogenat einer differentiellen und isopyknischen Zentrifugation unterzogen wird.

Die Zellen werden bei 10 x g sedimentiert (s.o.) und je Pellet mit 400  $\mu$ l Homopuffer und 100  $\mu$ l Dextran T 10 (30%) versetzt. Die Homogenisierung erfolgt auf Eis mit 10-20 langsamen Hüben bei 850 rpm im Glas-Teflon-Potter-Elvehjem-Homogenisator. War im Lichtmikroskop zu sehen, daß 95% der Zellen aufgeschlossen waren, wurde der Vorgang beendet.

In 1,5 ml Reaktionsröhrchen wurde das Homogenat 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Rotor 1379) und der resultierende PNS (post nuclear supernatant) auf Nycodenzgradienten aufgetragen, um die Peroxisomen aufzureinigen. Der Gradient verläuft von 45% bis 14% Nycodenz (s.u.) und wird in einem TV865-Vertikalrotor für 1 h bei 30.000 rpm zentrifugiert (langsame Beschleunigung und Verzögerung). Es werden 10 Fraktionen zu je 500  $\mu$ l geerntet, wobei sich die aufgereinigten Peroxisomen in den Fraktionen 2-3 befinden.

Verwendete Lösungen:Homopuffer:

250 mM Saccharose  
 10 mM Glycylglycin  
 1 mM EDTA  
 0,1% Ethanol , pH 7,4 (NaOH)

Nycodenzgradient:

Der Gradient setzt sich aus 9 Fraktionen absteigender Dichte (45,41,37,33,29,5,26,22,18 und 14% Nycodenz) zusammen. Die Osmolarität wird durch einen gegenläufigen Saccharosegradienten ausgeglichen. Gegossen wird der Gradient in 6 ml-Ultracrimp-Zentrifugenröhrchen (DuPont, Sorvall): die unterste Schicht besteht aus einem 70% -Nycodenz-Kissen (350  $\mu$ l), auf das die folgenden Fraktionen (je 500  $\mu$ l) geschichtet werden.

- Lösungen des Gradienten: 70% Nycodenz in ddH<sub>2</sub>O
- 14% Nycodenz in Glycylglycin-Puffer (10 mM) ergänzt mit 4,76% Saccharose
- 45% Nycodenz in Glycylglycin-Puffer (10 mM)

- Die Fraktionen werden durch Mischung der 14%igen und der 45%igen Lösungen hergestellt.

### 3.6.3 Katalasetest

Mittels dieses enzymatischen Tests wird die Katalaseaktivität in einer gegebenen Proteinlösung bestimmt. Da Katalase das Markerenzym der Peroxisomen ist, wo es Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umsetzt, kann mit dieser Methode die relative Menge von Peroxisomen, z.B. in Fraktionen einer Dichtegradientenzentrifugation, nachgewiesen werden.

Standard-Protokoll nach Hartl et al. (1985), verändert:

Die Lösungen werden in einer 24-Loch-Platte auf Eis und auf einem Schüttler gemischt.

- Je Probe werden 10-25 µl Lösung direkt entnommen; als Kontrolle werden zwei Blindproben (ohne Proteinlösung) mitbehandelt.
- Diese Lösungen werden zu bereits vorgelegten 460 µl Tritonreagenz je Probe/Loch gegeben und geschüttelt (mittlere Stärke, etwa 250 Upm).
- Der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe von 200 µl Substratlösung, die zügig nacheinander zu den Proben pipettiert wird.
- 5 min nach dem Start der ersten Probe wird die Reaktion durch Zugabe von je 340 µl Titanoxysulfat-Lösung nacheinander beendet. Das Titanoxysulfat komplexiert das nicht umgesetzte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus der Substratlösung zu einem gelben Farbstoff, der später photometrisch quantifiziert wird.
- Die Proben werden für weitere 5 min bei RT geschüttelt.
- Die Ansätze werden in 1 ml-Kunststoffküvetten bei 405 nm auf ihre Absorption hin analysiert (Photometer von Pharmacia).

Die Katalaseaktivität berechnet sich nach folgender Formel:

Katalaseaktivität (U/ml) = ( [log105,64 - log (105,64 - (E<sub>0</sub> - E<sub>p</sub>) x16)] : Testzeit in min ) x Vf

wobei: E<sub>0</sub> = Extinktion der Blindprobe (d.h. ohne Katalase)

E<sub>p</sub> = Extinktion des Ansatzes mit Katalase / Proteinlösung

Vf = Verdünnungsfaktor der Probe im Reaktionsvolumen (1000 µl)  
d.h. Vf = 1000 : eingesetztes Probenvolumen

Verwendete Lösungen:

*Tritonreagenz:*

1% Triton X-100

2% NaCl

0,33% BSA

0,1% Ethanol

*Substratlösung :*

33 mM Imidazol, pH 7,0 (HCl)

6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zugabe unmittelbar vor Versuchsstart)

Zusammen mit Titanoxysulfat und Tritonreagenz sollte diese Lösung im Vortest eine OD<sub>405</sub> von 0,8-1,0 besitzen.

*Titanoxysulfat-Lösung :*

gesättigte Lösung von TiOSO<sub>4</sub> in 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, anschließend 1:3 in 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verdünnt.

### 3.6.4 Kopplung von Peptiden an Thiopropylsepharose (TPS)

Zur Analyse der Fähigkeit, Coatomer zu binden, wurden die C-Termini von Pex11-1 und von Pex11-2 an TPS gekoppelt und später mit Cytosol inkubiert (Abb. 24).

#### Kopplung der Peptide:

- Je Ansatz wurden 125 mg TPS verwendet, 15 min vorgequollen in Kopplungspuffer.
- 1x 2 min bei 3500 rpm sedimentieren, resuspendieren, Transfer in 2ml Reaktionsgefäß.
- 500 µl Kopplungspuffer inkl. 4 M Urea zum waschen. Abermals sedimentieren und Überstand entfernen.
- Kopplung der Peptide an die TPS: 1,5 mM Peptidlösung in Kopplungspuffer inkl. 4 M Urea. Hiervon 500 µl bei RT über Nacht auf dem Überkopf-Schüttler mit der TPS inkubieren.
- Suspension 5 min bei 13.000 rpm sedimentieren. Überstand getrennt aufbewahren. Enthält überschüssiges Peptid und 2-Thiopyridose.
- TPS in 2x 900 µl in 10 ml Rörchen überführen und 1x in 5 ml Kopplungspuffer inkl. 4M Urea resuspendieren / waschen.
- 2 min bei 3500 rpm sedimentieren, in reinem Kopplungspuffer ohne Urea resuspendieren, ad 10 ml.
- 5 min Überkopfmischer, 2 min bei 3500 rpm sedimentieren, Überstand entfernen.
- Resuspendieren in 10 ml Blockierungspuffer und vortexen.
- 5 min Überkopfmischer, 2 min bei 3500 rpm sedimentieren, Überstand entfernen.
- Insgesamt 4x auf diese Weise mit Blockierungspuffer waschen.
- Exakt 10 min in 10 ml Blockierungspuffer inkl. 20 mM β-Merkaptoethanol auf Überkopfmischer inkubieren.
- 2 min bei 3500 rpm sedimentieren, Überstand entfernen.
- 1x grob mit 10 ml Blockierungspuffer waschen, dann nochmals, aber diesmal 2 min auf Überkopfmischer inkubieren. Wie gehabt sedimentieren und Überstand entfernen.
- 2x mit 10 ml Kopplungspuffer waschen. Anschließend pH auf 7,5 einstellen.
- 2 min bei 3500 rpm sedimentieren, Überstand entfernen.
- TPS in gewogene 10 ml-Röhrchen überführen und hierin 1x mit 10 ml Kopplungspuffer waschen. TPS-Gewicht ermitteln. In 500 µl PBS inkl. 0,02 Na-Azid lagern.

#### Kopplungseffizienz und Standardisierung der Ansätze:

- Extinktion der aufbewahrten Überstände bei 343 nm (Thiopyridon-Maximum) ermitteln.
- Nullabgleich mit 2M Urea.
- $c = E/\epsilon \times d$ , d.h.  $c = E/8,08 \times \mu\text{M}$ . Diese Thiopyridon-Konz. entspricht der TPS-gekoppelten Peptid-Menge. Hieraus läßt sich die Menge Peptid pro Gewicht an TPS ermitteln. Damit läßt sich bei der Inkubation mit Cytosol die eingesetzte Menge TPS-Peptid auf 3,3 nmol pro 100 µl-Ansatz normieren.
- A= Peptidkonz. aus Extinktionsmessung
- B= 3.300 pmol/A=mg Peptid
- C= gewogenes TPS-Gewicht pro Ansatz
- D= C/B (dimensionsloses Mengenverhältnis)
- Es sollen pro Ansatz 100 µl mit 3,3 nmol gekoppeltem Peptid pipettiert werden.
- Daher Einstellen der Peptid-Konz. auf diesen Standard.
- $E \mu\text{l} = D \times 100 \mu\text{l}$  (Endvol. über Faktor D je Ansatz), in E µl befinden sich D mal B mg TPS-beads mit 3,3 nmol gekoppeltem Peptid in 100 µl Vol.
- F= vorhandens Vol. (1 mg TPS entspricht 1 µl Vol.) pro Ansatz, aus C ermitteln.
- G= E-F = noch zu ergänzendes Vol. pro Ansatz, um die Standard-Konz. einzustellen.

Nachdem alle Ansätze normiert sind, kann die Inkubation mit Cytosol bzw. Coatomer erfolgen.

#### Verwendete Lösungen:



*Kopplungspuffer:*

100 mM Tris  
 500 mM NaCl  
 1 mM EDTA, pH 7,4

*Blockierungspuffer:*

100 mM NaAc  
 500 mM NaCl, pH 4,5

*Verwendete synthetische Peptide:*

Pex11-2: CPWLRLLP (MW: 1012)  
 Pex11-1: CYPQLKLKKAR (MW: 1218,5)  
 Pex11-1 Doppelmutante: CPQLSLSAR (negativ-Kontrolle, MW: 975))

**3.6.5 Coatomer-Bindungsassay**

Hierzu werden die im obigen Kapitel erläuterten standardisierten TPS-Peptid-Ansätze verwendet.

- Je Ansatz: 100 µl TPS-Suspension, entsprechend 3,3 nmol C-terminalem Peptid.
- 3 Ansätze: Pex11-1, Pex11-2, Negativkontrolle.
- Na-Azid entfernen.
- TPS in je 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferieren, in denen 1ml Hochsalzpuffer (HP) vorgelegt wurde. Auf Eis halten.
- 2 min bei 13.000 rpm sedimentieren, Überstand entfernen.
- 3x mit HP waschen.
- Je 150 µl Cytosol zugeben und mind. 2h bei 4°C im Überkopfmischer inkubieren.
- 2 min bei 13.000 rpm sedimentieren, Überstand entfernen.
- 4x mit je 1 ml HP waschen.
- 1x mit 25 mM TrisHCl (pH 7,4) waschen.
- TPS mit 100 µl SDS-Probenpuffer (4x) versetzen und 5 min bei 95°C erhitzen.

Die so erhaltenen Proteine, die von den C-Termini / Peptiden gebunden wurden, wurden dann in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot gegen die Coatomer-Untereinheit  $\beta'$ -COP (1:1000, aus Kaninchen) entwickelt.

*Hochsalzpuffer:*

50 mM Hepes/KOH (pH 7,4)  
 90 mM KCl  
 300 mM NaCl  
 1 mM EDTA  
 0,5 % NP40 (Nonidet P 40= Detergenz von ICN)

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Pex11-cDNA-Konstrukte

In Säugetieren existieren zwei homologe Pex11-Proteine: Pex11-1 und Pex11-2. Ihre Polypeptidsequenzen sind in der Maus zu 40% identisch und zu 70% ähnlich. Die beiden Homologe unterscheiden sich in einigen Merkmalen: Pex11-2 ist um 13 Aminosäuren länger als Pex11-1 und besitzt am C-Terminus eine Sequenz (-RXKX), die nach Letourneur et al. (1994) kein funktionelles Dilysinmotiv darstellt. Pex11-1 endet am C-Terminus mit der Sequenz (-KXKXX), einem Konsensus-Dilysinmotiv. Im N-terminalen Bereich von Pex11-1 – Aminosäure 16-24 – ist eine Sequenz enthalten, die dem PTS2-Konsensusmotiv (R/K)-(L/V/I)-(XXXXX)-(H/Q)-(L/A/F) entspricht. Pex11-2 enthält an gleicher Stelle eine Variante, die an der 8. Position ein Tyrosin anstatt des beschriebenen Histidins oder Glutamins enthält.

Um Informationen über die Funktionen von Pex11-1 und Pex11-2 zu erhalten, wurden - ausgehend vom Gesamtprotein (Abb. 1, Abb. 2-1 und Abb. 2-2) - verschiedene Verkürzungen und verschiedene Fusionsproteine hergestellt (Abb. 3 und Abb. 4). Nach der Expression der cDNA-Konstrukte wurden der Import der rekombinanten Proteine in die Peroxisomen und die beobachteten phänotypischen Veränderungen routinemäßig mit einer Anfärbung des peroxisomalen Markerproteins Pmp69 überprüft.

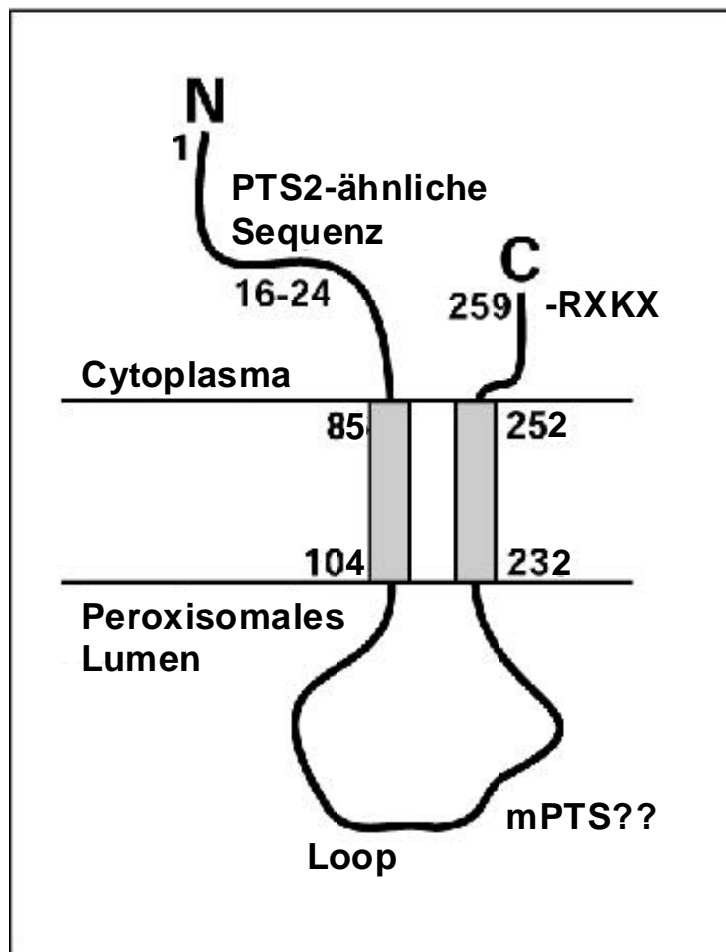
# Polypeptidsequenz- Homologie zwischen Pex11-1 und Pex11-2

mmPex11-1p	M D A F I R V A N Q S Q G R D <sup>16</sup> R L F R A T Q H A C <sup>24</sup> M L L R Y L L E S K A D K E A	40
mmPex11-2p	M D A W V R F S A Q S Q A R E R L C R A A Q Y A C S L L G H A L Q R H G A S P E	40
mmPex11-1p	V V L K L K R L E T S V S T G R K W F R L G N V F H A I Q A T E Q S I Q A A D L	80
mmPex11-2p	L Q K Q I R Q L E G H L S L G R K L L R L G N S T D A L E S A K R A V H L S D V	80
	<b>TMD1</b>	
mmPex11-1p	A P R L C L T L A N L N R V V Y Y I C D T V L W A K S V G L T S G V N R E K W Q	120
mmPex11-2p	V L R F C I T V S H L N R A L Y F A C D N V L W A G K S G L A P R V D Q E K W A	120
mmPex11-1p	R W A A R S Y Y Y F L L L S L V R D L Y E I L L Q M G Q V A R D R A K R E K S S	160
mmPex11-2p	Q R S F R Y Y L F S L I M N L S R D A Y E I R L L M E Q E T S A Y S R R M K V S	160
	<b>mPTS ?</b>	
mmPex11-1p	R D P P K Y S V A N - - - - - E E T E W L Q S F - - - - - L L L L F Q S	186
mmPex11-2p	G V G V S G G V E T V G P G G P G T P G G S L P Q L A L K F R L R I L L L A R V	200
mmPex11-1p	L K R H P P L L L D T V K N F C D I L I P L N Q L G I Y K S N L G V V G L G G L	226
mmPex11-2p	L R G H P P L L L D V L R N A C D L F I P L D K L G L W R C G P G I V G L C G L	240
	<b>TMD2</b> <b>Dilysin-Motiv</b>	
mmPex11-1p	I S S W A G L L T V V Y P Q L K L K A R	246
mmPex11-2p	I S S I L S I L T L I C P W L R L K P	259

**Abb. 1: Die Sequenzhomologien zwischen Pex11-1 und Pex11-2 aus der Maus (*Mus musculus forma domestica*) betragen 41% (Alignment mit DNA-Star-Software). Eingezeichnet sind das PTS2, ein vermutliches mPTS, das Dilysinmotiv - in Pex11-1 voll dem Konsensusmotiv entsprechend, in Pex11-2 um die letzte Position verkürzt, aber immer noch mit zwei positiven Seitenketten (R=Arg und K=Lys) - und die beiden Transmembrandomänen (TMD1 und TMD2).**

**Die 13 Aminosäuren, die Pex11-2 im Vergleich zu Pex11-1 zusätzlich besitzt, sind in der zweiten Hälfte des luminalen Loops (Abb.2-1) lokalisiert. Identische Aminosäuren sind umrahmt. Diese starke Homologie läßt eine sehr ähnliche Topologie bei beiden Pex11-Proteinen vermuten (Abb. 2-1 und Abb. 2-2).**

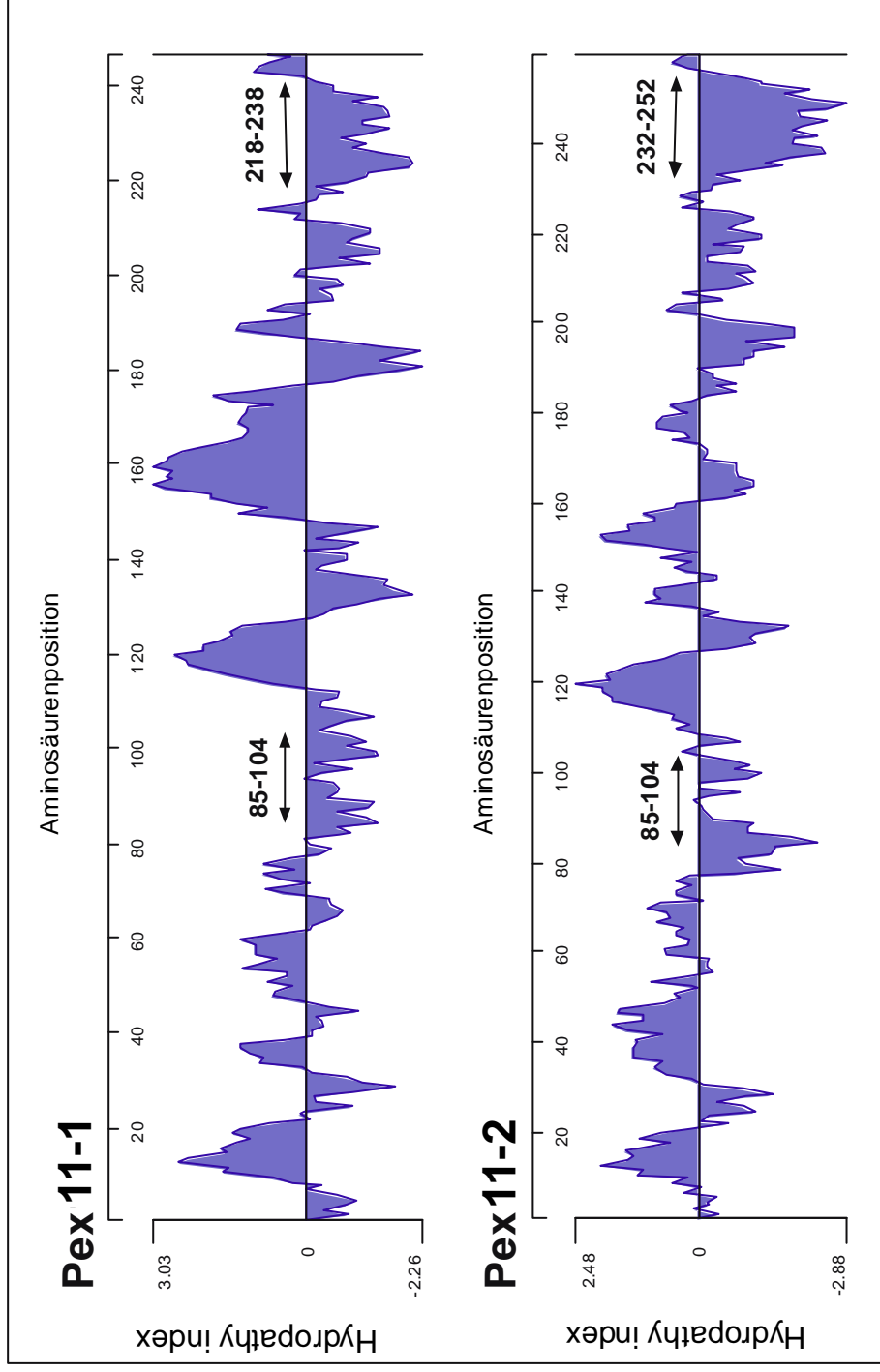
## Die Membrantopologie des Pex11-2



### **Abb. 2-1: Die Pex11-2-Membrantopologie**

Dargestellt ist die räumliche Orientierung aller Domänen: der N-Terminus mit der PTS2-ähnlichen Sequenz (s. Abb.1), das vermutete mPTS im luminalen Loop, der C-Terminus mit der an ein Dilysin-Motiv erinnernden Sequenz -RXKX und die beiden Transmembrandomänen des Pex11-2-Moleküls aus der Maus.

# Hydropathyplots von Pex11-1 und Pex11-2 (Kyte-Doolittle)



**Abb. 2-2: Hydrophobizitätsplot der beiden Pex11-Homologe aus der Maus** Die Positionen der putativen helikalen Transmembrandomänen wurden mit dem PredictProtein PHDhtm Programm ermittelt und sind mit Pfeilen markiert.

### 4.1.1 Pex11-1-Konstrukte

**Abb. 3 zeigt die angefertigten Pex11-1-cDNA-Konstrukte:**

Konstrukte mit GFP-Varianten (Ratte):

CFP-Pex11-1

Pex11-1-YFP

Myc-Konstrukte (Ratte):

Myc-Pex11-1

Pex11-1-Myc

Myc-(N -74)-Pex11-1

(N -74)-Pex11-1-Myc

Myc-Pex11-1-(C -5)

Pex11-1-(C -5)-Myc

Myc-(N -74)-Pex11-1-(C -5)

(N -74)-Pex11-1-(C -5)-Myc

unmarkierte Konstrukte (Ratte):

wt-Pex11-1

(N -74)-Pex11-1

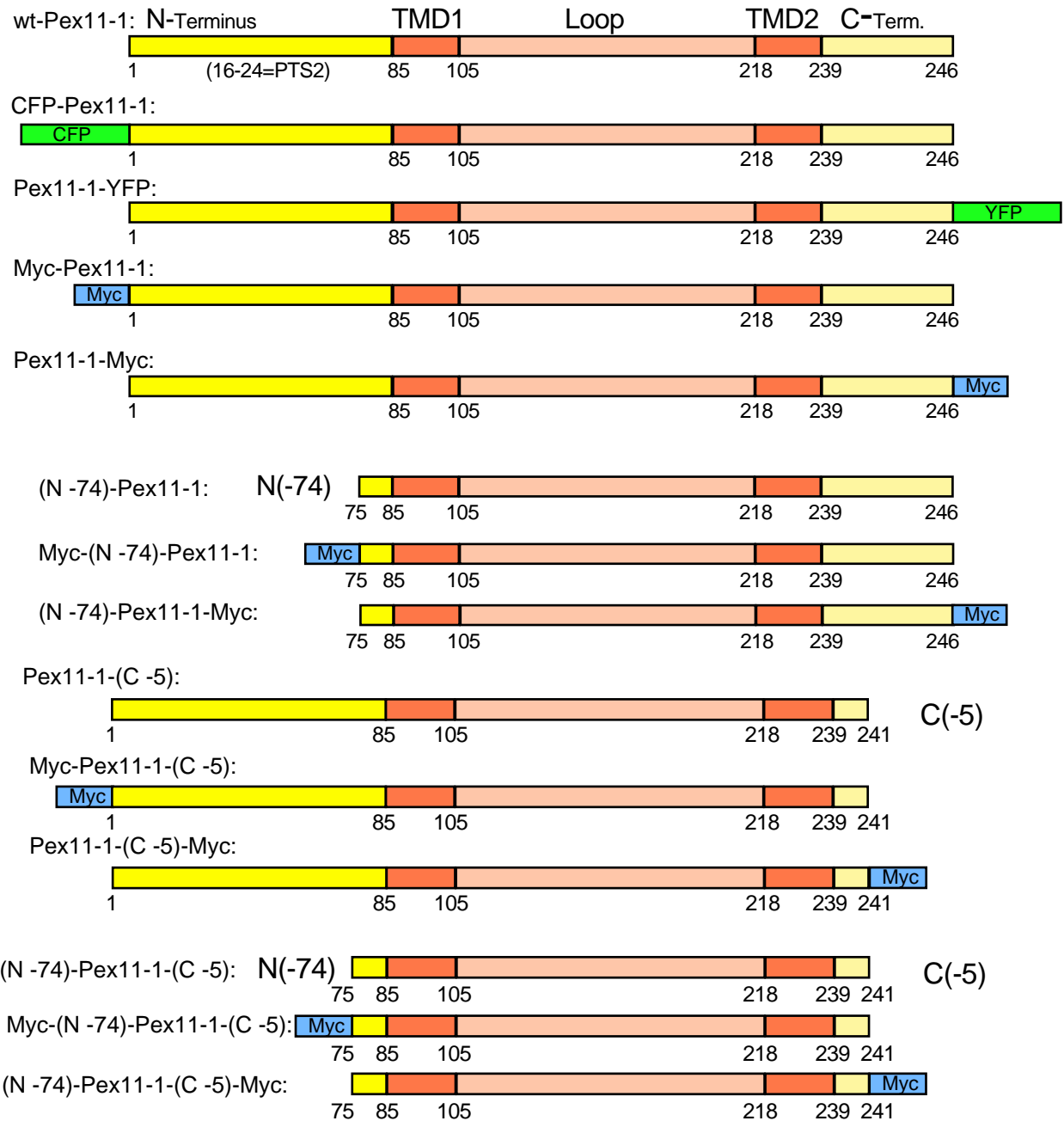
Pex11-1-(C -5)

(N -74)-Pex11-1-(C -5)

Zur Terminologie der Konstrukte:

Steht ein Marker am Anfang der Kurzbeschreibung, so handelt es sich um einen N-terminalen Anhang an das Pex11-1-Molekül; steht er am Ende derselben, so wurde er C-terminal angefügt. Die Abkürzung (N -74) steht für eine N-terminale Verkürzung um 74 Aminosäuren. (C -5) steht entsprechend für eine C-terminale Verkürzung um 5 Aminosäuren. Bei der C-terminalen Verkürzung von Pex11-1 wurde das hier vollständig vorliegende Dilysinmotiv entfernt. Die Expression von C-terminal verkürzten Konstrukten mit oder ohne Myc-Tag ist bisher nicht gelungen. Hierzu bedarf es noch weiterer Experimente.

## Pex11-1-Konstrukte:



**Abb. 3: Übersicht über die angefertigten Pex11-1-cDNA-Konstrukte**

Das Pex11-1-Gesamtprotein (ganz oben) wurde am N- Terminus und/oder am C-Terminus verkürzt. Die zu Anfang ohne angefügten Marker transfizierten Konstrukte waren in den betreffenden Zellen nur unzureichend identifizierbar. Zur Identifikation von erfolgreich transfizierten Zellen wurden daher verschiedene Fusionsproteine hergestellt:

- 1) An den N-Terminus des Gesamtproteins wurde CFP fusioniert, an den C-Terminus wurde bei einem anderen Konstrukt YFP angefügt.
- 2) Am N- oder C-Terminus wurde ein Myc-tag angefügt.

Angegeben sind die Positionen der jeweils ersten Aminosäure in den aufeinanderfolgenden Abschnitten der Peptidsequenz von Pex11-1.

Bei CFP und YFP handelt es sich um Farbvarianten von GFP. Sie sind in den nachträglich veränderten Vektoren pECFP-C1 bzw. pEYFP-N1 der Firma Clontech enthalten (Simpson et al., 2000). Die Insertion der Konstrukte in die Vektoren pcDNA3 bzw. pcDNA3.1 erfolgte bei den Myc-Varianten und den unmarkierten Konstrukten über Bam HI (5'-Ende) und Eco RI (3'-Ende). Schnittstellen wurden grundsätzlich per PCR in die zu klonierende Sequenz integriert. Das verwendete wt-Pex11-1 stammte aus der Ratte (Passreiter et al., 1998). Die molekularbiologischen Arbeitsschritte sind in Kapitel 3.2 erläutert.

#### **4.1.2 Pex11-2-Konstrukte**

Pex11-2 (human oder aus der Maus, codierende Sequenz im Labor vorhanden), als konstitutiv aktivem Protein, galt das besondere Interesse. Die Expression des unveränderten Moleküls (wt-Pex11-2) bewirkt in Säugerzellen und Hefen eine starke Proliferation der Peroxisomen (Schrader et al., 1998; van Roermund et al., 2000), was eine wichtige Rolle des Moleküls bei der Biogenese dieses Organells nahelegt.

Es wurden folgende Konstrukte erstellt (Abb.4):

##### (E)GFP-Konstrukte (human):

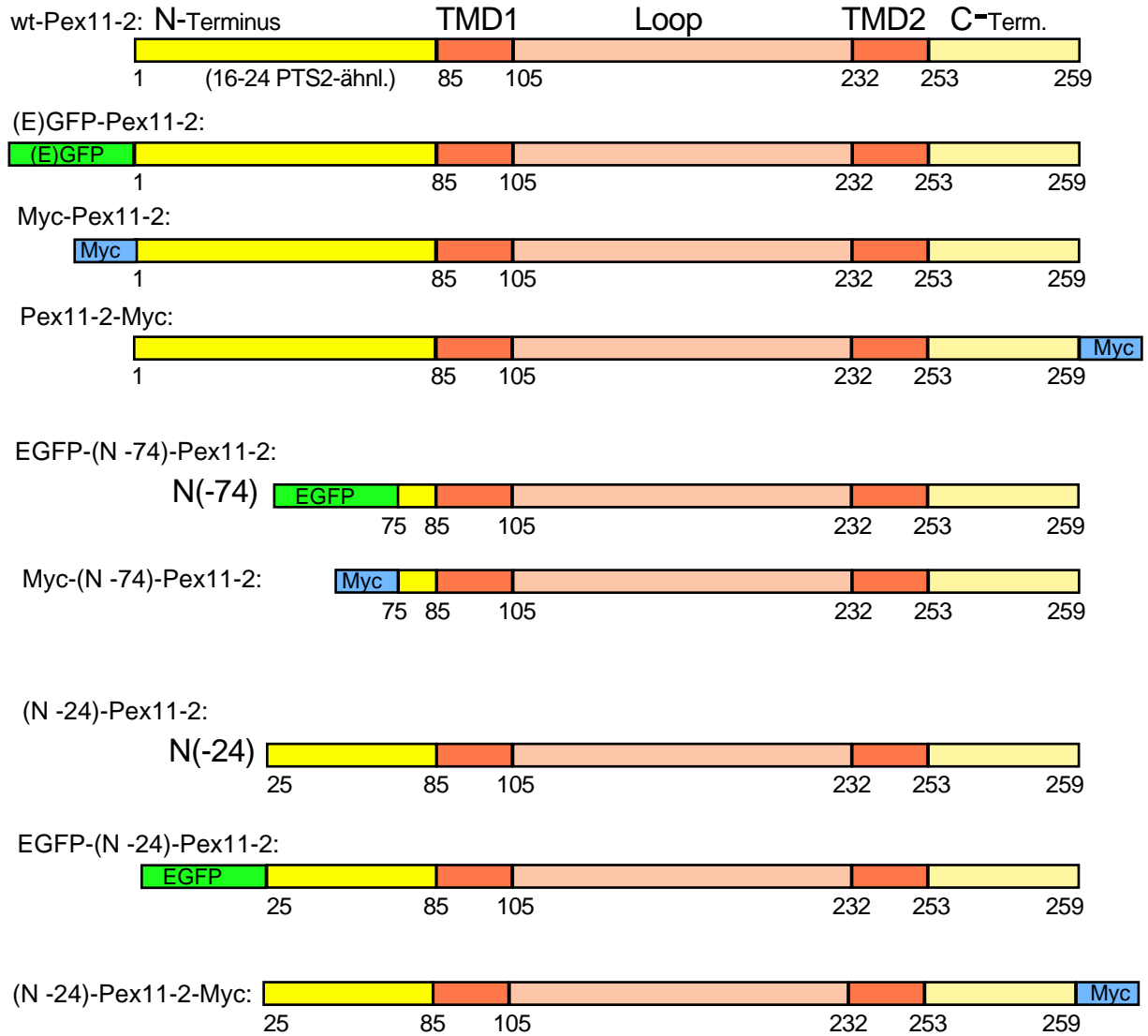
GFP-Pex11-2  
EGFP-Pex11-2  
EGFP-(N -24 )-Pex11-2  
EGFP-(N -74 )-Pex11-2  
Pex11-2-(N 1-84)  
Pex11-2-(N 1-84)-EGFP

##### Myc-Konstrukte (Maus):

Myc-Pex11-2  
Pex11-2-Myc  
Myc-(N -74)-Pex11-2  
(N -24)-Pex11-2 -Myc  
Myc-Pex11-2-(C- 4)  
Pex11-2-(C- 4)- Myc  
Myc-(N -74)-Pex11-2-(C -4)  
(N -24)- Pex11-2-(C -4)-Myc



## Pex11-2-Konstrukte:



### N-terminales Fragment

Pex11-2-(N 1-84):

1 (16-24 PTS2-ähnl.) 84

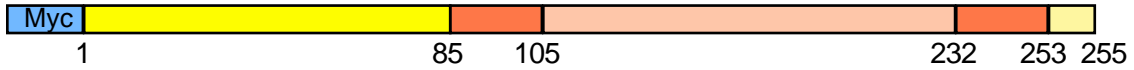
Pex11-2-(N 1-84)-EGFP:

1 84 EGFP

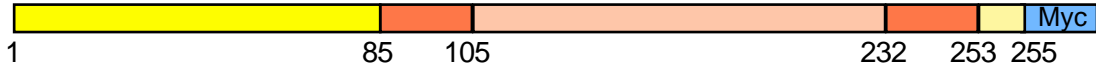
Pex11-2-(C -4):



Myc-Pex11-2-(C -4):



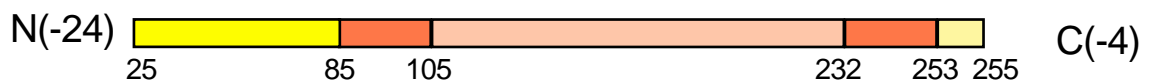
Pex11-2-(C -4)-Myc:



Myc-(N -74)-Pex11-2-(C -4):



(N -24)-Pex11-2-(C -4):



(N -24)-Pex11-2-(C -4)-Myc:



#### Abb. 4: Übersicht über die Pex11-2-cDNA-Konstrukte

Das Pex11-2-Gesamtprotein (ganz oben) wurde am N- Terminus und/oder am C-Terminus verkürzt.

Die zu Anfang ohne angefügten Marker transfizierten Konstrukte waren in den betreffenden Zellen nur teilweise nachweisbar. Zur Identifikation von erfolgreich transfizierten Zellen (CHO oder AT3) wurden daher verschiedene Fusionsproteine hergestellt:

- 1) An den N-Terminus des Gesamtproteins und der nur N-terminal verkürzten Varianten wurde (E)GFP fusioniert
- 2) Am N- oder C-Terminus wurde ein Myc-tag angefügt
- 3) An den funktionell wahrscheinlich bedeutsamen N-Terminus von Pex11-2 wurde EGFP C-terminal angefügt

Angegeben sind die Positionen der jeweils ersten Aminosäure der aufeinanderfolgenden Protein-Domänen von Pex11-2.

unmarkierte Konstrukte (Maus):

wt-Pex11-2

(N -24)-Pex11-2

Pex11-2-(C -4)

(N -24)-Pex11-2-(C -4)

Die Benennung der Konstrukte erfolgte in gleicher Weise, wie sie für die Terminologie der Pex11-1-Konstrukte verwendet wurde

Steht ein Marker am Anfang der Kurzbeschreibung, so handelt es sich um einen N-terminalen Anhang an das Pex11-2-Molekül; steht er am Ende derselben, so wurde er C-terminal angefügt. Die Abkürzungen (N -24) bzw. (N -74) stehen für eine N-terminale Verkürzung um 24 bzw. 74 Aminosäuren. (C -4) steht für eine C-terminale Verkürzung um 4 Aminosäuren. Die Expression der C-terminal verkürzten cDNA-Konstrukte war in den vorliegenden Ansätzen bisher nicht erfolgreich. Gleiches gilt für die verkürzten Konstrukte mit C-terminal angefügtem Myc-Epitop. Das unverkürzte Pex11-2-Myc erzeugte den gleichen Phänotyp wie Myc-Pex11-2. Wegen der problematischen Expression des verkürzten Pex11-2 mit C-terminalem Myc-tag stehen weitere Untersuchungen dieser Konstrukte noch aus. Die Experimente mit Myc-tag wurden daher mit den Konstrukten durchgeführt, die diesen Marker am N-Terminus tragen.

Die N-terminal Myc-getaggten Konstrukte Myc-(N -74)-Pex11-2 und Myc-(N -74)-Pex11-2-(C -4) sind N-terminal bis knapp vor die peroxisomale Membran verkürzt. Die C-terminal Myc-getaggten und die unmarkierten Konstrukte sind N-terminal um 24 Aminosäuren verkürzt (Abb. 4). Es wurden zwei verschieden große N-terminale Verkürzungen erstellt (N -24 und N -74), um ein eventuell im N-Terminus von Pex11-2 enthaltenes Targeting-Signal auf seine Funktion hin zu untersuchen. Bei der (N -74)-Variante wurde der Myc-tag an den N-Terminus angefügt, da hier kein Signal mehr maskiert werden konnte.

Alle (E)GFP-Konstrukte basieren auf der Sequenz des humanen Pex11-2, die Myc-markierten und unmarkierten Varianten wurden ausgehend vom Pex11-2 der Maus erstellt. Die Insertion in die Vektoren pcDNA3 (G418-Resistenz) bzw. pcDNA3.1 (Zeocin-Resistenz) erfolgte bei den unmarkierten Konstrukten und den myc-Varianten über Bam HI (5'-Ende) und Eco RI (3'-Ende), bei den EGFP-Konstrukten über Bsp EI und Eco RI. Das unmarkierte N-terminale Fragment von Pex11-2 wurde über Bam HI und Eco RI in pcDNA3 kloniert. Zur Fusionierung von EGFP an den C-Terminus des Fragments wurde dieses über eine EcoRI-Schnittstelle in den Vektor pEGFP-N2 (Neomycin-Resistenz) umklont.

Alle verwendeten Vektoren sind eukaryontische Expressionsvektoren und besitzen einen CMV-Promotor, der für eine hohe Expression der einklonierten cDNA sorgt.

Schnittstellen wurden allgemein per PCR in die zu klonierende Sequenz integriert, lediglich beim GFP-Pex11-2 wurde das GFP durch mehrere Umklonierungsschritte über vorhandene Schnittstellen an das Pex11-2 angefügt. Die GFP-Pex11-2-cDNA wurde schließlich über Kpn I (N-terminal) und Not I (C-terminal) in den pcDNA3.1-Vektor eingefügt. Genaueres über die molekularbiologischen Arbeiten findet sich in Kapitel 3.2.

## 4.2 Beschreibung der verwendeten Zellsysteme

Die Expression der hergestellten cDNA-Konstrukte - sowohl die auf Pex11-1, wie die auf Pex11-2 basierenden - erfolgte wahlweise in CHO-Zellen und in AT3-Zellen. Bei den CHO-Zellen handelt es sich um pseudohaploide, adhären wachsende Zellen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 50 µm. Die Peroxisomen in CHO-Zellen sind ca. 200 nm groß, von rundlicher bis kommaförmiger Gestalt und befinden sich gehäuft in der Nähe des Nukleus. Diese peroxisomale Morphologie erwies sich bei der Analyse einiger cDNA-Konstrukte als vorteilhaft. Die AT3-Zellen sind adhären wachsende Zellen aus dem Hepatom einer transgenen Maus, in denen das T-Antigen unter der Kontrolle des Antithrombin III

(regulatorische Region) exprimiert wird (Antoine et al., 1992). AT3-Peroxisomen sind ausgeprägt tubulär und vor allem nahe am Kern vorzufinden. AT3-Zellen sind flach und von polygoner Gestalt und besitzen einen Durchmesser von ca. 60 µm.

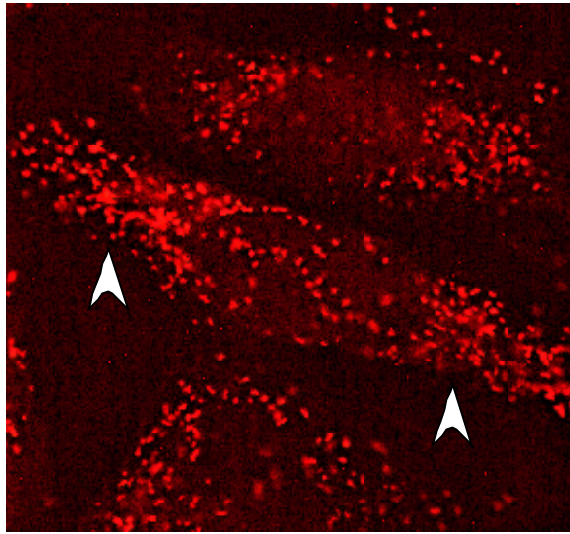
### **4.3 Expression der Pex11-1-Konstrukte**

#### **4.3.1 Expression von wt-Pex11-1**

Wird die cDNA von wt-Pex11-1 (Abb. 1 und Abb. 3) in das pcDNA3- Plasmid inkloniert und in CHO-Zellen 14-48h überexprimiert, so führt dies zu einer Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes (Abb. 5). In CHO-Zellen sind Peroxisomen von Natur aus von rundlicher bis Komma-förmiger Gestalt, bei einem Durchmesser von ca. 200 nm. Nach der Expression ist eine vergleichsweise geringe Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes zu beobachten. Die Anzahl der Peroxisomen wird etwa verdoppelt (Passreiter et al., 1998). Die peroxisomale Morphologie zeigt jedoch keine auffallende Veränderung.

#### **4.3.2 Expression verkürzter, unmarkierter Pex11-1-Konstrukte**

Um etwaige Funktionen derjenigen Abschnitte von Pex11-1, die in das Cytoplasma ragen, zu analysieren, wurden N- und C-terminal verkürzte Konstrukte hergestellt. Um den eventuell störenden Einfluß eines Proteintags auszuschließen, wurde zunächst auf die Einführung einer Markersequenz verzichtet. Dieser Verzicht bedingt, daß im Falle einer auffallenden Veränderung der Zelle oder des peroxisomalen Kompartimentes durch nachfolgende Immunfluoreszenz (IF) eine zweifelsfreie Differenzierung der mikroinjizierten (transfizierten) Zelle von den nicht transfizierten Zellen erfolgen kann. Um dieses Differenzierungsproblem zu vermindern, wurden die Zellen auf Deckgläsern mit eingätzten Rasterarealen ausplattiert.



**Abb.5: Pex11-1 verdoppelt die peroxisomale Proliferation von CHO-Zellen**  
Nach Mikroinjektion der Pex11-1-cDNA in CHO-Zellen ist nach 14h Expression etwa eine Verdoppelung der Peroxisomenzahl in den betreffenden Zellen zu beobachten (Pfeilköpfe). Die nicht transfizierten Zellen daneben zeigen eine geringere Anzahl an Peroxisomen. Die Peroxisomen wurden zur Visualisierung über Pmp69 indirekt mit TRITC angefärbt.

Folgende Varianten des verkürzten und unmarkierten Pex11-1 wurden transfiziert und 16-48h exprimiert: (N -74)-Pex11-1, Pex11-1-(C -5) und (N -74)-Pex11-1-(C -5). Für keines dieser Konstrukte wurde eine erkennbare Veränderung des peroxisomalen Phänotyps beobachtet. Die cDNA-Konstrukte wurden daher, zur besseren Identifizierung der mikroinjizierten Zellen, mit BSA coinjiziert, an welches die Fluoreszenzfarbstoffe AMCA-blue, Fluos oder TRITC gekoppelt waren. Alle diese Farbstoffe führten im Fluoreszenzmikroskop zu raschem Ausbleichen und waren damit nur von bedingtem Nutzen. Ein direkter Nachweis der Expression und die Analyse möglicher phänotypischer Veränderungen, ausgelöst durch diese Konstrukte, stehen noch aus.

### **4.3.3 Expression von Pex11-1-Fusionsproteinen**

Um die Vorgänge bei der Proliferation *in vivo* analysieren zu können, wurden cDNA-Konstrukte von Pex11-1 hergestellt, bei denen an den N-Terminus bzw. an den C-Terminus die cDNA-Sequenz, codierend für die fluoreszierenden Proteine CFP bzw. YFP, fusioniert wurde (Abb. 3). Diese Fusionsproteine ermöglichten eine eindeutige Identifizierung der Expression des exogenen, rekombinanten Genprodukts und eine Betrachtung phänotypischer Veränderungen in der lebenden Zelle. Bei diesen Konstrukten wurde das Markerprotein an jeweils einen der beiden cytosolisch orientierten Termini fusioniert. Sollte eine mögliche Funktion des jeweiligen Terminus durch den Marker sterisch inhibiert werden, so sollte dies im veränderten Phänotyp sichtbar werden.

Um mit einem deutlich kleineren Marker-Molekül am N-Terminus des Pex11-1 möglichst geringfügig die Funktion dieser Proteindomäne zu inhibieren bzw. hier rein sterisch zu interferieren, wurden Fusionskonstrukte mit dem Myc-Epitop (10 Aminosäuren: EQKLISEEDL) hergestellt.

### **4.3.3.1 Expression von CFP-Pex11-1**

In CHO-Zellen führte CFP-Pex11-1 20-48h nach Transfektion zu einer Ausbildung tubulärer Peroxisomen, die eine Länge von mindestens 1  $\mu\text{m}$ , bei einem Durchmesser von etwa 50 nm, besitzen. Diese tubulären Peroxisomen füllen die Zelle fast vollständig aus (Abb. 6-1). Bei einem Durchmesser von ca. 200 nm in den wt-CHO-Zellen bedeutet dies eine mindestens 5fache Verlängerung der CHO-Peroxisomen durch CFP-Pex11-1. Zum Teil war eine schwache Tendenz zur peroxisomalen Clusterbildung auszumachen. In etwa der Hälfte der injizierten Zellen waren, vorwiegend in Kernnähe, kleine peroxisomale Cluster zu sehen (Abb. 6-1 A). Die Vermehrung der peroxisomalen Strukturen durch CFP-Pex11-1 entspricht einer Zunahme auf etwa das 10fache Volumen.

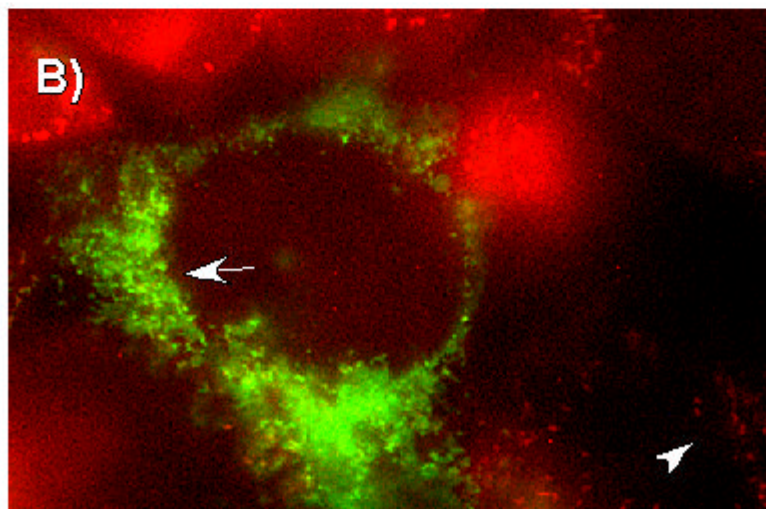
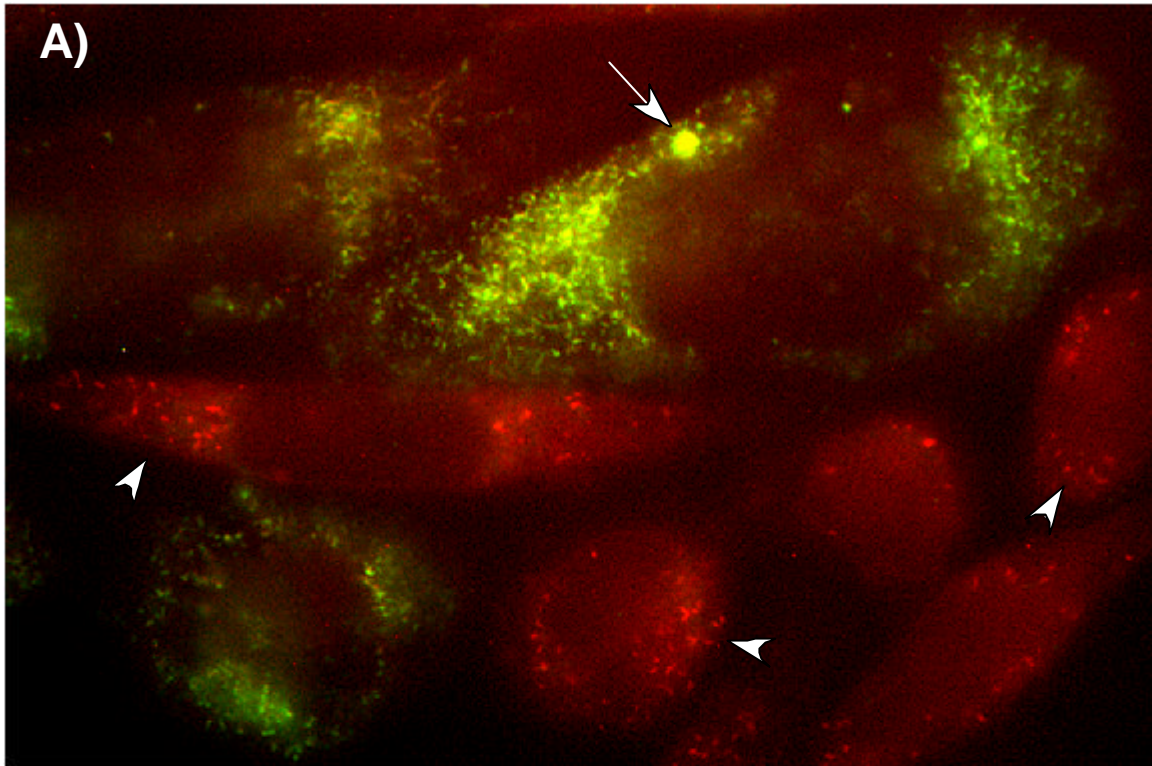
In AT3-Zellen war die phänotypische Veränderung anders geartet. In diesen Zellen liegen von Natur aus tubuläre Peroxisomen vor. Diese werden unter dem Einfluß von CFP-Pex11-1 mindestens verdreifacht. Die Tubuli werden durchschnittlich etwa 4mal länger und ihr Durchmesser etwa halbiert. Die Tendenz zur Clusterbildung ist mit der in CHO-Zellen vergleichbar. Im Gegensatz hierzu führte unmarkiertes wt-Pex11-1 in keiner der verwendeten Zellsysteme zu einer Veränderung der peroxisomalen Morphologie.

Die Gegenwart des CFP-tag am N-terminalen Ende von Pex11-1 scheint folglich die Funktion dieses Terminus sterisch zu inhibieren, was zu einer Veränderung der peroxisomalen Morphologie in den transfizierten Zellen führt. Die Inkubation mit den Inhibitoren Nocodazol oder Cytochalasin B und die somit dissoziierten Mikrotubuli bzw. Aktinstrukturen haben auf die Ausprägung dieses Phänotyps keinen Einfluß (s. Kapitel 4.4.3.2).

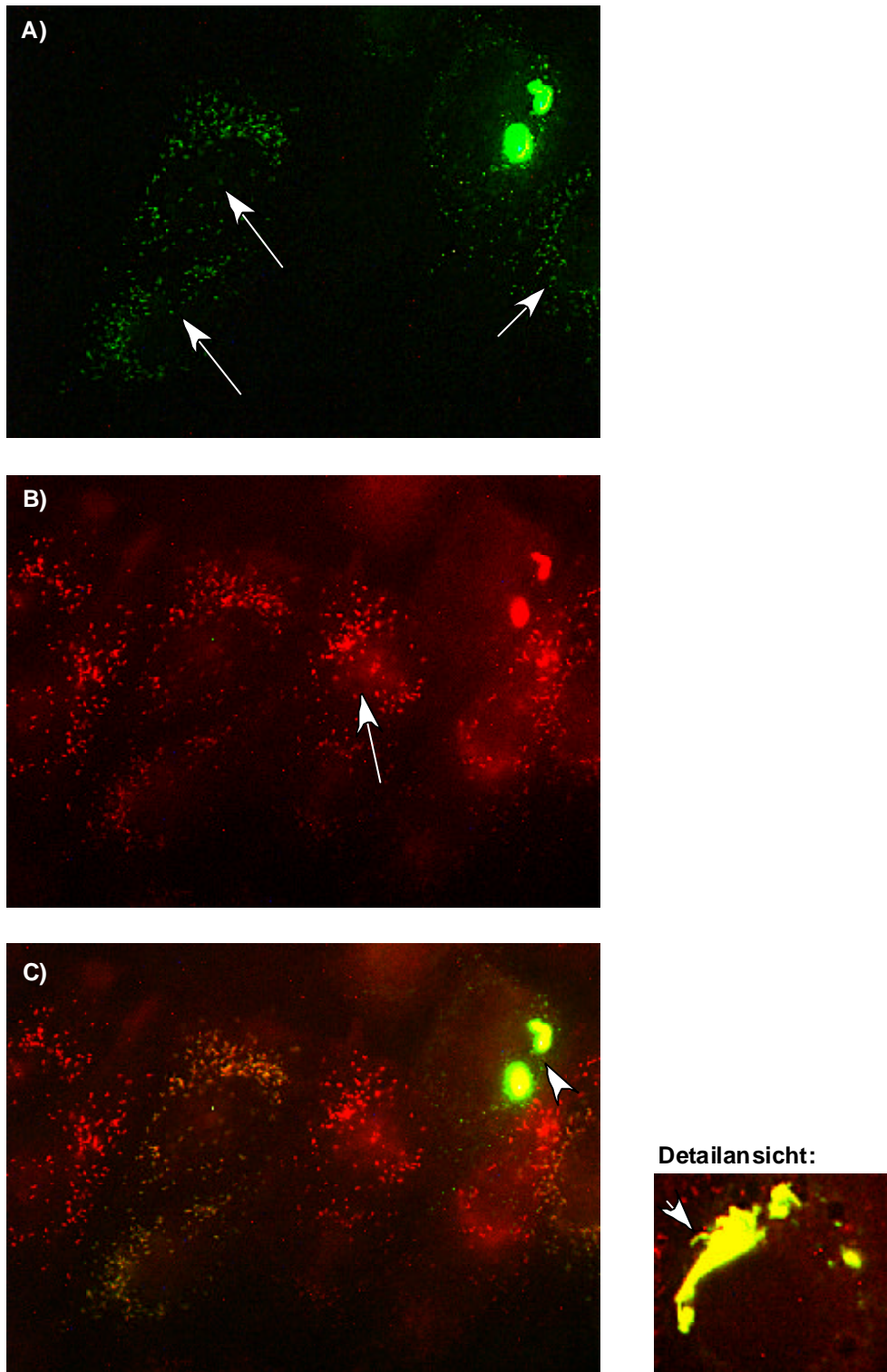
### **4.3.3.2 Expression von Pex11-1-YFP**

Zur Überprüfung eines eventuellen Einflusses eines angefügten Markers auf die Funktion des C-Terminus von Pex11-1 wurde YFP verwendet, das genauso groß wie CFP ist, da es sich bei





**Abb. 6-1: Expression von CFP-Pex11-1 in CHO-Zellen:** 20h nach Mikroinjektion von CFP-Pex11-1-cDNA in CHO-Zellen entstehen tubuläre Peroxisomen (Pfeil in B). Peroxisomen in den nicht injizierten Zellen daneben bleiben granulär ( visualisiert durch indirekte Immunfluoreszenz: anti-Pmp69 (aus Kaninchen), danach anti-Kaninchen-TRITC, Pfeilköpfe in A+B). In (A) ist in der oberen Zelle in Kernnähe ein kleines peroxisomales Cluster zu sehen (Pfeil).



**Abb. 6-2: Überexpression von Pex11-1-YFP in CHO-Zellen erzeugt nach 20h bei 33% der transfizierten Zellen Clusterformation:** In etwa zwei Drittel der transfizierten CHO-Zellen bleibt die peroxisomale Morphologie unverändert (A: Pfeile; Vgl. untransfizierte Zelle: Pfeil in B) und in einem Drittel der Fälle werden große Cluster ausgebildet (C: Pfeilkopf). Gezeigt werden die YFP-Fluoreszenz der überexprimierenden Zellen (A), die indirekte Gegenfärbung für Pmp69 mit TRITC-gekoppeltem Antikörper (B) und der Overlay beider Farbkanäle (C). Die Detailansicht zeigt, daß die Cluster an aufgelockerten Stellen eine tubuläre Struktur aufweisen (Pfeil).

beiden Markern um Varianten von GFP handelt. Das C-terminale Dilysinmotiv in Pex11-1 wird durch diesen Marker maskiert.

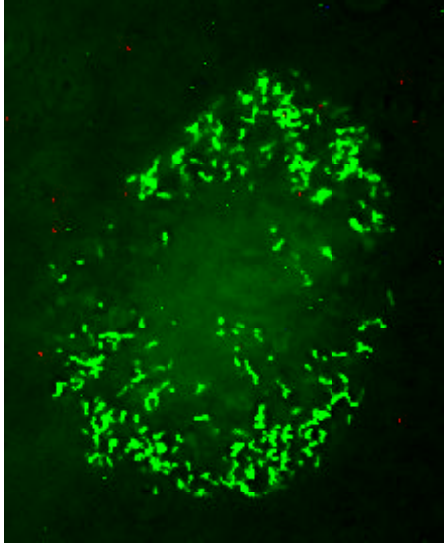
Die Fusion von YFP an das C-terminale Ende von Pex11-1 liefert ein heterogenes Expressionsmuster in CHO-Zellen. Etwa ein Drittel der Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert wurden, zeigen nach 20-48h Expression große, flächige peroxisomale Cluster (Abb. 6-2), die aus einer kompakten Anhäufung von peroxisomalen Tubuli bestehen. Dies ist an einigen Stellen zu sehen, an denen dieses Geflecht nicht so dicht, sondern eher etwas aufgelockert vorliegt (Abb. 6-2 / Detailansicht). Die Cluster liegen bevorzugt in Kernnähe.

Die restlichen zwei Drittel der transfizierten Zellen importieren zwar das Fusionsprotein in die Peroxisomen, diese zeigen jedoch keine morphologische Veränderung.

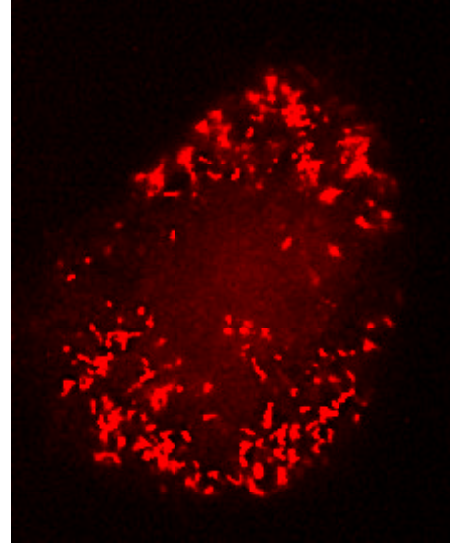
Im Gegensatz zum N-terminal markierten Pex11-1-Konstrukt zeigen hier nicht alle transfizierten Zellen einen veränderten peroxisomalen Phänotyp, jedoch sind die peroxisomalen Cluster in den Zellen die eine Veränderung aufweisen deutlich größer, als bei CFP-Pex11-1. Der dominierende Phänotyp in CHO-Zellen, die CFP-Pex11-1 exprimieren, sind peroxisomale Tubuli.

Definiert man die Ausformung von peroxisomalen Clustern als ein Maß für die Inhibierung der Funktion der Termini von Pex11-1 durch Marker, so zeigt sich, daß das C-terminale Dilysinmotiv in Pex11-1 von zentraler Bedeutung ist. Die durch CFP-Pex11-1 erzeugten peroxisomalen Tubuli könnten als Vorstufe zur Clusterformation aufgefaßt werden, da die Cluster eine tubuläre innere Struktur aufweisen und da dieses Konstrukt bereits kleine Cluster erzeugt. Die Maskierung des N-Terminus bei CFP-Pex11-1 reicht aber offenbar nicht aus, um große Cluster zu erzeugen.

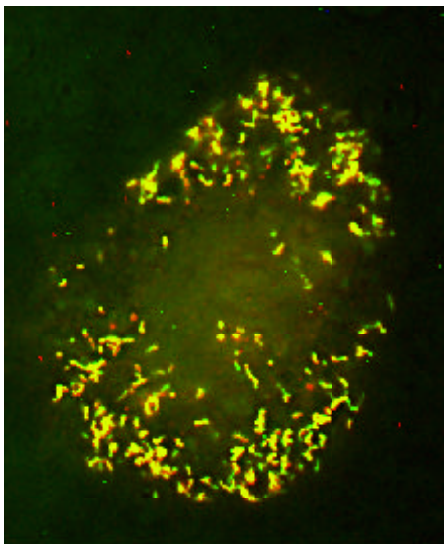
Die Dissoziation der Mikrotubuli durch Nocodazol unterbindet ein Clustern der Peroxisomen nach 22-48h Expression von Pex11-1-YFP (Abb.6-3). Die Dissoziation des Aktinskelettes durch Cytochalasin B hat aber keinen Effekt auf die Ausbildung von peroxisomalen Clustern (Vgl. s.o. und Kapitel 4.4.3.2).



11-1-YFP

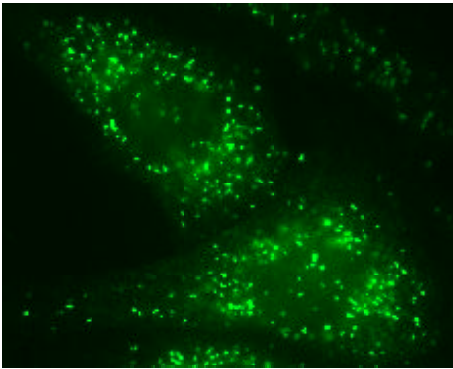


Pmp69=TRITC

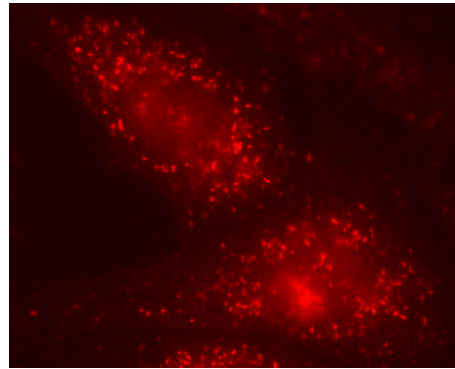


Overlay

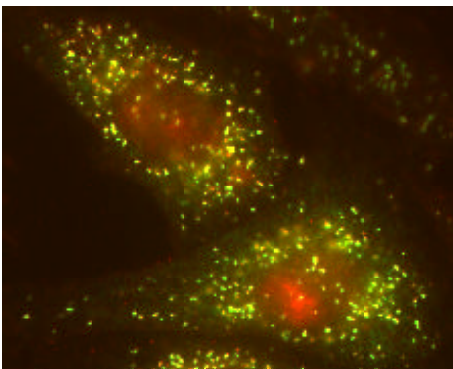
**Abb. 6-3 : Überexpression von Pex11-1-YFP in CHO-Zellen erzeugt in Gegenwart von 10 ug/ml Nocodazol keine Cluster mehr:** In einem Drittel der transfizierten Zellen wurden ohne Inhibitor-Einfluß große Cluster ausgebildet (Abb. 6-2). Nach 23h Überexpression des Pex11-1-YFP in Gegenwart von 10 ug/ml Nocodazol werden nur noch tubuläre Peroxisomen erzeugt. Offenbar sind intakte Mikrotubuli die Voraussetzung zur Clusterbildung. Gezeigt werden die YFP-Fluoreszenz der überexprimierenden Zelle, die indirekte Gegenfärbung für Pmp69 mit TRITC-gekoppeltem Antikörper und der Overlay beider Farbkanäle.



**Myc-Pex11-1=FITC**

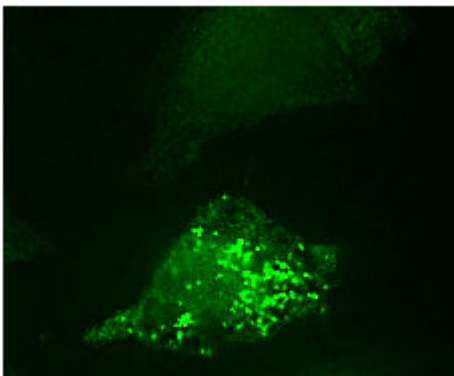


**Pmp69=TRITC**

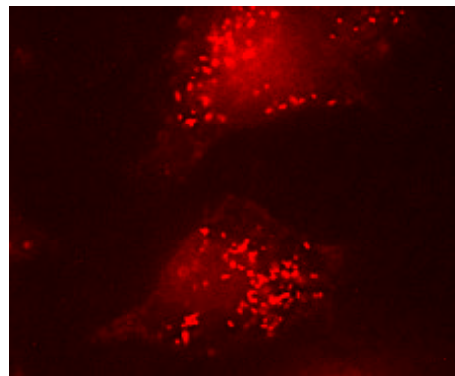


**Overlay**

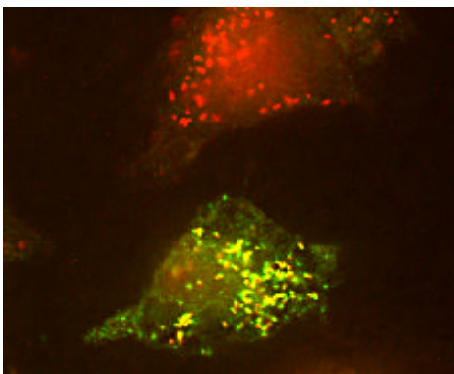
**Abb. 7-1: Expression von Myc-Pex11-1 in CHO-Zellen:** Gezeigt wird ein selektionierter Zell-Klon, der das rekombinante Protein stabil exprimiert. Die Peroxisomen bleiben unverändert. Die Organellen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Anti-Pmp69 (aus Kaninchen), danach anti-Kaninchen-TRITC und anti-Myc (Maus), danach anti-Maus-FITC.



**Myc=FITC**



**Pmp69=TRITC**



**Overlay**

**Abb. 7-2: Expression von Myc(N-74)-Pex11-1 in CHO-Zellen:** Gezeigt wird eine Zelle nach 24h Expression. Die Peroxisomen bleiben, wie in der darüber liegenden, nicht transfizierten Zelle, unverändert. Das Konstrukt wird aber in die Peroxisomen-Membran inseriert. Die Organellen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Anti-Pmp69 (aus Kaninchen), danach anti-Kaninchen-TRITC oder anti-Myc (Maus), im Anschluß anti-Maus-FITC.

### **4.3.3.3 Expression von Pex11-1-Konstrukten mit angefügtem Myc-Epitop**

In den vorliegenden Experimenten war keine Veränderung des peroxisomalen Phänotyps der verwendeten AT3- oder CHO-Zellen durch die Transfektion von Pex11-1-Konstrukten mit angefügtem Myc-Epitop zu beobachten. Es spielte dabei keine Rolle, ob diese verkürzt oder unverkürzt waren (Abb. 3, Abb. 7-1 und Abb. 7-2). Hierzu wurden folgende Konstrukte verwendet: Myc-Pex11-1, Pex11-1-Myc, Myc-(N -74)-Pex11-1. Die Expression der C-terminal verkürzten Konstrukte und derer mit C-terminalem Myc gelang bisher nicht und steht noch aus.

Auch wenn keine Veränderung des peroxisomalen Phänotyps entsteht, stellt dies ein Resultat dar: die Verwendung eines kleineren Markers als CFP oder YFP reicht bei Pex11-1 offensichtlich nicht aus, um die Termini in ihren Funktionen sterisch zu inhibieren. Die durch CFP-Pex11-1 erzeugten peroxisomalen Tubuli in CHO-Zellen und die peroxisomalen Cluster, wie sie durch Pex11-1-YFP verursacht werden, sind nach Myc-Pex11-1-Expression nicht zu beobachten (Abb. 7-1).

Das N-terminal verkürzte Myc-(N -74)-Pex11-1 wird trotz Entfernung des PTS2 in die Peroxisomenmembran inseriert (Abb. 7-2). Folglich besitzt dieses PTS2 für Pex11-1 keine Targeting-Funktion.

## **4.4 Expression der Pex11-2-cDNA-Konstrukte**

Zur Untersuchung der Funktion von Pex11-2 wurde ganz ähnlich wie bei Pex11-1 verfahren. Es wurden unmarkierte , markierte und verkürzte cDNA-Konstrukte eingesetzt. Als Zellsysteme dienten wieder CHO- und AT3-Zellen.

#### **4.4.1 Expression des wt-Pex11-2**

Bei der Expression (22-48h) von Pex11-2, sowohl in CHO- als auch in AT3-Zellen, ist der Peroxisomen-proliferierende Effekt erheblich stärker als bei Pex11-1 und liegt bei einer ca. 10-fachen Vermehrung der Organellen. Ähnliches wurde auch in anderen Zell-Linien beobachtet (Schrader et al., 1998; Li und Gould, 2002).

Außer der Vermehrung von Peroxisomen führt die Expression von Pex11-2 zu einer morphologischen Veränderung der Organellen. In CHO-Zellen werden die Peroxisomen deutlich kleiner, d.h. sie sind etwa ein Fünftel so groß wie zuvor. Außerdem liegen nun keine Komma-förmigen Peroxisomen mehr vor, sondern nur noch sphärisch geformte (Abb. 8-1).

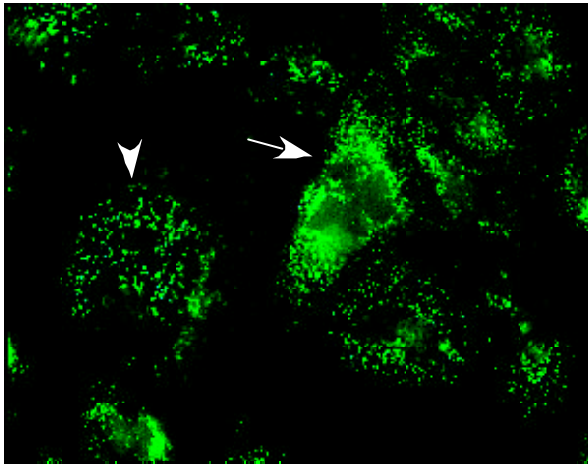
In AT3-Zellen werden die natürlicherweise vorkommenden peroxisomalen Tubuli in der Weise verändert, daß diese fragmentiert werden, wobei kurze, Komma-artige Strukturen entstehen, von denen die überexprimierenden Zellen fast vollständig ausgefüllt werden (Abb. 8-1).

In beiden verwendeten Zellsystemen wird durch die Transfektion von wt-Pex11-2 eine starke Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes induziert. Da in den transfizierten Zellen etwa das 10fache der ursprünglich vorhandenen Peroxisomen erzeugt wird und wt-Pex11-1 die Peroxisomenzahl nur etwa verdoppelt, ist der Proliferationseffekt von Pex11-2 etwa fünfmal stärker als der von Pex11-1.

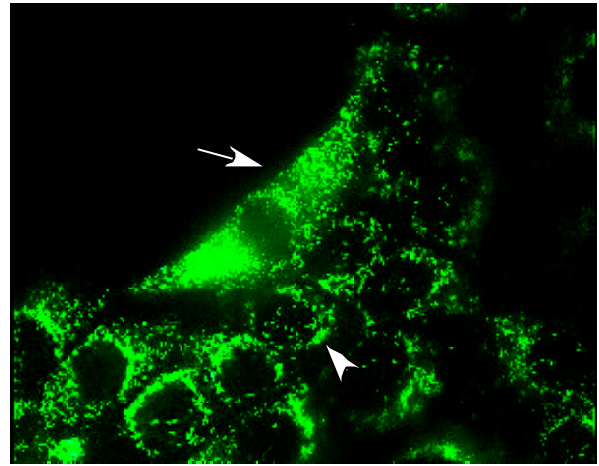
Diese Experimente bilden den Ausgangspunkt für die folgenden Versuche. Sie demonstrieren die ursprüngliche Situation bei der Expression von unmarkiertem, unverkürztem und damit vollständig funktionsfähigem Pex11-2. Zur Untersuchung der Funktion von Pex11-2 wurden zunächst Verkürzungen vorgenommen.

#### **4.4.2 Expression von unmarkierten, verkürzten Pex11-2-Konstrukten**

Da dem cytosolisch orientierten N- und C-Terminus von Pex11-2 durchaus eine funktionelle Bedeutung zukommen könnte, bot sich eine Untersuchung jener Konstrukte an, die um eben

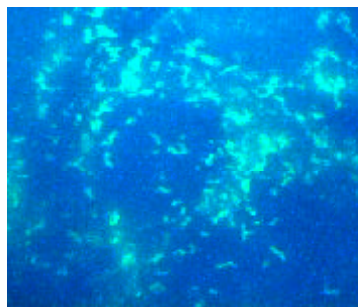


**CHO-Zellen**

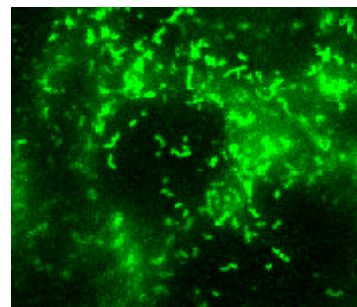


**AT3-Zellen**

**Abb.8-1: Pex11-2 induziert peroxisomale Proliferation in CHO- und AT3-Zellen:** Zu sehen ist das peroxisomale Markerprotein Pmp69 nach der indirekten Anfärbung mittels Immunfluoreszenz (Kaninchen-anti-Pmp69, Ziege-anti-Kaninchen-FITC). Deutlich ist die Zunahme peroxisomaler Strukturen zu sehen, nachdem das unveränderte Wildtypmolekül in einzelne Zellen mikroinjiziert und in der Folge 22h überexprimiert wurde. Neben den transfizierten Zellen (Pfeile) liegen unveränderte Wildtypzellen (Pfeilköpfe) mit natürlichem peroxisomalem Phänotyp.

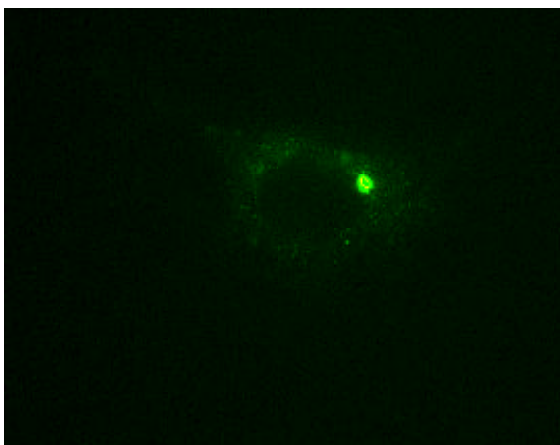


**BSA-AMCA-blue**

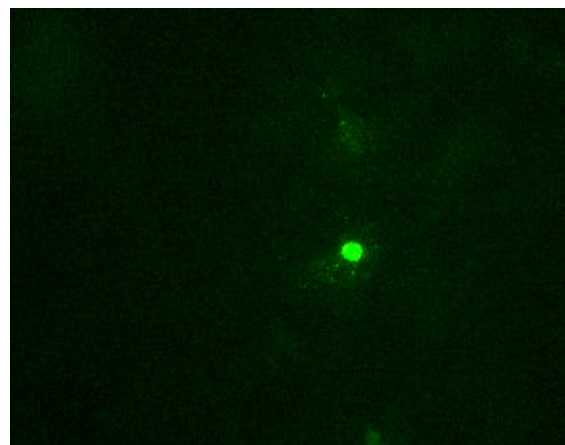


**Pmp69=FITC**

**Abb.8-2: (N -24)-Pex11-2 induziert keine peroxisomale Proliferation in AT3-Zellen:** Nach Verkürzung des Pex11-2 um die ersten 24 Aminosäuren wird 23h nach Expression der cDNA keine peroxisomale Proliferation induziert. Die Peroxisomen wurden wie in Abb. 8-1 über Pmp69 visualisiert. Zur Identifizierung transfizierter Zellen wurde AMCA-blue-gekoppeltes BSA coinjiziert. Die Überlagerung beider Farbkanaäle ist im linken Bild zu sehen.



**CHO-H1**



**AT3**

**Abb. 9: GFP-Pex11-2 induziert peroxisomale Aggregation (Clustering) in Säugerzellen:** Die linke Abbildung zeigt einen stabil exprimierenden selektierten CHO-Zellklon, in der rechten Abbildung ist eine mikroinjizierte AT3-Zelle zu sehen (16h Expression). Es handelt sich hier um die GFP-Fluoreszenz lebender Zellen. Die stark leuchtenden Cluster liegen in Kernnähe, im Hintergrund sind noch verbleibende singuläre Peroxisomen vorhanden. Je Zelle existiert ein großes Cluster.



diese Termini verkürzt wurden. Die folgenden cDNA-Konstrukte wurden durch Mikroinjektion in CHO- und AT3-Zellen eingebracht: (N -24)-Pex11-2, Pex11-2(C -4) und (N -24)-Pex11-2-(C -4).

Wurden N- und / oder C-terminal verkürzte Varianten von Pex11-2 transfiziert, so ergab sich abermals das Problem der Identifizierung der mikroinjizierten Zellen. Es wurden daher wieder mit alphanumerischen Rastern versehene Deckgläser für die Kultivierung und Immunfluoreszenz-Analyse der Zellen benutzt, und jene Areale notiert, die für die Mikroinjektion herangezogen wurden. Doch nach Auswertung durch Immunfluoreszenz konnte in diesen Arealen nach 14h-48h Expression für keines der verwendeten cDNA-Konstrukte phänotypische Veränderungen festgestellt werden. Wiederum wurde die Differenzierung der injizierten Zellen von nichtinjizierten Zellen durch die Coinjektion von BSA, an das ein Fluoreszenzfarbstoff (AMCA-blue (Pierce), Fluos oder TRITC (beide von Sigma)) angekoppelt wurde, versucht. Als lichtstabilste Farbstoffe erwiesen sich das blau fluoreszierende AMCA-blue und das grün fluoreszierende Fluos. Aber selbst diese Farbstoffe bleichten bei der Betrachtung immer noch zu rasch aus.

Anhand einiger identifizierter Zellen (Abb. 8-2) kann aber gesagt werden, daß die Entfernung sowohl des N-terminalen, wie auch des C-terminalen Endes die Induktion der Proliferation von Peroxisomen verhindert, da in diesen Ansätzen jeglicher Einfluß durch einen an das Originalmolekül angefügten Marker entfällt. Folglich enthalten entweder beide Termini von Pex11-2 eine funktionell wichtige Domäne, oder durch die Entfernung von jeweils einem Terminus wird die räumliche Struktur des Moleküls derart verändert, daß es nicht länger seine ursprünglichen Funktionen erfüllen kann. Möglicherweise führt die Verkürzung dazu, daß keine Expression der Konstrukte stattfindet, weshalb auch kein Einfluß durch ein rekombinantes Produkt erzeugt wird. Eine Zell-Identifizierung über einen möglicherweise besser geeigneten Fluoreszenzfarbstoff steht noch aus.

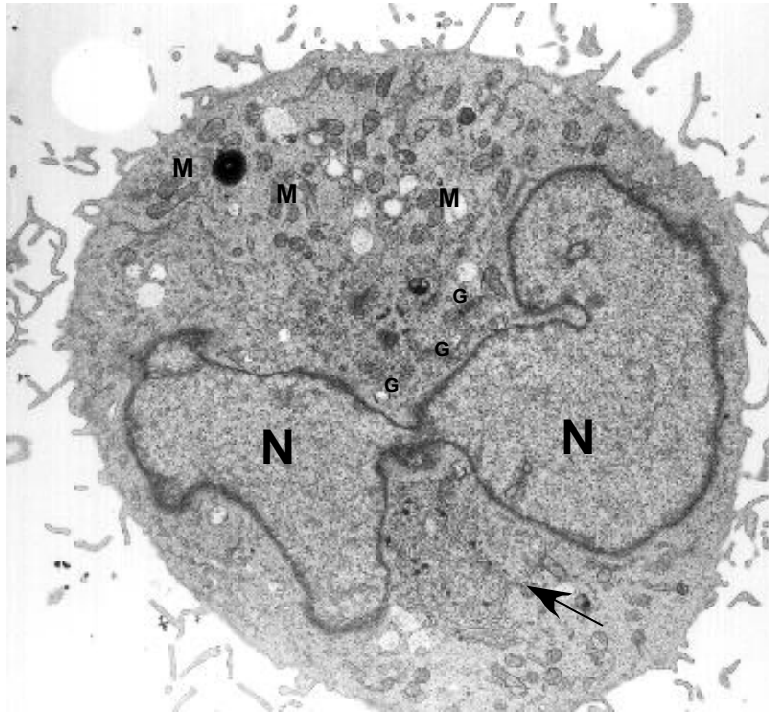
Da sich die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem BSA zur Zell-Identifizierung als umständlich und nicht sehr zuverlässig erwies, wurden, um eine eindeutige Identifizierung der rekombinanten Konstrukte in der Zelle zu ermöglichen, Fusionsproteine hergestellt. Sowohl die Expression als auch die Lokalisation dieser Konstrukte sind so leicht nachweisbar.

#### **4.4.3 Expression von (E)GFP-Pex11-2-Fusionsproteinen**

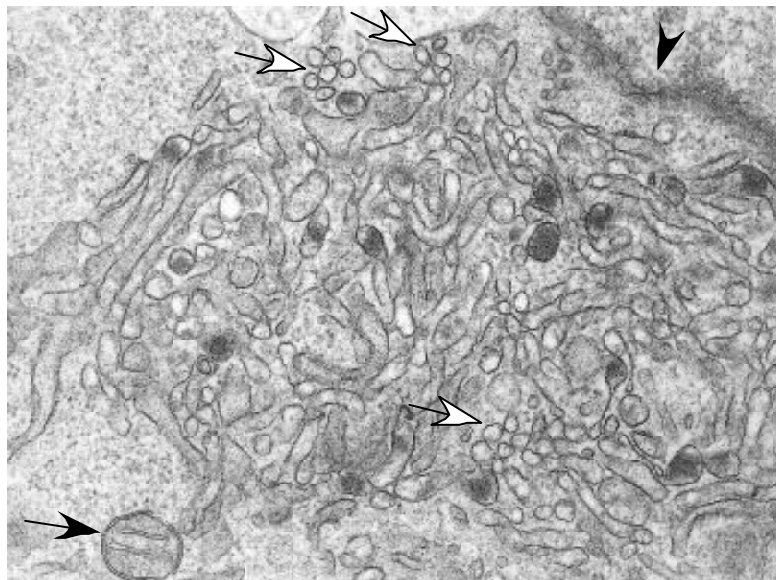
Um die Vorgänge bei der Proliferation *in vivo* analysieren zu können, wurden cDNA-Konstrukte erstellt, bei denen an den N- bzw. den C-Terminus für GFP oder EGFP codierende cDNA fusioniert wurde (Abb. 4). Dies ermöglicht eine rasche Identifizierung jener Zellen, die das exogene, rekombinante Genprodukt exprimieren und erlaubt die Charakterisierung phänotypischer und insbesondere kinetischer und morphologischer Veränderungen in der lebenden Zelle. Die Verwendung von GFP- oder EGFP als Fusionspartner resultierte in ganz ähnlichen Effekten auf das peroxisomale System. Die EGFP-Expressionsprodukte zeichneten sich jedoch durch eine höhere Fluoreszenzstabilität aus.

##### **4.4.3.1 Expression von (E)GFP-Pex11-2 und die Bildung peroxisomaler Cluster**

GFP-Pex11-2 induziert sowohl in CHO- als auch in AT3-Zellen innerhalb von 6-8 Stunden eine peroxisomale Clusterbildung. In den transfizierten Zellen ist jeweils meist ein dominierendes Cluster in der Nähe des Nukleus zu sehen. Nicht alle peroxisomalen Strukturen einer Zelle befinden sich in dem Cluster. Außerhalb des Clusters sind in den transfizierten Zellen weiterhin vereinzelt Peroxisomen mit normaler Morphologie aufzufinden, die neben dem stark leuchtenden Cluster allerdings oft nur schwer zu erkennen sind (Abb. 9). In der elektronenmikroskopischen Feinauflösung ist zu beobachten, daß das Cluster hauptsächlich aus relativ dicht gepackten peroxisomalen Tubuli besteht, und nicht aus

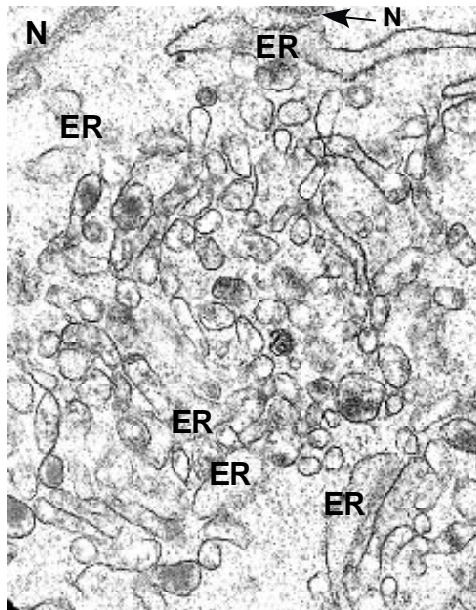


**Abb. 10 A: Stabiler GFP-Pex11-2-Zellklon:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnittes durch eine CHO-Zelle, die ständig GFP-Pex11-2 exprimiert. In der Mitte unter dem Zellkern (N) ist das peroxisomale Cluster zu erkennen, welches sich eng an den Kern anschmiegt (Pfeil). Oberhalb des Kerns sind zahlreiche Mitochondrien (M) und Golgistructuren zu sehen (G). Letztere sind deutlich feiner strukturiert als das im Vergleich dazu relativ grob-tubuläre peroxisomale Cluster.

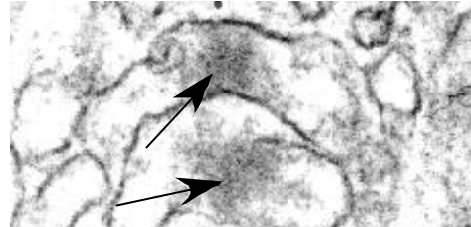


**Abb. 10 B: Detailansicht eines peroxisomalen Clusters:** Vergrößerte Ansicht des Clusters aus der obigen Übersichtsabbildung. Deutlich ist die tubuläre innere Organisation des Clusters zu erkennen. Unten links ist ein in der Nähe liegendes Mitochondrium zu sehen (Pfeil). Der Pfeilkopf kennzeichnet ein hier sichtbares Stück der Membran. Im Querschnitt sind die Tubuli zu Bündeln mit hexagonaler Organisationsstruktur zusammengefaßt (weiße Pfeile). Im Vergleich zu oben wurde das Bild um etwa 45° im Gegenuhzeigersinn gedreht.

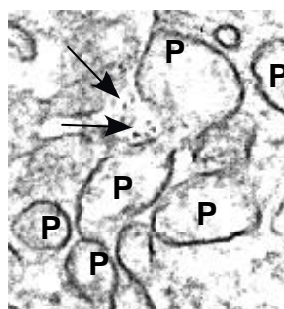
## Detailansichten zu verschiedenen Aspekten des Clustering



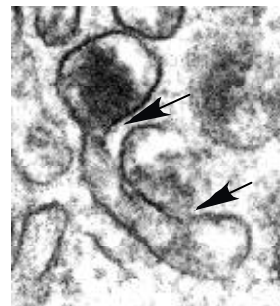
**Abb. 10 C:** Das peroxisomale Cluster ist **von ER umgeben**, insbesondere in Richtung zum Kern (N, der Pfeil deutet auf einen Abschnitt der Kernmembran).



**Abb. 10 D: Heterogene Katalaseverteilung** innerhalb der peroxisomalen Tubuli: die Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher Katalasekonzentration. Die Katalase wurde als Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin visualisiert.

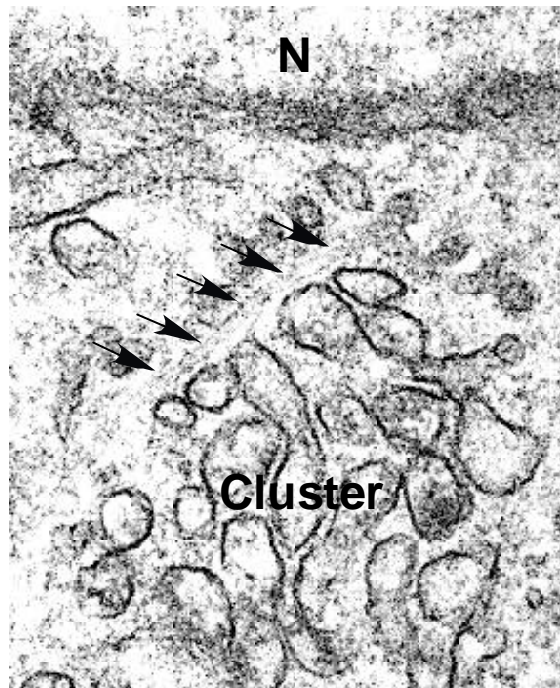


**Abb. 10 F:** Die Pfeile deuten auf querschnittene **Intermediärfilamente**, die durch das peroxisomale Cluster (P) ziehen. Man beachte die dichte Assoziation des Tubulus an das Filament.

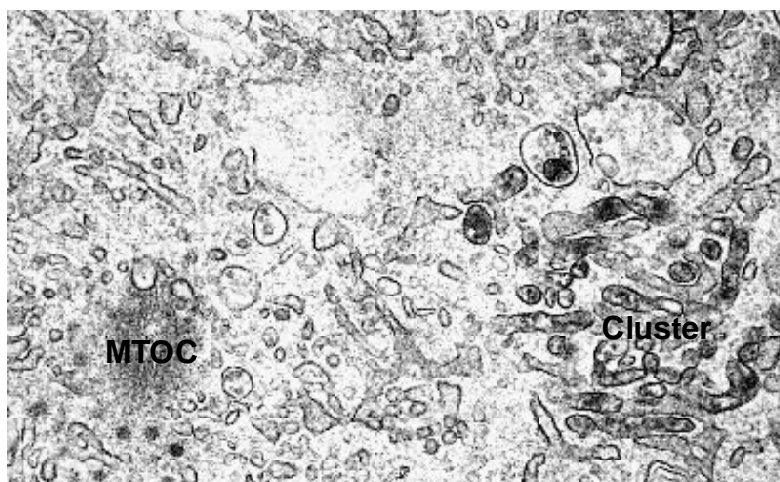


**Abb. 10 E:** Die Tubuli weisen **Konstriktionen** auf (Pfeile), die eine Vorstufe auf dem Weg zur Abschnürung von peroxisomalen Vesikeln darstellen könnte.

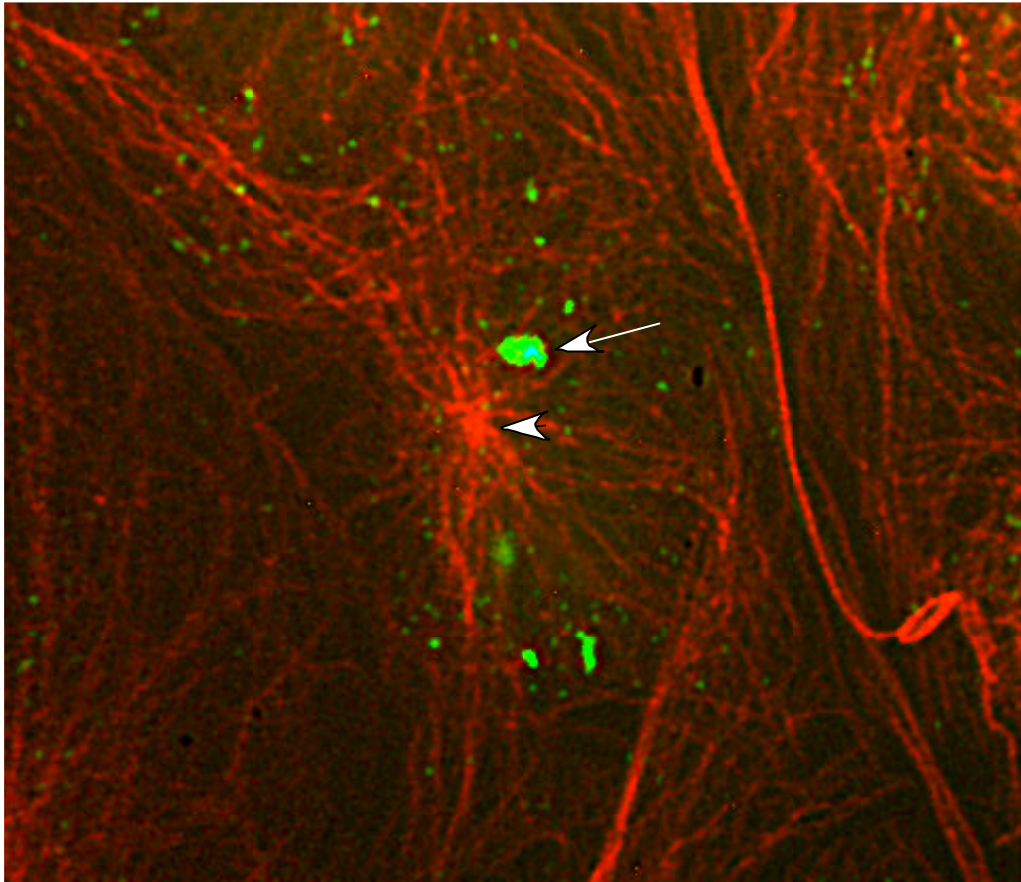
## Detailansichten zur Rolle mikrotubulärer Strukturen beim Clustering



**Abb. 10 G:** Die Pfeile markieren den Verlauf eines längsgeschnittenen **Mikrotubulus**, der durch das Cluster zieht. Die Querschnitte der Tubuli im Cluster sind längs dieses Mikrotubulus angeordnet. Der Anschnitt der Kernmembran (N) zeigt die Nähe des Clusters zum Nukleus.



**Abb. 10 H:** Häufig liegen Cluster in räumlicher **Nähe zum MTOC** (Microtubuli Organizing Center). Da hier Mikrotubuli gehäuft vorliegen, erscheint die Entstehung des Clusters in Abhängigkeit von diesen Cytoskelett-Strukturen wahrscheinlich. Außerdem spricht dies für einen retrograden Transport der Peroxisomen ins Zellinnere, zum Minus-Ende der Mikrotubuli.



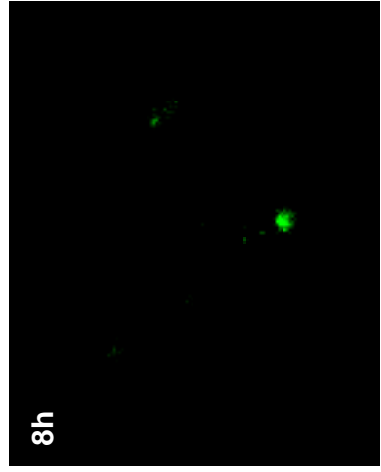
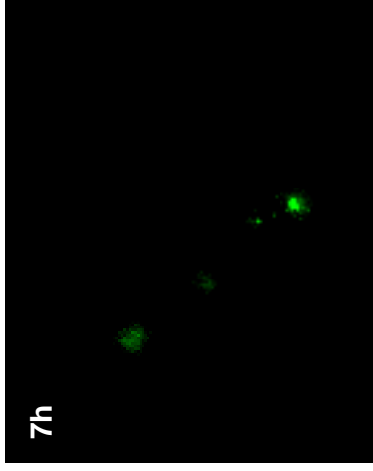
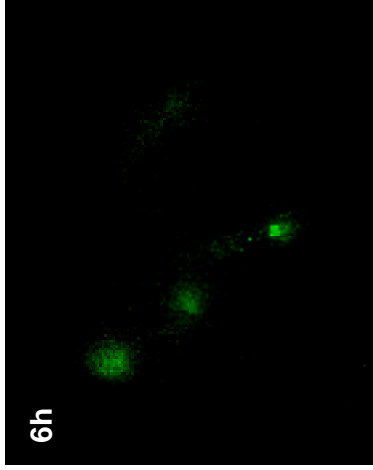
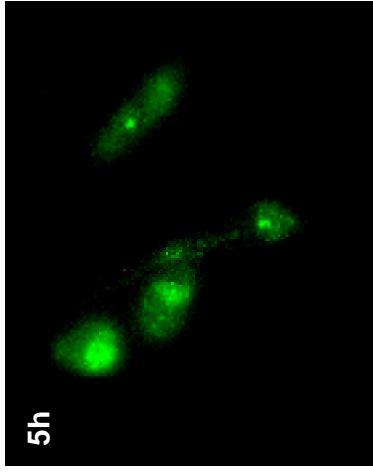
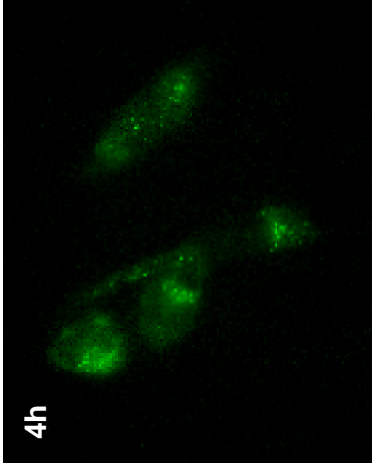
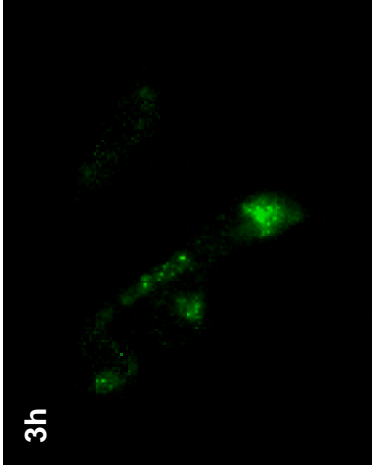
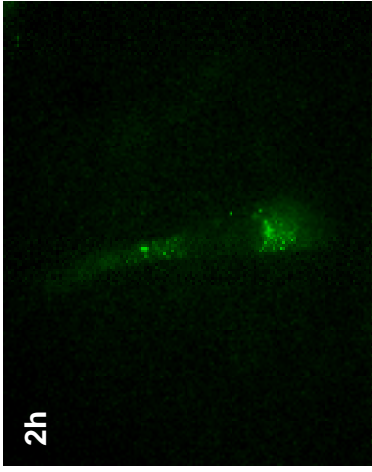
**Abb. 11: Mikrotubuli durchziehen die peroxisomalen Cluster und kleinere peroxisomale Strukturen sind an sie assoziiert.** Es wurde ein CHO-Zellklon analysiert, der stabil GFP-Pex11-2 exprimiert. Das große peroxisomale Cluster (Pfeil) liegt nahe am MTOC (Pfeilkopf). Die im Hintergrund sichtbaren kleinen peroxisomalen Strukturen sind grundsätzlich an Mikrotubuli assoziiert. Peroxisomale Strukturen zeigen GFP-Fluoreszenz, Mikrotubuli wurden gegen Tubulin indirekt mit TRITC angefärbt.

den kleinen, sphärischen Peroxisomen, wie sie in den CHO-Zellen normalerweise vorkommen. Abb. 10 A zeigt in der Übersicht die Lage des Clusters nahe am Kern. Bei höherer Auflösung (Abb. 10 B) ist zu erkennen, daß die im Cluster enthaltenen Peroxisomen kompakt und tubulär strukturiert vorliegen. Die Tubuli sind im Querschnitt zu hexagonalen Bündeln zusammengefaßt (Abb. 10 B) Auch sind die Cluster, vor allem in Richtung zum Kern, mehr oder weniger vollständig von rauhem ER umgeben (Abb. 10 C). Die Katalase, bzw. deren Reaktionsprodukt mit Diaminobenzidin, in den peroxisomalen Tubuli des Clusters ist heterogen verteilt (Abb. 10 D), welches eine Ausbildung von Microdomänen darstellen könnte. Auch enthalten diese Tubuli Konstriktionen (Abb. 10 E) was neben den Microdomänen auf eine inhibierte Vesikulierung hinweisen könnte.

Weiterhin ist zu beobachten, daß das Cluster sowohl von Mikrotubuli als auch von Intermediärfilamenten (Abb. 10 F) durchzogen ist, wobei die Peroxisomen an diese Strukturen assoziiert erscheinen (Abb. 10 G, Abb. 10 H und Abb. 11). Dieser Umstand weist auf eine Beteiligung des Cytoskeletts bei der Clusterformation hin. Um dies zu überprüfen wurden Experimente mit geeigneten Inhibitoren durchgeführt.

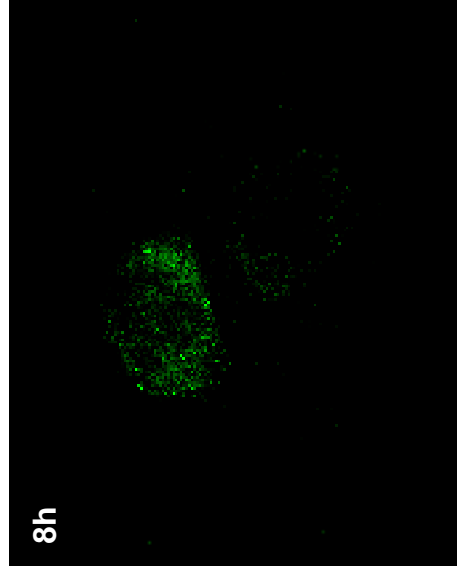
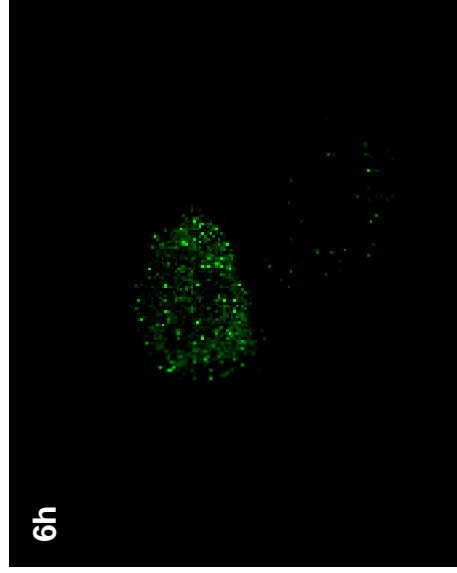
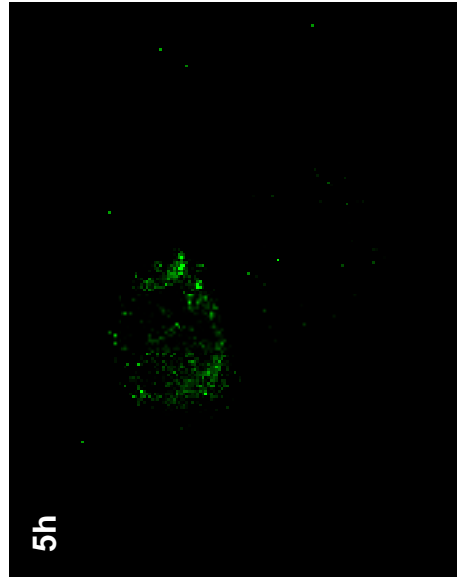
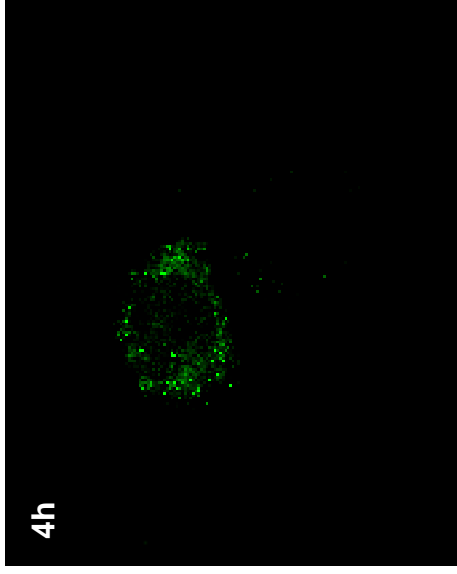
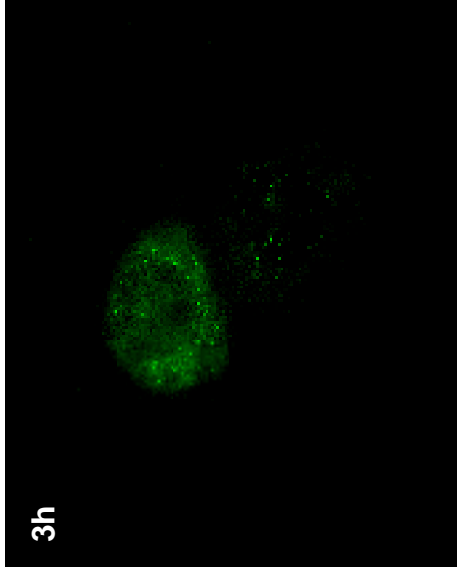
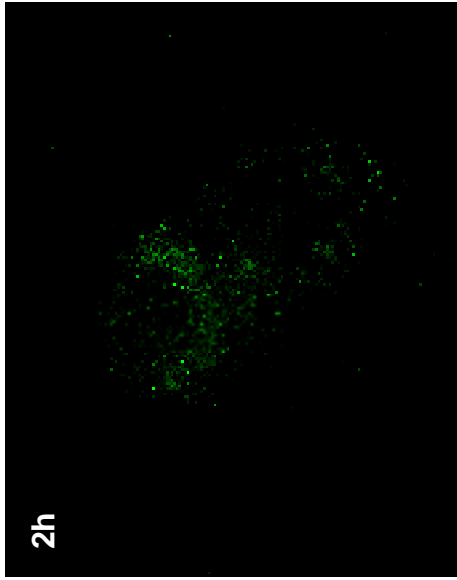
#### **4.4.3.2 Cytoskelettabhängigkeit der peroxisomalen Clusterbildung**

Die Tatsache, daß mikrotubuläre Strukturen das peroxisomale Cluster durchziehen, legt den Schluß nahe, daß Mikrotubuli bei der Ausbildung des Clusters eine Rolle spielen. Auch der zeitliche Verlauf der Clusterbildung - innerhalb von 6-8h nach erfolgter Transfektion von GFP-Pex11-2 - ist mit einer Beteiligung von Mikrotubuli als bestimmendem Element vereinbar. Aus diesen Gründen wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Clusterbildung untersucht und danach die Frage gestellt, ob Mikrotubuli an dieser intrazellulären Peroxisomenkonzentrierung beteiligt sind. Grundsätzlich denkbar wäre auch ein Abbau bestehender peripherer Peroxisomen - etwa durch Autophagie - und eine Neubildung von Peroxisomen in einem kernnahen Kompartiment, sowie eine durch das GFP-Pex11-2-

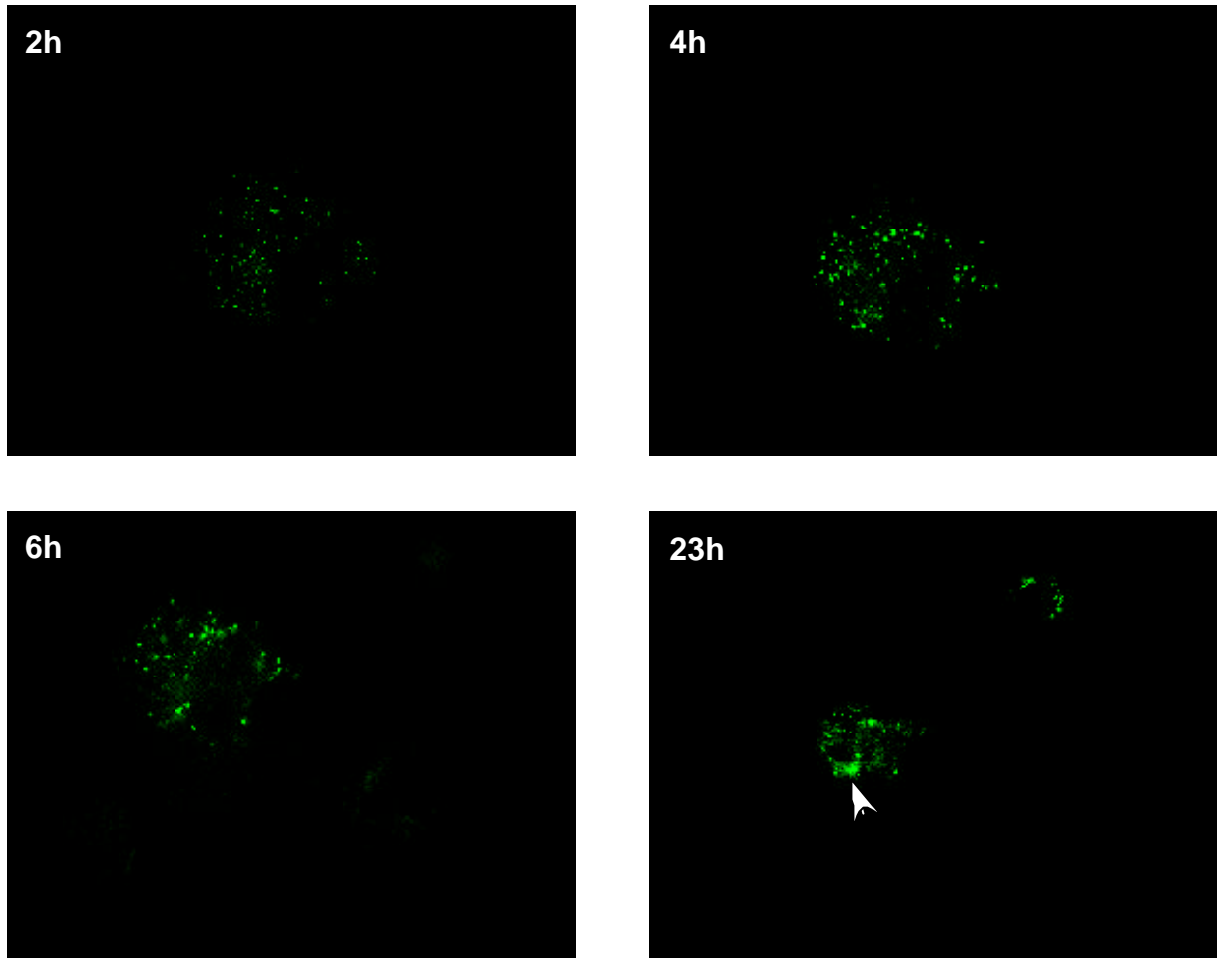


**Abb.12: GFP-Pex11-2 Cluster-Kinetik in CHO-Zellen (2,3,4,5,6,7 und 8h ohne Inhibitoren).** Es handelt sich hier um die GFP-Fluoreszenz von lebenden Zellen. 2 Stunden nach der Mikroinjektion des cDNA-Konstruktes ist ein Import von GFP-Pex11-2 in anfänglich singuläre Strukturen zu sehen, die sich im Verlauf von 8 Stunden nach und nach zu einem großen peroxisomalen Cluster in Kernnähe vereinigen.





**Abb.13: GFP-Pex11-2 Cluster-Kinetik in CHO-Zellen (2,3,4,5,6 und 8h mit 10ug/ml Nocodazol).** Es handelt sich hier um die GFP-Fluoreszenz von lebenden Zellen. 2 Stunden nach der Mikroinjektion des cDNA-Konstruktes ist ein Import von GFP-Pex11-2 in singuläre peroxisomale Strukturen zu sehen, die sich hier nach 8 Stunden - aufgrund der Zerstörung der Mikrotubuli - nicht zu peroxisomalen Clustern vereinigt haben. Nach einer vergleichbaren Zeitspanne sind also immer noch einzeln vorliegende peroxisomale Strukturen vorzufinden und keine Cluster wie sie in Abb. 12 zu sehen sind.



**Abb.14: GFP-Pex11-2 Cluster-Kinetik in CHO-Zellen (2,4,6 und 23h mit 10ug/ml Cytochalasin B):**

Es handelt sich hier um die GFP-Fluoreszenz von lebenden Zellen. 2h nach der Mikroinjektion des cDNA-Konstruktes ist die Insertion von GFP-Pex11-2 in singuläre peroxisomale Strukturen zu sehen, die sich hier erst nach 23 Stunden - trotz der Zerstörung des Aktinskelettes - zu kleinen, peroxisomalen Clustern in Kernnähe zusammenfinden (Pfeil). Es liegt jedoch kein so großes Cluster wie in transfizierten Zellen ohne Inhibitorbehandlung vor.

Konstrukt verhinderte Ausbreitung dieser Organellen innerhalb der Zelle. In diesem Falle sollten sich jedoch Anzeichen einer vermehrten Autophagie in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen finden lassen, was allerdings nicht der Fall ist.

Bereits 2h nach Mikroinjektion von GFP-Pex11-2 in CHO-Zellen kann die Insertion des GFP-Konstruktes in die bis dahin granulären Peroxisomen beobachtet werden. Im Verlauf von 6-8 h verdichten sich diese singulären Strukturen nach und nach zu einem peroxisomalen Cluster, das sich meist in Kernnähe ausbildet (Abb. 12).

Dieser Prozeß scheint stark von der Präsenz intakter Mikrotubuli abzuhängen. Die Dissoziation der Mikrotubuli durch Inkubation der Zellen mit Nocodazol (10 µg/ml) – beginnend 30 Minuten vor Mikroinjektion von GFP-Pex11-2 - führt dazu, daß im vergleichbaren Zeitraum keine Cluster mehr formiert werden. In diesen mit Nocodazol vorinkubierten Zellen wird zwar weiterhin GFP-Pex11-2 in die peroxisomale Membran inseriert, aber die intrazelluläre Verteilung und das morphologische Erscheinungsbild der Organellen unterscheidet sich nicht von dem der unbehandelten Kontrollen (Abb. 13).

Da neben den Mikrotubuli auch noch andere filamentöse Strukturen der Zelle einen Einfluß auf die Ausbildung der Cluster haben könnten, wurden beispielhaft die Aktinfilamente untersucht.

Die Dissoziation des Aktinskelettes durch Inkubation mit Cytochalasin B (10 µg/ml) kann allerdings nicht das Clustern von Peroxisomen verhindern, was wohl den Schluß zuläßt, daß dem Aktinskelett keine oder nur eine geringe Bedeutung bei diesem Prozeß zukommt (Abb. 14).

#### 4.4.3.3 N-terminale Verkürzung von EGFP-Pex11-2

Auch im Falle des Pex11-2-Moleküls wurde der Frage nachgegangen, ob bestimmten Molekülabschnitten Funktionen zugeordnet werden können.

Diese Frage wurde auch auf die Ausbildung der peroxisomalen Cluster durch GFP-Pex11-2 ausgedehnt. Zu diesem Zweck wurden die folgenden zwei EGFP-Fusionskonstrukte erstellt: EGFP-(N -24)-Pex11-2 und EGFP-(N -74)-Pex11-2 (s. Abb. 4 ). Nach ihrer Expression in CHO-Zellen läßt die Analyse der erhaltenen Ergebnisse mehrere Schlüsse zu:

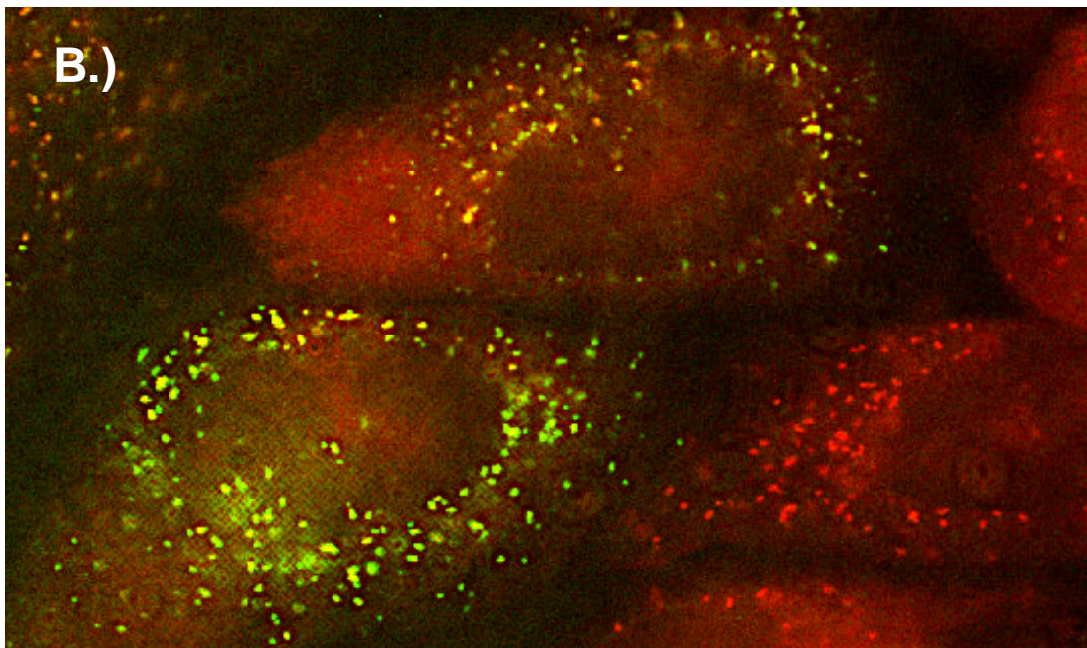
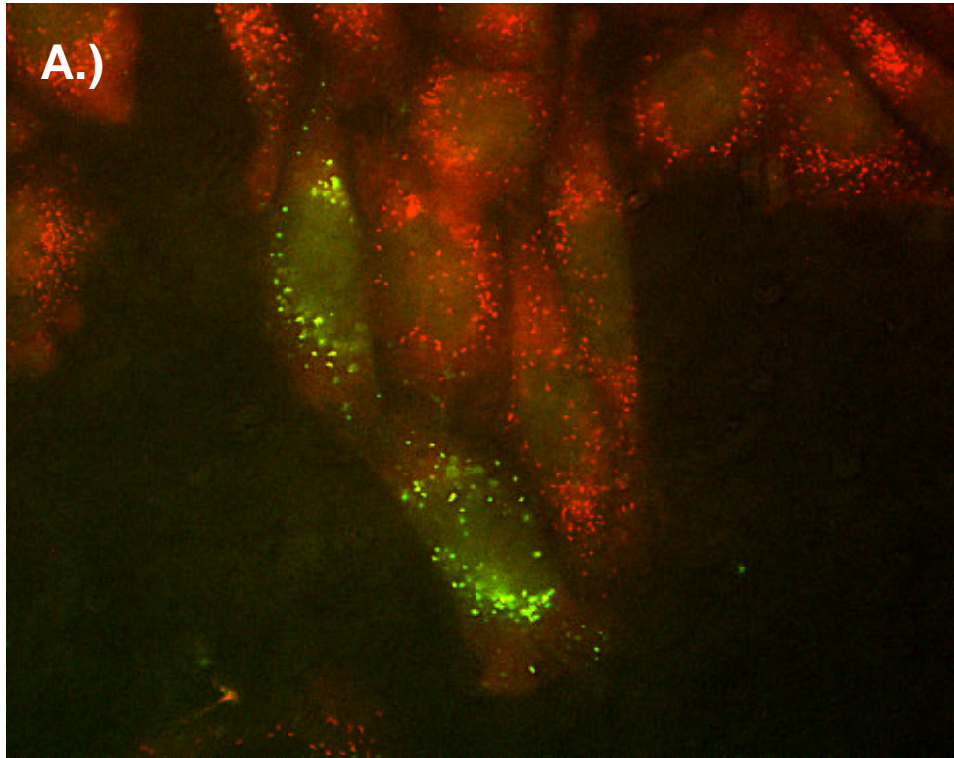
Die beiden verkürzten Fusionsproteine werden in die peroxisomale Membran inseriert (Abb. 15 A und 15 B). Daher kann sich kein mPTS in diesem N-terminalen Abschnitt (Aminosäuren 1-74) befinden, sondern muß weiter hinten in der Sequenz liegen.

Da die N-terminalen Verkürzungen auch die PTS2-ähnliche Sequenz einschließen, hat diese Sequenz in Pex11-2 keine Funktion als Targeting-Signal. Dies wird bereits bei einer N-terminalen Verkürzung um nur 24 Aminosäuren erreicht (Abb. 15 A).

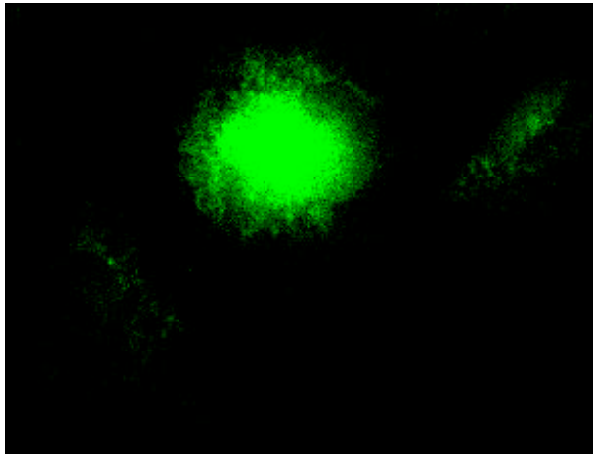
Die Clusterbildung bleibt ebenfalls bereits nach einer Verkürzung um 24 Aminosäuren aus und die Morphologie der Peroxisomen verändert sich nach 20-48h Expression, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, bei beiden Verkürzungs-Konstrukten *nicht* (Abb. 15 A und B).. Folglich befindet sich eine wesentliche Funktion des Pex11-2 in diesem N-terminalen Abschnitt, oder durch die Verkürzung wurde eine Veränderung der Konformation des Moleküls induziert, die eine Ausübung der ursprünglichen Funktion nicht mehr zuläßt.

#### 4.4.3.4 Expression von Pex11-2-(N 1-84) und Pex11-2-(N 1-84)-EGFP

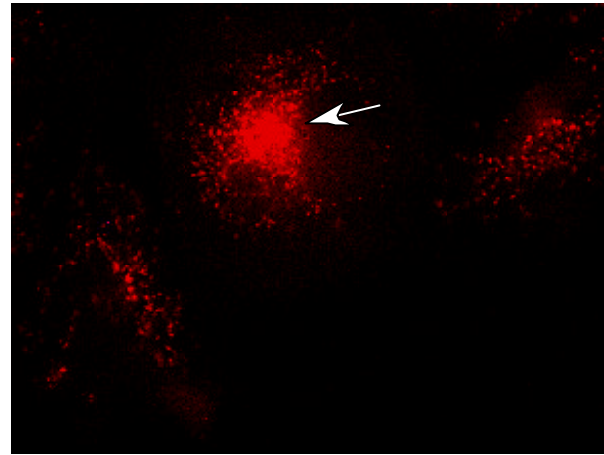
In den vorangegangenen Kapiteln, besonders in Kapitel 4.4.2 und Kapitel 4.4.3.3 wurden bereits Ergebnisse geschildert, die nahelegen, daß dem N-terminalen, vor der 1. Transmembrandomäne liegenden Fragment von Pex11-2 zumindest eine Teilfunktion zukommt. Es konnte demonstriert werden, daß nach der N-terminalen Verkürzung keine peroxisomale Proliferation mehr durch das nun verkürzte Konstrukt induziert wird ((N -24)-



**Abb. 15: Expression von EGFP-(N -24)-Pex11-2 bzw. EGFP-(N -74)-Pex11-2:** 20h nach Mikroinjektion der N-terminal verkürzten EGFP-Pex11-2-cDNAs in CHO-Zellen unterbleibt die Ausbildung eines peroxisomalen Clusters. Um dies zu erreichen, genügt bereits die Entfernung von 24 Aminosäuren (A). Auch das stärker verkürzte Konstrukt (-74 Aminosäuren) wird noch in die Peroxisomenmembran inseriert (B). Das exprimierte rekombinante Genprodukt zeigt eine deutliche EGFP-Fluoreszenz. Um die nicht transfizierten Zellen mit den unveränderten Peroxisomen darzustellen, wurden diese mittels indirekter Immunfluoreszenz über Pmp69 mit TRITC-gekoppelten Antikörpern angefärbt. Alle Peroxisomen besitzen sphärische Gestalt, auch die Peroxisomen in den transfizierten Zellen.

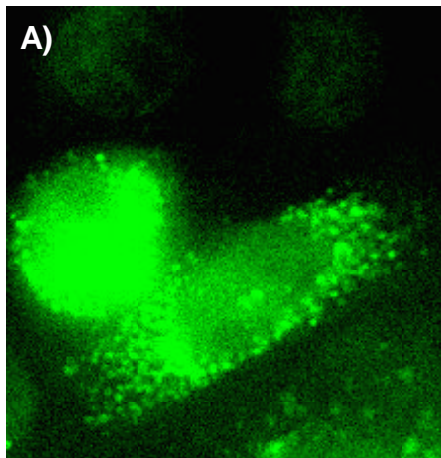


BSA-Fluos

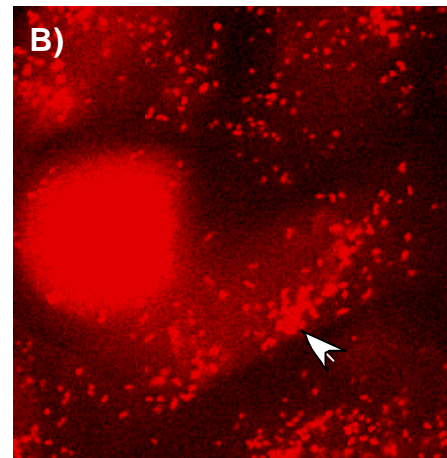


Pmp69

**Abb. 16: Expression von Pex11-2-(N 1-84) in CHO-Zellen:** Zusammen mit dem cDNA-Konstrukt wurde mit Fluos (einem grünen Fluoreszenzfarbstoff) gekoppeltes BSA (0,6mg/ml) injiziert, um die betreffenden Zellen identifizieren zu können. Zellen mit deutlichem Fluos-Signal zeigen eine Tendenz zur peroxisomalen Clusterbildung in Kernnähe (Pfeil), was in den in der Nähe liegenden, untransfizierten Zellen nicht der Fall ist. Peroxisomen wurden wieder über Pmp69 mit TRITC-gekoppeltem Zweitantikörper visualisiert. Die Expression erfolgte über 24h.

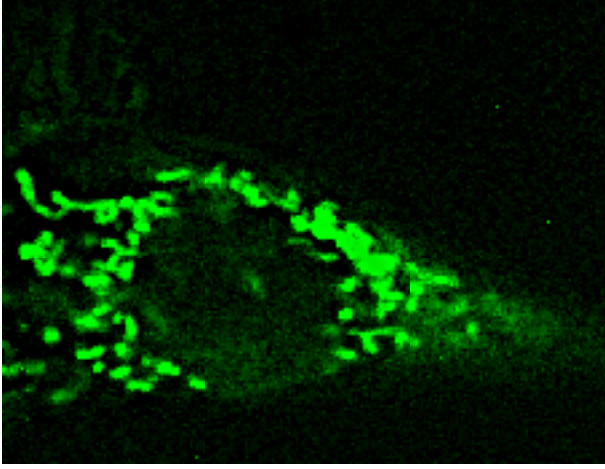


EGFP

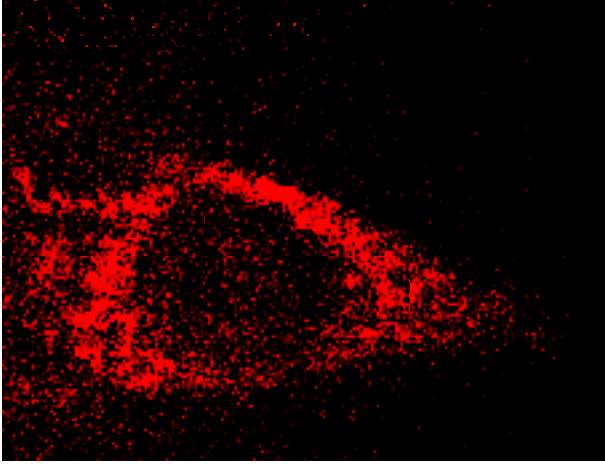


Pmp69

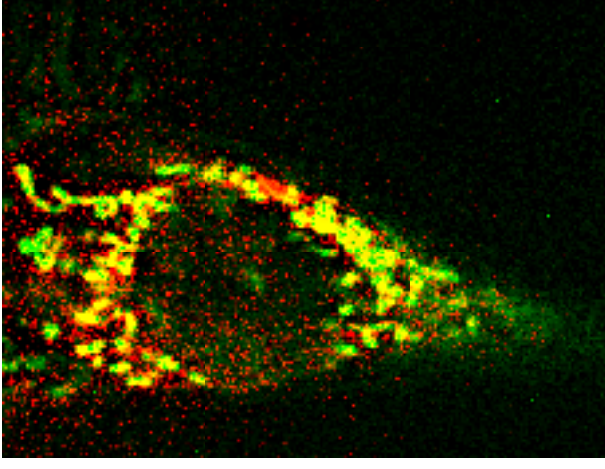
**Abb. 17: Expression von Pex11-2-(N 1-84)-EGFP in CHO-Zellen:** Nach 20 h Expression zeigen Zellen mit zumindest teilweise cytosolischem EGFP-Signal (A) eine Tendenz zur peroxisomalen Clusterbildung in Kernnähe (Pfeil in B). Die Fragmente sind nicht in Peroxisomen lokalisiert, sondern werden fehllokalisiert (s. Abb. 18). Peroxisomen wurden wieder über Pmp69 visualisiert. Die Zelle rechts oben ist nicht transfiziert und dient als Kontrolle. Die kleine Zelle auf der linken Seite ist abgestorben.



**EGFP**



**Mitochondrien**



**Overlay**

**Abb. 18: Fehllokalisierung von Pex11-2-(N 1-84)-EGFP an Mitochondrien**

Das EGFP-Signal des rekombinanten Fragmentes von Pex11-2 colokalisiert mit den durch roten Mito-Tracker angefarbten Mitochondrien. Das Fragment wird offenbar an Mitochondrien fehllokalisiert. Da bei der Permeabilisierung der Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse Digitonin verwendet wurde (welches nur die Zellmembran, nicht aber die Organellmembranen perforiert), konnte gezeigt werden, daß die Fragmente an der Außenseite der Mitochondrien lokalisiert sind. Für diesen Nachweis wurde das EGFP über einen FITC-gekoppelten Zweitantikörper angefarbt. Hierfür wurde das EGFP zuvor ausgebleicht, um die sonst irreführende Eigenfluoreszenz zu entfernen.

Pex11-2), und daß keine peroxisomalen Cluster mehr erzeugt werden (EGFP-(N -24)-Pex11-2 und EGFP-(N -74)-Pex11-2).

Offensichtlich spielt dieser N-terminale Abschnitt jedoch keine Rolle für die für die Insertion des Proteins in die peroxisomale Membran. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der N-terminale Abschnitt von Pex11-2, also die ersten 84 ins Cytosol reichenden Aminosäuren, sowohl mit, als auch ohne C-terminalem EGFP-tag überexprimiert. Die Konstrukte, die dabei Verwendung fanden waren Pex11-2-(N 1-84) und Pex11-2-(N 1-84)-EGFP (Abb. 4). Die Expression (20-48h) des unmarkierten Fragmentes, kloniert in pcDNA 3.1, resultierte in den meisten injizierten Zellen in einer mäßigen Ausbildung peroxisomaler Cluster (Abb. 16). Das EGFP-getaggte Fragment zeigte kein peroxisomales Muster. Dies war zu erwarten, denn wie oben beschrieben (Kapitel 4.3.3.4 und Kapitel 4.4.3.3) ist das peroxisomale Targeting für Pex11-1 und Pex11-2 nicht von diesem Proteinabschnitt abhängig und damit offensichtlich an einer anderen Stelle im Restmolekül lokalisiert. Etwa 20% der transfizierten Zellen zeigten für das Pex11-2-(N 1-84)-EGFP nach 20-48h Expression vor allem eine cytosolische Lokalisation und die Peroxisomen in diesen Zellen wiesen eine Tendenz zur Clusterbildung auf, d.h. Peroxisomen waren gehäuft und dicht zusammengelagert in Kernnähe vorzufinden (Abb. 17).

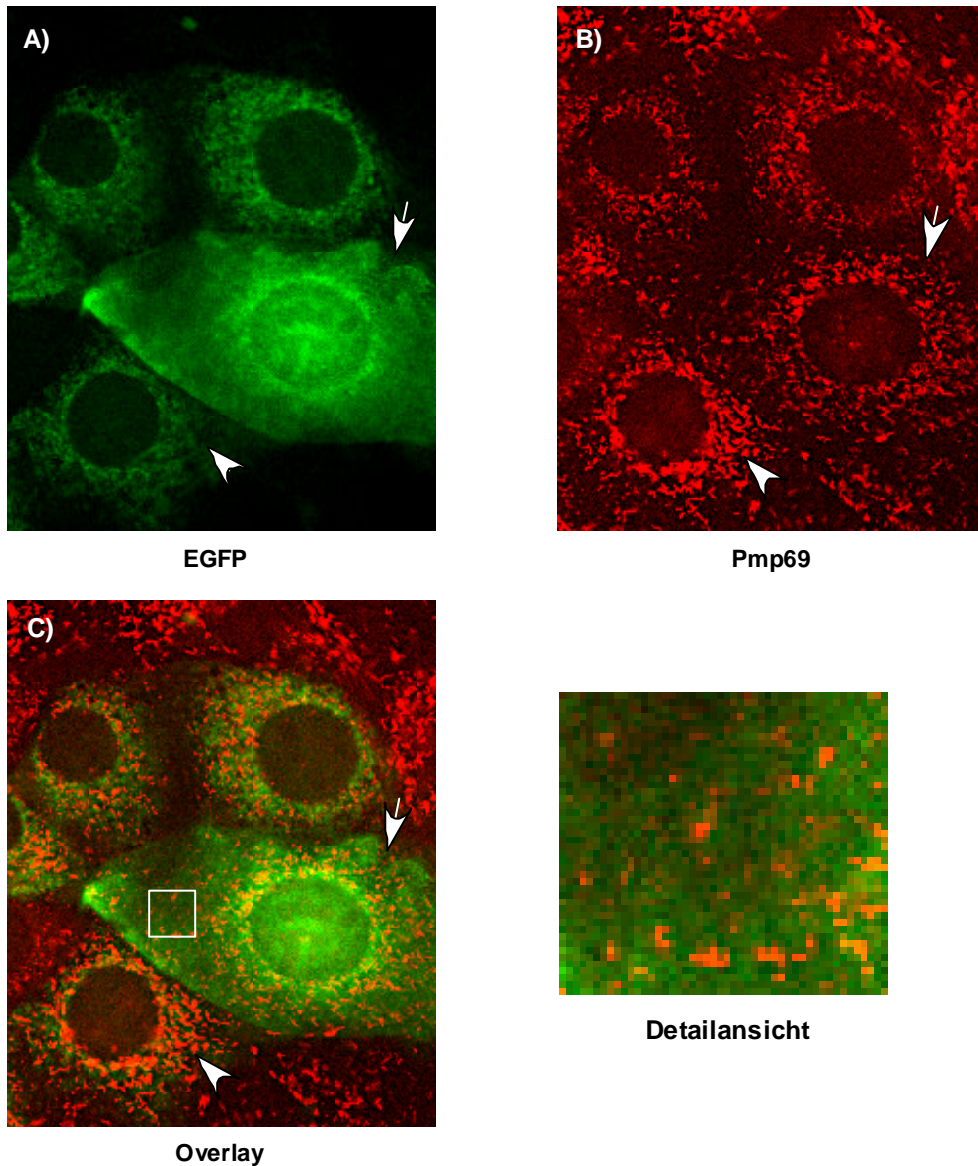
Trotzdem war daneben immer eine Anfärbung von Zellstrukturen durch das EGFP-getaggte Fragment zu beobachten. Zwischen einer fast völligen cytosolischen Lokalisation und einer fast ausschließlichen Lokalisation in diesen Strukturen waren alle Übergangsformen vertreten. Etwa 70-80% der transfizierten Zellen zeigten vor allem eine strukturelle Lokalisation des Pex11-2-(N 1-84)-EGFP . Durch Kolokalisation mit Mito-Tracker, einem Farbstoff, der der spezifischen Anfärbung von Mitochondrien dient, konnten diese Strukturen als Mitochondrien identifiziert werden (Abb. 18). Durch differentielle Permeabilisierung mit Digitonin, das bevorzugt die Plasmamembran, nicht aber die Organellmembranen perforiert, wurde festgestellt, daß das Fragment an der Außenseite von Mitochondrien bindet (Abb. 18).



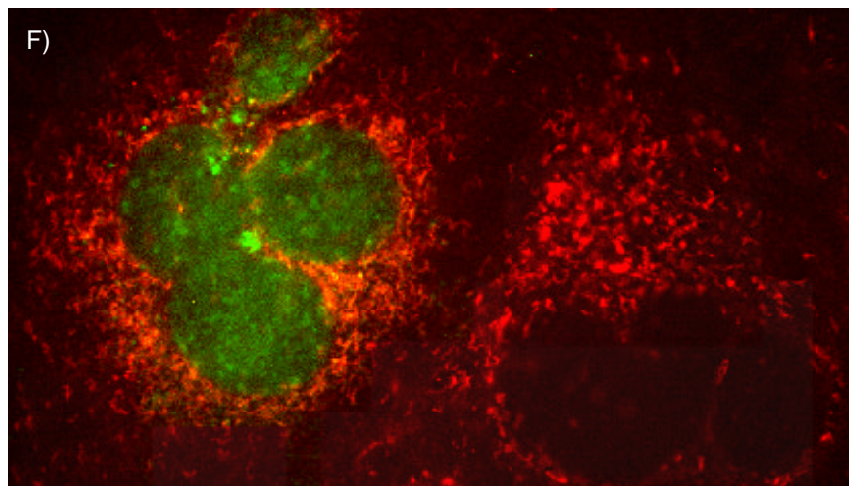
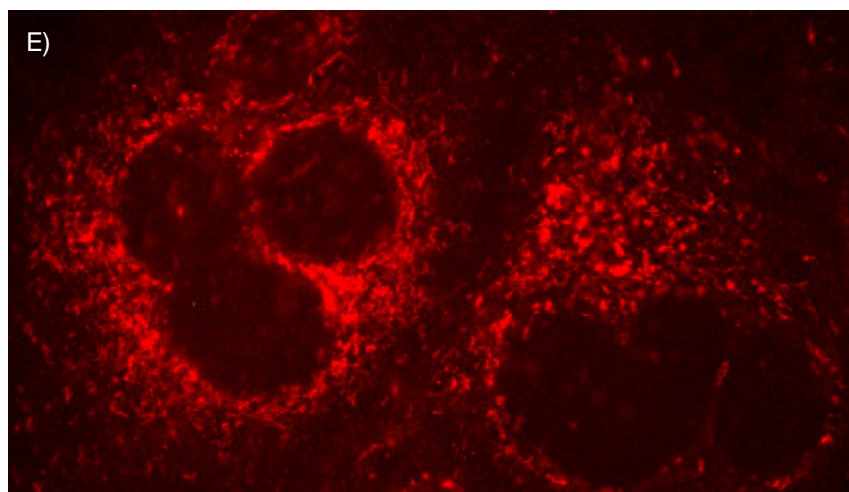
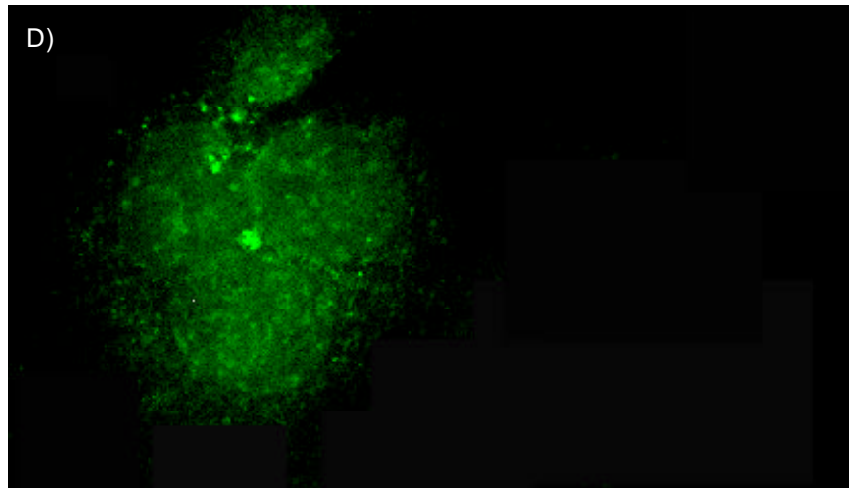
Eine Proliferation von Peroxisomen war jedoch bei keinem der beiden Fragmente zu beobachten. Wurden die Peroxisomen der transfizierten Zellen in der Immunfluoreszenzanalyse gegen Pmp69 mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern angefärbt, so wiesen diese weder in Ihrer Anzahl, noch in Ihrer Morphologie Veränderungen auf. Lediglich eine leichte Tendenz zur Clusterbildung war festzustellen. Folglich reichte der N-Terminus allein möglicherweise nicht aus, um eine Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes zu bewirken. Das Zusammenwirken verschiedener Domänen von Pex11-2 könnte für diese Funktion von entscheidender Bedeutung sein. Um dies zu verifizieren, wurden, wie in Folgenden beschrieben, die beiden Konstrukte (N -24)-Pex11-2 und Pex11-2-(N 1-84) bzw. (N -24)-Pex11-2 und Pex11-2-(N 1-84)-EGFP, die für das N-terminal verkürzte Molekül bzw. für den N-terminalen Abschnitt codieren, gemeinsam zur Expression gebracht.

#### **4.4.3.5 Coexpression von (N -24)-Pex11-2 und Pex11-2-(N 1-84) bzw. Pex11-2-(N 1-84)-EGFP**

Aufgrund der vorangegangenen Experimente erhob sich nun die Frage, ob durch Coexpression des N-terminalen Fragmentes (Pex11-2-(N 1-84) bzw. Pex11-2-(N 1-84)-EGFP) mit dem N-terminal verkürzten Molekül ((N-24)-Pex11-2) die proliferationsfördernde Aktivität von Pex11-2 wiederhergestellt werden kann. Zu diesem Zweck wurde das N-terminale Pex11-2-Fragment - mit oder ohne C-terminalem EGFP-tag - (Pex11-2-(N 1-84) bzw. Pex11-2-(N 1-84)-EGFP, Abb. 4) zusammen mit dem unmarkierten, N-terminal verkürzten Pex11-2 ((N -24)-Pex11-2, Abb. 4) in AT3-Zellen coexprimiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb.19-1 und Abb. 19-2 gezeigt. Während die Peroxisomen in den nicht-transfizierten Zellen natürlich wie jene in unbehandelten Zellen erscheinen, sind die Peroxisomen in coexprimierenden Zellen (16-48h nach Transfektion) in zahlreiche kleine Fragmente zerlegt (Abb. 19-1 und Abb. 19-2), wie es bereits bei der Überexpression des



**Abb. 19-1: Proliferations-Restitution durch Coexpression von Pex11-2-(N 1-84)-EGFP und (N -24)-Pex11-2** Werden das N-terminale Fragment und das N-terminal um 24 Aminosäuren deletierte Pex11-2 ( cDNA-Mix=1:1) in AT3-Zellen 24h coexprimiert, erhält man eine peroxisomale Proliferation, deren Ausmaß der nach wt-Pex11-2-Expression nahe kommt. Die transfizierten Zellen weisen längere, dünnere peroxisomale Tubuli auf und zeigen daneben zahlreiche kürzere Tubulus-Fragmente (Detailansicht). AT3-Zellen besitzen von Natur aus recht dicke peroxisomale Tubuli (s. Abb. 8-1 und Abb. 8-2). Es spielt dabei keine Rolle, ob das N-terminale Pex11-2-Fragment einen EGFP-tag besitzt (A-C) oder nicht (D-F, s.u.). Der einzige Unterschied besteht darin, daß Zellen, in denen das EGFP-getaggte Fragment auch cytosolisch vorliegt, eine deutlichere Proliferation aufweisen (A-C: Pfeile), als jene, in denen das Fragment mehrheitlich an Mitochondrien fehllokalisiert vorliegt (A-C: Pfeilköpfe).



**Abb.19-2: Coexpression von Pex11-2-(N 1-84) mit (N -24)-Pex11-2**

Da die coinjizierten Konstrukte beide keinen Marker tragen, wurde BSA-Fluos in die Injektionslösung gegeben, um injizierte Zellen identifizieren zu können (D).

Wie bereits oben beschrieben, nimmt das feinstrukturierte peroxisomale Material in den überexprimierenden Zellen (Zelle links in E) auf Kosten der dickeren Tubuli zu. Die rechte Zelle wurde nicht mikroinjiziert. Visualisiert wird dies - wie zuvor - über indirekte Färbung des Pmp69 mit TRITC-gekoppeltem Zweitantikörper (E). Der Overlay beider Farbkanäle wird in (F) gezeigt.

unmarkierten Pex11-2-Gesamtmoleküls zu sehen war (Abb. 8-1). Die Bedeutung des N-Terminus von Pex11-2 für die peroxisomale Proliferation wird durch dieses Ergebnis augenscheinlich bestätigt. Die beiden Pex11-2-Teilstücke scheinen der Zelle die Gegenwart eines vollständigen Pex11-2-Moleküls zu suggerieren.

Auch scheint die Funktion von Pex11-2 in überexprimierenden AT3-Zellen eher in einer Fragmentierung der länglichen peroxisomalen Tubuli zu bestehen, als in einer stimulierten *de novo*-Synthese von Organellen. Aus dem Experiment wird klar, daß: (i) dem N-terminalen Abschnitt Pex11-2-(N 1-84) eine Teilfunktion innewohnt, (ii) daß diese Teilfunktion mit der Vermehrung individueller Peroxisomen zusammenhängt, und (iii) daß die Coexpression des N-terminalen Abschnittes - gemeinsam mit dem inaktiven, N-terminal verkürzten Molekül - in der Lage ist, die Proliferationsaktivität wiederherzustellen.

#### **4.4.4 Expression von Myc-Pex11-2-Konstrukten**

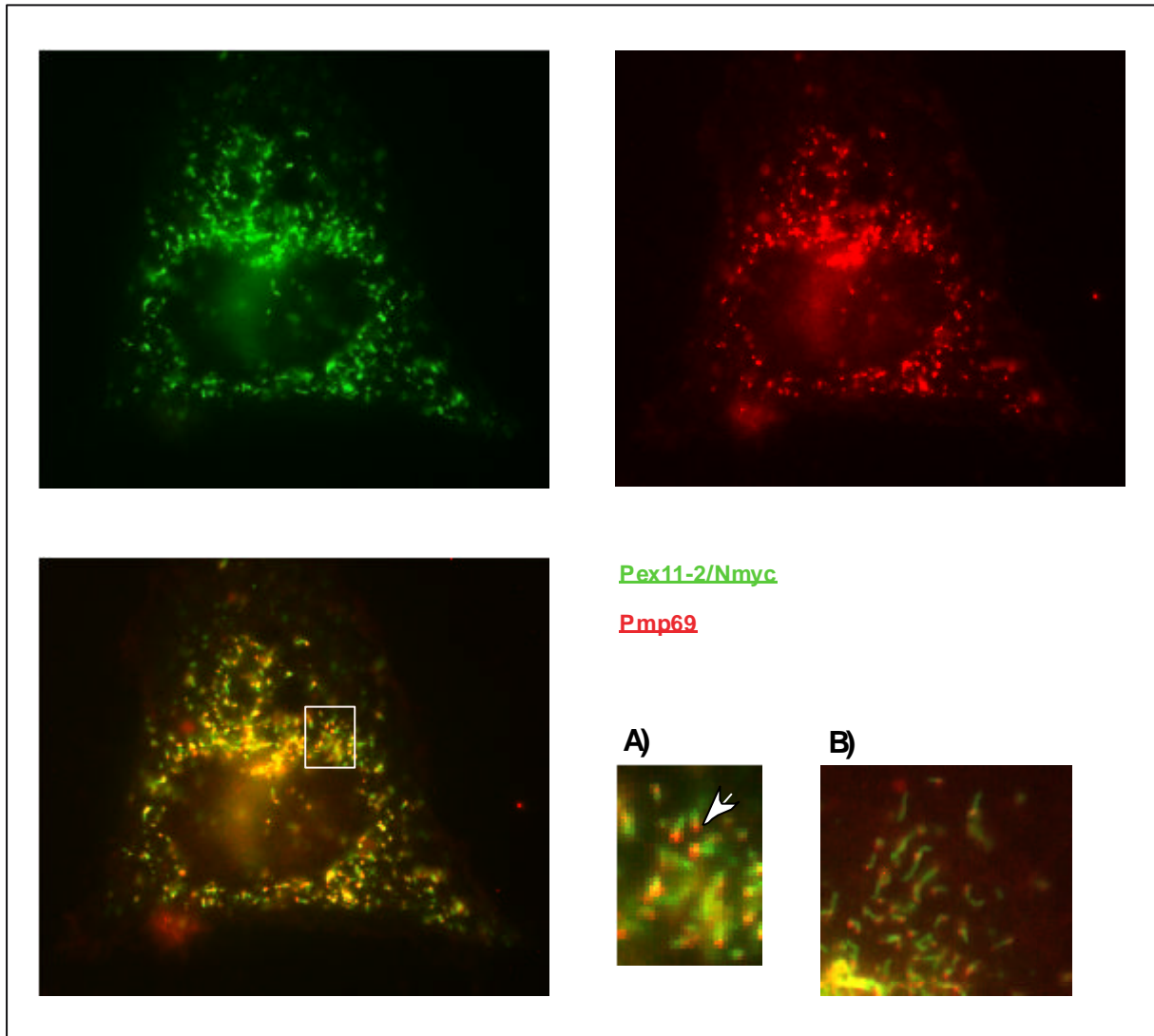
Bei Verwendung eines Markermoleküls in der Größe von GFP ( ca. 25 kD) bleibt immer die Unsicherheit, dass der Marker über seine Tag-Funktion hinaus eigenständige Effekte hervorruft. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Experimente, die mit GFP-getaggen Konstrukten ausgeführt wurden, mit Konstrukten wiederholt, in denen der GFP-tag durch den kurzen, aus 10 Aminosäuren bestehenden, Myc-tag ersetzt wurde. Technisch wurde dabei das Myc-Epitop durch entsprechende Gestaltung der PCR-Primer in die Pex11-2-Sequenz eingeführt. Entweder wurde die Sequenz für das Myc-Epitop hinter das ATG-Codon (bei N-terminalem Myc) oder vor dem STOP-Codon (bei C-terminalem Myc) platziert. Wie bei den GFP-Konstrukten wurden auch hier N-terminale Deletionen konstruiert (Abb. 4), besonders um die funktionelle Bedeutung des N-Terminus von Pex11-2 zu analysieren.

#### 4.4.4.1 Expression von unverkürztem Myc-Pex11-2

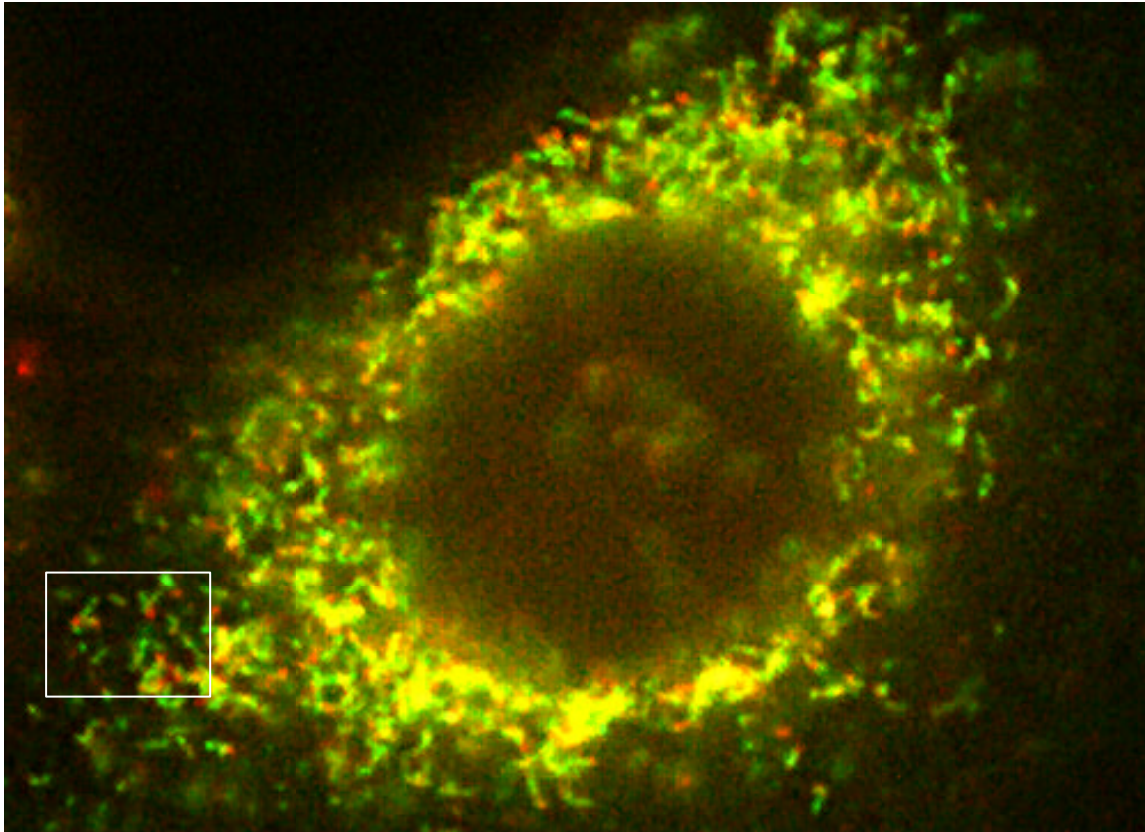
Die Expression von N-terminal mit Myc getagtem Pex11-2 veränderte den peroxisomalen Phänotyp 14-48h nach Transfektion in CHO-Zellen in anderer Weise, als das in den vorherigen Experimenten mit dem GFP-tag der Fall war. Die Komma-förmigen Strukturen, die in wt-CHO-Zellen die Regel sind, verändern sich nach Transfektion zu deutlich verlängerten Tubuli (Abb. 20-1), deren Länge die ursprüngliche um mindestens das 5-fache übertrifft. Dieser Phänotyp war auch in stabil transfizierten, selektionierten Klonen nachweisbar.

Ein zusätzliches interessantes Merkmal in diesen Zellen ist die teilweise unterschiedliche Lokalisation peroxisomaler Membran- und Matrixproteine innerhalb ein und desselben peroxisomalen Kompartimentes (Abb. 20-1 und Abb. 21). Zur Analyse der Segregation von peroxisomalen Proteinen wurde in der Immunfluoreszenz immer das Myc-Epitop des Myc-Pex11-2 in einer Farbe dargestellt (FITC bzw. TRITC), und das zweite Protein in der jeweils anderen Farbe. Das heißt, bei allen untersuchten peroxisomalen Proteinen wurde die Segregation vom markierten Myc-Pex11-2-Molekül dargestellt. Für die Membranproteine wurden Pex11-1 und Pmp69 untersucht ( Abb. 20-1 und Abb. 21) und für die Matrixproteinen wurde die Lokalisation von Katalase und Acyl-CoA-Oxidase analysiert (Abb. 21). Das Myc-Pex11-2 liegt immer gleichmäßig über die ganze Membran der peroxisomalen Tubuli verteilt vor, während das Pmp69 bevorzugt an den Endkappen der Tubuli konzentriert ist. Bei der Überlagerung der Farbaufnahmen dieser Proteinverteilungen erscheinen v.a. längere Tubuli zebraartig gestreift, wobei sich das Pmp69 vom Myc-Pex11-2 absetzt und nicht colokalisiert (Abb. 20-1).

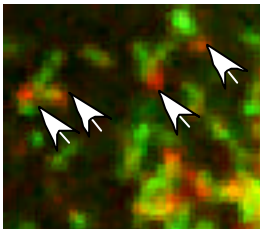
Die Matrixproteine sind zu unregelmäßigen Flecken innerhalb der Tubuli konzentriert, die in verschiedenen Bereichen der Tubuli lokalisiert sind, wobei auch hier eine zebraartige Optik zu beobachten ist (Abb. 21).



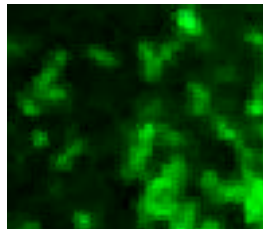
**Abb. 20-1: Expression von Myc-Pex11-2 in CHO-Zellen:** In Zellen, die Myc-Pex11-2 ständig exprimieren, werden peroxisomale Tubuli gebildet, die eine Proteinsegregation aufweisen. Gezeigt werden CHO-Zellen bei denen das Myc-Konstrukt über einen FITC-gekoppelten Zweitantikörper und Pmp69 durch einen TRITC-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt wurden. Pmp69 ist bevorzugt an den äußersten Enden der Tubuli lokalisiert (Pfeil), während das Myc-Pex11-2 über die ganze Oberfläche derselben verteilt ist (Detailansicht A). In Zellen, die Myc-Pex11-2 und wt-Pex11-1 coexprimieren, ist der Effekt nach 24h noch verstärkt (Detailansicht B): die Tubuli sind länger und dünner ausgeformt, was die Segregation der Proteine optisch noch deutlicher werden lässt.



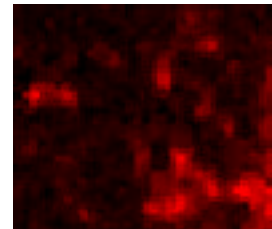
#### Detailansichten:



Overlay

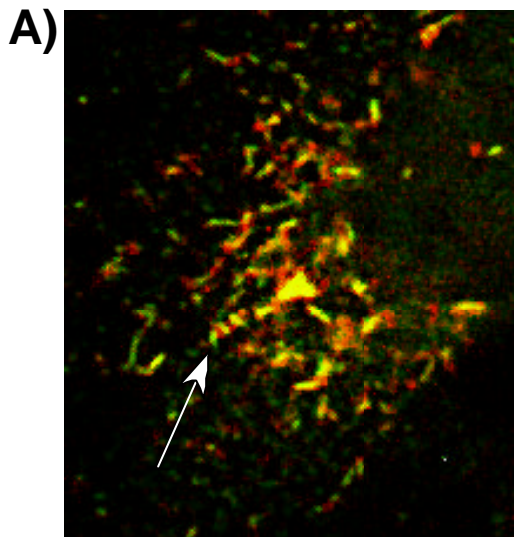


Myc=FITC

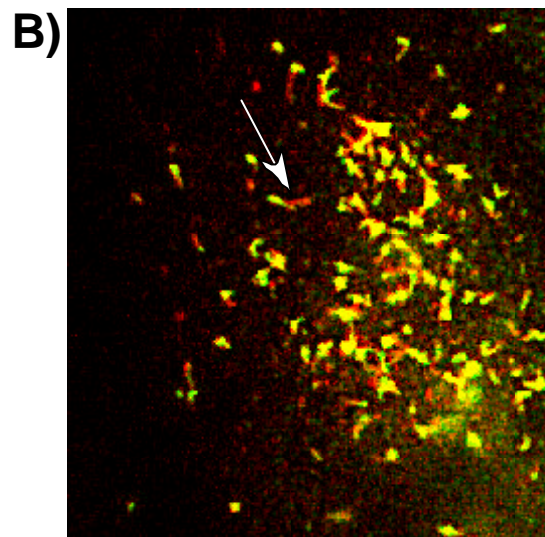


Pmp69=TRITC

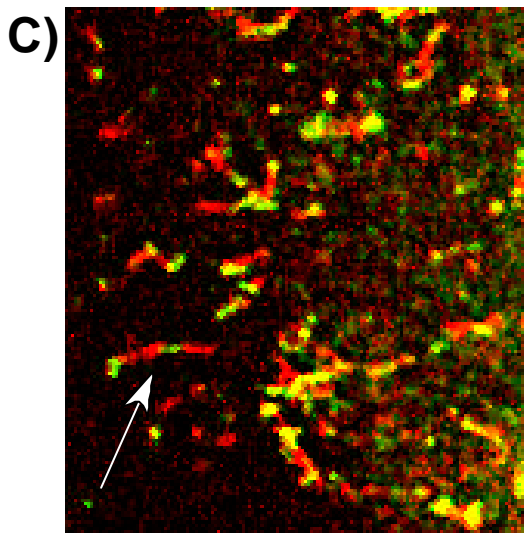
**Abb. 20-2: Expression von Myc-Pex11-2 in AT3-Zellen:** In Zellen, die Myc-Pex11-2 ständig exprimieren, sind peroxisomale Tubuli zu beobachten, die eine Proteinsegregation aufweisen. Gezeigt wird eine AT3-Zelle bei der das Myc-Konstrukt über einen FITC-gekoppelten Zweitantikörper und Pmp69 durch einen TRITC-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt wurden. Pmp69 ist bevorzugt an den äußersten Enden der Tubuli lokalisiert (Pfeile im Overlay), während das Myc-Pex11-2 über die ganze Oberfläche derselben verteilt ist (Detailansichten).



Pex11-1=FITC  
Myc=TRITC



Katalase=FITC  
Myc=TRITC



Acyl-CoA-Oxidase=FITC  
Myc=TRITC

Bei den Abbildungen 21 A)-C) wurde das Myc-Pex11-2 mit TRITC-gekoppeltem Zweitantikörper gefärbt. Das jeweils andere untersuchte Protein wurde über FITC-gekoppeltem Zweitantikörper sichtbar gemacht. Die Pfeile weisen auf markante Beispiele für Segregationen.

**Abb. 21: Die Segregation verschiedener Proteine in CHO-Zellen, die Myc-Pex11-2 stabil überexprimieren** In den peroxisomalen Tubuli, die in CHO-Zellen durch Myc-Pex11-2-Überexpression erzeugt werden, ist eine Segregation verschiedener Matrixproteine (Katalase (B) und Acyl-CoA-Oxidase (C)) und Membranproteine (Pex11-1 (A), Myc-Pex11-2) zu beobachten. Die Segregation von Pmp69 und Myc-Pex11-2 wird in Abb. 20 gezeigt. Zur Analyse wurde der stabile Klon N1-13 verwendet.



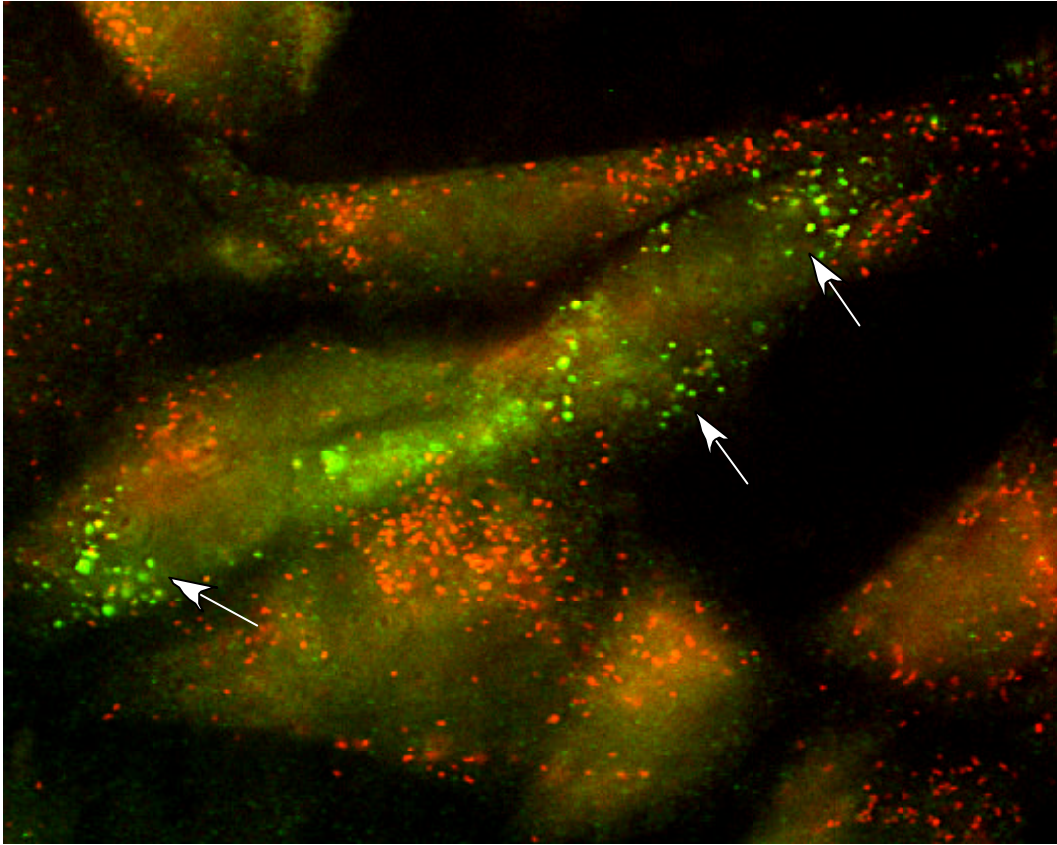
Diese phänotypischen Veränderungen sind nicht nur in CHO-Zellen zu beobachten, sondern finden sich auch in AT3-Zellen nach Transfektion mit Myc-Pex11-2. Da Peroxisomen in unbehandelten AT3-Zellen eine tubuläre Struktur besitzen, bewirkt die Transfektion mit Myc-Pex11-2 nach 24-48h die Ausbildung verlängerter und dünnerer peroxisomaler Tubuli, die ebenfalls die oben beschriebene Proteinsgregation aufweisen (Abb. 20-2)

Bei gleichzeitiger Überexpression (24-48h) von Myc-Pex11-2 in CHO-Zellen, die stabil wt-Pex11-1 überexprimieren, verstärkt sich der beobachtete Effekt. Die peroxisomalen Tubuli in diesen Zellen erscheinen noch weiter verlängert und haben einen noch geringeren Durchmesser (Abb. 20-1 B).

Natürlich erhebt sich bei diesen Beobachtungen die Frage, inwiefern die Effekte physiologische Bedeutung für die Funktion von Pex11-1 und Pex11-2 haben. Es wäre auch denkbar, daß sie Ausdruck des z.B. generell erhöhten Turnover von Kulturzellen sind. Eine in diesem Zusammenhang interessante Beobachtung ist die Bildung von relativ langen, perlenkettenartigen Peroxisomen in Hepatozyten von Ratten, die über einen Zeitraum von 10 Tagen mit dem Schilddrüsenhormon Thyroxin bzw. mit Thyroxin und gleichzeitig mit Clofibrat (einem Peroxisomenproliferator) behandelt wurden. Diese Strukturen erwecken den Eindruck, als handele es sich bei Ihnen um Intermediate bei der Neubildung von Peroxisomen aus peroxisomalen Tubuli.

#### **4.4.4.2 Verkürzung des N-Terminus: Myc-(N -74)-Pex11-2**

Der Effekt der N-terminalen Deletion von Myc-Pex11-2, hervorgerufen durch die Expression von Myc-(N -74)-Pex11-2, ist vergleichbar mit dem des entsprechenden GFP-Konstruktes (s. Kapitel 4.4.3.3). Die beobachteten Phänotypen der *ungekürzten* Fusions-Konstrukte (s. Kapitel 4.4.3.1 und Kapitel 4.4.4.1) bleiben, trotz Gegenwart des Marker-Epitops, aus. In CHO-Zellen sind selbst 48h nach Transfektion von Myc-(N -74)-Pex11-2 weder peroxisomale Tubuli noch intraperoxisomale Proteinsegregation zu beobachten. Die



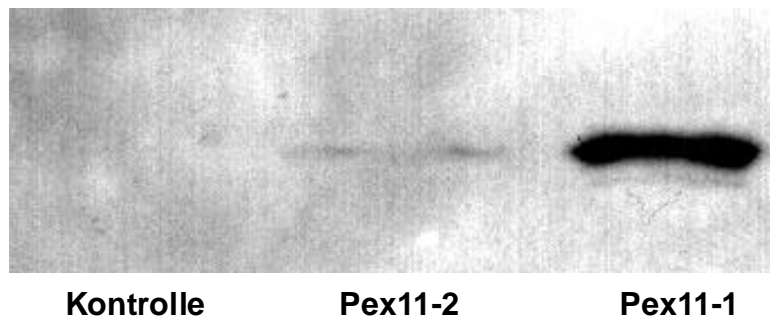
**Abb. 22: Expression des N-terminal verkürzten Myc-(N -74)-Pex11-2 in CHO-Zellen**  
Wird das Myc-(N -74)-Pex11-2 in CHO-Zellen überexprimiert, so werden im Gegensatz zur Überexpression des Myc-Pex11-2 (ungekürztes Protein) keine peroxisomalen Tubuli mehr erzeugt und auch die markante Segregation von peroxisomalen Proteinen bleibt aus. Gezeigt wird das mit TRITC angefärbte Pmp69 und das mit FITC angefärbte Myc-Epitop (jeweils mittels Fluoreszenzfarbstoffgekoppelter Zweitantikörper), im Overlay beider Farbkanäle. Die Peroxisomen der transfizierten Zellen (Pfeile) gleichen denen der nicht transfizierten Kontrollzellen direkt daneben. Die Expression erfolgte über einen Zeitraum von 48h.

Morphologie der Peroxisomen in den transfizierten Zellen gleicht der von unbehandelten Wildtypzellen. Wie bei den entsprechenden GFP-Konstrukten wird das verkürzte Protein nach wie vor in die peroxisomale Membran inseriert (Abb. 22). Damit scheint die Gegenwart dieser Domäne, wie in den vorangegangenen Experimenten bereits gezeigt, für die Insertion des Proteins in die Peroxisomenmembran nicht notwendig zu sein. Außerdem reicht die bloße Gegenwart des fusionierten Marker-Epitops zur Erzeugung des veränderten peroxisomalen Phänotyps nicht aus.

#### **4.4.4.3 Myc-Konstrukte mit verkürztem C-Terminus**

Den Untersuchungen von Cosson und Letourneur (1994) entsprechend, stellt die C-terminale Sequenz –KXXXX von Pex11-1 ein funktionelles Dilysinmotiv dar, das für die Anbindung des COPI-Komplexes beim vesikulären Transport zwischen ER und Golgiapparat eine entscheidende Rolle spielt. Die C-terminale Sequenz –RXKX, wie sie in Pex11-2 vorliegt, repräsentiert kein solches Motiv. Aus diesem Grund lag die Durchführung von Experimenten nahe, die auf dem Einsatz von Konstrukten beruhten, in denen diese C-terminale Sequenz durch Tags maskiert war oder gänzlich entfernt wurde. Die verwendeten cDNA-Konstrukte waren: Pex11-2-Myc, Myc-Pex11-2-(C- 4), Pex11-2-(C- 4)- Myc, Myc-(N -74)-Pex11-2-(C - 4), (N -24)- Pex11-2-(C -4)-Myc (Abb. 4). Bei der Expression von Pex11-2-Myc wurde ein Phänotyp erzeugt, der dem von Myc-Pex11-2 glich (Kapitel 4.4.4.1, Abb. 20-1). Sobald der C-Terminus fehlte, war jedoch keine Expression der Konstrukte in den Transfektanten zu beobachten. Weder war Fehllokalisierung im Cytosol, noch in einem anderen subzellulären Kompartiment festzustellen.

Wiederholte Sequenzierung der cDNAs zeigte, daß die Konstrukte keine Sequenzfehler aufwiesen. Darüber hinaus war auch der Einsatz verschiedener Transfektionsmethoden (Lipofektionsvarianten, Elektroporation, Mikroinjektion) nicht erfolgreich. Es ist zu



**Abb. 23: Coatomer-Anbindung an den Pex11-2-C-Terminus:**

Die Fähigkeit zur Anbindung von cytosolischem Coatomerkomplex wurde zwischen den C-Termini von Pex11-1 und Pex11-2 verglichen. Hierzu wurden die synthetischen Peptide über ein zusätzlich an den N-Terminus der Peptide angefügtes Cystein an Thiopropylsepharose gekoppelt (Pex11-1=CYPQLK**L**KAR-COOH; Pex11-2=CPWLRL**L**KP-COOH; als negativ-Kontrolle diente die Pex11-1-Doppelmutante=CPQL**S**L**S**AR-COOH, in deren Dilysinmotiv beide Lysine ausgetauscht waren). Hierauf wurde frisches Cytosol (aus CHO-Zell-Lysat) gegeben. Die Peptide mit den gebundenen cytosolischen Proteinen wurden von der Säule gelöst, per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen die Coatomer-Untereinheit  $\beta'$ -COP (aus Kaninchen, 1:1000 verdünnt) entwickelt. Der C-Terminus von Pex11-2, der nur einen Dilysinmotiv-ähnlichen Abschnitt besitzt, ist offenbar nur noch marginal in der Lage, Coatomer zu binden. In der Kontrolle findet keinerlei Coat-Anbindung statt.

vermuten, daß die Deletion des C-Terminus von Pex11-2 einen so drastischen Eingriff in seine Struktur darstellt, daß das Produkt toxisch wird oder sofort der Degradation unterliegt.

#### **4.5 Funktionsanalyse des Pex11-2-C-Terminus**

Wie im vorangegangenen Kapitel erwähnt, sollte nach Cosson und Letourneur (1994) die C-terminale Sequenz –RXXKX von Pex11-2 kein funktionsfähiges Dilysinmotiv darstellen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde das isolierte, synthetisch hergestellte C-terminale Peptid an Thiopropylsepharose gekoppelt (über ein zusätzlich integriertes Cystein am N-Terminus dieses synthetischen Fragments) auf die dann Cytosol gegeben wurde.

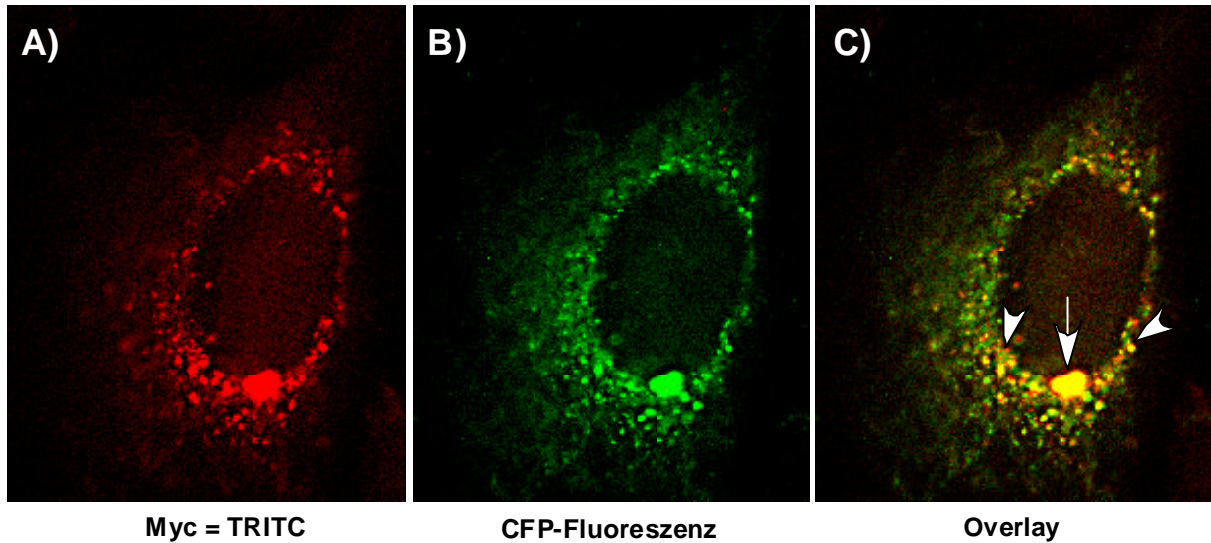
Es ist festzustellen, daß der Pex11-2-C-Terminus - im Vergleich zum C-Terminus von Pex11-1 - nur noch in geringem Umfang in der Lage, cytosolischen COPI-Komplex zu binden. Die Coatomer-Bindungskapazität des C-terminalen Peptids von Pex11-2 (-CPWLRRLKP) liegt im Vergleich zu der von Pex11-1 unter 10% (Abb. 23). Folglich scheint der C-Terminus von Pex11-2 tatsächlich kein funktionsfähiges Dilysinmotiv zu besitzen.

#### **4.6 Coexpression von Pex11-1-Fusionsproteinen mit markiertem Pex11-2**

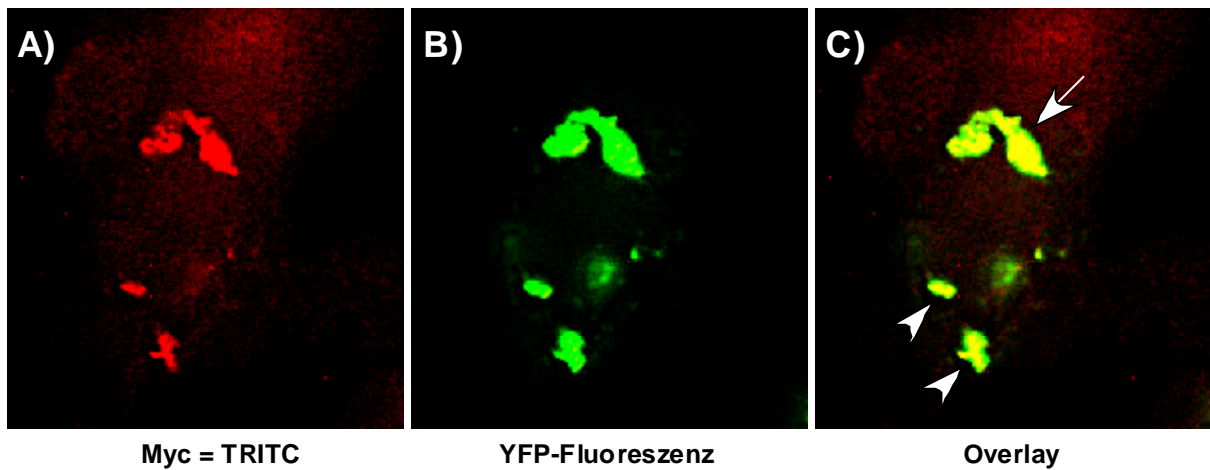
Um ein mögliches funktionelles Zusammenspiel von Pex11-1 und Pex11-2 zu analysieren, wurden verschiedene markierte Varianten beider Homologe coexprimiert. Die Expression der einzelnen Konstrukte ist in Kapitel 4.3.3.1 (CFP-Pex11-1), Kapitel 4.3.3.2 (Pex11-1-YFP), Kapitel 4.4.4.1 (Myc-Pex11-2), Kapitel 4.4.4.3 (Pex11-2-Myc) und Kapitel 4.4.1 (wt-Pex11-2) beschrieben.

##### **4.6.1 Coexpression von CFP-Pex11-1 und Myc-Pex11-2**

In diesem experimentellen Ansatz wurden die N-Termini beider Pex11-Homologe mit einem Marker fusioniert. Die Expression von CFP-Pex11-1 in CHO-Zellen erzeugte peroxisomale



**Abb. 24: Coexpression von CFP-Pex11-1 und Myc-Pex11-2 verstärkt die Tendenz zur Clusterbildung im Vergleich zur solitären Überexpression von CFP-Pex11-1** Werden beide Pex11-Homologe aus der Maus mit einem N-terminal fusionierten Marker in CHO-Zellen coexprimiert, so verstärkt sich die Tendenz zur Clusterbildung erheblich. Einzelne sehr große Cluster (Pfeil in C) existieren neben mehreren eher kleinen Agglomeraten (Pfeilköpfe in C) in der Nähe des Nukleus. Die Expression erfolgte 20h. Myc wurde über einen TRITC-gekoppelten Zweitantikörper visualisiert.



**Abb. 25: Coexpression von Pex11-1-YFP und Pex11-2-Myc verstärkt die Tendenz zur Clusterbildung im Vergleich zur solitären Überexpression von Pex11-1-YFP** Nach Coexpression der C-terminal getaggten Pex11-Homologe in CHO-Zellen wird ebenfalls die Clusterbildung verstärkt. Auch hier (Vgl. Abb. 24) werden große Cluster (Pfeil in C) neben eher kleineren Clustern (Pfeilköpfe in C) in Kernnähe ausgebildet. Die Zahl transfizierter Zellen, die Cluster bilden, liegt bei 50%. Die Expression erfolgte 20h. Myc wurde über einen TRITC-gekoppelten Zweitantikörper visualisiert.

Tubuli und kleine Cluster (s. Kapitel 4.3.3.1). Nach der Expression von Myc-Pex11-2 waren ausschließlich peroxisomale Tubuli zu beobachten, die intraperoxisomale Proteinsegregation aufwiesen.

Für ihre gemeinsame Expression wurden CFP-Pex11-1 und Myc-Pex11-2 in einem 1:1 DNA-Mix in CHO-Zellen mikroinjiziert. 14-48h nach der Mikroinjektion wurden die Zellen analysiert. Gegenüber der Expression von CFP-Pex11-1 alleine, verstärkte sich die Tendenz zur Clusterbildung bei der Coexpression mit Myc-Pex11-2 erheblich (Abb.24). Neben nun deutlich größeren Clustern entstehen mehrere kleinere Cluster in jeder transfizierten Zelle.

Dieser Effekt war nicht zu beobachten, wenn unmarkiertes wt-Pex11-2 mit dem CFP-Pex11-1 coexprimiert wurde. Auch wenn Pex11-2 mit C-terminalem Myc-Epitop (Pex11-2-Myc) zusammen mit dem CFP-Pex11-1 coexprimiert wurde, zeigten die transfizierten CHO-Zellen einen Phänotyp, wie er nach alleiniger Expression von CFP-Pex11-1 zu beobachten war.

#### **4.6.2 Coexpression von Pex11-1-YFP und Pex11-2-Myc**

Die alleinige Expression von Pex11-1-YFP liefert, wie in Kapitel 4.3.3.2 beschrieben, in zwei Dritteln der transfizierten CHO-Zellen große peroxisomale Cluster. Pex11-2-Myc erzeugte in CHO-Zellen, ähnlich wie Myc-Pex11-2, peroxisomale Tubuli, die intraperoxisomale Proteinsegregation aufwiesen.

In diesem Ansatz wurden die C-Termini beider Pex11-Homologe mit einem Marker fusioniert. Zur gemeinsamen Expression in CHO-Zellen wurden Pex11-1-YFP und Pex11-2-Myc in einem 1:1 DNA-Mix in CHO-Zellen mikroinjiziert. 14-48h nach der Mikroinjektion wurden die Zellen analysiert. Gegenüber der Expression von Pex11-1-YFP alleine, verstärkte sich die Tendenz zur Clusterbildung bei der Coexpression mit Pex11-2-Myc (Abb. 25). Neben größeren Clustern entstehen mehrere kleinere Cluster in jeder transfizierten Zelle. Außerdem

steigt die Zahl der clusterbildenden transfizierten Zellen von zuvor einem Drittel auf etwa 50%.

Dieser Effekt war nicht mehr zu beobachten, wenn unmarkiertes wt-Pex11-2 mit dem Pex11-1-YFP coexprimiert wurde. Auch wenn Pex11-2 mit N-terminalem Myc-Epitop (Myc-Pex11-2) zusammen mit dem Pex11-1-YFP coexprimiert wurde, zeigten die transfizierten CHO-Zellen nur den Phänotyp, wie er nach alleiniger Expression von Pex11-1-YFP zu beobachten war.

Eine Verstärkung des Clusterbildungseffektes war folglich nur zu sehen, wenn beide coexprimierten Homologe von Pex11 jeweils am selben Terminus mit einem Marker fusioniert waren. Möglicherweise waren die beiden Proteine als Folge an dieser Stelle sterisch inhibiert. Eventuell waren auf diese Weise verschiedene Pathways, die die Peroxisomenbiogenese beeinflussen, inhibiert. Dies könnte dann letztendlich zur Clusterbildung geführt haben.

#### **4.7 Versuche zur Identifikation von Pex11-2-Interaktionspartnern**

Aufgrund der beobachteten phänotypischen Veränderungen nach Expression von wt-Pex11-1, CFP-Pex11-1, wt-Pex11-2, GFP-Pex11-2 und Myc-Pex11-2, kann der Schluß gezogen werden, daß den ins Cytosol ragenden N-terminalen Abschnitten der Pex11-Proteine eine funktionelle Rolle zukommt. Eine solche Funktion könnte auch Interaktionen dieser Abschnitte mit anderen Proteinen einschließen. Um solche möglichen Pex11-Interaktionspartner zu identifizieren, wurden verschiedene Methoden herangezogen.

Zum Beispiel sollte durch in vitro-Transkription und -Translation des Pex-11-2-N-Terminus das radioaktiv markierte, N-terminale Peptid gewonnen werden. Hierzu wurde Pex11-2-(N 1-84) in einen pcDNA3-Vektor kloniert, der durch den T7-Promotor für die Transkription in einem zellfreien System geeignet ist. Mit dem Peptid sollten Interaktionspartner von Pex-11-2



z.B. mittels Quervernetzung mit den Bindungspartnern im zellfreien System identifiziert werden.

Weiterhin sollte das N-terminale Peptid durch *IPTG-induzierbare Expression in E. coli*, gewonnen werden. Das Pex-11-2-(N 1-84) wurde hierzu in einen für bakterielle, *IPTG*-induzierbare Expression optimierten QE60-Vektor von QIAGEN umklontiert. Es sollten lösliche, cytosolische Interaktionspartner von Pex11-2 aus einem cytosolischen Präparat spezifisch extrahiert werden. Hierzu sollte das Pex-11-2-(N 1-84) über einen C-terminal fusionierten 6xHis-tag, der im Vektor enthalten ist, an eine Nickel-Agarose-Säule gebunden werden.. Über diese Säule sollte Cytosol gegeben werden, um auf diese Weise cytosolische Interaktionspartner anzubinden und zu isolieren.

Außerdem wurde versucht, mit dem Two-Hybrid-System Interaktionspartner über Anbindung an den N-Terminus von Pex11-2 zu identifizieren. Nach der Coexpression von Bindungsdomäne (in einem Plasmid, das auch die Sequenz des Pex-11-2-(N 1-84) enthält) und Aktivierungsdomäne (in einem Plasmid, welches auch die verwendete Genbank enthält) von  $\beta$ -Galaktosidase im Hefestamm YRG2, sollten nach der „blau-weiß-Selektion“ auf X-Gal-Medium die positiven Klone identifiziert werden.

Auch durch chemisches Crosslinking wurde versucht mögliche Interaktionspartner der Pex11-Homologe zu identifizieren. Hierbei sollten durch den Einsatz von hydrophilem (s-SMCC) oder hydrophobem (BMH) Crosslinker diese Interaktionspartner kovalent gebunden werden, um sie damit einer Identifikation durch Gelelektrophorese und anschließender Sequenzierung zugänglich zu machen.

BMH (Bismaleimidohexan) enthält zwei Maleimid-Gruppen, ist homobifunktionell und reagiert bei einem pH von 6,5 bis 7,5 bevorzugt unter Bildung von Thioether-Bindungen mit Sulfhydryl-Gruppen, nicht jedoch mit Tyrosin, Histidin oder Methionin. Laut Hersteller; reagiert es folglich mit Cystein, welches in Pex11-1 und Pex11-2 jeweils mehrfach vorkommt

Dies z.T. an identischen Positionen der Primärstruktur, z.B. in der 1. Transmembrandomäne, siehe Abb. 1).

Das s-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat) ist aufgrund seiner Sulfo-Gruppe gut wasserlöslich. Dieser Crosslinker besteht aus einem NHS-Ester, der bei einem pH von 7-9 mit primären Aminen reagiert. Räumlich nahe Proteine (respektive Bindungspartner) der Pex11-Proteine, wie z.B. cytosolische Faktoren oder benachbarte peroxisomale Membranproteine, hätten Crosslinkprodukte liefern können.

Leider haben diese Versuche zu keinen brauchbaren Ergebnissen geführt, obwohl die experimentellen Bedingungen weitgehend variiert wurden.

## 4.8 Resümee der Ergebnisse

Zusammenfassend lassen sich die durch Expression der verwendeten cDNA-Konstrukte erzeugten peroxisomalen Phänotypen in verschiedene Gruppen einteilen.

1) *Verstärkte Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes.* Dies wurde durch die Expression von wt-Pex11-1 (Kapitel 4.3.1) und wt-Pex11-2 (Kapitel 4.4.1) erreicht, wobei Pex11-1 die Peroxisomenzahl verdoppelt, während Pex11-2 sie etwa verzehnfacht. Nach Coexpression der zwei Pex11-2-Fragmente (N<sup>-24</sup>)-Pex11-2 (das N-terminal verkürzte Molekül) und Pex11-2-(N<sup>1-84</sup>) (das N-terminale Fragment) ist ebenfalls verstärkte peroxisomale Proliferation zu beobachten (Kapitel 4.4.3.5).

2) *Erzeugung von peroxisomalen Tubuli in transfizierten CHO-Zellen.* Durch Expression von CFP-Pex11-1 (Kapitel 4.3.3.1) werden in CHO-Zellen, die normalerweise sphärische Peroxisomen besitzen, tubuläre Peroxisomen erzeugt, die aber keine intraperoxisomale Proteinsegregation aufweisen. Daneben treten hier auch vereinzelt kleine peroxisomale Cluster auf.

3) *Erzeugung von peroxisomalen Tubuli mit intraperoxisomaler Proteinsegregation in transfizierten CHO-Zellen.* Nach Expression von Myc-Pex11-2 (Kapitel 4.4.4.1) ist eine intraperoxisomale Segregation von Matrix- und Membranproteinen zu beobachten. Peroxisomale Clusterbildung tritt dabei nicht auf.

4) *Cytoskelett-abhängige Bildung peroxisomaler Cluster.* Nach Expression von (E)GFP-Pex11-2 (Kapitel 4.4.3.2) werden, in Abhängigkeit von intakten Mikrotubuli, große peroxisomale Cluster gebildet. Diesen Effekt der Clusterformation kann man auch durch Expression von Pex11-1-YFP (Kapitel 4.3.3.2) erreichen, wenn auch nur in etwa einem Drittel der transfizierten Zellen. Durch Coexpression von CFP-Pex11-1 mit Myc-Pex11-2 (Kapitel 4.6.1) treten auch in diesen transfizierten Zellen, neben mehreren kleinen Clustern, nun große Cluster auf.

5) *Abhängigkeit der Ausbildung veränderter peroxisomaler Phänotypen von unverkürzten (Fusions)-Proteinen.* Sämtliche veränderte peroxisomale Phänotypen lassen sich nur mit der vollständig vorliegenden Pex11-Peptidsequenz erzeugen. Sobald die ursprüngliche Sequenz verkürzt wird, ist kein Einfluß mehr auf den peroxisomalen Phänotyp der transfizierten Zellen festzustellen. Konstrukte wie EGFP-(N -24)-Pex11-2, EGFP-(N -74)-Pex11-2 und Myc-(N -74)-Pex11-2 (Kapitel 4.4.3.3 und Kapitel 4.4.4.2) werden zwar weiterhin in die peroxisomale Membran inseriert, jedoch bleibt die peroxisomale Morphologie unverändert. Auch bei den ungetaggen, verkürzten Pex11-1- und Pex11-2-Varianten ist keine Verstärkung der peroxisomalen Proliferation mehr festzustellen (Kapitel 4.3.2 und Kapitel 4.4.2).

## **5.Diskussion**

### **5.1 Pex11-2 induziert peroxisomale Proliferation**

Die Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes kann durch extrazelluläre Stimuli, wie z.B. das Lipidspiegel-senkende Clofibrat erreicht werden (Hess et al., 1965). Dieses Medikament wirkt als Peroxisomenproliferator, indem es einen PPAR aktiviert. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\alpha$  und die Anbindung an den geeigneten Promotor führt zur Induzierung der Transkription des peroxisomalen Proteins Pex11-1 (Issemann und Green, 1990; Dreyer et al., 1992; Lee et al., 1995). Das zweite in Säugern vorzufindende Pex11-Homolog, Pex11-2, ist nicht durch extrazelluläre Stimuli induzierbar (Schrader et al., 1998).

Peroxisomen-Proliferation kann jedoch auch unabhängig von der Aktivierung von PPARs erfolgen, z.B. durch die Überexpression von Pex11-2, einem Mitglied der Familie der Peroxine. In Säugerzellen führt dies zu einem etwa zehnfachen Anstieg der Anzahl der Peroxisomen (Kap. 4.4.1). Wird Pex11-2 N-terminal um 24 Aminosäuren verkürzt, so unterbleibt nach Expression dieses Konstruktes der proliferationsfördernde Effekt (Kap. 4.4.2). Es ist daher anzunehmen, daß dem cytosolisch gelagerten Pex11-2-N-Terminus eine Funktion bei der peroxisomalen Proliferation zukommt.

### **5.2 Segregation peroxisomaler Membran- und Matrixproteine**

Peroxisomen verschiedener Zellen sind heterogen gestaltet. Sie können sphärisch, tubulär oder netzartig geformt sein und ihre Größe kann zwischen 100 nm und 1,5  $\mu$ m variieren. Auch die Proteinzusammensetzung kann sehr unterschiedlich sein. Peroxisomen in Ratten-Hepatozyten aus unterschiedlichen Regionen der Leber können mit höheren oder geringeren

Konzentrationen an Katalase, D-Aminosäureoxidase, L- $\alpha$ -Hydroxysäureoxidase oder Uratoxidase ausgestattet sein (LeHir und Dubach, 1980; Hartl et al., 1985; Angermüller und Fahimi, 1988; Just et al., 1989).

Bisher wurde jedoch nie über eine heterogene Verteilung von peroxisomalen Proteinen innerhalb ein und desselben Organells berichtet, wie sie nach der Überexpression von Myc-Pex11-2 zu beobachten war.

Nach Expression des ungekürzten Myc-Pex11-2 (Kapitel 4.4.4.1) wurden in CHO-Zellen, evt. durch die ständige Überexpression des rekombinanten Proteins, tubuläre Peroxisomen generiert. Diese Tubuli zeigten bemerkenswerterweise eine Segregation der peroxisomalen Membranproteine Pex11-1 und Pmp69 sowie der peroxisomalen Matrixproteine Katalase und Acyl-CoA-Oxidase gegenüber Myc-Pex11-2. Pmp69 liegt vor allem an den Enden als Kappen-artige Struktur und abschnittsweise auch innerhalb der Tubuli vor. Myc-Pex11-2 ist hingegen über die gesamte peroxisomale Membran verteilt, was bei Colokalisationsexperimenten in der Immunfluoreszenz-Analyse zu einer Zebra-artigen Zonierung der Tubuli führt (Abb. 20-1). Die peroxisomalen Matrixproteine Katalase und Acyl-CoA-Oxidase liegen innerhalb der Tubuli ebenfalls abschnittsweise konzentriert vor (Abb. 21).

Die Lokalisation verschiedener peroxisomaler Proteine in Microdomänen könnte eine Vorstufe auf dem Weg zur Fragmentierung von Peroxisomen darstellen. Durch die Einführung des Myc-tags in Pex11-2 könnte die Funktion des Proteins so beeinflusst worden sein, daß der dynamische Vorgang der Abschnürung von der peroxisomalen Membran an einem kritischen Punkt arretiert wird.

Die gleichzeitige Überexpression von Pex11-1 in Myc-Pex11-2-transfizierten Zellen verstärkt den Effekt der Tubuliformation, was bedeuten könnte, daß das mäßig proliferationsfördernde Pex11-1 zwar zur zusätzlichen Vergrößerung des peroxisomalen Kompartimentes, nicht jedoch zur darauffolgenden Vesikulierung beiträgt.

Aber auch unter mehr physiologischen Bedingungen, ohne den Einfluß rekombinanter Fusionsproteine, sind perlschnurartige Konstriktionen an Peroxisomen zu beobachten. Vor allem nach Behandlung mit Thyroxin und Clofibrat (Vgl. Kapitel 4.4.4.1). Möglicherweise stellen diese Strukturen peroxisomale Intermediate auf dem Wege der Neubildung von Peroxisomen aus tubulären Strukturen dar. Die Konzentration von Pex11-1 ist in stimulierten Zellen deutlich höher als in unstimulierten Hepatocyten, während der Spiegel von Pex11-2 relativ konstant bleibt. Dieses Ungleichgewicht in den Konzentrationen der beiden Proteine legt den Schluß nahe, daß sie, trotz ihrer hohen Homologie (41% Identität in der Maus), voneinander unabhängige Funktionen erfüllen.

Auch hier hatte die Überexpression eines N-terminal um mindestens 24 Aminosäuren verkürzten Konstruktes von Pex11-2 (Myc-(N -24)-Pex11-2) zur Folge, daß die Effekte, die mit dem unverkürzten Myc-Fusionsprotein beobachtet wurden, ausblieben.

Diese Ergebnisse belegen, daß dem N-terminalen Abschnitt von Pex11-2 eine wichtige funktionelle Rolle zukommt, die entweder mit der beobachteten Domänenbildung innerhalb der peroxisomalen Membran - sowie der Matrix - und / oder der Ausbildung der Organellkonstriktionen in Zusammenhang stehen könnten.

Diese Ergebnisse ergaben aber noch einen weiteren interessanten Befund. Die Verkürzung des N-terminalen Abschnitts des Pex11-2 hat die Entfernung des putativen PTS2-Motivs zur Folge. Trotzdem wurde die ungehinderte Insertion des Proteins in die peroxisomale Membran beobachtet (Kap. 4.4.4.2). Das bedeutet, daß dieses Motiv für Pex11-2 kein funktionelles Targetingsignal darstellt, und daß ein anderer Proteinabschnitt das eigentliche mPTS enthält. Eventuell kommt für diesen Proteinabschnitt eine andere Funktion als peroxisomales Targeting in Frage.

Auch nach Verkürzung des N-Terminus von Pex11-1 wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (Kap. 4.3.3.3). Die im N-terminalen Bereich vorliegende PTS2-Konsensus-Sequenz ist offensichtlich nicht für die Membraninsertion des Proteins maßgeblich.

### 5.3 Ausbildung peroxisomaler Cluster

Die Fusion von GFP an den N-Terminus von Pex11-2 hatte zur Folge, daß sich innerhalb von 6-8h nach Transfektion von GFP-Pex11-2 Cluster außerordentlich langer, tubulärer, peroxisomaler Strukturen bildeten (Kapitel 4.4.3.1). Das an der peroxisomalen Proliferation beteiligte Pex11-2 war durch das N-terminal fusionierte GFP funktionell so beeinflusst, daß zwar die Vergrößerung des peroxisomalen Kompartimentes im Sinne einer Proliferation noch funktionierte, die zahlenmäßige Vermehrung der Organellen aber inhibiert war.

Peroxisomale Clusterbildung, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß, wurde in den vorliegenden Experimenten auch nach Expression von Pex11-1-YFP (Kap. 4.3.3.2), Pex11-2-(N 1-84) (Kap. 4.4.3.4) und nach Coexpression beider Pex11-Homologe als Fusionsproteine mit jeweils am selben Terminus angefügten Markern beobachtet (Kap. 4.6.1 und Kap. 4.6.2).

Bei näherer Betrachtung der inneren Organisation der GFP-Pex11-2-induzierten peroxisomalen Cluster in der elektronenmikroskopischen Feinauflösung zeigte sich, daß es sich um dicht zusammengelagerte, im Querschnitt hexagonal gepackte, peroxisomale Tubuli handelt. Sie weisen neben heterogener Katalaseverteilung auch Konstriktionen auf, was auf eine gewisse Hemmung der peroxisomalen Vesikulierung hinweisen könnte. Außerdem war zu beobachten, daß diese Cluster von Mikrotubuli durchzogen sind (Abb. 10 G). Als Fusionsprotein mit GFP war dieses Protein scheinbar nicht mehr in der Lage, eine Proliferation im Sinne einer Vermehrung von einzeln vorliegenden sphärischen Peroxisomen zu induzieren, wie es bei der Expression des unveränderten wt-Pex11-2 der Fall ist. Natürlich legt dies den Schluß nahe, daß der Prozeß der Organellenvermehrung durch das GFP-veränderte Protein an einer spezifischen Stelle unterbrochen wird. Wenn diese Vermutung richtig ist, sollte GFP-Pex11-2 oder der mit GFP fusionierte N-Terminus von Pex11-2 (Kap.

4.4.3.4) mit einer (den) Komponente(n) der Proliferationsmaschinerie interagieren und damit deren Identifizierung ermöglichen.

Daß das fusionierte GFP *per se* für die Ausprägung dieser phänotypischen Veränderungen verantwortlich ist, erscheint unwahrscheinlich, da andere peroxisomale Membranproteine mit angefügtem GFP-tag, z.B. Pmp22 (Pause et al., 2000), diesen Phänotyp in keiner Weise zeigen. Die Ausbildung peroxisomaler Cluster scheint in diesem Zusammenhang eine Pex11-spezifische Erscheinung zu sein.

Auch bei den GFP-Konstrukten bleibt der ursprünglich induzierte Effekt, in diesem Falle die Clusterbildung, aus, wenn an Stelle von GFP-Pex11-2 ein Konstrukt überexprimiert wird, bei dem der N-Terminus des Pex11-2 um mindestens 24 Aminosäuren verkürzt wurde (GFP-(N – 24)-Pex11-2, Kapitel 4.4.3.3). Die funktionelle Bedeutung des N-Terminus von Pex11-2 wird hier nochmals unterstrichen.

Die Verkürzung des N-Terminus um 24 oder 74 Aminosäuren könnte auch die Lage und Konformation des angehängten GFP-tags so verändern, daß die mit dem unverkürzten Konstrukt ermöglichten Interaktionen ausbleiben. Auf diese Weise stellen GFP-(N –24)-Pex11-2 oder GFP-(N –74)-Pex11-2 ideale Kontrollproteine bei der Suche nach den Pex11-2-Interaktionspartnern dar.

Die Analyse der Kinetik der GFP-Pex11-2-induzierten Clusterbildung erlaubt gewisse Rückschlüsse auf den Mechanismus dieses dynamischen Vorganges. Etwa 2h nach Transfektion ist die Insertion des GFP-Pex11-2 in einzeln vorliegende peroxisomale Strukturen zu beobachten. Im Verlauf von etwa 6h vereinigen sich diese erst zu kleineren Aggregaten und schließlich zu größeren Clustern. Diese Cluster sind auch in selektionierten, stabilen Zell-Klonen, die das GFP-Pex11-2 ständig exprimieren, zu sehen. Wird durch Vorinkubation mit Nocodazol das mikrotubuläre System ausgeschaltet, so bleibt die Clusterbildung aus und man beobachtet singuläre Peroxisomen, die das GFP-Konstrukt



enthalten (Kapitel 4.4.3.2). Die Hemmung der Ausbildung des Aktinskelettes der Zelle durch den Inhibitor Cytochalasin B zeigte keine derartige Inhibierung der Clusterbildung (Kapitel 4.4.3.2), was bedeutet, daß Mikrofilamente nicht an der Bildung peroxisomaler Cluster beteiligt sind.

Die Interaktion von Peroxisomen mit dem mikrotubulären Cytoskelett wurde intensiv in der Arbeitsgruppe untersucht. Diese Interaktion ist Grundlage des beobachtbaren mikrotubulären Transports von Peroxisomen in der Zelle (Rapp et al., 1996a+b; Review: Sheetz 1996). Dieser Transport kann von zwei Motorproteinen vermittelt werden. Der zur Zellperipherie gerichtete Transport durch Kinesin (Tanaka et al., 1998) und der retrograd gerichtete Transport durch das cytoplasmatische Dynein (Vaisberg et al., 1996, Burkhard et al., 1997). Ob eines oder beide dieser Motorproteine an der Clusterbildung von Peroxisomen beteiligt sind, ist nicht bekannt. Die beobachteten Effekte, die sich durch das Anknüpfen eines GFP-tags an Pex11-2 einstellen, erheben natürlich die Frage, wie Pex11-2 und peroxisomale Bewegung in Zusammenhang stehen könnten. Die Frage nach einer Beteiligung von Pex11-2 am intrazellulären Transport von Peroxisomen ist zur Zeit nicht zu beantworten. Für die Clusterbildung allerdings könnte die Hemmung des Kinesin-abhängigen Transports verantwortlich sein. Wäre der zur Zellperipherie hin gerichtete Transport unterbunden, so bliebe der zelleinwärts gerichtete Transport erhalten, was die beobachtete Clusterbildung in Kernnähe und nahe am MTOC erklären könnte. Damit läge eine mögliche Funktion des intrazellulären Organelltransportes im multidirektionalen Transport der Peroxisomen, der die gleichmäßige Verteilung der Organellen innerhalb der Zelle garantiert (Huber et al., 1997+1999). Gestützt wird diese Vorstellung von der Beobachtung, daß auch Mitochondrien ein ausgeprägtes Clustern in Kernnähe zeigen, wenn der Kinesin-abhängige Transport ausfällt (Tanaka et al., 1998). Ob GFP-Pex11-2 nun direkt, z.B. durch Interaktion mit Kinesin oder dem Kinesinrezeptor Kinektin, oder indirekt, durch Interaktion mit einem Mikrotubuli-

assoziierten Protein, die Peroxisomenbewegung beeinflusst, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht erschließen.

Das Aktinskelett scheint in diesem Zusammenhang nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Dissoziation des Aktinskelettes durch Cytochalasin B reduziert z.B. die peroxisomale Motilität nur um etwa 25% (Rapp et al., 1996a). In *Saccharomyces cerevisiae* jedoch scheint die Depolymerisation des Aktinskelettes jegliche peroxisomale Bewegung zu unterbinden (Hoepfner et al., 2001).

#### **5.4 Vergleich der Pex11-Proteine aus Einzellern und Säugern**

In Säugetieren sind mit Pex11-1 und Pex11-2 zwei Pex11-Homologe vertreten. Es handelt sich hierbei um integrale Membranproteine mit zwei möglichen Transmembrandomänen. N- und C-Terminus der Proteine ragen in das Zytoplasma, was Interaktionen mit cytosolischen Proteinen ermöglichen kann (s. Titorenko et al., 1997). Pex11-1 ist ein durch Peroxisomenproliferatoren, wie z.B. Clofibrat, induzierbares Protein. Die Induktion wird hierbei über Aktivierung des Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  durch Clofibrat erreicht, welcher als Heterodimer mit RXR (Retinoid X Rezeptor) seine Funktion erfüllt. Das aktivierte Heterodimer PPAR $\alpha$ -RXR bindet PPREs (Peroxisomenproliferatoren responsive Elemente) im betreffenden Gen und vermittelt dadurch die Aktivierung der Transkription, wobei in diesem Fall der mRNA-Spiegel von Pex11-1 auf etwa das Zehnfache ansteigt. (Isseman und Green, 1990; Reddy und Chu, 1996; Schrader et al., 1998). Pex11-1 erzeugt nach Überexpression in Säugerzellen mit einer Verdoppelung der ursprünglichen Peroxisomen nur eine mäßige Proliferation (Passreiter et al., 1998).

Pex11-2 ist hingegen nicht durch extrazelluläre Stimuli induzierbar. Es erzeugt aber nach Überexpression in Säugerzellen starke peroxisomale Proliferation, d.h. etwa eine Verzehnfachung der Peroxisomenzahl (Schrader et al., 1998 und Kap. 4.4.1). Die Bedeutung

von Pex11-2 für den Säuger-Organismus wird dadurch unterstrichen, daß Mäuse, die kein funktionsfähiges Pex11-2 exprimieren, einen Tag nach der Geburt sterben (Li et al., 2002).

Offenbar spielen beide Pex11-Homologe eine Rolle in der Peroxisomenproliferation von Säugerzellen. Ihre Unterschiedlichkeit bezüglich der funktionellen Domänen und der Induzierbarkeit, sowie bei den erhaltenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, läßt aber keine Interaktion der beiden Homologe vermuten. Offenbar agieren beide Proteine auf unterschiedliche Weise.

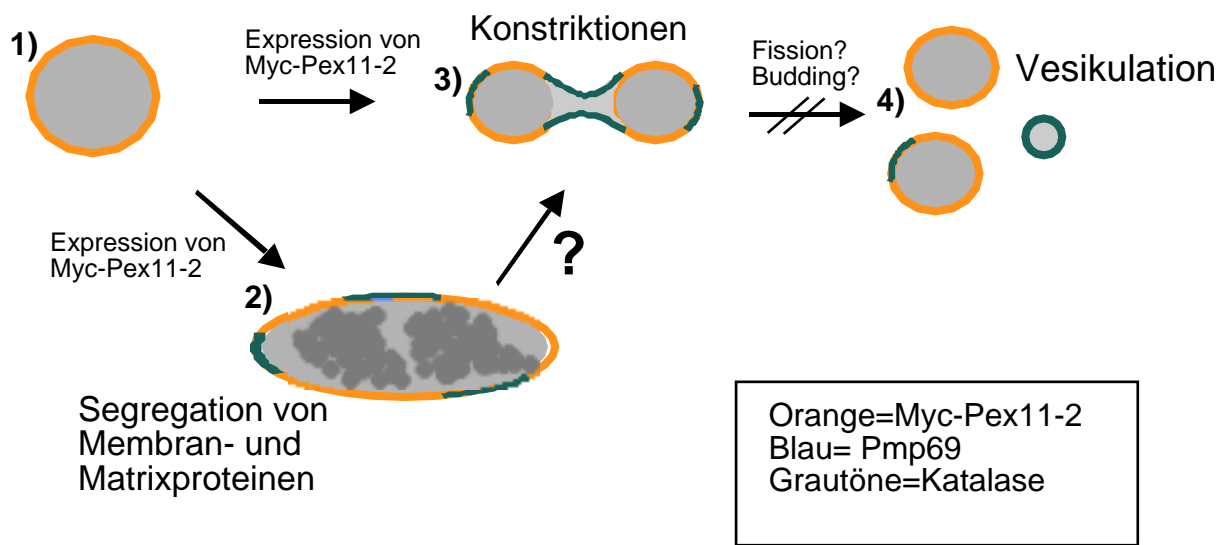
In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist nur ein Pex11-Protein vorhanden. Seine Topologie ist unklar, es wird jedoch eine Lokalisation als peripheres Protein auf der Innenseite der Hefe-Peroxisomen (Marshall et al., 1996; van Roermund et al., 2000) vermutet. Hefe-Pex11 besitzt kein Dilysinmotiv, worin es dem Pex11-2 in Säugern ähnelt. Das Pex11 aus *S. cerevisiae* ist durch Kultur der Hefen in Oleat-haltigem Medium induzierbar und wirkt proliferationsfördernd auf die Hefeperoxisomen, deren Anzahl sich etwa verzehnfacht. Neben der Funktion bei der peroxisomalen Proliferation scheint Pex11 in Hefe bei der Oxidation mittelkettiger Fettsäuren eine Rolle zu spielen, indem es diese über die peroxisomale Membran ins Lumen transportiert. In Hefe-Mutanten, die kein Pex11 exprimieren, ist die peroxisomale Proliferation und die Oxidation der mittelkettigen Fettsäuren inhibiert (van Roermund et al., 2000). Möglicherweise sind in Hefe beide Funktionen, Fettsäuretransport und peroxisomale Proliferation, miteinander verknüpft.

Im Flagellaten *Trypanosoma brucei* ist ebenfalls nur ein Pex11-Protein vorzufinden, welches ein C-terminales Dilysinmotiv besitzt. Dieses Pex11-Protein ähnelt damit dem Pex11-1 aus Säugern. Es ist nach Mutation des C-Terminus noch funktionsfähig. Dieses mutierte Pex11 erzeugt in *Trypanosoma* peroxisomale Proliferation, indem durch das Membranwachstum nach Überexpression tubuläre Glykosomen induziert werden, die sich zu Clustern zusammenlagern. Außerdem induziert das mutierte *Trypanosoma*-Pex11-Protein in transfizierten Hefezellen, die kein endogenes Pex11-Protein exprimieren, peroxisomale

Proliferation (Maier et al., 2000). Das Pex11-Protein in Trypanosoma besitzt zwei Transmembrandomänen und ähnelt damit in seiner Topologie den Pex11-Homologen in Säugern (Lorenz et al., 1998). Daneben besitzt es ein putatives mPTS XX(K/R)-(K/R)-X(3-7)-(T/S)-XX-(D/E)-X-Motiv, wie es in Pmp47 in *Candida boidinii* beschrieben wurde (Dyer et al., 1996).

## 5.5 Modell der Peroxisomen-Proliferation in Säugern

Anhand der Überexpression von Myc-Pex11-2 und dessen Insertion in die peroxisomale Membran in den vorliegenden Transfektions-Experimenten, sowie der anderen erhaltenen Ergebnisse mit GFP-Pex11-2 und wt-Pex11-2, läßt sich ein Modell zur Vesikulierung von Peroxisomen herleiten. Nach Überexpression von Myc-Pex11-2 kommt es demnach zur Insertion des rekombinanten Proteins in die Peroxisomenmembran und damit zu deren ständigem Wachstum. Dies führt zu einer Vergrößerung des peroxisomalen Kompartimentes in Form von tubulären Peroxisomen (Abb. 26 (1-2)). Diese Tubuli weisen eine intraperoxisomale Segregation von Membran- und Matrixproteinen auf, die eine Ausbildung von Microdomänen darstellen könnte. In Abb. 26 wird dies am Beispiel von Pmp69, Katalase und Myc-Pex11-2 dargestellt. Dies könnte die Vorbereitung einer Fragmentierung der tubulären peroxisomalen Strukturen darstellen. Möglicherweise wird auch die Phospholipidzusammensetzung der Peroxisomenmembran beeinflusst, was zu unterschiedlichen Zonen mit hoher oder geringer Membranfluidität führen könnte. Diese Fluiditätsunterschiede und eine mögliche Beteiligung eines Dynamin-ähnlichen Proteins könnten für die Konstriktionen innerhalb der peroxisomalen Tubuli, z.B. in den nach GFP-Pex11-2-Expression beobachteten Clustern, verantwortlich sein (Kap. 4.4.3.1 und Abb. 26 (3)). Die Gegenwart des Myc-tags am N-Terminus von Pex11-2 verhindert aber möglicherweise sterisch eine Fragmentierung der tubulären Strukturen, wie sie nach wt-Pex11-2-Überexpression in AT3-Zellen zu beobachten ist (Kap. 4.4.1 und Abb. 26 (4)). Die



**Abb. 26: Modell zur Vesikulation von Peroxisomen** u.a. anhand der Expression von Myc-Pex11-2 und den dadurch induzierten Effekten. Die durch Myc-Pex11-2 induzierte Ausformung tubulärer Peroxisomen in CHO-Zellen und die Segregation der peroxisomalen Proteine wird am Beispiel von Pmp69 und Katalase veranschaulicht. Ob die Konstriktionen parallel hierzu (3) oder erst danach ausgebildet werden (2-3) ist noch unklar. Solche Konstriktionen sind z.B. in peroxisomalen Clustern nach Expression von GFP-Pex11-2 zu beobachten. Die Fragmentierung der peroxisomalen Tubuli wird evt. durch Myc-Pex11-2 unterbunden. Als unverändertes wt-Pex11-2 induziert das Protein peroxisomale Proliferation (4).

beobachteten perlschnurartigen Strukturen mit Konstriktionen sind möglicherweise Intermediate eines inhibierten bzw. arretierten Proliferations-Prozesses. Ob die Segregation der Proteine parallel zur Ausbildung der Konstriktionen stattfindet (Abb. 26 (1) und (3)) oder ob diese Schritte zeitlich aufeinanderfolgen (Abb. 26 (1), (2) und (3)) ist noch unklar.

## 5.6 Ausblick

Es wird in Zukunft von besonderem Interesse sein, die Funktionen der Pex11-Homologe auf metabolischer Ebene zu analysieren. Die Funktion von Pex11 könnte - mehr oder weniger direkt - über die Oxidation von Fettsäuren, in *S. cerevisiae* insbesondere der mittelkettigen Fettsäuren, kontrolliert sein (van Roermund et al., 2000). Hierbei zeigen Hefezellen, in denen die für Oxidation dieser Fettsäuren benötigten Enzyme durch Mutationen inaktiviert wurden, denselben Phänotyp, wie Hefezellen, denen das Pex11 fehlt, nämlich eine geringe Anzahl sehr großer Peroxisomen. Es stellt sich daher die Frage ob, und welche Moleküle, evt. Cofaktoren, möglicherweise von Pex11 in die Peroxisomen transportiert werden.

Im Gegensatz zu dieser Hypothese stehen Experimente, die in jüngerer Zeit mit Hefen durchgeführt wurden (Li und Gould, 2002), wobei hier Hefen in *Fettsäure-freiem* Medium kultiviert wurden und Pex11 in diesen Galaktose-induziert überexprimiert wurde. Die Pex11-induzierte peroxisomale Proliferation entspricht hier dem Effekt von oleathaltigem Medium. Dieser Befund steht im Gegensatz zur Annahme, daß die Oxidation mittelkettiger Fettsäuren in Hefe mit der Funktion von Pex11 verknüpft ist.

Die Beobachtung von, im Vergleich zum Wildtyp, vergrößerten Peroxisomen in reduzierter Anzahl läßt sich auch in humanen Patienten-Fibroblasten machen, bei denen die Aktivität von Enzymen der Fettsäure-Oxidation beeinträchtigt ist (Chang et al., 1999). Andererseits zeigen Zellweger-Zellen, in denen humanes Pex11-2 überexprimiert wird, eine deutliche Proliferation der in diesen Zellen vorliegenden „Peroxisomen-Ghosts“, obwohl bei diesen der Matrixprotein-Import, also auch jener der Enzyme für die Fettsäure-Oxidation, inhibiert ist

(Chang et al., 1999). Möglicherweise ist die peroxisomale Proliferation beim Menschen unabhängig von der Fettsäure-Oxidation.

Weiterhin wurde für *S. cerevisiae* gezeigt, daß die Expression von Pex11 vom Transkriptionsfaktor Adr1 reguliert wird, wobei dieser Faktor evt. direkt am Pex11-Promotor bindet. Parallel hierzu wird die Expression von Acyl-CoA-Oxidase, dem limitierenden Enzym der  $\beta$ -Oxidation, ebenfalls über Adr1 reguliert (Gurvitz et al., 2001). Dies würde eine Regulation von peroxisomaler Proliferation *neben* der des Fettsäureabbaus auf mRNA-Ebene bedeuten, was einen indirekten Einfluß von Pex11 auf die  $\beta$ -Oxidation aber nicht ausschließt.

In Mäusen, die Pex11-2-defizient sind, sind die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren und die Etherlipidsynthese beeinträchtigt. Außerdem sterben diese Tiere kurz nach der Geburt, sind ohne endogenes Pex11-2 also nicht überlebensfähig (Li et al., 2002).

Die Untersuchung der möglichen Verknüpfung von peroxisomaler Proliferation und Fettsäure-Oxidation über die Funktion von Pex11 in Hefe, bzw. Pex11-2 in Säugern, steht noch aus.

Die Untersuchung des direkten Effektes von Pex11 auf die Peroxisomenproliferation, insbesondere über die Bindung von Interaktionspartnern steht ebenfalls noch aus. Da die cytosolisch orientierten Termini der integralen Pex11-Proteine in Säugern die Interaktion mit cytosolischen Proteinen ermöglichen, wäre die Identifizierung dieser Interaktionspartner sehr aufschlußreich. Bisher wurde nur die Interaktion mit Pex19 gezeigt. Die Anbindung an Pex19 scheint über ein PTS zu erfolgen und dient wohl der Insertion von Pex11-2 in die peroxisomale Membran (Sacksteder et al., 2000).

# Literatur

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

**Angermüller S. und Fahimi H.D. (1988)** Heterogeneous staining of D-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney. A light and electron microscopic study. *Histochemistry* 88: 277-285

**Ansorge W. und Pepperkok R. (1988)** Performance of an automated system for capillary microinjection into living cells. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 16: 283-292

**Antoine B., Levrat F., Vallet V., Berbar T., Cartier N., Dubois N., Briand P., Kahn A. (1992)** Gene expression in hepatocyte-like lines established by targeted carcinogenesis in transgenic mice. *Exp. Cell Res.* 200: 175-185

**Anton M., Passreiter M., Lay D., Thai T.-P., Gorgas K., Just W.W. (2000)** ARF- and coatamer-mediated peroxisomal vesiculation. *Cell Biochem. Biophys.* 32: 27-36

**Baerends R.J.S., Rasmussen S.W., Hilbrands R.E., van der Heide M., Faber K.N., Reuvekamp P.T.W., Kiel J.A.K.W., Cregg J.M., van der Klei I.J., Veenhuis M. (1996)** The *Hansenula polymorpha* PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J. Biol. Chem.* 271: 8887-8894

**Baerends R.J.S., Faber K.N., Kram A.N., Kiel J.A.K.W., van der Klei I.J., Veenhuis M. (2000)** A stretch of positively charged amino acids at the N terminus of *Hansenula polymorpha* Pex3p is involved in incorporation of the protein into the peroxisomal membrane. *J. Biol. Chem.* 275: 9986-9995

**Berry M.N. und Friend D.S. (1969)** High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43, 506-520

**Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

**Braverman N., Steel G., Obie C., Moser A., Moser H.W., et al. (1997)** Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat. Genet.* 15: 369-376

**Breidenbach R.W. und Beevers H. (1967)** Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27: 462-469

**Burkhardt J.K., Echeverri C.J., Nilsson T., Vallee R.B. (1997)** Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell. Biol.* 139: 469-484

**Chang C.C., South S., Warren D., Jones J., Moser A.B., Moser H.W., Gould S.J. (1999)** Metabolic control of peroxisome abundance. *J. Cell Sci.* 112: 1579-1590



**Chudzik D.M.**, Michels P.A., de Walque S., Hol W.G.J. (2000) Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. *J. Mol. Biol.* 300: 697-707

**Cohen P.**, Griffin J.H., Camier M., Caizergues M., Fromageot P., Cohen J.S. (1972) *FEBS Lett* 1972 Sep 15;25(2):282-286

**Cosson P.**, Démollière C., Hennecke S., Duden R., Letourneur F. (1996)  $\delta$ - and  $\zeta$ -COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J.* 15: 1792-1798

**Cosson P. und Letourneur F.** (1994) Coatomer interaction with dilysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263: 1629-1631

**Cosson P. und Letourneur F.** (1997) Coatomer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 484-487

**Dammai V. und 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

**Danpure C.J.** (1996) Targeting and import of peroxisomal proteins. In: Hurtley S.M. (Hrsg.), *Protein targeting*, Oxford University Press, Oxford: S. 63-100

**de Duve C.** (1983) Les microcorpuscules de la cellule vivante. *Pour la Science (Scientific American)* 69: 80-91

**de Duve C. und Baudhuin P.** (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357

**Diestelkötter P. und Just W.W.** (1993) *In vitro* insertion of the 22 kD peroxisomal membrane protein into isolated peroxisomes. *J. Cell Biol.* 123: 1717-1725

**Dodt G.**, Bravermann N., Wong C., Moser A., Moser H.W., et al. (1995) Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat. Genet.* 9: 115-125

**Dodt G. und Gould S.J.** (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

**Draye J.**, van Hoof F., de Hoffman E., Vamecq J. (1987) Peroxisomal oxidation of L-2-hydroxyphytanic acid in rat kidney cortex. *Eur. J. Biochem.* 167: 573-578

**Dreyer C.**, Krey G., Keller H., Givel F., Helftenbein G., Wahli W. (1992) Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68: 879-887

**Dulbecco R. und Freeman G.** (1959) *Virology* 8: 396

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

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

**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

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

**Flynn C.R.,** Mullen R.T., Trelease R.N. (1998) Mutational analysis of a type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes. *Plant J.* 16: 709-720

**Fujiki Y.,** Hubbard A.L., Fowler S., Lazarow P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93: 97-102

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

**Glover J.R.,** Andrews D.W., Subramani S., Rachubinski R.A. (1994) Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 269: 7558-7563

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

**Gorgas K.** (1985) Serial section analysis of mouse hepatic peroxisomes. *Anat. Embryol. Berl.* 172: 21-32

**Gorgas K.** (1987) Morphogenesis of peroxisomes in lipid synthesizing epithelia. In: Fahimi H.D., Sies H. (Hrsg.), *Peroxisomes in Biology and Medicine*. Springer Verlag, Heidelberg: S. 3-17

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

**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

- Gould S.J. und Valle D. (2000)** Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. Trends Genet. 16: 340-345
- Gurvitz A., Hiltunen J.K., Erdmann R., Hamilton B., Hartig A., Ruis H., Rottensteiner H. (2001)** *Saccharomyces cerevisiae* Adr1p governs fatty acid  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferation by regulating POX1 and PEX11. J. Biol. Chem. 276: 31825-31830
- Hajra A.K., Burke C.L., Jones C.L. (1979)** Subcellular localization of acyl-coenzyme A: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in rat liver peroxisomes (microbodies). J. Biol. Chem. 254: 10896
- Harter C., Pavel J., Coccia F., Draken E., Wegehangel S., Tschochner H., Wieland F.T. (1996)** Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1902-1906
- Hartl F.U., Just W.W., Köster A., 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
- Hess R., Stäubli W., Riess W. (1965)** Nature of the hepatomegalic effect produced by ethylchlorophenoxy-isobutyric acid in rat. Nature 208: 856
- Heupel R. und Heldt H.W. (1992)** Transfer of metabolites between chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. In: Stabenau H. (Hrsg.), Phylogenetic Changes in Peroxisomes of Algae – Phylogeny of Plant Peroxisomes. Universität Oldenburg: S. 13-26
- Hoepfner D., van den Berg M., Philippsen 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
- Huber C.M., Saffrich R., Ansorge W., Just W.W. (1999)** Receptor-mediated regulation of peroxisomal motility in CHO and endothelial cells. EMBO J. 18: 5476-5485
- Huber C.M., Saffrich R., Anton M., Paßreiter M., Ansorge W., Gorgas K., Just W.W. (1997)** A heterotrimeric G protein-phospholipase A2 signaling cascade is involved in the regulation of peroxisomal motility in CHO cells. J. Cell Sci. 110: 2955-2968
- Huhse B., Rehling P., Albertini M., Blank L., Meller K., Kunau W.-H. (1998)** Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. J. Cell Biol. 140: 49-60
- Issemann I. und Green S. (1990)** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347: 645-650
- Jackson M.R., Nilsson T., Peterson P.A. (1990)** Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. EMBO J. 9: 3153-3162
- Jardim A., Liu W., Zheleznova 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

**Jones J.M.**; Morrell J.C., Gould S.J. (2001) Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* 153: 1141-1149

**Just W.W. und Soto U.** (1992) Biogenesis of peroxisomes in mammals. *Cell. Biochem. Funct.* 10: 159-165

**Just W.W.**, Gorgas K., Hartl F.-U., Heinemann P., Salzer M., Schimassek H. (1989) Biochemical effects and zonal heterogeneity of peroxisome proliferation induced by perfluorocarboxylic acids in rat liver. *Hepatology* 9: 570-581

**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

**Krisans S.K.** (1992) The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Ann. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7: 358-364

**Kunau W.-H.** (1998) Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 232-237

**Kunau W.-H. und Erdmann R.** (1998) Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr. Biol.* 8: R299-R302

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

**Latruffe N. und Vamecq J.** (2000) Evolutionary aspects of peroxisomes as cell organelles, and of genes encoding peroxisomal proteins. *Biol. Cell* 92: 389-395

**Lazarow P.B. und 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 P.B. und Fujiki Y.** (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 489-530

**Lee S.S.-T.**, Pineau T., Drago J., Lee E.J., Owens J.W., Kroetz D.L., Gonzalez F.J., et al. (1995) Targeted disruption of the  $\alpha$  isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell Biol.* 15: 3012-3022

**LeHir M. und Dubach U.C.** (1980) The activities of peroxisomal oxidases in periportal and perivenous zones of the rat liver acinus. *Histochemistry* 69: 95-99

**Letourneur F.**, Gaynor E.C., Hennecke S., Démollière C., Duden R., Emr S.D., Riezman H., Cosson P. (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79: 1199-1207

**Li X.,** Baumgart E., Morrell J.C., Jimenez-Sanchez G., Valle D., Gould S.J. (2002) Pex11 $\beta$  deficiency is lethal and impairs neuronal migration but does not abrogate peroxisome function. *Mol. Cell. Biol.* 22: 4358-4365

**Li X., und Gould S.J.** (2002) Pex11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J. Cell Biol.* 156: 643-651

**Lindmark D.G. und Müller M.** (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Trichomonas foetus* and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248: 7724-7728

**Lorenz P.,** Maier A.G., Baumgart E., Erdmann R., Clayton C. (1998) Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p. *EMBO J.* 17: 3542-3555

**Lowry et al.** (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

**Maier A.G.,** Schulreich S., Bremser M., Clayton C. (2000) Binding of coatamer by the PEX11 C-terminus is not required for function. *FEBS Lett.* 484: 82-86

**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

**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

**McCammion M.T.,** McNew J.A., Willy P.J., Goodman J.M. (1994) An internal region of the peroxisomal membrane protein PMP47 is essential for sorting to peroxisomes. *J. Cell Biol.* 124: 915-925

**McNew J.A. und Goodman J.A.** (1996) The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *TIBS* 21: 54-58

**Miura S.,** Mori M., Takiguchi M., Tatibana M., Furuta S., Miyazawa S., Hashimoto T. (1984) Biosynthesis and intracellular transport of enzymes of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *J. Biol. Chem.* 259: 6397-6402

**Miura S.,** Kasuya Arai I., Mori H., Miyazawa S., Osumi T., et al. (1992) Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions in vitro as a minimal peroxisome-targeting signal. *J. Biol. Chem.* 267: 14405-14411

**Nickel W.,** Malsam J., Gorgas K., Ravazzola M, Jenne N., Helms J.B., Wieland F.T. (1998) Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTP $\gamma$ S in vitro. *J. Cell Sci.* 111: 3081-3090

**Nilsson T.,** Jackson M., Peterson P.A. (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 58: 707-718

**Novikoff A.B. und Novikoff P.M.** (1982) Microperoxisomes and peroxisomes in relation to lipid metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* 386: 138-152

- Novikoff A.B. und Shin W.Y. (1964)** The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Micros. Oxford* 3: 187-206
- Opperdoes F.R. und Borst P. (1977)** Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 80: 360-364
- Osumi T., Tsukamoto T., Hata S., Yokota S., Miura S., Fujiki Y., Hijikata M., Miyazawa S., Hashimoto T. (1991)** Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 947-954
- Passreiter M., Anton M., Lay D., Frank R., Harter C., Wieland F.T., Gorgas K., Just W.W. (1998)** Peroxisome biogenesis: Involvement of ARF and Coatomer. *J. Cell Biol.* 141: 373-383
- Pause B., Saffrich R., Hunziker A., Ansorge W., Just W.W. (2000)** Targeting of the 22 kDa integral peroxisomal membrane protein. *FEBS Lett.* 471: 23-28
- Purdue P.E. und Lazarow P.B. (1994)** Peroxisomal biogenesis: multiple pathways of protein import. *J. Biol. Chem.* 269: 30065-30068
- Purdue P.E. und Lazarow P.B. (2001)** Peroxisome biogenesis. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 17: 701-752
- Rapp S., Saffrich R., Anton M., Jäkke U., Ansorge W., Gorgas K., Just W.W. (1996a)** Microtubule-based peroxisome movement. *J. Cell Sci.* 109: 837-849
- Rapp S., Saffrich R., Jäkke U., Ansorge W., Gorgas K., Just W.W. (1996b)** Microtubule-mediated peroxisomal saltations. *Ann. NY Acad. Sci.* 804: 666-668
- Reddy J.K. und Chu R. (1996)** Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: pursuit of a phenomenon. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804: 176-201
- 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
- Rhodin J. (1954)** Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Doktorarbeit, Karolinska Institute Aktiebolaget Godvil, Stockholm
- Rustan A.C., Christiansen E.N., Drevon C.A. (1992)** Serum lipids, hepatic glycerolipid metabolism and peroxisomal fatty acid oxidation in rats fed with  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids. *Biochem. J.* 283: 333-339
- Sacksteder K.A., Morrell J.C., Wanders R.J.A., Matalon R., Gould S.J. (1999)** MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* 274: 24461-24468

**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

**Sakai Y.**, Marshall P.A., Saiganji A., Takabe K., Saiki H. et al. (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

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

**Santos M.J.**, Imanaka T., Shio H., Small G.M., Lazarow P.B. (1988b) Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome-aberrant organelle assembly. *Science* 239: 1536-1538

**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

**Sheetz M.P.** (1996) Microtubule motor complexes moving membraneous organelles. *Cell. Struct. Funct.* 21: 369-373

**Simpson J.C.**, Wellenreuther R., Poustka A., Pepperkok R., Wiemann S. (2000) Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Reports* 1: 287-292

**Singh I.**, Moser A.E., Goldfischer S., und Moser H.W. (1984) Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepatorenal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4203-4207

**Skoneczny M. und Lazarow P.B.** (1998) A novel, non-PTS1, peroxisomal import route dependent on the PTS1 receptor Pex5p. *Mol. Biol. Cell* 9: 348a (Abstr.)

**Small G.M.**, Szabo L.J., Lazarow P.B. (1988) Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes. *EMBO J.* 7: 1167-1173

**Soto U.**, Rapp S., Gorgas K., Just W.W. (1993) Peroxisomes and lysosomes. In: LeBouton A.V. (Hrsg.), *Molecular and Cell Biology of the Liver*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA: S. 181-262

**Subramani S.** (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 445-478

**Swinkels B.W.**, Gould S.J., Bodnar A.G., Rachubinski R.A., 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

**Takada Y., Noguchi T.** (1986) Ureidoglycollate lyase, a new metalloenzyme of peroxisomal urate degradation in marine fish liver. *Biochem. J.* 235: 391-397

**Tanaka Y.**, Kanai Y., Okada Y., Nonaka S., Takeda S., Harada A., Hirokawa N. (1998) Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93: 1147-1158

**Thai T.-P.**, Rodemer C., Jauch A., Hunziker A., Moser A., Gorgas K., Just W.W. (2001) Impaired membrane traffic in defective ether lipid biosynthesis. *Hum. Mol. Gen.* 10: 127-136

**Titorenko V.I.**, Chan H., Rachubinski R.A. (2000) Fusion of small peroxisomal vesicles in vitro reconstructs an early step in the in vivo multistep peroxisome assembly pathway of *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Biol.* 148: 29-43

**Titorenko V.I.**, Ogrydziak D.M., Rachubinski R.A. (1997) Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5210-5226

**Titorenko V.I. und 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

**Tolbert N.E.** (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133-157

**Tsukamoto T.**, Hata S., Yokota S., Miura S., Fujiki Y., et al. (1994) Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor. *J. Biol. Chem.* 269: 6001-6010

**Urquhart A.J.**, Kennedy D., Gould S.J., Crane D.I. (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

**Vaisberg E.A.**, Grissom P.M., McIntosh J.R. (1996) Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. *J. Cell Biol.* 133: 831-842

**van Roermund C.W.T.**, Hettema E.H., Kal A.J., van den Berg M., Tabak H.F., Wanders R.J.A. (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 Roermund C.W.T.**, Tabak H.F., van den Berg M., Wanders R.J.A., Hettema E.H. (2000) Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 150: 489-497

**Wanders R.J.A.**, Barth P.G., Heymans H.S.A. (2001) Single peroxisomal enzyme deficiencies. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. 2, Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., editors. McGraw-Hill, New York. S. 3219-3256

**Wanders R.J.A. und Tager J.M.** (1998) Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol. Asp. Med.* 19: 69-154



**Zhang J.W. und Lazarow P.B. (1996)** Peb1p (Pas7p) is an intraperoxisomal receptor for the NH<sub>2</sub>-terminal, type 2, peroxisomal targeting sequence of thiolase: Peb1p itself is targeted to peroxisomes by an NH<sub>2</sub>-terminal peptide. *J. Cell Biol.* 132: 325-334

**Zhao L., Helms JB, Brügger B, Harter C, Martoglio B, Graf R, Brunner J, Wieland FT. (1997)** Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4418-4423

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Peroxisomen: Vorkommen und Morphologie.....	1
1.2 Funktionen der Peroxisomen.....	1
1.3 Peroxisomenbiogenese .....	3
1.4 Peroxisomale Proteine: Targeting, Regulation und Aufgaben.....	3
1.4.1 Peroxisomaler Matrixprotein-Import mittels PTS.....	4
1.4.2 Peroxisomaler Membranprotein-Import.....	5
1.4.3 Regulation der Peroxine .....	6
1.5 Die Pex11-Homologe induzieren peroxisomale Proliferation.....	7
1.5.1 Vorkommen von Pex11-Proteinen in niederen Organismen.....	7
1.5.2 Topologie und wichtige Domänen der Pex11-Homologe.....	8
1.6 Zielsetzung .....	9
<b>2.Materialien.....</b>	<b>11</b>
2.1 Verwendete Materialien und Geräte .....	11
2.1.1 Spezielle Chemikalien.....	11
2.1.2. Vorgefertigte Materialien.....	13
2.1.3. Enzyme und Inhibitoren.....	13
2.1.4 Antiseren.....	14
2.1.5 Grössenmarker für Elektrophorese .....	15
2.1.5.1 Agarosegelelektrophorese.....	15
2.1.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	15
2.1.6 Reagentiensätze .....	15
2.1.7. Bakterienstämme.....	15
2.1.8. Zelllinien.....	16
2.1.9 Klonierungsvektoren .....	16
2.1.10 Geräte.....	17
2.1.11 Medien und Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur .....	17
<b>3.Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden.....	18
3.1.1 Arbeiten mit E. coli.....	18
3.1.1.1 Kultur von E. coli Bakterien (XL1-blue).....	18
3.1.1.2 Herstellung transformationskompetenter Zellen .....	19
3.1.2 Amplifikation von Plasmiden.....	19
3.1.2.1 Mini-Präparation durch QIAprep Spin Miniprep Kit .....	19
3.1.2.2 QIAfilter Plasmid Maxi/MidiPrep.....	20
3.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	20
3.1.4 Quantifizierung, Verdau und Extraktion von Nucleinsäuren.....	21
3.1.4.1 Ermittlung über die optische Dichte.....	21
3.1.4.2 Ermittlung über die Bandenstärke in der Gelmatrix .....	22
3.1.5 Restriktionsverdau von DNA .....	22
3.1.6 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel mit QIAquick-Säulchen.....	23
3.2 Klonierung von Pex11-1- und Pex11-2-Konstrukten.....	24
3.2.1 Hergestellte cDNA-Konstrukte .....	25
3.2.1.1 Pex11-1-Konstrukte .....	25

3.2.1.2 Pex11-2-Konstrukte .....	25
3.2.2 Praktische Durchführung der Klonierung .....	26
3.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.2.2.2 Vektor-Dephosphorylierung durch SAP.....	27
3.2.2.3 Ligationen .....	28
3.2.2.4 Transformation von DNA in Bakterien.....	28
3.3 Zellbiologische Methoden.....	29
3.3.1 Passagieren und Lagerung von Zellen.....	30
3.3.2 Transfektion und Markierung von Zellen.....	31
3.3.2.1 Lipofektion von Zellen .....	31
3.3.2.2 Mikroinjektion von Säugerzellen.....	32
3.3.2.3 Butyratstimulation von schwach exprimierenden Zellklonen.....	32
3.3.2.4 Markieren von Lysosomen mit Lyso-Tracker .....	32
3.3.2.5 Markieren von Mitochondrien mit Mito-Tracker .....	33
3.3.2.6 Luciferasetest.....	33
3.3.2.6.1 Markieren von Luciferase mit TRNHS.....	33
3.3.2.6.2 Luciferaseimport und deren Nutzung als „Herkunftsnachweis“ .....	34
3.3.2.7 Farbstoffkopplung an BSA .....	34
3.3.3 Immunfluoreszenz.....	34
3.4 Biochemische Methoden.....	36
3.4.1 Einkonzentrieren und Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	36
3.4.1.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA).....	36
3.4.1.2 Carbonatextraktion von Membranen.....	36
3.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	37
3.4.2 SDS-PAGE und Proteindetektion .....	38
3.4.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
3.4.2.2 Autoradiographie:.....	39
3.4.2.3 Coomassie-Blau-Färbung .....	39
3.4.2.4 Silberfärbung .....	40
3.4.3 Transfer und Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen („Western Blotting“).....	40
3.4.4 In vitro-Transkription und –Translation .....	42
3.4.4.1 In vitro-Transkription .....	42
3.4.4.2 In vitro-Translation in Retikulozytenlysat.....	43
3.4.5 Überexpression des Pex11-2-(N 1-84) in Bakterien .....	43
3.4.5.1 Überexpression des N-Terminalen Pex11-2-Fragments in E. coli .....	43
3.4.5.2 Aufschluß der Bakterien mit dem überexprimierten rekombinanten Proteinfragment ...	44
3.4.5.3 Aufreinigen der His-getaggten Proteinfragmente per Nickel-Agarose-Säule .....	44
3.4.6 Quervernetzung von Pex11-1 bzw. Pex11-2 mit seinen Interaktionspartnern.....	44
3.5 Hefe-Doppelhybrid-System (Two-Hybrid-System) .....	45
3.5.1 Feste und flüssige Kulturmedien .....	46
3.5.2 Transformation von Hefen.....	46
3.5.3 Nachweis der Galaktosidase-Aktivität in selektierten Klonen.....	48
3.6 Spezielle Methoden.....	48
3.6.1 Isolierung von Primärhepatocyten .....	48
3.6.2 Isolierung von Peroxisomen aus Hepatocyten .....	49
3.6.3 Katalasetest .....	50
3.6.4 Kopplung von Peptiden an Thiopropylsepharose (TPS) .....	51
3.6.5 Coatomer-Bindungsassay .....	52

## **4. Ergebnisse ..... 53**

4.1 Pex11-cDNA-Konstrukte .....	53
4.1.1 Pex11-1-Konstrukte .....	54
4.1.2 Pex11-2-Konstrukte .....	55
4.2 Beschreibung der verwendeten Zellsysteme .....	57
4.3 Expression der Pex11-1-Konstrukte.....	58
4.3.1 Expression von wt-Pex11-1 .....	58
4.3.2 Expression verkürzter, unmarkierter Pex11-1-Konstrukte.....	58
4.3.3 Expression von Pex11-1-Fusionsproteinen.....	59
4.3.3.1 Expression von CFP-Pex11-1 .....	60
4.3.3.2 Expression von Pex11-1-YFP .....	60
4.3.3.3 Expression von Pex11-1-Konstrukten mit angefügtem Myc-Epitop .....	62
4.4 Expression der Pex11-2-cDNA-Konstrukte.....	62
4.4.1 Expression des wt-Pex11-2 .....	63
4.4.2 Expression von unmarkierten, verkürzten Pex11-2-Konstrukten.....	63
4.4.3 Expression von (E)GFP-Pex11-2-Fusionsproteinen.....	65
4.4.3.1 Expression von (E)GFP-Pex11-2 und die Bildung peroxisomaler Cluster.....	65
4.4.3.2 Cytoskelettabhängigkeit der peroxisomalen Clusterbildung.....	66
4.4.3.3 N-terminale Verkürzung von EGFP-Pex11-2 .....	68
4.4.3.4 Expression von Pex11-2-(N 1-84) und Pex11-2-(N 1-84)-EGFP .....	68
4.4.3.5 Coexpression von (N -24)-Pex11-2 und Pex11-2-(N 1-84) bzw. Pex11-2-(N 1-84)-EGFP .....	70
4.4.4 Expression von Myc-Pex11-2-Konstrukten.....	71
4.4.4.1 Expression von unverkürztem Myc-Pex11-2.....	72
4.4.4.2 Verkürzung des N-Terminus: Myc-(N -74)-Pex11-2.....	73
4.4.4.3 Myc-Konstrukte mit verkürztem C-Terminus.....	74
4.5 Funktionsanalyse des Pex11-2-C-Terminus .....	75
4.6 Coexpression von Pex11-1-Fusionsproteinen mit markiertem Pex11-2.....	75
4.6.1 Coexpression von CFP-Pex11-1 und Myc-Pex11-2 .....	75
4.6.2 Coexpression von Pex11-1-YFP und Pex11-2-Myc .....	76
4.7 Versuche zur Identifikation von Pex11-2-Interaktionspartnern.....	77
4.8 Resümee der Ergebnisse.....	79
<b>5.Diskussion.....</b>	<b>81</b>
5.1 Pex11-2 induziert peroxisomale Proliferation.....	81
5.2 Segregation peroxisomaler Membran- und Matrixproteine .....	81
5.3 Ausbildung peroxisomaler Cluster.....	84
5.4 Vergleich der Pex11-Proteine aus Einzellern und Säugern .....	87
5.5 Modell der Peroxisomen-Proliferation in Säugern.....	89
5.6 Ausblick .....	90
<b>Literatur.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>105</b>

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Funktion der Pex11-Homologe Pex11-1 und Pex11-2 aus Säugern. Es handelt sich hierbei um integrale peroxisomale Membranproteine mit zwei Transmembrandomänen und in das Zytoplasma ragenden Termini. Die funktionelle Bedeutung der cytoplasmatischen Termini, insbesondere des Pex11-2-N-Terminus, sollte in verschiedenen Experimenten untersucht werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob im N-Terminus von Pex11-2 ein Targeting-Signal enthalten ist.

Um diese Fragen zu klären wurden cDNA-Konstrukte erstellt. Hierbei wurden verschiedene Varianten von Verkürzungen der Pex11-Homologe am N-Terminus oder am C-Terminus hergestellt. Zum Teil wurde an beiden Termini verkürzt. Weiterhin wurden Fusionsproteine mit Marker-Molekülen wie Myc, GFP, CFP und YFP angefertigt. Dies sowohl für unverkürzte Pex11-Homologe, als auch für die verkürzten Varianten. Zur Analyse wurden die verschiedenen Konstrukte in AT3- und CHO-Zellen transfiziert, welche dann immunocytochemisch untersucht wurden. Es wurden unterschiedlich veränderte peroxisomale Phänotypen durch Expression der verschiedenen Konstrukte erzeugt:

I.) Die Expression von wt-Pex11-2 induziert eine peroxisomale Proliferation, bei der die Peroxisomenzahl etwa verzehnfacht wird. Nach Expression von N-terminal verkürztem (N-24)-Pex11-2 hingegen bleibt dieser proliferationsfördernde Effekt aus.

II.) Nach der Expression von Myc-Pex11-2 werden in CHO-Zellen tubuläre anstatt sphärischer Peroxisomen erzeugt. Zudem weisen diese Tubuli intraperoxisomale Proteinsegregation auf. Nach N-terminaler Verkürzung dieses Konstruktes um 24 Aminosäuren (Myc-(N-24)-Pex11-2) findet weiterhin eine Insertion in die Peroxisomenmembran statt. Eine Veränderung der Peroxisomen bleibt aber aus.

III.) Außerdem erzeugte GFP-Pex11-2 in den transfizierten CHO- oder AT3-Zellen Cluster peroxisomaler Tubuli. Durch Inkubation mit dem Inhibitor Nocodazol wurden Mikrotubuli als ausschlaggebende Zellstruktur für die peroxisomale Clusterbildung identifiziert. Nach Expression des N-terminal um 24 bzw. 74 Aminosäuren verkürzten GFP-Fusionsproteins wurde keine Clusterbildung induziert, obwohl das Protein nach wie vor in die Peroxisomenmembran inseriert wird.

Die resultierenden veränderten peroxisomalen Phänotypen in den mit cDNA-Konstrukten transfizierten Säugerzellen weisen auf eine funktionelle Bedeutung, v.a. des N-Terminus, von Pex11-2 hin. Alle durch Expression rekombinanter Proteine induzierten veränderten Phänotypen waren nur mit unverkürzten Konstrukten zu beobachten. N-terminale Verkürzung um 24 Aminosäuren unterband jeglichen Einfluß der Konstrukte auf den peroxisomalen Phänotyp.

Der Pex11-2-N-Terminus könnte folglich verschiedene Funktionen besitzen: (i) Beim peroxisomalen Transport könnte er die Mikrotubuli-Assoziation, evt. über Kinesin, beeinflussen. (ii) Bei der Peroxisomenbiogenese könnte er insbesondere bei der Fragmentierung von Bedeutung sein. Die nach Myc-Pex11-2-Expression erzeugten tubulären Strukturen könnten Intermediate auf dem Weg zur peroxisomalen Fragmentierung darstellen. Die Abtrennung der Fragmente könnte durch das Myc-Pex11-2 sterisch inhibiert sein.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß der Pex11-2-N-Terminus kein funktionsfähiges PTS enthält. Letzteres ist wohl im luminalen Loop des Pex11-2 lokalisiert.

Die Identifikation möglicher cytosolischer Interaktionspartner des Pex11-2-N-Terminus, die bei den beschriebenen Vorgängen von Bedeutung sind, erfordert weitergehende Untersuchungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente weisen auf das Vorhandensein unterschiedlicher funktioneller Abschnitte innerhalb des Pex11-2-Moleküls hin. Sie bilden somit eine Basis für die weitere Charakterisierung dieses Proteins, das für die Peroxisomenbiogenese von großer Bedeutung ist.