

**Funktionelle Charakterisierung**  
**des peroxisomalen Membranproteins Pex10p**  
**aus *Arabidopsis thaliana***

Uwe Albert Schumann

Institut für Botanik und Mikrobiologie  
Lehrstuhl für Botanik  
Technische Universität München

**Funktionelle Charakterisierung  
des peroxisomalen Membranproteins Pex10p  
aus *Arabidopsis thaliana***

Uwe Albert Schumann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. C. Gietl  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hock

Die Dissertation wurde am 20.10.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt am 03.12.2003 angenommen.

## INHALTSVERZEICHNIS

Liste der verwendeten Abkürzungen .....	IX
Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2

### A. EINLEITUNG

<b>1 Die Peroxisomenforschung im Rückblick .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Vorkommen und Funktionen von Peroxisomen .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Die Unterscheidungen und Umwandlungen von Peroxisomen in Pflanzen... 4</b>	
2.1.1 Die Klasse der Glyoxysomen .....	5
2.1.2 Die Klasse der Blatt-Peroxisomen .....	5
2.1.3 Die Klasse der Wurzel-Peroxisomen .....	6
2.1.4 Die Klasse der „unspezialisierten“ Peroxisomen .....	6
2.1.5 Peroxisomen in Algen .....	6
2.1.6 Die Übergänge von pflanzlichen Peroxisomen in andere Klassen .....	7
<b>2.2 Peroxisomen in nicht pflanzlichen Organismen .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Peroxisomen in Hefen .....	8
2.2.2 Peroxisomen in tierischen Evertebraten .....	9
2.2.3 Peroxisomen in Säugern und Menschen .....	9
<b>2.3 Zusätzliche Funktionen und Eigenschaften von Peroxisomen in verschiedenen Organismen .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Das phänotypische Erscheinungsbild von Organismen mit dysfunktionalen Peroxisomen .....</b>	<b>11</b>
<b>4 Bislang identifizierte Gene, die an der Peroxisomen-Biogenese beteiligt sind.....</b>	<b>14</b>
<b>5 Die Biogenese von Peroxisomen .....</b>	<b>16</b>
<b>5.1 Der peroxisomale Import von Matrixproteinen.....</b>	<b>18</b>
5.1.1 Das Targeting cytosolischer Cargo-Proteine .....	19
5.1.2 Andocken eines Cargo-Rezeptor-Komplexes an die peroxisomale Membran .....	22
5.1.3 Der Translokationsapparat und der Verbleib des Rezeptors .....	23
<b>5.2 Die Insertion peroxisomaler Membranproteine .....</b>	<b>25</b>
<b>6 Die Bedeutung von PEX10 in verschiedenen Organismen .....</b>	<b>27</b>
<b>7 Ziele dieser Arbeit .....</b>	<b>29</b>

## B. MATERIAL UND METHODEN (allgemeiner Teil)

<b>8</b>	<b>Pflanzen</b> .....	<b>32</b>
<b>8.1</b>	<b>Anzucht</b> .....	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>Mikroorganismen</b> .....	<b>33</b>
<b>9.1</b>	<b>Bakterien</b> .....	<b>33</b>
9.1.1	Medien.....	33
9.1.2	Allgemeine molekulare Techniken und Protokolle.....	33
9.1.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien von <i>E.coli</i> .....	33
9.1.2.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> .....	34
9.1.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	35
9.1.2.4	Herstellung elektrokompenter Agrobakterien.....	36
9.1.2.5	Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompente Agrobakterien.....	36
9.1.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i> .....	37
<b>9.2</b>	<b>Hefen</b> .....	<b>38</b>
9.2.1	Kultivierung und Lagerung von <i>Hansenula polymorpha</i> .....	38
9.2.2	Präparation von elektrokompenten <i>H. polymorpha</i> -Zellen .....	40
9.2.3	Elektrotransformation von <i>H. polymorpha</i> .....	41
9.2.4	Wachstum und Induktion von <i>AthPex10p</i> und seiner Hybrid-Konstrukte.....	41
<b>10</b>	<b>Plasmid-Vektoren</b> .....	<b>42</b>
<b>11</b>	<b>Enzyme</b> .....	<b>42</b>
<b>12</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>43</b>
<b>13</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>44</b>

## B. MATERIAL UND METHODEN (spezieller Teil)

<b>14</b>	<b>Klonierung von <i>PEX10</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>45</b>
<b>14.1</b>	<b>Sequenzhomologien von <i>Pex10p</i> in <i>Arabidopsis</i>, Mensch und Hefe</b> .....	<b>45</b>
<b>14.2</b>	<b>Abfrage von EST-Datenbanken nach der cDNA von <i>AthPEX10</i></b> .....	<b>45</b>
<b>14.3</b>	<b>Herstellung einer Digoxigenin markierten <i>AthPEX10</i>-Sonde</b> .....	<b>45</b>
14.3.1	Durchführung der DIG-PCR.....	45
14.3.2	Bestimmung der Sondenkonzentration durch Dot Blot .....	46
<b>14.4</b>	<b>Screening der <math>\lambda</math>-ZipLox Bibliothek nach dem Vollängenklon von <i>AthPEX10</i></b> .....	<b>47</b>
14.4.1	Amplifikation der cDNA-Bibliothek .....	48
14.4.2	Screening einer cDNA-Bibliothek mithilfe der <i>AthPEX10</i> -Sonde ....	49

14.4.3	Die <i>in vivo</i> -Excision von <i>AthPEX10</i> in pZL1 des Lambda-ZIPLOX Phagen .....	54
14.4.4	Sequenzierung putativ positiver Klone von <i>AthPEX10</i> .....	54
<b>15</b>	<b>Klonierung von <i>PEX7</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>55</b>
15.1	<i>Sequenzhomologien von Pex7p in Arabidopsis, Maus und Mensch</i> .....	55
15.2	<i>Herstellung einer DIG-markierten Pex7-Sonde</i> .....	55
15.3	<i>Screening einer <math>\lambda</math>-ZipLox Bibliothek nach einem Volllängenklon von <i>AthPEX7</i> .....</i>	<i>56</i>
<b>16</b>	<b>Klonierung einer nodule enhanced Malatdehydrogenase (neMDH) aus der Sojabohne (<i>Glycine max</i>) .....</b>	<b>56</b>
<b>17</b>	<b>Erzeugung von Antikörpern gegen das Expressionsprodukt von <i>AthPEX10</i>.....</b>	<b>56</b>
17.1	<i>Generierung eines <i>AthPex10-6xHis</i>-Proteins .....</i>	<i>57</i>
17.1.1	Klonierung von <i>AthPEX10</i> in pQE-60 .....	57
17.1.2	Induktion und Expression des Proteins .....	58
17.1.3	Abernten der Zellen und Herstellung eines Lysats.....	59
17.1.4	Bindung des <i>AthPex10-6xHis</i> -Proteins an Ni-NTA-Resin .....	60
17.1.5	Affinitätsreinigung von <i>AthPex10p-6xHis</i> an einer Nickelchelate-Säule.....	60
17.1.6	Aufkonzentrierung des <i>AthPex10-6xHis</i> -Proteins .....	61
17.1.7	Erzeugung eines Antiserums .....	61
<b>18</b>	<b>Funktionsanalyse von <i>AthPEX10</i> in <i>Hansenula polymorpha</i>.....</b>	<b>61</b>
18.1	<i>Vergleich der Peptidsequenzen von <i>AthPex10p</i> und <i>HpPex10p</i> und die Klonierung der codierenden Sequenzen in das Vektorplasmid <i>pHIPZ4</i>.....</i>	<i>62</i>
18.1.1	Klonierung von <i>HpPEX10</i> aus pET4 in <i>pHIPZ4</i> .....	63
18.1.2	Klonierung von <i>AthPEX10</i> in <i>pHIPZ4</i> .....	64
18.2	<i>Klonierung verschiedener Hybridkonstrukte in Plasmidvektor <i>pHIPZ4</i>.....</i>	<i>64</i>
18.2.1	Klonierung des Hybridkonstrukts HK1 in <i>pHIPZ4</i> .....	65
18.2.2	Klonierung des Hybridkonstrukts HK2 in <i>pHIPZ4</i> .....	66
18.2.3	Klonierung des Hybridkonstrukts HK3 in <i>pHIPZ4</i> .....	67
18.2.4	Klonierung des Hybridkonstrukts HK4 in <i>pHIPZ4</i> .....	68
18.3	<i>Linearisierung der Plasmidkonstrukte .....</i>	<i>70</i>
18.4	<i>Die Induktion und Expression des Fremdproteins .....</i>	<i>70</i>
18.5	<i>Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der Hefezellen (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Veenhuis).....</i>	<i>71</i>
18.6	<i>Biochemische Untersuchungen zur Lokalisation von <i>AthPex10p</i> in <i>Hansenula</i> .....</i>	<i>72</i>

18.6.1	Präparation eines Rohzellextraktes in Anwesenheit von TCA .....	72
18.6.2	TCA-Präzipitation von Proteinen.....	72
18.6.3	Präparation eines Zellhomogenats in <i>Hansenula polymorpha</i> .....	73
18.6.4	Durchführung einer Differentialzentrifugation .....	74
18.6.5	Durchführung einer Saccharose-Gradienten-Zentrifugation.....	75
18.6.6	Enzymaktivitätsmessungen zur Kontrolle der Organellenfraktionen .....	76
<b>19</b>	<b>Analyse einer <i>AthPEX10</i>-Transposon-Insertionslinie und ihre Komplementation mit <i>AthPEX10</i> .....</b>	<b>77</b>
<i>19.1</i>	<i>Herkunft der Transposon-Linie.....</i>	<i>77</i>
<i>19.2</i>	<i>Definition der Transposon-Linie .....</i>	<i>77</i>
<i>19.3</i>	<i>Lokalisation des Ds-Elements innerhalb von pex10 der T-Linie .....</i>	<i>77</i>
<i>19.4</i>	<i>Konstruktion der Transposon-Linie .....</i>	<i>78</i>
<i>19.5</i>	<i>Die genetische Phänotypanalyse.....</i>	<i>79</i>
19.5.1	Segregation der Keimlinge auf Kanamycin .....	79
19.5.2	Verifikation und Ausrichtung der <i>pex10</i> -Insertion mittels PCR.....	80
19.5.3	Aufspaltung und makroskopischer Phänotyp der Samen innerhalb der Schoten.....	80
<i>19.6</i>	<i>Komplementation der letalen T-Linie mit der cDNA von AthPEX10.....</i>	<i>80</i>
19.6.1	Verwendete Plasmide und Klonierungsstrategie .....	80
19.6.2	Doppelselektion auf Keimlinge mit Kanamycin- und Phosphinotricinresistenz .....	81
<i>19.7</i>	<i>Lichtmikroskopische Untersuchungen an letalen und vitalen Embryonen.....</i>	<i>82</i>
<i>19.8</i>	<i>Elektronenmikroskopische Untersuchungen an letalen und vitalen Embryonen (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Wanner) .....</i>	<i>82</i>
<i>19.9</i>	<i>Histochemische GUS-Färbung einer heterozygoten Transposon-Linie.....</i>	<i>82</i>
<b>20</b>	<b>Generierung und Analyse einer dysfunktionalen Zinkfinger-Linie.....</b>	<b>83</b>
<i>20.1</i>	<i>Erzeugung eines dysfunktionalen Zinkfinger-cDNA-Konstrukts mithilfe der „splicing by overlap extension“-PCR-Methode .....</i>	<i>84</i>
<i>20.2</i>	<i>Klonierung der dZn-cDNA in den binären Vektor pBI121 und dessen Transformation in A. tumefaciens und A. thaliana.....</i>	<i>85</i>
<i>20.3</i>	<i>Die Analyse des Phänotyps .....</i>	<i>86</i>
<i>20.4</i>	<i>Makroskopische Phänotypbestimmung des Habitus .....</i>	<i>86</i>
<i>20.5</i>	<i>Physiologische Phänotypbestimmung durch Erfassung von Photo- synthese-Parameter mithilfe des Chlorophyllfluorometers PAM-2000 .....</i>	<i>86</i>
<i>20.6</i>	<i>Physiologische Phänotypbestimmung der Wurzelwachstumsraten .....</i>	<i>89</i>

20.7	<i>Physiologische Phänotypbestimmung der Hypokotyllängen</i> .....	89
20.8	<i>Erfassung verschiedener Chlorophyllparameter von Blattpigmentextrakten</i> .....	90
20.9	<i>Elektronenmikroskopische Phänotypbestimmung</i> .....	91
20.10	<i>Kompensation des Phänotyps durch Anzucht in Hoch-CO<sub>2</sub>-Kammern</i> .....	91
20.11	<i>Transkriptanalyse verschiedener dZn-Linien</i> .....	91
	20.11.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Keimlingen .....	92
	20.11.2 Durchführung der cDNA-Erststrangsynthese.....	92
	20.11.3 Durchführung der PCR zur Transkriptanalyse .....	93
	20.11.4 Aufreinigung, Amplifikation und Verdau der Transkripte mit <i>Mbi</i> ... 93	
20.12	<i>Lokalisation der cDNA-Insertionen bei der phänotypisch idealen Zinkfinger-Linie dZn 1/3/5/3 (in Zusammenarbeit mit Dr. H. Horvarth)</i> .....	94
20.13	<i>Die Charakterisierung der funktionalen Bedeutung des RING-Finger-Motivs</i> .....	95

### C. ERGEBNISSE

21	<i>Klonierung und Sequenzierung von AthPEX10</i> .....	96
22	<i>Klonierung und Sequenzierung des PTS2-Rezeptors AthPEX7</i> .....	98
23	<i>Klonierung einer nodule enhanced Malatdehydrogenase (neMDH) aus der Sojabohne (Glycine max)</i> .....	101
24	<i>Rekombinante Expression eines AthPex10-6xHis-Proteins zur Generierung von Antikörpern</i> .....	101
	24.1 <i>Klonierung von AthPex10-6xHis in den Expressionsvektor pQE-60 und dessen Transformation in E. coli M15</i> .....	101
	24.2 <i>Expression des Zielproteins AthPex10p-6xHis in E. coli</i> .....	102
	24.3 <i>Aufreinigung des AthPex10-6xHis-Proteins an einer Nickel-Chelat-Säule unter denaturierenden Bedingungen</i> .....	106
	24.4 <i>Bilanz der Expressionseffizienz von AthPex10-6xHis in M15[pREP4]</i> .....	107
	24.5 <i>Gewinnung eines Antiserums gegen AthPex10-6xHis-Protein</i> .....	108
25	<i>Versuch einer Funktionsanalyse von AthPex10p in Hansenula polymorpha</i> .....	108
	25.1 <i>Transformation eines pex10-defizienten Hansenula-Stammes mit AthPEX10</i> .....	109
	25.1.1 Kontrolle der Wachstumsraten auf Methanol.....	109
	25.1.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis peroxisomaler Strukturen im Hybridkonstrukt HK4.....	111
25.2	<i>Biochemische Lokalisationsuntersuchungen zum Targeting von AthPex10p in H. polymorpha</i> .....	113

25.2.1	Analyse einer Differentialzentrifugation.....	113
25.2.2	Analyse von Saccharosegradienten zur biochemischen Detektion von <i>AthPex10p</i> .....	115
<b>26</b>	<b>Inaktivierung von <i>AthPex10p</i> führt zum Absterben des reifenden Embryos ....</b>	<b>117</b>
26.1	<i>Verifikation und Ausrichtung der pex10-Insertion mittels PCR.....</i>	<i>117</i>
26.2	<i>Die Samenanlagen in Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen.....</i>	<i>119</i>
26.3	<i>Die Samenanlagen in heterozygoten Transposonschoten.....</i>	<i>120</i>
26.3.1	Makroskopischer Phänotyp auffälliger Samen .....	120
26.3.2	Das Segregationsverhältnis innerhalb transgener Schoten .....	121
26.4	<b><i>Komplementation der letalen Transposonlinie mit der AthPEX10-cDNA .....</i></b>	<b><i>123</i></b>
26.4.1	Vorerfahrungen mit Basta® und Bialaphos®.....	123
26.4.1.1	<i>Die Anwendung von Basta® .....</i>	<i>123</i>
26.4.1.2	<i>Die Anwendung von Bialaphos.....</i>	<i>124</i>
26.4.2	Verifikation der Komplementation einer T-Linie mit <i>AthPEX10</i> ....	125
26.4.2.1	<i>Das Screening von Keimlingen der F0-Generation zur Isolierung von doppeltransgenen F1-Kandidaten auf geeignetem Selektionsmedium.....</i>	<i>125</i>
26.4.2.2	<i>Molekularbiologisches Screening nach Kandidaten für eine Doppelinsertion.....</i>	<i>126</i>
26.4.2.3	<i>Das Screening nach homozygoten Knockouts, aber mit PEX10-cDNA komplementierten und folglich vitalen Transposonlinien der F2-Generation.....</i>	<i>127</i>
26.5	<b><i>Lichtmikroskopische Analyse der letalen Embryonen.....</i></b>	<b><i>131</i></b>
26.5.1	Embryogenese in <i>Arabidopsis</i> -Wildtyp-Linien .....	131
26.5.2	Die Embryogenese der homozygoten Transposon-Individuen .....	135
26.6	<b><i>Elektronenmikroskopische Analyse der letalen Embryonen.....</i></b>	<b><i>136</i></b>
26.6.1	Die Entwicklung vitaler Embryonen.....	137
26.6.2	Die Entwicklung letaler Embryonen .....	142
<b>27</b>	<b>Überexpression von <i>Athpex10</i> mit zerstörtem Zinkfinger-Motif in Arabidopsis-Wildtyp führt zu phänotypischen Merkmalen .....</b>	<b>146</b>
27.1	<b><i>Klonierung einer dZn-cDNA in den binären Expressionsvektor pBI121 und Transformation in A. tumefaciens.....</i></b>	<b><i>146</i></b>
27.2	<b><i>Transformation von A. thaliana mit transgenen Agrobakterien.....</i></b>	<b><i>147</i></b>
27.3	<b><i>Makroskopische Analyse der Phänotypen.....</i></b>	<b><i>148</i></b>
27.4	<b><i>Kompensation der dZn-Phänotypen durch Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen .....</i></b>	<b><i>150</i></b>
27.5	<b><i>Physiologische Charakterisierung einer Zinkfinger-„disruption“-Linie ...</i></b>	<b><i>153</i></b>

27.5.1	Erhebung von Photosynthese-Parametern mit dem Fluorometer PAM-2000 .....	153
27.5.2	Bestimmung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte von Blättern .....	155
27.5.3	Der Einfluss von Licht, Zucker und CO <sub>2</sub> auf das Wachstum von Keimlingen .....	157
<b>27.6</b>	<b><i>Elektronenmikroskopische Analyse des Phänotyps</i></b> .....	<b>165</b>
<b>27.7</b>	<b><i>Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Expression von dZnpex10 und der phänotypischen Merkmalsausprägung innerhalb der dZn-Linie 1/3/5/3</i></b> .....	<b>166</b>
27.7.1	Rückkreuzung der homozygoten dZn-Linie 1/3/5/3 mit einer Wildtyp-Linie .....	166
27.7.2	Transkriptanalyse auffälliger und unauffälliger homozygoter dZn-Linien.....	167
27.7.2.1	<i>Vorversuch zur Spezifität von MbiI in den Nukleotidsequenzen von pex10- und Wildtyp PEX10-cDNA</i> .....	167
27.7.2.2	<i>Vergleich der Transkriptmengen in verschiedenen Pflanzenlinien</i> .....	168
27.7.2.3	<i>Der Vergleich von Transkriptverteilungen innerhalb einer Linie nach Verdau mit dem Restriktionsenzym MbiI</i> .....	169
27.7.3	Die Bestimmung der Insertionsstellen im Genom der dZn-Linie 1/3/5/3 (in Zusammenarbeit mit Dr. H. Horvarth) .....	170
<b>27.8</b>	<b><i>Die Komplementation der Transposon-Linie mit dZnpex10 und ihre Charakterisierung nach phäno- und genotypischen Gesichtspunkten</i></b> .....	<b>171</b>

## D. DISKUSSION

<b>28</b>	<b>Die Klonierung des Gens für den PTS2-Rezeptor Pex7p aus <i>A. thaliana</i></b> .....	<b>174</b>
<b>29</b>	<b>Die Klonierung des Gens für das integrale Membranprotein Pex10p aus <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>175</b>
<b>30</b>	<b>Die Herstellung und Bewertung eines Antikörpers gegen <i>AthPex10px6His</i></b> .....	<b>177</b>
<b>31</b>	<b>Funktionsanalyse von <i>AthPex10p</i> in <i>Hansenula polymorpha</i></b> .....	<b>180</b>
<b>31.1</b>	<b><i>Die Komplementation eines pex10-defizienten Hansenula-Stammes mit dem Vollängen-Gen AthPEX10 und Hybridkonstrukten aus Hefe und Pflanze</i></b> .....	<b>181</b>
31.1.1	Die physiologische Charakterisierung komplementierter <i>pex10</i> -defizienter <i>Hansenula</i> -Stämme anhand des Wachstums auf methanolhaltigem Medium .....	182
31.1.2	Die elektronenmikroskopische Kontrolle der Fähigkeit zur Komplementation .....	183

31.1.3	Die Bewertung der Komplementationsversuche.....	184
31.2	<i>Die Lokalisation von AthPex10p in Hansenula polymorpha</i> .....	186
32	<b>Die Analyse einer PEX10-Transposon-Linie</b> .....	189
32.1	<i>Die genetische Phänotypanalyse</i> .....	189
32.2	<i>Lichtmikroskopische Untersuchungen an letalen Embryonen der T-Linie</i> .....	190
32.3	<i>Die elektronenmikroskopische Charakterisierung von pex10-defizienten Arabidopsis-Embryonen</i> .....	191
32.4	<i>Die Komplementation letaler Genotypen mit dem Volllängenklon von AthPEX10 und der cDNA des zerstörten Zinkfinger-Motivs</i> .....	196
33	<b>Die Charakterisierung einer überexprimierten dZn-Linie mit dysfunktionalem RING-Finger-Motiv</b> .....	197
33.1	<i>Die makroskopische Phänotypbestimmung auffälliger dZn-Linien</i> .....	199
33.2	<i>Die physiologische Phänotypbestimmung einer ausgewählten dZn-Linie</i> .....	202
33.3	<i>Die ultrastrukturelle Phänotypbestimmung einer auffälligen dZn-Linie</i> ...	204
34	<b>Die Synthese aus Resultaten mit AthPEX10 in Hefe, Transposon- und dZn-Linie und die Erstellung eines funktionalen Modells für AthPEX10p</b> .....	207
	<b>Literatur</b> .....	214
	<b>Appendix</b> .....	239

## APPENDIX

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

- **Schumann U, Wanner G, Schmid M, Gietl C** (2003). AthPEX10, a nuclear gene essential for peroxisome and storage organelle formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *PNAS* 100: 9626-9631.
- **Imsande J, Berkemeyer M, Scheibe R, Schumann U, Gietl C, Palmer RG** (2001). A soybean plastid targeted NADH-malate dehydrogenase: cloning and expression analysis. *Amer. J. Botany* 88, 2136-2142.
- **Schumann U, Gietl C, Schmid M** (1999). Sequence analysis of a cDNA encoding Pex7p, a peroxisomal targeting signal 2 receptor from *Arabidopsis thaliana* (Accession No. AF130973). (PGR99-060). *Plant Physiol.* 120, 339.
- **Schumann U, Gietl C, Schmid M** (1999). Sequence analysis of a cDNA encoding Pex10p, a Zinc-binding peroxisomal integral membrane protein from *Arabidopsis thaliana* (Accession No. AF119572). (PGR99-025). *Plant Physiol.* 119, 1147.

## Liste der verwendeten Abkürzungen:

• AOX	▶	Alkoholoxidase
• APX	▶	Ascorbatperoxidase
• AS	▶	Aminosäure(n)
• CG	▶	Complementation Group
• CHO	▶	<i>Chinese hamster ovary</i>
• DMSO	▶	Dimethyl Sulfoxid
• EPR	▶	Eppendorf-Reaktionsgefäß
• ER-RSM	▶	Endoplasmatisches Retikulum- <i>retrieval</i> Signalmotiv
• esER	▶	<i>export site</i> – Endoplasmatisches Retikulum
• EST	▶	<i>Expressed Sequenced Tag</i>
• IRD	▶	<i>Infantile Refsum Disease</i>
• MBP	▶	<i>Maltose Binding Protein</i>
• mPTS	▶	membranöses peroxisomales Targeting Signal
• NALD	▶	Neonatale Adrenoleukodystrophie
• NCBI	▶	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
• Ni-NTA-AP	▶	Nickel-NTA-Alkalische Phosphatase
• nsPMEs	▶	neu synthetisierte peroxisomale Matrix-Enzyme
• PAM	▶	Puls-Amplituden-Modulation
• PBD	▶	<i>Peroxisome biogenesis disorder</i>
• pER	▶	peroxisomales Endoplasmatisches Retikulum
• pfu	▶	<i>plaque forming units</i>
• PMP	▶	Peroxisomales Membranprotein
• PTS1, PTS2	▶	Peroxisomales Targeting Signal Typ 1, bzw. Typ2
• RCDP	▶	Rhizomelische Chondrodysplasia punctata
• rpm	▶	<i>rounds per minute</i>
• RT	▶	Raumtemperatur
• RuBisCO	▶	Ribulose 1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
• TMR	▶	transmembrandurchspannende Region
• TPR	▶	<i>Tetratrico peptide repeat</i>
• ZS	▶	Zellweger-Syndrom



## Zusammenfassung

Im Menschen spiegelt sich die essentielle Bedeutung von Proteinen bei der Peroxisomen-Biogenese durch das letal verlaufende Krankheitsbild des Zellweger-Syndroms wider, das durch den Defekt beteiligter Proteine (Peroxine) hervorgerufen wird. In Fibroblasten-Zellen des Menschen und in *P. pastoris* führt das Ausschalten von *PEX10* zur Anhäufung leerer Membranvesikel mit einer Importdefizienz von Matrixproteinen, während Nullmutanten von *H. polymorpha* keinerlei peroxisomale Strukturen mehr aufweisen.

Aus verschiedenen Pflanzenarten wurden bislang nur 6 von vermutlich 15 Peroxinen kloniert. In dieser Untersuchung wurden mit der Klonierung des PTS2-Rezeptors *PEX7* und dem putativ integralen Membranprotein *PEX10* die cDNA-Sequenzen zweier weiterer Peroxine aus *Arabidopsis* aufgeklärt. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von *AthPEX10* als ein essentielles Peroxin-Homolog im Genom von *Arabidopsis thaliana*.

Die Analyse einer *PEX10*-Transposon-Linie ergab eine ER-korrelierte Funktion des Gens bei der Formation von Lipidkörpern und Proteinvesikeln. Eine Ausschaltung des Gens führte in Embryonen des Globular- und Herzstadiums zu einer abnormen Organisation der Membranen auf Ultrastrukturebene, während Peroxisomen sich nicht ausbilden konnten. Der Phänotyp liess sich durch Komplementation mit dem Volllängen-Gen kompensieren, nicht aber durch die Transformation von *pex10* mit zerstörtem Zinkfinger-Motiv.

Um neben der frühen Funktion von *AthPEX10* bei der multiplen Organellenbiogenese zusätzliche Aufgaben innerhalb der Peroxisomen-Funktion untersuchen zu können, wurde *dZnpex10* mit zerstörtem Zinkfingermotiv in Wildtyppflanzen überexprimiert. In Wachstumstests und Untersuchungen der Photosyntheseleistungen unter Normalatmosphäre und fünffach erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration konnte ein überzeugender Zusammenhang zwischen der Peroxisomen-Funktionalität und photorespiratorischen Effekten hergestellt werden.

Lokalisationsstudien von *AthPex10p* in *H. polymorpha* unterstützen die Hypothese einer eigenständigen und pleiotropen Funktion von *PEX10* in Pflanzen, die durch Komplementationsuntersuchungen *pex10*-defizienter Hefestämme mit verschiedenen Hybridkonstrukten getragen wird.

Hinweise auf eine ER-abhängige Funktion von *AthPEX10* bei der frühen Peroxisomen-Biogenese in *Arabidopsis*-Zellkulturen ergaben sich auch durch *in situ* Lokalisationsanalysen mithilfe eines Antikörpers gegen *AthPex10*-6His in Kollaboration mit dem *Department of Biology* an der *Arizona State University* in USA.

Die Erkenntnisse aus den verschiedenen Untersuchungsansätzen flossen in die Erstellung eines Funktionsentwurfs von *AthPex10p* während der frühen Organellenbiogenese ein, sowie eines Modells zum Matrixprotein-Import in Pflanzen.

## Summary

In humans the essentiality of proteins for peroxisomal biogenesis is reflected in the fatal disease “Zellweger Syndrom”, which is caused by defective proteins (peroxins). In human fibroblasts and in cells of *Pichia pastoris* the knockout of *PEX10* leads to accumulation of empty membrane vesicles that are deficient in the import of matrix proteins, whereas knockouts in *Hansenula polymorpha* fibroblasts completely lack peroxisomal structures.

So far, only six out of presumably 15 peroxins from various plant species have been cloned. In this study, the cDNA sequence of two additional *Arabidopsis* peroxins, PTS2-receptor *PEX7* and putative integral membrane protein *PEX10*, are described. The object of the study was the characterization of *AthPex10p* as an essential peroxin homolog in the *Arabidopsis thaliana* genome.

The analysis of a *PEX10* transposon line revealed an ER-correlated role of the gene during formation of lipid bodies and protein vesicles. Knockout of the gene resulted in an abnormal membrane organization in embryogenesis and no formation of peroxisomes as shown by ultrastructural analyses. Complementation with the complete gene restored the wild type phenotype, while this was not the case with *pex10* containing a disrupted zincfinger motive.

In order to investigate additional roles of *AthPex10p* in peroxisomal function *dZnpex10* containing a disrupted zincfinger motive was overexpressed in wild type plants. Analysis of growth and photosynthesis in normal atmosphere as well as in atmosphere with a five fold higher CO<sub>2</sub> concentration revealed a striking correlation between peroxisomal functionality and photorespiratory effects.

Localization studies of *AthPex10p* in *H. polymorpha* supported the hypothesis of a multiple pleiotropic function of *PEX10* in plants. This is supported by complementation analyses of *Pex10* deficient yeast strains with different hybrid constructs.

Indications of ER-dependent functions of *AthPEX10* during early peroxisome biogenesis in *Arabidopsis* cell cultures were obtained in collaboration with the Department of Biology, Arizona State University by *in situ* localization analysis with an antibody recognizing *AthPEX10*-6His.

The observations from the different approaches were rationalized into a model of the function of *AthPex10* in early organelle biogenesis and into a model on import of matrixproteins into peroxisomes of plants.

## A. EINLEITUNG

### 1 Die Peroxisomenforschung im Rückblick

Peroxisomen sind subzelluläre Organellen von eher einfacher morphologischer Struktur, die jedoch nicht im Entferntesten die Komplexität ihrer enzymatischen Reaktionen widerspiegelt. Als zelluläre Einschlüsse wurden sie als letzte der bedeutenden Zellorganellen bereits vor fast 50 Jahren entdeckt. Anfänglich hielt man sie für ein Relikt primitiver Vorfahren in eukaryotischen Zellen, die dort Oxidationsreaktionen durchführten und denen in modernen Organismen keine bestimmte Funktion mehr zufällt (Übersichtartikel Erdmann *et al.*, 1997). Erstmals charakterisiert wurden die Microbodies in Säugergeweben anfang der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts von dem belgischen Biochemiker Christian de Duve. Die Hauptfunktion wurde darin erkannt, das bei der Respiration entstehende zelltoxische  $H_2O_2$  innerhalb der Peroxisomen durch die Tätigkeit der Katalase zu entfernen (de Duve & Baudhuin, 1966). Im Jahr 1974 erhielt de Duve den Nobelpreis unter anderem für die Entdeckung der Peroxisomen.

Anfängliche Untersuchungen von Peroxisomen in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Pflanzenarten beschrieben die große Ähnlichkeit dieser Organellen mit Peroxisomen aus tierischen Geweben (Mollenhauer *et al.*, 1966; Frederick *et al.*, 1968). Über die Biogenese von Peroxisomen, insbesondere das Zusammenspiel beteiligter Proteine, die Differenzierung der Organellen, ihr Wachstum und die Vermehrung, war über zwei Jahrzehnte lang in allen Organismen nur sehr wenig bekannt.

1973 wurden Peroxisomen erstmals medizinisch beschrieben, als man erkannte, dass Patienten mit schweren genetischen Erkrankungen, die mit Missbildungen des Nervensystems, der Leber und Niere einhergehen, keine Peroxisomen ausgebildet hatten. Da jedoch die Katalase biochemisch nachweisbar war, wurden die ersten Fallberichte nur sehr skeptisch behandelt (Fahimi & Baumgart, 1999). Erst die medizinischen Erkenntnisse der späten 1980er und frühen 1990er Jahre, dass dysfunktionale Peroxisomen für eine Gruppe schwerer Krankheiten des Menschen verantwortlich sind, katapultierte die Peroxisomenforschung zur vordersten Front des Interesses innerhalb der Zellbiologie. Fast parallel trug die Identifizierung des ersten von zwei (universellen) Targeting Signalen (PTS1), das neu synthetisierte Proteine vom Cytosol in die Peroxisomenmatrix leitet (Gould *et al.*, 1987), sowie die Entwicklung genetischer Screens in Hefen mit peroxisomalen Defekten zu neuen Einsichten und Ansätzen in der Peroxisomenforschung bei (Übersichtartikel Mullen, 2002). Das meiste Wissen bezüglich der Biogenese von Peroxisomen stammt von der Isolierung peroxisomendefizienter Mutanten in verschiedenen Hefen wie *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica* sowie Eier-

stockzellen (CHO) von Chinesischen Hamstern (Übersichtartikel Distel *et al.*, 1996). Seit dieser Zeit ist zunehmend klar geworden, dass Peroxisomen eine Vielzahl wichtiger und sehr unterschiedlicher Funktionen in praktisch allen eukaryotischen Zellen besitzen.

## 2 Vorkommen und Funktionen von Peroxisomen

Peroxisomen sind nuklear codierte Mehrzweckorganellen von gewöhnlich 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  Größe, umgeben von einer Einheitsmembran, die eine elektronendichte, oftmals granulär erscheinende Matrix umschließt (Übersichtsartikel Crookes & Olsen, 1999; Johnson & Olsen, 2001). Neuere Untersuchungen beschreiben auch sphärische und längliche Peroxisomen von 1,7 bzw. bis zu 4,1  $\mu\text{m}$  Länge, die in praktisch allen *Arabidopsis* Zelltypen vorkommen (Übersichtartikel Muench & Mullen, 2003); aber auch nur 0,1 bis 0,2  $\mu\text{m}$  kleine nicht näher beschriebene Peroxisomen in Fibroblasten oder Hefezellen, die auf Glukose angezogen wurden, sind bekannt (Übersichtartikel Purdue & Lazarow, 2001). Allen gemein ist die Existenz von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzierenden Oxidasen und die Peroxide inaktivierende Katalase (Frederick & Newcomb, 1969a). Abhängig vom Gewebetyp, den Stoffwechselanforderungen des Organismus und seines Entwicklungsstandes variieren die physiologischen Funktionen der Peroxisomen ganz erheblich. Synthese und Import neuer Enzyme ermöglichen verschiedenen Typen von Peroxisomen auch die Umwandlung in andere Peroxisomenklassen. Zu Beginn dieser Dissertation waren über 80 verschiedene peroxisomale Enzyme bekannt (Baker *et al.*, 2000). Die ständige Entdeckung neuer Enzyme weist jedoch darauf hin, dass die Bedeutung dieser Organellen durch die Ergebnisse intensiver Forschung weiter zunehmen wird.

### 2.1 Die Unterscheidungen und Umwandlungen von Peroxisomen in Pflanzen

Peroxisomen wurden in einer Vielzahl von Pflanzen wie Algen, Farne, Gymnospermen und Angiospermen untersucht (Übersichtartikel Olsen, 1998). In Höheren Pflanzen unterscheidet man mindestens vier verschiedene Klassen von Peroxisomen, die nach der spezifischen Funktion ihrer Organellen definiert werden (Übersichtartikel Reumann, 2000). Im Entwicklungsverlauf eines keimenden Samens und der Seneszenz von grünen Blättern können sich Peroxisomen jedoch auch vollständig ineinander umwandeln, um enzymatisch den veränderten physiologischen Anforderungen zu entsprechen.

### 2.1.1 Die Klasse der Glyoxysomen

Glyoxysomen waren die ersten Peroxisomen, die aus Pflanzen isoliert wurden. Breidenbach *et al.* (1968) beschrieben die Morphologie von Glyoxysomen aus *Ricinus communis*, die aus einem Sucrose-Gradienten isoliert wurden, und Cooper & Beevers (1969a) untersuchten die Enzymausstattung zum Abbau der Fettsäuren sowie die Involvierung der Mitochondrien. Ihren Namen verdanken die Glyoxysomen, weil sie exklusiv mit Ausnahme der cytosolischen Aconitase (De Bellis *et al.*, 1994; Courtois-Verniquet & Douce, 1993) alle Enzyme des Glyoxylatstoffwechsels besitzen, durch den aus zwei Molekülen Acetyl-CoA Succinat aufgebaut wird (Übersichtartikel Olsen & Harada, 1995; Gietl, 1996). Dieses wird von Mitochondrien und Gluconeogenese-Enzymen des Cytosols schliesslich zu Kohlenhydraten metabolisiert. Ausserdem enthalten Glyoxysomen auch die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zu Acetyl-CoA (Cooper & Beevers, 1969b; Hutton & Stumpf, 1969; Cooper, 1971; Beevers, 1979; van den Bosch *et al.*, 1992). Ihre Aufgabe liegt somit in der Speicherfett-Mobilisierung bei der Keimung von Samen. Sie sind damit weitgehend für die Fähigkeit von Pflanzen verantwortlich, Lipide als Kohlenstoffquelle für die sich entwickelnden heterotrophen Keimlinge nutzen zu können und sind bereits in reifenden Samen in großer Anzahl vorhanden. Dort überdauern sie die Samenruhe und Wässerung unverändert, um dann bei der Keimung ein Vielfaches an Volumen (siebenfach) und Enzymaktivität (zwei- bis sechsfach) zuzulegen, ohne dass die Anzahl an Glyoxysomen selbst mit maximal 1,5-fach wesentlich erhöht wird, wie Kuncze *et al.* (1984) in Studien mit Baumwollsamensamen beschrieben.

### 2.1.2 Die Klasse der Blatt-Peroxisomen

Die Hauptaufgabe der Blatt-Peroxisomen liegt in der Photorespiration von C<sub>3</sub>-Pflanzen in photosynthetisch aktiven Geweben und findet in engem Zusammenspiel mit Mitochondrien und Chloroplasten statt (Frederick & Newcomb, 1969b; Ogren, 1984). Sie wird durch die Oxygenase-Aktivität des bifunktionalen Enzyms Ribulose-bisphosphat Carboxylase/Oxxygenase (RUBISCO) hervorgerufen, um das die beiden Substrate CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> konkurrieren. Aufgrund der gegenüber C<sub>3</sub>-Pflanzen verschiedenen Anatomie und Biochemie spielt die Photorespiration bei C<sub>4</sub>-Pflanzen nur eine sehr untergeordnete Rolle (Canvin, 1979). Als Schlüsselenzyme des Glykolatstoffwechsels sind die Glykolat-Oxidase, Hydroxypyruvat-Reduktase und die Serin/Glyoxylat-Aminotransferase zu nennen, die diese Peroxisomenklasse kennzeichnen. Aber auch die Enzyme zur  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und die Katalase sind vorhanden.

### 2.1.3 Die Klasse der Wurzel-Peroxisomen

In den Knöllchen-tragenden Wurzeln  $N_2$ -fixierender Pflanzen spielen besonders spezialisierte Peroxisomen eine wichtige Rolle im Metabolismus von Stickstoffverbindungen. Dabei wird der von Bakterien fixierte elementare Stickstoff in einem Zusammenspiel verschiedener Zellorganellen und unter Verbrauch von Zucker in organischen Stickstoff umgewandelt, der zum vegetativen Wachstum und Reproduktion der Pflanze eingesetzt werden kann (Übersichtartikel Schubert, 1986). Einer der letzten Schritte in diesem Stoffwechsel, die Umwandlung von Urat zu Allantoin, wird von der Urat-Oxidase katalysiert und findet in den gegenüber infizierten Zellen stark vergrößerten Peroxisomen uninfizierter Zellen statt (Webb & Newcomb, 1987).

### 2.1.4 Die Klasse der „unspezialisierten“ Peroxisomen

Zusätzlich zu den bisher aufgeführten drei Peroxisomenklassen gibt es mindestens eine weitere Klasse von Peroxisomen, deren spezifische Funktion bislang unbekannt geblieben ist. Die Klasse der „unspezialisierten“ Peroxisomen kommt in Geweben vor, die weder eine photorespiratorische Funktion besitzen, noch durch Speicherlipide oder Wachse gekennzeichnet sind. Sie enthalten jedoch Katalase und gewöhnlich auch die  $H_2O_2$  produzierenden Oxidasen (Übersichtartikel Olsen & Harada, 1995). Das spezifische Gewicht dieser „unspezialisierten“ Peroxisomen liegt unterhalb von Glyoxysomen und Blatt-Peroxisomen (Huang & Beevers, 1971), ebenso ihre Größe und Abundanz.

### 2.1.5 Peroxisomen in Algen

Peroxisomen in Algen könnten eine völlig andere Funktion besitzen als jene in Höheren Pflanzen, denn die Verteilung ihrer peroxisomalen Enzyme ist sehr ungewöhnlich. So besitzen die Peroxisomen der Algengattung *Vaucheria* neben Katalase sowohl photorespiratorische Enzyme (Glykolat-Oxidase und Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase) als auch glyoxysomale Markerenzyme (Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase). Die Enzyme zur  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, die Citrat-Synthase sowie Malat-Dehydrogenase finden sich bei *Vaucheria* hingegen ausschliesslich in den Mitochondrien (Backeshoff & Stabenau, 1989). Weitere Untersuchungen in anderen Algengattungen ergaben, dass die Enzyme zum Stoffwechsel der  $\beta$ -Oxidation uneinheitlich entweder nur in Peroxisomen, in Peroxisomen und Mitochondrien oder ausschliesslich in Mitochondrien vorkommen (Winkler *et al.*, 1988; Stabenau *et al.*, 1989).

### 2.1.6 Die Übergänge von pflanzlichen Peroxisomen in andere Klassen

Mit dem Übergang des Keimlings zum autotrophen Wachstum wandeln sich die Glyoxysomen in den ergrünenden Keimblättern zu Blatt-Peroxisomen um. Der umgekehrte Prozess findet bei der Seneszenz von Kotyledonen und Sekundärblättern statt, bei dem sich die Blatt-Peroxisomen wieder in enzymatisch aktive Glyoxysomen umwandeln (Pistelli *et al.*, 1995; De Bellis *et al.*, 1990; Pistelli *et al.*, 1990; Landolt & Matile, 1990; Gut & Matile, 1988). Auf diese Weise könnte wertvolles Material zurückgewonnen werden, das in den Membranen von Geweben eingebunden ist und ohne den Recyclingprozess verloren wäre. Ob die bei der Seneszenz gebildeten Glyoxysomen vielleicht eine ganz eigene Klasse von Peroxisomen bilden, ist bislang nicht geklärt. Von manchen Autoren werden diese Organellen auch als neue Klasse postuliert, bzw. als Gerontosomen bezeichnet (De Bellis *et al.*, 1990; Vicentini & Matile, 1993). Sie sind zwar im Grunde den Glyoxysomen sehr ähnlich, weil sie die Enzyme zur  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und die des Glyoxylatzyklus enthalten. Allerdings ist nicht abschliessend geklärt, ob dieser Typus von Peroxisom noch andere spezifische Funktionen hat, die ihn vom Glyoxysomentypus unterscheidet, wie z.B. eine Aufgabe bei der Rückgewinnung von Aminosäuren.

Wie die Umwandlungen vonstatten gehen, wird kontrovers diskutiert (Übersichtartikel Olsen, 1998). Während das „One-Population-Model“ davon ausgeht, dass bei der Umwandlung der Peroxisomenklassen ein kurz andauernder intermediärer Zustand herrscht, bei dem z.B. sowohl photorespiratorische Enzyme als auch Enzyme des Glyoxylatstoffwechsels nebeneinander auftreten, geht das „Two-Population-Model“ von einer vollständigen Degenerierung der einen Peroxisomenklasse und einer *de novo* Synthese der andern aus. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass durch Lichtinduktion in den Glyoxysomen junger Keimlinge die Enzymaktivitäten der Photorespiration stark zunehmen, während die des Glyoxylatzyklus sinken - beide Hauptfunktionen der Peroxisomen also koexistieren (Titus & Becker, 1985; Sautter, 1986; Nishimura *et al.*, 1986). Sehr überzeugende Argumente stützen somit das „One-Population-Model“, das erstmals Trelease *et al.* (1971) als Schlussfolgerung ihrer Untersuchungen an Keimblättern von Gurken postuliert hatten.

## 2.2 Peroxisomen in nicht pflanzlichen Organismen

Das meiste Wissen über Peroxisomen stammt aus Hefeorganismen. Die Methoden der Gentechnik erlaubten die Generierung und Identifizierung verschiedenster Mutanten mit peroxisomalen Defekten. Viele der Befunde an Hefen trugen zum besseren Verständnis der Peroxisomen-Biogenese im Menschen bei. Da bei peroxisomalen Defekten im Menschen jedoch schwerste klinische Symptome in Bezug auf das Gehirn mit seinem Zentralen Ner-

vensystem auftreten, müssen für die Aufklärung der Ursachen Modellorganismen verwendet werden, welche die Anforderungen bezüglich der Komplexität des Organismus besser erfüllen. Hierfür werden in neuerer Zeit, neben menschlichen Zelllinien, vor allem Zelllinien aus Hamsterovarien sehr erfolgreich erforscht (Tsukamoto *et al.*, 1990; Shimosawa *et al.*, 1992). Auch der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bringt mit seinem vollständig entschlüsselten Genom, seinem Nervensystem und den 959 somatischen Zellen seines transparenten Körpers Vorteile mit sich, die ihn als Modellorganismus für die Peroxisomenforschung prädestinieren. Von 13 Peroxinen des Menschen codiert das *Caenorhabditis*-Genom 11 Homologe. Störungen in der Entwicklung von Peroxisomen und der zellulären Lokalisierung von Peroxinen laufen in beiden Organismen nach einem gemeinsamen Muster ab und können zukünftigen Strategien zur Intervention in der Pathogenese von PBD-Patienten dienen (Thieringer *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Peroxisomen in Hefen

Hefen sind ein idealer Modellorganismus für die Untersuchung der Peroxisomenbiogenese. In zuckerhaltigem Medium sind sie in der Lage, gänzlich ohne Peroxisomen zu überleben. Die Entdeckung dieser Eigenschaft anfang der 1990er Jahre eröffnete den Weg, mithilfe der Hefe-Genetik die Biogenese von Peroxisomen zu studieren (Lazarow, 1993; van der Klei & Veenhuis, 1997). Wildtypstämme bilden auf Glucose nur sehr kleine und wenige Peroxisomen aus. Enthält man ihnen den Zucker bzw.  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  als Nährstoffquelle vor und ersetzt diesen durch bestimmte Nährstoffe wie Methanol, Fettsäuren, Alkane, bzw. Alkylamine, D-Aminosäuren oder Purine, so ist eine starke Induktion von Peroxisomen zu beobachten. Diese Organellen enthalten alle Schlüsselenzyme, die für den Primärmetabolismus dieser Verbindungen notwendig sind und umfassen die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation, mehrere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produzierende Oxidasen, Katalase sowie Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase (van den Bosch *et al.*, 1992). Bemerkenswerterweise findet auch der umgekehrte Weg einer Peroxisomendegeneration statt, sobald Hefen von peroxisomeninduzierenden Medien, wie Ölsäure oder Methanol bzw. Alkylamine, in Glucose/Ammoniumsulfat überführt werden: Peroxisomen werden makropexophagisch in die Vakuole aufgenommen (Gunkel *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 1998; Titorenko *et al.*, 1995; Thumm *et al.*, 1994; Baba *et al.*, 1994). Dieser für Peroxisomen eigentümliche Prozess der Pexophagie ist zwar eine degenerative Abhandlung, allerdings wird sie nicht durch Hungerbedingungen der Zelle induziert, sondern um überflüssig gewordene Peroxisomen nach einem Wechsel von Ölsäure auf glucosehaltigem Medium abzubauen (Reggiori & Klionsky, 2002).

### 2.2.2 Peroxisomen in tierischen Evertebraten

Insgesamt gibt es nur wenige Untersuchungen zu Peroxisomen in Wirbellosen (Parveen *et al.*, 2001). Interessanterweise steigt in Verdauungsdrüsen von Meeresmuscheln die Anzahl der Peroxisomen mit zunehmender Konzentration der Umweltgifte stark an und es laufen Untersuchungen, welche Bedeutung die Peroxisomenproliferation als Bioindikator für die Meeresverschmutzung haben könnte (Corpas *et al.*, 2001; Cajaraville *et al.*, 2000; Cancio *et al.*, 1998). In *Caenorhabditis elegans* finden sich Peroxisomen hauptsächlich in den Epithelzellen des Verdauungstraktes und der Pharynxdrüse (Yokota *et al.*, 2002). Taub *et al.* (1999) berichten auch vom Vorkommen cytosolischer Katalase, welche die Nematoden während ausgedehnter Überdauerungsstadien vor oxidativen Schäden schützt oder einen Mechanismus darstellt, mit den veränderten Stoffwechselbedingungen zurechtzukommen, die ein Hungerstadium begleiten.

### 2.2.3 Peroxisomen in Säugern und Menschen

In Säugern, einschliesslich des Menschen, sind die Peroxisomen an einer Vielzahl metabolischer Prozesse beteiligt. Diese umfassen, neben den Enzymen des  $H_2O_2$ -Stoffwechsels, die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, die Biosynthese komplexer Fette (Plasmalogene), die Regulierung der Anzahl an Fettzellen, den Cholesterinstoffwechsel, die Beteiligung an der Biosynthese von Gallensäuren, den Geschlechtssteroid-Metabolismus und den Katabolismus von Purinen, D-Aminosäuren, 1- $\alpha$ -Hydroxysäuren sowie Uraten (van den Bosch *et al.*, 1992; Warren *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2001). Infolge der Einwirkung von Xenobiotika, wie z.B. Weichmacher aus der Kunststoffindustrie, Erdölprodukten oder lipidsenkender Pharmaka lassen sich die Leberperoxisomen in Nagerzellen stark vermehren. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Peroxisomen beim Abbau bestimmter Umweltgifte eine Rolle spielen (Fahimi & Baumgart, 1999; Smith *et al.*, 2001).

## 2.3 Zusätzliche Funktionen und Eigenschaften von Peroxisomen in verschiedenen Organismen

Neben den bekannten Funktionen von Peroxisomen, wie Erzeugung und Abbau von  $H_2O_2$ ,  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Glyoxylatzyklus und Photorespiration, wurde in neuerer Zeit eine Gruppe von Enzymen entdeckt, die hauptsächlich am Stoffwechsel von „reactive-oxygen-species“ (ROS) und Stickoxid ( $NO\bullet$ ) beteiligt sind (Corpas *et al.*, 2001). Die Peroxisomen sind in der Lage verschiedene Signalmoleküle wie  $H_2O_2$ ,  $O_2\bullet^-$  und  $NO\bullet$  in das Cytosol zu entlassen, wo sie in vielfältiger Weise als Schlüsselmetabolite beim Wachstum

und Entwicklung von Pflanzen sowie der hypersensitiven Antwort auf Pathogenbefall fungieren. Als Teil der Signaltransduktion beim programmierten Zelltod besitzen sie eine große Bedeutung in der Verteidigungsantwort gegenüber anderen Organismen. Auch bei der Seneszenz (Pastori & del Rio, 1997), abiotischen Stressfaktoren (del Rio *et al.*, 1998) oder Verwundungen steigt die Konzentration des Stressmoleküls  $H_2O_2$  stark an und infolge dessen die Proliferation von Peroxisomen. Die Beobachtung einer Peroxisomenproliferation durch Transkription peroxisomaler Biogenese-Gene konnte auch an chinesischen Hamster-Ovariolenzellen nach Behandlung mit  $H_2O_2$  gemacht werden (Lopez-Huertas *et al.*, 2000). Eine Bedeutung der ROS bei humanen Erkrankungen wie z.B. degenerativen Organveränderungen und entzündlichen Prozessen ist ebenfalls bekannt, deren genaue Funktion allerdings umstritten (Song, 2003). Welchen Zusammenhang es zwischen verminderter Peroxisomenaktivität bei Alterungsprozessen und der Entstehung von Krebs aufgrund oxidativen Stress gibt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen (Übersichtsartikel Perichon *et al.*, 1998; Masters & Crane, 1998; Dansen & Wirtz, 2001). Legakis *et al.* (2002) untersuchten die alterungsbedingten Veränderungen von Peroxisomen in Fibroblastenzellen des Menschen und stellten eine Erhöhung des Stoffwechselgiftes  $H_2O_2$  infolge einer abnehmenden Importeffizienz für Matrixproteine mit einem peroxisomalen Targeting-Signal 1 (PTS1) fest. Der PTS1-Rezeptor Pex5p reicherte sich stattdessen an der peroxisomalen Membran an und importierte das Antioxidant-Enzym Katalase mit zunehmendem Alter der Zelle nur noch in verringertem Maße. Dadurch bedingt, verstärkt zunehmend anfallendes  $H_2O_2$  schliesslich den Prozess der verringerten Importeffizienz von Matrixenzymen.

Eilers *et al.* (2001) charakterisierten eine Sulfit-Oxidase in *Arabidopsis*, die in den Peroxisomen lokalisiert ist und dort offenbar eine Sulfit entgiftende Funktion besitzt oder alternativ an der Oxidation von Nitrit in verschiedenen Pflanzenarten beteiligt ist (Nakamura *et al.*, 2002).

Zolman *et al.* (2001) entdeckten einen peroxisomalen ABC-Transporter (PXA1), der CoA-Ester von Fettsäuren und einen Vorläufer von Auxin, Indol-3-Buttersäure (IBA), zur  $\beta$ -Oxidation in die Peroxisomen transportiert. Mutanten von *pxa1*, die gegen IBA resistent sind, zeigen ein verlangsamtes Wachstum mit kleineren Blattrosetten, weniger Blättern und Seitenwurzeln sowie kürzere Blütenstengel und kennzeichnen eine Funktion von Peroxisomen in der Auxin-Biosynthese (Minorsky, 2002).

Zwei Hauptenzyme des Penicillin-Biosynthese-Stoffwechselfades sind ebenfalls in Peroxisomen lokalisiert. Der letzte Schritt bei der Penicillin-Synthese findet innerhalb dieser Organellen statt und aus Untersuchungen ist die Korrelation zwischen der Menge an produziertem Antibiotikum und der Peroxisomen-Anzahl bekannt (Muller *et al.*, 1991).

In Trypanosomen und verwandten Organismen treten besondere Peroxisomen auf, die sich durch das Fehlen von Oxidasen und folglich der Absenz von Katalase auszeichnen. Diese spezielle Klasse der Glycosomen beinhaltet sieben Enzyme der Glycolyse sowie die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation und der Ätherlipid-Biosynthese (van den Bosch *et al.*, 1992).

In Ascomyceten wurden sogenannte *woronin bodies* beschrieben, die von Peroxisomen abstammen (Keller *et al.*, 1991) und eine neue Kategorie von Peroxisomen darstellen könnten. Septal-Poren verbinden bei diesen Organismen benachbarte Zellen zum Zweck des Transportaustausches von Cytoplasma einschliesslich Zellorganellen, was eine extrem schnelle Ausbreitung der Pilze ermöglicht. Bei eintretender Lyse von Hyphen müssen die Septalporen jedoch verschlossen werden, um den Tod eines Organismus zu verhindern. Diese Funktion erfüllen die Vesikel (*woronin bodies*), indem sie die Poren rasch verstopfen und die damit einen Prozess einleiten, der letztendlich zum Verschließen der Plasmamembran sowie der Wiederaufnahme des polaren Wachstums führt (Jedd & Chua, 2000).

In einem Übersichtartikel von Muench & Mullen (2003) wird die erstaunliche Dynamik pflanzlicher Peroxisomen beschrieben, die je nach Zelltypus langsame und schnelle, unidirektionale und bidirektionale Bewegungen beinhalten. Auch *stop and go* Bewegungen und einander gegensätzliche Bewegungen zweier unabhängiger Peroxisomen konnten beobachtet werden. Die Geschwindigkeit der Bewegungen ist dabei mit  $\sim 6,5 \mu\text{m/s}$  dreimal so hoch wie die maximale Geschwindigkeit in Säugerzellen, was einen unterschiedlichen molekularen Mechanismus der Bewegungen wahrscheinlich macht. Einer der möglichen Gründe für die Bewegung von Peroxisomen könnte darin liegen, die Organellen in eine räumliche Nähe zu neu entstehenden, für Peroxisomen bestimmte Proteine zu bringen, die an cytosolisch verteilten Polyribosomen synthetisiert werden. Somit wäre durch das Cytoskelett eine Erhöhung der Effizienz solcher Prozesse zu erzielen. Hoepfner *et al.* (2001) konnten eine bedeutende Rolle des Actin-Cytoskeletts bei der Verteilung der Peroxisomen in die Tochterzellen nachweisen. Dieser Transportmechanismus ist wichtig, um bei einer relativ geringen Anzahl von Organellen die Weitergabe der Peroxisomen sicherzustellen (Thoms & Erdmann, 2003).

### **3 Das phänotypische Erscheinungsbild von Organismen mit dysfunktionalen Peroxisomen**

Das meiste Wissen bezüglich der Bildung von Peroxisomen ist der Analyse von *peroxisome biogenesis defective mutants*, so genannten *pex*-Mutanten in Hefen zu verdanken. Diese sind trotz Peroxisomendefizienz zwar auf zuckerhaltigem Medium lebensfähig, erlauben aber ein Screening nach Import- oder Biogenese-Mutanten auf nicht zuckerhaltigem Medi-

um wie Ölsäuren (gilt für die meisten Hefen) oder Methanol für die methylotrophe Hefen (Übersichtartikel Subramani, 1998).

Desweiteren wurde mit Erfolg nach *peroxisome biogenesis (peb)*-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae* gescreent, indem man die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abbauende Katalase durch 3-Aminotriazol gehemmt oder durch Mutation ausgeschaltet hat, um dann nach Mutanten zu suchen, die trotzdem lebensfähig waren. Dabei musste es sich um Hefestämme handeln, die dysfunktionale Peroxisomen aufwiesen und somit kein zelltoxisches H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> infolge peroxisomaler  $\beta$ -Oxidation produzieren konnten (Zhang *et al.*, 1993; Van Der Leij *et al.*, 1992).

In einer dritten Strategie wurden Wildtypzellen mit einem chimärischen Resistenzgen gegen das Antibiotikum Bleomycin, gekoppelt mit der peroxisomalen Luciferase, in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert. Bei intakten Peroxisomen wird das Resistenzgen aufgrund des PTS1-Signals der Luciferase in die Peroxisomen importiert. Selektioniert man nun auf Bleomycin, so können nur peroxisomendefiziente Stämme mit cytosolisch verbliebenem Resistenzgen weiterwachsen, während all jene Zellen absterben, die das Fusionsprotein in intakte Peroxisomen translozieren konnten. Auf diese Weise liessen sich weitere *pas*-Mutanten (*peroxisome assembly mutants*) isolieren (Elgersma *et al.*, 1993).

Johnson *et al.* (1999) entwickelten zwei weitere Methoden zur Selektion positiver *pex*-Mutanten in *P. pastoris*. Eine nützt die Fähigkeit der Alkoholoxidase (AOX) in intakten Peroxisomen ungiftigen Allyl-Alkohol zu toxischem Acrolein zu oxidieren. Dies bewirkt, dass nur peroxisomendefiziente Mutanten überleben, während intakte Hefestämme absterben. Die zweite Methode beruht auf der Verwendung eines Hefestammes mit einem Defekt in der Formaldehyd-Dehydrogenase (*fdl*). Dieses Enzym ist zur Metabolisierung von Formaldehyd, dem Produkt der AOX notwendig. AOX-induzierte Zellen von *fdl*-Stämmen sind deshalb auf Methanol als Wachstumsmedium nicht lebensfähig, weil sie Formaldehyd anreichern. *fdl/pex*-Mutanten mit nur geringer Aktivität an AOX sind hingegen relativ insensitive für Methanol, weil sie diesen nicht effizient genug zu Formaldehyd umwandeln und können auf einem Methanol/Sorbitol-Medium, in dem Sorbitol den Doppelmutanten als C-Quelle dient, gescreent werden (Johnson *et al.*, 1999).

Im Menschen manifestiert sich die essentielle Bedeutung funktionaler Peroxisomen durch eine ganze Reihe von Krankheitsbildern. Bis heute sind 24 Erbkrankheiten aufgrund peroxisomaler Defekte bekannt (Smith *et al.*, 2001). Dabei wird zwischen Erkrankungen unterschieden, die auf einem Defekt in der Biogenese der Peroxisomen oder des Import-Apparates beruhen oder aber der Mutation einzelner Enzyme im peroxisomalen Stoffwechsel. Zu den peroxisomalen Krankheiten, die durch morphologisch normale Peroxisomen charakterisiert sind, aber durch Defekte eines einzelnen Enzyms hervorgerufen werden,

gehören 12 identifizierte Krankheiten wie z.B. die am häufigsten vorkommende X-ALD (X-linked Adrenoleukodystrophie), bei der sich sehr lange Fettsäuren (Very Long Chain Fatty Acids) durch Störung der VLCFA-CoA-Synthetase anreichern, die Primäre Hyperoxaluria TypI (PH1) mit einem Defekt in der Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase, Acatalasemia mit einer Katalase-Defizienz sowie die Refsum-Krankheit, die durch einen Defekt in der  $\alpha$ -Oxidation der Phytansäure hervorgerufen wird (Übersichtartikel Fujiki, 1997).

Weitere 12 Krankheiten beruhen auf Defekten in Proteinen, die für die Formation von Peroxisomen notwendig sind (Übersichtartikel Moser, 1999) und für die Erforschung des peroxisomalen Importapparates deshalb von besonderem Interesse sind. Die klinischen Befunde des Zellweger Syndroms wurden erstmals 1964 beschrieben bevor ein Zusammenhang zu Peroxisomen überhaupt erkannt wurde, weshalb zwischen der klinischen Ausprägung eines Krankheitsbildes und der biochemischen Ursache, also ob nur ein einzelnes peroxisomales Matrixenzym oder ein essentielles Protein für die Peroxisomen-Biogenese betroffen ist, kein oder nur ein geringer Zusammenhang besteht. Goldfischer *et al.* stellten 1973 erstmals eine mögliche Korrelation zwischen den klinischen Symptomen von Zellweger Syndrom und Abnormalitäten von Peroxisomen in verschiedenen Geweben weniger Wochen alter Säuglinge her. Doch erst 1988 wurde von Santos *et al.* der Zusammenhang zwischen Zellweger Syndrom und einem Defekt im Import-Apparat von Matrixproteinen erkannt. Eine Beeinträchtigung der Biogenese und Funktion von Peroxisomen führt beim Menschen zu einer Reihe von schwerwiegenden Erkrankungen, der sogenannten PBDs (*Peroxisome Biogenesis Disorders*). Diese Krankheiten werden durch einen Defekt in einem von mindestens 14 Genen verursacht, deren Produkte zur Ausbildung funktionaler Peroxisomen notwendig sind und treten in einer Häufigkeit der Geburten von 1: 25.000 bis 1: 50.000 auf. Man unterscheidet das Zellweger Spektrum einerseits von der Rhizomelischen Chondrodysplasia Punctata (RCDP) andererseits. Zum Zellweger-Spektrum gehören die schwerwiegendste Krankheit des Zellweger Syndroms (ZS), die Neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und die *Infantile Refsum Disease* (IRD). Davon betroffene Säuglinge sterben beim ZS bereits während der ersten neun Lebensmonate an den Folgen ausgeprägter Schwäche, Hypotonie, Leberzirrhose, kardiovaskulärer Fehlbildungen und Schädeldeformationen, bei NALD tritt der Tod mit etwa zwei Jahren ein. Bei dem am mildesten ausgeprägten Krankheitsbild von IRD-Patienten wird ein durchschnittliches Lebensalter von sechs Jahren erreicht (Moser, 1999), in sehr seltenen Fällen erleben Betroffene aber auch ihr zweites bis sogar fünftes Lebensjahrzehnt (Moser *et al.*, 1995). Menschen, die an einem genetischen Defekt des Imports von Proteinen mit einem peroxisomalen Targeting-Signal 2 (PTS2) leiden, werden unter das Krankheitsbild RCDP subsumiert und sterben durchschnittlich nach ihrem ersten Lebensjahr, da alle metabolischen Prozesse, die PTS2 assoziiert sind, ausfallen (Chang *et al.*, 1999b). Besonders auffälliges Merkmal von peroxisoma-

len Erkrankungen sind die neuropathologischen Veränderungen. Ein Defekt in der Migration von Nervenzellen während der Entwicklung führt zu einer für peroxisomale Erkrankungen charakteristischen Zytoarchitektur des Gehirns. Je nach dem, welches der an der Biogenese beteiligten Gene in Zelllinien verschiedener Patienten betroffen ist, teilt man die PBDs aufgrund von Komplementationsstudien in verschiedene Komplementationsgruppen (CG) ein. Diese unterscheiden sich allerdings in ihrer Nomenklatur und sind für Amerika, Japan und Europa jeweils unterschiedlich (Moser, 1999). Während Komplementationsgruppen in Europa und Amerika mit unterschiedlichen Ziffern bezeichnet werden, verwenden Mediziner in Japan verschiedene Buchstaben zu ihrer Einteilung. Bis heute ist die Pathogenese der generalisierten peroxisomalen Erkrankungen weitgehend ungeklärt, und eine Therapie für das Zellweger Syndrom gibt es bislang nicht.

In Pflanzen gibt es nur wenige Untersuchungen zur phänotypischen Merkmalsausbildung dysfunktionaler Peroxisomen. Allerdings kann ein Ausfall in der Organellenfunktion unabhängig davon, ob nur einzelne Matrixenzyme oder essentielle Biogenese-Gene von Peroxisomen betroffen sind, zu photorespiratorischen Effekten führen. Desweiteren sind Störungen bei der Bildung von Reservestoffen in Samen sowie ihre Nutzbarkeit beim Keimungsprozess beschrieben worden. Eine ausführliche Behandlung dieser pflanzlichen Phänotypen erfolgt jedoch an späterer Stelle.

#### **4 Bislang identifizierte Gene, die an der Peroxisomen-Biogenese beteiligt sind**

Definitionsgemäss ist ein Protein, das an der Biogenese von Peroxisomen beteiligt ist, ein Peroxin und das dafür codierende Gen als *PEX*-Gen charakterisiert. Die Funktion eines Peroxin-Homologs kann dabei äusserst vielfältig sein und die Lokalisation muss weder auf ein funktional reifes noch ein biogenetisch frühes Peroxisom beschränkt bleiben. Die Klassifizierung eines Peroxins beinhaltet verschiedenste Aufgaben wie z.B. den Matrix-Proteinimport, die Formierung der Membran, das Peroxisomenwachstum oder seine Differenzierung, die Teilung von Peroxisomen und ihre Vererbung (Distel *et al.*, 1996). Diese Funktionen könnten somit auch von cytosolischen Peroxinen oder Peroxinen, die mit anderen subzellulären Kompartimenten als denen des Peroxisoms assoziiert sind bewerkstelligt werden (Mullen *et al.*, 2001). Bislang sind 25 verschiedene Peroxine in Eukaryonten klassifiziert worden, sowie ein peroxisomenspezifisches Chaperon *Djp1*. Von den 25 Peroxinen existieren 15 in *Arabidopsis thaliana*, die in Tab. A1 in Fettschrift hervorgehoben sind. Davon kloniert wurden *PEX1*, *PEX2*, *PEX5*, *PEX7*, *PEX10*, *PEX14*, und *PEX16*. Weitere acht Peroxine in *A. thaliana* sind aus der Homologie von EST-Sequenzen zu Peroxinen in Hefen und Säugern zu postulieren (Mullen *et al.*, 2001).

<b>Name</b>	<b>Peroxin-Eigenschaften</b>	<b>kloniert in: / homolog zu etablierten Peroxin:</b>
<i>PEX1</i>	PMP; AAA ATPase	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>P. angusta</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX2</i>	PMP; RING-Finger-Motiv	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>P. anserina</i> , <i>C. elegans</i> , <i>L. donovani</i> , <i>C. griseus</i> , <i>M. musculus</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>H. sapiens</i> <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX3</i>	PMP; notwendig für Membranprotein-Import.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>K. lactis</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>P. angusta</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX4</i>	PMP; Ubiquitin konjugiertes Enzym	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. angusta</i> , <i>P. pastoris</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX5</i>	PTS1-Rezeptor; cytosolisch und peroxisomal lokalisiert.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>P. angusta</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>C. elegans</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>T. brucei</i> , <i>C. lanatus</i> , <i>C. porcellus</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>N. tabacum</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> und weitere Organismen.
<i>PEX6</i>	PMP; AAA ATPase.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>P. angusta</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>C. elegans</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>H. annuus</i> <sup>4</sup> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX7</i>	PTS2-Rezeptor; cytosolisch und peroxisomal lokalisiert.	<i>N. crassa</i> <sup>3</sup> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>M. musculus</i> , <i>C. griseus</i> <sup>1</sup> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX8</i>	PMP; enthält sowohl PTS1 als auch PTS2-Signal.	<i>H. polymorpha</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>S. cerevisiae</i> .
<i>PEX9</i>	PMP	<i>Y. lipolytica</i>
<i>PEX10</i>	PMP; RING-Finger-Motiv.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>P. angusta</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>S. pombe</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX11</i>	PMP; in Säugern $\alpha$ und $\beta$ -Form; an der Peroxisomen-Teilung involviert.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. boidinii</i> , <i>T. brucei</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX12</i>	PMP; RING-Finger-Motiv.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX13</i>	PMP; Docking-Protein.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. griseus</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX14</i>	PMP; Docking-Protein.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. angusta</i> , <i>C. longicaudatus</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX15</i>	PMP;	<i>S. cerevisiae</i> .
<i>PEX16</i>	PMP; notwendig für Membranprotein-Import.	<i>Y. lipolytica</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX17</i>	PMP; Docking Protein.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX18</i>	Primär cytosolisches Protein.	<i>S. cerevisiae</i> .
<i>PEX19</i>	PMP; Chaperon; notwendig für Membranprotein-Import.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. griseus</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>M. musculus</i> , <i>H. sapiens</i> , <b><i>A. thaliana</i></b> .
<i>PEX20</i>	Primär cytosolisches Protein.	<i>Y. lipolytica</i>
<i>PEX21</i>	Primär cytosolisches Protein.	<i>S. cerevisiae</i>
<i>PEX22</i>	PMP	<i>P. pastoris</i>
<i>PEX23</i>	PMP	<i>Y. lipolytica</i>
<i>PEX24</i>	PMP	<i>Y. lipolytica</i>
<i>PEX25</i>	Peripheres Membranprotein	<i>S. cerevisiae</i> <sup>2</sup>
<i>Djp1</i>	Cytosol. Protein; Chaperon.	<i>S. cerevisiae</i>

**Tab. A1:** Bislang identifizierte Peroxine und ihre möglichen Funktionen. Alle aus verschiedenen Organismen bereits klonierten Peroxin-Homologe sind kursiv dargestellt. In Fettschrift sind weitere Peroxine in *Arabidopsis* angegeben, die sich aus Sequenzvergleichen bereits identifizierter *PEX*-Gene aus Hefen und Säugern mit Datenbank-Sequenzen aus *Arabidopsis* ergeben haben und in die Tabelle integriert wurden (verändert nach Mullen *et al.*, 2001 und Eckert & Erdmann, 2003 sowie: (1), Mukai *et al.*, 2002; (2), Smith *et al.*, 2002; (3), Sichting *et al.*, 2003; (4) Kaplan *et al.*, 2001).

Die Gene von mindestens 13 Peroxin-Homologen aus *Arabidopsis* existieren auch im Menschen. Nur die Peroxine Pex4p und Pex17p fehlen in *H. sapiens*, während ansonsten die identische Peroxinausstattung auf eine konservierte Peroxisomen-Biogenese zwischen Pflanze und Mensch schliessen lässt.

### 5 Die Biogenese von Peroxisomen

Konzeptionell lässt sich die Biogenese eines Peroxisoms in drei verschiedene Teilschritte untergliedern (Übersichtsartikel Holroyd & Erdmann, 2001; Terlecky & Fransen, 2000). Erstens ist die Formation einer peroxisomalen Membran notwendig, die in der Lage ist, weitere Membranproteine (PMPs) zu integrieren. Zweitens ist der Import von peroxisomalen Matrixproteinen über die Membran erforderlich und drittens muss auch die Weitergabe des Zellorganells gewährleistet sein. Die Vorstellungen zur Entstehung von Peroxisomen haben sich über die vergangenen Jahrzehnte verändert, doch noch immer ist der Mechanismus der Peroxisomen-Biogenese grundsätzlich weitgehend ungeklärt. Bislang existiert kein wirklich überzeugender Beweis dafür, dass eines der Modelle, welches die Organellengnese beschreibt, zutreffen könnte (Sacksteder *et al.*, 2000; South & Gould, 1999). Dies hat seine Ursache darin, dass es schwierig ist, die vielen Ergebnisse innerhalb der Peroxisomenforschung zu bewerten, weil ähnliche Experimente in verschiedenen Organismen unterschiedliche Resultate ergeben können. So variieren schon in verschiedenen Hefe-Spezies die Phänotypen der *pex*-Mutanten zum Teil erheblich (Übersichtartikel Tabak *et al.*, 1999).

Im ursprünglichen Modell der 1970er Jahre ging man davon aus, dass die Peroxisomen von speziellen Segmenten des rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) abknospen. In diesem „*ER-vesiculation model*“ von Beevers (1979) werden reife Organellen, die sowohl Membran- als auch Matrixproteine besitzen, an ER-gebundenen Polysomen kotranslatiert und in Form von Vesikeln abgeschnürt (Übersichtartikel Trelease, 1984). Als Anfang der 1980er Jahre gezeigt werden konnte, dass verschiedene Peroxine nicht ER-abhängig, sondern an freien Polyribosomen des Cytosols synthetisiert werden und auch keine direkte Verbindung zwischen ER und Peroxisomen nachgewiesen wurde, setzte sich das „*growth and division*“ Modell von Lazarow & Fujiki (1985) durch. Demnach wachsen Peroxisomen durch den posttranslationalen Import ihrer Proteinkomponenten und vermehren sich schliesslich über die Teilung des reifen Peroxisoms, was grundsätzlich als Variation der Biogenese von Mitochondrien und Chloroplasten betrachtet werden kann (Übersichtartikel Smith & Schnell, 2001). Dieses Konzept der Organellen-Biogenese wurde durch den erheblichen Erkenntniszuwachs bezüglich eines posttranslationalen Proteinimports in die Peroxisomen unterstützt und ist in zahlreichen Übersichtsartikeln beschrieben worden (z.B.

Sacksteder & Gould, 2000; Subramani *et al.*, 2000; Crookes & Olsen, 1999; Hettema *et al.*, 1999; Subramani, 1993). Den unmittelbaren Beweis, dass Peroxisomen aus Peroxisomen hervorgehen, konnten Hoepfner *et al.* (2001) mit zeitaufgelösten Bildern von fluoreszent markierten Peroxisomen im Zellzyklus von *S. cerevisiae* führen. Die Frage der erstmaligen Herkunft eines Peroxisoms liesse sich über die endosymbiontische Aufnahme eines Peroxisoms als gemeinsamer Vorfahre aller Eukaryontenzellen oder auch der Invagination von Plasma-Membranen, ähnlich ER oder Lysosomen erklären (Übersichtartikel Olsen & Harada, 1995).

Neuerdings werden jedoch auch Abwandlungen des „*growth and division*“ Modells diskutiert, die erneut das ER als alternativen oder parallelen Weg in der Peroxisomen-Biogenese behandeln (Übersichtartikel Titorenko & Rachubinski, 1998; Übersichtsartikel Mullen *et al.*, 2001; Veenhuis & van der Klei, 2002; Veenhuis *et al.*, 2003). Diese tragen dem Befund Rechenschaft, dass Peroxisomen auch bei völliger Absenz von bereits existierenden Peroxisomen, einschliesslich auch nur peroxisomaler Membranstrukturen (*ghost sheets*), dennoch entstehen können. In Studien mit *Y. lipolytica* konnte gezeigt werden, dass sich Peroxisomen über einen mehrstufigen Prozess entwickeln, der mit der Bildung eines präperoxisomalen Vesikels beginnt, das verschiedene Membranproteine und COPII-Komponenten enthält und an einer Subdomäne des ER entsteht. Dieses Vesikel geht schliesslich über die Aufnahme weiterer Membranproteine und die Freilassung der COPII-Elemente in frühe peroxisomale Vorläuferformen (P<sub>n</sub>) über. Diese P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub>-Peroxisomen sind dann in der Lage, erstmals verschiedene Matrixproteine aufzunehmen und nach ihrer Pex1p und Pex6p gesteuerten Fusion sowie dem schrittweisen Import weiterer Matrixproteine und Phospholipide, schliesslich über P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, und P<sub>5</sub>, reife P<sub>6</sub>-Peroxisomen auszubilden (Titorenko *et al.*, 2000; Titorenko & Rachubinski, 2000; Übersichtsartikel Titorenko & Rachubinski, 2001a; Titorenko & Rachubinski, 2001b; van der Klei & Veenhuis, 2002).

South *et al.* (1999) konnten in zuvor peroxisomendefizienten menschlichen Fibroblasten-Zellen zeigen, dass nach Wiedereinführung von *PEX16* unabhängig von COP-Proteinen (South *et al.*, 2000) oder des ER-Translocon-Apparates (South *et al.*, 2001) Präperoxisomen als autonome Strukturen über mehrstufige Schritte schliesslich zu jungen Peroxisomen werden, die jedoch nicht vom ER abknospen.

Salomons *et al.* (1997) untersuchten die Auswirkungen des ER-Vesikeltoxins Brefeldin A (BFA) auf die Entwicklung von Peroxisomen in *Hansenula polymorpha* und stellten fest, dass BFA zur Anreicherung und Misslokalisierung neu synthetisierter peroxisomaler Membran- und Matrixproteinen am ER führt. Faber *et al.* (2002a) beobachteten in *pex3*-defizienten *Hansenula*-Zellen nach Synthese der ersten 50 N-terminalen Aminosäuren von Pex3p die Ausbildung membranöser Membranstrukturen, die vom Endomembransystem abstammen. Diese können sich nach Wiedereinführung des Vollängen-*PEX3* zu funktio-

nalen Peroxisomen entwickeln. Die Autoren messen diesem Befund eine besondere Bedeutung als Rettungsmechanismus zu, bei dem in speziellen Fällen die Weitergabe von Peroxisomen durch Verlust der Organellen oder Fehlern in der Vererbung nicht mehr möglich ist (Übersichtartikel Veenhuis & van der Klei, 2002), wie dies auch von integralen Membranproteinen und Lipiden des Golgi-Apparates bekannt ist (Übersichtartikel Warren & Wickner, 1996). Geuze *et al.* (2003) lieferten Beweise für die Involvierung des ER bei der Bildung von Peroxisomen in Mauszellen und postulieren das ER als die Hauptquelle peroxisomaler Membranen, die sich über verschiedene Reifungsschritte zu Peroxisomen entwickeln. Die Bildung eines Präperoxisoms setzt die ER-abhängige Lieferung von Membranen und eines oder mehrerer integraler Membranproteine voraus. Die Weiterentwicklung hin zum funktionellen Peroxisom erfolgt dann als ein vom ER autonomer Prozess. Somit wird an frühe Diskussionen angeknüpft, die eine völlige *de novo*-Synthese von Peroxisomen mithilfe des ER in Erwägung zieht (Übersichtartikel Terlecky & Franssen, 2000; Mullen *et al.*, 2001).

In Pflanzen gibt es nur einige wenige Studien, die zum einen die zahlenmässige Vermehrung von Peroxisomen über einen Vorgang des Abknospens und der Fusionierung mit anderen Präperoxisomen beschreiben und zum andern das Wachstum und die Ausdifferenzierung von Präperoxisomen postulieren, - ein Schritt der ohne eine numerische Vermehrung der Organellen auskommt (Übersichtsartikel Trelease, 2002; Johnson & Olsen, 2001). In Untersuchungen von Mullen *et al.* (1999) wurde das indirekte Targeting der pflanzlichen peroxisomalen Ascorbatperoxidase über spezielle Subdomänen des Endoplasmatischen Retikulums beschrieben. Diese schnüren Membranvesikel ab und entwickeln sich unter Aufnahme von Matrixproteinen zu peroxisomalen Frühformen.

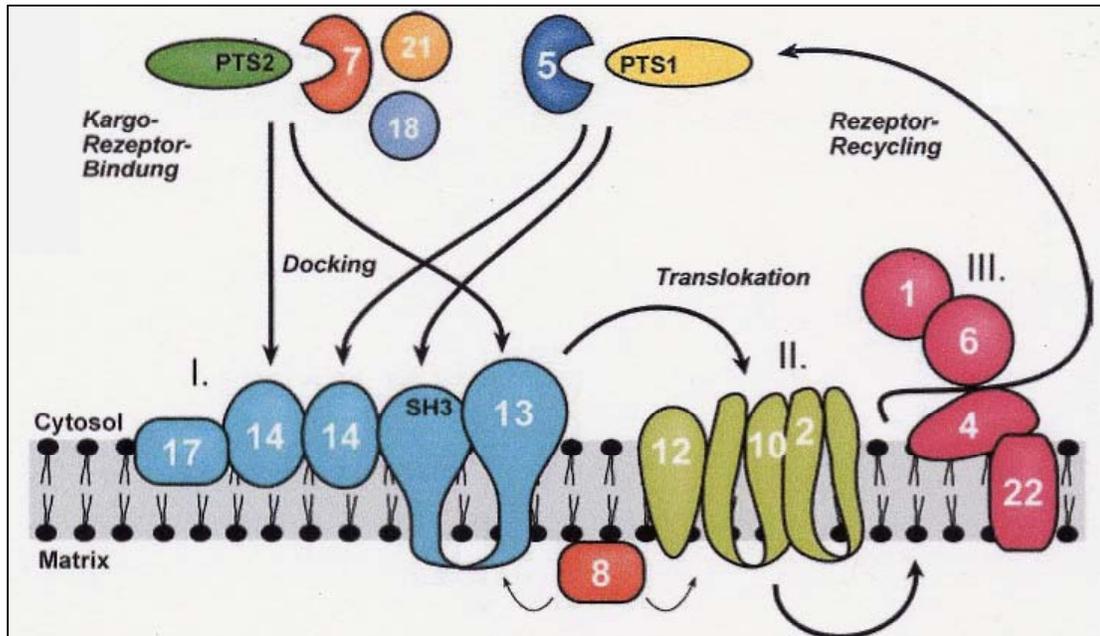
Der Kenntnisstand zur Biogenese pflanzlicher Peroxisomen ist nach Trelease (2002) bestenfalls als spärlich zu bezeichnen und an einem allgemein akzeptierten Konsens-Modell, das sowohl den Ursprung von Präperoxisomen als auch ihre Vergrösserung und weitere Vermehrung beschreiben würde, wird immer noch gearbeitet.

### 5.1 Der peroxisomale Import von Matrixproteinen

Der Import cytosolisch synthetisierter Proteine in die Peroxisomen-Matrix ist ein Prozess, der sich in drei verschiedene Teilschritte untergliedern lässt und repräsentiert eine Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen, die in Abb. A1 dargestellt sind (z.B. Übersichtartikel Holroyd & Erdmann, 2001; Thoms & Erdmann, 2003).

- Ein Importrezeptor (Pex5p oder Pex7p) muss die Cargoproteine anhand eines Targeting-Signals (PTS1 oder PTS2) erkennen und zu den Peroxisomen leiten.

- An der Membranoberfläche des Zielorganells muss ein Docking-Mechanismus (Pex13p und Pex14p) bestehen, der den Rezeptor mit seiner Cargofracht erkennt.
- Ein Translokationsapparat (Pex2p, Pex10p und Pex12p) muss den Import des Zielproteins sicher stellen und den Rezeptor ins Cytosol recyceln (Pex1p und Pex6p).



**Abb. A1:** Sequenzielle Protein-Importkaskade von Matrixproteinen in die Peroxisomen am Hefemodell. Cargoproteine mit einem PTS1 oder PTS2 werden von den entsprechenden Signalrezeptoren Pex5p und Pex7p erkannt und an den Docking-Komplex aus Pex14p und Pex13p in der Membran geleitet (I). Nach dem Andocken erfolgt die Passage des Rezeptors mit seiner Cargofracht durch den Translokationsapparat, welcher aus den RING-Peroxisinen Pex2p, Pex10p und Pex12p bestehen könnte (II). Pex1p und Pex6p sind vermutlich am Recyclingprozess der Rezeptoren beteiligt (III). Das nur in Hefen vorkommende intraperoxisomale Pex8p scheint die Fusion des Docking-Komplexes mit dem RING-Komplex zu organisieren, was in der Bildung eines großen Importkomplexes mündet (Agne *et al.*, 2003). Abbildung aus Holroyd & Erdmann, 2001 und Thoms & Erdmann, 2003.

### 5.1.1 Das Targeting cytosolischer Cargo-Proteine in die Peroxisomen

Ungefähr 50 Proteine müssen vom Ort ihrer Synthese an freien Ribosomen des Cytosols selektiv durch die peroxisomale Membran geleitet werden (Eckert & Erdmann, 2003). Dafür werden zwei allgemeine peroxisomale Targeting-Signale (PTS) für peroxisomale Matrixproteine benutzt. Die große Mehrheit der Matrixproteine besitzt ein PTS1 am äußersten C-terminalen Ende, das aus der Sequenz des Tripeptids SKL, bzw. konservierten Varianten davon besteht (Gould *et al.*, 1989) und eine Bindung mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p (McCollum *et al.*, 1993) eingeht, von dem in Säugerzellen zwei unterschiedlich lange Iso-

formen infolge alternativen Splicings bestehen. Die sich wiederholenden sechs Tetratricopeptid-Motive (TPR) innerhalb des Pex5p sind notwendig, aber nicht ausreichend für die Interaktion des Rezeptors mit einem PTS1-Signal (Szilard & Rachubinski, 2000). Pex5p wurde in einem pflanzlichen Organismus erstmals von Kragler *et al.* (1998) aus *Nicotiana tabacum* und zeitgleich von Wimmer *et al.* (1998) aus *Citrullus vulgaris* kloniert. Demnach pendelt der PTS1-Rezeptor Pex5p zwischen Cytosol und peroxisomalen Innenraum.

Vom PTS1-Typus sind allerdings auch zahlreiche artspezifische Derivate der Konsensussequenz (S/C/A;K/R/H;L,M) möglich (Lametschwandtner *et al.*, 1998), die meisten davon offensichtlich in Proteinen pflanzlicher Peroxisomen (Mullen, 2002). Das PTS1 ist sowohl notwendig als auch ausreichend (Gould *et al.*, 1988), um Reporterproteine in Hefen, Pflanzen, Insekten und Säugern in die Peroxisomen zu dirigieren (Gould *et al.*, 1990). Verschiedene peroxisomale Matrixproteine, wie z.B. die menschliche Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase enthalten jedoch auch eine C-terminale Sequenz, die nur zwei von drei Aminosäuren der Konsensussequenz besitzen (z.B. KKL) und die dennoch in die Peroxisomen geleitet werden, während Reporterproteine mit diesem PTS1 ihr Ziel nicht mehr erreichen können (Übersichtartikel Hetteema *et al.*, 1999). Dieser Befund impliziert, dass es neben dem Tripeptid noch weitere zusätzliche Informationen geben muss, um Proteine in die Peroxisomen-Matrix zu leiten. Verantwortlich hierfür sind die Aminosäuren unmittelbar oberhalb der PTS1-Information (Mullen *et al.*, 1997; Lametschwandtner *et al.*, 1998). Lametschwandtner und Mitarbeiter konnten in *two-hybrid*-Studien zeigen, dass der PTS1-Rezeptor eine Vielzahl C-terminaler Tripeptide binden kann und die Interaktion durch acht Aminosäuren oberhalb des PTS moduliert wird. Falls eine Konsensussequenz vorliegt, reicht ihre Interaktion mit der Bindungsstelle des Rezeptors aus, ohne dass zusätzliche AS-Interaktionen notwendig wären. Andernfalls ergänzen die Aminosäuren oberhalb der Nicht-Konsensussequenz die Bindungen zwischen Rezeptor und Cargoprotein (Übersichtartikel Hetteema *et al.*, 1999). Für Elgersma *et al.* (1996) ist deshalb die Überprüfung der Präsenz des PTS1-Rezeptors Pex5p eine Alternative zur Bestimmung, ob ein Matrixprotein über ein PTS1 in die Peroxisomen geleitet wird.

Von den in Säugerzellen existierenden beiden Isoformen des PTS1-Rezeptors ist die längere, Pex5pL, sowohl in CHO-Peroxisomen (Otera *et al.*, 1998; Matsumura *et al.*, 2000; Otera *et al.*, 2000) als auch in menschlichen Fibroblastenzellen (Braverman *et al.*, 1998; Dodt *et al.*, 2001) ebenfalls für den Import von PTS2-Proteinen in die Peroxisomen notwendig, indem Pex5pL physisch mit Pex7p interagiert (Mukai *et al.*, 2002) und an die peroxisomale Andockstelle Pex14p transportiert (Otera *et al.*, 2002). Beide Isoformen, PEX5L und PEX5S sind dabei bis auf ein zusätzliches Exon in PEX5L identisch, das aus 37 Aminosäuren besteht und in *H. sapiens* zwischen den Aminosäuren 114 und 115 liegt.

Nach Gould & Collins (2002) ist Pex5p somit der direkte oder indirekte Import-Rezeptor für alle neu synthetisierten peroxisomalen Matrix-Enzyme (nsPMEs). Doch auch in Pflanzen gibt es Hinweise darauf, dass der Import von PTS2-Proteinen vom PTS1-Importmechanismus abhängig ist. In *two-hybrid*-Analysen von *Arabidopsis* interagiert der vermutliche Andockrezeptor Pex14p zwar mit dem PTS1-Importrezeptor Pex5p, nicht aber mit dem PTS2-Rezeptor Pex7p. Letzterer bindet jedoch an Pex5p und auch die einander nicht überschneidenden Bindedomänen der drei Peroxine weisen auf einen Proteinkomplex zwischen Pex5p, Pex7p und Pex14p hin, der auf ein funktionelles Zusammenspiel im Matrix-Protein-Import hindeutet (Nito *et al.*, 2002).

In der Hefe *S. cerevisiae* hingegen ist der PTS2-Import unabhängig von Pex5p, benötigt aber die Präsenz der beiden bislang nur in *S. cerevisiae* identifizierten Proteine Pex18p und Pex21p (Stein *et al.*, 2002), um mit dem Docking-Mechanismus aus Pex13p und Pex14p (Girzalsky *et al.*, 1999) interagieren zu können. In *Y. lipolytica* existiert kein PTS2-Rezeptor Pex7p. Stattdessen ist Pex20p für die Oligomerisation und den Import des Cargo-Proteins Thiolase notwendig, das in *pex20*-Mutanten exklusiv im Cytosol verbleibt, während andere Matrixproteine importiert werden können (Titorenko *et al.*, 1998).

Nur wenig Matrixproteine benutzen ein PTS2, um in die Peroxisomen geleitet zu werden (Swinkels *et al.*, 1991). In Pflanzen wurde mit der glyoxysomalen Malatdehydrogenase erstmals eines von sechs PTS2-tragenden Enzymen identifiziert (Gietl *et al.*, 1994). Weitere PTS2-tragende peroxisomale Proteine sind Acyl-CoA-Oxidase, Aspartat-Aminotransferase, Thiolase, Citrat-Synthase und Hsp70. Im Vergleich zu anderen Organismen ist dies jedoch immer noch eine relativ hohe Anzahl (Mullen, 2002).

Als spezifischer Rezeptor für PTS2-Proteine fungiert das WD40-Protein Pex7p (Marzioch *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995), das in Pflanzen erstmals im Rahmen dieser Dissertation kloniert wurde (Schumann *et al.*, 1999). Die PTS2-Sequenz liegt meist nah am N-Terminus und besitzt die Konsensusabfolge (R/K;L/V/I)X<sub>5</sub>(H/Q;L/A) aus neun Aminosäuren (Übersichtartikel Holroyd & Erdmann, 2001; Subramani *et al.*, 2000; Swinkels *et al.*, 1991), bzw. eine von Flynn *et al.* (1998) geforderte flexiblere Konsensussequenz (R/K)X<sub>6</sub>(H/Q;A/L/F); (vgl. auch Mullen *et al.*, 2001; Mullen, 2002). Gelegentlich erfüllt das PTS2 allerdings ebenso an internen Positionen abseits des N-Terminus seine Funktion und neben dem sequenzspezifischen Motiv enthält auch ein strukturspezifisches Motiv, das von den physiochemischen Eigenschaften der Molekülreste innerhalb des Nonapeptids abhängt, Targeting-Informationen (Flynn *et al.*, 1998). Anders als PTS1-Proteine werden PTS2-Proteine in Pflanzen und Säugern, nicht aber in Hefen oder Trypanosomen als hochmolekulare Vorläuferproteine synthetisiert, deren Targeting-Sequenzen nach dem Import in die peroxisomale Matrix durch eine Peptidase entfernt werden (Gietl, 1990; Kato *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1998; Mullen, 2002). Als Besonderheit ist die Phylogenese von

*Caenorhabditis elegans* zu erwähnen. Dort wurde der PTS2-Importmechanismus im Zuge der Evolution vollständig durch PTS1 ersetzt (Motley *et al.*, 2000).

Einige wenige peroxisomale Matrixproteine, z.B. die peroxisomale Acyl-CoA Oxidase (Pox1p) aus *P. pastoris*, besitzen jedoch weder ein PTS1 noch ein PTS2. Für manche dieser Proteine konnten neue PTS-Sequenzen identifiziert werden, die mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p interagieren, um in die Matrix zu gelangen. Allerdings handelt es sich bei den Pex5p-Interaktionsstellen um völlig unterschiedliche Regionen als bei PTS1-Bindungen. Auch Pox1p aus *S. cerevisiae* besitzt ein eigenes PTS3, das sich von jenem in *P. pastoris* unterscheidet. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei dem PTS1-Rezeptor im Grunde um einen multifunktionellen Rezeptor handelt und andere Proteine, denen ein PTS fehlt, über die Bindung mit Pex5p ebenfalls in die Peroxisomen gelangen könnten (Übersichtartikel Eckert & Erdmann, 2003).

### 5.1.2 Andocken eines Cargo-Rezeptor-Komplexes an die peroxisomale Membran

Nachdem das Rezeptorprotein mit seiner Cargofracht die Peroxisomenmembran erreicht hat, muss es an spezifische Proteine andocken können, die das als Fähre fungierende Rezeptor-Protein mit seiner Fracht erkennen. Dieser Docking-Komplex wurde zuerst in *S. cerevisiae* beschrieben (Albertini *et al.*, 1997; Huhse *et al.*, 1998) und besteht aus den drei Peroxinen Pex13p, Pex14p und Pex17p. Pex17p ist ein peripheres Membranprotein und direkt mit Pex14p assoziiert. Hefe-Mutanten von *pex17* zeigen zwar noch peroxisomale Membranreste (*ghosts*), aber weder den Import von PTS1-noch von PTS2-Proteinen (Huhse *et al.*, 1998). Dieselbe Import-Defizienz zeigt sich bei *pex14*-Mutanten (Albertini *et al.*, 1997). Pex14p interagiert mit Pex13p und beiden Importrezeptoren Pex5p und Pex7p (Brocard *et al.*, 1997). Pex13p ist ein integrales Membranprotein, das seine C- und N-Termini cytosolisch exponiert. Die C-terminale Region enthält eine SH3 Domäne und bindet sowohl Pex5p als auch Pex14p während die N-terminale Region direkt oder indirekt mit Pex7p interagiert (Girzalsky *et al.*, 1999). Importstudien an *S. cerevisiae* weisen darauf hin, dass Pex14p der erste Schritt beim Andocken des PTS1-Rezeptors ist (Übersichtartikel Holroyd & Erdmann, 2001) und die beiden sich überlappenden Importmechanismen an diesem Peroxin konvergieren (Albertini *et al.*, 1997). In Zellen von *H. polymorpha* zeigen *pex14*-Mutanten ebenfalls nur noch membranöse Strukturen, in denen die Hauptmasse der Matrixproteine im Cytosol verbleibt (Komori *et al.*, 1997).

Zur Funktion von Pex14p im Menschen gibt es teils widersprüchliche Befunde. Zum einen erkennen Fransen *et al.* (1998) eine Interaktion von Pex14p mit Pex5p und Pex13p und die Notwendigkeit von Pex14p für den Matrix-Proteinimport, was einer Rolle ähnlich in Hefen

entspricht. Zum andern diagnostizieren Will *et al.* (1999) nur eine Interaktion von Pex14p mit Pex5p, jedoch keine mit Pex13p oder dem PTS2-Rezeptor Pex7p. Shimizu *et al.* (1999) zeigten für CHO-Zellen schliesslich eine Interaktion von Pex14p mit beiden Importrezeptoren Pex5p und Pex7p, was einer Parallele zu Hefen entsprechen würde.

Hayashi *et al.* (2000) konnten in *pex14*-Mutanten von *A. thaliana* die Schlüsselbedeutung des Docking-Proteins auch für den Importmechanismus beider PTS-Signale in Pflanzen aufzeigen. Nach dem Ausschalten des Peroxins, zeigten sich pleiotrope Effekte in unspezialisierten Peroxisomen, Blattperoxisomen sowie Glyoxysomen. Pex14p interagiert in *Arabidopsis* mit Pex5p, nicht aber mit Pex7p. Die Fähigkeit des PTS2-Rezeptors mit Pex5p zu interagieren, spricht für einen PTS1-Rezeptor abhängigen Import von PTS2-Proteinen, der über Pex14p gesteuert wird (Nito *et al.*, 2002).

### 5.1.3 Der Translokationsapparat und der Verbleib des Rezeptors

Nach dem erfolgreichen Andocken des Rezeptorproteins an das Peroxisom muss das Cargoprotein durch die Membran hindurch geschleust werden. Ob dabei die Bindung zwischen Rezeptor und Cargoprotein bis zum Übertritt in die peroxisomale Matrix aufrecht erhalten bleibt oder der Rezeptor seine Fracht bereits an der Membran dem Translokationsapparat übergibt, ist umstritten. Die ursprüngliche Hypothese ging von einem „*simple shuttle model*“ aus, bei dem der Rezeptor seine Fracht an die Translokationsmaschinerie übergibt, um dann im Cytosol für neue Shuttle-Aufgaben zu verbleiben (Marzioch *et al.*, 1994; Dodt & Gould, 1996). Diese Hypothese wurde durch die vorwiegend cytosolische Lokalisation der PTS-Rezeptoren in verschiedenen Organismen gestützt (Dammai & Subramani, 2001). Das „*extended shuttle model*“ von Rachubinski & Subramani (1995) geht hingegen von einem vollständigen Übertritt des Rezeptors in die Matrix aus, der dort seine Cargofracht entlässt und für neue Importrunden aus dem Peroxisom herausgeschleust wird. Untersuchungen an menschlichen Peroxisomen legen für den Importrezeptor Pex5p deutliche Beweise für die Hypothese des „*extended shuttle model*“ dar, bei dem ein Rezeptorprotein mehrmals mit seiner Fracht in die Matrix und von dort ins Cytosol für weitere Importrunden wandert (Dammai & Subramani, 2001). Für Pflanzen konnten Wimmer *et al.* (1998) in Untersuchungen des PTS1-Rezeptors aus der Wassermelone ebenfalls eine Lokalisierung von CvPex5p im Cytosol und innerhalb neu gebildeter Peroxisomen von transformierten *Hansenula*-Zellen feststellen. Insgesamt vier Peroxine scheinen am Recyclingprozess des PTS1-Rezeptors beteiligt zu sein. Diese umfassen Pex1p und Pex6p sowie Pex4p und Pex22p, wobei Pex4p bislang nur aus verschiedenen Hefen kloniert wurde und von Pex22p an der Peroxisomen-Membran verankert wird, das selbst wiederum auch nur aus *P. pastoris* bekannt ist (Übersichtartikel Charlton & Lopez-Huertas, 2002). Ein Homo-

log für *PEX4* existiert jedoch auch in *Arabidopsis*, wie aus der Analyse ihres Genoms hervorgeht (Mullen *et al.*, 2001).

Eine besondere Eigenschaft von Peroxisomen, anders als in Mitochondrien oder ER, ist die Translokation von vollständig gefalteten und oligomeren Proteinen durch die peroxisomale Membran (Titorenko *et al.*, 2002; Übersichtartikel Subramani, 2002; Faber *et al.*, 2002b), obwohl Crookes & Olsen (1998) an Importstudien mit Monomeren der Isocitrat-Lyase eine gegenüber Oligomeren verbesserte Importeffizienz feststellen konnten. Auch mit einer PTS-Sequenz beschichtete Goldpartikel werden in die Peroxisomen importiert (Walton *et al.*, 1995). Die zu importierenden Matrixproteine können mit mehreren Importrezeptoren gleichzeitig interagieren und die Rezeptoren selbst Verbindungen mit mehreren Oligomeren aus Importsubstrat eingehen (Thoms & Erdmann, 2003). Welcher Mechanismus diesem Transport zugrunde liegt, ist bislang unverstanden. Zum einen wird die Passage des Cargoproteins durch einen Kanal oder eine Pore innerhalb der Membran, entweder dauerhaft oder nur vorübergehend für den Zeitraum des Importvorgangs diskutiert, zum anderen ein Prozess über Einstülpung, Auflösung und Verschmelzung der Membran um die Cargofracht herum, praktisch als Form einer abgewandelten Endocytose (Übersichtartikel Subramani, 2002). Da bislang mikroskopisch weder kleine noch große Translokationsporen gefunden werden konnten, ist eine temporäre Anordnung spezifischer Peroxine zur Translokation vollständig gefalteter Matrixproteine denkbar, die durch das Andocken von Cargo-Proteinen erst induziert werden und die sofort nach Import des Matrixproteins wieder degenerieren, um die Permeabilitätseigenschaften der Membran als Barrierschranke aufrecht zu erhalten (Mullen, 2002). Dabei wäre beim Prozess der Proteinpassage in das Peroxisom denkbar, dass der Docking-Protein-Komplex selbst bereits als Bestandteil des Translokationsapparates fungiert (Übersichtartikel Holroyd *et al.*, 2001). Die drei RING-Finger Peroxine Pex2p, Pex10p und Pex12p stellen integrale peroxisomale Membranproteine (PMPs) dar, die wahrscheinlich nach dem erfolgten Andocken eines Rezeptors in Form eines heteromeren Komplexes auftreten und deren Funktionen wohl in Mensch und Hefe konsistent sind (Übersichtsartikel Sacksteder *et al.*, 2000; Holroyd *et al.* 2001). Schaltet man *PEX10* und *PEX12* aus, so wird die Fähigkeit von Pex5p an die Peroxisomen zu binden nicht beeinflusst, was dafür spricht, dass diese Peroxine nicht zum Andocken des Rezeptors benötigt werden (Chang *et al.*, 1999). Die Interaktion von Pex10p und Pex12p erfolgt über die C-terminalen RING-Domänen, der gleiche Mechanismus, mit dem Pex12p in der Lage ist, Pex5p an sich zu binden (Chang *et al.*, 1999; Okumoto *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Pex12p nicht nur mit Pex10p und Pex5p interagiert, sondern auch mit den Docking-Proteinen Pex13p und Pex14p der beiden PTS1 und PTS2-Importrezeptoren und somit die These einer physischen Verknüpfung von Docking-Apparat und Translokationsmaschinerie unterstützen (Albertini *et al.*, 2001). Aber der tat-

sächliche Mechanismus der Translokation und die daran beteiligten Komponenten konnten bislang nicht identifiziert werden (Holroyd *et al.*, 2001).

## 5.2 Die Insertion peroxisomaler Membranproteine

Neben dem Import von Matrixproteinen ist zur Bildung von Peroxisomen auch die Lieferung von Phospholipiden und von Membranproteinen notwendig (Übersichtartikel Trelease, 2002). Der posttranslationale Import von Membranproteinen in die Peroxisomen vollzieht sich dabei völlig unabhängig vom Importmechanismus der Matrixproteine (z.B. Purdue & Lazarow, 1994). Verschiedene Autoren wiesen peroxisomale Membran-Targeting-Signale (mPTS) nach, die eindeutig vom PTS1- und PTS2-Importmechanismus abweichen und die Komponenten der Transmembran-Segmente beinhalten, welche für das Targeting in die Peroxisomen notwendig sind (Honsho & Fujiki, 2001; Wang *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2000; Pause *et al.*, 2000; Mullen & Trelease, 2000). Iida *et al.* (2003) konnten bei dem neu entdeckten peroxisomalen Membranprotein M-LP aus der Maus, welches in der Aktivitätssteuerung einer Superoxiddismutase involviert ist, ein peroxisomales Membran-Targeting-Signal nachweisen, das aus dem ersten von insgesamt drei Transmembran-Segmenten nahe des Aminoterminus besteht und sich aus zahlreichen positiv geladenen Aminosäuren des darauffolgenden Loops zusammensetzt. Gegenüber früherer Annahmen, dass ein peroxisomales Membran-Protein (PMP) nur jeweils ein bestimmtes Targeting-Signal besitzt, zeigten Jones *et al.* (2001), dass verschiedene Membranproteine auch zwei unabhängige und einander nicht überlappende Targetingsequenzen besitzen können, von denen eine allein ausreichend ist, das Protein in die peroxisomale Membran zu leiten. Eine klare Konsensussequenz für mPTS konnte bislang noch nicht gefunden werden, obwohl sie für verschiedene peroxisomale Membran-Proteine, einschliesslich *CbPmp47p*, *RnPmp33p*, *HsPmp34p* und *Pex3p* aus verschiedenen Spezies beschrieben wurden (Übersichtartikel Eckert & Erdmann, 2003). Man unterscheidet Membranproteine des Typ1 von Membranproteinen des Typ2. Während Typ1-Proteine erstmalig in ER-Domänen lokalisiert werden, die präperoxisomale Vesikel abschnüren (gilt vermutlich nur für sehr wenige frühe Peroxisome), treten Typ2-Proteine über ihr mPTS direkt vom Cytoplasma in die peroxisomale Membran ein, was auf die meisten PMPs zutrifft (Übersichtartikel Johnson & Olsen, 2001; Eckert & Erdmann, 2003). Das Targeting und die Insertion von PMPs findet auch noch in Zellen statt, denen eine wesentliche Komponente des Importapparates von Matrixproteinen fehlt, wie in Studien mit *pex13* dargestellt wurde (Erdmann & Blobel, 1996; Gould *et al.*, 1989). Santos *et al.* (1988) zeigten in menschlichen Fibroblastenzellen des Zellwegertypus, dass sich trotz Import-Defizienz für Matrixproteine peroxisomale „membrane ghosts“ ausbildeten und somit das Targeting als auch die Insertion von Membranproteinen immer

noch funktionieren. Während also die meisten *pex*-Mutanten Membranvesikel ohne Matrixinhalt erzeugen, gibt es drei Peroxine, Pex3p, Pex16p und Pex19p, deren jeweilige Deletion die Ausbildung solcher „ghosts“ verhindert und zur cytosolischen Exposition mit nachfolgendem Abbau von PMPs führt, was die drei Peroxine als Schlüsselkomponenten für die Bildung peroxisomaler Membranen prädestiniert (Hettema *et al.*, 2000; South & Gould, 1999). Sie dienen somit als Initiierungsstufe bei der Peroxisomen-Biogenese und die nachfolgende Schritte dienen dem Matrix-Proteinimport, dem Wachstum und der Teilung der Organellen (Honsho *et al.*, 2002). In „two-hybrid“-Analysen von Snyder *et al.* (1999) wurde die Interaktion von Pex19p mit Pex3p in *P. pastoris* nachgewiesen, was auch bereits für *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte (Götte *et al.*, 1998). Doch fanden die Autoren in *pex19*-Mutanten von *P. pastoris* immer noch sehr frühe Membranreste, die sich aus Pex3p zusammensetzen, aber morphologisch von späten „membrane ghosts“ zu unterscheiden sind. Interessanterweise interagiert Pex19p in diesem Hefeorganismus auch mit Pex10p. Fransen *et al.* (2001) konnten die Interaktion von Pex19p mit einer ganzen Reihe von Membranproteinen nachweisen, wie Pex3p, Pex10p, Pex11p, Pex12p, Pex13p und Pex16p. Da Pex19p zwischen Cytosol und peroxisomaler Membran verteilt ist, könnte das Peroxin ein mobiler Rezeptor für peroxisomale Membran-Targeting-Signale (mPTS) darstellen, der neu synthetisierte PMPs im Cytosol für den Transport zur peroxisomalen Membran solubilisiert, und Pex3p würde ein Teil der dazugehörigen Docking-Stelle widerspiegeln. Allerdings gibt es für diese Hypothese durchaus widersprüchliche Befunde, die zumindest gegen einen universellen mPTS-Rezeptor in Form von Pex19p sprechen (Holroyd & Erdmann, 2001). Die Rolle von Pex16p könnte darin liegen, präperoxisomale Vesikel, die vom ER gebildet werden, durch den Einbau weiterer Membranproteine, hin zu erkennbaren Peroxisomen zu entwickeln. Honsho *et al.* (2002) postulieren in Säugern eine Funktion bei der Membranbildung oberhalb der Rolle von Pex3p. Die Überexpression von Pex16p führt in *Y. lipolytica* zu vergrößerten Peroxisomen, während *pex16*-Zellen keinerlei morphologische Strukturen peroxisomaler Herkunft erkennen lassen (Eitzen *et al.*, 1997). South & Gould (1999) konnten in Fibroblastenzellen des Menschen einen direkten Einbau von Pex16p in bereits existierende Peroxisomen, ohne den Umweg über das ER, feststellen. Lin *et al.* (1999) klonierten das *PEX16*-Homolog aus *Arabidopsis* und erkannten eine ER-abhängige Funktion des Proteins bei der Protein- und Lipidbody-Biogenese. Ein stringenter Zusammenhang zu Peroxisomen selbst eröffnete sich in ihrer Studie aufgrund von Untersuchungen in abgereiften und trockenen Samen nicht. In diesen sind Peroxisomen nicht grundsätzlich zu erwarten (Olsen & Harada, 1995).

In einer Untersuchung von Geuze *et al.* (2003) an dendritischen Mauszellen fanden die Autoren das peroxisomale Membranprotein Pex13p in speziellen lamellenartigen Subdomänen des ER. Ihre 3-D Rekonstruktionen zeigten, dass eigenständige Lamellen ohne Ver-

bindung zum ER in ein peroxisomales Retikulum übergehen, die das Vorläuferkompartiment des globulären Peroxisoms darstellen. Dabei zeigt sich ein Gradient des Peroxins, mit der deutlich höchsten Konzentration in den lamellenartigen ER-Domänen, gefolgt von peroxisomalem Retikulum. In den Peroxisomen selbst lag die Konzentration von Pex13p bei nur 9% der Gesamtkonzentration und einer deutlich geringeren Dichte den beiden anderen Strukturen gegenüber. Dies führt zur Schlussfolgerung einer ER-abhängigen Herkunft peroxisomaler Membranen.

## 6 Die Bedeutung von *PEX10* in verschiedenen Organismen

Von 1995 bis heute wurden insgesamt mindestens 15 Forschungsartikel zur Funktion und Interaktion von Pex10p in Peroxisomen verschiedener Hefen und des Menschen veröffentlicht, die sich in den Ergebnissen bezüglich der Funktion von Pex10p teils erheblich unterscheiden.

Kalish *et al.* (1995) zeigten für *Pichia pastoris*, dass die zinkbindende Domäne C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> für die Funktion des Proteins essentiell ist. In *P. pastoris* führt der Verlust des Membranproteins zur Anhäufung leerer Membranvesikel (*ghost sheets*), weshalb eine Funktion bei der Translokation von Matrixproteinen, entweder des PTS1- oder des PTS2-Typus, postuliert wird. Da die Funktion von *PpPex10p* durch exogene Proteasen nicht berührt wird, ist eine vollständige Lokalisation des Peroxins innerhalb des Organells wahrscheinlich. Anhand der Charakterisierung mit Pex19p in *Pichia pastoris* zeigten Snyder *et al.* (1999) die Interaktion von *PpPex19p* mit Pex3p und ebenso mit Pex10p.

In *pex10*-Mutanten von *Hansenula polymorpha* führt die Ausschaltung des Gens hingegen zu keinen sichtbaren peroxisomenähnlichen Strukturen mehr. Stattdessen reichern sich die Matrixproteine im Cytosol an. *HpPex10p* ist vor allem in den Membranen von jungen Peroxisomen nachweisbar, weshalb es als Komponente innerhalb der Peroxisomenvermehrung betrachtet wird. Eine Überexprimierung des Proteins führt zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl an Peroxisomen (Tan *et al.*, 1995).

Veenhuis *et al.* (1996) zeigten an verschiedenen peroxisomendefizienten Mutanten von *Hansenula* (*Δpex1*, *Δpex5* und *Δpex14*), dass sich kleine membranöse Vesikel in den Mutanten ausbilden konnten und diese sich analog zu intakten Peroxisomen vermehrten, sobald der Proliferationsfaktor *HpPex10p* in den Mutanten überexprimiert wurde.

Fast zeitgleich charakterisierten Warren *et al.* (1998) und Okumoto *et al.* (1998) das Expressionsprodukt von *PEX10* in *Homo sapiens* und komplementierten mit *PEX10*-cDNA morphologisch und biochemisch Fibroblasten-Zellen der Komplementationsgruppe 7 (USA), bzw. B (Japan), bei denen der peroxisomale Matrix-Protein-Import gestört ist und

die das klinische Krankheitsbild des Zellweger-Syndroms ausbilden. Diese Import-Defizienz hatten Slawecki *et al.* bereits 1995 in Patienten-Zelllinien der Komplementationgruppe 7 beschrieben. Dodt & Gould (1996) beobachteten eine Anhäufung des PTS1-Rezeptors Pex5p innerhalb des peroxisomalen Lumens in CG7-Zellen und diskutierten eine Funktion des unbekanntes Gens (*PEX10*) bei der Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplex oder beim Export des Rezeptors aus dem peroxisomalen Lumen. Die Bedeutung des C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-Motivs für die Funktion des Peroxins wurde bei einem NALD-Patienten deutlich, bei dem eine Punktmutation im Zinkfingermotiv C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> des einen Allels zum Austausch des hochkonservierten Histidins durch Glutamin (H290Q) führte, während eine Mutation im anderen Allel (R125X) ein frühzeitiges Stopcodon einbrachte (Warren *et al.*, 1998). Chang *et al.* (1999a) beschreiben die Interaktion zwischen Pex12p und Pex10p über die Zinkfinger RING-Domäne. Sie erkannten eine Interaktion von *HsPex12p* mit *HsPex5p* und *HsPex10p* und postulieren eine Funktion sowohl von Pex12p als auch von Pex10p im Matrix-Protein-Import, der nach dem Docking-Mechanismus von Pex5p greift. Menschliche *Apex10*-Fibroblasten-Zellen können immer noch peroxisomale Membranproteine importieren und bilden peroxisomale Strukturen aus, aber es findet kein Import von Matrix-Proteinen mehr statt, ähnlich dem Phänotyp in *Pichia pastoris* (Chang *et al.*, 1999b).

Sacksteder *et al.* (2000) charakterisierten im *yeast two-hybrid system* die Funktion von *HsPex19p* und zeigten anhand von Reportergenkonstrukten, dass dieses Peroxin mit verschiedenen integralen Membranproteinen, unter anderem Pex10p, interagiert.

Den Zusammenhang zwischen verschiedenen Genotypen einer *pex10*-Mutation und ihren klinischen Ausprägungen untersuchten Warren *et al.* (2000). Sie fanden bei vier untersuchten Zellweger-Patienten *nonsense*, *frameshift* oder *splice-site* Mutationen, die große Bereiche des Gens ausgeschaltet hatten, während bei einem Patienten mit milderem Phänotyp der an NALD erkrankte nur eine *missense*-Mutation im Zinkfingermotiv vorlag. Die Bedeutung der C-terminalen Zink-Bindungsdomäne für die Funktion von *PEX10* war evident.

Okumoto *et al.* (2000) fanden in Zellen Chinesischer Hamsterovariolen eine Interaktion von Pex10p und Pex12p, wie er auch in Peroxinen des Menschen beschrieben wurde. Durch *domain mapping* zeigten sie die funktionale Bedeutung des RING-Fingers für die Peroxinaktivität zwischen Pex10p und Pex12p *in vitro* sowie für Pex10p mit Pex2p. Sowohl Pex12p als auch Pex10p interagieren mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p, was auf eine Beteiligung der beiden RING-Finger Peroxine zumindest im PTS1 gesteuerten Matrix-Protein-Import schliessen läßt. Diese Ergebnisse sind weitgehend kongruent mit Befunden aus *S. cerevisiae* (Albertini *et al.*, 2001). Dort reichte in *two-hybrid*-Untersuchungen die RING-Domäne alleine für eine Interaktion zwischen Pex12p und Pex10p aus. Ausserdem wurden in Immuno-Isolations-Experimenten die beiden Peroxine zusammen mit den PTS-

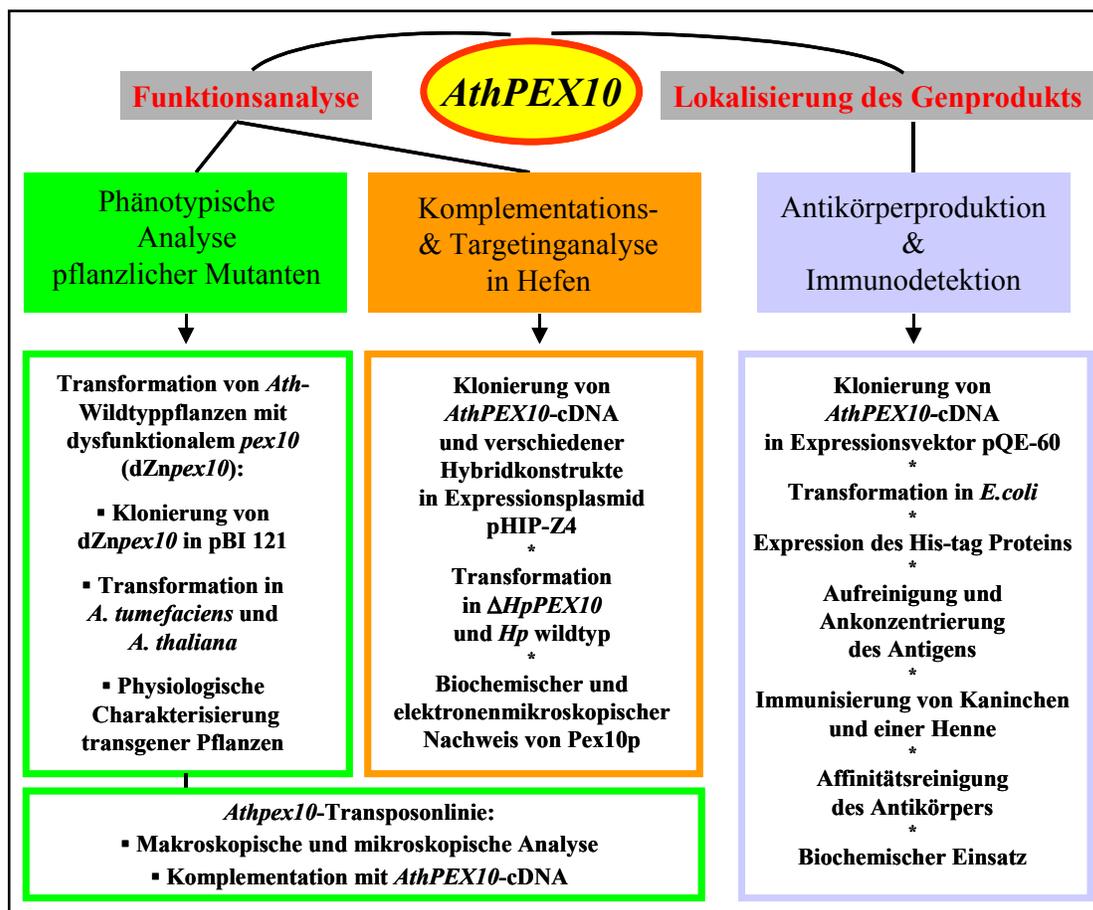
Rezeptoren Pex5p und Pex7p sowie den Docking-Proteinen Pex13p und Pex14p copräzipitiert. Collins *et al.* (2000) untersuchten die epistatischen Beziehungen von 12 verschiedenen Peroxinen in *P. pastoris* anhand des Subphänotyps von reduziertem Pex5p. Die Ergebnisse unterstützen ein Modell, bei dem Pex10p zusammen mit Pex12p und Pex8p in *Pichia* einen Matrix-Importfaktor darstellt, der hinter dem Docking-Mechanismus aus Pex13p und Pex14p liegt. Pex4p wird eine späte Rolle beim Recycling des Rezeptors zugeschrieben.

## 7 Ziele dieser Arbeit

Die Bedeutung von Peroxisomen ist durch ihr Vorkommen in wahrscheinlich allen eukaryotischen Organismen evident. Eine Fehlbildung dieser Organellen oder ihre Dysfunktionalität führt deshalb zu schwerwiegenden, meist letalen Folgen in der Ontogenese eines Lebewesens, wie es sich nicht zuletzt durch das Krankheitsbild des Zellwegersyndroms beim Menschen manifestiert. Während die peroxisomalen Funktionen aufgrund unterschiedlicher Enzymausstattungen heteroformer Zelltypen immens vielfältig sein können, scheint der Mechanismus ihrer Entstehung und Vererbung einem biogenetischen Grundmuster zu folgen, das in Hefen, Säugern und Pflanzen evolutionär konserviert ist. Dennoch gibt es auch Unterschiede zwischen den Organismen, die sich schon zwangsläufig aus den Differenzen in den Orthologen für verschiedene Peroxine ergeben. Die Entwicklung eines universellen Modells zur Peroxisomen-Biogenese setzt das Verständnis von den Unterschieden und Abweichungen in verschiedenen Modellsystemen sowohl auf systematischer als auch zelltypischer Ebene voraus und ist die Prämisse für kurative pränatale Behandlungsmethoden bei PBD-Patienten oder für gezielte biotechnologische Eingriffe in den peroxisomalen Metabolismus von Pflanzen, z.B. zur Herstellung neuer Lebensmittelöle oder Rohstoffen für die industrielle Anwendung als Pharmazeutika, Brennstoff oder industrielles Schmiermittel (Quelle: *cell factory project* der EU; *Project: QLK3-1999-00213*).

Die Voraussetzungen hierfür wurden in der Vergangenheit zum Großteil an Hefen erarbeitet und viele Erkenntnisse sind der Forschung auf medizinischem Gebiet zu verdanken. In Pflanzen war das Wissen bezüglich der Peroxisomen-Biogenese noch zu Beginn dieser Dissertation äusserst spärlich, was sich in der erstmaligen Klonierung eines Peroxins im Jahr 1998 in Form des PTS1-Rezeptors Pex5p aus *Citrullus vulgaris* innerhalb dieser Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Botanik der Technischen Universität München widerspiegelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch Screening von cDNA-Bibliotheken weitere pflanzliche Peroxine identifiziert und kloniert werden, was für zwei cDNA-Vollängklone, *PEX7* und *PEX10* gelungen ist. Da die Funktion von Pex7p als PTS2-Rezeptor bereits aus nicht-pflanzlichen Organismen bekannt war, erschien die Fokussierung auf das integrale

Membranprotein Pex10p interessanter. Zur Charakterisierung des Peroxins wurden vier verschiedene Strategien gewählt, deren Ansätze in Abb. A2 dargestellt sind.



**Abb. A2:** Schematischer Überblick der Arbeitsansätze zur Charakterisierung von *AthPEX10*.

Zum einen wurden Antikörper gegen *AthPex10p* generiert, mit denen die subzelluläre Lokalisation des Genprodukts elektronenmikroskopisch und biochemisch erforscht werden sollte.

Der zweite Weg ging über die Targeting- und Funktionsanalyse von *AthPex10p* in Wildtypstämmen und *pex10*-defizienten Mutanten von *Hansenula polymorpha*. Mithilfe von Komplementationsanalysen verschiedener Hybridkonstrukte, bei denen Peptidsequenzen von *AthPEX10* mit nur geringer Homologie durch *HpPEX10* ersetzt wurden und mittels biochemischer Lokalisationsstudien wurde versucht, die Funktion des pflanzlichen Peroxins im heterologen Organismus aufzuklären.

In Arabidopsispflanzen selbst wurde ein zweigeteilter Weg eingeschlagen. Einerseits erfolgte die phänotypische Charakterisierung einer *pex10*-Transposon-Linie mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden und ihre Komplementation mit *PEX10*-cDNA. Andererseits wurden die physiologischen Eigenschaften von *zincfinger-disruption*-Linien un-

tersucht, in denen *PEX10*-cDNA mit dysfunktionellem Zinkfinger-Motiv zuerst kloniert und dann in Wildtyplinien überexprimiert wurde, um die Auswirkungen auf die peroxisomalen Eigenschaften der Pflanzen analysieren zu können.

Die Synthese der Ergebnisse sollen dazu beitragen, neue Einblicke in die Funktion von Pex10p für die Biogenese und die Aufgaben von Peroxinen im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* zu gewinnen und dadurch neue Einsichten in die Gemeinsamkeiten homologer Systeme sehr entfernt verwandter Organismen zu ermöglichen. Das Erkennen evolutiv besonders konservierter Mechanismen würde als Grundlage für die Entstehung eines allgemein gültigen Modells zur Peroxisomen-Biogenese dienen.

## **B. MATERIAL UND METHODEN (allgemeiner Teil)**

### **8 Pflanzen**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ökotypen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* verwendet. Der Ökotyp Columbia (Col) wurde zur Erzeugung einer dysfunktionalen „Zincfinger-disruption“-Mutante eingesetzt und Landsberg erecta (La-er) diente als genetischer Hintergrund zur Untersuchung und Komplementation einer Pex10-Transposon-Linie (*knock-out-line*). Alle Ökotypen sind über das *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) in Ohio, USA erhältlich.

#### **8.1 Anzucht**

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte ausschließlich auf MS-Medium nach Murashige & Skoog (1962), Mikrosalze und Vitamine nach dem B5-Medium von Gamborg *et al.* (1968). Das Nährmedium wurde mit 1% Saccharose angereichert und mit 0,1% MES gepuffert, der pH-Wert mit KOH auf 5,8 eingestellt. Zur Verfestigung wurden 9 g Agar agar pro Liter Medium zugegeben. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden gegebenenfalls Antibiotika als Selektionsmittel zugegeben. Bei Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenz waren dies je 50 µg/ml Medium Endkonzentration. Im Fall von Bialaphos reichten 5 µg/ml für ein effizientes Screening.

Bevor die Samen auf MS-Platten transferiert wurden, erfolgte eine Sterilisierung des Saatguts mit 80% Ethanol plus 0,1% Triton-X 100 für 3x1 Minute und anschließendes Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O für 4x5 Minuten. Falls die Samen direkt nach dem Ernten wieder ausgebracht werden sollten, erfolgte eine 3-tägige Lagerung bei 4°C, um die Samenruhe aufzubrechen.

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte bei 22°C und Dauerlicht von 100 µE\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>. Nach 10-12 Tagen waren die Pflanzen groß genug, um Transgene zuverlässig zu erkennen und diese auf Plastiktöpfe mit Perlit-Einheitserde (Typ T) zu transferieren. Das weitere Wachstum erfolgte in Phytokammern (Conviron, Canada) unter Langtagbedingungen mit 16 h Licht, 65% Luftfeuchtigkeit bei 22°C und 8 h Dunkelheit mit 75% Luftfeuchtigkeit bei 18°C. Unter diesen Bedingungen betrug eine Generationszeit 6-8 Wochen. Bei Pflanzen, die in einer CO<sub>2</sub>-Kammer des Lehrstuhls für Grünlandlehre der Technischen Universität München (Prof. Dr. H. Schnyder) gehalten wurden, ließ sich der Kohlendioxidgehalt mittels einer CO<sub>2</sub>-Flasche auf 1500-1800 ppm einregeln, was in etwa dem 5-fachen Partialdruck des atmosphärischen Wertes entsprach.

## 9 Mikroorganismen

### 9.1 Bakterien

Für die *in Planta*-Transformationen wurde der Stamm C58 von *Agrobacterium tumefaciens* mit dem Ti-Plasmid pGV3850 verwendet (Zambrysky *et al.*, 1983). Für Klonierungen eigneten sich die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  von Promega und M15[pREP4] von Qiagen.

#### 9.1.1 Medien

Die verschiedenen Medien zur Kultivierung der Bakterien sind in Sambrook & Russel (2001) beschrieben.

#### 9.1.2 Allgemeine molekulare Techniken und Protokolle

Molekulare Standard Techniken wie die Durchführung einer PCR, Restriktionsverdau, Ligation, Transformation von *E. coli* oder Agarose-Gelelektrophorese wurden im wesentlichen nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt, SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Laemmli (1970). Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blotting) wurde nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt.

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mithilfe des „Biorad Protein Assay system“ (Biorad GmbH, München) mit BSA als Standard.

##### 9.1.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien von *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter DH5 $\alpha$  Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (1983).

#### Lösungen:

SOB-Medium:	Bactotrypton	2 %	
	Hefeextrakt	0,5 %	
	NaCl	10 mM	
	KCl	2,5 mM	
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	(Zugabe steril nach Autoklavierung)
SOC-Medium:	wie SOB-Medium + 20 mM Glucose		

## B. Material und Methoden (allgemeiner Teil)

---

TB-Lsg.:	Pipes	10 mM	
	CaCl <sub>2</sub>	15 mM	
	KCl	250 mM	(in Bidestwasser lösen und pH 6,7 mit KOH)
	MnCl <sub>2</sub>	55 mM	

→ Steril filtrieren und bei 4°C aufbewahren.

Dimethylsulfoxid: DMSO (Lösungsmittel)

### Durchführung:

- Ansetzen einer Übernachtskultur von DH5 $\alpha$ , 37°C.
- Animpfen von 250 ml SOB-Medium mit 250  $\mu$ l Übernachtskultur und bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wachsen lassen (Dauer ca. 50 h).
- Für 10 min auf Eis stellen.
- Zellen 10 min bei 5000 rpm (Sorvall-GSA Rotor), 4°C abzentrifugieren.
- Zellen in 80 ml eiskalter TB-Lsg. resuspendieren und 10 min auf Eis inkubieren.
- Zellen erneut abzentrifugieren (10 min, 4°C, 5000 rpm).
- Zellen in 20 ml eiskalter TB-Lsg. resuspendieren.
- Unter Rühren langsame Zugabe von DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (1,4 ml DMSO für 20 ml Zellen).
- 10 min auf Eis inkubieren.
- Kompetente Zellen in 210  $\mu$ l Aliquots aufteilen (Eppendorf-Reaktionsgefäß).
- Eppendorf-Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff einfrieren und bei -80°C aufbewahren.

### **9.1.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli***

Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* wurde ein abgewandeltes Protokoll von Inoue *et al.* (1990) verwendet.

- Kompetente Zellen auf Eis auftauen und in Portionen von 50-100  $\mu$ l aufteilen.
- Zugabe der Plasmid-DNA (max. 1/10 des Volumens).
- 30 min Inkubation auf Eis.
- Hitze-Schock: 30 sec., 42°C.
- Anschließend sofort auf Eis transferieren und 2 min inkubieren.
- Zugabe von SOC-Medium bis 1 ml Endvolumen.
- Inkubation auf Schüttler für 1 h, 37°C, 200 rpm.
- Ausplattieren der Zellen auf geeignetem Selektionsmedium (10  $\mu$ l; 100  $\mu$ l; 890  $\mu$ l).
- Inkubation bei 37°C über Nacht.

### 9.1.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem abgewandelten Protokoll von Hattori und Sakaki (1986).

#### Lösungen:

GET:	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris
	⇒pH 8,0 (HCl)	
1% SDS / 0,2 M NaOH:	Aus Stammlösungen frisch ansetzen:	
	1,0 ml	10% SDS
	0,5 ml	4 M NaOH
	8,5 ml	H <sub>2</sub> O
K-Acetat:	3 M	Kaliumacetat
	11,5 %	Eisessig
TE-Puffer:	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	⇒ pH 8,0 (HCl)	
Rnase-Stammlösung :	10 mg/ml	RNase in TE-Puffer lösen
	10 min bei 95°C erhitzen, um DNasen zu zerstören.	
TE-Rnase:	20 µl	RNase in 10 ml TE-Puffer verdünnen
CIA-Lsg. (24:1):	96,0 ml	Chloroform
	4,0 ml	Isoamylalkohol
Ethanol:		Ethanol 96%, vergällt
Phenol, TE-äquilibriert:		käuflich erworben von Roth

#### Durchführung:

- 4 ml LB-Medium + Antibiotikum mit einer Kolonie animpfen und ü.N. bei 37°C und 200 rpm schütteln.
- Zweimal 1,5 ml der Übernachtskultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) abzentrifugieren (2 min, 14.000 rpm), Überstand verwerfen.
- Pellet in 100 µl GET resuspendieren, 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

- 200 µl 1% SDS / 0,2 M NaOH zugeben, vorsichtig mischen und 5 min auf Eis stellen.
- 50 µl eiskaltes Kaliumacetat zugeben, vorsichtig mischen und weitere 5 min auf Eis stellen.
- 10 min bei 14.000 rpm abzentrifugieren, Überstand in ein frisches ERG überführen.
- 500 µl Phenol zugeben, vortexen und 2 min bei RT stehen lassen.
- Zugabe von 200 µl CIA-Lsg., vortexen und 5 min 14.000 rpm zentrifugieren.
- Obere Phase in frisches ERG mit 1 ml Ethanol transferieren, kurz vortexen.
- 10 min bei RT stehen lassen, anschließend 10 min 14.000 rpm zentrifugieren.
- Überstand verwerfen, Pellet in Speed-Vac eintrocknen.
- Pellet in 50-100 µl TE-RNase resuspendieren und Inkubation für 1 h bei 37°C.

### 9.1.2.4 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

Für Transformationen in Pflanzen wurden Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* des Stamms C58pGV3850 verwendet, die Rifampicin (25 µg/ml) als Selektionsmarker besitzen. Elektrokompetente Zellen wurden wie folgt hergestellt:

- Ansetzen einer Übernachtskultur (3 ml LB<sub>Rif25</sub>-Medium), 28°C und 200 rpm.
- Animpfen einer 200 ml Kultur in 1 l Erlenmeyerkolben mit 200 µl der ÜNK, 28°C ü.N.
- Medium in 6 x 30 ml Aliquots unterteilen und 5 min bei 4000 g abzentrifugieren.
- Pellets auf Eis in je 15 ml eiskaltem sterilen MilliQ-Wasser durch sehr sanftes, gelegentliches Schwenken lösen, dabei Schütteln vermeiden. (Lösungsprozess kann bis zu 90 min dauern, wird aber mit jedem weiteren Waschschrift verringert.)
- Zellen bei 4°C, 4000 g, 10-15 min abzentrifugieren.
- Waschschrift noch dreimal wiederholen.
- Nach letzten Waschschrift werden die Pellets in je 1,2 ml 10 % Glycerol gelöst und in 400 ml Aliquots unterteilt.
- Eppendorf-Reaktionsgefäße in flüssigem N<sub>2</sub> einfrieren und bei -80°C aufbewahren.

### 9.1.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente Agrobakterien

Die Elektroporation erfolgte in dem Elektroporationssystem „Easyject plus“ von EquiBio nach dem abgewandelten Protokoll von Meyer *et al.* (1994). Die Elektroporationsküvetten wurden von der Firma pEQLab bezogen.

- Auftauen der elektrokompetenten Zellen auf Eis.
- In vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß 1-2 µl der Plasmid-DNA zu 80 µl Zellen geben.

- Inhalt in gut gekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten (von pEQLab) überführen und kurz runterschleudern.
- Elektroporation durchführen mit 2000 V, 700  $\Omega$ , 25  $\mu$ F und 17,5 msec.
- Rasche Zugabe von 920  $\mu$ l SOC-Medium und Inhalt in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
- Zellen 3 h bei 30°C und 100 rpm schütteln.
- Verdünnungsausstriche auf LB-Platten mit geeigneten Selektionsmarkern durchführen.
- 2-3 Tage Inkubation bei 30°C bis Klone sichtbar werden.

#### 9.1.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*

##### Lösungen:

Siehe Protokoll Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*.

Lysozym-Lsg.: 5 ml GET + Spatelspitze Lysozym

##### Durchführung:

- 4 ml Medium mit Einzelkolonie animpfen und ü.N. bei 30°C, 200 rpm schütteln.
- 2 x 1,5 ml ÜNK in einem Eppendorf-tube abzentrifugieren (30 sec., 14000 rpm), Überstand verwerfen.
- Pellet in 100  $\mu$ l Lysozym-Lsg. resuspendieren, 30 min bei RT inkubieren.
- 200  $\mu$ l 1 % SDS / 0,2 M NaOH zugeben, vorsichtig mischen und 30 min bei RT inkubieren.
- 150  $\mu$ l Kac-Lsg. zugeben, vorsichtig mischen und 5 min auf Eis inkubieren.
- 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren, Überstand in frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
- 500  $\mu$ l Phenol zugeben, mischen und 2 min bei RT inkubieren.
- 200  $\mu$ l CIA zugeben, mischen und 15 min bei 14000 rpm zentrifugieren.
- Obere Phase abnehmen, in 1 ml Ethanol überführen und DNA für 15 min fällen.
- 15 min bei 14000 rpm zentrifugieren, den Ethanol absaugen und Pellet in Speed-Vac trocknen.
- Pellet in 50-100  $\mu$ l TE-Rnase lösen und RNA bei 37°C, 1 h verdauen.

## 9.2 Hefen

Für Komplementationsversuche und Überexprimierung von *AthPex10* in Hefen wurde mit zwei verschiedenen Stämmen von *Hansenula polymorpha* gearbeitet, die von Prof. Dr. M. Veenhuis am Institut für Eukaryotische Mikrobiologie der Universität Groningen (Niederlande) zur Verfügung gestellt wurden. Der Leucin defiziente Wildtyp-Stamm NCYC495<sup>leu<sup>-</sup></sup> (vgl. Gleeson und Sudbery, 1988) diente für Lokalisationsuntersuchungen des überexprimierten *AthPex10* Proteins in biochemischen Untersuchungen. Der *HpPex10*-defiziente Stamm *HpΔPex10B1* mit einer Punktmutation im endogenen *Hansenula PEX10*-Gen wurde für Komplementationsversuche mit *AthPEX10*-cDNA und verschiedenen Hybrid-Konstrukten zwischen *Arabidopsis* und *Hansenula* benutzt.

### 9.2.1 Kultivierung und Lagerung von *Hansenula polymorpha*

Für eine optimale Induktion von Peroxisomen ist eine intensive Voranzucht der Hefen im „Batch-Verfahren“ notwendig. Die Anzucht der *Hansenula*-Stämme erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 37°C und 200 rpm. Um eine gute Belüftung mit Sauerstoff sicherzustellen, sollte nicht mehr als 20% vom Volumen des Erlenmeyerkolbens für das Medium verwendet werden.

Für Vorkulturen einzelner Klone von Agarplatten eignete sich YPD-Medium, dem Glucose als Kohlenstoffquelle im Überschuss beigegeben wurde. Der Nachteil ist eine nur kurze Periode exponentiellen Wachstums. Zur Lagerung auf Agarplatten bis zu 10 Wochen wurde YND-Medium benutzt, dem vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar zugesetzt wurde. Zur Langzeitlagerung wurden Glycerinkulturen angelegt, die aus 800 µl einer YND-Übernachtskultur und 300 µl steril filtriertem Glycerin (87%) bestanden.

Für biochemische (Zellfraktionierungen) und ultrastrukturelle (EM) Experimente wurde Mineralmedium mit limitierter Kohlenstoffquelle verwendet. Für Experimente mit dem Leucin auxotrophen Wildtyp-Stamm NCYC495 war die Zugabe von 30 µg/ml 1-Leucin zum Mineralmedium notwendig. Als Kohlenstoffquelle wurde für Vorkulturen Glucose zugegeben, zur Induktion von Peroxisomen, abhängig vom benutzten Stamm, Glycerol und Methanol in geeigneten Konzentrationen und Mischungsverhältnissen beigegeben. Die Induktion von Peroxisomen kann sowohl auf Flüssigmedium auf einem Rotationsschüttler, als auch auf Agarplatten im Brutschrank erfolgen.

<u>Medien und Lösungen:</u>		alle Angaben <i>ad</i> 1 Liter <i>Aqua bidest</i>
YPD-Medium:	10 g	Hefeextrakt
	10 g	Bacto-Pepton
	10 g	Glucose
		→ autoklavieren, bei RT aufbewahren.
YND-Medium:	6,7 g	Yeast Nitrogen Base*
		* Yeast Nitrogen Base (DIFCO); ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat
	10,0 g	Glucose
		→ autoklavieren, bei RT aufbewahren.
Mineralmedium:	2,5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,2 g	MgSO <sub>4</sub>
	0,7 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3,0 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,5 g	Hefeextrakt
	1,0 ml	Vishniac-Lösung (1.000-fach)
		→ autoklavieren
	1,0 ml	Vitamin-Lösung (1.000-fach)
	10 ml	Leucin (100-fach)
		→ <b>Zugabe der Kohlenstoffquelle richtet sich nach dem Versuchsprotokoll.</b>
Vishniac-Lösung: (1.000-fach)	10,0 g	EDTA (Titriplex-III)
	4,40 g	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
		→ Lösen und pH 6,0 mit NaOH einstellen.
	1,01 g	MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O
	0,32 g	CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O
	0,315 g	CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O
	0,22 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O
	1,47 g	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
	1,0 g	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
		→ pH 4,0 mit HCl einstellen.
		→ Autoklavieren und bei 4°C dunkel aufbewahren. Frische Lösung besitzt eine grünliche Farbe, die später pinkfarben wird.

## B. Material und Methoden (allgemeiner Teil)

---

Vitamin-Lösung: (1.000-fach)	20 mg	D-Biotin
	→	20 mg Biotin in 20 ml 0,1 N NaOH lösen, Zugabe von 950 ml 20 mM KPi-Puffer (pH 7,5). 600 mg Thiamin
Leucin-Lösung: (100-fach)	3 mg	Leucin (steril filtrieren)

### 9.2.2 Präparation von elektrokompetenten *H. polymorpha*-Zellen

Für die Elektrotransformationen wurden kompetente Zellen von *H. polymorpha* entweder frisch hergestellt oder in Form von 60 µl Aliquots, die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden können, verwendet.

#### Lösungen:

KP <sub>i</sub> -Puffer:	50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	→	pH 7,5 mit KOH einstellen.
	→	autoklavieren
Tris-Stammlösung: (100-fach)	1 M	Tris-HCl (pH 8,0)
	→	autoklavieren
Magnesiumchlorid: (100-fach)	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	→	autoklavieren
STM-Puffer:	270 mM	Saccharose
	→	vorsichtig autoklavieren (121°C nicht überschreiten).
	10 mM	Tris
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>

#### Durchführung:

- 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie von einer frischen YPD-Platte animpfen und ü.N. bei 37°C und 200 rpm schütteln.
- 100 ml vorgewärmtes YPD-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur animpfen und bei 37°C schütteln, bis eine OD<sub>663</sub> von 1,2- 1,5 erreicht ist (ca. 5-6 Stunden).
- Zentrifugation bei 4.000 rpm, RT, 5 min (Beckman JA10).
- Zellpellet in 25 ml KP<sub>i</sub>-Puffer mit 25 mM DTT resuspendieren.
- 15 min, 37°C sanft schütteln.
- Abernten der Zellen bei 4°C, 4.000 rpm für 5 min (Beckman JA10).

- Vorsichtige Resuspension des Zellpellets mit 100 ml eiskaltem STM-Puffer und erneute Zentrifugation bei 4°C, 4.000rpm, 5 min.
- Pellet in 50 ml eiskaltem STM-Puffer vorsichtig waschen, erneut abzentrifugieren.
- Pellet in 500 µl eiskaltem STM-Puffer aufnehmen. Die kompetenten Zellen sind nun zur Transformation bereit und sollten entweder sofort eingesetzt werden oder in 60 µl Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt werden.

### 9.2.3 Elektrotransformation von *H. polymorpha*

- 60 µl kompetente Zellen auf Eis mit 1-4 µl zuvor linearisierter Plasmid DNA mischen und in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (pEQLab) geben.
- Transformation der Zellen mit einem Puls 500 V, 5 msec (BTX ElectroSquarePorator).
- Unmittelbar nach dem Puls Zugabe von 940 µl YPD-Medium (RT) und Überführen des Küvetteninhalts in ein 2,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.
- Regeneration der Zellen bei 37°C und 200 rpm für 1 h.
- Zellen in Eppendorfcentrifuge mit 6.000 rpm, 1 min abzentrifugieren.
- 1%, 10% und 89% der Zellen als Verdünnungsausstriche auf YPD-Platten mit Zeocin (100 mg/l) als Selektionsmarker ausbringen.
- Inkubation der Platten bei 37°C für 3-4 Tage bis ein Screening positiver Transformanten möglich ist.

### 9.2.4 Wachstum und Induktion von *AthPex10p* und seiner Hybrid-Konstrukte

Für eine optimale Induktion von Peroxisomen ist zuerst eine extensive Vorkultivierung der Hefe-Stämme notwendig. Hierzu wird möglichst viel Material, also nicht nur eine einzelne Kolonie einer Kulturplatte, in 20 ml Mineralmedium (MM) + 0,5% steril filtrierte Glucose als Kohlenstoffquelle überführt. Unter optimalen Bedingungen bei 37°C und 200 rpm würden die Zellen solange exponentiell wachsen bis ihre Kohlenstoffquelle aufgebraucht ist. Bei einer  $OD_{663} \leq 2$ , die der späten exponentiellen Wachstumsphase entspricht, werden die Zellen in frisches vorgewärmtes Medium auf eine Ausgangs-OD von 0,1 verdünnt. Diese Vorkultivierung erfolgt noch weitere zweimal, bis die Zellen im Wachstum eine Verdopplungszeit von einer Stunde auf Glucose erreichen.

Zur Induktion von Peroxisomen werden die Zellen in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD zwischen 1,2 und 1,5 geerntet und entweder auf Mineralmedium mit steril filtriertem Glycerol / Methanol (0,1 / 0,5%) auf ihre Anfangs-OD überführt (im

Fall von  $\Delta pex10Hp\beta B1$ ) oder beim Wildtyp-Stamm ausschließlich auf 0,4% Methanol. Die Verdopplungszeit auf Methanol beträgt für Wildtypzellen etwa 4,0 h. Die Zellen können somit bei einer OD von 1,5 nach ca. 15 Stunden Wachstum über Nacht für weitere Untersuchungen abgeerntet werden. Falls die Verdopplungszeit von 4,0 h für den Wildtypstamm nicht erreicht werden konnte, wurde die Präkultivierungsphase auf Glucose verlängert und erneut methanolinduziert.

## 10 Plasmid-Vektoren

In Tabelle B1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für Klonierungen, Transformationen und Transfektionen zum Überblick aufgelistet.

Vektor	Referenz	Promotor	Beschreibung	Anwendung
pBI 121	Jefferson, 1987	P35-S	Binärer Vektor für Agrobakterien	Konstruktion einer dZn-Linie
pQE-60	Qiagen, Hilden	PT5	Expressionsvektor	Expression eines 6xHis-Tag-Proteins
pET4	Tan <i>et al.</i> , 1995	Pmox	Klonierungsvektor für <i>HpPEX10</i>	Transformation von <i>HpPEX10</i>
pHIPZ4	Salomons <i>et al.</i> , 2000	Paox	Zeocin-Resistenz, P <sub>AOX</sub>	Expression von <i>PEX10</i> -Konstrukten in <i>H. polymorpha</i>
pSKAscI35SS1GFP	Hoffmann, 2001	35SS1	Helferplasmid Promotorlieferant	Komplementation von <i>Athpex10</i> -k.o. mit <i>AthPEX10</i> bzw. <i>dZnpex10</i>
pBIAscIBAR	Christmann, TU-München, unveröffentlicht		Expressionsvektor pBI121 mit Basta-Resistenz statt Kan <sup>®</sup>	

**Tab. B1:** Liste der Vektoren und ihre Anwendungen.

## 11 Enzyme

Alle in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme stammten von MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland oder Roche GmbH, Mannheim, Deutschland. Bei Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) für Klonierungen wurde „*proof-reading*“ Vent-Polymerase von „New England Biolab“ benutzt und Pwo-Polymerase (von peQLab), da diese gegenüber der preiswerteren Taq-Polymerase (MBI Fermentas) eine bis 15-fach niedrigere Fehlerrate besitzen. T4-Ligase und Klenow-Fragment Polymerase wurde ebenfalls von MBI Fermentas bezogen. Lysozym stammt von Fluka Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen.

## 12 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden entweder bei MWG Biotech AG, Deutschland oder Toplab, Martinsried, Deutschland in Auftrag gegeben.

Eine Liste der Primer-Nukleotidsequenzen und ihre Verwendung gibt Tab. B2 wieder.

Primerpaar	Name	Sequenz 5'-3'	Anwendung
1	<i>AthPex10-6xHis-Sense</i>	-AAA <u>CCA TGG</u> GGC TTA ATG GGG ATT CGG GTC CG-	Erzeugung eines 6xHis-tags zur Antigen-Produktion
	<i>AthPex10-6xHis-Antisense</i>	-TTG <u>GGA TCC</u> AAA ATC AGA ATG ATA CAA ACA-	
2	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	Greift im Intron des <i>Ath</i> -Genoms „downstream“ des Transposons
	<i>AthPex10-Intron-Antisense</i>	-GAC AAT TAT ATC AAT ATC AGC GG-	
3	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	Greift im Exon des <i>Ath</i> -Genoms, „downstream“ des Transposons
	<i>AthPex10-ExonV-Antisense</i>	-CAC AGG CCA TCG CTG AAT AG-	
4	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	Würde Transposon-überspannend greifen, testet Richtung der T-Insertion
	<i>AthPex10-Ds5'-Antisense</i>	-ACG GTC GGG AAA CTA GCT CTA C-	
5	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	Greift Transposon-überspannend, testet Richtung der T-Insertion
	<i>AthPex10-Ds3'-Antisense</i>	-GGT TCC CGT CCG ATT TCG ACT-	
6	<i>Ath-dZINC-Sense</i>	-GGT GGT CTT GTG TTT GGT TGG AGC GGT ATT ATG GAA TGG TGC-	Erzeugung einer Zincfinger-„disruption“-Linie in <i>Arabidopsis</i>
	<i>Ath-dZINC-Antisense</i>	-ACC GCT CCA ACC AAA CAC AAG ACC ACC AGG AGT GGC CGT TGG-	
7	<i>AthPex10-pBI-Sense</i>	-AAG <u>GAT CCA TGA</u> GGC TTA ATG GGG ATT CG-	Klonierung von <i>AthPEX10</i> in binären Vektor pBI121
	<i>AthPex10-pBI-Antisense</i>	-TTG <u>AGC TCG</u> TCT TGT AAT AGA TCT CCA AT-	
8	<i>Ath-rbc-Sense</i>	-ATG GCT TCC TCT ATG CTC-	Kontroll-PCR für genomische DNA-Isolierung
	<i>Ath-rbc-Antisense</i>	-CGG TGA AGC TTG GGG GCT-	
9	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	Klonierung von <i>AthPEX10</i> in Expressionsvektor pHIPZ4
	<i>AthPex10-AS3-Antisense</i>	-CAT <u>GTC GAC TAA</u> AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-	
10	<i>HpPex10C2-Sense</i>	-GGC <b>ATG</b> TTT AAG CTT TTG TCT TTT GCA GCT CAG CCG GAG ATT ATG-	Klonierung des Hybridkonstrukts HK1 in pHIPZ4
	<i>AthPex10AS3-Antisense</i>	-CAT <u>GTC GAC TAA</u> AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-	
11a	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	PCR A; Klonierung des Hybridkonstrukts HK2 in pHIPZ4
	<i>HpPex10C3AS-Antisense</i>	-TCC GGA AAC CAG TTG TGC TAG CCG GAC TGC TTG CGT AGC AGC TCG AGT-	
11b	<i>HpPex10C3S-Sense</i>	-CGG CTA GCA CAA CTG GTT TCC GGA GTA TCT AGG TTA AAC GAT AGA CTT-	PCR B; Klonierung des Hybridkonstrukts HK2 in pHIPZ4
	<i>AthPex10AS3-Antisense</i>	-CAT <u>GTC GAC TAA</u> AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-	
12a	<i>AthPex10-S3-Sense</i>	<b>-ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	PCR A; Klonierung des Hybridkonstrukts HK3 in pHIPZ4
	<i>HpPex10C5AS-Antisense</i>	-CAG ATG GAG ATT CAA AAG ATC CAT CAC GTT TAA CCT AGA TAC TAC AGA-	

## B. Material und Methoden (allgemeiner Teil)

Primerpaar	Name	Sequenz 5'-3'	Anwendung
12b	<i>HpPex10C5S</i> -Sense	-GAT CTT TTG AAT CTC CAT CTG GCG CTC TTC TAC TTT GAA GGT TTT TAT-	PCR B; Klonierung des Hybridkonstrukts HK3 in pHIPZ4
	<i>AthPex10AS3</i> -Antisense	CAT <u>GTC GAC</u> TAA AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-	
13a	<i>AthPex10-S3</i> -Sense	- <b>ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	PCR A; Klonierung des Hybridkonstrukts HK4 in pHIPZ4
	<i>HpPex10C6AS</i> -Antisense	-CAC GGT CTT GGT GGC CCC CCA CAG CCG ACG CAA GCC CTC AGC AGC AAG-	
13b	<i>HpPex10C6S</i> -Sense	-CTT GCT GCT GAG GGC TTG CGT CGG CTG TGG GGG GCC ACC AAG ACC GTG-	PCR B Klonierung des Hybridkonstrukts HK4 in pHIPZ4
	<i>HpPex10AS</i> -Antisense	- <u>ATT CTA GAT</u> TAT CGT AGA GGC AAC AG-	
13c	<i>AthPex10-S3</i> -Sense	- <b>ATG</b> AGG CTT AAT GGG GAT TCG-	PCR C; Klonierung des Hybridkonstrukts HK4 in pHIPZ4
	<i>HpPex10-AS</i> -Antisense	- <u>ATT CTA GAT</u> TAT CGT AGA GGC AAC AG-	
14	<i>AthPex7-S</i> -Sense	-ATA AGA ACA GTT AAG GTT TGG GAT G-	Herstellung einer DIG-markierten Pex7-Sonde
	<i>AthPex7-AS2</i> -Antisense	-ATC TAT CTA CTA TTA CCA TCA ATC A-	
15	<i>AthPex10-S2</i> -Sense	(5'-TAC AAC TGG TTT TGC GTG CCA ATC TGA-3')	Herstellung einer DIG-markierten Pex10-Sonde
	<i>AthPex10-AS2</i> -Antisense	- <b>CTA</b> AAA ATC AGA ATG ATA CAA ACA AAC-	
16	<i>Pex10fwd1</i> -Sense	-GAA ATG CAC TCT CTG CTT AAG CAC-	Transkriptanalyse verschiedener dZn-Linien
	<i>Pex10rev2</i> -Antisense	-ATG CAC TGT CCT TAG GTG TCA CTG-	
17	N78-Sense	-GAG CCT TAC AAC GCT ACT CTG TCT GTC-	β-Tubulin Primer zur Kontrolle der Transkriptanalyse
	N79-Antisense	-ACA CCA GAC ATA GTA GCA GAA ATC AAG-	
18	35Sfwd-Sense	-ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C-	Kontroll-PCR für genomische DNA-Isolierung für dZn-Konstrukt
	<i>AthPex10-pBI</i> -Antisense	- <u>TTG AGC TCG</u> TCT TGT AAT AGA TCT CCA AT-	

**Tab. B2:** Auflistung der verwendeten Primer in dieser Untersuchung. Fettgedruckt ist ein Start- oder Stopcodon wiedergegeben. Eine Restriktionsschnittstelle wird durch die Unterstreichung der betreffenden Nukleotide angezeigt.

## 13 Chemikalien

Sämtliche Feinchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Herstellern Fluka/Sigma in Taufkirchen und Serva in Heidelberg, beide Deutschland bezogen. Das Antibiotikum Bialaphos® stammte von Shinyo Sangyo Co., Ltd, in Tokyo, Japan und Zeocin® von Invitrogen in Groningen, Niederlande.

## **B. MATERIAL UND METHODEN (spezieller Teil)**

### **14 Klonierung von *PEX10* aus *Arabidopsis thaliana***

Um den Charakter von Membranproteinen untersuchen zu können, die zur Import-Maschinerie peroxisomaler Matrixproteine gehören, wurde zunächst die cDNA von *PEX10* aus *Arabidopsis thaliana* geklont.

#### **14.1 Sequenzhomologien von Pex10p in *Arabidopsis*, Mensch und Hefe**

Mit Pex10-DNA-Sequenzen aus *Homo sapiens* und *Hansenula polymorpha* wurde die NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*) nach entsprechenden Homologien im Genom von *Arabidopsis thaliana* abgefragt. Eine genomische Sequenz mit teils identischen Regionen und Bereichen hoher Ähnlichkeit wurde auf dem Chromosom II, BAC Klon T9J22 identifiziert.

#### **14.2 Abfrage von EST-Datenbanken nach der cDNA von *AthPEX10***

Mithilfe eines Vergleichs der Sequenzhomologien und des daraus resultierenden putativen *PEX10* in *Arabidopsis thaliana* wurde eine Datenbankabfrage für cDNAs in *Arabidopsis* ESTs (Expressed Sequence Tag) durchgeführt. In der Folge konnte ein EST (GenBank Acc. [T21552](#); cDNA clone Id. 94N21T7) identifiziert werden, der die Volllänge der cDNA von *AthPEX10* enthält. Die Sequenzanalyse des Klons ergab allerdings eine unkorrekt gespleißte mRNA.

#### **14.3 Herstellung einer Digoxigenin markierten *AthPEX10*-Sonde**

Um eine  $\lambda$ -PRL2 cDNA-Bibliothek von ABRC nach dem korrekten Vollängenklon von *Arabidopsis-PEX10* screenen zu können, wurde ein C-terminaler 533bp Abschnitt aus dem EST amplifiziert und mit Digoxigenin markiert als Sonde für die Detektion von *PEX10* verwendet.

##### **14.3.1 Durchführung der DIG-PCR**

Mithilfe der beiden Primer *AthPex10*-S2-Sense (5'-TAC AAC TGG TTT TGC GTG CCA ATC TGA-3') und *AthPex10*-AS2-Antisense (5'-CTA AAA ATC AGA ATG ATA CAA

ACA AAC-3') wurde mit EST T21552 als Template und Digoxigenin markierten Nucleotiden eine PCR durchgeführt. Diese DIG-dNTP's werden in die Sonde eingebaut und mit enzymgekoppelten Antikörpern gegen Digoxigenin nachgewiesen. Amplifiziert wurde somit ein 533bp langes Fragment der cDNA von *AthPEX10* von etwa der Mitte des Gens bis zum Stopcodon am C-Terminus. Zur Markierung wurde das „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ von Boehringer verwendet.

### 14.3.2 Bestimmung der Sondenkonzentration durch Dot Blot

Um die DNA-Konzentration der *PEX10*-Sonde abschätzen zu können, wurde sie zusammen mit einer Vergleichsprobe bekannter Konzentration in verschiedenen Verdünnungsstufen auf eine Nylonmembran aufgetragen und immunologisch detektiert. Die ursprüngliche Konzentration der Vergleichsprobe von Roche beträgt 20 ng/μl. Diese wird in Verdünnungsstufen von 1ng/μl bis 1pg/μl in Schritten von 1:10 hergestellt. Analoge Verdünnungen verwendet man für das PCR-Produkt der Sondenlösung.

#### ***Dot Blot auf Nylonmembran:***

- Zwei Lagen Whatman-Papier und die Nylonmembran kurz in H<sub>2</sub>O wässern.
- Die Vakuumkammer zuerst mit den beiden Lagen Whatman-Papier, dann mit der Nylonmembran möglichst luftblasenfrei belegen.
- Vakuumgerät für 5 min mit 100 mbar anschalten.
- Vakuumgerät abschalten und je 3 μl der Verdünnungen in die Probelöcher pipettieren.
- Weitere 5 min Unterdruck mit 100 mbar anlegen.
- Membran entnehmen und trocknen lassen.
- Für 2 min Cross-link unter UV-Bestrahlung durchführen, zur Fixierung der DNA auf der Membran.

#### ***Immunologische Detektion:***

##### Lösungen:

Maleinsäurepuffer:            11,6 g Maleinsäure  
(pH 8,0)                        8,8 g NaCl  
                                      8,0 g NaOH

Blocking-Reagenz:            Maleinsäurepuffer + 1% Blocking-Reagenz (Boehringer)

AP-Puffer:                      0,1 M NaCl  
(pH 9,5)                        5 mM MgCl  
                                      0,1 M Tris

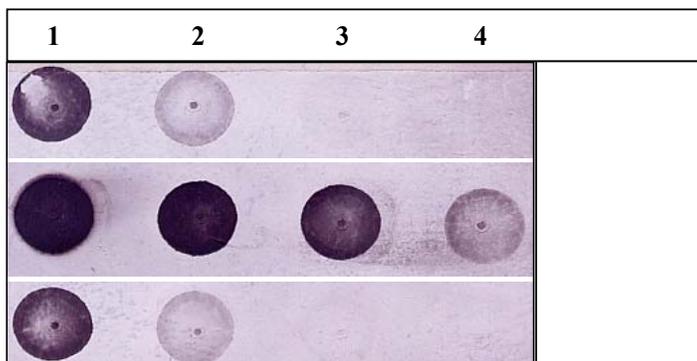
NBT: 50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid

BCIP: 50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid

Durchführung:

- Membran in Petrischale überführen und kurz mit Maleinsäurepuffer waschen.
- Puffer dekantieren und 30 min in Blocking-Reagenz schwenken.
- Zugabe von DIG-Antikörper für 30 min (Anti-Digoxigenin-AP, Boehringer, 1: 5.000).
- 2 x 15 min mit Maleinsäurepuffer waschen.
- Kurz mit AP-Puffer waschen.
- Inkubation im Färbereagenz: 25 ml AP-Puffer + 125 µl NBT + 100 µl BCIP ruhig und lichtgeschützt stehen lassen, bis sich die Färbung ausreichend entwickelt hat.
- Membran mit Wasser spülen und trocknen, lichtgeschützt aufbewahren.

Den Dot Blot der immunologisch detektierten *AthPEX10*-Sonde mit zwei Reihen Kontrolldots bekannter DNA-Konzentrationen zeigt Abb. B1. Schätzt man die Intensitäten der Dots ab, so liegt die *PEX10*-Sonde etwa 500-fach konzentrierter vor als die obere und untere Reihe der Kontroll-DNA.



**Abb. B1:** Dot Blot zur Berechnung der Konzentration einer *AthPEX10*-Sonde. Obere und untere Reihe sind die Verdünnungen einer Kontroll-DNA von Roche, auf die sich die Verdünnungen 1-4 beziehen. 1: 1ng/µl; 2: 100pg/µl; 3: 10pg/µl; 4: 1pg/µl Kontroll-DNA.

Die Konzentration der *PEX10*-Sonde liegt somit in der Größenordnung von etwa 500 ng/µl und kann nun zum Screening der cDNA-Bibliothek eingesetzt werden.

**14.4 Screening der λ-ZipLox Bibliothek nach dem Vollängenklon von *AthPEX10***

Bei der CD4-7/λ-PRL2 Phagen Bibliothek handelt es sich um cDNA von einer Ansammlung gleicher Mengen isolierter mRNA verschiedensten Gewebes von Wildtyp-Pflanzen aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia), die das ABRC vertreibt und von D'Alessio *et al.* (1992) beschrieben wurde. Die amplifizierte Bibliothek stammt ursprünglich von 200.000 Primär-Transformanten mit Insertionsgrößen zwischen 400 und 2.000 Basen.

Da es sich um eine gerichtet klonierte cDNA handelt, liegen die linearen Inserts zwischen den beiden  $\lambda$ -Armen, die eine *Sall* und *NotI*-Schnittstelle besitzen. Damit läßt sich das pZL1 Plasmid, das die cDNA Insertion enthält, später excisieren.

### 14.4.1 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

In der Regel wird die cDNA-Bibliothek einmal amplifiziert, um eine grössere Arbeitsmenge zu erhalten. Mehr als eine Amplifikationsrunde ist jedoch nicht empfehlenswert, da langsamer wachsende Klone sonst zu stark unterrepräsentiert sein können.

Phagen werden kultiviert, indem sie zusammen mit Wirtsbakterien ausplattiert werden. Während einer mehrstündigen Inkubation bei 37°C bildet sich ein Bakterienrasen mit *plaque forming units* (pfu), die aus jeweils einem einzelnen Phagen durch lytische Vermehrung entstehen.

#### Lösungen:

NZY-Medium:                    10 g    Bacto-Trypton  
(pH 7,5 mit NaOH)            5 g    Hefeextrakt  
    5 g    NaCl  
    2 g    MgSO<sub>4</sub>  
    ad 1 Liter H<sub>2</sub>O  
    → Zur Herstellung von Agarplatten, Zugabe von 15 g/l Bacto Agar.  
    → autoklavieren

LB-Medium:                    10 g    Trypton  
(pH 7,5)                        5 g    Hefeextrakt  
    10 g    NaCl  
    ad 1 Liter H<sub>2</sub>O  
    → Zur Herstellung von Agarplatten, Zugabe von 15 g/l Bacto Agar.  
    → autoklavieren

SM-Puffer:                    100 mM    NaCl  
    10 mM    MgSO<sub>4</sub>  
    50 mM    Tris-HCl

Topagarose:                    0,7 % Agarose in NZY-Medium aufkochen. Nach dem Lösen im Wasserbad bei 50°C temperieren.

Maltose-Lsg.:                    20 % Stamm-Lsg., steril filtrieren; 1:100 verwenden.

MgSO<sub>4</sub>-Lsg.:                    1 M Stamm-Lsg., steril filtrieren; 1:100 verwenden.

Durchführung:

- Übernachtkultur von Wirtsbakterium *E. coli* Y1090 in 4 ml LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub> ansetzen und bei 200 rpm, 37°C schütteln.
- 25 ml LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 0,2 % Maltose mit 250 µl der Übernachtkultur animpfen, 200 rpm, 37°C und bis zur OD<sub>600</sub> ~0,5 wachsen lassen.
- Inzwischen 8 große NZY-Agarplatten auf 37°C vorwärmen; 100 ml Topagarose vorbereiten (pro großer Petrischale 8 ml).
- CD4-7-Phagen von -80°C auftauen und ursprünglichen Phagentiter mit Verdünnungen von SM-Puffer auf 50.000 pfu / 25 µl runterverdünnen.
- In 8 sterilen Glasröhrchen je 600 µl der Wirtszellen mit 25 µl (50.000 pfu) der Phagenlösung für 15 min bei 37°C und 100 rpm inkubieren.
- Je 8 ml der Topagarose auf die Bakterien/Phagen-Mischung pipettieren, auf die vorgewärmten NZY-Platten giessen und fest werden lassen.
- Inkubation für 6-8 h bei 37°C bis zur konfluenten Lyse der Bakterien.
- Sobald die Plaques max. 2 mm groß sind, werden die Platten mit je 10 ml SM-Puffer überschichtet, mit Parafilm gegen Austrocknen geschützt und bei 4°C ü.N. leicht geschwenkt.
- SM-Puffer aller 8 Platten in 100 ml Erlenmeyerkolben dekantieren und jede Platte mit 2 ml SM-Puffer spülen.
- Zugabe von Chloroform bis 5 % Endkonzentration zur Phagenlösung und mischen, 15 min bei RT stehen lassen, damit Bakterien abgetötet werden.
- Chloroformfreier Überstand in neuen Erlenmeyerkolben dekantieren.
- Zellbestandteile für 10 min bei 2.000 g abzentrifugieren.
- Überstand mit 0,3 % Chloroform versetzen.
- Zugabe von 7 % DMSO und Aliquotierungen zu jeweils 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße.
- Aufbewahrung bei -80°C.

Zur erneuten Titerbestimmung der Phagenlösung werden wieder Verdünnungsreihen hergestellt und ausplattiert. Die pfu-Einheiten können ausgezählt und die Konzentration pro ml berechnet werden. Der Phagentiter der amplifizierten cDNA-Bank betrug 10<sup>6</sup> pfu/ml.

#### **14.4.2 Screening einer cDNA-Bibliothek mithilfe der *AthPEX10*-Sonde**

Im ersten Schritt eines Phagenscreenings werden die Phagen sehr dicht auf große Agarplatten ausplattiert, um möglichst zahlreiche Klone testen zu können. In darauffolgenden

Schritten werden positive Klone in geringeren Dichten ausplattiert und solange vereinzelt, bis sie als „*single plaques*“ isoliert werden können.

### ***Kultivierung der Phagen in Y1090:***

- Übernachtskultur von Wirtsbakterium *E. coli* Y1090 in 4 ml LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub> ansetzen und bei 200 rpm, 37°C schütteln.
- 25 ml LB-Medium + 10 mM MgSO<sub>4</sub> + 0,2 % Maltose mit 250 µl der Übernachtskultur animpfen, 200 rpm, 37°C und bis zur OD<sub>600</sub> ~0,5 wachsen lassen (Dauer ca. 3h).
- Zwischenzeitlich 7 große NZY-Agarplatten auf 37°C vorwärmen; 100 ml Topagarose vorbereiten (pro großer Petrischale 8 ml).
- CD4-7-Phagen mit einem ermittelten Titer von 10<sup>6</sup> pfu/ml von -80°C auftauen.
- In 7 sterilen Glasröhrchen je 600 µl von Y1090 mit 50 µl (50.000 pfu) der Phagenlösung für 15 min bei 37°C und 100 rpm inkubieren.
- Je 8 ml der auf 50°C vorgewärmten 0,7% Topagarose auf die Bakterien/Phagen-Mischung pipettieren, auf die vorgewärmten NZY-Platten giessen und fest werden lassen.
- Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C.

Um mit der DNA-Sonde hybridisierende Klone detektieren zu können, wird Phagen-DNA von den Plaques der Agarplatten auf Nitrocellulosefilter von Schleicher & Schuell (PROTRAN BA85, 0.45 µm, Ø 82 mm, bzw. 132 mm) übertragen.

Beim ersten Screening der Bibliothek werden zwei Abdrücke pro Platte zum Ausschluss unspezifischer Signale abgenommen. Der erste Abdruck erfolgt für 2 min, der zweite Abdruck für 4 min – beim Rescreening ist ein Abdruck für 2 min ausreichend. Vor dem Transfer der Phagen auf Nitrocellulosemembranen werden die Agarplatten für 1-2 h bei 4°C aufbewahrt, damit der Topagar fester wird und sich beim Überführen auf die Membranen nicht ablösen kann.

### Lösungen:

20 x SSC:	3 M	NaCl
(pH 7,0)	0,3 M	Natriumcitrat

→ Durch Verdünnung wird 5 x SSC etc. hergestellt.

Prähybridisierungslösung:	5 x	SSC
	0,1 %	N-Lauroylsarcosin
	0,02 %	SDS
	0,5 %	Blocking-Reagenz (durch Aufkochen lösen)

→ Lösung frisch zubereiten oder bei -20°C lagern;

AP-Puffer:	0,1 M	NaCl
(pH 9,5)	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1 M	Tris
Denaturierungspuffer:	1,5 M	NaCl
	0,5 N	NaOH
Neutralisierungspuffer:	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCL (pH 7,4)
Äquilibrierungspuffer :	2 x SSC	
	300 mM	NaCl
	30 mM	Natriumcitrat (pH 7,0)

***Transfer der Phagen-DNA auf Nitrocellulosefilter:***

- Trockene Nitrocellulosemembran luftblasenfrei auf vorgekühlte Agarplatte aufsetzen und Membran dabei nicht mehr verrutschen.
- Mit einer Kanülnadel zur Lagemarkierung der Membran dreimal asymmetrisch am Rand durch Membran und Agar stechen.
- Drei Wannenbehälter mit je drei Lagen Whatman-Papier auslegen (Chromatographie Papier Whatman 3MM Chr) und mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und Äquilibrierungspuffer tränken.
- Die Nitrocellulosefilter nacheinander für jeweils 5 min mit der vorher dem Topagar zugewandten Seite nach oben auf die Serie von Whatman-Papier legen.
- Nach der Äquilibrierung werden die Membranen auf Whatman-Papier an der Luft getrocknet und anschließend zur Fixierung der DNA auf den Membranen 2 h bei 80°C gebacken.

***Hybridisierung:***

- Filter nach dem Backen in Prähybridisierungslösung eintauchen und anschließend in Hybridisierungsröhren transferieren, möglichst ohne Überlappung. Die DNA-Seite liegt innen, der Lösung zugewandt (ca. 40 ml Prähybridisierungslösung pro Röhre).
- Prähybridisierung für 3 h bei 60°C im Hybridisierungsofen (alle unbedeckten Stellen der Membran werden durch Blocking-Reagenz abgesättigt).
- Herstellung der Sondenlösung mit 100 ml Prähybridisierungspuffer + 5 µl der *PEX10*-Sonde (Stammkonzentration der Sonde 500 ng/µl; Arbeitskonzentration der Sondenlösung 25 ng/ml). Anschließend 10 min Denaturierung bei 100°C.

## B. Material und Methoden (spezieller Teil)

---

- Dekantierung der Prähybridisierungslösung und Hybridisierung mit jeweils 10-12 ml Sondenlösung über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen.

### ***Waschen:***

Beim Waschen wird überschüssige und unspezifisch gebundene Sondenlösung entfernt. Die Sonde kann bei -20°C eingefroren werden und ist für ein Rescreening erneut benutzbar. Ihre Spezifität kann durch die Stringenz der Waschbedingungen, wie Salzgehalt und Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall wurde eine hohe Stringenz gewählt, d.h. niedriger Salzgehalt und hohe Temperatur.

- Sondenlösung bei -20°C einfrieren und Membranen 2 x 15 min mit 2 x SSC (auf 60°C vorgewärmt) im Hybridisierungssofen waschen.
- Membranen 2 x 15 min mit 0,1 x SSC wie oben waschen.

### ***Immunologische Detektion:***

#### Lösungen:

Maleinsäurepuffer:	11,6 g	Maleinsäure
(pH 8,0)	8,8 g	NaCl
	8,0 g	NaOH

Blocking-Reagenz: Maleinsäurepuffer + 1% Blocking-Reagenz (Boehringer)

AP-puffer:	0,1 M	NaCl
(pH 9,5)	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1 M	Tris

NBT: 50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid

BCIP: 50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid

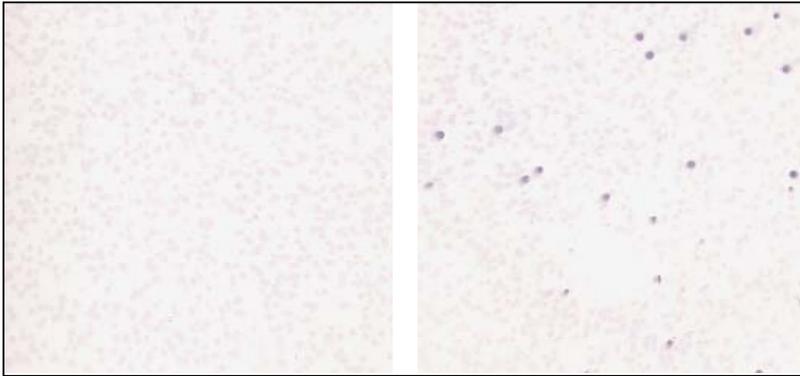
SM-Puffer:	100 mM	NaCl
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	50 mM	Tris-HCl

#### Durchführung:

- Die 14 Membranfilter mit DNA-Seite nach oben in 14 Petrischalen mit Maleinsäurepuffer legen und 5 min waschen.
- 30 min Schwenken in Maleinsäurepuffer + 1% Blocking-Reagenz.
- 30 min Schwenken in Maleinsäurepuffer + 1% Blocking-Reagenz + DIG-Antikörper

(Anti-Digoxigenin-AP, Boehringer, 1: 5.000). AK-Lösung kann mit 0,02%  $\text{NaN}_3$  versetzt und bei 4°C aufbewahrt werden.

- 2 x 15 min mit Maleinsäurepuffer waschen.
- 5 min mit AP-Puffer waschen.
- Inkubation im Färbereagenz: 250 ml AP-Puffer + 1,25 ml NBT + 1 ml BCIP ruhig und lichtgeschützt stehen lassen, bis sich die Färbung ausreichend entwickelt hat (vgl. Abbildung B2).



**Abb. B2:** Immunoblot eines Primärphagenscreenings mit einer DIG-markierten Sonde gegen *AthPEX10*; das linke Bild zeigt ein ausschliesslich negatives Phagenscreening, das rechte Bild enthält auch positive dunkle Plaques.

#### ***Isolierung positiver Phagenplaques:***

- Stabile Klarsichtfolie auf die nummerierten Rundfilter legen und mit einem Stift alle Markierungen sowie die positiven Plaques anzeichnen. Alle positiven Plaques mit dem zweiten Duplikat gegenkontrollieren.
- Zur Lokalisierung der positiven Plaques auf der Platte die Folie mit den Markierungen auf die Unterseite der Petrischale legen und mit einer Präpariernadel durch die angezeichneten Plaques der Folie und Petrischale stechen, so dass sich eine leichte Vertiefung im Plastik der Petrischale abzeichnet. Vertiefungen auf der Platte mit Stift umranden.
- Mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette jeweils die Fläche um einen positiven Plaque großzügig ausstechen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml SM-Puffer überführen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 3-4 Tropfen Chloroform. (Einzelne Phagenplaques werden beim Rescreening in 500  $\mu\text{l}$  SM-Puffer mit 20  $\mu\text{l}$  Chloroform überführt).
- Alle Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 4°C für mindestens 12 h stehen lassen, um die völlige Herauslösung der Phagen aus dem Topagar zu erreichen. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C.

Zur Isolierung einzelner Phagenplaques werden in einem Rescreening Verdünnungen dieser Phagenlösungen mit SM-Puffer von  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  durchgeführt und erneut mit

Y1090 kultiviert, auf kleine Agarplatten ausplattiert, auf Nitrocellulosemembranen transferriert, hybridisiert und immunologisch detektiert. Die Phagendichte muss so niedrig gewählt sein, dass ihr Wachstum nicht konfluent verläuft. Einzelne positive Phagen können dann sicher isoliert und für die *in vivo*-Excision eingesetzt werden. Im Fall von *AthPEX10* waren dies sechs putativ positive Klone mit denen weitergearbeitet wurde.

### 14.4.3 Die *in vivo*-Excision von *AthPEX10* in pZL1 des Lambda-ZIPLOX Phagen

Für die automatische Excision des pZL1-Plasmids mit der cDNA von *AthPEX10* werden die Einzelphagen zusammen mit DH10B (Zip) ausplattiert. Der *E. coli*-Stamm enthält das Zip-Plasmid mit einem Resistenzgen gegen Kanamycin. Sobald die Phagen die Bakterien befallen, geht die Phagen-DNA  $\lambda$ -ZIPLOX ins Bakteriengenom über und wird dort mithilfe rekombinanter Gene des pZip-Plasmids in die Plasmidform pZL1 mit Ampicillin als Selektionsmarker überführt. Bei Wegfall des Kanamycin-Selektionsdrucks wird das pZip-Plasmid selektioniert- übrig bleibt das 4,3 kb große pZL1-Plasmid mit der gewünschten cDNA, in diesem Fall von *AthPEX10*. Für weitere Detail-Informationen siehe Produktkatalog von GIBCO BRL (Life Technologies, Inc.).

- Übernachtkultur ansetzen von DH10B (Zip) in 4 ml LB-Medium + 50  $\mu$ g/ml Kanamycin.
- In sechs Eppendorf-Reaktionsgefäßen (weil sechs Einzelplaques von *PEX10*) je 100  $\mu$ l der Ü.N.K + 25  $\mu$ l der Phagenlösungen 1-6 pipettieren, kurz schütteln und 5 min bei RT inkubieren.
- 12 kleine Agarplatten mit LB-Medium + 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin bereithalten.
- In Agarplatten 1-6 je 110  $\mu$ l der Bakterien/Phagen-Suspension ausplattieren, restliche 15  $\mu$ l mit 75  $\mu$ l LB-Medium verdünnen und ebenfalls auf Platten 7-12 ausplattieren.
- Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank.
- Von den ca. 50-500 Klonen der Platten 1-6 (oder 7-12 je nach Dichte der Bakterien) jeweils drei singuläre Klone als Verdünnungsausstrich picken und parallel als Ü.N.K. in 4 ml LB-Medium + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ansetzen.
- Isolierung von Plasmid-DNA siehe Kapitel 9.1.2.3.

### 14.4.4 Sequenzierung putativ positiver Klone von *AthPEX10*

Vor dem Sequenzieren der Plasmid-DNA wurde eine Kontroll-PCR mit den beiden Primern *AthPex10*-S2-Sense und *AthPex10*-AS2-Antisense durchgeführt, die ein 533 bp-

Fragment amplifizieren sollten. Zusätzlich diente ein Restriktionsverdau mit *Sall* und *NotI* dazu, die beiden flankierenden Regionen der cDNA-Insertionen aus dem Plasmid pZL1 herauszuschneiden.

Nachdem PCR-Produkte und Restriktionsverdaue auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf ihre Grössen geprüft waren, wurde Plasmid-DNA von vier der ursprünglich sechs Klone mit dem QIAGEN Kit „QIAprep Spin Miniprep“ weiter aufgereinigt, die Qualität der DNA photometrisch bei 260<sub>nm</sub> und 280<sub>nm</sub> kontrolliert und zum Sequenzieren an die Firma TopLab in Martinsried, Deutschland geschickt.

## **15 Klonierung von *PEX7* aus *Arabidopsis thaliana***

Für eine Untersuchung der Importmaschinerie peroxisomaler Matrix-Proteine wurde die cDNA von *PEX7*, einem peroxisomalen Targeting-Signal-2-Rezeptor aus *Arabidopsis thaliana*, geklont. Dieser Import-Rezeptor erkennt spezifisch all jene Proteine, die das peroxisomale Targeting-Signal-2 (PTS2) besitzen.

Im Folgenden beschränkt sich der Material- und Methodenteil zur Klonierung von *AthPEX7* auf die Abweichungen zur Klonierung von *AthPEX10*, die in Kapitel 14 ausführlich beschrieben wurde.

### **15.1 Sequenzhomologien von Pex7p in *Arabidopsis*, Maus und Mensch**

Mit Pex7-Sequenzen aus *Homo sapiens* und *Hansenula polymorpha* wurde die *Arabidopsis* EST-Datenbank nach entsprechenden Homologien durchsucht. Der EST [eF15393](#) wurde als putativer *AthPex7*-Klon identifiziert und angefordert. Die Sequenzierung ergab allerdings keine Vollängen-cDNA. Zusätzlich konnte noch eine genomische Sequenz ([B12652](#)) in der „BAC-end“-Datenbank als Pex7 identifiziert werden.

### **15.2 Herstellung einer DIG-markierten Pex7-Sonde**

Da es sich bei EST [F15393](#) aufgrund der erfolgten Sequenzierung um keine Vollängen-cDNA handelte (Start im C-terminalen Bereich von putativem *PEX7* mit Stop in UTR), wurde er als Template dazu benutzt eine Digoxigenin-markierte Sonde mit einer Länge von 505 bp zu amplifizieren. Hierzu wurden in einer PCR mit DIG-dNTP's die beiden Primerpaare *AthPex7*-S-Sense (5'-ATA AGA ACA GTT AAG GTT TGG GAT G-3') und *AthPex7*-AS2-Antisense (5'-ATC TAT CTA CTA TTA CCA TCA ATC A-3') eingesetzt.

### 15.3 Screening einer $\lambda$ -ZipLox Bibliothek nach einem Volllängenklon von *AthPEX7*

Mithilfe der 505 bp DIG-Sonde wurde analog zu *PEX10* die CD4-7 cDNA-Bibliothek gescreent. Bei dieser  $\lambda$ -PRL2 Phagen Bibliothek handelt es sich um cDNAs von einer Ansammlung gleicher Mengen isolierter mRNA verschiedensten Gewebes von Wildtyp-Pflanzen aus *Arabidopsis thaliana* (vgl. D'Alessio *et al.*, 1992).

Zwei positive Klone wurden daraus identifiziert sowie sequenziert und enthielten die vollständig codierende Region von Pex7p.

### 16 Klonierung einer *nodule enhanced Malatdehydrogenase* (neMDH) aus der Sojabohne (*Glycine max*)

Da im Rahmen der Dissertation die Technik des Screenings nach den Erfahrungen mit *AthPEX10* und *AthPEX7* wohl etabliert war, wurde im Rahmen einer Kollaboration das vollständige Gen der *nodule enhanced Malatdehydrogenase* (neMDH) aus der Sojabohne kloniert. Hinweise zum erbrachten Material und Methodenteil sowie die Gensequenz selbst sind in *American Journal of Botany* publiziert (Imsande *et al.*, 2001).

### 17 Erzeugung von Antikörpern gegen das Expressionsprodukt von *AthPEX10*

Für *in situ* Lokalisationsuntersuchungen von *AthPex10p* war es unumgänglich, Antikörper gegen das Genprodukt zu erzeugen. Zwei verschiedene Methoden fanden dabei Anwendung. So wurde zum einen ein *Maltose-Binding-Protein-AthPex10*-Fusionsprotein (Pharmacia) kloniert und mit dem Antigen zwei Kaninchen immunisiert. Das Rohimmenserum des einen Kaninchens zeigte keine Interaktion mit dem Antigen und wurde aussortiert. Das zweite Tier schien Antikörper gegen das MBP-FP ausgebildet zu haben, weshalb sein Rohimmenserum zur Hälfte einer Affinitätsreinigung unterzogen wurde. Da dieser Antikörper jedoch nur im bakteriellen System das überexprimierte MBP-*AthPex10*-Fusionsprotein schwach erkannte, bleibt er im Folgenden unberücksichtigt. Der zweite Parallelweg ging über die Erzeugung eines *AthPex10*-6x-Histidin-Tag-Proteins (QIAGEN) und der Immunisierung eines Kaninchens sowie einer Henne und wird im Nachfolgenden ausführlich beschrieben.

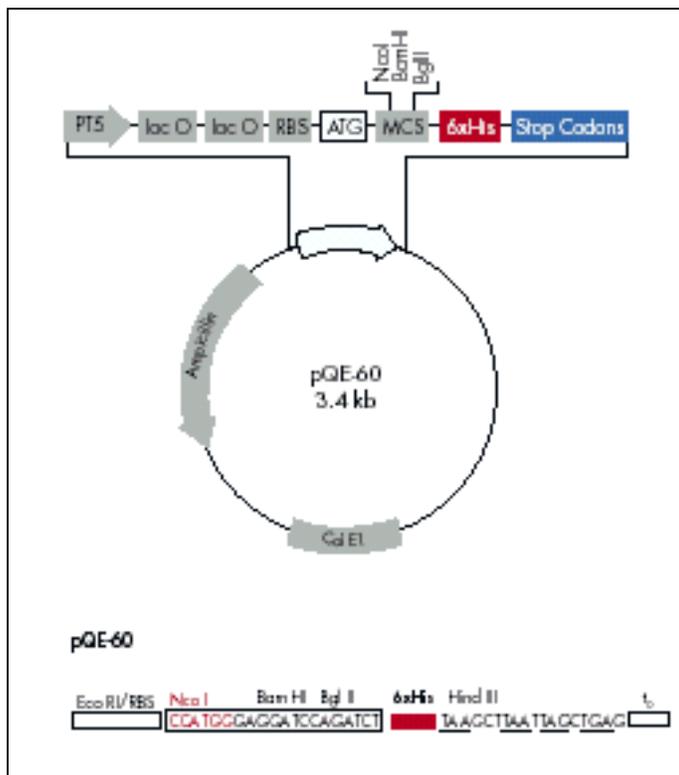
## 17.1 Generierung eines *AthPex10*-6xHis-Proteins

Die pQE-Expressionsvektoren von QIAGEN ermöglichen die Expression rekombinanter Proteine mit einem 6xHistidin-Arm in *E. coli*. Der Vektor pQE-60 hängt diesen His-Tag am C-terminalen Ende des zu exprimierenden Proteins an und erlaubt eine rasche Aufreinigung des exprimierten Proteins mittels einer Nickel-Affinitäts-Chromatographie.

Die Expression des in pQE-60 klonierten *AthPex10p* wird durch den *lac*-Repressor auf dem Plasmid pREP4 solange unterdrückt, bis die Induktion über Zugabe von IPTG ange-regt wird. Als Wirtstamm diente hierbei *E. coli* M15[pREP4].

### 17.1.1 Klonierung von *AthPEX10* in pQE-60

Mithilfe der beiden Primer *AthPex10*-6xHis-Sense (5'-AAA CCA TGG GGC TTA ATG GGG ATT CGG GTC CG-3') und *AthPex10*-6xHis-Antisense (5'-TTG GGA TCC AAA ATC AGA ATG ATA CAA ACA-3'), in die eine *NcoI* bzw. eine *BamHI*-Schnittstelle eingebaut ist, läßt sich die Sequenz von *AthPEX10* so amplifizieren, dass sie über die beiden Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* der *multiple cloning site* in pQE-60 kloniert werden kann (Abb. B3). PCR-Produkt und Plasmid-DNA wurden nach dem Doppelverdau mit *NcoI* und *BamHI* auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.



**Abb. B3:** Plasmidkarte und *multiple cloning site* von pQE-60.

Mit dem QIAquick Gelextraktions-Kit (Qiagen, Hilden) läßt sich die DNA aus der Agarose aufreinigen. Nach Ligation von Insert und Vektor mit der T4-Ligase erfolgte die Transformation in kompetente M15-Bakterien von *E. coli*. Verschiedene Verdünnungstiter wurden auf LB-Platten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden Klone auf frische Ampicillinplatten ausgestrichen und eine Übernachtkultur zur Durchführung einer Plasmid-Miniprep angesetzt.

Ein Restriktionsverdau mit *NcoI* und *BamHI*, sowie eine anschließende PCR mit dem *AthPex10-6xHis*-Primerpaar ermöglichte die Identifizierung positiver Klone.

### 17.1.2 Induktion und Expression des Proteins

#### a.) Vorversuch:

Zur Kontrolle der Expression wurde ein Vorversuch in kleinerem Maßstab durchgeführt. Hierfür wurden je 4 ml 2xTY-Medium mit einem Klon von *AthPex10-6xHis* und dem leeren Vektor pQE-60 ohne Insertion als Kontrolle inokkuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden vier 200 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml 2xTY-Medium befüllt und als Doppelprobe mit den beiden Übernachtkulturen auf eine Ausgangs OD<sub>600</sub> von 0,07- 0,08 angeimpft. Je zwei Kolben enthielten dasselbe Konstrukt und sollten einmal induziert werden und einmal ohne IPTG-Zugabe weiterwachsen. Nachdem die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 erreicht hatten, wurde in zwei Kolben IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1mM zugegeben. Gleichzeitig wurde von nun, ab Stunde Null bis fünf Stunden nach Induktion, je 100µl der Zellkulturen abgenommen und 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zum Ende der Induktion auf Eis gelagert und mit 30 µl 4x SDS-Probenpuffer für 5 min aufgekocht. Anschließend wurden die Proben bis zur Analyse auf einem SDS-Gel bei minus 20°C eingefroren. Parallel hierzu wurden jeweils stündlich entnommene 100µl Aliquots mit 2xTY-Medium 1:10 verdünnt und die OD<sub>600</sub> der vier Zellkulturen notiert.

#### b.) Großansatz

In einem jeweiligen Großansatz eines Versuches wurden 2-Liter Erlenmeyerkolben mit je 400 ml 2xTY-Medium befüllt und aus einer Übernachtkultur von *AthPex10-6xHis* zu einer OD<sub>600</sub> von 0,07-0,08 angeimpft. Nach Erreichen der logarithmischen Phase (OD<sub>600</sub> ~ 0,6) wird mit IPTG induziert (1 mM Endkonzentration) und für weitere 5-6 Stunden bei 37°C und 200 rpm geschüttelt.

### 17.1.3 Abernten der Zellen und Herstellung eines Lysats

#### Lösungen:

Lysis-Puffer I:	50 mM	Tris	
	100 mM	NaCl	⇒ pH 8,0 (HCl)
Lysis-Puffer II :	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	10 mM	Tris	
	6 M	Guanidinium-HCl	⇒ pH 8,0 (HCl)

#### Durchführung:

Die Zellen wurden mit 4.000 x g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert (JA10, Beckman). Nach Dekantierung des Überstandes wurden pro Gramm *E.coli*-Nassgewicht 3 ml Lysis-Puffer zugegeben (nach Sambrook et al., 1989) sowie 8 µl einer 50 mM PMSF-Lösung in 2-Isopropanol. Die Zellen werden durch langsames Schwenken wieder resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren um die Zellwände aufzubrechen. Bis zur weiteren Verwendung blieb das Lysat bei -20°C eingefroren und wurde im weiteren in Anlehnung an das Herstellerhandbuch „The QIAexpressionist“ behandelt. Das Lysat wurde auf Eis langsam aufgetaut und 0,8 mg Lysozym pro ml Puffer eingerührt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Lysat in 10 sec. Intervallen mit einem Ultraschall-Homogenisator (70 W) für 10-12 Wiederholungen soniziert. Wegen der anhaltenden Zähflüssigkeit des Lysats, erfolgte die Zugabe von 5µg/ml DNase I und eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis.

Aufgrund seiner membrandurchspannenden Domänen wurde *AthPex10-6xHis* von *E.coli* in Form von „Inclusionbodies“ abgelagert. Um die löslichen Proteine vom pelletierbaren Zielprotein zu trennen, schloss sich eine Zentrifugation mit 10.000 x g für 20 min bei 4°C an (Beckman-Rotor JA20). Das Pellet wurde mit 4 ml Lysis-Puffer II pro Gramm Nassgewicht resuspendiert. Anschließend wurden die „Inclusionbodies“ 30-60 min bei RT vorsichtig gerührt um ein Aufschäumen der Proteine zu vermeiden. Die Lyse der Einschlusskörper ist abgeschlossen, sobald die Lösung transluzent wird.

In einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 10.000 x g bei RT (JA20) werden die Zelltrümmer pelletiert und der klare Überstand, der nun das Zielprotein enthält, ist bereit zur Inkubation mit dem Ni-NTA-Resin (QIAGEN).

### 17.1.4 Bindung des *AthPex10-6xHis*-Proteins an Ni-NTA-Resin

Vor der Bindung des Zielproteins an das Nickel-Chelat wurde das Resin mit Lysis-Puffer II äquilibriert. Die Bindung wurde im „Batch-Verfahren“ durchgeführt. Hierzu wurden 50 ml Falcon-Tubes verwendet in die pro 5 ml Lysat 1 ml des 50% Ni-NTA-Resins gegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur und 100 rpm auf einem Rotationsschüttler wurde das Lysat-Resin-Gemisch auf eine Pharmacia-Säule geladen.

### 17.1.5 Affinitätsreinigung von *AthPex10p-6xHis* an einer Nickelchelate-Säule

#### Lösungen:

Wasch Puffer:	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	10 mM	Tris	
	8 M	Harnstoff	⇒ pH 6,3 (HCl)
Elutions-Puffer I:	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	10 mM	Tris	
	8 M	Harnstoff	⇒ pH 5,9 (HCl)
Elutions-Puffer II:	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	10 mM	Tris	
	8 M	Harnstoff	⇒ pH 4,5 (HCl)

#### Durchführung:

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte mithilfe eines Chromatographie-Gerätes von Pharmacia. Es bestand aus den Komponenten Steuerungsgerät, peristaltischer Pumpe, photometrischer Apertur und einem angeschlossenen Schreiber. Die Durchflussmenge eines Puffers durch die Säule variierte zwischen 100 und 500 µl pro Minute. Die relative Konzentration der eluierten Proteine ließ sich über den Schreiberausschlag verfolgen. Das Lysat-Resin-Gemisch wurde auf eine 15 ml Säule (Pharmacia) geladen und solange gewaschen, bis der Durchfluss eine OD<sub>280</sub> < 0,01 aufwies (50-80 ml).

Nach dem Waschschrift bei pH 6,3 schloss sich zuerst ein zweiter Waschschrift bei pH 5,9 an. Anschließend erfolgte die Elution des Zielproteins bei pH 4,5. Die verschiedenen Fraktionen wurden gesammelt und die Proteinkonzentrationen mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Höher konzentrierte Fraktionen wurden anschließend in einem SDS-Gel (12,5%) analysiert und die Fraktionen mit dem aufgereinigten Zielprotein vereinigt.

### 17.1.6 Aufkonzentrierung des *AthPex10-6xHis*-Proteins

Das aufgereinigte Zielprotein lag nach dem Elutionsschritt in 8 M Harnstoff-Lösung vor. Für eine Immunisierung von Tieren war dies zu hoch. Deshalb wurde eine Verdünnung auf 2 M Harnstoff und 150 mM NaCl + 0,1% Triton-X 100 (pH 7,5-8,0) angestrebt, um eine für Tiere atoxische Harnstoffkonzentration zu erhalten und das Protein trotzdem in Lösung zu halten. Nach der Verdünnung des Eluats erfolgte eine Anreicherung des Proteins mithilfe von Centriplus 30 (Millipore). Hierbei handelt es sich um Zentrifugen-Filter-Einsätze mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 30.000 Dalton.

Am Ende des Prozesses lag das Antigen in einer Konzentration von 0,8 mg/ml zur Immunisierung bereit.

### 17.1.7 Erzeugung eines Antiserums

Die Immunisierung eines Kaninchens und einer Henne wurde bei der Firma Davids Biotechnologie, Regensburg in Auftrag gegeben. Tabelle B3 zeigt das Immunisierungsprotokoll der beiden Tiere.

Tag	Kaninchen	Proteinmenge (µg)	Tag	Henne	Proteinmenge (µg)
0	1. Immunisation	100	0	1. Immunisation	75
21	2. Immunisation	100	14	2. Immunisation	75
42	3. Immunisation	100	35	3. Immunisation	50
63	4. Immunisation	100	45-55	Einsammeln von 10 Immunoeiern	
85	5. Immunisation	100	65	Präparation der IgG-Fraktion	
95	Finales Ausbluten Präparation der IgG-Fraktion				

**Tab. B3:** Immunisierungsprotokoll zur Erzeugung von *AthPex10-6xHis*-Antikörpern.

Die Firma präparierte aus den Seren die IgG-Fractionen. Jeweils eine Hälfte wurde als Rohimmunserum ausgeliefert, die andere Hälfte wurde einer Affinitätsreinigung unterzogen.

## 18 Funktionsanalyse von *AthPEX10* in *Hansenula polymorpha*

Zur Bestimmung des Targeting von *AthPex10p* im Hefeorganismus wurde das Arabidopsisprotein in einem Wildtypstamm von *Hansenula polymorpha* überexprimiert. Mit



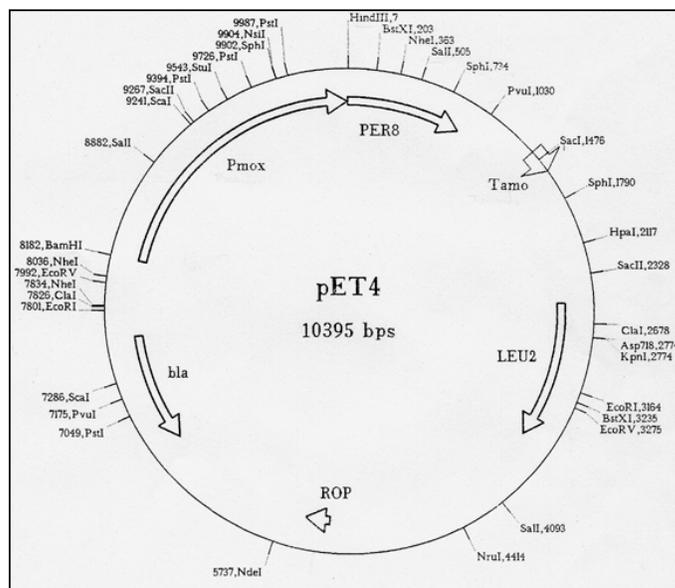
	10	20	30	40	50	60
AthPEX10.pep	MRLNGDSGPGQDEPGSSGFHGGIRRFPLAAQPEIMRAAEKDDQYASFIEACRDAFRHLF					
HpPex10.pep	-----MFKLLSFANAPAIVRANQKDSYFESRLHNQLLDVVKAIK					
AthPEX10.pep	GTRIALAYQKEMKLLGQMLYYVLTITGSGQOTLGEEYCDIIQVAGPYGLSPTPARRALFILL					
HpPex10.pep	GSHFVHKYPEELR <b>TLATALYLCLTTLVGS</b> KTLGEEYVDLVVSRDGRKIPK <b>FASRFGFVV</b>					
	*.. * *.. * ** *** * .***** *.. * . * * * *..					
AthPEX10.pep	YQTAVPYIAERISTRATQAVTFDESDEFEGDSHIHSRPMIDLPSSSQVETSTSVVSRILN					
HpPex10.pep	<b>AYVLF</b> PYAVRQLLQKLKAQOS----- <b>RLAQLVSG</b> ----- <b>VSYM</b> N					
	** .. . *					** . *
AthPEX10.pep	DRLMRSWHRAIQRWPVLPVAR <b>EVLQVL</b> RANIM <b>LFYFEGFY</b> YHISKRASGVRYVFIGKQ					
HpPex10.pep	<b>VMDLLNLH</b> ----- <b>LALFYFTG</b> KYYQFAKRLFGLRYAFGYRV					
	. *					* * * * * * * . * * * * *
AthPEX10.pep	LN--QRPR--YQ <b>ILGVFLIQLCILAEGL</b> RRSNLSSITSSIQQASIGSYQTSGGRGLPV					
HpPex10.pep	DKNQQRARG <b>NYELLGLLIIFQ</b> TVFKNVANLRK--LWGATKTVQDSGDLIYRFR-----					
	** * *..*.. * .** * * ..* . *					
AthPEX10.pep	LNEEGLNITSEAEKGNWSTSDSTSTEAVGK <b>CTLCLSTRQHP</b> TAT <b>PCGHVFCW</b> SCIMEWCN					
HpPex10.pep	-DQTSDVIDLADPK-----VL.PYLPEASRT <b>CMLCLSPMKDP</b> SCG <b>EGHVF</b> CK <b>CVLDW</b> VK					
	. * * ** * * * * * . * . * * * * * * * * *					
AthPEX10.pep	EKQ <b>ECPL</b> CRTPNTHSSLVCLYHSDF					
HpPex10.pep	ERQ <b>ECPL</b> CRAKMRESQLLPLR----					

**Abb. B5:** Sequenzhomologie der Aminosäuren von *AthPex10p* und *HpPex10p*. Die zwei putativ transmembranumspannenden Regionen in *AthPex10p* sind grün unterlegt, die vermutlich vier Transmembran-Helices in *Hansenula* gelb (Embnet-CH-Programm). Nach Tan *et al.* (1995) fehlen in *HpPex10p* Membran-spannende Domänen. Blau zeigt das konservierte Zindefingermotiv C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> an.

### 18.1.1 Klonierung von *HpPEX10* aus pET4 in pHIPZ4

Für eine Klonierung von *HpPEX10* in pHIPZ4 als spätere Positivkontrolle musste die cDNA zuerst aus dem Plasmid pET4 (Abb. B6) herausgeschnitten werden. Dies erfolgte mangels geeigneter Restriktionsschnittstellen mithilfe der PCR, die am 3'-Ende des Gens eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle einführte. Mit deren Hilfe ließ sich das *HpPEX10*-Gen später sticky-blunt in das Plasmid pHIPZ4 klonieren. Der *HpPex10*-Sense-Primer (5'-ATG TTT AAG CTT TTG TCT-3') und der *HpPex10*-AS-Primer (5'-ATT CTA GAT TAT CGT AGA GGC AAC AG-3') amplifizierten ein Fragment mit 896 bp aus pET4. Nach QIAprep-Reinigung wurde das PCR-Produkt mit *Xba*I verdaut und auf ein 0,7% Agarose-

gel geladen. Der Vektor pHIPZ4 wurde *HindIII* verdaut und mit Nukleotiden mithilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Nach QIAprep-Plasmidreinigung und anschließendem Verdau mit *XbaI* wurde der Vektor ebenfalls mit dem PCR-Produkt auf das Agarosegel geladen.



Vektor- und Insertbanden wurden nach der Auftrennung ausgeschnitten und nach QIA-quick-Gelreinigung mithilfe der T4-Ligase 1h bei 37°C ligiert. Nach 10 min Denaturierung der Ligase bei 70°C und Abkühlen bei RT erfolgte die Transformation des Vektorkonstrukts in chemisch kompetente DH5 $\alpha$ .

**Abb. B6:** Restriktionskarte des Plasmids pET4.

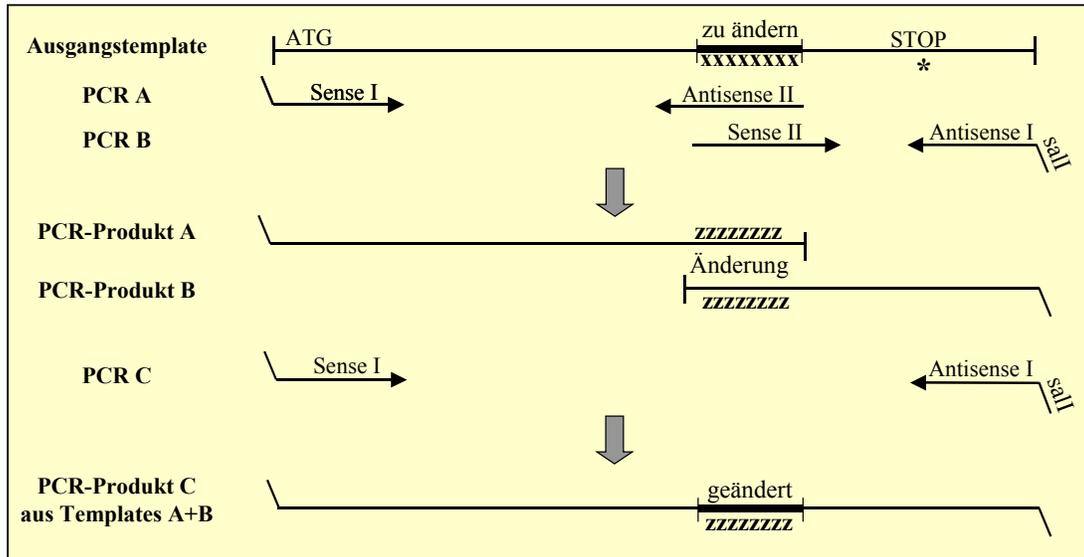
### 18.1.2 Klonierung von *AthPEX10* in pHIPZ4

Für die Klonierung des Volllängen-Gens von *Arabidopsis PEX10* in pHIPZ4 wurde per PCR mit Hilfe der beiden Primer *AthPex10S3*-Sense (5'-ATG AGG CTT AAT GGG GAT TCG-3') und *AthPex10AS3*-Antisense (5'CAT GTC GAC TAA AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-3') die cDNA aus dem Plasmid pZL1 isoliert. Die Klonierung in pHIPZ4 erfolgte *sticky-blunt* mit der Restriktionsschnittstelle *Sall*, die durch den Antisense-Primer am 3'-Ende des Gens eingeführt wurde. Der Vektor pHIPZ4 wurde dazu mit *HindIII* geschnitten, die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dann wie das PCR-Produkt mit *Sall* verdaut. Nach Ligation von Vektor und Insert erfolgte die Transformation in DH5 $\alpha$ .

### 18.2 Klonierung verschiedener Hybridkonstrukte in den Plasmidvektor pHIPZ4

Für den Fall, dass Volllängen-*PEX10* aus *Arabidopsis* den Pex10-defizienten Hefestamm nicht komplementieren würde, wurden insgesamt vier verschiedene Hybridkonstrukte zwischen *Hansenula*- und *Arabidopsis-PEX10* erzeugt und in den Vektor pHIPZ4 eingebracht. Dabei wurde so vorgegangen, dass sich das Volllängen-Gen aus *Arabidopsis* in verschiedenen Sequenzpassagen dem *Hansenula*-Gen annäherte. Für die Konstrukte HK2, HK3 und HK4 erfolgte der Austausch verschiedener Peptidsequenzen mit der „*splicing by over-*

lap extension“ PCR-Methode von Horton *et al.* (1989). Deren Funktionsprinzip wird in Abb. B7 vorgestellt.



**Abb. B7:** Funktionsprinzip der „*splicing by overlap extension*“-PCR-Methode (Saiki *et al.*, 1988; Horton *et al.*, 1989) zur Konstruktion der Hybridkonstrukte HK2, HK3 und HK4 zwischen *Arabidopsis* und *Hansenula-PEX10*.

Mithilfe der „*splicing by overlap extension*“-PCR kann ein beliebiger Abschnitt innerhalb einer Nukleotidsequenz abgewandelt werden. Entweder indem Nukleotide deletiert werden oder für neue Aminosäuren (AS) codieren. Durch Einfügen einer *SalI*-Schnittstelle im Antisense-Primer kann das neue PCR-Produkt später in den Vektor pHIPZ4 *sticky-blunt* eingefügt werden.

### 18.2.1 Klonierung des Hybridkonstrukts HK1 in pHIPZ4

Aus der Sequenzhomologie in Abb. B8 ist ersichtlich, dass die Übereinstimmung der AS am N-terminalen Ende der beiden Proteine nur minimal ist, bzw. überhaupt keine Analogie gegeben ist. Deshalb wurden die ersten 28 AS des *AthPex10p* deletiert und durch sieben AS des Hefegens ersetzt.

Dieser Austausch am N-Terminus erfolgte mithilfe eines neu entworfenen Sense-Primers, dem *HpPex10C2-Sense* (5'-GGC ATG TTT AAG CTT TTG TCT TTT GCA GCT CAG CCG GAG ATT ATG-3'). Der Antisense Primer *AthPex10AS3-Antisense* (5'CAT GTC GAC TAA AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-3') mit *SalI* Restriktionsschnittstelle erlaubte später die *sticky-blunt* Klonierung in pHIPZ4 wie bereits für die Vollängenklonierung von *AthPEX10* in pHIPZ4 beschrieben.

## B. Material und Methoden (spezieller Teil)

	10	20	30	40	50	60
AthPEX10.pep	MRLNGDSGPGQDEPGSSGFHGGIRRFPL	AAQPEIMRAAEKDDQYASF	IHEACRDAFRHLF			
HpPex10.pep	-----MFKLLSF	ANAPAIVRANQKDSYFESRLHNQLLDVVKAIK				
			* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
AthPEX10.pep	GTRIALAYQKEMKLLGQMLYYVLT	TGSGQQT	LGEEYCDI	IQVAGPYGLSPT	PARRALFIL	
HpPex10.pep	GSHFVHKYPEELRTLATALYLCL	TTLVGSKTLGEEYVDLVYVSRDGRKIPKFASRF	GFVV			
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
AthPEX10.pep	YQTAVPYIAERISTRAATQAVTF	DESDEFFGDSHIHSPRMIDLPSSSQVETSTSVVSRLN				
HpPex10.pep	AYVLFPPYAVRQLLQKLKAQQS	-----RLAQLVSG-----	VSYMN			
	** * * *		* * * *		* * * *	* * * *
AthPEX10.pep	DRLMRSWHRAIQRWPVVL	PVAREVLQLVLRANLMLFYFEGFYHI	SKRASGVRYVFIGKQ			
HpPex10.pep	VMDLLNLH-----	LALFYFTGKYQFAKRLFGLRYAFGYRV				
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
AthPEX10.pep	LN--QRPR--YQILGVFLLI	QLCILAAEGLRRSNLSSITSSIQQASIGSYQTS	SGGRGLPV			
HpPex10.pep	DKNQQRARGNYELLGLLI	IFQTVFKNVANLRK--LWGATKTVQDSGD	LIYRFR-----			
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
AthPEX10.pep	LNEEGLITSEAEKGNWSTSD	STSTEAVGKCTLCLSTRQHPTATPCGHVFCWSCIMEWCN				
HpPex10.pep	-DQTSVDIDLADPK----	VLPYLPEASRTCMLCLSPMKDPSCGEGHVCWKC	VLDVWK			
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
AthPEX10.pep	EKQECPLCRTPNTHSSLVCLYHSDF					
HpPex10.pep	ERQECPLCRAKMRESQLLPLR----					
	* * * * *	* * * * *				

**Abb. B8:** Hybridkonstrukt HK1 zwischen *Arabidopsis*- und *Hansenula*-Pex10p. Die ersten 28 AS von *Arabidopsis* (gelb) wurden durch sieben AS des Hefegens (blau) ersetzt.

### 18.2.2 Klonierung des Hybridkonstrukts HK2 in pHIPZ4

Im Bereich zwischen AS 141 und AS 175 des *AthPex10p* liegt ein 34 AS langer Peptidbereich, dem keine analogen AS im *HpPex10p* zugeordnet werden können oder in dem nur eine geringe Homologie zwischen den beiden Proteinen besteht. Deshalb wurde mithilfe der „*splicing by overlap extension*“-PCR Methode die gelb unterlegte *Arabidopsis*-Sequenz deletiert und durch den blau markierten *Hansenula*-Abschnitt komplementiert, wie aus Abb. B9 ersichtlich ist.

Als Sense-Primer in der PCR A dienten *AthPex10S3*-Sense (5'-ATG AGG CTT AAT GGG GAT TCG-3') und ein neuer Antisense-Primer *HpPex10C3AS* (5'-TCC GGA AAC CAG TTG TGC TAG CCG GAC TGC TTG CGT AGC AGC TCG AGT-3'). In einer PCR B wurde zur Amplifikation eines neuen N-terminalen Abschnitts der Sense-Primer



## B. Material und Methoden (spezieller Teil)

AAT GGG GAT TCG-3') und ein neuer Antisense-Primer *HpPex10C5AS* (5'-CAG ATG GAG ATT CAA AAG ATC CAT CAC GTT TAA CCT AGA TAC TAC AGA-3') eingesetzt. Für die zweite PCR-Reaktion B fanden Sense-Primer *HpPex10C5S* (5'-GAT CTT TTG AAT CTC CAT CTG GCG CTC TTC TAC TTT GAA GGT TTT TAT-3') und Antisense-Primer *AthPex10AS3-Antisense* (5'CAT GTC GAC TAA AAA TCA GAA TGA TAC AAA C-3') Verwendung. Beide PCR-Produkte wurden in einer dritten Reaktion als Ausgangstemplates für die Primer *AthPex10S3-Sense* und *AthPex10AS3-Antisense* benutzt.

	10	20	30	40	50	60
AthPEX10.pep	MRLNGDSGPGQDEPGSSGFHGGIRRFPLAAQPEIMRAAEKDDQYASFIHEACRDAFRHLF					
HpPex10.pep	-----MFKLLSFANAPAIVRANQKDSYFESRLHNQLLDVVKAIK		* * * . ** . ** . * . * . *			
AthPEX10.pep	GTRIALAYQKEMKLLGQMLYYVLTGSGQQTLGEEYCDIIQVAGPYGLSPTPARRALFIL					
HpPex10.pep	GSHFVHKYPEELRTLATALYLCLTLVGSKTLGEEYVDLVYVSRDGRKIPKFAFRFGFVV	* . . * * . . * ** *** * . ***** * . . * . * * * * . .				
AthPEX10.pep	YQTAVPYIAERISTRATQAVTFDESDEFFGDSHIHSPRMIDLPSSSQVETSTSVVSRNLN					
HpPex10.pep	AYVLPYAVRQLLQKKAQSS-----RLAQLVSG-----VSYMN	** . . . *		* . * *		** . *
AthPEX10.pep	<b>DRLMRSWHRAIQRWPVVLPVAREVLQVLRLANLML</b> FYFEGFYHISKRASGVRYVFIGKQ					
HpPex10.pep	<b>VMDLLNLH</b> ----- <b>LAL</b> FYFTGKYQFAKRLFGLRYAFGYRV	*		* * * * * * * . * . * * * * .		
AthPEX10.pep	LN--QRPR--YQILGVFLLIQLCILAEEGLRRSNLSSITSSIQQASIGSYQTSGGRGLPV					
HpPex10.pep	DKNQQRARGNYELLLIIFQTVFKNVANLRK--LWGATKTVQDSGLIYRFR-----	** * * . . ** . . . *		*** . * * . * . *		*
AthPEX10.pep	LNEEGLNLTSEAEKGNWSTSDSTSTEAVGKCTLCLSTRQHPTATPCGHVFCWSCIMEWCN					
HpPex10.pep	-DQTSVDIDLADPK-----VLPYLPEASRTCMLCLSPMKDPSCGECGHVFCWKCVLDWVK	. * * *		** * * * * . * . . * * * * * * . . . *		
AthPEX10.pep	EKQECPLCRTPNTHSSLVCLYHSDF					
HpPex10.pep	ERQECPLCRAKMRESQLLPLR----	* . * * * * * . * * . *				

**Abb. B10:** Hybridkonstrukt HK3 zwischen *Arabidopsis*-Pex10p und *Hansenula*-Pex10p. Der gelb unterlegte *Arabidopsis*-Abschnitt wurde deletiert und durch die blau unterlegte *Hansenula*-Sequenz ersetzt.

### 18.2.4 Klonierung des Hybridkonstrukts HK4 in pHIPZ4

Bei dem Hybridkonstrukt HK4 wurde der gesamte C-terminale Abschnitt des *AthPEX10*-Gens durch den entsprechend homologen Bereich aus *Hansenula* ersetzt. Dieser Austausch betrifft etwa ein Drittel der gesamten Peptidsequenz von *AthPEX10p* (Abb. B11). Vom

Transfer der Peptidsequenzen ist jedoch keine putative TMD des *Hansenula*-Pex10p betroffen.

	10	20	30	40	50	60
AthPEX10.pep	MRLNGDSGPGQDEPGSSGFHGGIRRFPLAAQPEIMRAAEKDDQYASFIHEACRDAFFRHLF					
HpPex10.pep	-----MFKLLSFANAPAIVRANQKDSYFESRLHNQLLDVVKAIK					
			* * * * *	* * * *	* * *	* * *
AthPEX10.pep	GTRIALAYQKEMKLLGQMLYYVLTGSGQQTLGEEYCDIIQVAGPYGLSPTPARRALFIL					
HpPex10.pep	GSHFVHKYPEELRTLALALYLCLTTLVGSKTLGEEYVDLVYVSRDGRKIPKFASRFGFVV					
	* .. * * .. * ** *** * .***** * .. *					* * * * ..
AthPEX10.pep	YQTAVPYIAERISTRATQAVTFDESDEFFGDSHIHSPRMIDLPSSSQVETSTSVVSRLN					
HpPex10.pep	AYVLFPHYAVRQLLQKKAQQS-----RLAQLVSG-----VSYMN					
	** .. . *			* * *		** *
AthPEX10.pep	DRLMRSWHRAIQRPVVLVAREVLQVLVRANLMLFYFEGFYHISKRASGVRYVFIGKQ					
HpPex10.pep	VMDLLNLH-----LALFYFTGKYQFAKRLFGLRYAFGYRV					
	*			* * * * *	* * * *	* * * *
AthPEX10.pep	LN--QRPR--YQILGVFLLIQLCILAAEGLRRSNLSSITSSIQQASIGSYQTSGGRGLPV					
HpPex10.pep	DKNQQRARGNYELLGLLIIFQTVFKNVANLRK--LWGATKTVQDSGDLIYRFR-----					
	** * * ..* * .. *			* * * *	* * * *	* ..
AthPEX10.pep	LNEEGNLITSEAEKGNWSTSDSTSTEAVGKCTLCLSTRQHPTATPCGHVFCWSCIMEWCN					
HpPex10.pep	-DQTSVDIDLADPK-----VLPYLPEASRTCMLCLSPMKDPSCGCGHVFCWKCVLDWVK					
	* .. *			** * * * *	* ..	* * * * * .. *
AthPEX10.pep	EKQECPLCRTPNTHSSLVCLYHSDF					
HpPex10.pep	ERQECPLCRAKMRESQLLPLR-----					
	* ..* * * * *			* * *		*

**Abb. B11:** Hybridkonstrukt HK4 zwischen *Arabidopsis*- und *Hansenula*-Pex10p. Der gelb unterlegte gesamte C-terminale *Arabidopsis*-Abschnitt wurde deletiert und durch die blau unterlegte *Hansenula*-Sequenz ersetzt.

In einer PCR A amplifizierten der Sense-Primer *AthPex10S3*-Sense (5'-ATG AGG CTT AAT GGG GAT TCG-3') und der Antisense-Primer *HpPex10C6AS* (5'-CAC GGT CTT GGT GGC CCC CCA CAG CCG ACG CAA GCC CTC AGC AGC AAG-3') mit *AthPex10* als Template ein PCR-Produkt, das je 24 Nukleotide aus *AthPex10* und *HpPex10* am N-Terminus enthält. Eine PCR B mit *HpPex10* als Ausgangstemplate und den Primern *HpPex10C6S*-Sense (5'-CTT GCT GCT GAG GGC TTG CGT CGG CTG TGG GGG GCC ACC AAG ACC GTG-3') und *HpPex10AS*-Antisense (5'-ATT CTA GAT TAT CGT AGA GGC AAC AG-3') amplifizierte das N-terminale Hybrid aus *Hansenula*. In der PCR C mit Ausgangstemplaten der ersten beiden PCR-Produkte und *AthPex10S3*-Sense sowie *HpPex10AS*-Antisense-Primern wurde schließlich ein PCR-

Produkt generiert, das zu zwei Dritteln aus *AthPEX10* und ein Drittel aus *HpPEX10* bestand.

### 18.3 Linearisierung der Plasmidkonstrukte

Vor der Transformation der verschiedenen Plasmidkonstrukte in elektrokompetente *Hansenula*-Stämme war es notwendig den Vektor pHIPZ4 zu linearisieren, weil er in *Hansenula* selbst nicht replizieren kann und deshalb in das Genom der Hefe integriert werden musste. Die Linearisierung erfolgte bei den unterschiedlichen Konstrukten über einen Restriktionsverdau in der Promotorregion. Dies geschah bei den Vektor-Insert-Konstrukten *AthPEX10*, HK1 sowie HK3 über einen Verdau mit dem Enzym *SphI*. Bei den Konstrukten *HpPEX10*, HK2, HK4 und leerer Vektor als Negativ-Kontrolle war der Verdau mit diesem Enzym nicht möglich, weil *SphI* auch innerhalb einiger Regionen der *HpPEX10*-Sequenz schneidet. Deshalb musste in diesen Konstrukten ein Partialverdau mit *StuI* angewendet werden. Dabei wurden zur Transformation nur die DNA-Banden aus einem Agarosegel ausgeschnitten, die in einer zuvor empirisch ermittelten Konzentration und Dauer des Verdau nur einmal geschnitten wurden, obwohl es zwei Restriktionsschnittstellen innerhalb des Plasmids für *StuI* gab.

### 18.4 Die Induktion und Expression des Fremdproteins

Für optimale Induktionsbedingungen von Peroxisomen ist eine extensive Präkultivierung der Hefezellen entscheidend. Hierfür wurde reichlich Ausgangsmaterial von der Platte zum Animpfen einer Flüssigkultur benutzt und die Zellen erst zur späten exponentiellen Wachstumsphase ( $OD \leq 2,0$ ) in frisches vorgewärmtes Medium auf eine Anfangs-OD 0,1 überimpft. Sobald die Zellkulturen ihre mittlere exponentielle Wachstumsphase ( $OD 1,0-1,5$ ) erreicht haben, werden sie mindestens zwei weitere Male verdünnt. Die Verdopplungszeit von einer Stunde auf glucosehaltigem Medium dient dabei zur Kontrolle optimaler Bedingungen und sollte nicht wesentlich überschritten werden. Werden die maximalen Wachstumsraten erreicht, können die Zellen in ihrer mittleren exponentiellen Wachstumsphase auf methanolhaltiges Medium überimpft werden. Für ein Glycerin/Methanol-Gemisch von *pex*-Mutanten beträgt die Verdopplungszeit unter bestmöglichen Bedingungen etwa zwei Stunden, auf reinem Methanol vier Stunden, sofern sich funktionale Peroxisomen ausbilden konnten. Zur physiologischen Untersuchung der Wachstumsfähigkeit auf Methanol diente die Entwicklung der optischen Dichte. Für EM-Untersuchungen der Peroxisomen selbst wurden die Zellen bei einer OD von 1,5-2,0 abgeerntet, fixiert und eingebettet.

### 18.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der Hefezellen (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Veenhuis)

Für zellmorphologische Untersuchungen zum Nachweis von Peroxisomen wurden die verschiedenen Konstrukte zur Komplementation einer  $\Delta Hppex10$  Mutante mit  $KMnO_4$  fixiert und in Epon eingebettet (vgl. Waterham *et al.*, 1994).

Fixierung: (alle Schritte bei Raumtemperatur durchführen)

- 15-20 OD-Einheiten einer frischen Hefekultur bei 4.000g in Greiner- Zentrifugenröhrchen abzentrifugieren.  
(1 OD-Einheit entspricht bei  $OD_{660nm}$  einem Wert von 1 bezogen auf eine 1 ml Kultur.)
- Zellpellet zweimal mit 5 ml demineralisiertem  $H_2O$  waschen durch Resuspension / Zentrifugation.
- Pellet in 5 ml 1,5% (w/v)  $KMnO_4$ -Lsg. resuspendieren.
- 20 min Fixation bei gelegentlichem Schütteln.
- Abzentrifugieren und Waschen mit  $H_2O$  bis der Überstand klar wird (i.d.R. ist dreimaliges Waschen ausreichend).
- Pellet in 5 ml 1% (w/v) Uranylacetat resuspendieren.
- 15 min bei max. Geschwindigkeit abzentrifugieren um ein festes Pellet zu erhalten.
- Mindestens 4 h oder vorzugsweise über Nacht mit dem Pellet im Uranylacetat bei RT stehen lassen.

Dehydrierung: (Alle Schritte in Greiner-Tubes durchführen)

- 15 min 50% Ethanol, ohne das Zellpellet zu zerstören.
- 15 min 70% Ethanol, dabei das Zellpellet in kleine Stücke brechen.
- 15 min 96% Ethanol.
- 15 min 100% Ethanol.
- 30 min 100% Ethanol.

Infiltration: (Die Tubes ständig auf einer Rotordrehscheibe langsam bewegen lassen).

- 1:1 Mischung aus 100% Ethanol und Epon für 4-8 h.
- 1:3 Mischung aus 100% Ethanol und Epon ü.N., vorsichtig mischen.
- Reines Epon für 1 h, vorsichtig mischen.
- Reines Epon für mindestens 6 h, vorsichtig mischen.
- Einbetten in Gelatine Kapseln.
- Polymerisation bei 80°C für 24 h.

## 18.6 Biochemische Untersuchungen zur Lokalisation von *AthPex10p* in *Hansenula*

Lokalisationsuntersuchungen von überexprimierten *AthPex10p* in Wildtypzellen von *Hansenula* mit Antikörpern gegen das Protein sollten das Targeting des Genprodukts mithilfe von *Western Blots* an isolierten Organellenfraktionen klären helfen.

### 18.6.1 Präparation eines Rohzellextraktes in Anwesenheit von TCA

Für die Präparation von Proteinproben für eine SDS-PAGE Analyse ist das Protokoll von Baerends *et al.* (2000) geeignet, bei dem die Proteine durch TCA (Trichloressigsäure) sofort denaturiert und proteolytische Degradationen verhindert werden. Falls die Proben erst später verwendet werden, ist eine Unterbrechung des Protokolls nach der TCA-Fällung und die Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zu empfehlen.

#### Durchführung:

- Zellen kultivieren und 3 OD<sub>660</sub>-Einheiten abernten (ergibt ca. 300µg Protein), bei 14000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge, 30 sec., Raumtemperatur (RT).
- Zellen in 300 µl H<sub>2</sub>O resuspendieren, Zugabe von 100 µl 50% TCA und mischen.
- Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 30 min (oder länger) einfrieren.
- Zellen 5 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugieren.
- Zweimaliges Waschen des Zellpellets mit 500 µl eiskaltem 80% Aceton, 5 min abzentrifugieren, 14000 rpm, RT.
- Überstand dekantieren und Pellet lufttrocknen.
- Pellet in 100µl 1% SDS / 0,1 N NaOH lösen.
- Zugabe von 100 µl 2x SDS Probenpuffer und Erhitzen der Proben für 5 min,  $100^{\circ}\text{C}$ . (Die Proteinkonzentration beträgt etwa 1,5 mg/ml.)

### 18.6.2 TCA-Präzipitation von Proteinen

Für bereits aufgeschlossene Zellhomogenate wurde das Protokoll von McCammon *et al.* (1994) verwendet.

- Zugabe von gleichem Volumen 25% (w/v) TCA zur Probe.
- Inkubation auf Eis für mindestens 30 min oder längere Aufbewahrung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Zentrifugation für 15 min 14.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , in vorgekühlter Eppendorf-Zentrifuge und Entfernen des Überstands.
- Zweimaliges Waschen des Präzipitats mit 500 µl eiskaltem 80% Aceton und anschließende Zentrifugation, 5 min, 14.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ .

- Überstand verwerfen und trocknen des Pellets an der Luft.
- Lösen des Pellets in 1 Volumen 1 % SDS / 0,1 N NaOH, Vortexen.
- Zugabe von gleichem Volumen 2x SDS Proben-Puffer und Denaturierung der Probe für 5 min bei 100°C.

### 18.6.3 Präparation eines Zellhomogenats in *Hansenula polymorpha*

Für eine Aufklärung der subzellulären Lokalisation von *AthPex10p* in *Hansenula*-Zellen wurde ein Zellhomogenat nach dem Protokoll von van der Klei et al. (1998) hergestellt.

#### Lösungen:

Präinkubations-Puffer:	100 mM Tris-HCL	pH 8.0
	50 mM EDTA	
β-Mercaptoethanol:	Stammlösung liegt 14,3 M vor.	
Protoplasten-Puffer:	50 mM Kaliumphosphat	pH 7.2
	1.2 M Sorbitol	
Homogenisations-Puffer:	5 mM MES-Puffer	pH 5.5
	0.1 mM EDTA	
	1 mM KCl	
	1.2 M Sorbitol	
PMSF-Lsg.:	0.5 M PMSF in DMSO (500-fach)	
Protease-Inhibitor-Lsg.:	1 Tablette „Complete“-Mini EDTA frei, von Roche, ausreichend für 10 ml Lösung.	

#### Durchführung:

- Zellen 5 min bei RT mit 3800 g zentrifugieren, Nassgewicht des Pellets bestimmen.
- Zellen in Präinkubations-Puffer resuspendieren (~0,06 g/ml) und unter Rühren Zugabe von 140 mM β-Mercaptoethanol.
- Unter leichtem Schütteln 15 min bei 35°C inkubieren.
- Zellen 5 min bei RT mit 3800 g abzentrifugieren; Pellet einmal mit Protoplasten-Puffer waschen.
- Zellen in Protoplasten-Puffer unter Zugabe von 1 mg/ml Zymolase 20T (Seikagaku Corporation, Japan) resuspendieren.
- Inkubation im Wasserbad bei 35°C unter vorsichtigem Schütteln (50 rpm).

- Protoplastierung im Lichtmikroskop alle 5 min verfolgen. (Zeit kann zwischen 5 min und 1h variieren. Eine gute Protoplastierung zeichnet sich durch runde, einzelne Zellen mit wenig Zelldebris aus. Zugabe von H<sub>2</sub>O zur Probe sollte die Protoplasten zum Platzen bringen.)
- Protoplasten auf Eis für 10 min kühlen.
- Protoplasten 8 min 4300 g, 4°C abzentrifugieren.
- Zugabe von kaltem Homogenisations-Puffer (1 mM PMSF und Protease-Inhibitor-Lsg. frisch zusetzen), um Protoplasten-Puffer und Zymolase zu entfernen. Das Pellet dabei nicht resuspendieren, aber mit Spatel von Gefäßwand ablösen. Erneut 8 min 4300 g, 4°C abzentrifugieren. Überstand verwerfen.
- Pellet mithilfe einer Glasspritze gründlich mit Homogenisations-Puffer wie zuvor resuspendieren. (Aufbrechen der Protoplasten im Lichtmikroskop kontrollieren. Gegebenenfalls einen Potter zur Homogenisation benutzen, 2-3 Züge.)

Das Homogenat ist nun für eine Differential- oder Sucrose-Gradienten-Zentrifugation einsetzbar.

### 18.6.4 Durchführung einer Differentialzentrifugation

Zur Feststellung, in welcher subzellulären Fraktion sich das Zielprotein befindet (Tab. B4) wird eine Differentialzentrifugation mit dem Zellhomogenat wie folgt durchgeführt.

- Homogenat 10 min zentrifugieren, 5000 rpm, Sorvall SS34, 4°C.
- Überstand S1 erneut zentrifugieren wie zuvor.
- Überstand S2 für 30 min zentrifugieren, 20.000 rpm, SS34, 4°C.

G-Wert	Probe	
3.000	▶ P1	Zelldebris
	▶ S1	
3.000	▶ P2	Zelldebris
	▶ S2	PNS (Postnuclearer Überstand)
30.000	▶ P3	Organellen Pellet
	▶ S3	Cytosol, kleine membranöse Strukturen.

**Tab. B4:** Auftrennung der subzellulären Fraktionen bei unterschiedlichen G-Werten.

Von jeder Fraktion wurde vor und nach Zentrifugation ein Aliquot (1 ml) für die spätere Analyse im Western Blot abgenommen sowie eine TCA-Präzipitation durchgeführt. Zuvor

wird das jeweilige Pellet mit Homogenisationspuffer auf das ursprüngliche Volumen zurückgebracht, damit bei der späteren Analyse auf dem Western Blot die gleichen Quantitäten verglichen werden können.

### 18.6.5 Durchführung einer Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Für die weitere Auftrennung des Postnuklearen Überstandes (PNS) aus der Differential-Zentrifugation, wurde das Protokoll von Douma *et al.* (1985) angewendet, bei dem die Zellorganellen entsprechend ihrer Dichte auf einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt werden.

Zur Herstellung eines Saccharose-Gradienten werden verschieden konzentrierte Stammlösungen der Saccharose entsprechend Tab. B5 zusammengemischt.

#### Lösungen:

Puffer B  
 5 mM MES pH 5,5  
 0,1 mM EDTA  
 1 mM KCl

65 % (w/w) Saccharose in Puffer B (855,7 g/Liter)

Homogenisationspuffer :  
 5 mM MES pH 5,5  
 0,1 mM EDTA  
 1 mM KCl  
 1,2 M Sorbitol

Konz. Saccharose	ml 65 % Saccharose	ml Puffer B	Gesamtvolumen
52	22,6	7,4	30 ml
50	21,6	8,4	30 ml
48	47,8	22,2	70 ml
46	26,0	14,0	40 ml
44	30,8	19,2	50 ml
40	16,5	13,5	30 ml
35	14,1	15,9	30 ml

**Tab. B5: Herstellung der verschieden konzentrierten Saccharose-Lösungen.**

6,5 ml	65 %
2,5 ml	52 %
2,5 ml	50 %
5,0 ml	48 %
3,0 ml	46 %
4,0 ml	44 %
10 ml	Probe
Überstand	Homogenisationspuffer

Für die Herstellung des Gradienten werden 36 ml Polypropylenröhrchen verwendet, die entsprechend der Tab. B6 mit Saccharose beladen wurden. Die aufgetragene Menge an Protein pro Gradient sollte dabei zwischen 5 und 8 mg liegen, um eine vernünftige Auftrennung der Organellenfraktionen zu gewährleisten.

**Tab. B6: Zusammensetzung eines Saccharose-Gradienten.**

Sobald die Gradienten geladen sind, werden sie luftblasenfrei mit Homogenisationspuffer überschichtet und in einem vorgekühlten SV288 Rotor platziert. Die Zentrifugation findet bei 18.000 rpm für 2,5 h statt. Die Kühlung von 4°C wird erst dann zugeschaltet, wenn die Drehzahl des Rotors erreicht ist, um eine Durchmischung des Gradienten aufgrund der Vibrationen des Kühlaggregats zu vermeiden. Positive und negative Beschleunigungen müssen sehr langsam eingestellt sein.

Nach Ende des Zentrifugenlaufes werden die Gradienten am Boden mit einer Kanüle angestochen und 20-25 Fraktionen zu jeweils 1,5 ml in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgesammelt.

Etwa 1000 µl der jeweiligen Fraktionen werden für eine TCA-Fällung verwendet, der Rest für Enzymaktivitätsmessungen, Proteingehaltkonzentration nach Bradford und Bestimmung der Saccharosedichte mittels Refraktometer.

### 18.6.6 Enzymaktivitätsmessungen zur Kontrolle der Organellenfraktionen

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte an frisch abgenommenen Fraktionen von Saccharose-Gradienten.

Gemessen wurde zum einen die Aktivität der **Alkoholoxidase** als Marker für Hefe-Peroxisomen nach der Methode von Verduyn *et al.* (1984). Diese beruht auf einer Oxidationsreaktion von ABTS<sub>rot</sub> (2,2, Azin-di-[2-ethylbenzthioazolinsulfonat]), welches oxidiert eine grüne Farbe besitzt und sein Absorptionsmaximum bei 420 nm erreicht.

**Cytochrome c** als Mitochondrienmarker hat in reduziertem Zustand sein Absorptionsmaximum bei 550 nm. Die Abnahme der Absorption bei dieser Wellenlänge ist ein Maß für die Aktivität der Cytochrome c Oxidase und wurde nach der Methode von Douma *et al.* (1985) bestimmt.

## **19 Analyse einer *AthPEX10*-Transposon-Insertionslinie und ihre Komplementation mit *AthPEX10***

Zur funktionellen Charakterisierung von *AthPEX10* wurde über das *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) eine *Athpex10*-Transposon-Linie mit einem Ds-Element im N-terminalen Bereich des Gens bezogen.

Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass heterozygote Pflanzen der *pex10*-Transposon-Linie durch Selbstkreuzung nicht in den Zustand der Homozygotie zu bringen waren. Die Segregation innerhalb dieser Transposon-Schoten ergab, dass homozygote Individuen bereits vor dem Abschluss ihrer Embryogenese abstarben.

Im Folgenden wird die Genese dieses Befundes näher beschrieben sowie die Komplementation der letalen Linie mit der cDNA des Volllängenklons von *AthPEX10*.

### **19.1 Herkunft der Transposon-Linie**

Über Internetabfrage wurde die elektronische Datenbank von NASC nach der gi-Nummer, in vorliegendem Fall von *PEX10*, abgefragt. Mit ihrer Hilfe läßt sich die „ima-page“ nach Samenlinien, die eine Geninsertion enthalten, durchforsten. Über einen weiteren Link und die entsprechende Bestellnummer können die gewünschten Samen angefordert werden. Weitere Details sind unter <http://www.nasc.nott.ac.uk/ima-info.html> beschrieben.

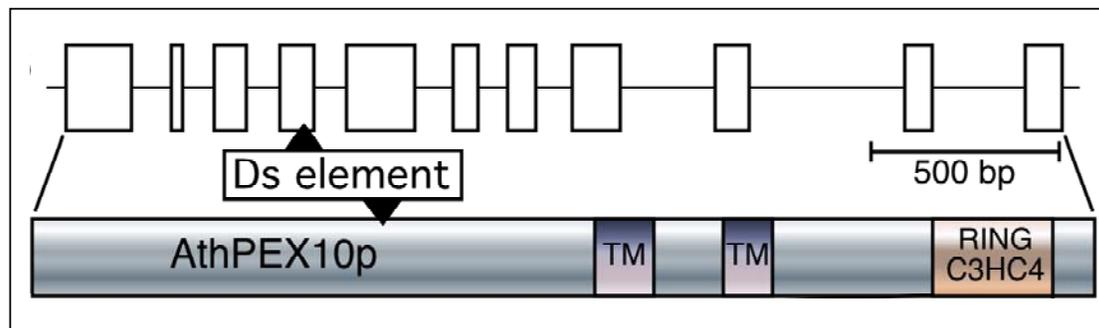
### **19.2 Definition der Transposon-Linie**

Von NASC durchgeführte Sequenzanalysen an Transposon-Linien ergaben bis zu 7% Kreuzkontamination. Diese entstanden zwar hauptsächlich durch PCR-Kontaminationen, aber gelegentlich auch durch Sameneintrag anderer Pflanzen (Parinov *et al.*, 1999). Um sicher zu sein, dass die bestellten und von NASC ausgelieferten Samen das Ds-Element im *PEX10* tragen, wurden markerresistente Pflanzen zuerst im Hinblick auf die gewünschte Transposon-Insertion getestet. Hierzu wurden verschiedene Primerpaare verwendet, die zum einen innerhalb des Transposons und zum andern innerhalb von *AthPEX10* greifen und in einem spezifischen Genprodukt von bestimmter Länge resultieren sollten.

### **19.3 Lokalisation des Ds-Elements innerhalb von *pex10* der Transposon-Linie**

Das Ds-Element der Transposon-Linie ist N-terminal im Exon 4 von insgesamt 11 Exons des *Arabidopsis*-*Pex10* lokalisiert. Das Gentranskript kann somit nur für 125 von insge-

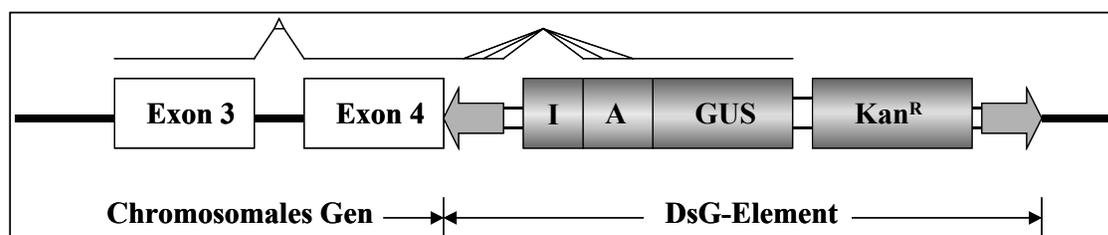
samt 381 Aminosäuren des Membranproteins codieren. Beide membrandurchspannenden Regionen wie auch das funktionelle Ringfingermotiv C3HC4 liegen unterhalb vom Transposon, wie aus den Positionen in Abbildung B12 hervorgeht.



**Abb. B12:** Lokalisation des Ds-Elements innerhalb Exon 4 von *Athpex10* der Transposon-Linie. Dargestellt sind die insgesamt 11 Exons von *PEX10* in Form oberer, heller Rechtecke, die transmembran-durchspannenden Regionen (TM) sowie das Ringfingermotiv C3HC4. Die Darstellung spiegelt die räumliche Lage der einzelnen Komponenten zueinander wider.

#### 19.4 Konstruktion der Transposon-Linie

Im Fall von *Athpex10* wurde ein Ds-Element so inseriert, dass die endogene Promotoraktivität von *PEX10* detektiert werden könnte. Das Ds-Element hat hierbei die Funktion einer Genfalle (DsG-Element), weil es innerhalb der codierenden Region des deletierten Gens liegt. Mithilfe des GUS-Gens, das seinerseits unter Kontrolle des endogenen Promotors von *pex10* steht, könnte die Promotoraktivität des deletierten Gens untersucht werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass das Element in der korrekten Richtung (von 5' nach 3') transkribiert werden kann. Abbildung B13 zeigt die Konstruktion des DsG-Elements innerhalb des *Athpex10*-Gens.



**Abb. B13:** Aufbau und Insertion des DsG-Elements in *Athpex10*; (I): *Arabidopsis* Intron; (A): „Triple splice Akzeptor“; (GUS): Glucuronidase-Gen; (Kan): Kanamycinresistenz-Gen (nach Sundaresan *et al.*, 1995).

## 19.5 Die genetische Phänotypanalyse

Nachdem die bei NASC bestellten Transposon-Samen eingetroffen waren, wurde die Hälfte von insgesamt 14 Samen zuerst auf MS-Platten ohne Kanamycin ausgebracht, um das Saatgut zu amplifizieren. Die Transposon-Samen wurden mit durchlaufenden Nummern T1 bis T7 bezeichnet. Zwei der originären Samenlinien starben vorzeitig ab. Erst die Nachkommen der verbliebenen fünf Samenlinien wurden dann auf die Transposon-Insertion hin getestet. Dies geschah durch Selektionsdruck auf Kanamycin-Medium und anschließende Überprüfung resistenter Pflanzen im Hinblick auf Insertionsrichtung und Lokalisation des Transposons mithilfe der PCR und geeigneten Primern.

### 19.5.1 Segregation der Keimlinge auf Kanamycin

Von den verbliebenen fünf Linien wurden jeweils 50-60 Samen sowohl auf MS-Platten mit und ohne Kanamycin als Selektionsmarker ausgebracht. Nach 10 Tagen zeigten nur die beiden Linien T3 und T7 zu 62 % und 64 % Resistenz gegen Kanamycin. Auf den Kontrollplatten ohne Kanamycin lag die Überlebensrate für alle fünf Linien bei 98-100 % der Keimlinge.

Je 14 Keimlinge der transgenen Linien T3 und T7, die zuvor auf Kanamycin gewachsen waren, wurden dann in Töpfe mit Erde transferiert. Bei einer normalen Vererbung mit einem unabhängigen Ereignis sollten 1/3 dieser Pflanzen homozygot für das Transposon sein, was sich in der F2-Generation mit 100 %iger Kanamycinresistenz manifestieren würde. Tatsächlich segregierten jedoch alle 28 Individuen der beiden Linien sobald ihre Samen erneut auf Kanamycin ausgebracht worden waren. Tabelle B7 zeigt die Segregationsraten für vier Pflanzen der F2-Generation von T3 und T7 auf Kanamycinmedium. Die durchschnittliche Überlebensrate aller Keimlinge zusammen ergibt 63,9 %.

Anzahl der Keimlinge (n)	Zahl der Überlebenden (n)	Überlebensrate (%)
97	59	61
103	68	66
107	71	66
170	107	63

**Tab. B7:** Überlebensrate von Keimlingen heterozygoter Transposonpflanzen nach 6 Tagen Wachstum auf MS-Platten mit Kanamycin.

### **19.5.2 Verifikation und Ausrichtung der *pex10*-Insertion mittels PCR**

Um die Genotypen der 28 Pflanzen aus zwei Linien molekularbiologisch zu definieren, wurde von Blattmaterial kanamycinresistenter Pflanzen genomische DNA isoliert und mithilfe der Polymerasekettenreaktion und geeigneten Primern DNA-Fragmente amplifiziert. Auftreten und Länge dieser Produkte erlauben einen Rückschluss auf die Ausrichtung des Transposons und darauf, ob neben der Transposon-Insertion noch ein intaktes endogenes *PEX10* Allel vorhanden war.

### **19.5.3 Aufspaltung und makroskopischer Phänotyp der Samen innerhalb der Schoten**

Da alle untersuchten transgenen Individuen heterozygot für das Ds-Element blieben, mussten die homozygoten Genotypen bereits im Laufe der Samenentwicklung abgestorben sein. Deshalb wurden reifende Schoten von heterozygoten Transposon-Linien unter dem Bino-kular geöffnet und die Entwicklung der Samenreife mit Schoten von *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen verglichen.

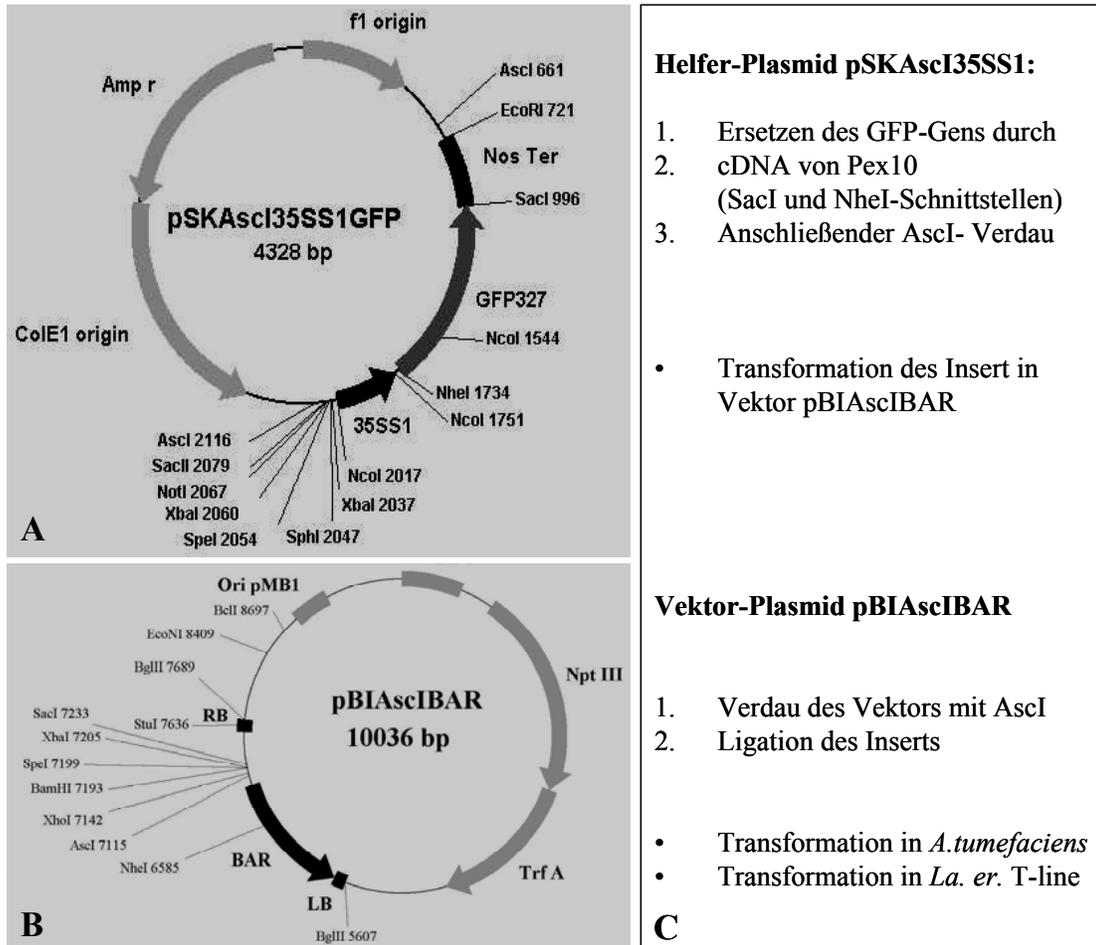
## **19.6 Komplementation der letalen Transposon-Linie mit der cDNA von *AthPEX10***

Für den Beweis der Korrelation von 22 %iger Letalität bei sich entwickelnden Embryonen und der *pex10*-Deletion in der Transposon-Linie, wurde diese durch die Klonierung der cDNA von *AthPEX10* komplementiert, um die Letalität aufzuheben.

### **19.6.1 Verwendete Plasmide und Klonierungsstrategie**

Bei der Komplementation der Transposon-Linie mit der cDNA von *AthPEX10* wurden zwei modifizierte Plasmide der Ausgangsvektoren pSK sowie pBI221 verwendet (Hoffmann, 2001). Zuerst wurde im Helferplasmid pSKAscI35SS1GFP das GFP-Gen mithilfe der Restriktionsschnittstellen *SacI* und *NheI* ausgeschnitten und durch die cDNA des *PEX10*, das dieselben Restriktionsschnittstellen besitzt, ersetzt (Abb. B14). Damit stand die Expression von *AthPex10p* unter der Kontrolle des konstitutiven 35SS1-Promotors und dem NOS-Terminator. Mithilfe von *AscI*, das im pSK-Plasmid zweimal schneidet, lässt sich das Insertionskonstrukt in den Expressionsvektor pBIAscI $\bar{B}$  transferieren, der zuvor auch mit *AscI* verdaut worden ist. Von nun an ist die Expression des peroxisomalen Gens mit dem Markergen für die *bar*-Resistenz gekoppelt.

Nach erfolgter Transformation des Plasmids in den Stamm pGV3850 von *Agrobacterium tumefaciens* und die Transfektion in heterozygote Transposon-Linien, ist über die Selektion auf MS-Platten mit Bialaphos und Kanamycin ein Primärscreening von Pflanzen möglich. Vitale Pflanzen besitzen dann mindestens ein Allel der *pex10*-Deletion durch das Transposon, als auch die cDNA des *PEX*-Gens als Komplement.



**Abb. B14:** Klonierungsstrategie der Komplementation einer *Athpex10*-Transposon-Linie mit der cDNA von *AthPEX10*; (A), Vektorkarte des Helferplasmids pSKAscI35SS1GFP; (B), Vektorkarte von pBIAscIBAR; (C), Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte.

### 19.6.2 Doppelselektion auf Keimlinge mit Kanamycin- und Phosphinotricinresistenz

Eine Doppelselektion auf transgene Pflanzen, die sowohl Kanamycin- als auch *bar*-Resistenz zeigen, setzt voraus, dass der Selektionsdruck auf nicht-Transgene möglichst hoch ist. Hintergrundkontamination durch Keimlinge, die zwar lebensfähig, aber nicht transgen sind, erschweren das weitere Screening. Deshalb wurden zuerst Kontrollversuche mit *bar*-resistenten und Wildtyp-Pflanzen durchgeführt, um die adäquate Methode zur

Herbizidanwendung für eine möglichst vollständige Selektion aller nicht-transgenen Keimlinge auszutesten.

### **19.7 Lichtmikroskopische Untersuchungen an letalen und vitalen Embryonen**

Um den Zeitpunkt des Entwicklungsabbruchs letaler homozygoter Transposon-Linien bestimmen zu können, wurden die Samen unter Binokularkontrolle aus ihrer Schote entfernt und auf einem Objektträger mit einigen Tropfen Hoyer's Medium (7,5 g *Gummi arabicum*, 100g Chloralhydrat und 5 ml Glycerol in 30 ml Wasser) inkubiert, das als Klärungsmittel diente (Liu & Meinke, 1998). Nach Inkubation von wenigen Minuten bis zu einer Stunde waren die Zellwände der Samenschalen durch das Chloralhydrat soweit aufgelöst, dass eine Bestimmung des embryonalen Entwicklungszustandes im Lichtmikroskop möglich war. Hierzu wurde ein Zeiss Axioskop mit angeschlossener Digitalkamera von Nikon verwendet.

### **19.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an letalen und vitalen Embryonen (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Wanner)**

Für Ultrastruktur-Untersuchungen der Zellen von putativ letalen Embryonen wurden diese mit 2,5% Glutaraldehyd in 75 mM Cacodylat-Puffer (pH 7,0) fixiert und im Department Biologie I, der Ludwig-Maximilians-Universität München mit OsO<sub>4</sub> nachfixiert, in einer aufsteigenden Serie von Aceton-Lösungen dehydriert, in Spurr's Harz infiltriert und anschließend eingebettet. Schließlich konnten von Prof. Dr. G. Wanner Ultradünnschnitte angefertigt und in einem Transmissionselektronenmikroskop von Zeiss (EM 912) mit integriertem OMEGA Strahlenfilter bei 80 kV im „zero loss“-Modus elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht werden.

### **19.9 Histochemische GUS-Färbung einer heterozygoten Transposon-Linie**

Zur Herstellung eines Reaktionspuffers wurden 5 mg X-GLUC (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-beta-D-Glucuron-Cyclohexylammoniumsalz; Gold Biotechnology) in 50 µl Dimethylformamid gelöst und mit 5 ml 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0 verdünnt.

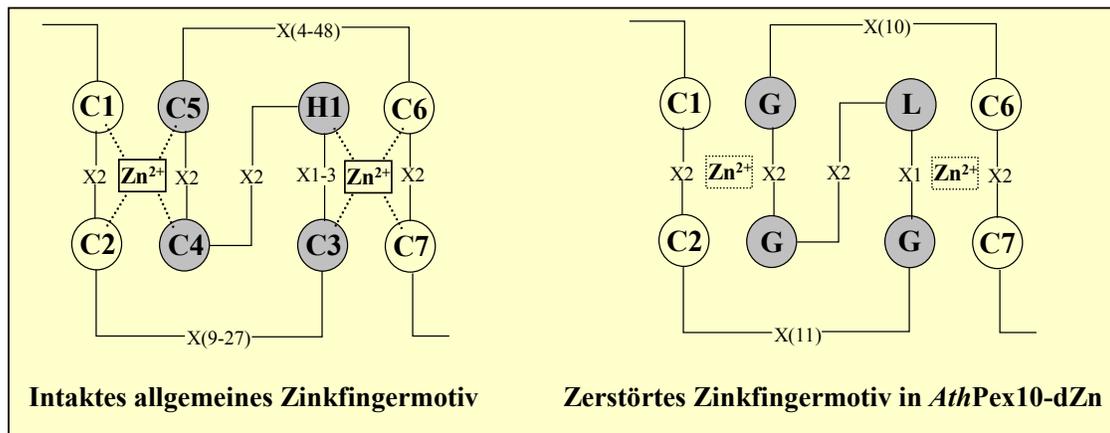
Die Färbung erfolgte durch Überführen isolierter Embryonen und junger Dunkelkeimlinge in ein Eppendurf-Reaktionsgefäß mit 300 µl Reaktionspuffer und anschließender Inkubation für 2-3 h bei 37°C. Die Farbreaktion kann mit 70%igem EtOH für 30 min bei 65°C ge-

stoppt werden. Die Blaufärbung der Pflanzen erfolgt unter Binokularkontrolle. Für Detail-Informationen vergleiche Jefferson *et al.* (1987) und Rodrigues-Pousada *et al.* (1993).

## 20 Generierung und Analyse einer dysfunktionalen Zinkfinger-Linie

Zur Klärung der Funktion von *AthPex10p* wurde eine Pflanzenlinie erzeugt, in der das C-terminale Zinkfingermotiv  $C_3HC_4$  des Membranproteins ausgeschaltet wird. Dies erfolgte durch den Austausch einzelner Nukleotide in der cDNA von *AthPEX10* und führte zur Exprimierung von Aminosäuren als Liganden, die keine Bindungsaffinität mehr zu ihrem zentralen Zinkion aufweisen konnten. Die Expression des Gens findet zwar statt, aber die Funktion des Zinkfingers als Interaktionspartner geht verloren. Dadurch ließen sich eventuell milde Auswirkungen auf das phänotypische Erscheinungsbild einer solchen Pflanzenlinie untersuchen, die bei vollständigem Verlust der Expression von Pex10p einen letalen Phänotyp des Embryonalstadiums ausbildet.

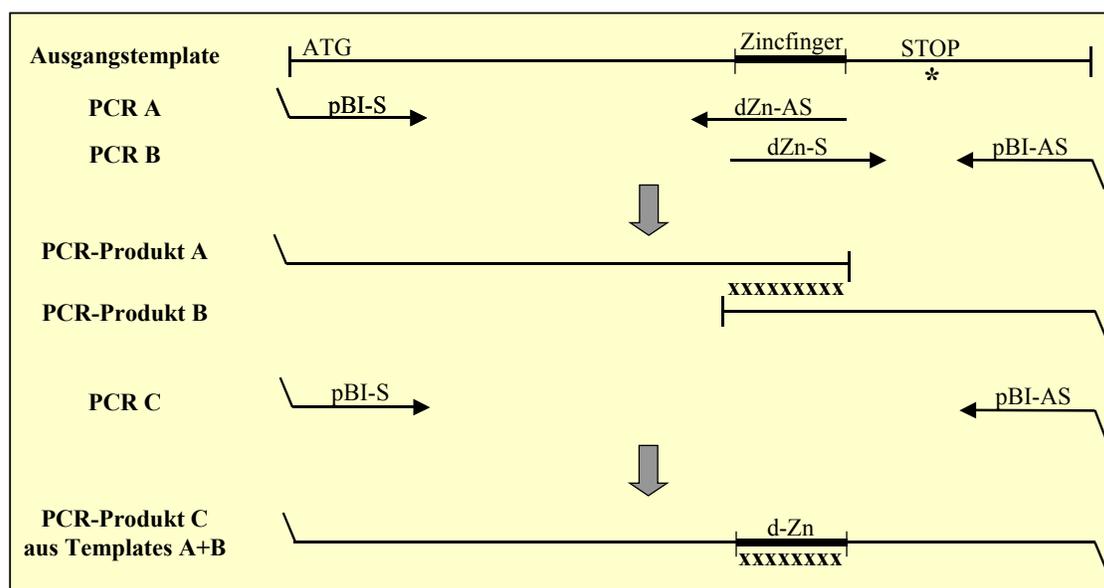
Abb. B15 zeigt die zweidimensionale Anordnung der Zinkatome und ihrer Liganden in der funktionellen Form eines allgemeinen Zinkfingermotivs  $C_3HC_4$  sowie in der dysfunktionellen Form  $C_2GLG_2C_2$  der *Athpex10-dZn*-Linie. Das Zinkatom wird hierbei normalerweise in einer tetraetrischen Struktur festgehalten, die von den konservierten Aminosäureresten des Cystein- und Histidinmoleküls geformt wird. Durch Austausch der funktionellen Aminosäuren geht die funktionale räumliche Anordnung des Zinkfingers verloren.



**Abb. B15:** Schematische Darstellung des allgemeinen Zinkfingermotivs (links) (verändert nach Borden & Freemont, 1996) sowie des ausgeschalteten Zinkfingermotivs in *AthPex10-dZn* (rechts). Die Dysfunktionalität erfolgte durch den Austausch der dunkel unterlegten Cysteine in Glycin und des Histidins zu Leucin.

## 20.1 Erzeugung eines dysfunktionalen Zinkfinger-cDNA-Konstrukts mithilfe der „splicing by overlap extension“-PCR-Methode

Durch gezielte Nukleotidaustausche innerhalb der Cysteine Nummer 3, 4 und 5 sowie des Histidins im Zinkfingermotiv, läßt sich die Funktionalität dieser konservierten Proteindomäne zerstören. Erreicht wurde es durch Anwendung zweier spezifischer Primer, die einmal vom 5'-Ende und einmal vom 3'-Ende des Zinkfingermotivs innerhalb der *PEX10*-cDNA angreifen. Die Primerpaare komplementieren jedoch nicht die vollständige Sequenz des funktionellen Zinkfingermotivs, sondern enthalten einzelne Veränderungen in den Basentriplets. Die Codierung für die Expression eines Cysteins „tgt“ oder „tgc“ wurde in „ggg“ für Glycin umgeschrieben, aus „cat“ für Histidin wurde „ctt“ und somit Leucin. Das Prinzip der „*splicing by overlap extension*“-Methode beruht auf drei singulären PCR's, die in Abb. B16 dargestellt sind.



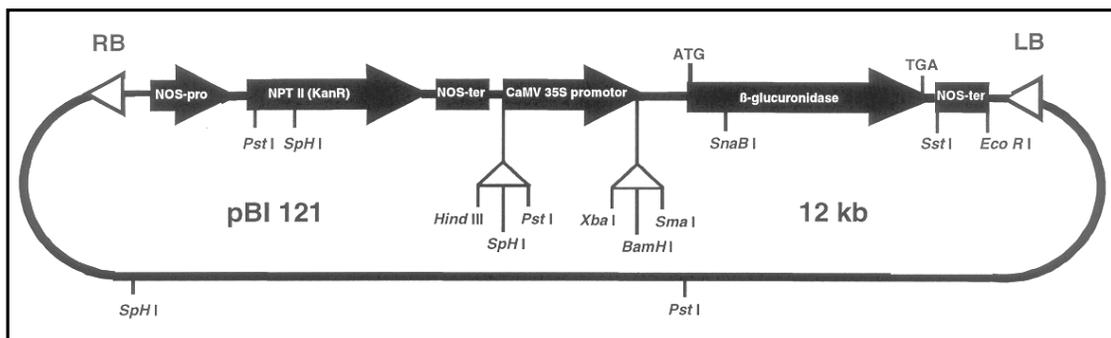
**Abb. B16:** Klonierung einer *Athpex10*-cDNA mit Punktmutationen innerhalb des Zinkfingermotivs. Die Veränderungen der konservierten Aminosäuren erfolgte mithilfe der „*splicing by overlap extension*“-Methode (Horton *et al.*, 1989). Als Ausgangstemplate diente ein Vollängenklon von *AthPEX10* im Excisionsvektor pZL1. Die Schwanzanhänge in den pBI-Sense- und Antisense -Primern repräsentieren eine *BamHI*- beziehungsweise eine *SacI*- Restriktionsschnittstelle.

Eine PCR A amplifiziert hierbei zuerst ein Teilstück des Zinkfinger-„disruption“-Gens vom 5'-Ende mit dem pBI-Sense-Primer AAG GAT CCA TGA GGC TTA ATG GGG ATT CG und dem dZn-Antisense-Primer ACC GCT CCA ACC AAA CAC AAG ACC ACC AGG AGT GGC CGT TGG. Eine PCR B mit dem pBI-Antisense-Primer TTG AGC TCG TCT TGT AAT AGA TCT CCA AT und dem dZn-Sense-Primer GGT GGT CTT GTG TTT GGT TGG AGC GGT ATT ATG GAA TGG TGC amplifiziert das abgeänderte Gen vom 3'-Ende des Ausgangstemplats. Beide unvollständigen Genprodukte aus der

PCR A+B enthalten nun einen Abschnitt des Zinkfingers, der durch Nukleotidveränderungen dysfunktional wurde. In einer dritten PCR werden nun die beiden Ersttemplates A+B zusammen als Ausgangstemplates für die beiden pBI-Primer benutzt, die jeweils vom 5'- und 3'-Ende des *PEX10*-Gens angreifen und gleichzeitig mit einer Restriktionsschnittstelle zur Klonierung des Volllängen-Gens in den binären Vektor pBI121 ausgestattet sind.

## 20.2 Klonierung der dZn-cDNA in den binären Vektor pBI121 und dessen Transformation in *A. tumefaciens* und *A. thaliana*

Das *Athpex10*-dZn-Konstrukt wurde mithilfe seiner Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *SacI* (Isoschizomer *SstI*) innerhalb der pBI-Primer in den binären Vektor pBI121 integriert. Ein Doppelverdau des Vektors mit beiden Enzymen entfernte die  $\beta$ -Glucuronidase und die Ligation des Inserts mit T4-Ligase führte zur Expression eines Genprodukts, das unter Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors stand und zusammen mit dem Selektionsmarker für Kanamycinresistenz transkribiert wurde. Abbildung B17 zeigt die Restriktionskarte des binären Expressionsvektors pBI121.



**Abb. B17:** Restriktionskarte des binären Vektors pBI121 von Clontech (Jefferson, 1987).

Im Anschluss an die Klonierung des dZn-Inserts in den Vektor pBI121 erfolgte die Transformation in chemisch kompetente Zellen des Stammes pGV3850 von *Agrobacterium tumefaciens*. Nach einer Kontroll-PCR mit Plasmid-DNA der transformierten Bakterien zur Überprüfung des Inserts wurden vier Töpfe mit blühenden Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (Col.) mithilfe der Vakuum-Infiltration transfiziert (Bent *et al.*, 1994).

Von den sich entwickelnden Samen der Primärgeneration wurden jeweils ~4000 Stück auf große Petrischalen mit MS-Medium und Kanamycin (50  $\mu$ g/ml Endkonzentration) ausgebracht und transgene Pflanzen für ein weiteres Wachstum auf Einheitserde transferiert.

### **20.3 Die Analyse des Phänotyps**

Von den transgenen Nachkommen mit Kanamycinresistenz wurde der jeweilige Habitus beobachtet. Abweichungen im Gesamterscheinungsbild der Pflanzen gegenüber Wildtyppflanzen führten dazu, dass mit dem Saatgut solcher Individuen in die nächste Generation weitergezüchtet wurde, um den Phänotyp zu reproduzieren. Teilweise war ein auffälliger Habitus jedoch durch äußere Ursachen bedingt wie Wasserstress, gelegentlichen Schädlingsbefall oder schwankenden Lichtverhältnissen infolge defekter Klimakammern. In solchen Fällen führte die Falsifizierung von Phänotypen zur Stilllegung der Linie. Bei reproduzierbaren Phänotypen wurden die Linien in den Zustand der Homozygotie gebracht und ihr Saatgut für weitere Untersuchungen amplifiziert.

### **20.4 Makroskopische Phänotypbestimmung des Habitus**

Die Anzucht und das Wachstum putativer Zinkfinger-„disruption“-Linien wurde innerhalb einer Pflanzschale mit 28 Einzeltöpfen immer zusammen mit Wildtyplinien und einem Pflanzenkonstrukt mit insertionslosem Vektor pBI121 durchgeführt. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass beobachtete Unterschiede im Habitus der dZn-Linien genomisch bedingt waren und nicht auf Modifikationen z.B. durch unterschiedliches Mikroklima oder Chargen von Pflanzerde beruhten. Auffälligkeiten im Wachstum wurden mit einer digitalen Kamera Coolpix 990 von Nikon fotografiert.

### **20.5 Physiologische Phänotypbestimmung durch Erfassung von Photosyntheseparameter mithilfe des Chlorophyllfluorometers PAM-2000**

Die Fluoreszenz des Chlorophylls stellt photochemisch nicht genutzte und daher letztlich verschwendete Anregungsenergie dar. Zwischen der Chlorophyllfluoreszenz und der Effizienz der photosynthetischen Energieumwandlung, im Folgenden Quantenausbeute genannt, besteht eine quantitative Beziehung, die sich das Puls-Amplituden-Modulationsgerät PAM 2000 zunutze macht:

$$\text{Fluoreszenz} + \text{Photochemie} + \text{Dissipation} = 1.$$

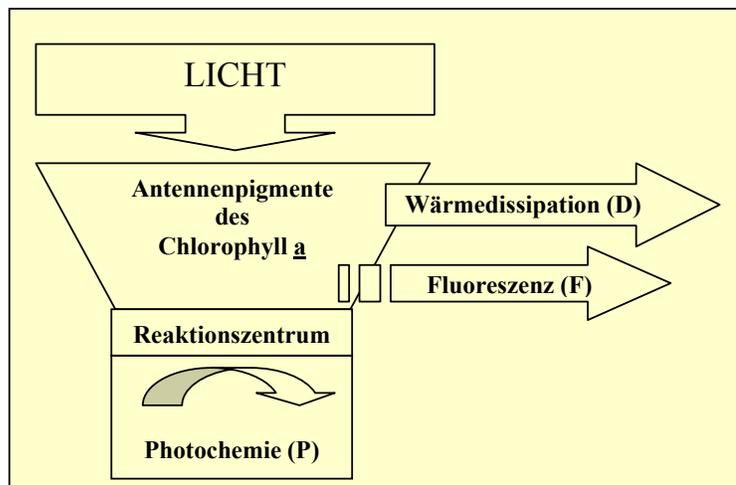
Durch zwei Fluoreszenzmessungen kurz vor und während eines sättigenden Lichtpulses lassen sich die beiden Relativgrößen Fluoreszenz und Wärmedissipation so bestimmen, dass sich die Photochemie des zu untersuchenden Blattes daraus ableitet. Diese Methode eignet sich somit sehr gut für ein Screening von dZn- Mutanten, deren photochemische Energieumwandlung gestört ist. Die hohe Effizienz des Chlorophyllfluorometers PAM-

2000, mit dem sich der physiologische Status eines pflanzlichen Organismus aufzeigen läßt, kann dabei sogar aufwändige Gaswechsellmessungen ersetzen (Schroeter *et al.*, 1992).

Unter *in vivo* Bedingungen stammen die Fluoreszenzveränderungen fast ausschließlich vom Chlorophyll *a*, das im Photosystem II lokalisiert ist. Aussagen über die Energienutzung und die Energiedissipation beziehen sich deshalb auch nur auf das PSII. Durch Absättigung der photochemischen Energieumwandlung im PSII mithilfe eines sehr starken Lichtpulses, wird die Quantenausbeute im PSII kurzfristig auf null gedrückt. Dadurch werden nach dem Energieerhaltungsgesetz Dissipation und Fluoreszenz maximal. Die effektive Quantenausbeute des PSII kann aufgrund der Basis dieser „Sättigungspulsmethode“ bestimmt werden und ist in folgender Gleichung beschrieben:

$$\text{Quantenausbeute von PSII} = (F_m - F_t) / F_m = \Delta F / F_m$$

Dabei ist  $F_t$  die zu einem gegebenen Zeitpunkt gemessene Fluoreszenzausbeute und  $F_m$  die zu diesem Zeitpunkt durch einen Sättigungspuls induzierbare maximale Fluoreszenzausbeute. Messrelevant ist also die Fluoreszenzerhöhung  $\Delta F$ , die durch einen Sättigungspuls induziert wird und sich auf die zu diesem Zeitpunkt maximale Fluoreszenz  $F_m$  bezieht. Verschiedene Variabilitätsfaktoren wie Probengröße oder Messlichtintensität wirken sich somit nicht auf das Messergebnis aus, solange keine Veränderungen zwischen  $F_t$  und  $F_m$ -Messung erfolgen, welche jedoch innerhalb einer Sekunde abgeschlossen sind (Schreiber, 1997). Das Fluorometer liefert also ein relatives Maß der Chlorophyllfluoreszenz. Diese steht in direkter Konkurrenz zur Wärmedissipation und Quantenausbeute in Form photochemischer Nutzung, wie Abb. B18 veranschaulicht.



**Abb. B18:** Schematische Darstellung der Energieumwandlung am PSII Reaktionszentrum (verändert nach Schreiber, 1997).

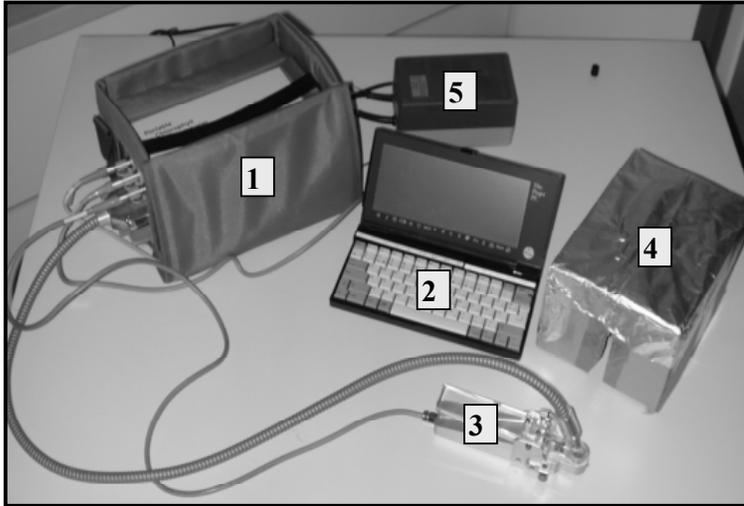
Alle an Blättern durchgeführten Messungen erfolgten *in situ* bei  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  und atmosphärischen Bedingungen. Unmittelbar

vor Beginn der Fluoreszenzmessungen wurde jeweils ein einzelnes Rosettenblatt vergleichbarer Größe am Stengelgrund abgeschnitten, in der Spannvorrichtung der Glasfaseroptik fixiert und für 10 Minuten abgedunkelt. Dieser Zeitraum reicht gewöhnlich aus, um

den Fluss des Protonengradienten zu minimieren und die Elektronenakzeptoren innerhalb der Reaktionszentren in oxidiertem Zustand zu erhalten. Durch Bestrahlung mit moduliertem Rotlicht geringer Intensität bei 600 Hz wird die minimale Fluoreszenzausbeute  $F_0$  bestimmt. Maximale Fluoreszenzausbeute  $F_m$  ergibt sich nach einem 0,8 Sekunden andauernden starken hellroten Lichtpuls bei 20 kHz, der mit einer photosynthetischen-Photonen-Fluß-Dichte PPF von  $5000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erzeugt wird und ausreicht, alle Reaktionszentren abzusättigen. Aus den resultierenden Werten berechnet nun die Software eine maximale photochemische Effizienz (Schreiber & Bilger, 1993), die bei einem gesunden, dunkeladaptierten Blatt Maximalwerte zwischen 0,75 und 0,85 erreicht bei sehr niedrigen Lichtintensitäten. Mit zunehmender Belichtungsintensität nimmt die Quantenausbeute jedoch ab, weil in erhöhtem Maße Elektronen in den Transportketten angestaut werden.

Nach Dunkelfluoreszenzbestimmung wurde photosynthetisch aktives Rotlicht (aktinisches Licht) mit  $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  zugeschaltet und 5 min gewartet bis die Fluoreszenzausbeute  $F_t$  als Funktion des aktinischen Lichts einen stabilen Wert erreicht hatte. Hiernach erfolgte erneut ein sättigender 0,8 sec anhaltender aktinischer Lichtpuls, um die maximale Fluoreszenzausbeute  $F'_m$  im lichtadaptierten Zustand zu messen. Die Software des PAM-2000 ist nun in der Lage aus den gewonnenen Einzelwerten die effektive Quantenausbeute des PSII (Yield) bei einer belichteten Probe zu berechnen. Jedoch ist diese gegenüber der maximalen Quantenausbeute einer dunkeladaptierten Probe aus zwei Gründen erniedrigt. Zum einen wird die strahlungslose Dissipation angeregt und zum andern ist auch ein Teil der Reaktionszentren geschlossen.

Desweiteren zeigt die Software die relative Elektronentransportrate ETR an, welche sich aus  $\text{Yield} \cdot \text{PAR} \cdot C$  zusammensetzt. PAR bezeichnet dabei die Flussdichte der einfallenden photosynthetisch aktiven Strahlung in  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und C eine empirische Konstante, die berücksichtigt, dass nicht alle einfallenden Quanten absorbiert werden und PSII nur ca. 50% der absorbierten Quanten erhält. Weitere wichtige Parameter sind qP (photochemischer Quenckoeffizient) und qN (nicht-photochemischer Quenckoeffizient), deren Berechnung angibt, wie effektiv das photosynthetische System arbeitet. Photochemisches Quenching ist ein Maß für den Redoxzustand des primären Elektronenakzeptors  $Q_A$  und liegt bei Null, wenn  $Q_A$  vollständig reduziert ist, weil alle Reaktionszentren geschlossen sind und die einfallende Strahlung als Fluoreszenz reemittiert wird und wird Eins bei vollständig oxidiertem  $Q_A$ , wo alle PSII-Reaktionszentren geöffnet vorliegen, um die einfallende Energie fast völlig zu absorbieren. Je höher der qP-Wert, desto effektiver arbeitet das Photosynthesesystem. Je höher der qN-Wert, umso ineffizienter ist sein Zustand, weil der Anteil der Energiedissipation steigt.



**Abb. B19:** Das portable Fluoreszenzmessgerät PAM-2000 (Walz GmbH; Effeltrich, Deutschland) mit einer zentralen Steuerungseinheit (1), dem Notebook Computer (2), einer optischen Apparatur (3), dem Transformator (5) und einer Kartonage als Verdunkelungseinrichtung (4).

Abb. B19 zeigt das aus fünf Komponenten bestehende Messsystem, mit dessen Hilfe der Vergleich photosynthetisch relevanter Parameter durchgeführt wurde. Verglichen wurden drei verschiedene Typen von Pflanzenlinien: eine dZn-Linie mit überexprimierten dysfunktionalem *pex10* (dZn1/3/5/3), eine Kontroll-Linie mit leerem Vektor pBI121 ohne dZn-Insertion sowie eine Wildtyp-Linie von *Arabidopsis thaliana*.

## 20.6 Physiologische Phänotypbestimmung der Wurzelwachstumsraten

Für einen Vergleich der Wurzelwachstumsraten zwischen Wildtyp-Pflanze, Kontroll-Pflanze mit leerem Vektor und einer oder mehrerer dZn-Linien wurden die Samen auf Petrischalen mit MS-Medium ausgebracht, das entweder 1% Saccharose als Zusatz enthielt oder zuckerfrei blieb. Danach kamen die Petrischalen zur Aufhebung der Samendormanz für zwei Tage in einen Kühlraum bei 4°C und wurden anschließend aufrecht in einer Phytokammer, beziehungsweise einer Hoch-CO<sub>2</sub>-Kammer mit 0,5% CO<sub>2</sub> und Tag/Nacht-Rhythmus aufgestellt. Das Wachstum der Keimlinge verlief also auf der Oberfläche der Agarplatte. Ab Zeitpunkt der Keimung wurde das Wurzelwachstum täglich mit Filzstift angezeichnet. Somit konnten die zurückgelegten Einzelstrecken und die aufsummierten Gesamtstrecken der Keimlinge zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Für Versuche mit Hoch-CO<sub>2</sub> wurden alle Platten zwecks verbessertem Gasaustausch, mit luftdurchlässigem Heftpflaster „SÖHNGEN Pore“ der Firma SÖHNGEN GMBH, Taunusstein umwickelt.

## 20.7 Physiologische Phänotypbestimmung der Hypokotyllängen

Der Quotient zwischen zurückgelegter Wurzelstrecke und Hypokotylstrecke war für verschiedene Linien im Dunkeln weitgehend identisch wie ein Vorversuch ergeben hat. Da

unter Dunkelbedingungen das Wachstum des Hypokotyls gegenüber den Wurzeln jedoch verstärkt ist, waren Unterschiede innerhalb verschiedener Linien durch Erfassung der Hypokotylstrecken genauer zu erfassen, als dies für die Wurzelstrecken der Fall gewesen wäre. Um das Dunkelwachstum von Keimlingen vergleichen zu können, wurden die Samen verschiedener Linien analog zur Erfassung der Wurzellängen auf MS-Medium ohne Zucker ausgebracht. Anschließend wurden die Platten mit Alufolie umwickelt und in eine Styroporbox verfrachtet, wo sie unter Lichtabschluss bei 22°C bis zu 2 Wochen exponiert wurden. Die zurückgelegten Hypokotyllängen wurden für die spätere Auswertung unter Vermeidung starken Lichtes täglich mit einem Filzstift angezeichnet.

### **20.8 Erfassung verschiedener Chlorophyllparameter von Blattpigmentextrakten**

Um eventuelle Unterschiede in den Chlorophyllgehalten von dZn-Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen und Wildtyppflanzen bestimmen zu können, wurden Blattpigmentextrakte durchgeführt und anschließend der Gehalt an Chlorophyll a, Chlorophyll b, Gesamtchlorophylle (a+b) sowie Gesamtcarotinoide (x+c) nach den Formeln von Lichtenthaler (1987) berechnet. Dies schien deshalb angezeigt, weil Vertreter der dZn-Pflanzen bereits im Keimblattstadium eine augenfällig hellere Blattpigmentierung gegenüber den Kontrollpflanzen aufwiesen.

Dazu wurde im Protokoll wie folgt vorgegangen:

- Einwiegen von ca. 50 mg stengellosem Blattmaterial gleichen Alters aus der Blattrosette in einen Mörser.
- Zugabe einer Spatelspitze Natriumbicarbonat zur Neutralisierung der Säuren.
- Mörsern des Blattmaterials mithilfe von flüssigem Stickstoff.
- Zugabe von 36 µl 100 % igem Aceton pro Milligramm Blattmaterial.
- Überführung in 2 ml- Eppendorf-Reaktionsgefäße.
- 30 Minuten abdunkeln und dabei alle 5 Minuten kurz vortexen.
- 5 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand 1:2 mit Aceton verdünnen.
- Extinktion bei 700 nm, 662 nm, 645 nm und 470 nm gegen Nullwert messen.

Zur Bestimmung der Durchschnittswerte wurden jeweils 4-6 Pflanzen einer Linie verwendet und die Mittelwerte einschließlich Standardabweichungen berechnet.

### 20.9 Elektronenmikroskopische Phänotypbestimmung

Um zu prüfen, ob sich bereits im Embryonalstadium von dZn-Pflanzen Auffälligkeiten auf Ultra-Zellebene feststellen lassen, wurden Embryonen des Herz- und Torpedostadiums, - dies war das Stadium in dem homozygote Transposon-Embryonen abstarben-, aus ihrer Samenschale herauspräpariert und elektronenmikroskopisch mit Wildtypembryonen desselben Entwicklungsstadiums verglichen.

Dazu wurden die isolierten Embryonen mit 2,5% Glutaraldehyd in 75 mM Cacodylat-Puffer (pH 7,0) fixiert und dann zur weiteren Behandlung in das Department Biologie I, der Ludwig-Maximilians-Universität in München zu Prof. Dr. G. Wanner transportiert. Dort wurden die Embryonen mit OsO<sub>4</sub> nachfixiert, in einer aufsteigenden Serie von Aceton-Lösung dehydriert, in Spurr's Harz infiltriert und anschließend eingebettet. Schließlich konnten ultradünne Schnitte in einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss EM 912) mit integriertem OMEGA Strahlenfilter bei 80 kV im „zero loss“-Modus untersucht werden.

### 20.10 Kompensation des Phänotyps durch Anzucht in Hoch-CO<sub>2</sub>-Kammern

Um einen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp einer dZn-Linie und der Photorespiration herstellen zu können, wurden sowohl Petrischalen mit Saatgut zu Beginn der Keimung als auch Pflanzschalen mit 12 Tage alten Keimlingen in eine spezielle CO<sub>2</sub>-Phytokammer von Conviron, Canada überführt. In dieser Kammer am Lehrstuhl für Grünlandlehre der Technischen Universität München, ließ sich der Kohlendioxidgehalt über ein Steuergerät auf ~1.800 ppm einstellen. Dies entspricht einem etwa 5-fach erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt gegenüber Normalatmosphäre. Der Prozess einer Photorespiration wird dadurch unterdrückt, in dessen Folge zelltoxisches H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstünde, das wiederum durch die Tätigkeit der Katalase in den Peroxisomen detoxifiziert werden muss.

### 20.11 Transkriptanalyse verschiedener dZn-Linien

Da die verschiedenen dZn-Linien unter normalatmosphärischen Bedingungen unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen zeigten, sollte mithilfe der Transkriptanalyse geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Transkriptmenge und der Ausbildung eines Phänotyps gibt. Hierfür wurden Keimlinge von *Arabidopsis*-Wildtyp, einer Vektorkontrolle, einer extrem phänotypischen Linie dZn 1/3/5/3, zwei milderer phänotypischen Linien dZn 4/11/10-4 und dZn 3/6/5-A sowie einer kanamycinresistenten Linie ohne phänotypische Auffälligkeiten (dZn 2/9/8) im Hinblick auf ihre Transkriptmenge an dysfunktionalem

*pex10* untersucht. Da sich die cDNA des dysfunktionalen Zinkfinger-*pex10* nur in wenigen Nukleotiden vom endogenen *PEX10* unterscheidet, musste eine Strategie gefunden werden, mit der sich die beiden Transkripte unterscheiden lassen. Möglich wurde dies durch das Enzym *MbiI*, das innerhalb einer Restriktionsschnittstelle im Glycin des ursprünglichen Cystein Nummer 5 im dysfunktionalen Zinkfingermotiv der *PEX10*-cDNA schneidet. Amplifiziert man also ein zinkfingerüberspannendes DNA-Fragment aus Wildtyp und „zinkfinger disruption line“ und verdaut anschließend mit *MbiI*, so sollte nur das PCR-Produkt des *dZnpex10* geschnitten werden während das Wildtyp-Produkt unverdaut bleibt. Diese Strategie läßt verschiedene Aussagen zu: ob das Transgen überhaupt transkribiert wird, ob durch das Transgen ein „Silencing“ des endogenen *PEX10* stattfindet und schliesslich ist in gewissem Umfang auch eine quantitative Abschätzung zum Verhältnis der Transkriptmengen in unterschiedlichen Linien möglich.

### **20.11.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Keimlingen**

Zur Transkriptanalyse wurde Gesamt-RNA von drei Wochen alten Keimlingen isoliert. Verwendet wurde dabei der „RNeasy-Plant-Mini-Kit“ von QIAGEN laut Herstellerprotokoll. Pro Linie wurden 100 mg Keimlinge, die auf MS-Platten angezogen wurden eingesetzt. Vor dem Mörsern in Flüssigstickstoff wurden die Wurzeln mit anhaftenden Agarresten entfernt.

Nach der RNA-Isolierung wurde der Inhalt der sechs Eppendorf-Reaktionsgefäße mit RNase freier DNaseI von AMBION (USA) bei 37°C für 30 min verdaut und anschließend ein „RNA-Cleanup“ entsprechend dem QIAGEN-Protokoll durchgeführt. Die Konzentrationsmessungen der RNA erfolgten bei 260 und 280 nm und ergaben für die jeweils eluierten 50 µl Volumen Konzentrationen zwischen 428 und 712 µg/ml. Die Aufbewahrung der RNA-Reaktionsgefäße erfolgte bei -20°C.

### **20.11.2 Durchführung der cDNA-Erststrangsynthese**

Zur Durchführung der cDNA-Erststrangsynthese wurde das „Reverse Transcription System“ von Promega, USA (Katalog Nr. A3500) verwendet. Dazu wurden jeweils 2 µg der RNA mit H<sub>2</sub>O auf 9 µl Volumen aufgefüllt, mit jeweils 1 µl Oligo-dt's versetzt und 5 min bei 70°C erhitzt, anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und auf Eis vorgehalten. Jeder Template-Ansatz wurde doppelt hergestellt um später auch eine Negativ-Kontrolle ohne Reverse Transkriptase durchführen zu können (MOCK-Kontrolle).

Zur Durchführung der Reversen Transkription wurden Prämix-Ansätze wie folgt, einmal mit Reverser Transkriptase, das andere Mal ohne Reverse Transkriptase durchgeführt:

	<b>+ RT</b>		<b>- RT</b>
4 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>		dito
2 µl	10 x Puffer		dito
2 µl	10 mM dNTP's		dito
0,5 µl	RNase-Inhibitor		dito
0,75 µl	AMV-RT	0,75 µl	H <sub>2</sub> O
0,75 µl	H <sub>2</sub> O		dito

→ zu jedem 10 µl Prämix-Ansatz die jeweiligen 10 µl Templates zugeben und 1 h bei 42°C inkubieren, anschließend mit 80 µl H<sub>2</sub>O auffüllen. Lagerung erfolgt bei -20°C.

### 20.11.3 Durchführung der PCR zur Transkriptanalyse

Zur Durchführung der PCR wurde der Pex10fwd1-Sense Primer (5'-GAA ATG CAC TCT CTG CTT AAG CAC-3') und der Pex10rev2-Antisense Primer (5'-ATG CAC TGT CCT TAG GTG TCA CTG-3') verwendet. Diese amplifizieren ein Zinkfinger-überspannendes 248 bp langes cDNA-Fragment vom C-terminalen Bereich bis in die 3'-untranslatierte Region. Als Kontroll-PCR wurden β-Tubulin-Primer N78-Sense (5'-GAG CCT TAC AAC GCT ACT CTG TCT GTC-3') und N79-Antisense (5'-ACA CCA GAC ATA GTA GCA GAA ATC AAG-3') benutzt, die ein 165 bp langes cDNA-Fragment, bzw. ein 668 bp Produkt mit genomischer DNA amplifizieren. Nach Vorversuchen mit 28, 30, 33, 35 und 38 Zyklen erwiesen sich 30 und 35 Zyklen als optimal für die Abschätzung der Quantitäten.

### 20.11.4 Aufreinigung, Amplifikation und Verdau der Transkripte mit *MbiI*

Nach der relativen quantitativen Abschätzung der Transkriptmengen zwischen den verschiedenen Linien, wurden die Transkriptbanden mit dem amplifizierten *PEX10/pex10* unterschiedlicher Zusammensetzung aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von QIAGEN (Katalog Nr. 28704) aufgereinigt. Vor dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *MbiI* wurde die aufgereinigte DNA erneut mit den beiden Primern Pex10fwd1 und Pex10rev2 amplifiziert. Die relativen Mengen an funktionaler und dysfunktionaler *PEX10*-cDNA sollte sich durch diesen Amplifikationsschritt nicht verändern. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Damit wurde gewährleistet, dass die dZn-DNA auch vollständig verdaut werden konnte, wie Vorversuche mit Plasmid-DNA

von *dZnpex10* gezeigt hatten. Die verschiedenen Verdauungen wurden schliesslich auf ein drei-prozentiges Agarosegel geladen, aufgetrennt und analysiert.

### **20.12 Lokalisation der cDNA-Insertionen bei der phänotypisch idealen Zinkfinger-Linie dZn 1/3/5/3 (in Zusammenarbeit mit Dr. H. Horvarth)**

Um die Möglichkeit ausschliessen zu können, dass mit der Integration eines oder mehrerer Transgene in das Genom von dZn 1/3/5/3 ein essentielles Gen für die Photorespiration ausgeschaltet worden war, wurde die photorespiratorische Ideallinie im Hinblick auf ihre T-DNA Insertionen untersucht. Im negativen Fall wäre der bei Hoch-CO<sub>2</sub> vollständig zu rettende Phänotyp der dZn-Linie 1/3/5/3 nicht durch die Überexpression der dysfunktionalen cDNA von *pex10* evoziert worden, sondern durch das Ausschalten eines Enzyms, das am Metabolismus der Photorespiration beteiligt ist.

Die Durchführung der Insertionslokalisationen wurde dankenswerterweise von Dr. H. Horvath am „*Department of Crop and Soil Sciences*“ der „Washington State University“ in Pullman, USA vorgenommen. Dabei kamen zwei verschiedenen Methoden zum Einsatz, um die Sequenzen zu identifizieren, die an die linke und rechte T-DNA Border der dZn-Linie 1/3/5/3 angrenzen.

Die erste Methode beruht auf der von Stahl *et al.* (2002) beschriebenen Methode. Dabei werden genomische DNA-Fragmente isoliert, die zuvor mit *Sau3AI* oder *TaqI* verdaut wurden und entweder die linke oder rechte „Border“ enthalten. Diese werden in den mit *SmaI* verdauten PUC18-Vektor hineinkloniert und die Sequenzierungsreaktionen schliesslich mit den Universalprimern M13F ausgeführt.

Eine zweite Methode, mit der zusätzliche Informationen gewonnen werden sollten, ist von Liu *et al.* (1995) sowie Liu & Whittier (1995) beschrieben worden. Die von Liu & Whittier (1995) entwickelte Arbeitsweise erlaubt die Lokalisation von DNA-Fragmenten, die an bekannte Sequenzen angrenzen. Sie beruht auf der Technik der „*thermal asymmetric inter-laced*“ (TAIL)-PCR, in der drei spezifische *nested* Primer, komplementär zur Vektor-Sequenz, an der linken und rechten Grenze eines zu lokalisierenden DNA-Fragments benutzt werden sowie drei degenerierte Zufalls-Primer (*arbitrary degenerate*) AD1, AD2 und AD3. Ein Set besteht dabei jeweils aus einem *nested* sequenzspezifischen Primer mit hoher Schmelztemperatur ( $T_m$ ) sowie einem kürzeren AD-Primer mit niedrigerer  $T_m$ . Die Effizienz der Amplifikation von spezifischen und unspezifischen Produkten kann thermisch kontrolliert werden. Für die Sequenzierungsreaktionen wurde mit gereinigten PCR-Produkten gearbeitet und die grenzspezifischen Primer LB3 (5'-GAT TTG GGT GAT

GGT TCA CG-3') und R179 (5'-CTC TCA GGG CCA GGC GGT GAA GGG C-3') verwendet.

### **20.13 Die Charakterisierung der funktionalen Bedeutung des RING-Finger-Motivs**

Um die Bedeutung des RING-Finger-Motivs für die Funktionalität des *AthPEX10*-Peroxins zu untersuchen, wurde die dysfunktionale Version der cDNA von *AthPEX10* (*Athpex10dZn*) in die *pex10*-Transposonlinie stabil integriert. Neben der Erkenntnis zur Bedeutung des Zinkfingermotivs sollte dieser Versuch auch die indirekte Schlussfolgerung auf die Integrität von phänotypischen dZn-Linien der Columbia-Pflanzen zulassen, in denen das Protein von *dZnpex10* überexprimiert wurde, aber in Konkurrenz zum endogen vorhandenen *PEX10* des Wildtyp-Genoms steht. Falls sich eine *pex10*-defiziente Transposon-Linie mit *dZnpex10* komplementieren liesse, ohne einen auffälligen Phänotyp zu entwickeln, könnte ein markanter Phänotyp in einer *Athwt::dZnpex10*-Linie nicht durch die Zerstörung des Zinkfinger-Motivs verursacht worden sein.

Die Klonierungsstrategie und das Screening nach transgenen Pflanzen erfolgte analog der Komplementation einer Transposon-Linie mit der Wildtypform von *AthPEX10*, wie sie in Kapitel 19.6 bereits ausführlich beschrieben wurde.

## C. ERGEBNISSE

In der Untersuchung wurden die cDNA-Klone für die peroxisomalen Gene *AthPEX10* und *AthPEX7* kloniert und sequenziert. Desweiteren wurde im Rahmen einer Kollaboration die cDNA der *nodule enhanced Malatdehydrogenase* (neMDH) aus der Sojabohne kloniert.

Die Funktion von *AthPex10p* wurde näher untersucht durch die Analyse einer *PEX10*-Transposon-Linie, die Erzeugung von dysfunktionalen dZn-Linien mit einem zerstörten RING-Finger-Motif, Lokalisations- und Komplementationsanalysen von *AthPex10p* in Wildtyp- und  $\Delta pex10$ -Stämmen von *H. polymorpha* - sowie der Generierung eines Antikörpers gegen *AthPex10p*-6His.

### 21 Klonierung und Sequenzierung von *AthPEX10*

Mithilfe der *PEX10*-Sequenz aus Hefe und Mensch wurde die NCBI-Datenbank nach Homologien abgefragt. Eine genomische Sequenz aus *Arabidopsis* mit Regionen hoher Identität konnte identifiziert werden (Chromosom 2, BAC T9J22). Ein anschließendes *Screening* der *Arabidopsis*-EST-Datenbank für cDNAs identifizierte eine Vollängen-cDNA von dieser Region ([T21552](#)), die jedoch eine unkorrekt gespleisste mRNA widerspiegelte. Ein 533 bp Digoxigenin-markiertes Fragment wurde amplifiziert und als Sonde zum *screenen* einer Lambda-RPL2 cDNA-Bibliothek eingesetzt (D'Alessio *et al.*, 1992). Sechs Klone konnten isoliert und sequenziert werden. Das Ergebnis der Sequenzanalyse für *PEX10* aus *Arabidopsis thaliana* ist in Abb. C1 dargestellt.

Die Sequenz der cDNA umfasst 1545 bp einschließlich der 5' und 3' untranslatierten Region und ist unter Accession No. AF119572 im „PLANT GENE REGISTER“ PGR99-025 veröffentlicht (Schumann *et al.*, 1999). Das Start-Codon liegt bei Nukleotiden 57-59, das Stop-Codon erstreckt sich von 1200-1202. Das Genprodukt besteht aus 381 Aminosäuren (AS) mit einem berechneten Molekulargewicht von 42,6 KDa. Die AS 91-96 zeigen ein TLGEEY-Motiv von bislang nicht identifizierter Funktion (Übersichtartikel Charlton & Lopez-Huertas, 2002), das in allen Pex10p-Homologen von *H. sapiens*, *C. elegans*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae* und *H. polymorpha* auftritt und typisch für diese Unterfamilie zinkbindender Proteine ist (Warren *et al.*, 1998). Je nach Programm werden ein oder zwei transmembrandurchspannende Regionen (TMR) postuliert. Die TMR-2 zwischen AS 249 und 265 in Abb. C1 wird von allen Programmen berechnet und ist mit der C-terminalen TMR in *H. sapiens* konsistent. Zusätzlich berechnet das Programm TMpred (Embnet-CH) eine weitere N-terminale TMR zwischen den AS 203-222. Das zinkbindende RING-Finger

Motiv CX<sub>2</sub>CX<sub>11</sub>CXHX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>10</sub>CPXC (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>) reicht von AS 327-364 des C-terminalen Endes von *AthPex10p*.

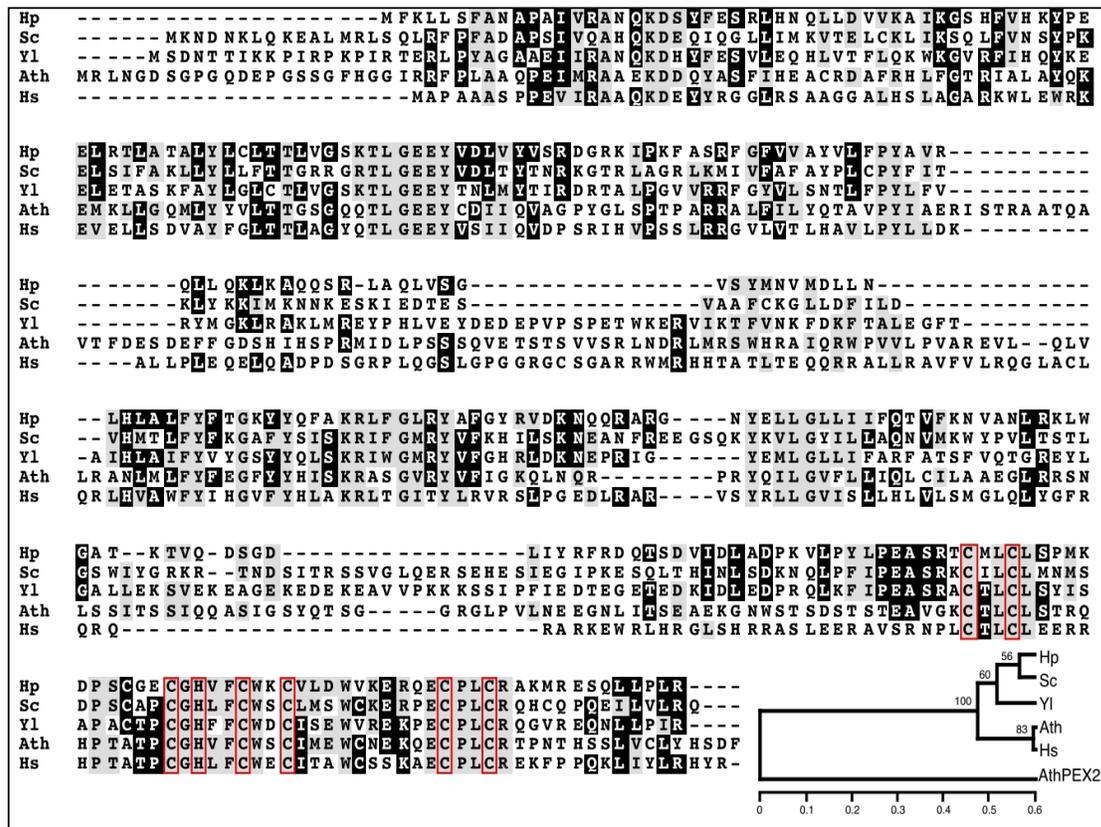
```

ccgaataaaaaacatcattcggcaagttcatcgatccacgaaaaaaagaaacgatgagg
M R
cttaatggggattcgggtccgggtcaggatgaacccggttcgagcggggtttcacggcgga
L N G D S G P G Q D E P G S S G F H G G
atcagacgattcccgttagcagctcagccggagattatgagagctgctgagaaagacgat
I R R F P L A A Q P E I M R A A E K D D
caatacgtttctttcatccacgaagcttgccgcgatgccttccgacaccttttcggtaca
Q Y A S F I H E A C R D A F R H L F G T
agaatcgctcttgcttaccagaaggagatgaagctacttggacagatgctttactatggt
R I A L A Y Q K E M K L L G Q M L Y Y V
cttacgacaggttcagggcaacaaactttaggagaggaatattgtgacattatacaggtt
L T T G S G Q Q T L G E E Y C D I I Q V KoRe
gcaggccttatggactctctcctacaccagctagacgtgctttgttcatattgtaccag
A G P Y G L S P T P A R R A L F I L Y Q
accgcagttccatataatcgagagagaattagcactcgagctgctacgcaagcagtcacc
T A V P Y I A E R I S T R A A T Q A V T
tttgatgagtctgatgagtttttgggtgatagtcatatccactaccaagaatgatagat
F D E S D E F F G D S H I H S P R M I D
cttccatcttcatctcaagttgaaacttcaacttctgtagtatctaggttaaacgataga
L P S S S Q V E T S T S V V S R L N D R
cttatgagatcgtggcaccgagctattcagcgatggcctgtggttcttctgttggccgc
L M R S W H R A I Q R W P V V L P V A R
gaagtcttacaactggttttgcgtgccaatctgatgctcttctactttgaaggttttat
E V L Q L V L R A N L M L F Y F E G F Y TMR 1
tatcatatatacgaacgtgcatccgggggttcggtatgttttcataggaagcaactgaat
Y H I S K R A S G V R Y V F I G K Q L N
cagagacctagataccaaattcttgggggttttcttctaataccaattgtgcatccttgtc
Q R P R Y Q I L G V F L L I Q L C I L A TMR 2
gctgagggccttgctcggagtaatttgtcatctatcactagctccattcagcaggcttct
A E G L R R S N L S S I T S S I Q Q A S
ataggatcttatcaaacttcaggagggaggtttacctggttttaaatgaagaggggaat
I G S Y Q T S G G R G L P V L N E E G N
ttgataaacttcggaagctgaaaagggaaactggctctacctccgattcaactcaacggag
L I T S E A E K G N W S T S D S T S T E
gcagtagggaaatgcactctctgcttaagcaccctcagcaccacaacggccactccttgt
A V G K C T L C L S T R Q H P T A T P C
ggtcatgtgttttgttggagctgcattatggaatggtgcaacgagaagcaagaatgccct
G H V F C W S C I M E W C N E K Q E C P C3HC4
ctttgtcgaacgcccaatacccattcaagtttggtttggttgtatcattctgatttttag
L C R T P N T H S S L V C L Y H S D F ER-RSM
gcacaatgggatcaacaagacaggcactgcagaaaggcaaagcagctaagacagtgaca
cctaaggacagtgcatctgctacaggaatggaatctgcttcggcttcagactttttgagt
aagatcaacaagttatgagagaagacagaataataatatttctgacatcattctcgatcc
catgcctaccttttctctatgatatttagtgagaaaccacagaggtttgttgttttac
atttcattaaaaagagttggagatggttaggtggtctttcacattctatattacatataat
aatctcaattggagatctattacaagacaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

**Abb. C1:** cDNA-Sequenz von *PEX10* aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. No. AF119572) sowie sein Genprodukt. Dargestellt sind die beiden transmembrandurchspannenden Regionen (TMR, gelb), eine in verschiedenen Pex10p hochkonservierte Region (KoRe, lila) und das Zinkfingermotiv (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>, blau). Ausserdem ist ein putatives C-terminales ER-retrieval-Signalmotiv (ER-RSM) wiedergegeben (grün). Die cDNA umfasst 1545 bp einschliesslich PolyA-Schwanz. Das Genprodukt besteht aus 381 AS mit einem Molekulargewicht von 42,6 KDa.

Einen Vergleich der Sequenzen homologer Pex10-Proteine für *Homo sapiens*, *Hansenula polymorpha* und des putativen Pex10p aus *Arabidopsis thaliana* gibt Abb. C2 wieder. Zusätzlich sind die Pex10-Peroxine für zwei weitere Hefen, *Yarrowia lipolytica* und *Saccharomyces cerevisiae* wiedergegeben sowie in Form eines Stammbaums der Grad der Verwandtschaft aller fünf Organismen zueinander. Das pflanzliche Peroxin ist hierbei zu 35% identisch mit *H. sapiens* und *H. polymorpha* und besitzt eine Ähnlichkeit von 56% mit beiden Organismen. In Bezug auf *S. cerevisiae* liegen die Werte bei 30% Identität und 50% Ähnlichkeit.



**Abb. C2:** Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Pex10-Peroxine. Hp: *Hansenula polymorpha*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*; Ath: *Arabidopsis thaliana*; Hs: *Homo sapiens*. Das TLGEF-Motiv und die beiden Transmembran-Helices sind schattiert, das Zink-bindende RING-Finger-Motiv ist eingerahmt. Der Familienbaum wurde auf Basis des „neighbour joining algorithm“ berechnet.

## 22 Klonierung und Sequenzierung des PTS2-Rezeptors *AthPEX7*

Mithilfe der *PEX7*-Sequenz aus Hefe und Mensch wurde die *Arabidopsis* EST-Datenbank nach Homologien abgefragt. Ein Treffer (EST F15393) wurde als putativer *AthPEX7*-Klon identifiziert und bestellt. Aufgrund der Sequenzierung des Klons handelte es sich um keine

Vollängen-cDNA. Deshalb wurde ein 505 bp Digoxigenin-markiertes Fragment von F15393 amplifiziert und als Sonde für das *Screening* einer Lambda-RPL2 cDNA-Bibliothek benutzt (D'Alessio et al., 1992). Die Sequenzierung zweier Vollängenklone ergab für die *AthPEX7*-cDNA eine Länge von 1.184 bp einschliesslich des PolyA-Schwanzes und ist unter Accession No. AF130973 im PLANT GENE REGISTER PGR99-060, (Plant Physiol. 120: 339) veröffentlicht. Abb. C3 zeigt das Ergebnis der Sequenzanalyse für *PEX7* aus *A. thaliana*.

```

aagactcttcttttgattcaatcactcaccggagaagaagaagaagctatgcccgggtgttc
                                     M P V F
aaagctccggttcaatggctactctgtgaaattcagtcattctacgagtcacgacctgccc
K A P F N G Y S V K F S P F Y E S R L A
gtcgtacagctcagaacttcggaattctcgaaacggccgaatccatgtcctcagactc
V A T A Q N F G I L G N G R I H V L E L
gctcctggagctccaggcgaactgaatccgtctcgtacgatacagccgacgctgtatac
A P G A P G V T E S V S Y D T A D A V Y   WD40
gacgtatggtggcagaatctcatgactctgtgctcatcgccgcaaattggtgacggctca
D V C W S E S H D S V L I A A N G D G S
gtgaagatttacgacacagctcttctcctccttctaattccgattagatcattccaagag
V K I Y D T A L P P P S N P I R S F Q E
cacgcgcgtgaggttcaatctgtggattacaatcccacgcggcgcgattcgtttctcact
H A R E V Q S V D Y N P T R R D S F L T
tcttcgtgggatgatacgggttaagctttgggctatggatcgccggcgagtgtaaggact
S S W D D T V K L W A M D R P A S V R T   WD40
ttaaaggaacatgcttattgctttatcaagcagtttggaaatcctaaacatggtgatgtg
F K E H A Y C V Y Q A V W N P K H G D V
tttgcttctgcttctggagattgtactttaaggatttgggatgtagagaacctggatca
F A S A S G D C T L R I W D V R E P G S   WD40
actatgatcatccctgctcatgatctttgagattttgtcttgattggaataagtatgat
T M I I P A H D F E I L S C D W N K Y D
gattgtatttttagctacttcttcagtgataagacagttaaggtttgggatgtaggagt
D C I L A T S S V D K T V K V W D V R S   WD40
tatagagttcctttggctgtgcttaattggatcatggatgagcggatgaggaaggatgaaattc
Y R V P L A V L N G H G Y A V R K V K F
tcgccgcataggaggagtttgatagcttcttgctcttatgatatgagtggttcttgg
S P H R R S L I A S C S Y D M S V C L W
gactatatggtggaagatgctttggttggttaggtatgatcatcacagagtttgctgtt
D Y M V E D A L V G R Y D H H T E F A V   WD40
gggatcgatatgagtggttcttgttgaaggtttaattggcgagtactggttgggatgagctt
G I D M S V L V E G L M A S T G W D E L   WD40
gtttatggttggcagcaaggatggatccttagagccagttgattcataagtaagtttgtg
V Y V W Q Q G M D P R A S *

attgcaaacagtttcatctttatgttgtggaattggtttggtttttgttaaaggaat
gtagttggaataaagttgggatcttgcttaagaagaaatgtaagttactgagagtttcac
atatgaacaaggttatctttcgaattgtaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

**Abb. C3:** cDNA-Sequenz von *PEX7* aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. No. AF130973) und sein Genprodukt. Hervorgehoben sind die sechs WD-40 Motive (gelb). Die cDNA umfasst 1184 bp einschließlich PolyA-Schwanzes. Das Genprodukt besteht aus 317 AS mit einem Molekulargewicht von 35,4 KDa.

## C. Ergebnisse

Das Startcodon erstreckt sich von Nukleotid 50-52 und das Stopcodon von 1001-1003. Sein Genprodukt besteht aus 317 Aminosäuren (AS) mit einem berechneten Molekulargewicht von 35.473 Dalton. Membrandurchspannende Regionen werden nicht postuliert. Insgesamt lassen sich sechs verschiedene WD-40 Motive identifizieren, wie aus Abb. C3 hervorgeht. Mitglieder der WD-40-Familie bestehen aus 6 WD Wiederholungen von etwa 40 Aminosäuren mit jeweils einem zentralen Trp-Asp-Motif. Die WD-Wiederholungen umfassen das gesamte Protein mit Ausnahme von ca. 60 Aminosäuren des N-Terminus. Interessanterweise sind sie oft mit Vertretern der TPR-Familie assoziiert, zu denen auch der PTS1-Rezeptor Pex5p gehört.

In Abb. C4 sind die Sequenzen homologer Proteine von Pex7p für *Homo sapiens*, *Mus musculus* und des putativen Pex7p aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt.

	10	20	30	40	50	60
HsPex7 . pep	MSAVCGGAARMLRTPGRHG	YAAEFSPYLP	PGRLACATAQH	YGIAGCG--	TL	LILDPDEAGL
MmPex7 . pep	-----MSAARTLRVPGRHG	YAAEFSPYLP	PGRLACAAAQH	YGIAGCG--	TL	LVLVDQNESGL
AtPex7 . pep	-----MPVFKAP-FNGYSVKF	SPFYESRLAVATAQN	FGILGNRIHV	LELAPGAPGV		
		. * . ** . *** . **** . ***** . ** . *				
				WD-1		
HsPex7 . pep	RLFRSFDW	NDGLFDVTWSENNEHV	LITCSGDGSLQL	WDTAKAAG--	PLQVYKEHA	QEVYS
MmPex7 . pep	QIFRSFDW	NDGLFDVTWSENNEHV	LVTCSGDGSLQL	WDTAKATG--	PLQVYKEHT	QEVYS
AtPex7 . pep	TESVSYDTA	DAVYDVCWSESHDSV	LIAANGDGSVKI	YDTALPPSPNPI	RSFQEHAREV	QS
	* . *	* . ** . *** . **** . ***** . ** . *				
				WD-2		
HsPex7 . pep	VDWSQTRGEQLV	VSGSWDQTVK	LWDPTVGKSLCT	FRGHESIIYSTI	WSPH	PGCFASASG
MmPex7 . pep	VDWSQTRGEQLV	VSGSWDQTVK	VWDPTVGNLCT	FRGHESVIYSTI	WSPH	PGCFASASG
AtPex7 . pep	VDYNPTRRDS	FELTS-SWDDTVK	LWAMDRPASV	RTFKEHAYCVY	QAVWNP	PKHGDVFASASG
	** ** . . *	** ** . *	* . ** . *	* . ** . *	* . ** . *	*****
				WD-3		WD-4
HsPex7 . pep	DQTLRIWDVKA	GVRIVIPAHQAE	ILSCDWCKY	NENLLVTGAV	DCSLRGWDL	RNV
MmPex7 . pep	DQTLRIWDVK	TGVRIVIPAHQTE	ILSCDWCKY	NENLVVTGAV	DCSLRGWDL	RNV
AtPex7 . pep	DCTLRIWDV	REPSTMIIPAH	DFEILSCDW	KNYDDC	ILATSSV	DKTVK
	* ***** . *	.. *****	***** ** . . . *	* ** . . . *	* ** . . . *	* ** . . . *
				WD-5		
HsPex7 . pep	ELLGHTYAIR	RVKFSPFHASV	LASCSDYDF	TVRFWNFSK	PDSLLETVE	HHTFTCGLDFSL
MmPex7 . pep	ELLGHTYAIR	RVKFSPFHASV	LASCSDYDF	TVRFWNFSK	PDPLETVE	HHTFTCGLDLSL
AtPex7 . pep	VLNGHGYAV	RKVKFSPHRRS	LASCSDYDMS	VLWDYMEDAL	VGRYDHHTE	FAVGIDMSV
	* ** ** . * . *****	. . . *****	* * . * . *	* * . * . *	* * . * . *	* * . * . *
				WD-6		
HsPex7 . pep	QSPTQVADCS	WDETIKIYD	PACLTIPA			
MmPex7 . pep	QSPTQVADCS	WDETIKIYD	DPVCLTVP			
AtPex7 . pep	LVEGLMA	STGWDEL	VYVWQQGMD	PRAS	WD-40 Motiv	
	. * . ** . . .					

**Abb. C4:** Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Pex7p von *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Arabidopsis thaliana*. Der PTS-2-Rezeptor ist durch insgesamt 6 WD-40 Motive gekennzeichnet.

Der pflanzliche PTS2-Rezeptor ist zu 44 % identisch und 55% ähnlich mit dem menschlichen *PEX7*-Homolog. Bezogen auf das *PEX7*-Gen der Maus liegen diese Werte bei 42% Identität und 53 % Ähnlichkeit.

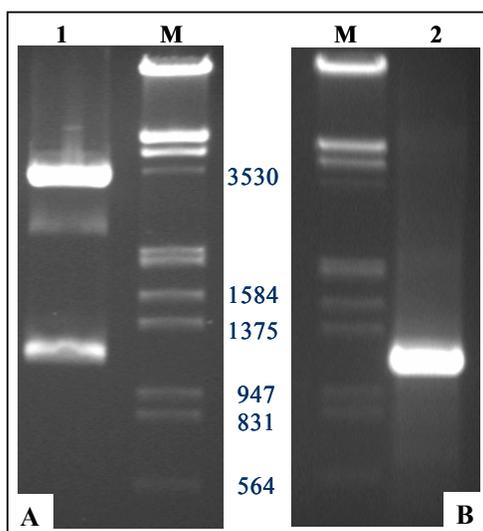
### 23 Klonierung einer nodule enhanced Malatdehydrogenase (neMDH) aus der Sojabohne (*Glycine max*)

Da es sich bei der Klonierung der *nodule enhanced Malatdehydrogenase* aus der Sojabohne im Rahmen dieser Dissertation um den Seitenzweig einer Kollaboration handelte, wird statt eines Ergebnisteils auf die Publikation der entschlüsselten Gensequenz in *American Journal of Botany* verwiesen (Imsande *et al.*, 2001).

### 24 Rekombinante Expression eines *AthPex10*-6xHis-Proteins zur Generierung von Antikörpern

Zur rekombinanten Expression von *AthPex10p* wurde die codierende Sequenz des Gens in den Expressionsvektor pQE-60 umkloniert. Dieser fügt am C-terminalen Ende des Proteins sechs Histidin-Reste an, was die spätere Aufreinigung des Zielproteins zur Antigen-Produktion über eine Nickel-Chelat-Säule ermöglicht.

#### 24.1 Klonierung von *AthPex10*-6xHis in den Expressionsvektor pQE-60 und Transformation in *E. coli* M15



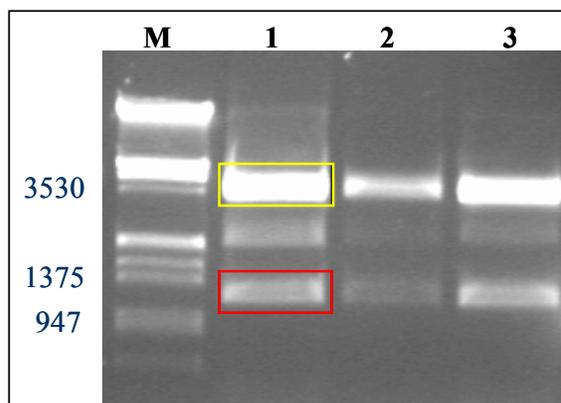
**Abb. C5:** Verifizierung der Klonierung von *AthPex10*-6xHis in pQE-60 mittels Restriktionsverdau (A) und PCR (B). (1) Vektor plus Insert; (2) PCR-Produkt; (M) Molmarker.

In die *AthPex10*-cDNA wurde mithilfe von PCR-Methodik und der beiden *AthPex10*-6xHis-Primer eine *NcoI*-Schnittstelle am N-Terminus und eine *BamHI*-Schnittstelle C-terminal eingebaut. Damit ließ sich die cDNA in die *Multiple-Cloning-Site* (MCS) des Expressionsvektors pQE-60 einbauen, welche am C-terminalen Ende einen 6x His-Tag enthielt. Die

Kontrolle der Klonierung erfolgte mithilfe der Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* (Abb. C5, Spur 1). Zusätzlich wurde von einem putativen Klon eine PCR mit den beiden

*AthPex10*-6xHis-Primern durchgeführt, um die Länge des Inserts zu überprüfen (Abb. C5, Spur 2). Die Vektorgröße betrug ohne Insert 3.400 bp. Die Länge der *Pex10*-Insertion nach Doppelverdau betrug 1.147 bp, das PCR-Amplifikat hatte eine Länge von 1.157 bp.

Nach der Klonierung von *AthPex10* in pQE-60 erfolgte die Transformation des Konstrukts in kompetente Zellen von M15, um die Expression des Proteins nach Zugabe von IPTG zu induzieren. Nach chemischer Transformation wurden von den etwa 200 Klonen ein Dutzend pikiert und auf frische LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert zur anschließenden Plasmid-Isolierung.



**Abb. C6:** Restriktionsverdau des Vektorplasmids mit *NcoI* und *BamHI* nach Transformation von *AthPex10*-6xHis/pQE-60 in *E. coli* M15. Die Nummerierungen 1-3 bezeichnen drei identische Klone. Für die Expression des Proteins wurde mit Klon 1 weitergearbeitet. Der obere Rahmen von Klon 1 zeigt den doppelverdauten Vektor (*NcoI* und *BamHI*) in Grösse von 3,4 kb an, der untere Rahmen sein Insert mit 1.147 bp.

Ein erneuter Restriktionsverdau mit den Enzymen *NcoI* und *BamHI* ergab die Vektorgröße von 3,4 kb sowie ein Insert mit 1.147 bp. Alle drei untersuchten Klone in M15 zeigten dasselbe Muster (Abb. C6). Die zusätzliche Bande bei etwa 2.500 bp stammt von Resten der „supercoiled“-Vektor-DNA. Klonierung und Transformation galten somit als abgeschlossen und Klon Eins wurde im weiteren für die Expression des Zielproteins benutzt.

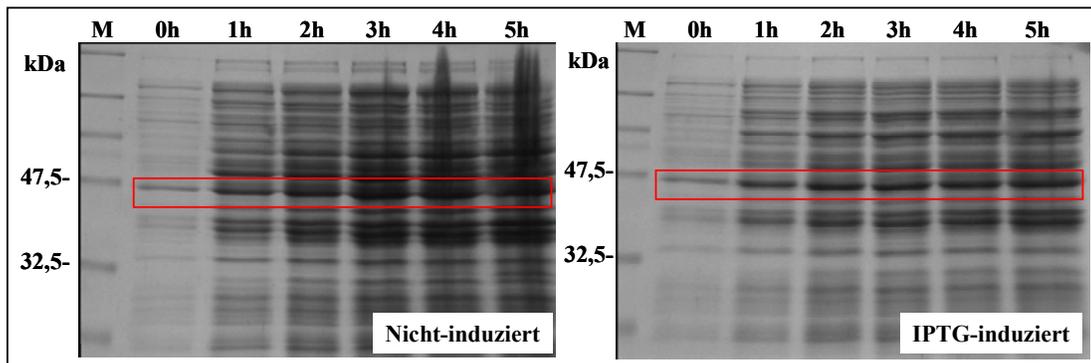
## 24.2 Expression des Zielproteins *AthPex10p*-6xHis in *E. coli*

Nach der Transformation von *AthPex10p*-6xHis/pQE-60 in M15 sollte die Expression des Zielproteins anlaufen, um nach erfolgter Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Säule Antigene für die Immunisierung von Tieren bereit zu haben. Die Expression des Zielproteins gestaltete sich dabei unerwartet schwer, weil sich unerwünschte *E. coli*-Proteine in derselben Grössenordnung wie das Zielprotein bildeten und dieses überdeckten. Mithilfe eines Detektionssystems, der Ni-NTA-AP, die spezifisch mit dem Histidinschwanz am C-Terminus von *AthPex10p* reagiert, konnte der Nachweis der Expression des Zielproteins erbracht werden, was im Folgenden dargestellt wird.

Zuerst wurde ein Klon in einem Vorversuch mit 20 ml Medium ausgetestet. Hierzu wurden zwei Erlenmeyerkolben nach Inokulation mit einer Übernachtskultur auf eine Start-OD von 0,07-0,08 gebracht. Nachdem eine OD von 0,5-0,6 erreicht war, wurde ein Kolben mit

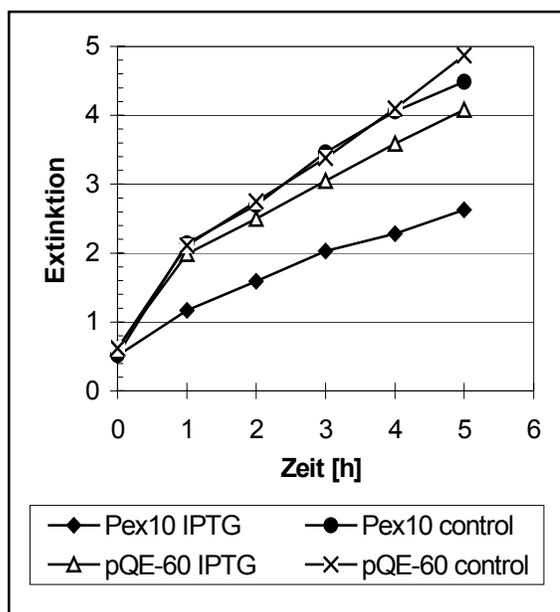
1mM Endkonzentration IPTG induziert. Die Zellen des Kontrollkolbens blieben ohne IPTG-Zugabe. Von Null bis fünf Stunden nach Induktion wurden stündlich 100 µl Zellsuspension abgenommen und auf ein SDS-Gel geladen, um die Expression zu kontrollieren.

Abb. C7 zeigt das Ergebnis der Proteinexpression nach fünf Stunden Wachstum. Es wird zwar deutlich, dass in dem induzierten Kolben quantitativ weniger Zellproteine gebildet wurden als in dem nicht-induzierten Versuchsansatz. Allerdings ist es nicht möglich, anhand der Coomassie-Färbung eine Expression des *AthPex10p-6His* festzustellen, da die Expression sehr gering war. Zudem treten in den nicht induzierten Zellen ebenfalls Proteine mit denselben Molekulargewichten auf wie das Zielprotein.



**Abb. C7:** Expression von *AthPex10-6xHis*-Protein in M15 über einen Verlauf von fünf Stunden. Links die nicht-induzierte Kontrolle, rechts die *AthPex10-6xHis*-Expression auf Coomassie-Gelen. Der linke Rahmen zeigt, dass unerwünschte *E. coli*-Proteine in derselben Grössenordnung wie das Zielprotein (rechter Rahmen) gebildet werden.

Um diesen Sachverhalt näher zu bestimmen, wurde der leere Vektor pQE-60 in M15 transformiert und erneut ein Vorversuch zur Induktion von *AthPex10-6xHis* durchgeführt. Als

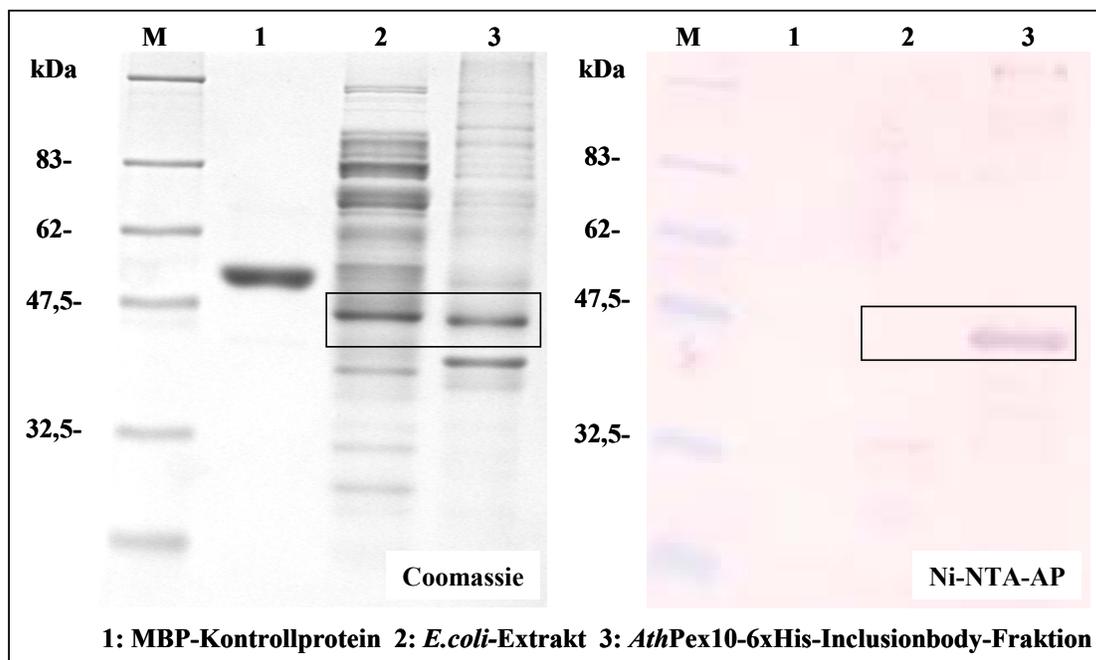


Kontrolle diente dieses Mal neben der Nicht-Induktion auch der leere Vektor ohne Insert. Auch diese Negativ-Kontrolle wurde einmal IPTG-induziert und einmal nicht.

**Abb. C8:** Zeitlicher Verlauf der Extinktion verschiedener Versuchsansätze bei  $OD_{600}$  bis fünf Stunden nach Induktion der IPTG-Kolben. Die Zellteilungsrate des IPTG-induzierten Pex10p/pQE-60-Klons ist vermindert, während die drei Kontrollen (zwei nicht-induzierte und ein induzierter pQE-60-Klon ohne *PEX10*-Insertion) eine schnellere Zellteilungsrate aufweisen.

Zu stündlichen Aliquots als Kontrolle auf einem SDS-Gel, wurden nun auch die OD<sub>600</sub> aller vier Versuchsansätze über die gesamte Zeitdauer von fünf Stunden verfolgt. Es zeigte sich, dass die Zellteilungsrate bei dem induzierten *AthPex10-6xHis*-Klon gegenüber den anderen Negativ-Kontrollen verringert ist (Abb. C8, Rautesymbol). Dies läßt vermuten, dass die Wachstumsrate der *E. coli*-Zellen auf Grund der Expression des Fremdproteins *AthPex10p-6xHis* verlangsamt war, so dass es nun im Grossversuch exprimiert werden konnte.

Pro Versuch wurden 1.600-2.400 ml 2x TY-Medium eingesetzt und die Zellen fünf Stunden nach Induktion abzentrifugiert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte zuerst unter nativen Bedingungen. Dabei zeigte sich unter Verwendung einer Nickel-NTA-Alkalischen Phosphatase (Ni-NTA-AP), die eine direkte Detektion von 6xHis getaggtten Proteinen ohne Einsatz sekundärer Antikörper erlaubt, dass das Zielprotein in Form von *Inclusionbodies* abgelagert wurde. Diese mussten nach ihrer Abtrennung zuerst aufgeschlossen werden, damit das Protein solubilisiert werden konnte. Der Nachweis, dass das Zielprotein exprimiert wurde, erfolgte mithilfe der Ni-NTA-AP und zweier Kontrollen.

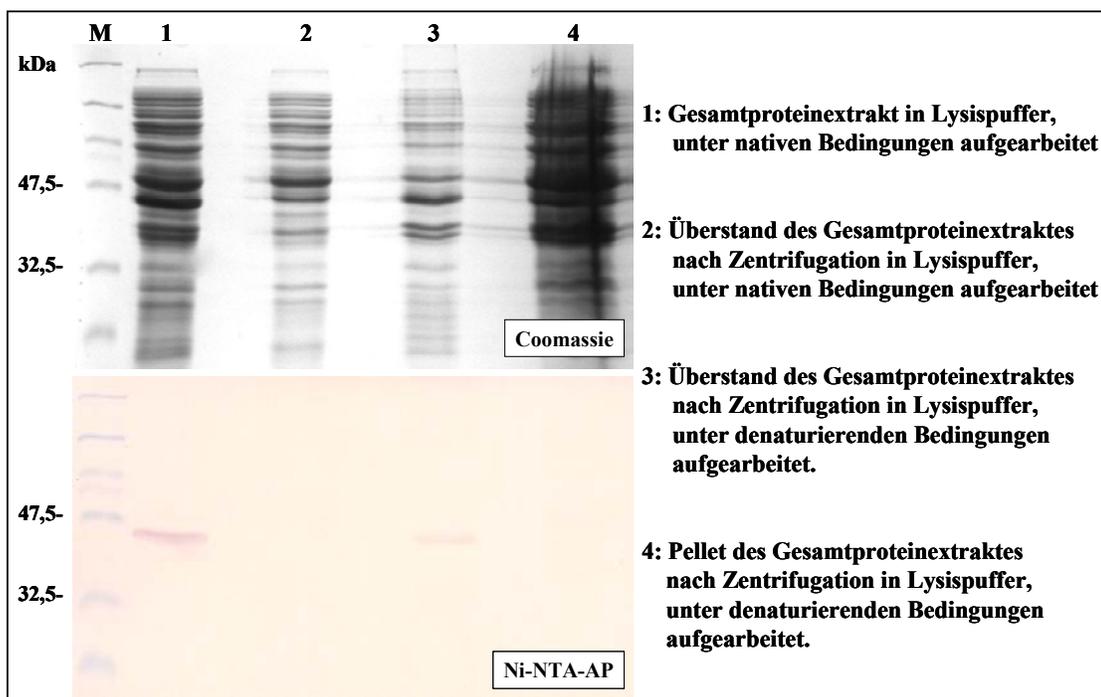


**Abb. C9:** Nachweis der Expression eines His-Tag-Proteins mit der molekularen Größe von *AthPex10p* durch Detektion mit Ni-NTA-AP (3, rechter Rahmen). Nicht-transgene *E. coli* Zellen exprimieren ein Protein gleicher Grössenordnung wie das Zielprotein (2, linker Rahmen), das jedoch nicht mit der Ni-NTA-AP reagieren kann (2, rechter Rahmen). Ein quantitativ dominierendes *Maltose-Binding-Protein* (MBP) als Negativkontrolle (1) ergibt ebenfalls kein Signal mit dem Ni-NTA-AP-Konjugat.

In Abb. C9 (Spur 1) ist ein *Maltose-Binding-Protein* (MBP)- als Negativ-Kontrolle, ein nicht-transgener Rohextrakt von *E.coli* (Spur 2) sowie die *Inclusionbody*-Fraktion des

*AthPex10-6xHis*-Proteins zu sehen (Spur 3). Die eingerahmten Proteinbanden zeigen Proteine derselben Grösse, allerdings handelt es sich in Spur zwei um einen *E.coli*-Extrakt, der kein *AthPex10-6xHis*-Protein enthält, bei Spur drei um das vermutliche Zielprotein- beide in derselben Gröszenordnung.

Die Detektion mit dem Nickel-NTA-AP-Konjugat beweist die Präsenz des Zielproteins in der *Inclusionbody*-Fraktion. Um zu testen, ob dennoch ein ausreichender Anteil des *AthPex10-6xHis*-Protein unter nativen Bedingungen löslich ist und im Überstand verbleibt, wurden verschiedene Fraktionen von Eluaten zuerst unter nativen, dann unter denaturierenden Bedingungen auf ein Polyacrylamid-Gel geladen und analysiert. Abb. C10 zeigt das Ergebnis nach Coomassie-Färbung und Detektion mit dem Ni-NTA-AP-Konjugat.

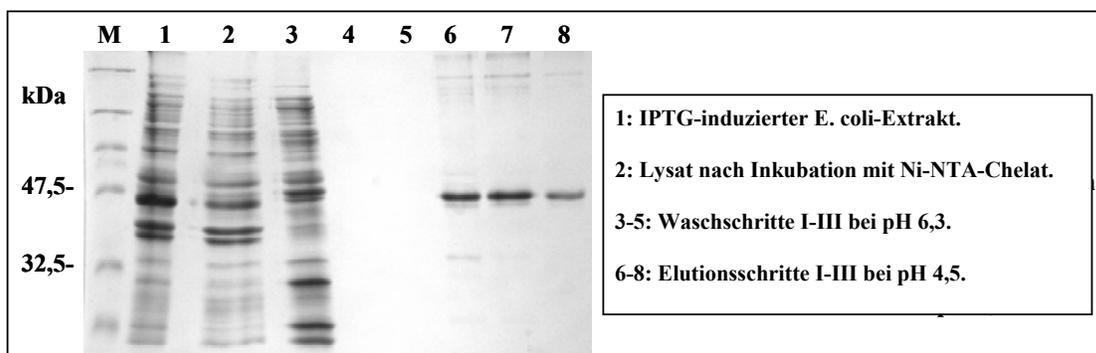


**Abb. C10:** Detektion verschiedener Protein-Fraktionen über ein SDS-PAGE zur Lokalisierung des *AthPex10-6xHis*-Proteins mit Ni-NTA-AP-Konjugat im Western-Blot. Das Zielprotein wird vollständig in Form von *Inclusionbodies* abgelagert, wie die ausschliesslichen Signale in Spur Eins und Drei des Ni-NTA-AP-Konjugats zeigen.

Aufgrund der Signale des Ni-NTA-AP-Konjugats in Spur 1 und 3 wird deutlich, dass das Zielprotein vollständig in Form von *Inclusionbodies* abgelagert wird. Unter nativen Bedingungen ist es deshalb nicht möglich, das His-tag-Protein in Lösung zu bekommen (kein Signal in Spur 2). Werden die *Inclusionbodies* unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet, liegt das Zielprotein hingegen vollständig solubilisiert vor (kein Signal in Spur 4). Deshalb wurden unter nativen Bedingungen zuerst die *Inclusionbodies* abgetrennt, um sie dann unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Guanidiniumchlorid-Puffer aufzubrechen und das His-Tag-Protein an die Nickel-NTA-Agarose zu binden.

### 24.3 Aufreinigung des *AthPex10-6xHis*-Proteins an einer Nickel-Chelat-Säule unter denaturierenden Bedingungen

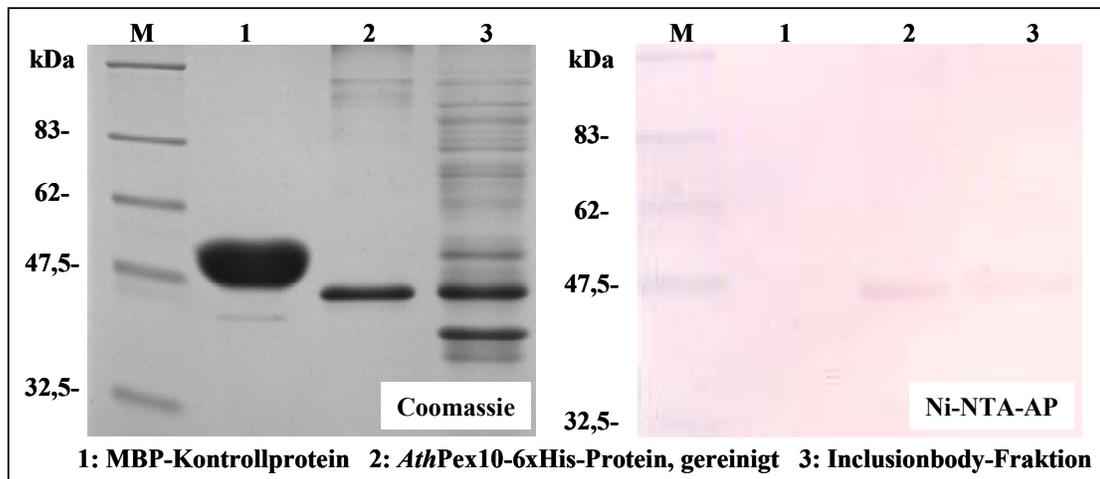
Die *E. coli*-Zellen wurden nach 5 Stunden Expression unter nativen Bedingungen aufgeschlossen, um die intakten *Inclusionbodies* mit dem *AthPex10-6His*-Protein zu isolieren. Nach Aufschluss der *Inclusionbodies* mit Guanidiniumchlorid erfolgte die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen an einer Nickel-Chelat-Säule. Dabei wurde das Gemisch aus Ni-NTA-Chelat und aufgeschlossenen *Inclusionbodies* nach der Inkubation im „Batch-Verfahren“ auf eine Pharmacia-Säule geladen. Alle ungebundenen Proteine konnten abfließen. Nach Beladen der Säule erfolgte der Waschschrift aller unspezifisch gebundenen Proteine bei pH 6,3. Die Elution des rekombinanten Proteins in Form von Monomeren geschieht bei pH 5,9 und bei pH 4,5 in Aggregaten. Es zeigte sich aber, dass bei pH 5,9 nur sehr wenig Protein zu eluieren war- erst bei pH 4,5 wurde das *AthPex10-6His*-Protein eluiert. Abb. C11 zeigt die Ergebnisse für die Aufreinigung des Zielproteins bei verschiedenen pH-Werten.



**Abb. C11:** Kontrolle der Aufreinigung von *AthPex10-6xHis*-Protein über eine Nickel-Chelat-Säule mithilfe eines SDS-Gels (12,5%) und Coomassie-Blue-Färbung. Das aufgereinigte Zielprotein besitzt eine Reinheit von 60-90 %.

Die Fraktionen 6-8 in Abb. C11 zeigen das eluierte aufgereinigte Zielprotein mit einer Reinheit von 60-90 %. Die aufgesammelten und aufkonzentrierte Einzelfraktionen des Zielproteins aus mehreren Großansätzen wurden vereinigt und zu einer für Versuchstiere verträglicheren Lösung umgepuffert.

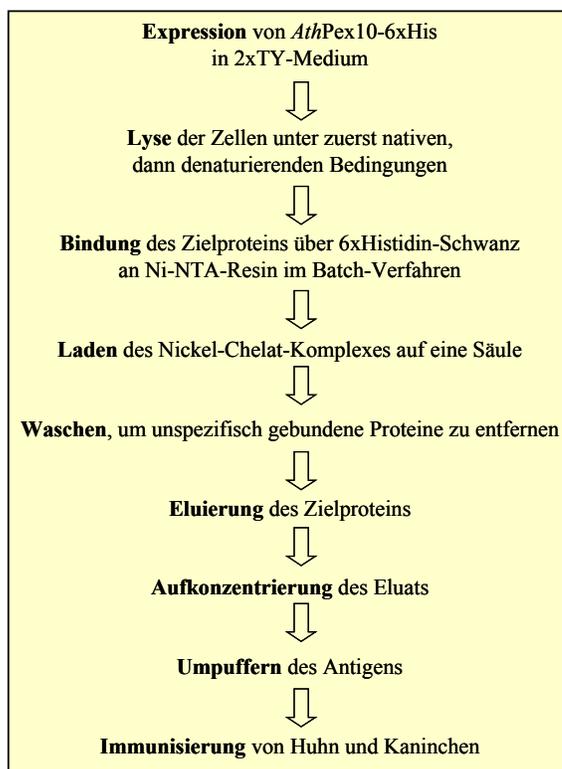
Abb. C12 zeigt einen letzten Kontrollblot des aufgereinigten und aufkonzentrierten Antigens vor Beginn der Immunisierung. Zu sehen ist ein *Maltose Binding Protein* (MBP) als Negativ-Kontrolle, das trotz quantitativer Dominanz (Spur 1, Coomassie) erwartungsgemäss kein Signal mit dem Ni-NTA-AP-Konjugat ergibt (Spur 1, Ni-NTA-AP). Das aufgereinigte His-tag-Protein sowie die *Inclusionbody*-Fraktion des Zielproteins in Lysat-Puffer reagieren hingegen mit dem Ni-NTA-AP-Konjugat, wie die beiden spezifischen Banden in einer Grössenordnung von ~43 kDa erkennen lassen (Spur 2+3, Ni-NTA-AP).



**Abb. C12:** Kontrollblot des aufgereinigten Antigens mit Ni-NTA-AP vor Immunisierungsstart.

Am Ende des Prozesses wurden somit 5,5 ml einer 2 molaren Harnstoff-Lsg. mit 150 mM NaCl + 0,1 % Triton-X100 sowie 20 mM Tris (pH 7,7) gepuffert. Diese enthielt eine Proteinkonzentration von ca. 0,8 mg/ml und wurde zur Immunisierung auf Trockeneis an die Firma „Davids-Technologie“ in Regensburg verschickt.

#### 24.4 Bilanz der Expressionseffizienz von *AthPex10-6xHis* in M15[pREP4]

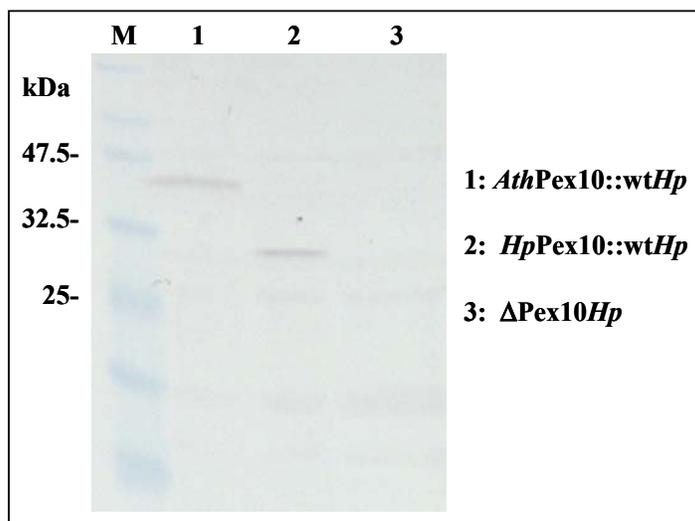


In Abb. C13 sind die einzelnen Schritte zur Herstellung und Aufreinigung des Antigens mithilfe des Ni-NTA-Systems dargestellt. Demzufolge führte die Expression von *AthPex10-6xHis* in 1 Liter 2xTY-Medium zu etwa 400 µg aufgereinigten Proteins mit einer Reinheit zwischen 60 und 90%. Nach Umpufferung und Aufkonzentrierung der Antigen-Lösung wurden insgesamt 4,4 mg des aufgereinigten Zielproteins in einer Konzentration von 800 µg/ml zur Immunisierung eines Huhns und eines Kaninchens verwendet.

**Abb. C13:** Verlauf der Antigenproduktion zur Herstellung von Antikörpern gegen *AthPex10-6xHis*.

### 24.5 Gewinnung eines Antiserums gegen *AthPex10*-6xHis-Protein

Nach Auslieferung der beiden Antiseren gegen *AthPex10*-6xHis-Protein aus Huhn und Kaninchen, wurden die beiden Rohimmunseren sowie die affinitätsgereinigten Antikörper getestet. Dies geschah mit Proteinextrakten aus *Hansenula polymorpha*, die *AthPex10p* überexprimierten (Abb. C14, Spur 1). Auch das überexprimierte *Hansenula*-Pex10p mit einer Größe von 31 kDa wird vom Antikörper gegen *AthPex10*-6xHis erkannt (Spur 2). Spur Nummer Drei zeigt die Immunodetektion mit einer  $\Delta$ -*HpPex10*-Mutante von *H. polymorpha* und diente als Negativkontrolle des Antikörpers. Die Spezifität des Antikörpers



richtete sich somit allein gegen Pex10p und keine anderen *Hansenula*-Proteine.

**Abb. C14:** AK-Detektion von Proteinextrakten verschiedener Hefekonstrukte mit  $\alpha$ -*AthPex10*-6xHis des Rohimmunserums aus dem Kaninchen, Verdünnung 1:5.000. Der Antikörper erkennt spezifisch die überexprimierten Pex10-Proteine aus *Hansenula* und *Arabidopsis*.

Von allen vier getesteten Seren zeigte das Rohimmunserum des Kaninchens die besten Resultate. Der affinitätsgereinigte Antikörper aus dem Kaninchen war schlechter als sein Rohimmunserum. Das Huhn bildete keine spezifischen Antikörper gegen das *AthPex10*-6xHis-Protein aus. Somit erschien das Rohimmunserum aus dem Kaninchen für die Immunomarkierungen am besten geeignet.

### 25 Versuch einer Funktionsanalyse von *AthPex10p* in *Hansenula polymorpha*

Die Überexpression von *HpPex10p* in *Hansenula polymorpha* berührt zwar die Proliferation, nicht aber die Integrität der Peroxisomen oder die Fähigkeit zum Import von Matrix-Proteinen (Tan *et al.*, 1995). Um den Nachweis zu führen, dass es sich bei *AthPEX10* tatsächlich um ein Peroxin handelt, wurde deshalb untersucht, ob das pflanzliche Peroxin in der Lage wäre, eine *pex10*-defiziente *Hansenula*-Mutante zu komplementieren.

Zu diesem Zweck wurde zuerst das Vollängigen und anschließend verschiedene Hybridkonstrukte zwischen *AthPex10p* und *HpPex10p* in *pex10*-defiziente Stämme von *H. polymorpha* eingebracht. Diese  $\Delta$ *pex10*-Mutanten zeichnen sich zwar durch Wachstum auf

glucosehaltigem Medium (YND-Medium) aus, nicht aber auf Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle. Die Bildung von funktionalen Peroxisomen zeigt sich daher durch die Fähigkeit zum Wachstum auf Methanol. Da es bei einer Teilkomplementation jedoch auch zur Ausbildung dysfunktionaler Peroxisomen kommen kann, die zwar morphologisch Peroxisomen darstellen, aber nicht ihre physiologischen Funktionen aufweisen, wurde mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen die Ausbildung von Peroxisomen in verschiedenartig transformierten  $\Delta pex10$ -Hefestämmen überprüft.

Indem das Volllängengenen aus *Arabidopsis* in  $\Delta Hppex10$  keine Peroxisomen induzieren konnte, wurde über eine Lokalisationsuntersuchung von *AthPex10p* in Wildtyp-Zellen von *Hansenula* analysiert, ob das pflanzliche Peroxin wenigstens in die Peroxisomen der Hefe geleitet wird. Dies geschah mit biochemischen Nachweismethoden und geeigneten Antikörpern, die das Targeting von *AthPex10p* auf Zellebene innerhalb von *Hansenula* aufklären sollten.

## 25.1 Transformation eines *pex10*-defizienten *Hansenula*-Stammes mit *AthPEX10*

Der Nachweis zur Komplementation einer  $\Delta Hppex10$ -Mutante mit *Arabidopsis*-Volllängen-Gen von *PEX10* und verschiedenen Hybridkonstrukten zwischen *Arabidopsis* und *Hansenula* erfolgte zum einen über die Kontrolle der Wachstumsraten auf Methanol und zum andern über elektronenmikroskopische Untersuchungen von Hefemutanten, die mit den verschiedenen Hybridgenen transformiert waren.

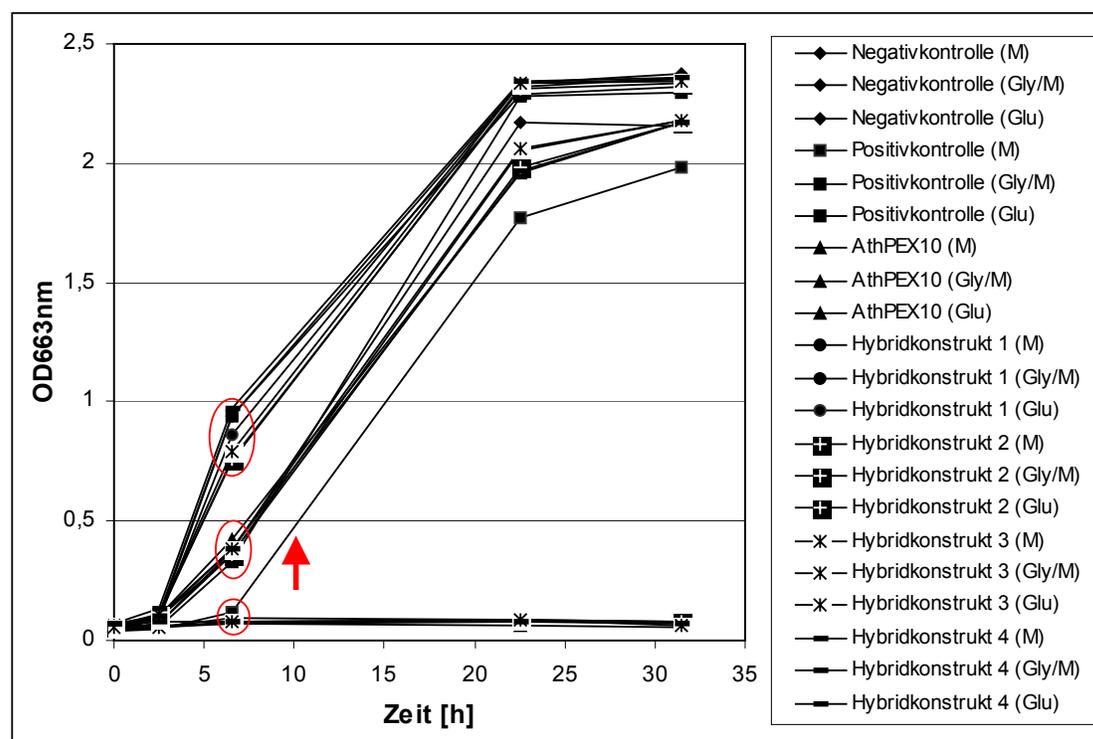
### 25.1.1 Kontrolle der Wachstumsraten auf Methanol

In Abb. C15 sind die Wachstumsraten verschiedener Hefekonstrukte auf unterschiedlichen Medien wiedergegeben. Jedes der sieben Konstrukte wurde auf glucosehaltigen Medium angezogen, auf Medium, das ein Glycerol/Methanol-Gemisch enthielt und auf Medium, das Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle aufwies (vgl. Kapitel 18.1). Untersucht wurden hierbei *pex10*-defiziente Hefestämme, die den leeren Vektor ohne *PEX10*-Insertion exprimierten und als Negativkontrolle dienten, ein Stamm der *HpPEX10* überexprimierte (Positivkontrolle), die vier verschiedenen Hybridkonstrukte (HK1-4) sowie zusätzlich eine Linie mit dem *Arabidopsis*-Volllängen-Gen. Die Fähigkeit zum Wachstum eines der Konstrukte auf Methanol würde die Ausbildung funktionaler Peroxisomen zur Voraussetzung haben.

Die Grafik in Abb. C15 zeigt ein klares Ergebnis. Der mit *HpPEX10* komplementierte *pex10*-Stamm war als einziges Konstrukt in der Lage, auf ausschließlich methanolhaltigem

Medium wachsen zu können (Abb. C15, Pfeil), während alle anderen Konstrukte ihre Ausgangs-OD nicht überschreiten konnten (Abb. C15, unterer Kreis). Das leere Vektorkonstrukt zeigt wie alle Konstrukte ein Wachstum auf Glucose (Abb. C15, oberer Kreis), erwartungsgemäss jedoch nicht auf Methanol.

Das *Arabidopsis*-Vollängen-Konstrukt ist ebenfalls nur auf glucosehaltigem Medium zur Zellteilung befähigt und unterscheidet sich hiermit nicht von einem der vier Hybridkonstrukte, die ebenfalls keine oder nur dysfunktionale Peroxisomen ausbilden konnten. Auf Glycerin/Methanol-Medium sind hingegen alle Konstrukte zum Wachstum befähigt, weil die Konsumption von Glycerin keine funktionalen Peroxisomen voraussetzt (Abb. C15, mittlerer Kreis).



**Abb. C15:** Kontrolle der Wachstumsraten verschiedener Hefekonstrukte zum Nachweis funktionaler Peroxisomen auf unterschiedlichen Medien. Der obere Kreis umfasst das Wachstum aller Konstrukte auf glucosehaltigem Medium (Glu), der mittlere Kreis auf Glycerin/Methanol-Medium (Gly/M) und der untere Kreis beinhaltet alle Konstrukte, die ausschließlich auf methanolhaltigem Medium (M) angezogen wurden. Nur die Positivkontrolle *HpPEX10* $\Delta$ *Hppex10* konnte funktionale Peroxisomen ausbilden, wie das Wachstum auf Methanol zeigt und durch den Pfeil angezeigt wird. Hingegen war das *Ath*-Vollängen-Gen-Konstrukt sowie keines der Hybridkonstrukte in der Lage, auf Methanol zu wachsen.

Zur Überprüfung, ob durch die Komplementationsversuche wenigstens eine Teilkomplementation stattfinden konnte, sich also dysfunktionale Peroxisomen ausbildeten, wurden elektronenmikroskopische Methoden eingesetzt. Die Erfassung der Wachstumsraten einer Hefekultur gibt hierüber keinen Aufschluss.

### 25.1.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis peroxisomaler Strukturen im Hybridkonstrukt HK4

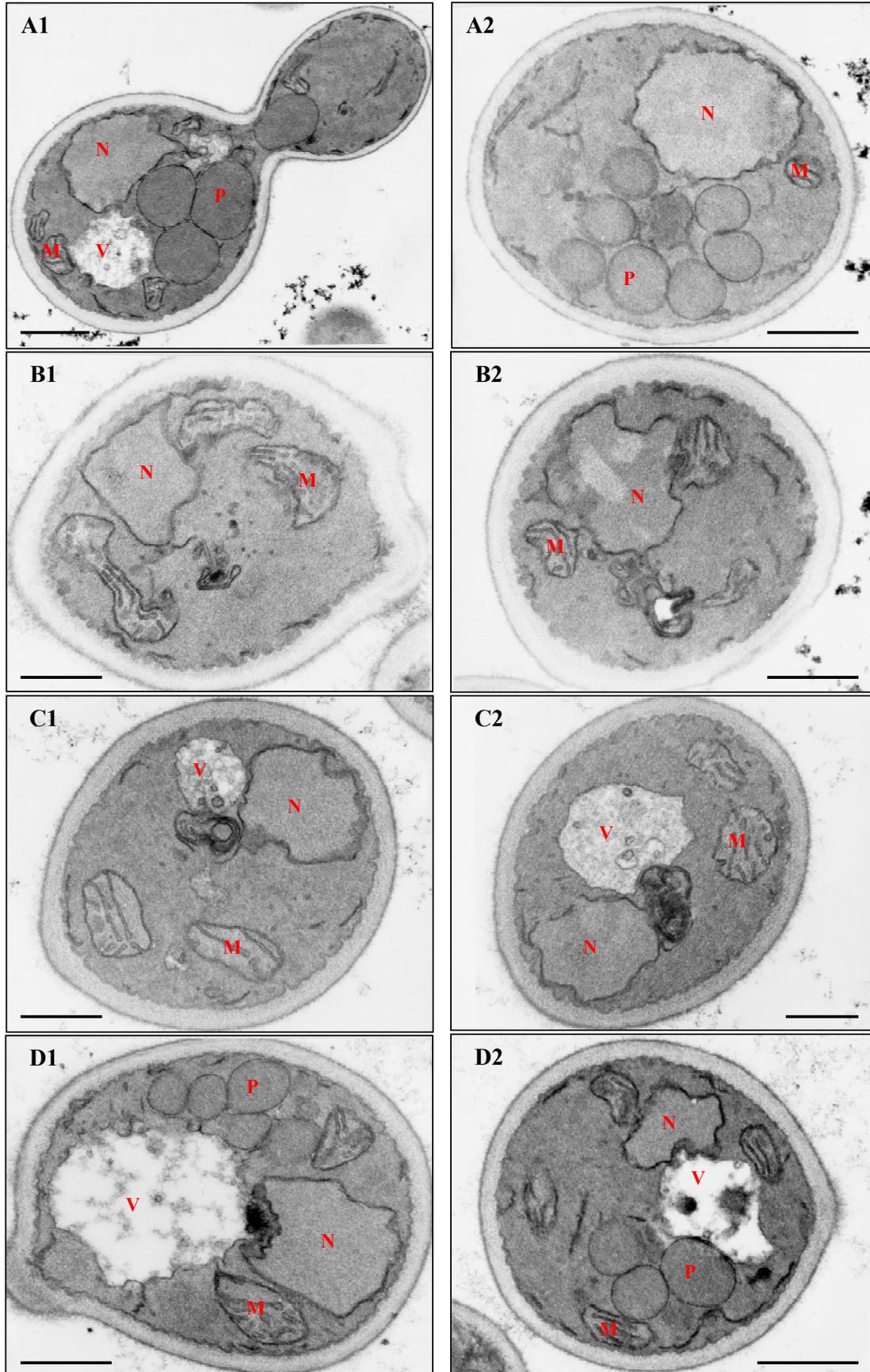
Mithilfe elektronenmikroskopischer Bildaufnahmen konnte der Nachweis erbracht werden, dass das Hybridkonstrukt HK4 in der Lage war, morphologische Peroxisomen auszubilden. Die Organellen waren zwar nicht funktional, wie das Nullwachstum auf Methanol gezeigt hatte, aber von einer Teilkomplementation ist auszugehen, wie im Folgenden erläutert wird.

Die Überexpression des *Arabidopsis*-Volllängen-Gen im Wildtyp-Stamm NCYC495leu<sup>-</sup> führte zur Ausbildung von Peroxisomen wie aus den EM-Bildern hervorgeht (Abb. C16, A). Dieses Konstrukt war in der Lage, Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen und diente als Positivkontrolle der Komplementationsversuche. Mit ihr konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *AthPex10p* die Bildung von Peroxisomen nicht beeinträchtigt. Auch die Überexpression von *Hansenula*-Volllängen-Gen im *pex10*-defizienten  $\Delta HpPEX10$  Stamm induziert funktionelle Peroxisomen, wie das Wachstum auf Methanol und die elektronenmikroskopische Auswertung der Zellen gezeigt haben (nicht dargestellt).

Die Expression von *Arabidopsis*-Volllängen-Gen im *pex10*-defizienten Stamm führte jedoch zu keinen sichtbaren peroxisomalen Strukturen (Abb. C16, B1+B2). Dieselben peroxisomendefizienten Bilder ergaben sich bei den Hybridkonstrukten HK1 und HK2 (nicht dargestellt) sowie HK3 (Abb. C16, C1+C2). Der Austausch spezifischer Peptid-Sequenzen im *Arabidopsis*-Gen durch homologe Abschnitte des *Hansenula-PEX10* führte in diesen Konstrukten nicht zur Teilkomplementation.

Deutliche peroxisomale Strukturen ergab hingegen das Hybridkonstrukt HK4 (Abb. C16, D1+D2) in dem der C-terminale *Arabidopsis*-Abschnitt durch den homologen *Hansenula*-Bereich ersetzt wurde. Da für HK4 kein Wachstum auf Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle möglich war, sind diese Peroxisomen jedoch als dysfunktionell zu betrachten. Ein zumindest teilweiser Import von Matrixproteinen läßt sich jedoch aufgrund des strukturell abgrenzbaren Matrixinhaltes gegenüber dem Cytosol postulieren.

**Abb. C16, folgende Seite:** Elektronenmikroskopische Kontrollen zum Nachweis einer Teilkomplementation einer  $\Delta Hppex10$ -Mutante mit *AthPEX10* -Volllängen-Gen (B) und verschiedener Hybridkonstrukte (C+D); Volllängen-Gen *AthPEX10* in *Hansenula*-Wildtyp zur Positivkontrolle (A); Volllängen-Gen *AthPEX10* in  $\Delta Hppex10$  (B); Hybridkonstrukt HK3 in  $\Delta Hppex10$  (C); Hybridkonstrukt HK4 in  $\Delta Hppex10$  (D). Das Hybridkonstrukt HK4 (D) war in der Lage morphologische Peroxisomen auszubilden. Das pflanzliche Volllängen-Gen führte hingegen zu keiner Teilkomplementation, ebenso wenig wie das Hybridkonstrukt HK3. M: Mitochondrium; N: Nukleus; P: Peroxisom; V: Vakuole. Balkenlänge 0,5  $\mu\text{m}$ .

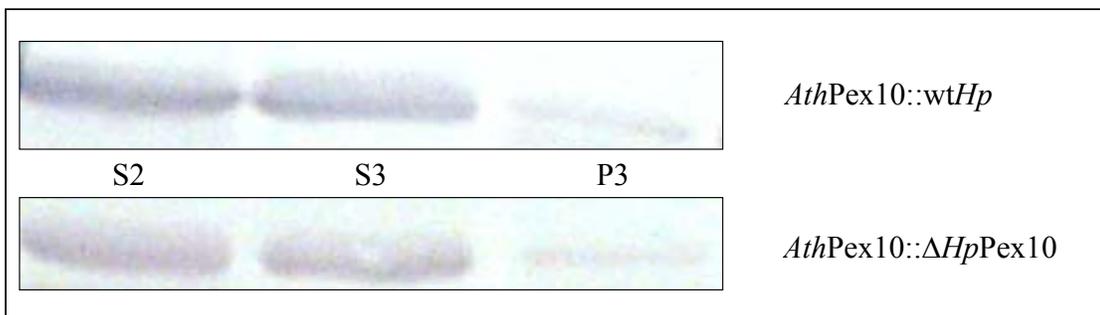


## 25.2 Biochemische Lokalisationsuntersuchungen zum Targeting von *AthPex10p* in *H. polymorpha*

Da das Volllängen-Gen von *Arabidopsis* keine (Teil)-Komplementation einer  $\Delta Hpex10$ -Mutante erlaubte, sollte versucht werden, das Targeting des pflanzlichen Proteins auf zellulärer Ebene von *Hansenula* aufzuklären. Dies geschah über die Auftrennung von Organellen am Saccharose-Gradienten mit anschließender Immunolokalisierung von *AthPex10p* und der Identifizierung verschiedener Organellen anhand ihrer Markerenzyme.

### 25.2.1 Analyse einer Differentialzentrifugation

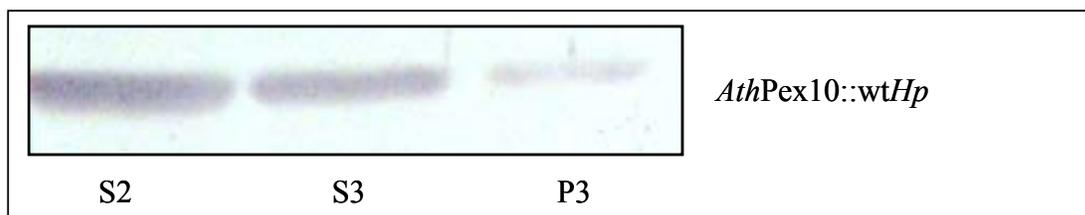
Eine Differentialzentrifugation ermöglicht die subzelluläre Fraktionierung von *H. polymorpha*-Zellen. In vorliegendem Fall wurde *AthPex10p* sowohl in *Hansenula*-Wildtyp, als auch in *pex10*-defizienten *Hansenula*-Zellen überexprimiert, um anschließend die Lokalisation des Proteins mit Antikörpern gegen *AthPex10p* zu detektieren. Die subzelluläre Fraktionierung des postnuclearen Überstandes S2 erfolgt bei 30.000 g und führt zur Separation eines Organellenpellets P3 sowie eines Überstandes S3, in dem sich cytosolische Proteine und kleinere membranöse Strukturen ansammeln, falls z.B. keine vollständigen Peroxisomen ausgebildet wurden (Abb. C17). Unter der Annahme, dass *AthPex10p* im Hefeorganismus, wie *HpPex10p* auch, in die Peroxisomen geleitet wird, müsste der Immunoblot quantitativ sein stärkstes Signal in P3 ergeben. Aus Abb. C17 ist für *Arabidopsis*-Pex10p jedoch eine Lokalisation ausserhalb der peroxisomalen Fraktion erkennbar, da der weitaus grösste Teil des Proteins sich in S3 und kaum in P3 wiederfindet. Dabei zeigt die Verteilung des *AthPex10*-Proteins keinen Unterschied zwischen einem Hefestamm, der Peroxisomen ausbildet (Abb. C17, oben) und einem peroxisomendefizienten Stamm (Abb. C17, unten).



**Abb. C17:** Immunodetektion von *AthPex10p* in TCA-Präzipitaten einer Differentialzentrifugation mit  $\alpha$ -Pex10. Der obere Blot zeigt die Überexpression von *AthPex10* in einem Wildtypstamm von *Hansenula*, die untere Reihe zeigt die Überexpression von *AthPex10p* in einem *pex10*-defizienten *Hansenula*-stamm. *AthPex10p* wird fast vollständig im Überstand detektiert (S3) und nicht in dem Organellenpellet (P3).

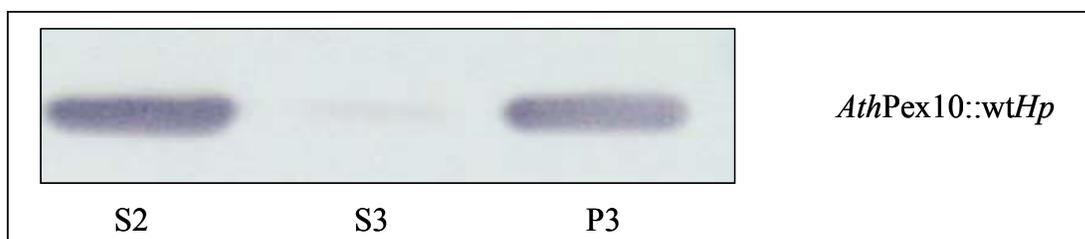
Um den Zentrifugationsverlauf im Hinblick auf seine Zuverlässigkeit zu prüfen, wurden die subzellulären Fraktionen mit zwei weiteren Antikörpern detektiert, die sich sowohl gegen die cytosolische, als auch die pelletierbare Fraktion richteten.

Abb. C18 zeigt das Ergebnis des *Western Blots* der aufgetrennten Fraktion S2 mit dem cytosolischen Kontrollmarker gegen Ethanoldehydrogenase (EDH). Der weitaus grösste Anteil dieses cytosolischen Proteins findet sich im Überstand S3, nur ein geringer Anteil in P3, was als Hintergrundkontamination der Zellaufbereitung zu werten ist. Durch Restrückstände des Überstands S3 im Pellet P3 kann das Protein auch in der Pelletfraktion detektiert werden.



**Abb. C18:** Immunodetektion von Ethanoldehydrogenase (EDH) in einem TCA-Präzipitat einer Differentialzentrifugation mit  $\alpha$ -EDH. Der Blot zeigt die Überexpression von *AthPex10p* in einem Wildtypstamm von *Hansenula*. Der cytosolische Marker EDH wird erwartungsgemäss fast vollständig im Überstand S3 detektiert und dient als cytosolische Kontrolle der Differentialzentrifugation.

Zur Kontrolle der Zuverlässigkeit von Fraktion P3 wurde ein Immuno-Blot mit  $\alpha$ -Porin durchgeführt. Dieser mitochondriale Marker muss sich über die Auftrennung einer Differentialzentrifugation im Pellet P3 wiederfinden lassen wie Abb. C19 auch deutlich erkennen läßt.



**Abb. C19:** Immunodetektion von Porin in einem TCA-Präzipitat einer Differentialzentrifugation mit  $\alpha$ -Porin. Der Immuno-Blot zeigt die Überexpression von *AthPex10p* in einem Wildtypstamm von *Hansenula*. Der mitochondriale Marker Porin wird vollständig im Organellenpellet P3 detektiert und dient als Kontrolle der Differentialzentrifugation.

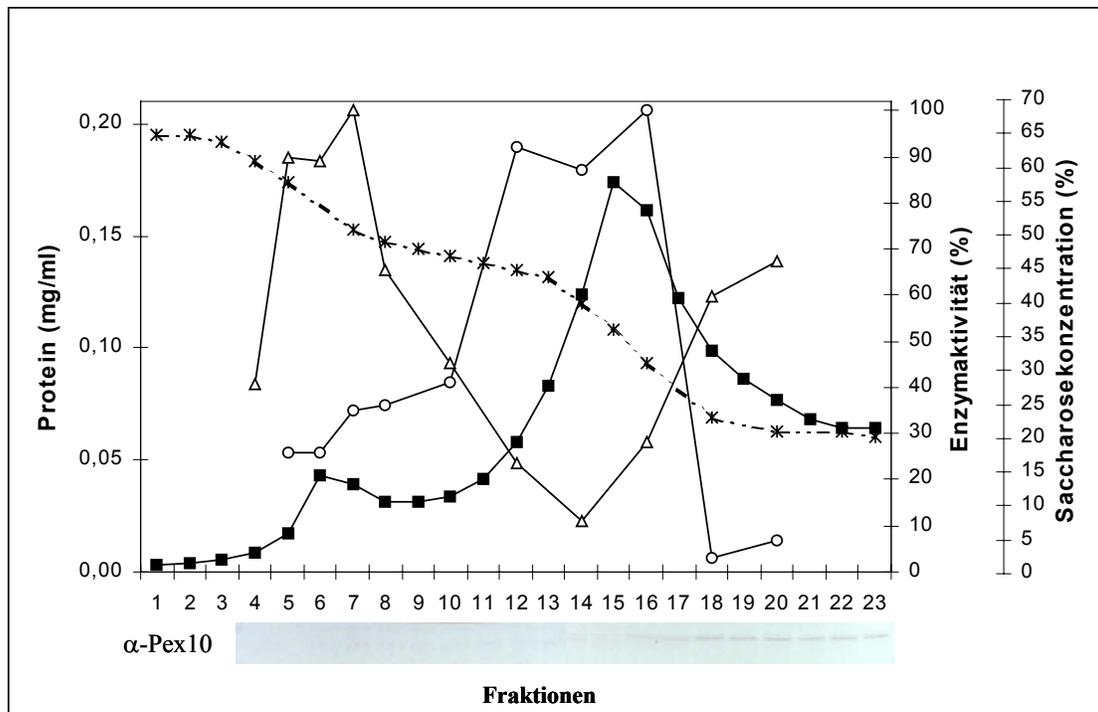
Das Ergebnis der Differentialzentrifugation zeigt eine deutliche Lokalisierung des pflanzlichen Pex10p im cytosolischen Überstand S3, bei gleichzeitig korrekter Detektion von Porin im Organellenpellet P3 und der cytosolisch lokalisierten Ethanoldehydrogenase (EDH) in Fraktion S3 von *Hansenula polymorpha*.

### 25.2.2 Analyse von Saccharosegradienten zur biochemischen Detektion von *AthPex10p*

Aufgrund des unerwarteten Befundes aus der Differentialzentrifugation, dass sich *AthPex10p* in der cytosolischen Fraktion und nicht im Organellenpellet lokalisieren lässt, wurden zwei Saccharosegradienten durchgeführt, die die verschiedenen Organellenfraktionen nach ihrer Dichte auftrennen. Mithilfe des Pex10-Antikörpers und enzymkinetischer Tests sollte das Targeting von *AthPex10p* in *H. polymorpha* genauer aufgeklärt werden.

#### ▪ Die Analyse eines Saccharosegradienten von *AthPex10p* in *Hp*-Wildtyp-Zellen:

Abb. C20 zeigt verschiedene Parameter eines Saccharosegradienten von überexprimiertem *AthPex10p* in Wildtypzellen von *Hansenula polymorpha*.



**Abb. C20:** Saccharosegradient eines postnuclearen Überstands von *AthPex10p* überexprimierenden, methanolinduzierten und homogenisierten *H. polymorpha* WT- Zellen. Dargestellt ist die Aktivität der peroxisomalen Alkoholoxidase ( $\Delta$ ), des mitochondrialen Cytochrom  $c$  ( $\circ$ ), die Proteinkonzentration ( $\blacksquare$ ) sowie die Konzentration an Saccharose ( $\ast$ ). Die Enzymaktivitäten sind angegeben als Prozentsatz der Aktivität einer Peakfraktion, die Saccharosekonzentration in (w/w) und die Proteinkonzentration in (mg/ml). Der Blot zeigt eine Immunodetektion der Fraktionen 4-23 mit Antikörpern gegen *AthPex10p*.

Die Aktivität der peroxisomalen Alkoholoxidase (AOX) zeigt ein deutliches Plateau in Fraktionen 5-7, die mit der Saccharosekonzentration von 57-50% korreliert. Der Saccharosegradient von reinen Wildtypzellen zeigt idealerweise einen peroxisomalen Peak in Fraktion 6 bei einer Saccharosekonzentration zwischen 56 und 53% (van der Klei *et al.*, 1998),

was mit den vorliegenden Werten gut übereinstimmt und für die Separation der Peroxisomenfraktion spricht. Ein weiteres Indiz hierfür ist auch ein kleinerer Peak in der Proteinkonzentration, der mit der AOX-Aktivität zusammenfällt. Ein Aktivitätsanstieg in den oberen Fraktionen (ab 15 oder 16) weist jedoch auch auf geplatze Peroxisomen hin, die ihren Matrixinhalt ins Cytosol entlassen haben.

Cytochrom *c* als mitochondriales Markerenzym besitzt seine maximale Aktivität in Fraktion 16, was mit der zweithöchsten gemessenen Proteinkonzentration zusammenfällt. (Für den höchsten Proteinwert liegt keine Messung der Cytochrom *c* Aktivität vor). Der Peak in der Proteinkonzentration wird somit erwartungsgemäss durch die hohe Konzentration an Cytochrom *c* hervorgerufen und bestätigt die Zuverlässigkeit des Gradienten.

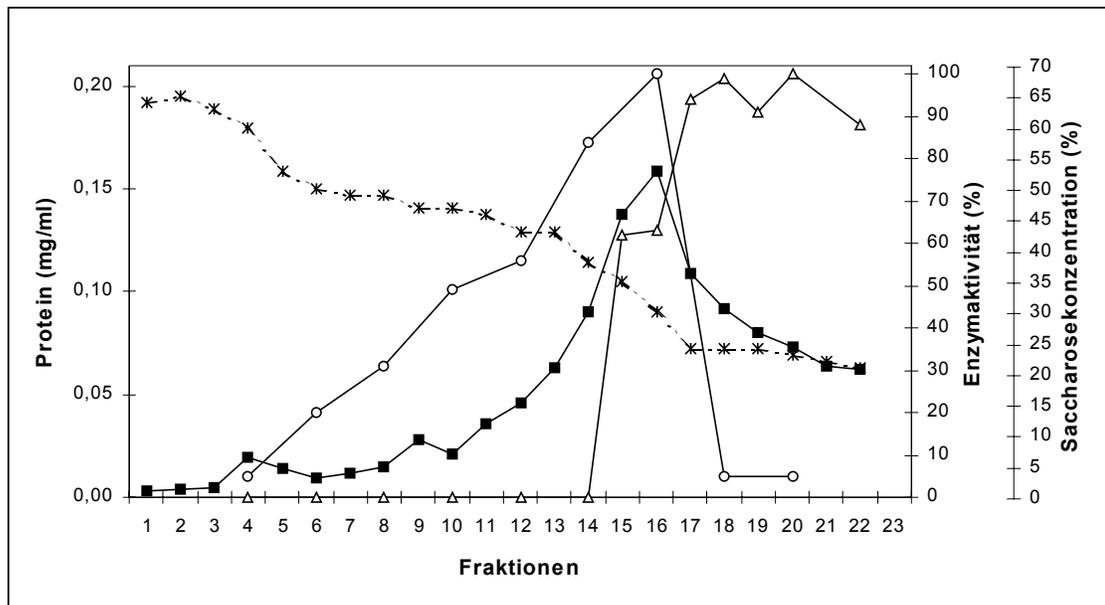
Detektiert man die Fraktionen 4-23 mit Antikörpern gegen *Arabidopsis*-Pex10p, so ist in der Peroxisomenfraktion 5-7 keine Bande erkennbar. Dagegen findet sich *AthPex10p* eindeutig in den oberen cytosolischen Fraktionen des Saccharosegradienten wieder, wie die Banden in Abb. C20, Fraktionen 18-23 zeigen. Auch eine leichtere Bande in Fraktion 17 könnte rein cytosolischer Natur sein. Allerdings lässt sich hier nicht ausschliessen, dass *AthPex10p* auch an sehr leichte Membranvesikel gebunden sein könnte, die generell über der Mitochondrienfraktion sedimentieren, wie z.B. membranöse Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

### ▪ Die Analyse eines Saccharosegradienten von *AthPex10p* in $\Delta Hppex10$ -Zellen:

Die Analyse eines Saccharosegradienten von überexprimiertem *AthPex10p* in *pex10*-defizienten Zellen von *H. polymorpha* bestätigt die elektronenmikroskopischen Befunde, dass *Arabidopsis*-*PEX10* nicht in der Lage ist, den Phänotyp *pex10*-defizienter *Hansenula*-Zellen zu retten.

Betrachtet man sich in Abb. C21 die Verteilung der prozentualen Aktivität an Alkoholoxidase, so ist in den untersuchten Fraktionen 4 und 6 mit Saccharosekonzentrationen zwischen 60 und 50% überhaupt keine Aktivität der AOX messbar. Erst ab Fraktion 15 ist ein sprunghafter Anstieg des peroxisomalen Matrixproteins zu verzeichnen, das sein maximales Plateau in den Fraktionen 17-22 besitzt. Intakte Peroxisomen konnten also nicht ausgebildet werden wie die ausschliesslich cytosolische Anhäufung der AOX im Saccharosegradienten zeigt.

Die Kurve für die Proteinkonzentration steigt von Beginn ab Fraktion 4 kontinuierlich bis zum Peak bei Fraktion 16 an und folgt damit weitgehend der Aktivitätskurve für Cytochrom *c* als Mitochondrien-Marker. Der flachere Abfall der Proteinkonzentration in den oberen Fraktionen ist dem Aktivitätsmaximum der Alkoholoxidase ab Fraktion 17 geschuldet.



**Abb. C21:** Saccharosegradient eines postnuclearen Überstands von *AthPex10p* überexprimierenden, Methanol/Glycerol-induzierten und homogenisierten  $\Delta HpPex10$ -Hansenulazellen. Dargestellt ist die Aktivität der peroxisomalen Alkoholoxidase ( $\Delta$ ), des mitochondrialen Cytochrom c ( $\circ$ ), die Proteinkonzentration ( $\blacksquare$ ) sowie die Konzentration der Saccharose ( $\ast$ ). Die Enzymaktivitäten sind angegeben als Prozentsatz der Aktivität einer Peakfraktion, die Saccharosekonzentration in (w/w) und die Proteinkonzentration in (mg/ml).

Da keine Peroxisomenfraktion ausgebildet wurde, konnte auf eine Immunodetektion mit  $\alpha$ -Pex10p verzichtet werden.

## 26 Inaktivierung von *AthPex10p* führt zum Absterben des reifenden Embryos

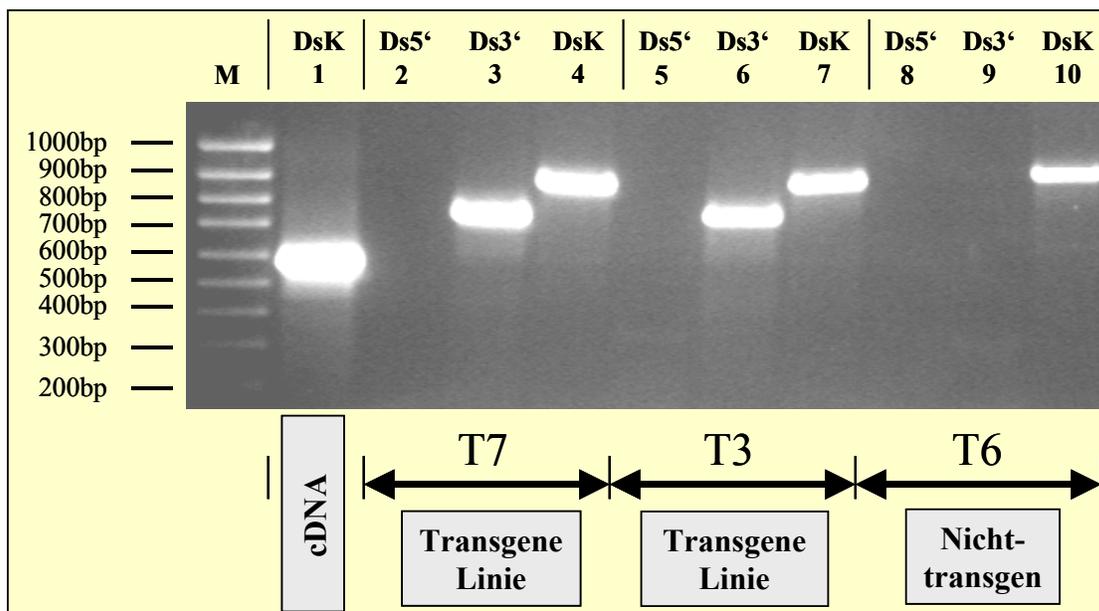
Zerstört man die Funktionalität von *AthPEX10* durch die Insertion eines Transposons, so wird in der homozygoten Transposon-Linie im Laufe der Embryonalentwicklung die Biogenese von Lipidkörpern, Proteinkörpern und Peroxisomen schwerwiegend gestört. Im Folgenden wird die Entstehung dieses Befunds näher vorgestellt.

### 26.1 Verifikation und Ausrichtung der *pex10*-Insertion mittels PCR

Um die Insertionsrichtung des Transposons innerhalb der beiden transgenen T-Linien T3 und T7 zu bestimmen, wurde Blattmaterial von jeweils 14 Nachkommen beider Linien zur Isolierung genomischer DNA verwendet. Bei einer Insertion des Ds-Elementes in Leserichtung des endogenen Promotors, könnte mithilfe des GUS-Genes die Promotoraktivität des deletierten *pex10*-Gens untersucht werden. Mithilfe geeigneter Primer und PCR-

Methoden konnte einerseits die Richtung der Transposon-Insertion bestimmt werden und andererseits, ob noch ein intaktes Allel des endogenen *PEX10*-Gens vorhanden war.

Als Sense-Primer wurde jeweils ein Oligonukleotid gewählt, das mit dem Startcodon des *AthPEX10* beginnt (*AthPex10*-S3 5'-ATG AGG CTT AAT GGG GAT TCG-3'). Ein Produkt mit einem Kontrollprimer *AthPex10*-ExonV (5'-CAC AGG CCA TCG CTG AAT AG-3') im Exon Fünf und *downstream* der Transposoninsertion zeigte, dass ein Allel des undeletierten *PEX10* vorhanden war. Die Transposonprimer *AthPex10*-Ds3' (5'-GGT TCC CGT CCG ATT TCG ACT-3') und *AthPex10*-Ds5' (5'-ACG GTC GGG AAA CTA GCT CTA C-3') fungierten beide als Antisenseprimer und gaben an, wie das DsG-Element im *PEX10*-Gen positioniert ist. Entsprechend der eingesetzten Templates ergeben sich somit verschiedene Amplifikate (Abb. C22). Geltasche 1 mit der cDNA von *PEX10* und Kontrollprimer fungiert als Positivkontrolle der PCR. Sichtbar ist hier ein 588 bp-Produkt gegenüber einem 922 bp-Produkt bei genomischer DNA wie bei den Templates von T7, T3 und T6 (Geltaschen 4,7,10). Letzteres zeigt ausschließlich ein Produkt mit den *PEX10*-Primern (Geltasche 10), da diese Linie schließlich keine Kanamycin-Resistenz besitzt und somit auch kein PCR-Produkt mit Transposonprimern zeigen darf (Negativ-Kontrollen der Geltaschen 8+9).



**Abb. C22:** Genotypbestimmung der Transposonlinien mithilfe von PCR und geeigneten Primern. (M): Molmarker; (DsK): Pex10 Exon-Antisense-Primer; (Ds3'): Transposon-Primer am 3'-Ende des Transposons; (Ds5'): Transposon-Primer am 5'-Ende des Transposons. Die PCR-Produkte lassen einerseits die Heterozygotie der beiden T-Linien T3 und T7 erkennen und andererseits die Insertion des Ds-Elementes in Leserichtung von 5' nach 3', was somit seine Transkription ermöglichen würde.

Aufgrund eines PCR-Produkts mit *PEX10*-Sense und Transposon-Primer Ds3' zeigte sich einerseits, dass das DsG-Element in Leserichtung eingebaut ist und eine GUS-Expression

somit theoretisch stattfinden könnte. Andererseits ergab das Ergebnis der PCR auch ein intaktes *PEX10*-Allel in allen untersuchten Nachkommen der beiden T-Linien T3 und T7. Alle jeweils 14 getesteten kanamycinresistenten Abkömmlinge der Linien T3 und T7 zeigten dieselben PCR-Banden als Zeichen ihrer Heterozygotie, was aufgrund des Segregationsmusters ihrer Keimlinge auf Kanamycinmedium auch zu erwarten war.

Die von 28 Pflanzen statistisch zu erwartenden 9 homozygoten Transposonpflanzen auf Selektionsmedium mussten somit bereits im frühen Stadium der Embryonalentwicklung abgestorben sein. Im weiteren wurden deshalb die Samenanlagen von transgenen T-Linien näher untersucht.

## 26.2 Die Samenanlagen in *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen

Um den Zustand der Samenanlagen in den Schoten der Transposon-Insertionslinie besser beurteilen zu können, wurden zusammen mit Transposonpflanzen auch Wildtyp-Pflanzen untersucht. Da ihre Wachstumsbedingungen identisch waren, erlaubten die Unterschiede in den Samenanlagen Rückschlüsse auf den Phänotyp der homozygoten Transposon-Embryonen.

In Wildtyp-Schoten zeigten die Samen mit ihren Embryonen ein sehr einheitliches Bild (Abb. C23), vorausgesetzt, die Wachstumsbedingungen in den Phytokammern führten zu keinen Stressbedingungen. Hitze, Wassermangel oder Staunässe, schlechte Lichtbedingungen und Pathogenbefall vermochten Abweichungen im Erscheinungsbild nicht-transgener Schoten zu erzeugen.



**Abb. C23:** Aufsicht auf die Samenanlagen einer in Längsrichtung aufpräparierten *Ath*-Wildtyp-Schote. Oben und links sind einheitliche, fast reife Samenanlagen erkennbar. Rechts handelt es sich um frei liegende, abgereifte Samen des Ruhestadiums.

Im Normalfall zeigten Wildtypsamen jedoch eine sehr gleichmäßige Entwicklung ihrer Embryonen. Gelegentlich waren innerhalb einer Schote eine bis wenige unbefruchtete Samenanlagen zu beobachten, allerdings nie befruchtete und in ihrer Entwicklung stagnierende Embryonen.

### 26.3 Die Samenanlagen in heterozygoten Transposonschoten

Im Vergleich zu den Samenanlagen in Schoten normal gewachsener *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen zeigten die Samen von Transposonpflanzen deutliche Auffälligkeiten. Diese werden im Folgenden mit Hinblick auf den makroskopischen Phänotyp und das Segregationsverhältnis von auffälligen und unauffälligen Samen näher beschrieben.

#### 26.3.1 Makroskopischer Phänotyp auffälliger Samen

Nach der Aufpräparation einer Transposon-Schote zeigte sich in aller Regel ein vom Wildtyp divergierendes Bild der Samenanlagen. In Abb. C24, Teilbild A sind drei zu unterscheidende Typen von Samenanlagen fotografisch dargestellt.



**Abb. C24:** Übersicht auf eine freipräparierte Transposonschote mit drei verschiedenen Typen von Samenanlagen. Neben vitalen, grünen Samen sind auch letale Samen unterschiedlicher Entwicklungsstufe zu erkennen (\*) sowie eine infertile Samenanlage (\*\*).

Neben grünen, sich völlig normal entwickelnden Samen sind auch chlorophyllfreie und frühzeitig abgestorbene Samenanlagen erkennbar (\*), deren Samenschale in der weiteren

Entwicklung vorzeitig abreifen und braun werden (Abb. C24, oben). Allerdings besteht der Same eines solch letalen Embryos praktisch weitgehend aus maternalem Gewebe. Der embryonale Inhalt selbst ist degeneriert und fast vollkommen absent. Die Samenschalen solcher reifen, aber tauben Samen zerfallen oftmals schon beim Abernten in ihre beiden Hälften.

In Abb. C24 (oberes Teilbild) ist ausserdem noch eine unbefruchtete Samenanlage sichtbar, wie sie gelegentlich auch in Wildtypschoten von *Arabidopsis* vorkommt. Aufgrund des deutlichen Größenunterschieds zu befruchteten, aber sich letal entwickelnden Transposon-Samen sind die infertilen weiblichen Gameten jedoch gut zu unterscheiden.

### 26.3.2 Das Segregationsverhältnis innerhalb transgener Schoten

Um Rückschlüsse auf den Genotyp der Transposon-Linien treffen zu können, wurde der Anteil vorzeitig absterbender Samenanlagen ausgezählt. In Tab. C1 sind die Segregationsverhältnisse von acht Transposonschoten wiedergegeben. Neben der Zahl vitaler und letaler Samen sind auch die Anzahl der unbefruchteten Samenanlagen dargestellt. Die Auszählung der Samen erfolgte an Pflanzen der Transposon-Linie T7, die im Mai angezogen wurden.

T7	Vitale Samen	Letale Samen	Infertile Samen	Letalitätsrate (%)
1	22	5	5	18,5
2	33	6	0	15,3
3	8	2	26	20,0
4	32	9	0	21,9
5	27	8	0	22,8
6	28	6	5	17,6
7	31	13	0	29,5
8	32	12	0	27,2
<b>1-8</b>	<b>Durchschnittliche Letalitätsrate in aufsummierten Schoten (%)</b>			<b>21,6% ± 4,5 SD</b>
<b>1-8</b>	<b>Durchschnittliche Letalitätsrate aller aufsummierter Samen (%)</b>			<b>22,2%</b>

**Tab. C1:** Segregationsverhältnisse befruchteter Samen aus acht Schoten der Transposonlinie T7.

Die Werte für die einzelnen Schoten aus Tab. C1 zeigen MiniMax-Schwankungen von 15,3-29,5% Letalität für die Embryonen einer Schote. Der Mittelwert aller Letalitätsraten zusammengenommen liegt mit 21,6% etwas unter dem Wert von 22,2% der aufsummierten Gesamtsamen. Die Standardabweichung (SD) beträgt 4,5%.

Um sicher sein zu können, dass die ausgezählten Segregationsverhältnisse unabhängig von eventuellen Schwankungen in den Aufzuchtbedingungen der Pflanzen reproduzierbar sind,

wurden im Februar erneut die Segregationsraten von 33 Einzelschoten der Transposon-Linie T3, ermittelt. Das Ergebnis der Auszählung ist in Tab. C2 dargestellt.

Linie T3	vitale Samen	letale Samen	Letalitätsrate (%)
1	27	11	28,9
2	24	7	22,6
3	25	6	19,4
4	25	6	19,4
5	28	6	17,6
6	10	5	33,3
7	28	1	3,4
8	24	10	29,4
9	22	7	24,1
10	38	9	19,1
11	22	7	24,1
12	24	6	20,0
13	29	3	9,4
14	38	12	24,0
15	33	15	31,3
16	35	4	10,3
17	16	3	15,8
18	12	5	29,4
19	31	11	26,2
20	42	15	26,3
21	30	11	26,8
22	23	8	25,8
23	27	12	30,8
24	41	6	12,8
25	28	7	20,0
26	25	6	19,4
27	32	6	15,8
28	27	4	12,9
29	21	6	22,2
30	40	6	13,0
31	22	8	26,7
32	24	5	17,2
33	19	7	26,9
<b>1-33</b>	<b>Durchschnittliche Letalitätsrate in aufsummierten Schoten (%)</b>		<b>21,3%; STAB 7,1%</b>
<b>1-33</b>	<b>Durchschnittliche Letalitätsrate aller aufsummierten Samen (%)</b>		<b>21,2%</b>

**Tab. C2:** Segregationsverhältnisse vitaler und letaler befruchteter Samen in 33 Einzelschoten der Transposonlinie T3.

Die Werte für die Letalitätsraten in einzelnen Transposon-Schoten zeigen MiniMax-Schwankungen von 3,4-33,3%. Der Mittelwert aller einzelnen Letalitätsraten liegt mit 21,3% praktisch ebenso hoch wie die 22,2% der aufsummierten Gesamtsamen. Die Standardabweichung beträgt 7,1%.

Damit liegt der Gesamtwert letaler Segregationen innerhalb der Transposonschoten im Bereich zwischen 21% und 22%, unabhängig von der Transposon-Linie oder jahreszeitlicher Schwankungen der Anzuchtbedingungen im Gewächshaus. Die Abweichungen vom Mittelwert sind innerhalb der verschiedenen Schoten jedoch ganz beträchtlich, nähern sich jedoch - bezogen auf die gesamte Pflanze - dem statistischen Wert von 25%. Die geringfügige Abweichung nach unten ist durch eine geringere genetische Fitness der Transposon-

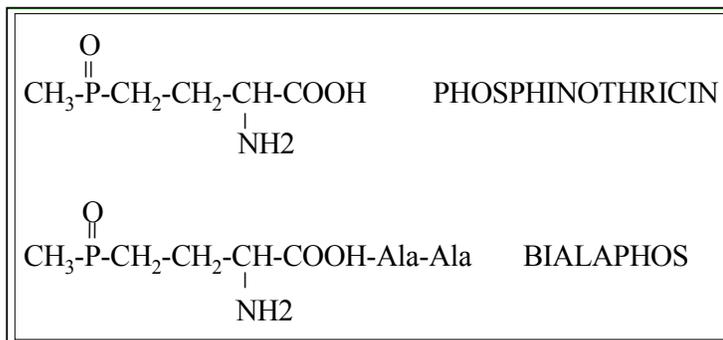
Gameten zu erklären. Das Ergebnis der Segregationsanalyse lässt darauf schließen, dass Embryonen, die homozygot für die Transposon-Insertion sind, im Laufe ihrer Entwicklung absterben.

## 26.4 Komplementation der letalen Transposonlinie mit der *AthPEX10*-cDNA

Die Komplementation der letalen Transposon-Linie erfolgte über eine Überexprimierung von *AthPEX10* cDNA, die mit dem Markergen für *bar*-Resistenz gekoppelt war. Voruntersuchungen an *bar*-resistenten Kontroll- und Wildtyppflanzen sollten zeigen, in welcher chemischen Verbindung das Herbizid seine größte Wirkung entfalten konnte, um ein effektives *Screening* transgener Pflanzen durchführen zu können.

### 26.4.1 Vorerfahrungen mit Basta® und Bialaphos®

Generell stehen zwei verschiedene Herbizide zur Verfügung, die sich in ihrer Strukturformel nur unwesentlich unterscheiden. Die Wirkungen, bedingt durch unterschiedliche Aufnahmewege in die Pflanze, sind jedoch beträchtlich. Die Herbizidwirkung von Phosphinothricin wird dabei durch Acetylierung zerstört. Dies geschieht durch das Enzym



Phosphinothricin-Acetyl-Transferase, das vom *bar*-Gen codiert wird und aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde.

**Abb. C25:** Strukturformeln von Phosphinothricin und Bialaphos®

#### 26.4.1.1 Die Anwendung von Basta®

Der aktive Bestandteil von Basta ist Glufosinatammonium. Glufosinat (=Phosphinothricin) ist ein Substratanalog von Glutamat und ein starker Inhibitor der Glutamin-Synthase (GS) in Pflanzenzellen. Solchermaßen behandelte Pflanzen akkumulieren toxische Konzentrationen an Ammonium, weil die GS nicht mehr in der Lage ist, Ammonium und Glutamat in Glutamin umzuwandeln. Allerdings wirkt Basta® erst bei Kontakt mit Blättern und grünen Stengeln der Pflanzen. Dies erfordert bis zu viermaliges Sprühen, um die nicht-transgenen Keimlinge abzutöten. Dennoch ist die Wirkung nicht 100% wie aus Abb. C26 ersichtlich ist. Bessere Ergebnisse ließen sich erzielen, wenn man die Keimlinge auf Petri-

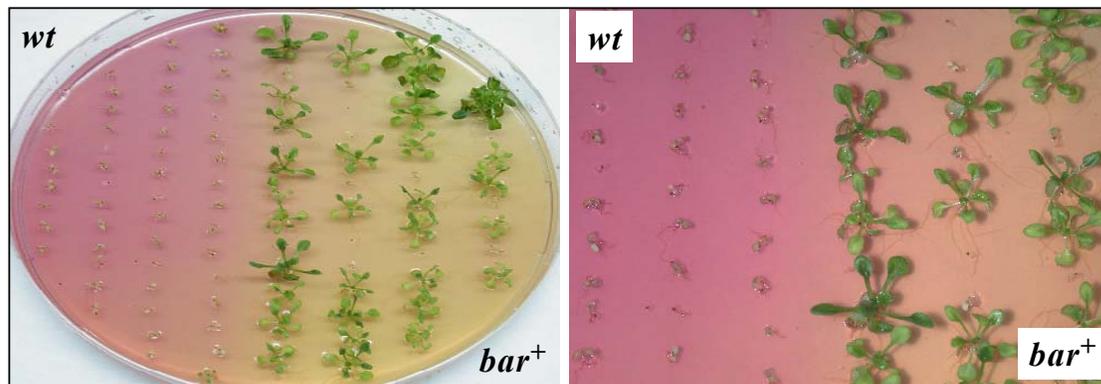
schalen mit MS-Medium anzog und Basta® mehrmalig direkt auf die Platten sprühte. Allerdings bestand hierbei durch das wiederholte Öffnen der Schalen die Gefahr einer Kontamination durch Pilzsporen.



**Abb. C26:** Verschiedene *Arabidopsis*-Linien ohne *bar*-Resistenzen nach viermaligem Sprühen mit einer 0,01% Glufosinatammonium-Lösung auf die Keimlinge. (A), T3-Linie; (B), T7-Linie; (C), *Arabidopsis*-Wildtyp. Der Selektionsdruck auf nicht-transgene Keimlinge war unbefriedigend, wie die vitalen Wildtyp-Pflanzen (C) erkennen lassen. Ausserdem ist die Selektionswirkung auf die Keimlinge uneinheitlich, wie sich aus einzelnen Bereichen hoher Vitalitätsraten folgern lässt.

#### 26.4.1.2 Die Anwendung von Bialaphos®

Das Tripeptid Bialaphos® besteht aus Phosphinotricin mit zwei L-Alaninen. Sobald es von der Pflanzenzelle aufgenommen wird, spalten ihre Proteasen die Peptidbindung auf und Phosphinothricin entfaltet seine toxische Wirkung. Der große Vorteil von Bialaphos® liegt im Aufnahmeweg in die Pflanze begründet. Keimlinge nehmen das Herbizid aktiv über ihre Wurzeln auf. Dadurch besteht die Möglichkeit Bialaphos® bereits beim Herstellen der Agarplatten ins Medium beizugeben. Der Selektionsdruck auf nicht-transgene Wildtyp-Pflanzen war im Vorversuch absolut (Abb. C27).



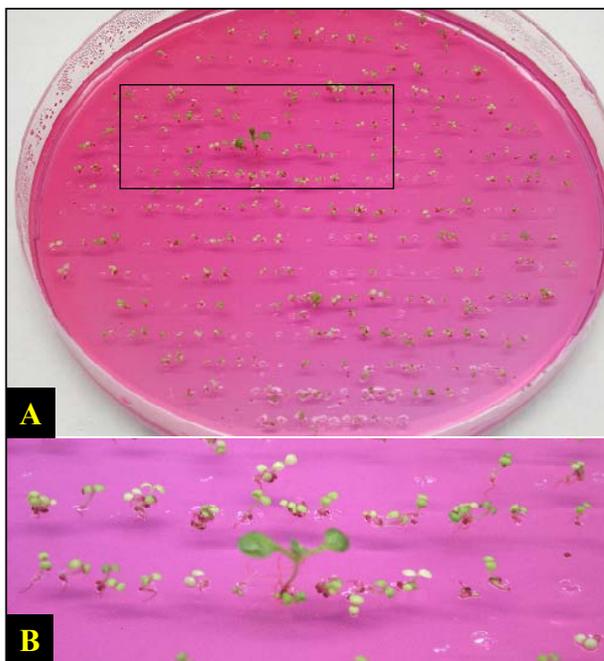
**Abb. C27:** *Ath*-Wildtyp- und *Ath-bar*<sup>+</sup>-Keimlinge nach Behandlung mit Bialaphos. Das Herbizid wurde einmalig dem Medium beigegeben. Links: Übersichtsbild; Rechts: Detailvergrößerung von links.

Durch Zusatz des pH-Indikators Chlorophenol Rot läßt sich die Expression des *bar*-Gens am Farbumschlag von rot nach gelb verfolgen. Dies wird durch die Abgabe von  $H^+$ -Ionen bewirkt, die den pH-Wert des umgebenden Mediums erniedrigen. Nicht-transgene Keimlinge segregieren hingegen Ammonium, welches zur Alkalisierung des Mediums beiträgt und zur Aufrechterhaltung seiner roten Farbe. Für ein Einzelscreening von Keimlingen unter vielen war das System jedoch nicht sensitiv genug, da es ursprünglich für ein *Screening* von Gersten- und Tabakkeimlingen entwickelt worden ist (Prof. Dr. D. von Wettstein, *Washington State University*, USA; mündliche Mitteilung).

#### 26.4.2 Verifikation der Komplementation einer Transposon-Linie mit *AthPEX10*

Die Primärtransformanten T3 und T7, welche heterozygot für das Transposon sind, wurden mit *AthPEX10*-cDNA transformiert. Die entstehenden Samen wurden auf Doppelselektionsmedium angezogen und die vitalen Keimlinge daraufhin untersucht, ob nun Pflanzen, die homozygot für die Transposon-Insertion sind, unter der Expression der *AthPEX10*-cDNA lebensfähig waren. Die Verifikation, ob sich eine letale Transposon-Linie mit der cDNA von *AthPEX10* retten läßt, erfolgte über zwei unterschiedliche Wege, nämlich den Segregationsraten auf Doppelselektionsmedium sowie der PCR-Analyse von genomischer DNA vitaler Individuen. Beide Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

##### 26.4.2.1 Das Screening von Keimlingen der F0-Generation zur Isolierung von doppeltransgenen F1-Kandidaten auf geeignetem Selektionsmedium



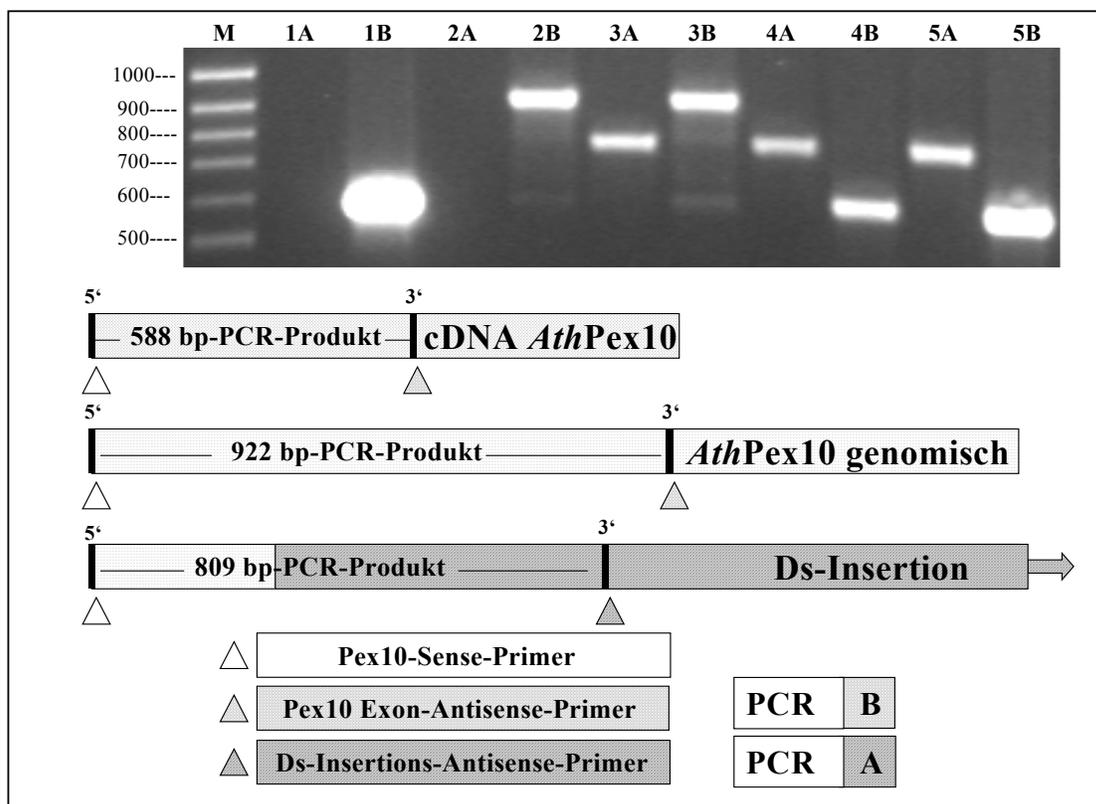
Von den Primärtransformanten T3 und T7 der F0-Generation wurden jeweils etwa 2.000 Samen auf MS-Agarplatten mit Kanamycin und Bialaphos® ausgebracht. Rund 20 Keimlinge (F1) verteilt auf 16 Petrischalen wurden nach 10 Tagen Wachstum als putativ transgen für das Transposon als auch die Komplementation erachtet (Abb. C28) und in Töpfe mit Erde transferiert.

**Abb. C28:** Putativ transgener Keimling auf MS-Doppelselektions-Medium mit Kanamycin und Bialaphos®. (A), Übersichtsbild; (B), Detailvergrößerung des Rahmen aus A.

Nach drei Wochen Wachstum in Phytokammern waren die Pflanzen groß genug, um einzelne Rosettenblätter zur molekularbiologischen Verifizierung der Doppelinsertion abzuschneiden und dienten zur Isolierung genomischer DNA. Es sollten solche Pflanzen isoliert werden, die hemizygot für das Transposon und die Komplementation mit *PEX10*-cDNA waren.

### 26.4.2.2 Molekularbiologisches Screening nach Kandidaten für eine Doppelinsertion

Von den 20 vitalen Keimlingen der F1-Generation wurden sieben Individuen statistisch ausgewählt, um nach erfolgreicher PCR-Verifizierung der Doppelinsertion in die F2-Generation gehen zu können, wo dann nach Linien gescreent werden kann, die mit *PEX10*-cDNA komplementiert sind, aber kein endogenes *PEX10*-Allel mehr besitzen. In Abb. C29 sind die Primer-Strategie und die PCR-Produkte verschiedener Pflanzenkonstrukte dargestellt. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sich sowohl das Transposon, als auch die *PEX10*-cDNA des Komplements nachweisen lassen.



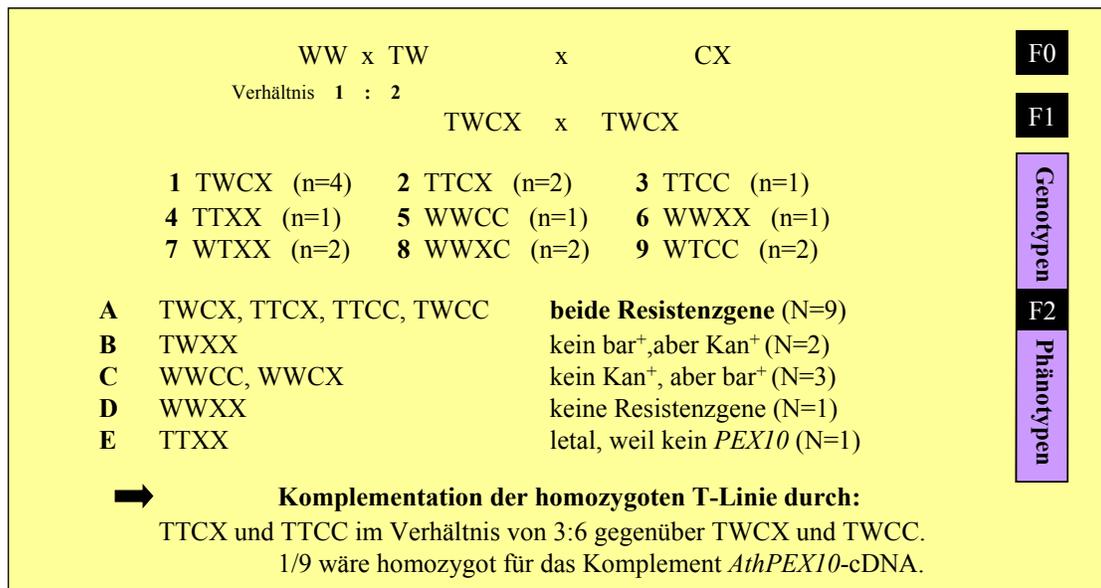
**Abb. C29:** PCR zur Verifizierung dihybrider Pflanzenlinien der F0-Generation. (1), *PEX10*-Plasmid-DNA; (2), *La. er.* WT; (3), unkomplementierte T-Linie; (4), komplementierte T3-Linie; (5), komplementierte T7-Linie; (M), 100bp-Leitermarker. Das Ergebnis in 4B und 5B gibt Aufschluss über ein cDNA-Komplement von *PEX10* und eine Ds-Insertion (4A + 5A). Es erlaubt hingegen keine Aussage darüber, ob noch ein endogenes Allel von *PEX10* vorhanden ist.

Sense-Primer war in allen Fällen ein Primer in *PEX10*, der im Startcodon ATG von Pex10 „annealte“. Der Antisense-Primer der Kontrolle greift erst ca. 200bp *downstream* der Transposon-Insertion. Ein Produkt mit diesen Primern erfolgt, wenn entweder genomisches *PEX10* oder die cDNA davon vorhanden ist. Bei Abwesenheit der cDNA wird einschließlich Introns ein 922 bp-Fragment amplifiziert. Das 588 bp-Produkt der cDNA wird bei Anwesenheit jedoch bevorzugt amplifiziert und drängt das genomische *Template* in den Hintergrund. Ein Insertions-Antisense-Primer, etwa 200 bp innerhalb des Transposons, amplifiziert das Transposon-Element.

In Abb. C29 ist exemplarisch die Komplementation einer T3 und T7-Transposon-Linie mit der cDNA von *PEX10* dargestellt (Spuren vier und fünf). Spur drei zeigt eine unkomplementierte Transposonlinie ohne cDNA-Fragment, Spur zwei spiegelt Wildtyp-DNA ohne Transposon-Fragment wider. Plasmid-DNA in Spur eins diente als Positiv-Kontrolle. Alle sieben untersuchten Pflanzenlinien zeigten die Banden sowohl des Transposon- als auch des cDNA-Fragments.

### 26.4.2.3 Das Screening nach homozygoten Knockouts, aber mit *PEX10*-cDNA komplementierten und folglich vitalen Transposonlinien der F2-Generation

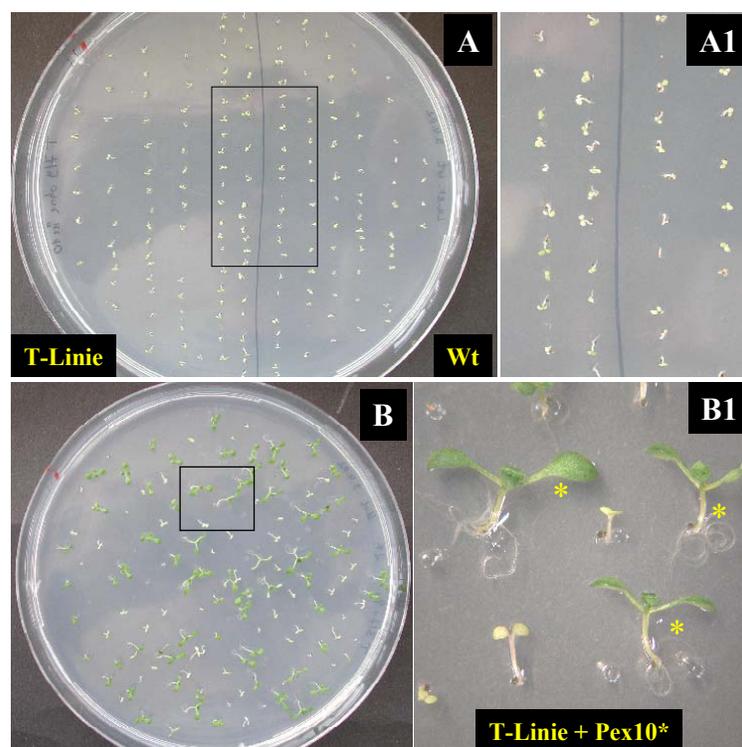
Ziel des *Screenings* in der F2-Generation ist es, eine Doppeltransformante zu isolieren, die wenigstens eine Kopie der cDNA von *PEX10* trägt, also komplementiert ist für dieses Gen und gleichzeitig homozygot für das Transposon ist.



**Abb. C30:** Segregationsschema der Genotypen und die daraus resultierenden Phänotypen auf unterschiedlichem Selektionsmedium in der F2-Generation. (T), *pex10*-Knock-out; (W), *PEX10*-Wildtyp-Allel; (C), *PEX10*-cDNA Komplement; (X) *PEX10*-Nicht-Komplement; die Allele (T) und (C) sind jeweils mit Selektionsmarkern für Kanamycin, bzw. Bialaphos® gekoppelt.

In diesem Fall bestünde ein Zusammenhang zwischen dem eingebrachten Komplement und der Aufhebung des letalen Phänotyps. Bei einer nicht gekoppelten dihybriden Vererbung sind dies drei von 15 keimenden Pflanzen, wie aus Abb. C30 hervorgeht.

Neben der Überlegung wie hoch der Prozentsatz an gewünschten komplementierten homozygoten Transposonlinien innerhalb der vitalen Pflanzen auf Doppelselektionsmedium sein muss, spielt auch der relative Prozentsatz an Überlebenden auf verschiedenen Medien eine interessante Rolle. Dieser gibt indirekt einen Hinweis darauf, ob die Komplementation der homozygoten Transposon-Linie mit der cDNA von *PEX10* erfolgreich war oder nicht. Hierbei kommt zum Tragen, dass dihybride Embryonen, die beide Resistenzgene tragen, nur unter der Voraussetzung lebensfähig sind, dass die cDNA von *PEX10* den letalen Phänotyp aufheben kann. Ist dies nicht der Fall, so verringert sich der Anteil der theoretisch zu erwartenden vitalen Keimlinge auf Medium mit Kanamycin und Bialaphos® um die Zahl dieser Letalen. Abb. C31 zeigt die Durchführung des Screenings nach vitalen Pflanzen mit Doppelresistenzen für Kanamycin und Bialaphos®.



**Abb. C31:** Screening nach dihybriden Pflanzen, die zum einen homozygot für das Transposon sind und zusätzlich mindestens heterozygot für das Komplement der *PEX10*-cDNA. (A): Negativ-Kontrollen mit Wildtyp-Keimlingen und einer unkomplementierten T-Linie auf Doppel-Selektionsmedium Kanamycin und Bialaphos®; (A1): Detailvergrößerung des Rechtecks von A; (B): Screening nach vitalen dihybriden Pflanzen der T-Linien, die mit *PEX10*-cDNA komplementiert wurden; (B1), Detailvergrößerung des Rechtecks von B.

In Tab. C3 sind die Segregationsraten der sieben mit *PEX10*-cDNA komplementierten Transposonlinien auf verschiedenen Selektionsmedien dargestellt. Aus der Anzahl aller Überlebenden auf verschiedenen Selektionsmedien ergibt sich ein Hinweis auf den Erfolg des Komplementations-Versuchs. Allerdings können die Segregationsverhältnisse aufgrund der engen Abweichungen verschiedener Arbeitshypothesen nur als Tendenz dienen. Diese spricht jedoch für eine geglückte Komplementation von homozygoten Transposon-

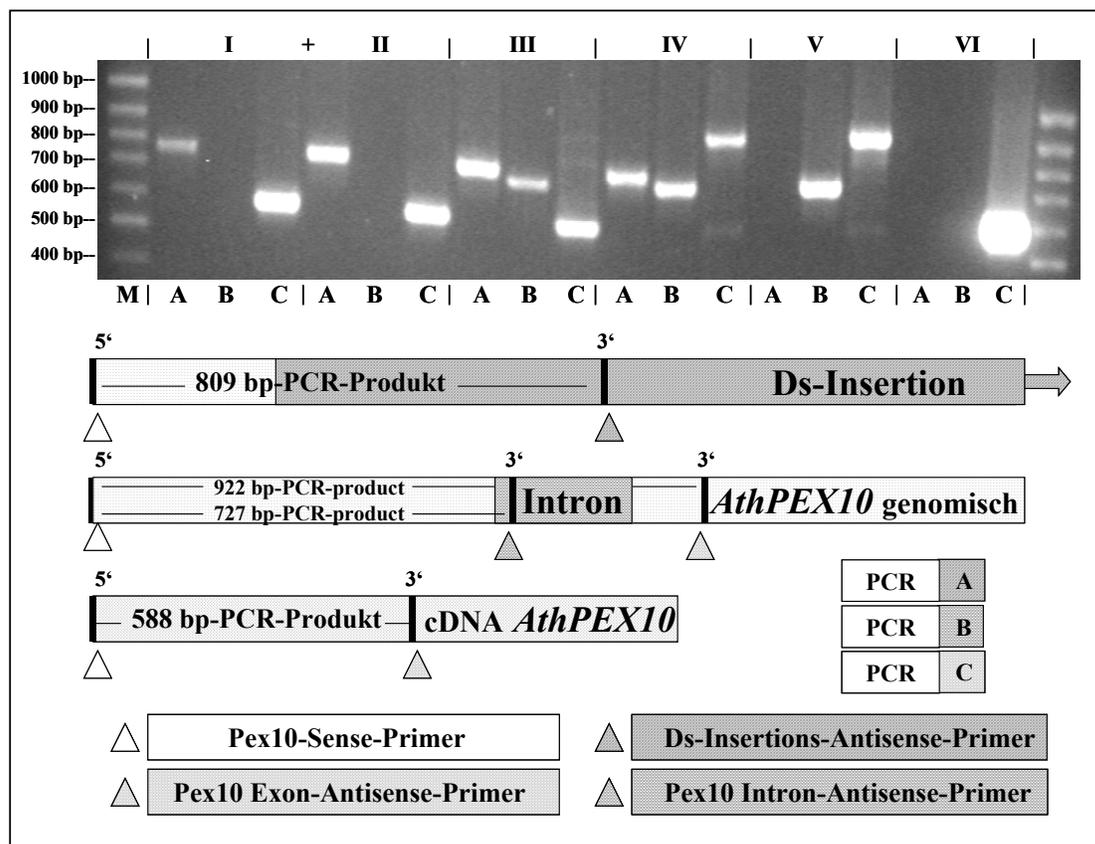
Linien mit der cDNA von *AthPEX10*, wie die statistisch einfache bis starke Tendenz einer Überlebensrate in Höhe von 60% auf Doppelselektionsmedium zeigt.

Linie	Kanamycin			Bialaphos®			Kanamycin+Bialaphos®			
	Letal (n)	Vital (n)	Überlebende (%)	Letal (n)	Vital (n)	Überlebende (%)	Letal (n)	Vital (n)	Überlebende (%)	
T7/3 +Pex10- 4*	47	71	60,1	36	93	72,0	47	67	59	
T3/7 +Pex10-1	24	58	70,7	10	88	89,7	30	76	72	
T7/3 +Pex10- 5*	21	75	78,1	1	109	99,0	32	69	68	
T7/3 +Pex10- 3*	41	63	60,6	23	67	74,4	62	51	45	
T3/7 +Pex10- 1*	36	68	65,3	19	60	75,9	30	63	68	
T3/7 +Pex10- 3*	17	45	72,5	23	109	82,5	50	58	54	
T3/7 +Pex10- 2*	26	76	74,5	30	84	73,6	54	68	56	
Statistisch zu erwarten: Erfolg / nicht Erfolg			73 / 66				80 / 75	60 / 50		

**Tab. C3:** Vitalitätsraten von sieben mit *PEX10*-cDNA komplementierten Transposon-Linien auf unterschiedlichen Medien im Vergleich der statistisch zu erwartenden Überlebenden bei erfolgreicher Komplementation und nicht-erfolgreicher Komplementation homozygoter Transposon-Linien mit *PEX10*-cDNA. Mit Ausnahme von T7/3+Pex10-3\* zeigen alle Linien einfache bis starke Tendenzen für eine geglückte Komplementation.

Um eine definitive Aussage darüber treffen zu können, ob und bei welchen Linien die Komplementation mit der cDNA von *PEX10* den letalen Phänotyp der homozygoten Transposon-Linie aufheben konnte, war erneut genomische DNA von vitalen Pflanzen mittels PCR zu testen. Zu diesem Zweck wurden von jeder der sieben Linien 18 Keimlinge in Töpfe mit Erde transferiert und nach circa drei Wochen Wachstum Blattmaterial zur Isolierung genomischer DNA verwendet.

Bei Durchführung der PCR musste eine Strategie angewendet werden, die es erlaubte, endogen vorhandenes *PEX10* auch bei Anwesenheit von exogen eingebrachter cDNA zu detektieren. Die Wahl fiel hierbei auf einen *PEX10*-Antisenseprimer, der im Intron des Gens greift (*AthPEX10*-Intron 5'-GAC AAT TAT ATC AAT ATC AGC GG-3') und somit kein Produkt im Komplement erzeugen kann. In Abb. C32 ist die Primerstrategie und das Ergebnis für die verschiedenen Pflanzen-Linien exemplarisch dargestellt.



**Abb. C32:** PCR zur Identifizierung homozygoter Transposon-Linien der F2-Generation, die mit *PEX10*-cDNA komplementiert werden konnten und folglich vital sind. (PCR A): *PEX10*-Sense-Primer und Transposon-Insertions-Antisense-Primer; (PCR B): *PEX10*-Sense-Primer und *PEX10*-Intron-Antisense-Primer; (PCR C): *PEX10*-Sense-Primer und *PEX10*-Exon-Antisense-Primer; (I): homozygote komplementierte T7/3-Linie; (II): homozygote komplementierte T3/7-Linie; (III): heterozygote komplementierte T-Linie; (IV): unkomplementierte T-Linie; (V): *Arabidopsis*-WT-Linie; (VI): Plasmid-Kontroll-DNA. Nur die PCR-Bandenmuster in I+II erfüllen alle drei Voraussetzungen für den Nachweis der Komplementation einer homozygoten T-Linie mit *AthPEX10*-cDNA: Homozygotie des Transposons (A), Komplementation durch *AthPEX10*-cDNA (C), kein PCR-Produkt mit einem *PEX10*-Intron-Primer (B).

Verwendet man Plasmid-DNA als Template, so ergibt nur der Exon-Antisense-Primer ein Produkt. Intron-Primer und Transposon-Primer ergeben keine Banden (Abb. C32; VI, B+A). In der Wildtyp-Linie von *Arabidopsis* ist erwartungsgemäß kein Transposon-

Produkt zu finden (V, A). Das *Template* einer nicht komplementierten Transposon-Linie führt zu drei PCR-Produkten, da die beiden *PEX10*-Primer jeweils im Intron und Exon der heterozygoten Linie greifen können (IV). Die Länge des PCR-Produkts bei Verwendung des *PEX10*-Exon-Antisense-Primers verringert sich von 922 bp (genomisches PCR-Produkt) auf 588 bp der cDNA in der komplementierten Transposon-Linie (III, C), weil die Matrize der kürzeren cDNA von *PEX10* häufiger amplifiziert werden würde als das 922 bp-Produkt der genomischen Sequenz. Dass dies der Fall ist, zeigt das Produkt in (III, B). Der Intron-Antisense-Primer ergibt ebenfalls eine Bande, endogenes *PEX10* ist somit vorhanden. Die Templates in (II+I) zeigen hingegen alle PCR-Banden für eine homozygote, mit *PEX10* cDNA komplementierte Transposon-Linie. Für die Herstellung der Templates wurden Rosettenblättern normal gewachsener, drei Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen benutzt. Homozygote Transposonpflanzen ohne *PEX10*-cDNA-Komplement starben hingegen bereits innerhalb ihrer Embryonalentwicklung ab.

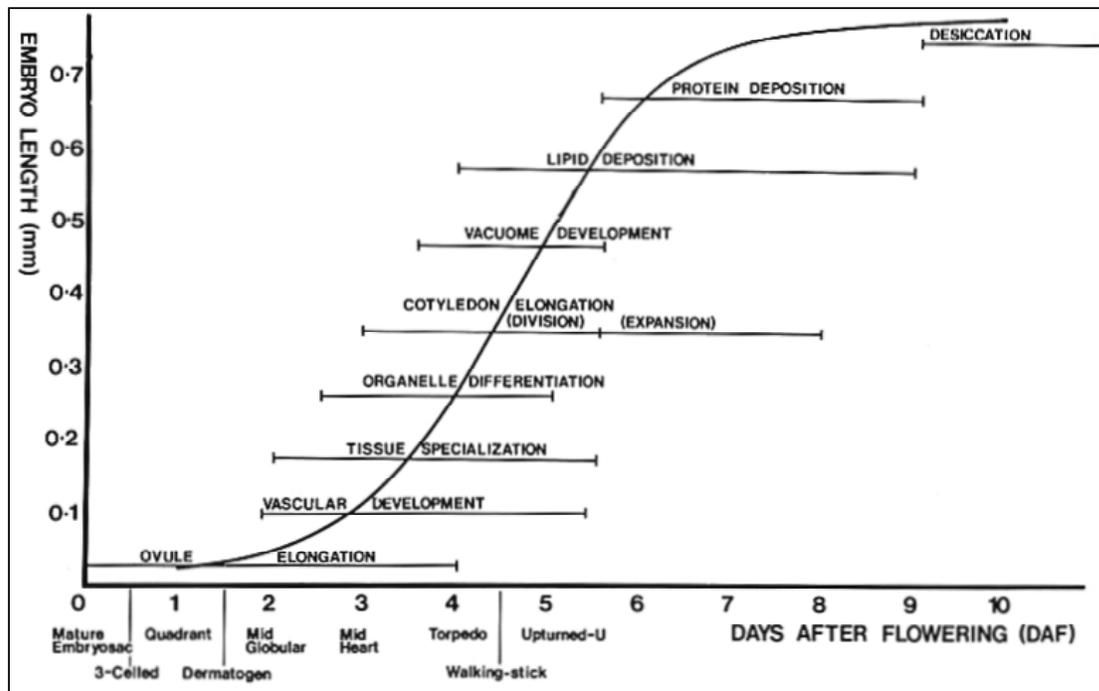
Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass ein fehlendes Allel von *PEX10* für die Embryoletalität in den Transposon-Linien T3 und T7 verantwortlich war und diese sich durch die Komplementation mit der cDNA von *AthPEX10* kompensieren liess.

## 26.5 Lichtmikroskopische Analyse der letalen Embryonen

Der Zeitpunkt des Entwicklungsabbruchs bei Individuen homozygoter Transposon-Linien ermöglicht einen Rückschluss auf dessen mögliche Ursache. Deshalb wurden die letalen Transposonembryonen im Lichtmikroskop auf den Zustand ihrer Entwicklung hin untersucht. Zuvor wurden jedoch zuerst die Samen von Wildtyp-Pflanzen mit Klärungsmittel inkubiert und alle Embryonen einer Schote hinsichtlich ihrer Entwicklung beurteilt. Wichtig waren hierbei die individuellen Abweichungen innerhalb derselben Schote. Lagen die Entwicklungsabweichungen bei Transposon-Linien deutlich über der Kontrollgruppe, ergab dies einen Hinweis auf homozygote und in der Folge letale Embryonen. Solche putativ letalen Kandidaten konnten auf diese Weise frühzeitig identifiziert werden, um sie für weitergehende Untersuchungen auf elektronenmikroskopischer Ebene heranzuziehen.

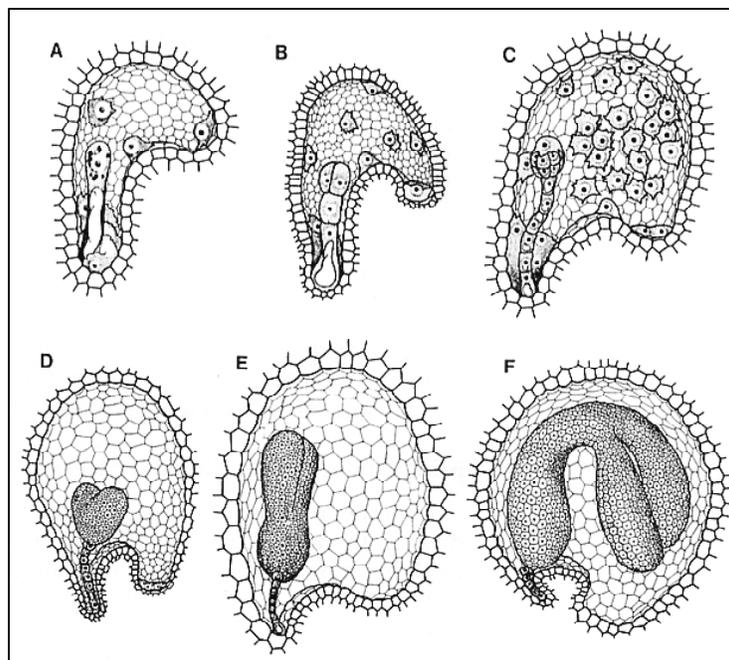
### 26.5.1 Embryogenese in *Arabidopsis*-Wildtyp-Linien

Die verschiedenen Stadien der Zelldifferenzierung sind eng an die embryonale Entwicklung des Embryos gekoppelt, wie aus Abb. C33 (folgende Seite) deutlich hervorgeht. Beispielsweise beginnt die Differenzierung der Zellorganellen im Globularstadium und dauert bis Tag fünf nach Befruchtung an.



**Abb. C33:** Überblick auf die zeitliche Embryogenese von *Arabidopsis* hinsichtlich ihrer Zelldifferenzierung (nach Bowman, 1994).

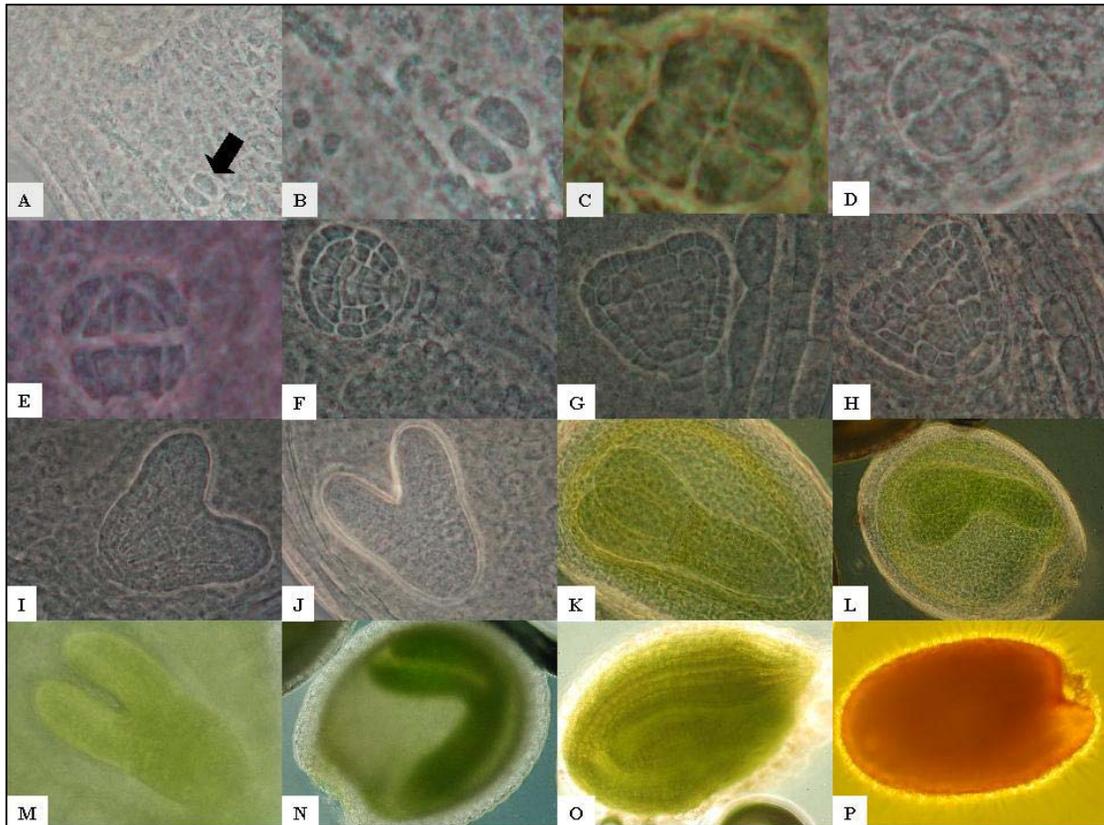
Die Embryogenese verläuft im Wesentlichen über ein Zygoten-, Quadranten-, Oktantenstadium, verschiedene Globular- und Herzstadien, Torpedostadium, Spazierstockstadium, umgedrehtes-U-Stadium bis schließlich zum abreifenden Embryo. Der gesamte Prozess dauert etwa 9 Tage, wie in Abb. C34 schematisch dargestellt ist. Nach zwei Wochen, abhängig vom Genotyp und Umweltbedingungen, ist die Dehydratation des Samens



soweit fortgeschritten, dass er in eine Dormanz übergeht, die mehrere Jahre andauern kann (vgl. Bowman, 1994).

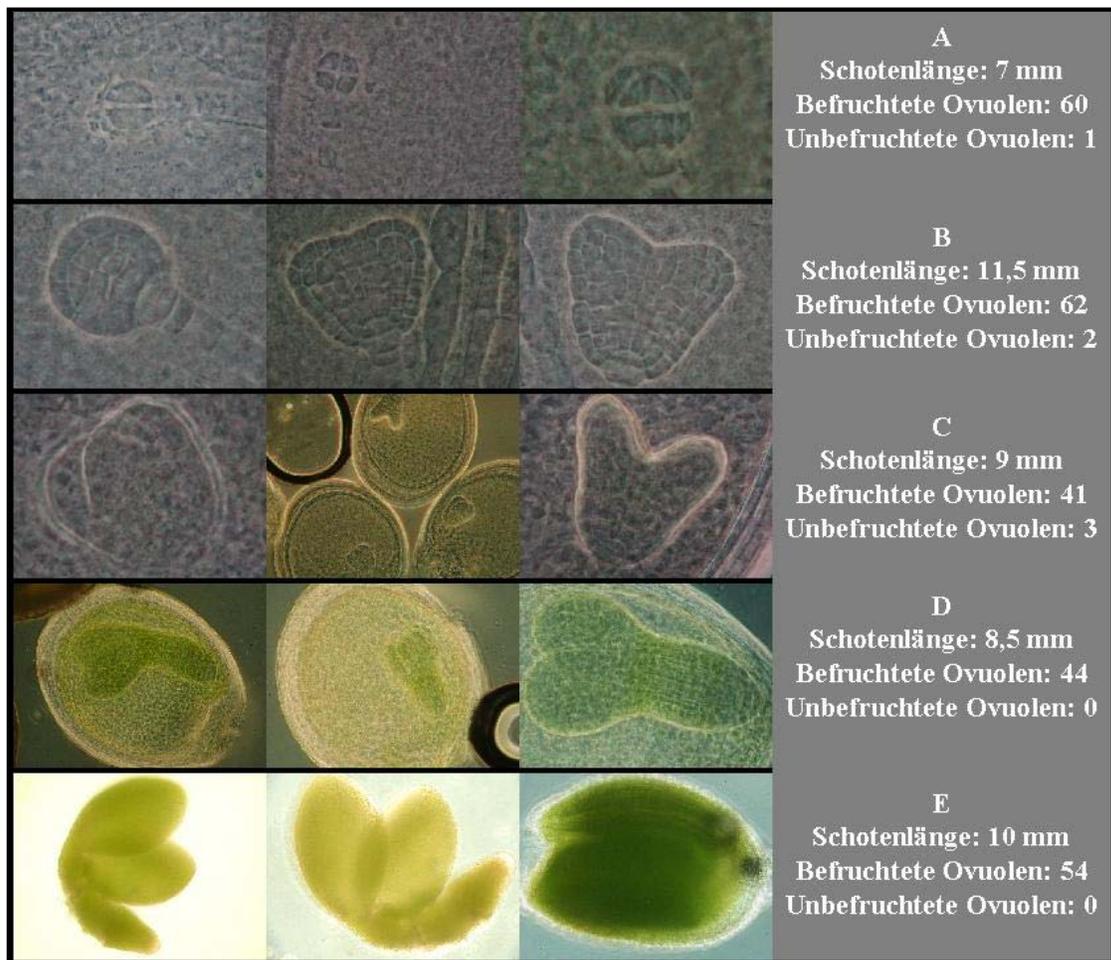
**Abb. C34:** Schematische Embryonalentwicklung in *Arabidopsis thaliana*. (A), Zygote; (B), 2-Zell-Stadium; (C), Globular-Stadium; (D), Herz-Stadium; (E), Torpedo-Stadium; (F), „upturned“ U-Stadium (verändert nach Bowman, 1994).

In Abb. C35 sind die „*in situ*“-Entwicklungen der Embryonen in *Arabidopsis*-Wildtyp-Schoten nach Inkubation mit Klärungsmittel dargestellt. Das darin enthaltene Chloralhydrat löst nach ca. 10-30 min die Zellwände der Samenschale auf und erlaubt die Aufsicht auf den Embryo. In sehr frühen Entwicklungsstadien ist eine korrekte Benennung der Embryo-Zellzahl schwierig, da die Anzahl der Suspensorzellen und die Zahl der Embryozellen zwar korrelieren, aber durch unterschiedliche Tiefenebenen lichtmikroskopisch nicht immer gut zu erfassen sind.



**Abb. C35:** *In situ*-Embryogenese von *Arabidopsis*-Wildtyp-Samen. (A+B), Quadranten-Stadien; (C), Oktanten-Stadium; (D+E), frühe Globular-Stadien; (F), spätes Globular-Stadium; (G+H), frühe Herz-Stadien; (I+J), späte Herz-Stadien; (K+L), Torpedo-Stadien; (M), Spazierstock-Stadium; (N), frühes „upturned“ U-Stadium; (O), spätes „upturned“ U-Stadium; (P), reife Embryo-Dormanz.

Die Embryogenese wurde für die weitere Untersuchung der Transposon-Linien auf fünf Entwicklungsstadien reduziert. Diese beinhalten das Oktanten-, das Globular-, das Herz-, das Torpedo- sowie das „upturned“ U-Stadium. Weitere Unterteilungen waren nicht notwendig, wie die Untersuchungen an Wildtypschoten ergaben. Die individuellen Abweichungen innerhalb einer solchen Schote betragen maximal zwei der fünf Entwicklungsstadien, wie aus Abb. C36 der folgenden Seite hervorgeht. Hierbei wurden Schoten verschiedener Länge untersucht und die Anzahl ihrer befruchteten als auch unbefruchteten Ovulen festgehalten.

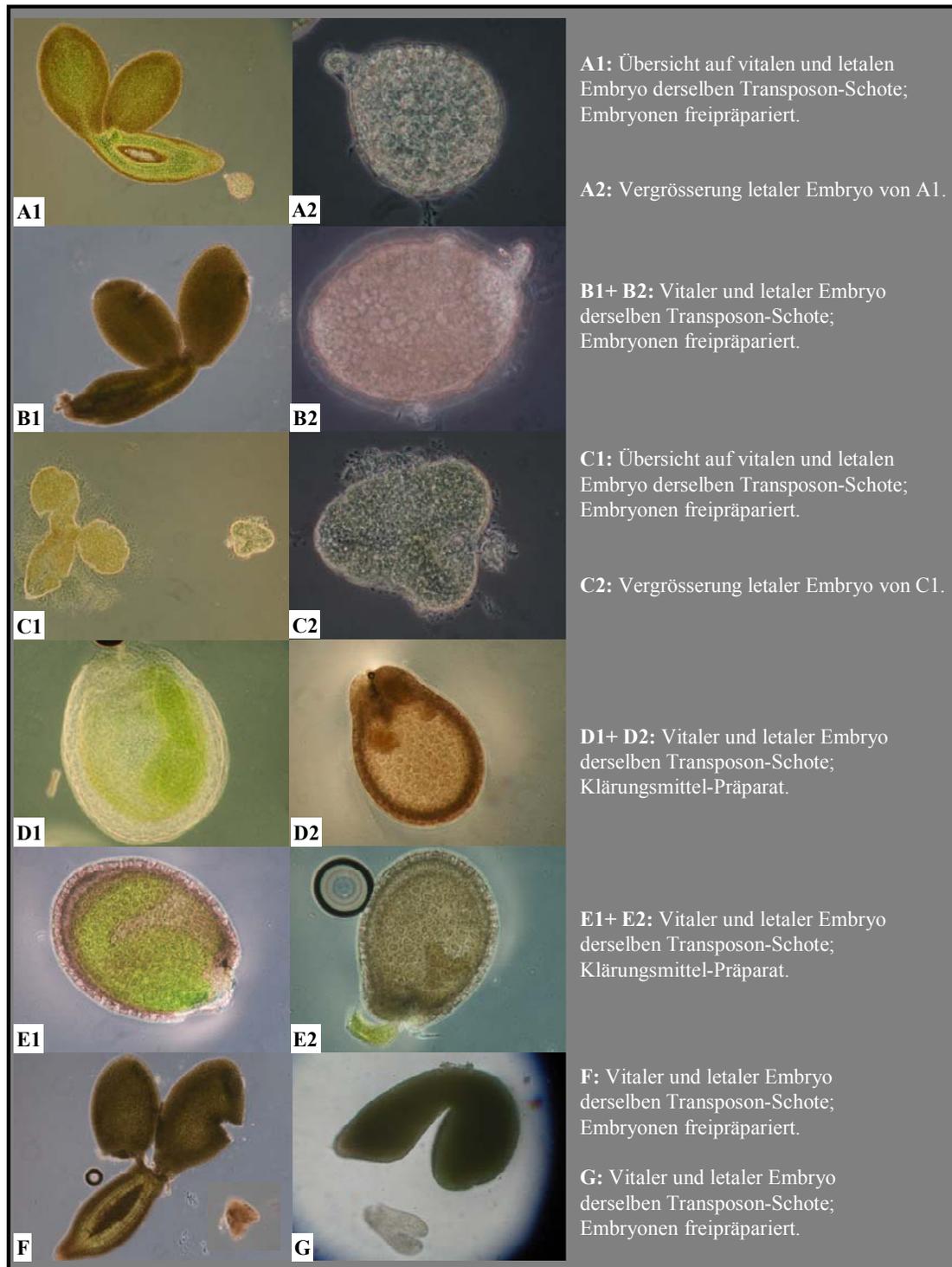


**Abb. C36:** Maximale Divergenz der Embryogenese aller Individuen aus jeweils einer Schote in Wildtyp-Linien von *Arabidopsis thaliana*. Unabhängig vom Alter der Schote lag die individuelle Abweichung der einzelnen Embryonen bei einem Divergenzindex von  $<1$ .

Die Entwicklungsstadien innerhalb einer Schote konnten nach Inkubation mit Klärungsmittel lichtmikroskopisch untersucht werden. Abb. C36 zeigt exemplarisch die für fünf Schoten jeweils maximal divergierenden Entwicklungsstadien. Dabei wird sichtbar, dass die individuellen Abweichungen innerhalb einer Schote nur sehr gering sind und bei optimalen Wachstumsbedingungen zwar die Grenzen eines Entwicklungsstadiums überschreiten, aber innerhalb des Ranges eines Stadiums liegen. So findet sich beispielsweise in Schote B der Abb. C36 ein Entwicklungsbereich von spätem Globular- bis frühem Herz-Stadium, jedoch nie frühes Globular- bis spätes Herz-Stadium. Der Bereich der Abweichung lag somit innerhalb aller untersuchten Wildtypschoten bei einem Divergenzindex  $<1$  und wurde als sehr zuverlässig betrachtet. Abweichungen bezüglich des Index ergaben sich nur in den verschiedenen Schoten von Transposon-Linien.

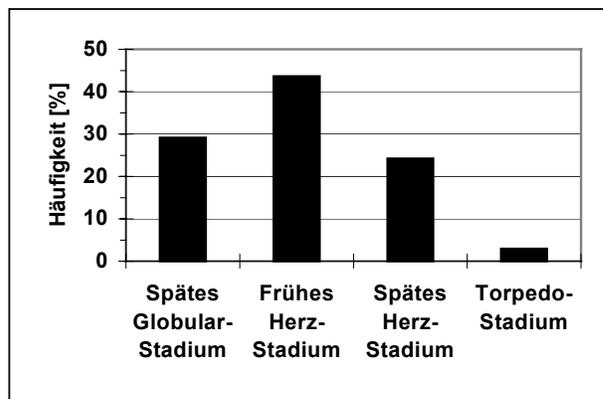
### 26.5.2 Die Embryogenese der homozygoten Transposon-Individuen

Die individuellen und gegenüber Wildtyp-Schoten sehr auffälligen Abweichungen innerhalb einer Transposon-Schote sind in Abb. C37 fotografisch dargestellt.



**Abb. C37:** Vergleich divergierender Entwicklungsstadien vitaler und letaler Embryonen aus jeweils derselben Transposon-Schote. Der Divergenzindex in Schoten von T-Linien liegt deutlich über 1.

Gegenüber der geringen Divergenz bei Wildtyp-Schoten ist die Diskrepanz in den individuellen Abweichungen sich entwickelnder Embryonen von T-Linien sehr auffällig. Der Divergenzindex liegt bei den Transposonschoten zwischen zwei und drei. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass der Index umso größer wird, je älter die Schoten sind. Dies bedeutet, dass eine Unterscheidung der vitalen und letalen Embryonen erst dann möglich ist, wenn das homozygote „Knock-out“ von *pex10* zur Stagnation der Embryonalentwicklung führt, während sich die vitalen Individuen über einen Index größer „Zwei“ weiter entwickeln.



Addiert man die einzelnen stagnierenden Stadien von 103 als letal identifizierten Transposonembryonen auf, so ergibt sich eine prozentuale Verteilung, wie in Abb. C38 dargestellt.

**Abb. C38:** Prozentuale Verteilung von 103 letalen Embryonen auf die verschiedenen Entwicklungsstadien in Transposon-Linien.

Fast 68% aller letalen Embryonen stagnieren in ihrer Entwicklung innerhalb des Herzstadiums und annähernd 30% sterben bereits im späten Globularstadium. Nur drei Individuen von 103 entsprechen dem Torpedo-Stadium. Diese Beobachtungen werden von der statistischen Gesamtzahl an letalen Embryonen in einem Bereich von 21-22% gestützt, d.h. dass die letalen Embryonen quantitativ erfasst werden konnten. Dennoch ist nicht völlig auszuschließen, dass vereinzelt letale Embryonen des Torpedo-Stadiums oder darüber hinaus nicht als letal erkannt wurden, weil ihr Index der Divergenz gegenüber den vitalen Embryonen zu gering war.

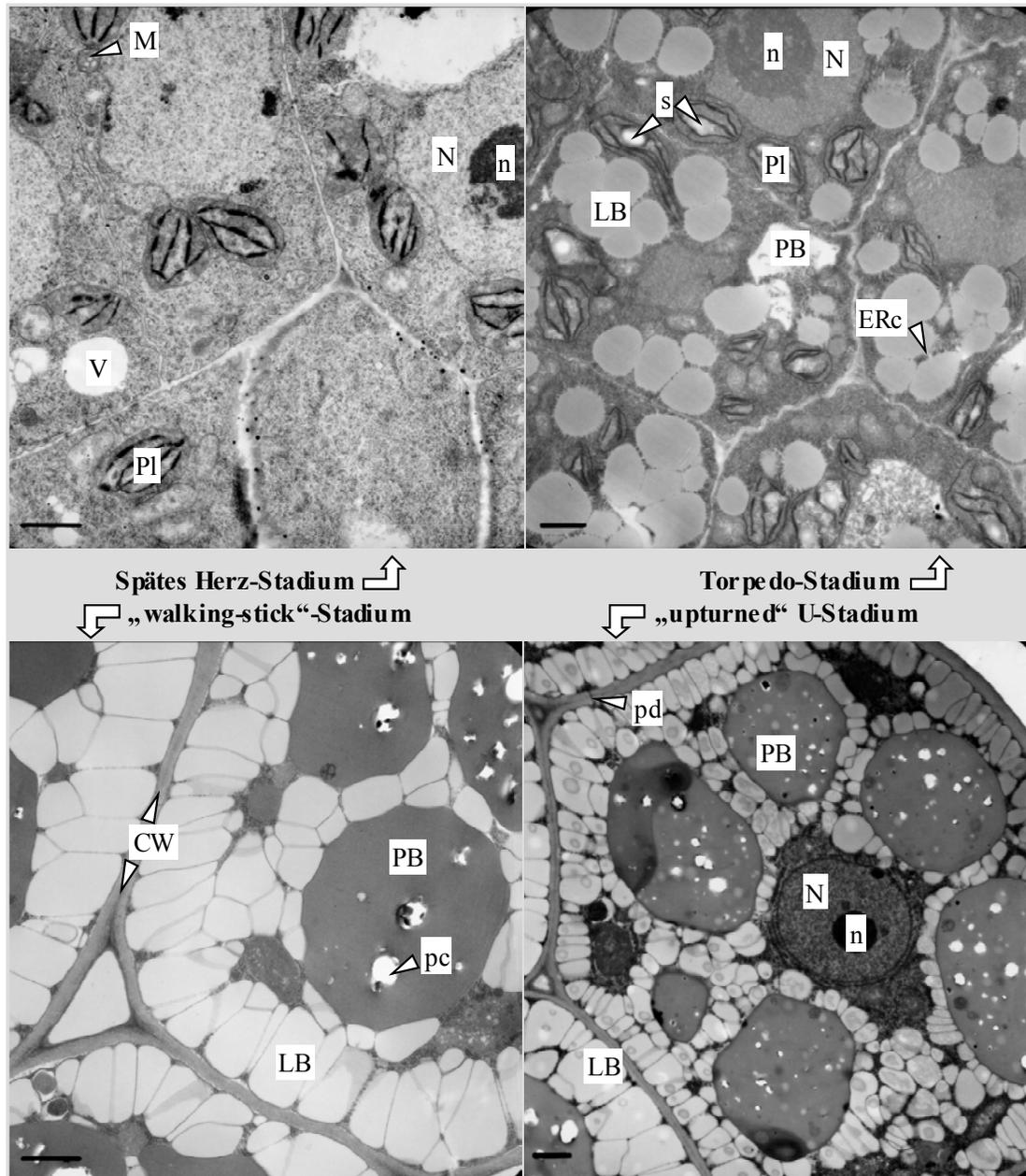
## 26.6 Elektronenmikroskopische Analyse der letalen Embryonen

Nachdem lichtmikroskopisch geklärt werden konnte, dass knapp ein Viertel aller Transposonindividuen letal sind und zum Großteil bereits im Globular- bis Herzstadium absterben, wurde mit elektronenmikroskopischen Methoden versucht, die Ursache der Letalität auf Ebene der Zellorganellen abzuklären. Hierfür wurden zuerst vitale Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien fixiert, eingebettet und geschnitten, um den Zustand ihrer Organellen mit letalen Transposonindividuen derselben Altersstufe vergleichen zu können.

Alle elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Prof. Dr. G. Wanner am Department Biologie I, der Ludwig-Maximilians-Universität München aufgenommen.

### 26.6.1 Die Entwicklung vitaler Embryonen

Einen Überblick über die Ontogenese gesunder *Arabidopsis*-Embryonen verschiedener Altersstufen vom Herz-Stadium bis zum fast reifen Embryo zeigt Abb. C 39.



**Abb. C39:** Elektronenmikroskopischer Überblick auf die zeitliche Entwicklung von Zellorganellen in *Arabidopsis*-Wildtyp-Embryonen; ERc, Endoplasmatischer Retikulum-Kanal; N, Nucleus; n, Nucleolus; PB, Proteinkörper; LB, Lipidkörper; pc, Phytatkrystall; V, Vakuole; pd, Plasmodesmata; Pl, Chloroplast; s, Stärke Korn; CW, Zellwand; M, Mitochondrium; Balkenlänge 1  $\mu\text{m}$ .

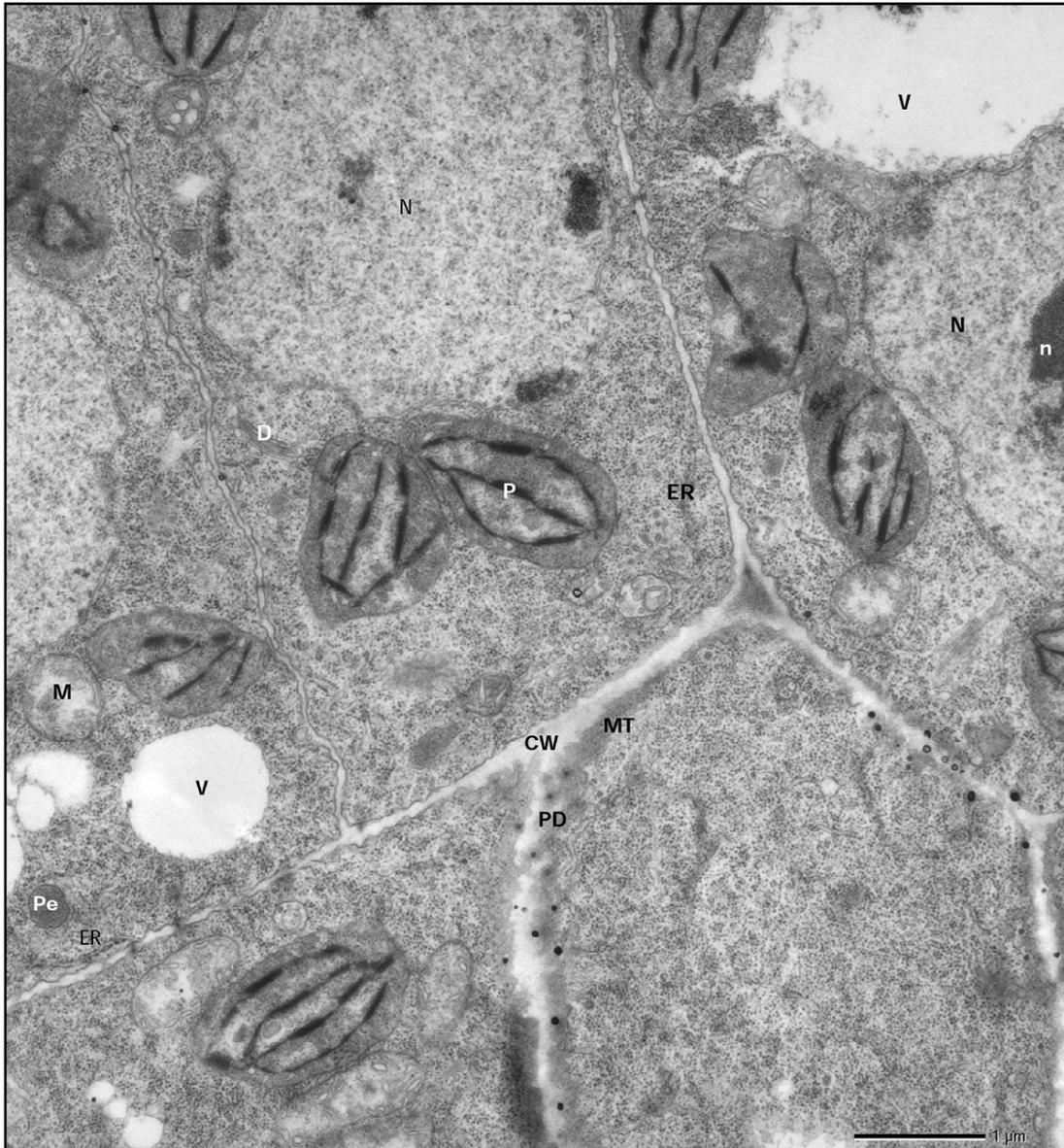
Der Entwicklungsprozess der Lipidkörper (Oleosomen) von anfänglich wenigen, fast kreisrunden Organellen des Torpedo-Stadiums bis hin zu den dicht gepackten, mehr quaderfö-

migen Anlagen des reifen Embryos ist gut erkennbar und ihre Entwicklung in Wildtyp-Embryonen verläuft völlig unauffällig. Die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums zeigen einfache, nicht geschwollene Strukturen. Charakteristisch sind die zahlreichen ER-Kanäle, die das ER mit den entstehenden Lipidkörpern verbinden. Im Torpedostadium sind erstmalig kleinere Proteinkörper erkennbar, die vom Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und in der Vakuole abgelagert werden. Ab dem „walking-stick“-Stadium und älter sind die sekundären Zellwände voll ausgebildet, vereinzelt sind auch Plasmodesmata zwischen den benachbarten Zellen sichtbar. Charakteristische Peroxisomen lassen sich bereits im Herz-Stadium in einer Dichte von  $\sim 4,3$  Stück/ $100\mu\text{m}^2$  cytoplasmatischer Fläche auszählen. Die Dichte der Organellen verändert sich mit dem Übergang zum Torpedo-Stadium kaum.

Schaut man sich die Ultrastruktur der einzelnen Embryonalstadien noch genauer an, so erkennt man im Herzstadium des Wildtyp-Embryos meristematische Zellen mit sich entwickelnden primären Zellwänden (Abb. C40). Das Endoplasmatische Retikulum ist wohl entwickelt und mit Ribosomen gespickt (raues ER). Auch das Cytosol ist dicht mit Ribosomen bepackt. Die EM-Aufnahme läßt die Profile reich entwickelter Golgi-Stapel, Mitochondrien, Peroxisomen und sich entwickelnder Chloroplasten mit Grana-Stapeln von zwei bis vier scheibenförmig zusammengepressten Thylakoiden erkennen. Die Zellen enthalten eine bis mehrere Vakuolen.

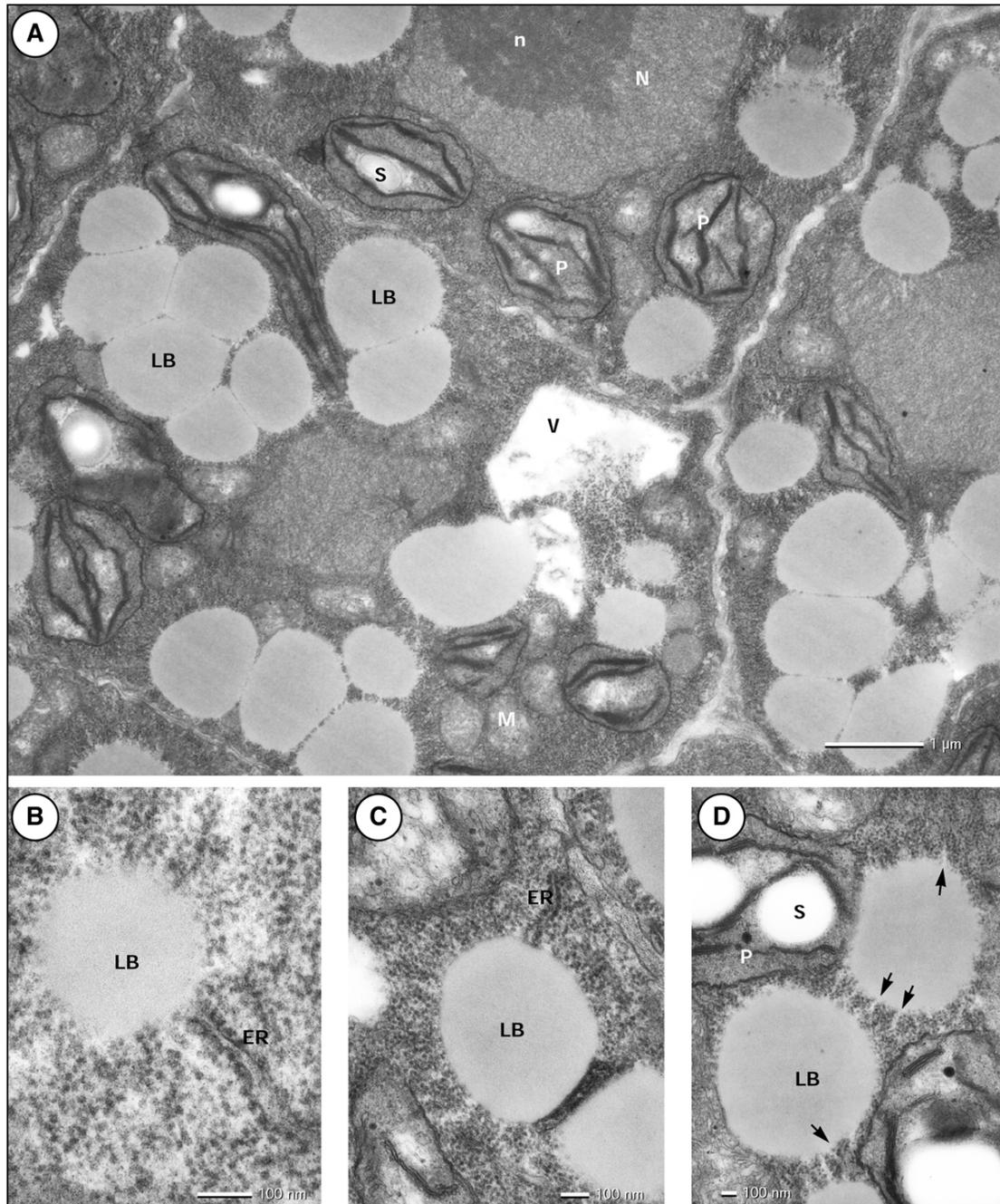
Im Torpedo-Stadium sind die Zell- und Organellenstrukturen grundsätzlich dieselben wie im Herz-Stadium. Allerdings ist die Synthese von Lipidkörpern (Oleosomen) im Cytosol mit seinen dicht besetzten Ribosomen in vollem Gange (Abb. C41, Teilbild A). Andererseits ist nur gelegentlich eine Vakuole mit Anzeichen einer Ablagerung von Speicherproteinen sichtbar. Die Synthese von Triacylglycerol, das in den Oleosomen abgelagert werden soll, umfasst sowohl die Synthese gesättigter als auch ungesättigter Fettsäuren im Chloroplasten, ihren Transfer in Form eines Acyl-CoA Pools zum Endoplasmatischen Retikulum und die Bildung von Di- und Triacylglycerolen in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (Somerville, 2000). Zeitgleich werden die Proteine der Lipidkörper auf der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und in die äussere Phospholipidschicht der Membran eingebaut (Huang, 1992; Huang, 1993; Huang, 1996). Ein ultrastruktureller Beweis unterstützt die Annahme, dass die Triacylglycerole zwischen der inneren und äusseren Schicht der Elementar-Membran des Endoplasmatischen Retikulums akkumulieren, und dass die einfache Membran der Oleosomen somit von den Phospholipidschichten mit inserierten Oleosinen abstammt (Wanner *et al.*, 1981; Abb. C41, Teilbilder B und C). Die sich entwickelnden Oleosomen sind durch eine Oberfläche regelmässig angeordneter Kanäle mit einem Durchmesser von 10 nm charakterisiert (Abb. C41, Teilbild D). In hochauflösenden TEM-Aufnahmen wird deutlich, dass diese Kanäle

dieselbe Elektronendichte besitzen wie die Triacylglycerole der Oleosomen und direkt mit den Profilen des Endoplasmatischen Retikulums verbunden sind.

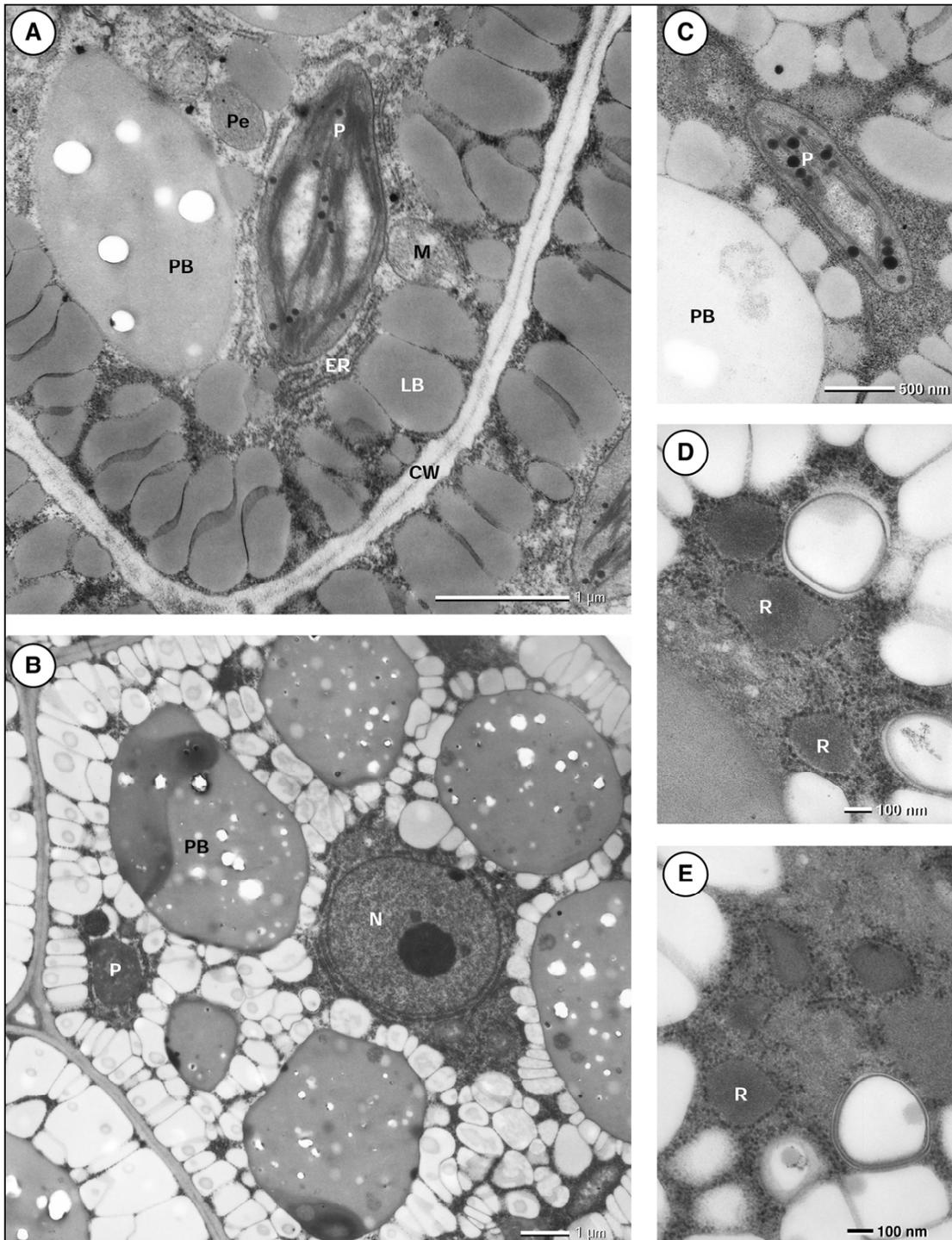


**Abb. C40:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch einen Wildtyp-Embryo des Herz-Stadiums. Der meristematische Zelltyp zeigt raues Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien (M), Peroxisomen (Pe), Dictyosomen (D), sich entwickelnde Chloroplasten (P) mit Stromathylakoiden und Granastapeln sowie die Entwicklung typischer primärer Zellwände (CW). Die Zellen besitzen eine oder mehrere Vakuolen (V). (PD = Plasmodesmata; MT = Mikrotubuli; N = Nukleus; n = Nukleolus.)

Während der weiteren Entwicklung des Embryos (walking-stick und Keimblatt-Differenzierung) werden die sekundären Zellwände ausgebildet sowie Speicherproteine und Globoid-Kristalle synthetisiert und in großen Vakuolen abgelagert (Otegui et al., 2002; Abb. C42, Teilbild A).



**Abb. C41:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch einen Wildtyp-Embryo im Torpedo-Stadium. Auffällig sind die elektronentransluzenten Lipidkörper (LB) des mit Ribosomen dicht besetzten Cytoplasmas (Teilbild A). In den Teilbildern B und C ist die Verbindung des rauen Endoplasmatischen Retikulums zu den sphärischen Lipidkörpern gut zu erkennen. Die sich entwickelnden Lipidkörper sind durch eine Oberfläche regulär angeordneter Kanäle charakterisiert, welche dieselbe Elektronendichte besitzen wie die Triacylglycerole der Lipidkörper (Pfeile in Teilbild D). (N = Nukleus; n = Nukleolus; P = Chloroplast; S = Stärkekorn; V = Vakuole).



**Abb. C42:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch das Keimblatt eines Wildtyp-Embryos im „walking-stick“-Stadium (Teilbild A). Die Ausbildung sekundärer Zellwände (CW) ist in vollem Gange. Speicherproteine und Globoidkristalle werden synthetisiert und in großen Proteinkörpern (PB) abgelagert. Die zahlreich vorhandenen Lipidkörper (LB) werden gegen die Plasmamembran gedrückt. Wohl entwickelte Chloroplasten (P), Mitochondrien (M), Peroxisomen (Pe) und Endoplasmatisches Retikulum (ER) sind immer noch sichtbar. Während der entgültigen Reife des Embryos ist das Cytosol um den Nukleus und dem wenigen Raum um die Lipidkörper herum kon-

zentriert (Teilbilder B-D). Die Thylakoide der Chloroplasten (P) sind bereits abgebaut und die Plastiden zu kleinen Proplastiden mit Stroma und wenigen Plastoglobuli (C) reduziert. Rizinosomen (R), die mit Ribosomen besetzt sind, können häufig beobachtet werden (Teilbilder D und E).

Die zahlreichen Lipidkörper liegen so dicht, dass sie nun gegen die Plasmamembran gedrückt werden, und wohl entwickelte Chloroplasten sind um die zentral angeordneten Speicherproteine, Nukleus, Mitochondrien, Peroxisomen sowie die kurzen Profile des Endoplasmatischen Retikulums herum angeordnet. Während der endgültigen Reife des Embryos ist das Cytosol schliesslich um den Zellkern und den geringen Platz zwischen den Lipidbody-Konglomeraten herum konzentriert (Abb. C42, Teilbild B). Die Thylakoide der Chloroplasten sind inzwischen abgebaut und die Plastiden zu kleinen Proplastiden mit Stroma und wenigen Plastoglobuli reduziert worden (Abb. C42, Teilbild C). Auffällig kurze Profile des Endoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien sowie Ricinosomen lassen sich unterscheiden. Letztere können durch ihre einfache Membranen mit einem Durchmesser von circa 1  $\mu\text{m}$  identifiziert werden, die mit Ribosomen besetzt sind (Gietl & Schmid, 2001; Abb. C42, Teilbilder D und E).

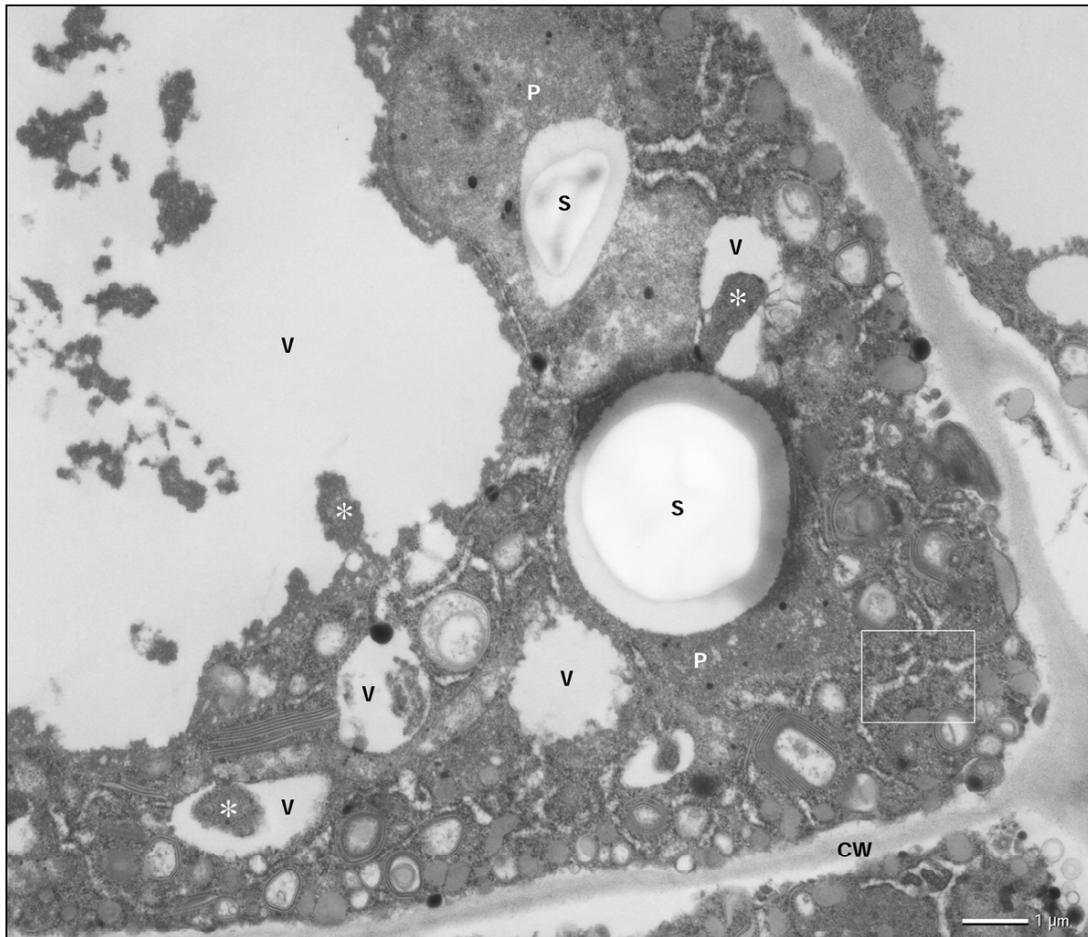
### 26.6.2 Die Entwicklung letaler Embryonen

Die letalen Embryonen homozygoter Transposon-Individuen erreichen nur das Herz-Stadium. Ihre zelluläre Ausdifferenzierung zum Zeitpunkt des Zelltodes ist ein Mosaik reifer Embryo-Differenzierung und einer stagnierenden Entwicklung von Oleosomen und Proteinkörpern. Die in Wildtypzellen vergleichbaren Alters vorhandenen Peroxisomen finden sich in letalen Transposon-Embryonen nicht.

Sekundäre Zellwände wurden ausgebildet. Auch sind Vakuolen von ähnlicher Größe wie in Wildtypzellen zu erkennen. Deren Inhalt ist jedoch nicht sehr kompakt (Abb. C43). Die dicht angeordneten Lipidkörper, von Größe und Umfang des Wildtyps fehlen gänzlich.

Das Cytosol enthält Mitochondrien, zahlreiche Vesikel und unausdifferenzierte Proplastiden ähnlich der Wildtyp-Zellen, allerdings sind die Stärkekörner wesentlich größer. Ausgedehnte Profile des Endoplasmatischen Retikulums finden sich zusammen mit kurzen Profilen, die für die Ultrastruktur von reifen Wildtyp-Embryonen typisch sind.

Insgesamt gibt es drei abnormale Strukturen in letalen Transposon-Embryonen, die einen Hinweis auf die Rolle von Pex10p in Bezug auf die Entstehung der Speichervakuolen durch die Bildung von Speicherproteinen geben, sowie die Formation von Lipidkörpern (Oleosomen).



**Abb. C43:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch das meristematische Gewebe eines letalen Embryos. Die zelluläre Differenzierung der Embryonen zum Zeitpunkt ihres Zelltods ist ein Mosaik reifender Embryo-Differenzierung und der stockenden Entwicklung von Lipidkörpern und Proteinkörpern. Die Zellen haben sekundäre Zellwände (CW) und Vakuolen (V) mit amorphem, elektronendichtem Material ausgebildet, das offensichtlich Präzipitate (\*) formt. Reife Lipidkörper fehlen hingegen vollständig. Die Proplastiden (P) sind überdurchschnittlich groß und enthalten Stärkekörner (S). Das Endoplasmatische Retikulum ist mit typischen lokalen Anschwellungen extrem entwickelt (hervorgehoben durch den Rahmen).

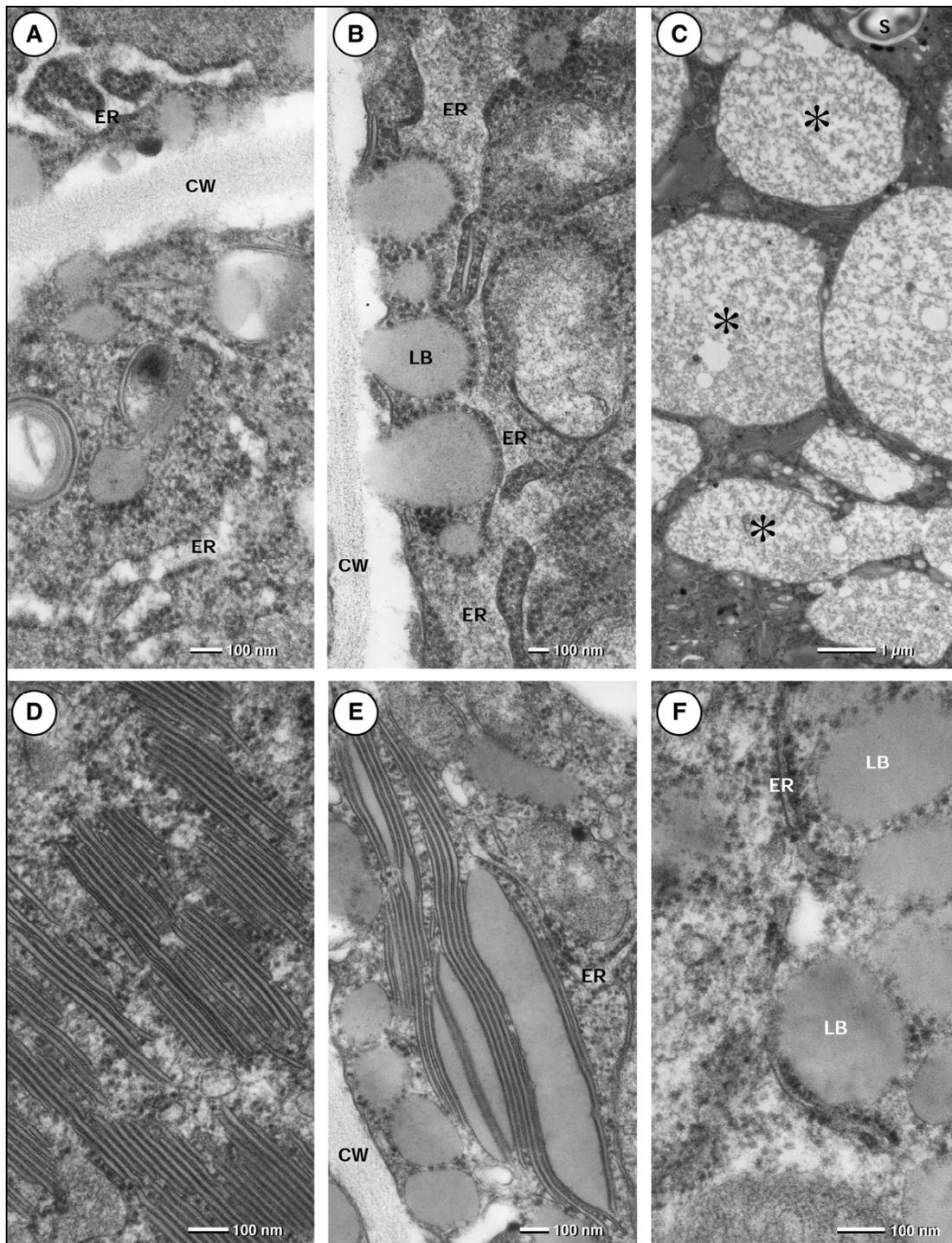
In Wildtyp-Embryonen werden Albumine und Globuline an Polysomen des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und in ihr Lumen transferiert. Anschließend werden sie in Form von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in die Speichervakuolen transportiert. In letalen Zellen formt das Endoplasmatische Retikulum jedoch ein ausgedehntes Netzwerk mit angeschwollenem ER-Lumen aus (Abb. C44, Teilbild A), deren Aufblähungen während der weiteren Zellentwicklung immer mehr zunehmen (Abb. C44, Teilbild B) und dabei zahlreiche Vakuolen von ähnlicher Größe und Umfang bilden, wie die Proteinkörper in Wildtyp-Embryonen. Im Gegensatz zu diesen enthalten die Vakuolen des letalen Zelltyps jedoch nur amorphes, faserartiges Proteinmaterial

(Abb. C44, Teilbild C), das ganz offensichtlich dazu tendiert zu aggregieren (Abb. C43, Sterne) sowie elektronendichte Präzipitate auszubilden (Abb. C44, Teilbild C, Sterne). Die Abwesenheit von Pex10p könnte somit das Abknospen genau dieser Vesikel verhindern, die das Protein vom Endoplasmatischen Retikulum zu den Golgi und von dort zu den Vakuolen transportieren.

Die zweite evidente Struktur besteht aus Stapeln dünner, stark komprimierter Membranblättchen, die entweder parallel oder sphäroidal angeordnet sein können (Abb. C44, Teilbilder D und E). Ein solch einzelnes Membranblättchen ist durch eine angrenzende elektronendichte Membran-Untereinheit charakterisiert sowie eine homogene, weniger elektronendichte Matrix, die offensichtlich Speicherlipide repräsentiert. Die Dicke dieser Lipidmatrix variiert (Abb. C44, Teilbild E), liegt aber gewöhnlich im Bereich von 10 nm (Abb. C44, Teilbild D). Weil das eingeschlossene Material dieselbe Elektronendichte besitzt wie die Lipidkörper (Oleosomen), kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese Membranblättchen grundsätzlich extrem flache Lipidkörper darstellen. Desweiteren spiegeln die Membranblättchen die ursprüngliche Form der Oleosomen, und der Raum zwischen den dunklen elektronendichten Linien wäre dann mit Triacylglyceriden gefüllt. *AthPex10p* scheint somit für die Bildung der Untereinheiten der Lipidbody-Membranen erforderlich zu sein, ohne die eine organisierte Akkumulation der Triacylglyceride nicht möglich ist.

Zum Dritten gibt es Strukturen von sehr kleinen Lipidkörpern mit Membran-Untereinheiten, die mit Ribosomen besetzt sind (Abb. C44, Teilbilder B und F). Dieser Typus von Lipidkörper kann vom Endoplasmatischen Retikulum offensichtlich auch in Abwesenheit von Pex10p initiiert werden und erinnert stark an junge Lipidkörper (Oleosomen) des Torpedo-Stadiums in *Arabidopsis* (vgl. Bowman, 1994, Seite 383) oder auch an die reifenden Keimlinge von *Cucurbita* und *Citrullus* (Wanner *et al.*, 1981).

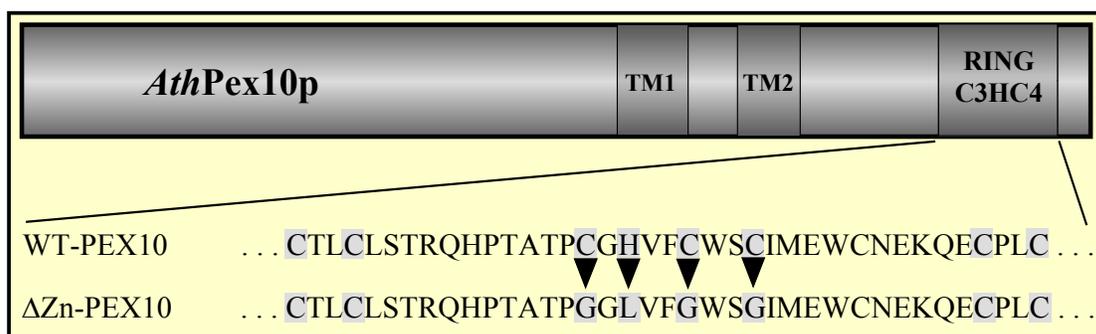
**Abb. C44, folgende Seite:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch das meristematische Gewebe eines letalen Embryo. Das raue Endoplasmatische Retikulum formt ein wohl entwickeltes Netzwerk angeschwollener Stränge und Zisternen (Teilbild A). Das elektronentransluzente Lumen des ER ist mit amorphem, faserartigem Material gefüllt (Teilbild B), das die Speichervakuole schliesslich zu einer ähnlichen Grösse anwachsen lässt wie die Proteinkörper des Wildtyps (Teilbild C, \*). Die abnormale Bildung der Lipidkörper ist ein sehr charakteristisches Merkmal: extrem dünne, diskusartige Scheiben bilden ganze Stapel dieser Formationen (Teilbild D). Die abgeflachten Lipidkörper besitzen eine dreigliedrige Struktur: zwei elektronendichte, einfache Membranen und eine homogene, elektronentransluzente Matrix, die vermutlich aus Triacylglycerol besteht. Die Dicke der diskusartigen Lipidmatrixes liegt im Bereich von 10 nm, kann aber auch ganz beträchtlich davon abweichen (Teilbild E). Kleine Lipidkörper (LB) können vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) anscheinend trotz Abwesenheit von Pex10p gebildet werden und erinnern an neu entstehende Lipidkörper (Oleosomen) des Torpedo-Stadiums (Teilbilder B und F); (CW = Zellwand).



Zusammenfassend konnte durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen die Bedeutung von *AthPEX10* für die Biogenese von Lipidkörpern und die Formation von Proteinvesikeln nachgewiesen werden. Die Ausbildung von Peroxisomen wurde in homozygoten Transposon-Linien verhindert. Durch Komplementation mit der cDNA von *AthPEX10* entwickelten sich die Embryonen hingegen zu Pflanzen mit normalem Habitus.

## 27 Überexpression von *Athpex10* mit zerstörtem Zinkfinger-Motif in *Arabidopsis*-Wildtyp führt zu phänotypischen Merkmalen

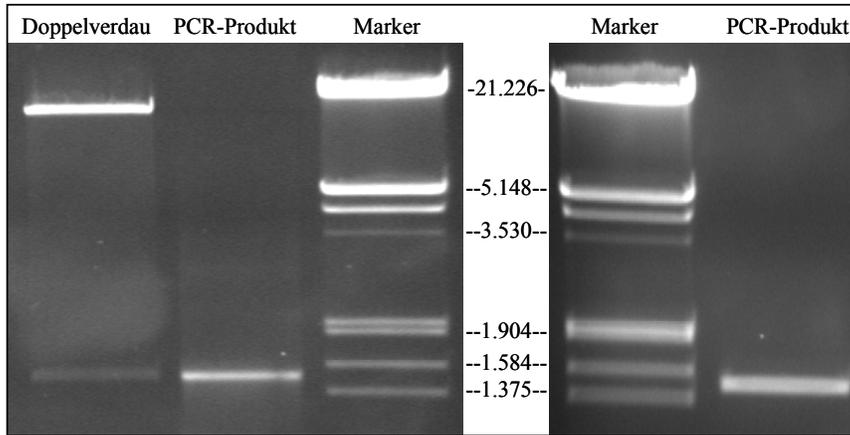
Da ein vollständiger Funktionsausfall von endogenem *PEX10* innerhalb der Transposonlinien bereits im Embryonalstadium zum Absterben der Pflanze führt, sollte die Generierung eines *pex10* mit dysfunktionalem Zinkfinger-RING und seine Überexpression in Wildtyp einen milderen Phänotyp erzeugen, der es ermöglichen würde, die Funktion des Proteins *in situ* zu erforschen. Zu diesem Zweck wurde im Bereich des Zinkfingermotivs C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> die Funktionalität durch gezielte Punktmutationen der cDNA-Triplets aufgehoben (Abb. C45) und das putativ dysfunktionale Gen in *Arabidopsis thaliana* (Col.) überexprimiert.



**Abb. C45:** Veränderungen der Aminosäuren innerhalb des Zinkfingermotivs am C-terminalen Ende von *Athpex10*. Die Abkürzungen TM1 und TM2 bezeichnen die Lage der transmembranumspannenden Regionen, die durch die Veränderungen der Aminosäuren jedoch nicht betroffen waren.

### 27.1 Klonierung einer dZn-cDNA in den binären Expressionsvektor pBI121 und Transformation in *A. tumefaciens*

Mithilfe einer geeigneten PCR-Methode war es möglich, mehrere Punktmutationen innerhalb des Zinkfinger-RINGS von *AthPEX10* zu erzeugen. Die sogenannte „splicing by overlap extension“-PCR amplifiziert dabei über drei unabhängige PCR-Schritte eine dysfunktionale cDNA-Version von *pex10*, die in den binären Expressionsvektor pBI121 mithilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sac*I integriert wurde. Abb. C46, linkes Bild, zeigt den Doppelverdau einer Plasmid-Präparation aus *E. coli* DH5α mit *Bam*HI und *Sac*I (1.482 bp) als Insert-Kontrolle sowie das PCR-Produkt mit pBI-Primern (1.490 bp). Ausgangstemplate für die PCR war ebenfalls Plasmid-DNA des Vektors pBI121 mit der *pex10* dZn-Insertion. Nach Transformation des Plasmidkonstruktes in elektrokompente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* pGV3850 wurde erneut eine Plasmidisolierung mit anschließender Kontroll-PCR durchgeführt. Dessen 1,4 kb-Produkt zeigt das rechte Bild in Abb C46. Die *Agrobacterien* wurden nun zur Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen eingesetzt.



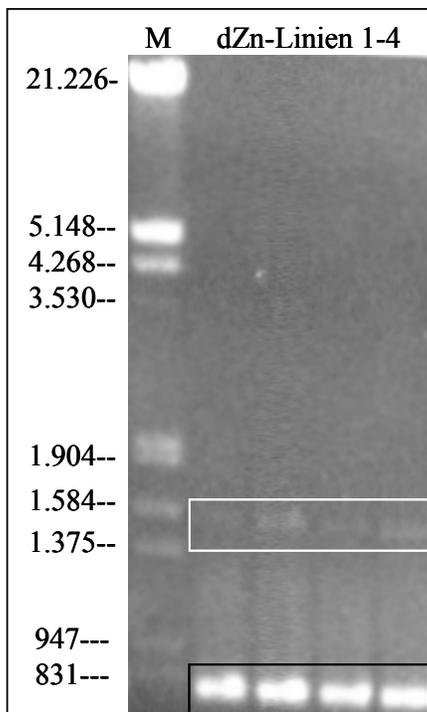
**Abb. C46:** Kontrollgele der Klonierung von *Athpex10-dZn* in pBI121 aus *E. coli* DH5 $\alpha$ . Das linke Bild zeigt einen Doppelverdau der Plasmid-DNA mit *Bam*HI und *Sac*I und gibt das Insert in einer Größe von 1.482 bp

wieder sowie das nebenstehende PCR-Produkt mit 1.490 bp. Das rechte Bild zeigt das PCR-Produkt isolierter Plasmid-DNA der gleichen Größe aus transformierten Agrobakterien.

## 27.2 Transformation von *A. thaliana* mit transgenen Agrobakterien

Mit den transgenen Agrobakterien, die einmal nur den leeren Vektor pBI121 ohne *pex10 dZn*-Insertion enthielten und einmal den Vektor plus Insertion, wurden jeweils vier Töpfe mit blühenden Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia transformiert.

Nach der Samenreife der F0-Generation wurden jeweils etwa 4.000 Samen auf Petrischalen mit MS-Medium gegeben, die zusätzlich den Selektionsmarker Kanamycin enthielten. Putativ transgene Abkömmlingen aller vier Pflanzentöpfe der F0-Generation wurden nach 10 Tagen von Agarplatten auf Töpfe mit Einheitserde transferiert und nach weiteren drei



bis vier Wochen Wachstum Blattmaterial zur Isolierung genomischer DNA abgeschnitten. In Abb. C47 sind die PCR-Produkte von *Athpex10-dZn* aus genomischer DNA-Präparation dargestellt. Verwendet wurde ein 35S-ForwardII-Primer, der im 35S-Promotor greift, sowie ein pBI-Antisense-Primer in der UTR von *PEX10*-cDNA. Die PCR-Produkte in Höhe von etwa 700 bp dienen als Positivkontrolle und amplifizieren eine Rubisco-Bande mit den beiden Rubisco-Primern *rbc*-Sense und *rbc*-Antisense von etwa 700 bp Länge.

**Abb. C47:** Kontroll-PCR aus Präparation genomischer DNA zur Amplifizierung eines *Athpex10-dZn*-Fragments (weißer Rahmen) und einer Rubisco-Bande als Positivkontrolle der PCR (schwarzer Rahmen).

### 27.3 Makroskopische Analyse der Phänotypen

Insgesamt 51 kanamycinresistente Keimlinge der F1-Generation wurden von Selektionsmedium auf Töpfe mit Einheitserde transferiert, um in Phytokammern für weitere 6-8 Wochen bis zur Samenreife zu gelangen. Nach dem Abernten der Samen wurden sie erneut auf Kanamycin als Selektionsmedium ausgebracht. Jeweils acht transgene Keimlinge einer Linie wurden anschließend erneut auf Erde transferiert und ihr Phänotyp in der F2-Generation beobachtet. Von den insgesamt 408 Individuen der F2-Generation aus 51 Linien der F1-Generation wurden vom im Habitus auffälligen Pflanzen die Samen abgeerntet und auf Selektionsmedium nach homozygoten Individuen gescreent. Phänotypisch auffällig waren hierbei alle Pflanzen, die entweder ein sehr zwerghaftes und verkümmertes Wachstum zeigten oder überdurchschnittlich robust erschienen und z.B. fleischige oder flächenmäßig große Blätter entwickelten. Die homozygoten Nachkommen der verschiedenen Phänotypen waren zu jeweils acht Individuen in die nächste Generation gebracht worden, um zu prüfen, ob sich ein Phänotyp tatsächlich reproduzieren ließ und für alle Nachkommen einer Linie galt. Während auffällig stark gewachsene Pflanzen in der Folgegeneration wieder ein normales Wachstum zeigten, blieben einige Linien der Kümmerformen zwerghaft und entwickelten nur ausgebleicht wirkende Blätter geringer Größe.

Drei unter normalatmosphärischen Bedingungen phänotypische dZn-Linien (dZn 1/3/5/3, dZn 2/13/3/4 und dZn 4/11/10-4) konnten isoliert und physiologisch näher charakterisiert werden. Die phänotypisch auffälligste Linie dZn 1/3/5/3 (Abb. C48) wurde auch für weitergehende Untersuchungen zur Photorespiration oder Elektronenmikroskopie verwendet.



**Abb. C48:** Aufsicht auf das Wachstum von Kontrollpflanzen, Wildtyppflanzen und der dZn-Linie 1/3/5/3 nach vier Wochen Wachstum unter Gewächshausbedingungen (linkes Bild von oben nach unten; Kontrollpflanzen, Wildtyppflanzen, dZn-Linie). Rechtes Bild zeigt die Vergrößerungsansicht einer dZn-Pflanze gegenüber einer Kontrollpflanze (links) und der Wildtyppflanze (rechts). Die Vertreter der dZn-Linie 1/3/5/3 zeigen chlorotische Blätter sowie einen insgesamt zwerghaften Habitus.

Diese dZn-Linie 1/3/5/3 ist deutlich kleiner und die Blattpigmentierung gegenüber den Kontrollen erheblich schwächer ausgeprägt. Der Entwicklungszeitraum vom Keimling bis zum Beginn der Blattseneszenz war bei dieser dZn-Linie um zwei bis drei Wochen gegenüber den Kontrollen verlängert.

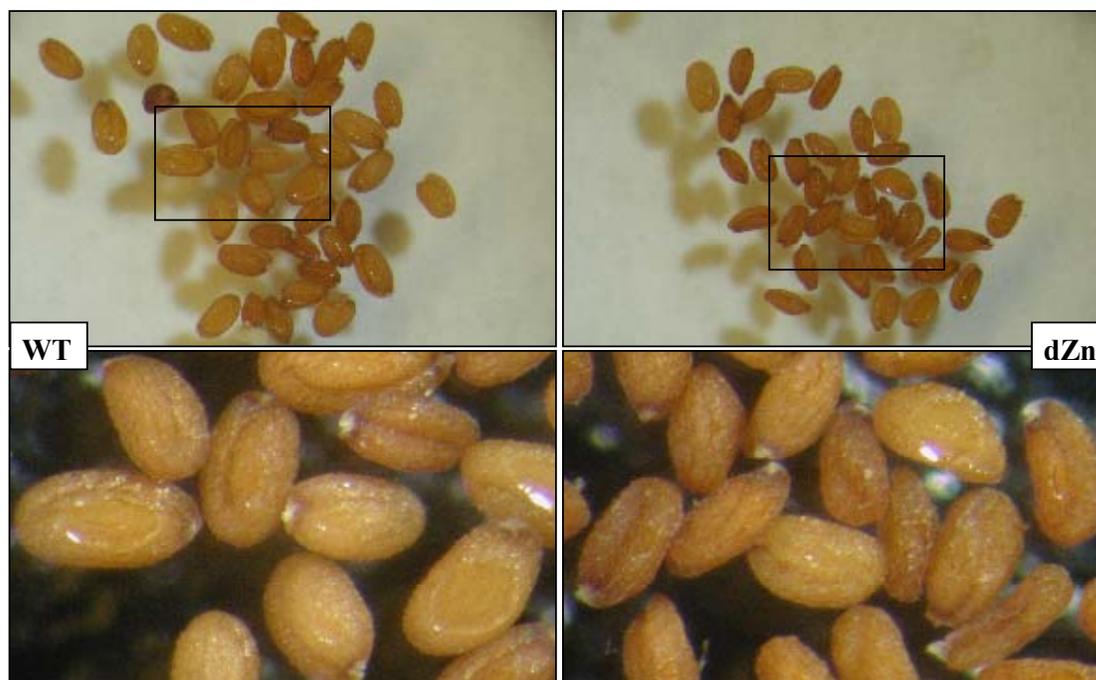
Abb. C49, linkes Bild zeigt einen Vergleich der drei Pflanzentypen nach sechs Wochen Wachstum auf Erde. Während die Blätter der Kontrollpflanzen bereits abgestorben sind, zeigt die dZn-Linie immer noch deutlich grüne Blätter und Schoten.

Aus Abb. C49, rechtes Bild geht die Entwicklung der dZn-Linie über einen Zeitverlauf von drei (A), sechs (B) und acht Wochen (C) hervor. Bemerkenswert ist die Diskrepanz in der Entwicklung zu einer ebenfalls drei Wochen alten Wildtyppflanze (D), deren Biomasse gegenüber der dZn-Linie erkennbar höher ist.



**Abb. C49:** Vergleich der phänotypischen Entwicklung nach sechs Wochen Wachstum im Gewächshaus (linkes Bild). Die dZn-Linie zeigt ein buschiges und zwergenhaftes Wachstum und besitzt gegenüber den Kontrollen eine verzögerte Blattseneszenz. Das rechte Bild zeigt die zurückgebliebene Entwicklung einer dZn-Linie über drei (A), sechs (B) und acht Wochen (C). Die Wildtyppflanze (D) ist mit drei Wochen ebenso alt wie der Phänotyp in A.

Auf die Fähigkeit zur Reproduktion wirkte sich die Kümmerform allerdings kaum aus. Der Ertrag an Samen blieb annähernd gleich, auch wenn die Samengrößen der dZn-Linie 1/3/5/3 subjektiv kleiner erscheinen und morphologisch nicht so rundliche Formen zeigen wie die Samen des Wildtyps (Abb. C50). Ein Vergleich der Samenflächen ergibt für die dZn-Linie unter normalatmosphärischen Bedingungen eine Verringerung um etwa 23% gegenüber den Wildtypsamen. Dies machte sich besonders beim Ausbringen des Saatguts mittels einer Pipettenspitze bemerkbar. Die Samen der dZn-Linie verhakten sich nämlich hierbei sehr leicht ineinander und waren nur relativ schwer in Form einzelner Samen auf die Petrischalen mit MS-Nährmedium auszubringen.



**Abb. C50:** Morphologischer Vergleich von Wildtypsamen (WT) und Samen der dZn-Linie 1/3/5/3 (dZn). Letztere wirken subjektiv meist kleiner, kantiger und weniger prall mit Reservestoffen gefüllt. Die unteren Aufnahmen zeigen vergrößerte Detailausschnitte der oberen Bilder und sind durch die beiden Rechtecke bestimmt.

#### 27.4 Kompensation der dZn-Phänotypen durch Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen

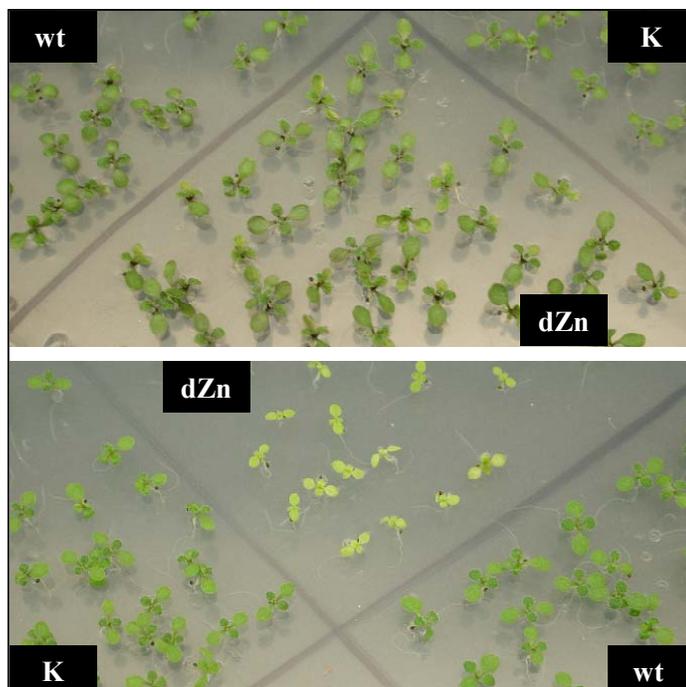
Unter der Annahme, dass die Expression von dZn-*pex10* auf die Entwicklung der Blatt-Peroxisomen in dZn-Pflanzen einen relevanten Einfluss besitzt, sollten die phänotypischen Merkmale der dZn-Linie unter Gasbedingungen bei denen der CO<sub>2</sub>-Gehalt stark erhöht ist, kompensiert werden können. Unter solchen Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen wird innerhalb des Zusammenspiels von Chloroplasten, Blatt-Peroxisomen und Mitochondrien die Photorespiration unterdrückt. Bei der CO<sub>2</sub>-Assimilation durch das Akzeptormolekül **Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase** (RUBISCO) konkurriert das CO<sub>2</sub>-Molekül unter atmosphärischen Bedingungen mit dem Luftsauerstoff um das aktive Zentrum des Enzyms. Neben der 3-Phosphoglycerinsäure (3-PGS) entsteht deshalb durch Oxygenierung des Ribulose-1,5-bisphosphats auch Phospho-Glykolsäure. Noch innerhalb der Chloroplasten wird vom Phosphoglykolat der Phosphatrest abgespalten und das entstandene Glykolat in die Peroxisomen transportiert.

Dort entsteht durch sauerstoffverzehrende Oxidation zu Glyoxylat zelltoxisches Wasserstoffperoxid, das von der peroxisomentypischen Katalase in O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O gespalten wird. Nach Übernahme einer Aminogruppe wird aus Glyoxylat die Aminosäure Glycin, welche den Übergang in die Mitochondrien vollzieht. In ihnen findet der CO<sub>2</sub> produzierende

Schritt der Photorespiration statt, indem sich aus zwei Molekülen Glycin - unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  - ein Serin-Molekül entwickelt, das zurück in die Peroxisomen geschleust wird. Hier entsteht durch Abspaltung von  $\text{NH}_2$  Hydroxypyruvat und nach seiner Reduktion zu Glycerat kann dieses erneut in die Chloroplasten transportiert werden, wo es nach Phosphorylierung dem Calvin-Zyklus zugeführt wird.

Über diesen als Glykolatweg bezeichneten Stoffwechselfad kann circa 75% des im Glykolat investierten Kohlenstoffs für den Photosyntheseapparat zurück gewonnen werden. Hierfür sind jedoch intakte Peroxisomen Voraussetzung, die einerseits das Glykolat umsetzen können und andererseits in der Lage sind, das dabei entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  abzubauen. Wird jedoch durch Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration die Affinität der Rubisco für Luft-sauerstoff herabgesetzt, dann sollte einerseits die verringerte Effizienz des Photosyntheseapparates und andererseits die zelltoxische Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Oxidation von Glykolat zu Glyoxylat in Pflanzen der dZn-Linien kompensierbar sein.

Zur Durchführung dieses Versuches wurden die drei Pflanzentypen dZn-Linie 1/3/5/3, Vektorkontrollpflanzen und Wildtyppflanzen in spezielle Conviron-Phytokammern eingestellt, deren  $\text{CO}_2$ -Konzentration sich über ein Steuerungsgerät auf den 5-fachen Wert des atmosphärischen Gehalts einstellen ließ. Die verschiedenen Pflanzentypen wurden auf Petrischalen mit MS-Medium für 10 Tage unter Normalatmosphäre angezogen und entweder bereits vor der Keimung die Hälfte der Anzuchtplatten erhöhten  $\text{CO}_2$ -Bedingungen ausgesetzt (Abb. C51) oder erst nach der Keimung auf Erde transferiert und dann zur Hälfte in  $\text{CO}_2$ -Kammern gebracht (Abb. C52). Als Kontrolle diente jeweils derselbe Versuchsansatz in der entsprechenden Phytokammer mit Normal-Gasatmosphäre.



**Abb. C51:** Vergleich des unterschiedlichen Wachstums von Keimlingen des Wildtyps (wt), der Vektorkontrolle (K) und von dZn-Pflanzen (dZn) unter Normalatmosphäre (unteres Bild) und Hoch- $\text{CO}_2$ -Bedingungen (oberes Bild) nach 10 Tagen auf Agarplatten mit MS-Medium. Unter atmosphärischem  $\text{CO}_2$ -Gehalt bleiben die dZn-Pflanzen im Wachstum gegenüber den Kontrollen zurück und zeigen deutlich hellere Blätter. Der Phänotyp läßt sich bei erhöhten  $\text{CO}_2$ -Bedingungen von 1800 ppm vollständig unterdrücken.



**Abb. C52:** Vergleich des unterschiedlichen Wachstums von Wildtyppflanzen, Kontrollpflanzen und dZn-Pflanzen unter Normalatmosphäre (linkes Bild) und Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen (rechtes Bild) nach vier Wochen auf Erde. Die oberen Reihen entsprechen Kontrollpflanzen, die mittleren Reihen Wildtyppflanzen und die unteren Reihen der dZn-Linie. Unter 5-fach erhöhten CO<sub>2</sub>-Bedingungen wächst die dZn-Linie nach vier Wochen entsprechend den beiden Kontrollen unauffällig und ist in der Lage das anfängliche Zwergenwachstum unter Normalatmosphäre nach Transfer in eine Hoch-CO<sub>2</sub>-Kammer vollständig zu kompensieren.

Während die dZn-Linie unter Normalbedingungen in ihrem Wachstum deutlich hinter den Kontrollen zurückbleibt und auch die Blattpigmentierung erheblich schwächer ausgeprägt ist, verschwinden diese Unterschiede unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen vollständig, wie aus den Abb. C52 (rechtes Teilbild) und C53 (linkes Teilbild) deutlich hervorgeht.



**Abb. C53:** Das linke Teilbild zeigt eine dZn-Pflanze nach fünf Wochen Wachstum bei 1.800 ppm CO<sub>2</sub>. Rechts unten zeigt dieselbe Linie unter Normalbedingungen verkümmert. Die unauffällig wachsende Wildtypkontrolle unter Normalbedingungen ist rechts oben abgelichtet.

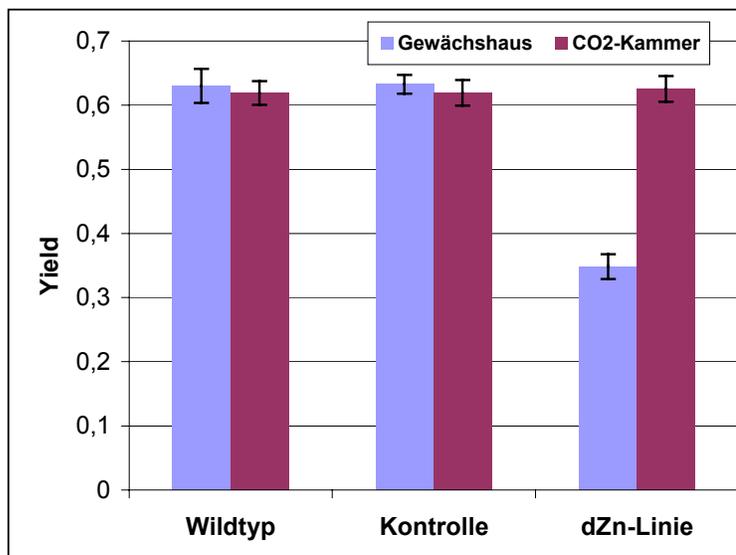
Nach fünf Wochen Wachstum auf Erde zeigt eine dZn-Pflanze unter fünffach erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (1.800 ppm) eine vitale, gegenüber Kontrollpflanzen gänzlich unauffällige Blattpigmentierung sowie eine normale Biomasseentwicklung (Abb. C53, linkes Teilbild), die keinen Unterschied zu den beiden Kontrollpflanzengruppen zeigte. Vertreter derselben Linie, die als Negativ-Kontrolle unter Normalatmosphäre aufwachsen mussten, zeigten hingegen einen stark verkümmerten Habitus (Abb. C53, rechtes Teilbild) mit deutlich erkennbaren Unterschieden zu den Kontrollen Wildtyp und Vektorkontrolle.

## 27.5 Physiologische Charakterisierung einer Zinkfinger-„disruption“-Linie

Aufgrund der phänotypischen Merkmalsausprägung der dZn-Linie und ihrer Kompensation unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen liegt ein Zusammenhang zwischen photorespiratorischen Effekten innerhalb der Photosynthese und des Kümmerwuchses der dZn-Linie nahe. Zur Untersuchung dieser Hypothese erschien es sinnvoll sich einige physiologische Parameter der verschiedenen Pflanzentypen sowohl unter Normalatmosphäre als auch unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen näher zu betrachten.

### 27.5.1 Erhebung von Photosynthese-Parametern mit dem Fluorometer PAM-2000

Mit dem Fluorometer PAM-2000 läßt sich auf nicht-invasive Weise der Photosyntheseprozess unter natürlichen Bedingungen in verschiedenen Messgrößen festhalten. Dies geschieht auf Basis der Chlorophyllfluoreszenz im PSII. Abb. C54 zeigt die effektiven Quantenausbeuten des PSII an belichteten Blättern von Wildtyp, Vektorkontrolle und dZn-Linie.

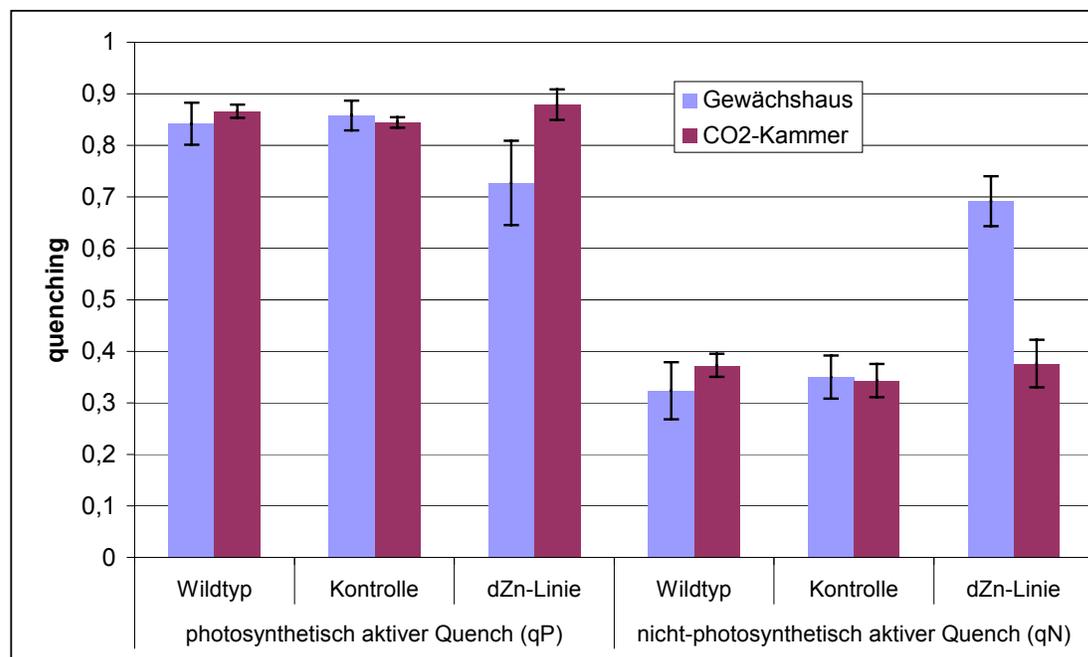


**Abb. C54:** Ertrag der Photosyntheserate, angegeben in „Yield“, für drei verschiedene Typen von Pflanzenlinien unter CO<sub>2</sub>-Bedingungen der Normalatmosphäre (Gewächshaus) und 5-fach erhöhten CO<sub>2</sub>-Werten (CO<sub>2</sub>-Phytokammer). Jeder Mittelwert wurde aus vier Individuen eines Pflanzentyps gebildet.

Dieser Ertrag der Photosyntheserate, der Einfachheit halber „Yield“ genannt, unterscheidet sich unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen für keine der drei Pflanzentypen. Die vier Pflanzenvertreter der dZn-Linie 1/3/5/3 zeigen in der Effizienz ihrer Quantenausbeuten keinen abweichenden Mittelwert zu den Kontrollen.

Unter atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen liegt dieser Wert bei der Wildtyp- und Vektorkontrolle mit 0,62 und 0,63 zwar ebenso hoch wie in der CO<sub>2</sub>-Kammer. Allerdings erreicht hier, unter Bedingungen die den Ablauf der Photorespiration nicht unterdrücken, die dZn-Linie mit 0,35 nur mehr die Hälfte des Werts ihrer beiden Kontrollen. Der Anteil photochemisch nutzbarer Anregungsenergie ist hier zugunsten erhöhter Chlorophyllfluoreszenz erniedrigt.

Dieser Unterschied der dZn-Linie im Vergleich zu ihren beiden Kontrollen zeigt sich auch, wenn man einen weiteren Parameter im Prozessablauf des Photosynthesesystems betrachtet. Schaut man sich das photochemische Quenching in Abb. C55 als Parameter für den Redoxzustand des primären Elektronenakzeptors an, so wird ebenfalls deutlich, dass unter normalen CO<sub>2</sub>-Bedingungen die Effizienz des Photosynthesesystems bei Vertretern der Linie dZn1/3/5/3 stark vermindert ist, was sich durch hohe qN- und erniedrigte qP-Werte der dZn-Linie ausdrückt.



**Abb. C55:** Koeffizient des photosynthetisch aktiven und nicht aktiven Quenches bei drei verschiedenen Typen von Pflanzenlinien unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen der CO<sub>2</sub>-Phytokammer sowie den Normalbedingungen eines Gewächshauses. Der Mittelwert rekrutierte sich aus jeweils vier Vertretern einer Pflanzengruppe.

Je höher der qP-Wert, umso effektiver arbeitet das Photosynthesesystem. Je höher der qN-Wert, desto ineffizienter ist sein Zustand, weil der Anteil der Energiedissipation steigt. Diese Quenchingkoeffizienten sind hingegen bei Wildtyp- und Vektorkontrollpflanzen gar nicht oder nur wenig von der Konzentration an Umgebungs-Kohlendioxid abhängig und zeigen unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen dieselben Werte wie jene der dZn-Linie.

Anders ausgedrückt ist die photochemische Effizienz der dZn-Linie bei 5-fach erhöhten Kohlendioxidgehalt ebenso hoch wie bei den Pflanzenvertretern aus den beiden Kontrollgruppen Wildtyp und Vektorkontrolle.

### 27.5.2 Bestimmung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte von Blättern

Bei allen photoautotrophen Organismen sind die Chlorophylle von zentraler Bedeutung für die Photosynthese. Da die dZn-Linie unter normalatmosphärischen Bedingungen im Licht, also unter photorespiratorischen Verhältnissen, deutlich blässere Blätter als die Kontrollen ausbildet, wurden die verschiedenen Parameter der Photosynthesepigmente erfasst und in Abb. C56 grafisch dargestellt. Parallel wurden diese Parameter von Pflanzen erhoben, die unter 5-fach erhöhten CO<sub>2</sub>-Partialdruck angezogen wurden und infolge dessen der Metabolismus einer ablaufenden Photorespiration umgangen werden konnte.

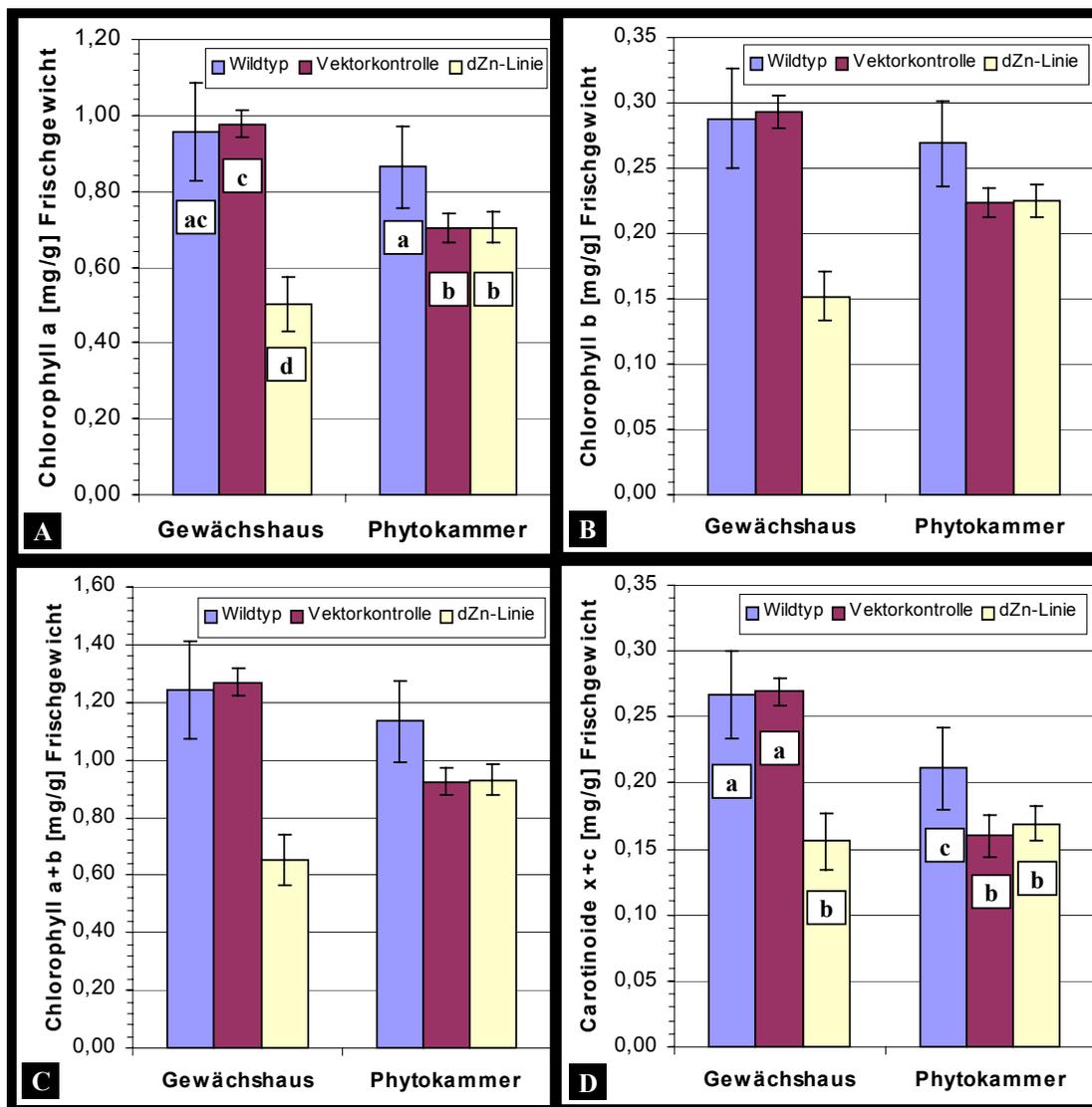
Wichtigstes Photosynthesepigment der Höheren Pflanzen ist Chlorophyll a, während Chlorophyll b und die Carotinoide als akzessorische Pigmente fungieren. Dies spiegelt sich in der mengenmässigen Dominanz des Chlorophyll a an den Photosynthesepigmenten wider und am Vorkommen des Chlorophyll a in den Reaktionszentren, den Orten des photosynthetischen Primärprozesses. Die Carotinoide sind als akzessorische Photosynthesepigmente relativ schlechte Energieüberträger. Ihre Hauptfunktion erfüllen die Carotinoide (Carotine und Xanthophylle) somit eher als Schutzpigmente vor photooxidativer Zerstörung bei übermässiger Lichteinstrahlung für die empfindlichen Chlorophylle innerhalb des Antennenkomplexes.

Betrachtet man sich die Einzelwerte des Chlorophyll a in Teilbild A (Abb. C56) sowie des Chlorophyll b in Teilbild B, so ist bei der dZn-Linie unter Normalatmosphäre eine Reduzierung der beiden Antennenpigmente um fast 50 % gegenüber den Kontrollen feststellbar. Der prozentuale Umfang der Reduzierung ist für Chlorophyll a und b so ähnlich, dass im Weiteren für die Betrachtung der Chlorophylle nur das Teilbild C mit dem Gesamtchlorophyllgehalt (a+b) betrachtet werden kann. Entsprechend ist auch der Gesamtchlorophyllgehalt der dZn-Linie im Vergleich zu den beiden Kontrollen unter Gewächshausbedingungen deutlich erniedrigt. Unter Hoch-CO<sub>2</sub> bei unterdrückter Photorespiration liegt dieser Wert aber auf vergleichbarem Niveau wie die Vektorkontrolle und ist nur leicht erniedrigt gegenüber dem Wildtyp.

Die Gehalte an den als Schutzpigmente fungierenden Carotinoiden sind unter Gewächshausbedingungen gegenüber den Kontrollpflanzen ebenfalls deutlich vermindert. Unter Phytokammerbedingungen steigt ihr Gehalt in der dZn-Linie nicht signifikant an, allerdings sinken die Carotinoidgehalte der beiden Kontrolllinien in den Phytokammern, so dass diese Werte in der dZn-Linie und Vektorkontrolle gleich hoch sind.

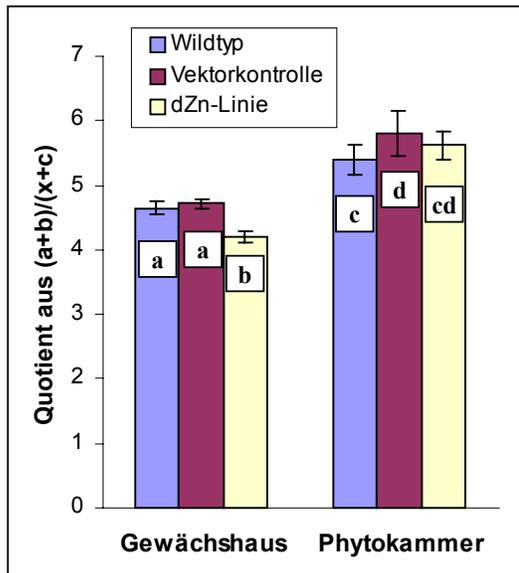
Um die tatsächlichen Veränderungen in der Zusammensetzung der Blattpigmente beurteilen zu können ist die Veränderung des Quotienten zwischen Blattchlorophyllen und Schutzpigmenten hilfreich, da sich dieser auf die Werte innerhalb einer Linie bezieht und

die Modifikationen der Pigmentzusammensetzungen aufgrund veränderter Kohlendioxidkonzentration in der Umwelt besser beschreiben kann.



**Abb. C56:** Gehalt an verschiedenen Photosynthesepigmenten in Rosettenblättern von Wildtyp, Vektorkontrolle und dZn-Linie unter Gewächshausbedingungen mit Normalatmosphäre (360  $\mu\text{bar}/\text{bar}$   $\text{CO}_2$ ) und in einer  $\text{CO}_2$ -Phytokammer mit 5-fach erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck (1800  $\mu\text{bar}/\text{bar}$ ). Schaubild (A) zeigt die Werte für Chlorophyll a, (B) für Chlorophyll b, (C) für Chlorophylle (a+b) und (D) spiegelt die Werte für die Summe aller Xanthophylle und Carotine (x+c) wider. Jeder Einzelwert wurde aus den Ergebnissen von Blattmaterial aus vier Pflanzen (Gewächshaus), bzw. sechs Pflanzen ( $\text{CO}_2$ -Phytokammer) berechnet. Die Platzhalter in Teilbilder (A)+(D) repräsentieren statistische Unterschiede zweier Werte aufgrund eines durchgeführten Mann-Whitney-U-Testes. Gleiche Buchstaben bedeuten keine signifikanten Unterschiede zweier Werte, unterschiedliche Buchstaben ausreichende Signifikanz eines Unterschieds; ( $p < 0,05$ ).

Die Darstellung der Quotienten in Abb. C57 zeigt, dass beide Kontroll-Linien unter Gewächshausbedingungen geringere Quotienten besitzen, als unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen der Phytokammer. Hierbei könnte es sich sowohl um eine Reaktion auf die verringerten Lichtmengen als auch auf die erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Phytokammer handeln.



**Abb. C57:** Verhältnis zwischen Chlorophyll-Konzentration (a+b) und Konzentration an Carotinoiden (x+c) unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks. Signifikant ist die relative Verringerung der empfindlichen Chlorophylle an der Gesamtpigmentierung eines Blattes unter Gewächshausbedingungen mit Normalatmosphäre. Die Buchstaben repräsentieren statistische Ähnlichkeiten aufgrund eines durchgeführten Mann-Whitney-U-Testes. Gleiche Platzhalter bedeuten keine signifikanten Unterschiede zweier unabhängigen Werte, unterschiedliche Buchstaben ausreichende Signifikanz eines Unterschieds; ( $p < 0,05$ ).

Sehr auffällig ist aber die starke Veränderung in der Zusammensetzung der Pigmente bei der dZn-Linie. Ihr Gewächshausquotient liegt mit 4,20 deutlich hinter den Kontrollwerten von 4,65 der Wildtyp-Linie und 4,72 der Vektorkontrolle zurück. Unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen kompensiert die dZn-Linie diesen Quotienten mit 5,62 gegenüber 5,40 des Wildtyps und läßt sich von diesem statistisch nicht mehr unterscheiden.

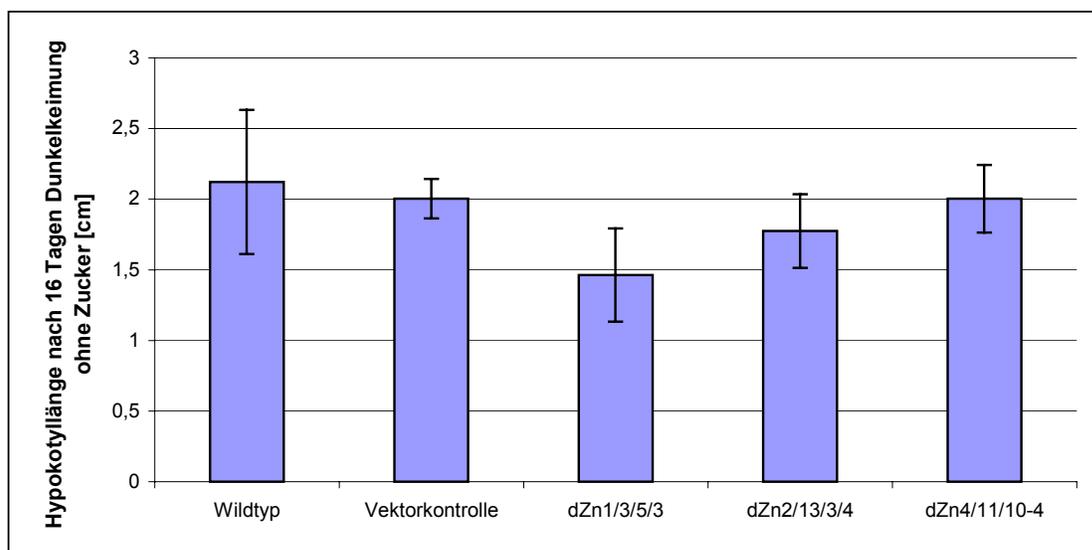
Als Ursache der Verminderung von Chlorophyllen unter Gewächshausbedingungen sind die zelltoxischen Auswirkungen der Photorespiration bei der dZn-Linie durch die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu nennen sowie die Auswirkungen der Photooxidation durch Bildung von Radikalen, die wahrscheinlich einen verstärkten Abbau der empfindlicheren Chlorophylle zur Folge haben. Der Abbau der Schutzpigmente geht hingegen langsamer vonstatten. Allerdings sind auch diese von den Oxidationsprozessen betroffen, wie die insgesamt erniedrigten Absolutwerte der Schutzpigmente gegenüber den Kontrollen unter Normalatmosphäre deutlich zeigen. Unter CO<sub>2</sub>-Bedingungen der Phytokammer sind die sensiblen Blattpigmente auf ein Normalmaß der Kontrollen erhöht.

### 27.5.3 Der Einfluss von Licht, Zucker und CO<sub>2</sub> auf das Wachstum von Keimlingen

Ohne das funktionale Zusammenspiel von Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien bei der Photorespiration ist nur eine verringerte Kompensation der Ribulose-Oxygenase-

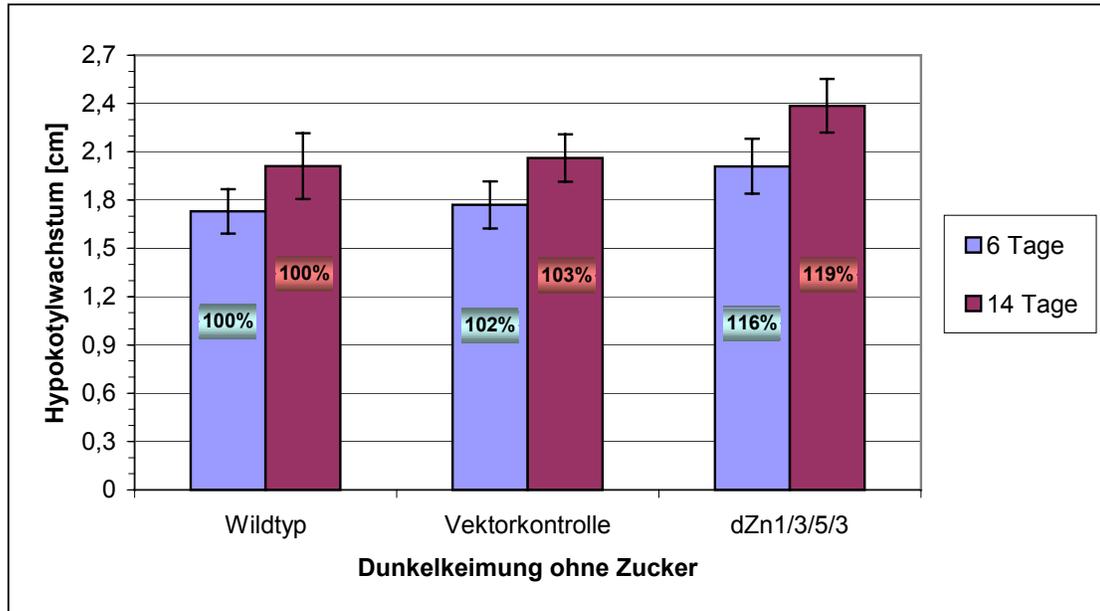
Tätigkeit durch die Rückführung des metabolisierten Phosphoglycolats in den Calvin-Zyklus möglich. Deshalb müssten die dZn-Linien unter normalatmosphärischen Bedingungen im Licht aufgrund der Beeinträchtigung ihrer Blatt-Peroxisomen schlechter wachsen als die Kontrollen. Falls die wachstumshemmenden Prozesse nur an die Photorespiration gekoppelt sind, dürfte bei stattfindender Dunkelkeimung und ausschliesslicher Nutzung von Lipid- und Speicherproteinen zum Aufbau der Biomasse keine Einschränkung im Keimungsvermögen und der Ausbildung von Keimblättern feststellbar sein. Dies gilt allerdings nur dann, wenn die Nutzung der Speicherlipide durch die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren innerhalb der Glyoxysomen noch ablaufen kann. Um den Einfluss von *dZnpex10* auf Blatt-Peroxisomen und Glyoxysomen getrennt abschätzen zu können, wurden metrische Untersuchungen der Keimlinge unter verschiedenen Dunkel- und Gasbedingungen durchgeführt.

Das Hypokotylwachstum von drei verschiedenen dZn-Linien und ihrer Kontrollen war unter Dunkelbedingungen auf MS-Medium ohne Zucker ähnlich gut, wenngleich es innerhalb der verschiedenen dZn-Linien durchaus auch Abweichungen gibt, wie Abb. C58 erkennen lässt. Während sich die dZn-Linie 4/11/10-4 nach 16 Tagen Dunkelkeimung gegenüber den Kontrollen völlig unauffällig zeigt, ist das Wachstum der phänotypischen Extremelinie dZn 1/3/5/3 um 31%, bzw. 27% gegenüber der Wildtyp- und Vektorkontrolle inhibiert. Das Wachstum der dritten dZn-Linie liegt mit 16% und 11% Minderwachstum dazwischen. Ob sich der relative wachstumshemmende Effekt der dZn-Linie 1/3/5/3 einer Störung in der Mobilisierung der Reservestoffe verdankt, also von glyoxysomaler Natur ist oder in einer Verminderung der Reservestoffe selbst begründet liegt, ist der Grafik allerdings nicht zu entnehmen. Hierfür müsste der Sekundäreffekt verminderter Reservestoffbildung bereits bei der Samenbildung von dZn-Linien ausgeschlossen werden.



**Abb. C58:** Vergleich des Hypokotylwachstums zwischen Wildtyp, Vektorkontrolle und drei verschiedenen dZn-Linien nach 16 Tagen Dunkelkeimung auf MS-Medium ohne Zucker.

Deshalb wurde, um den Einfluss der Reservestoffe auf das teils verminderte Hypokotylwachstum der dZn-Linien bei Dunkelheit ausschliessen zu können, die unter Normalbedingungen phänotypisch auffälligste dZn-Linie 1/3/5/3 unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen bis zur Samenreife gebracht und diese Samen dann erneut unter Dunkelbedingungen auf MS-Medium ohne Zucker ausgebracht. In Abb. C59 sind die Hypokotyllängen der beiden Positivkontrollen Wildtyp und Vektorkontrolle der dZn-Linie gegenübergestellt.

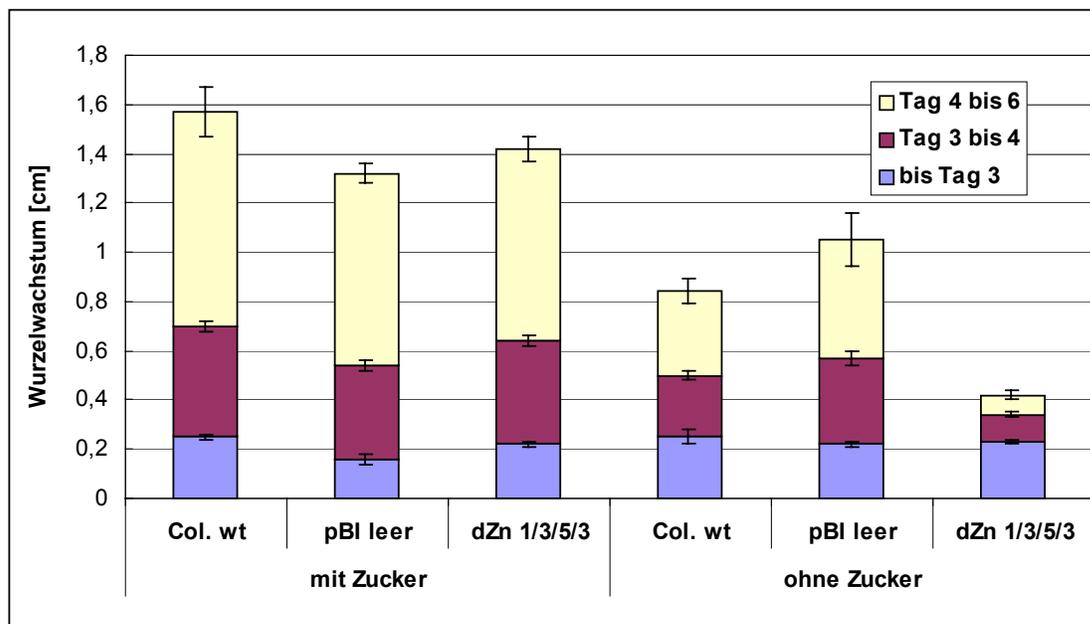


**Abb. C59:** Vergleich des Hypokotylwachstums zwischen Wildtyp, Vektorkontrolle und Hoch-CO<sub>2</sub> kompensierter dZn-Linie nach 6 und 14 Tagen Dunkelkeimung auf MS-Medium ohne Zucker. Neben des Absolutwerten der Ordinatenachse sind auch die Relativlängen in Prozent, bezogen auf die Wildtyp-Linie angegeben, deren Wachstum mit 100% festgelegt wurde.

Aus den relativen Wachstumswerten der drei Linien geht klar hervor, dass die unter atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen herangereiften und minderwertigeren Samen der phänotypischen dZn-Linie 1/3/5/3 unter Dunkelkeimbedingungen ebenso gut wachsen wie ihre Kontrollen. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Mutterpflanzen zuvor unter kompensatorischen Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen aufgezogen werden und dadurch Gelegenheit zur Ausbildung normal gestalteter Samen haben, ohne den wachstumshemmenden Einflüssen der Photorespiration ausgesetzt zu sein.

Ein weiteres Indiz dafür, dass sich das dysfunktionale *dZnpex10* phänotypisch anscheinend nicht auf die Funktion von Glyoxysomen auswirkt, ergab ein Wurzelwachstumstest unter photorespiratorischen Bedingungen des Lichts. Dabei wurde das Wachstumsverhalten der dZn-Linie 1/3/5/3 zusammen mit ihren Kontrollen unter photorespiratorischen Bedingungen näher untersucht, indem diese verschiedenen Bedingungen im Licht ausgesetzt wurden, die sich jeweils durch die Zugabe von Zucker zum Medium unterschieden. Aus Abb.

C60 geht hervor, dass sich die drei Pflanzengruppen im Licht sehr ähnlich verhielten, wenn Zucker im Medium angeboten wurde und die dZn-Linie sogar ein besseres Wachstum aufwies als die Vektorkontrolle.



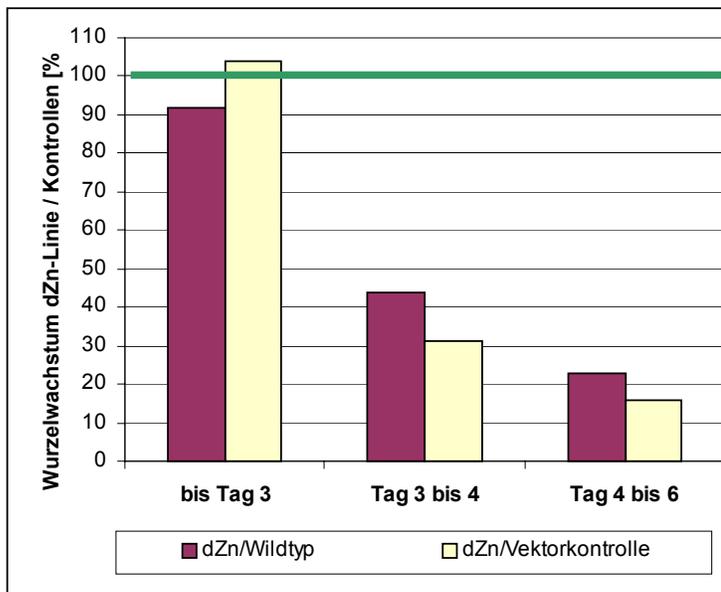
**Abb. C60:** Vergleich des Wurzelwachstums von Keimlingen des Wildtyps, der Vektorkontrolle und einem Vertreter der dZn-Linien unter Dauerlichtbedingungen. Die Samen wurden jeweils auf MS-Medium mit 1% Saccharose sowie ohne Saccharose angezogen. Die Erfassung der Wurzellängen erfolgte erstmals nach drei Tagen vom Zeitpunkt der Keimung an. Eine zweite Teilmessung wurde nach einem weiteren Tag durchgeführt, die letzte nach insgesamt sechs Tagen. Die Ergebnisse spiegeln den Mittelwert dreier unabhängiger Versuchsansätze wider. Pro Linie wurden 28-32 Keimlinge erfasst.

Obwohl die Keimblätter der dZn-Linie phänotypisch bereits blasser erscheinen als die Keimblätter der Kontrollen (nicht dargestellt), ist auf zuckerhaltigem MS-Medium das Wurzelwachstum der dZn-Linie nicht verringert. Für den Aufbau ihrer Biomasse ist der exogen zugegebene Zucker offenbar völlig ausreichend, ohne dass der Einfluss photorespiratorischer Defizienzen wachstumslimitierend wirkt. Anders verhält es sich wenn der Zucker dem Medium nicht beigegeben wurde. Nach sechs Tagen Wachstum unter Dauerlicht und vorenthaltenem Zucker bleibt die dZn-Linie zwischen 50 und 60 % im Wurzelwachstum gegenüber den beiden Kontrollen zurück. Der Zucker ist somit notwendig und ausreichend zugleich, um die Defizienz bezüglich der Photorespiration kompensieren zu können.

Der Versuch gibt jedoch auch einen Einblick in das Vermögen der Embryonen, unter Verbrauch von Speicherstoffen, Keimblätter auszubilden. So ist das Wachstum der dZn-Linie 1/3/5/3 innerhalb der ersten drei Tage nach Keimung gegenüber den Kontrollen völlig vergleichbar. Erst mit zunehmender Abhängigkeit von der eigenen Photosyntheseleistung mit einhergehendem Verbrauch der Speichernährstoffe manifestiert sich die peroxisomale Defizienz in der dZn-Linie. Dieser Prozess vollzieht sich sukzessive in dem Maß

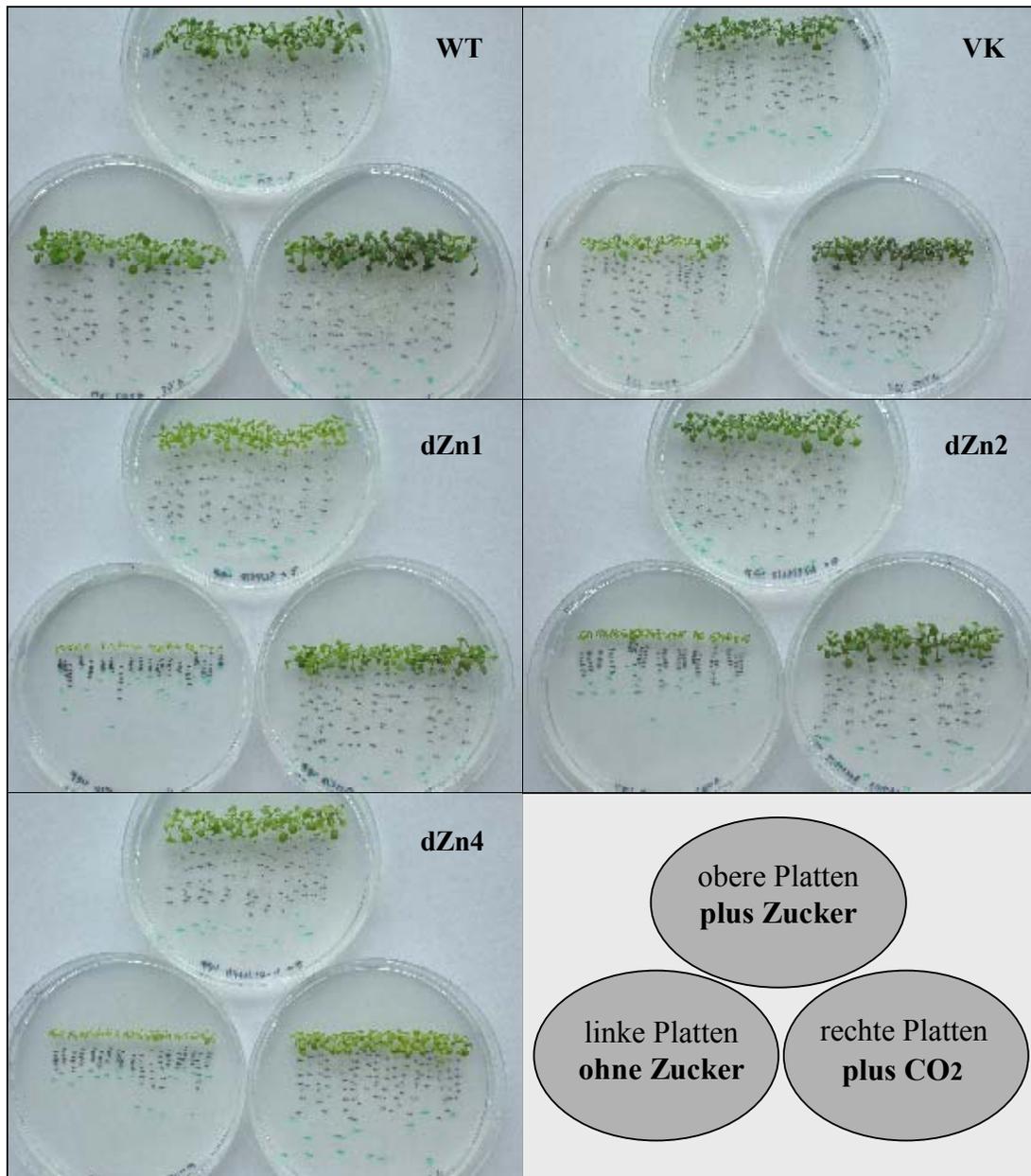
wie Speichernährstoffe aufgebraucht werden und der Anteil der Photosyntheseleistung zunimmt, wie aus den relativen Wachstumszuwächsen der einzelnen Teilmessungen klar hervor geht. Der anfängliche Prozess der Keimung bis Tag Drei mit Involvierung der Glyoxysomen scheint hingegen ungestört. Die Eindringlichkeit dieser Teilunterschiede im Wurzelwachstum der verschiedenen Pflanzengruppen wird aus Abb. C61 deutlich, indem die zurückgelegten Einzelstrecken der zwei Kontrollgruppen in Relation zur dZn-Linie gesetzt wurden. Das Wachstum der Kontrollen wurde hierbei auf 100 % gesetzt.

Die Daten zeigen, dass mit zunehmender Keimungsdauer und der Ausbildung photosynthetisch aktiver Blattfläche, unter gleichzeitigem Abbau der Reservestoffe, die Vertreter der dZn-Linie immer mehr hinter dem Wurzelwachstum der Kontrollen zurückbleiben. Nach drei Tagen Keimung liegt die dZn-Linie mit einer durchschnittlichen relativen Wurzellänge von 92 und 104 % noch sehr eng bei ihren Kontrollen. Doch bereits nach einem weiteren Tag kann die dZn-Linie nur noch 44 bzw. 31 % der Wurzellänge ausbilden, die von den Kontrollen im gleichen Zeitraum zurückgelegt werden. Die letzte Teilmessung nach sechs Tagen ergibt für die dZn-Linie schliesslich nur noch 23 bzw. 16 % an Längenzuwachs, verglichen mit den Referenzwerten von Wildtyp und Vektorkontrolle. Damit spiegeln die Daten den zwerghaften Phänotyp der dZn-Linie 1/3/5/3 gegenüber ihren beiden Kontrollen wider.



**Abb. C61:** Prozentuales Wurzelwachstum der dZn-Linie bezogen auf Wildtyp und Vektorkontrolle bei Dauerbelichtung und MS-Medium ohne Zucker. Dargestellt sind drei Teilmessungen der dZn-Linie und ihr zunehmend prozentualer Abfall im Wurzelwachstum gegenüber den beiden Kontrollen. Deren zurückgelegte Wurzelstrecken wurden jeweils 100% gesetzt.

Um den unmittelbaren Zusammenhang zwischen vermindertem Wurzelwachstum der dZn-Linien und photorespiratorischen Effekten herstellen zu können, wurde zu den bisher eingeführten Versuchsparametern Zuckerbeigabe und Zuckerentzug ein weiterer Parameter in Form von Hoch-CO<sub>2</sub> eingebracht. Dabei wurden verschiedene dZn-Linien und ihre beiden Kontrollen unter jeweils nur einer abgeänderten Versuchsbedingung getestet (Abb. C62).

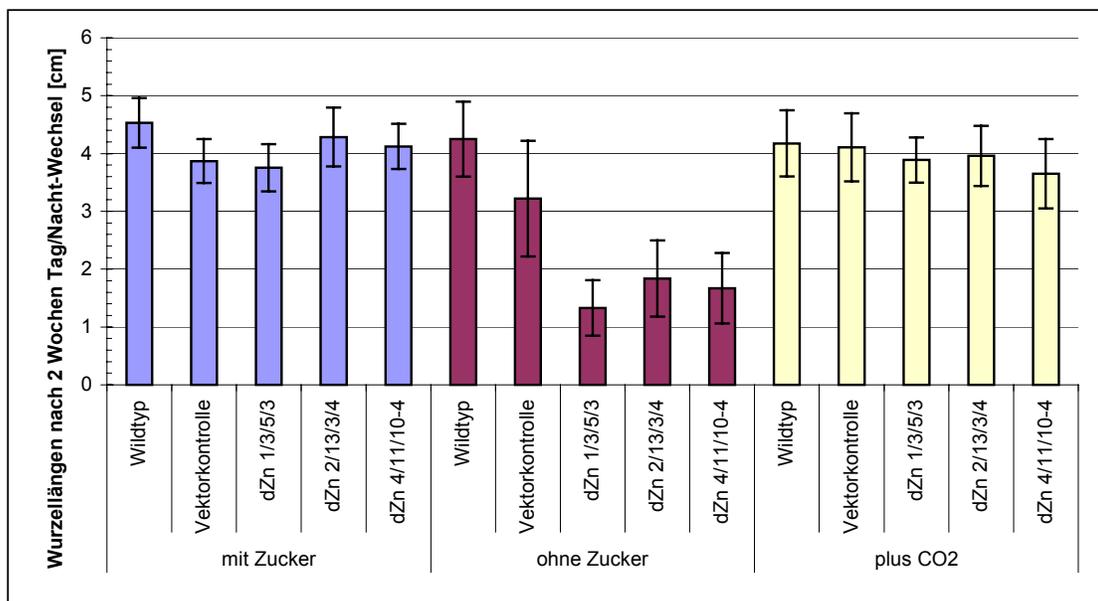


**Abb. C62:** Übersicht auf die zweiwöchige Keimlingsentwicklung verschiedener dZn-Linien (dZn1, dZn2 und dZn4) sowie ihrer beiden Kontrollen Wildtyp (WT) und Vektorkontrolle (VK). Ein Teilbild zeigt jeweils die Platten einer Linie auf 1% zuckerhaltigem Medium und Normalatmosphäre (oben), zuckerfreiem Medium und Normalatmosphäre (links) sowie zuckerfreiem Medium bei ~5-fach erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt. Sichtbar ist der phänotypische Zwergenwuchs der dZn-Linien bei zuckerfreiem Medium und Normal-CO<sub>2</sub>, der sowohl durch Zucker, als auch durch Hoch-CO<sub>2</sub> kompensiert werden kann. Die Querstriche auf den Platten kennzeichnen zurückgelegte Wurzelstrecken pro Zeiteinheit.

Jeweils 20-30 Samen einer Linie wurden einmal auf MS-Agarplatten mit Zucker- und einmal ohne Zuckerbeigabe ausgebracht und in einer Phytokammer unter Starklichtbedingungen bei wechselndem Tag/Nacht-Rhythmus mit Normalatmosphäre exponiert. Ein dritter Versuchsansatz ohne Zuckerbeigabe wurde in eine Phytokammer gebracht, deren CO<sub>2</sub>-

Gehalt auf etwa 0,5 % hochreguliert wurde, so dass keine photorespiratorischen Effekte das Wachstum der Keimlinge beeinflussen konnten. Um einen optimalen Gasaustausch zwischen Platteninnerem und Außenmilieu zu gewährleisten, wurden die Petrischalen in allen Versuchsansätzen mit luftdurchlässigem Heftpflaster umwickelt. Abb. C62 zeigt die fotografischen Bilder der verschiedenen Linien nach zwei Wochen Wachstum unter ihren jeweiligen Bedingungen. Das zwerghafte Wachstum der drei dZn-Linien bei Normal- $\text{CO}_2$  und zuckerfreiem Medium ist bereits makroskopisch gegenüber den Kontrollen zu erkennen. Eine Zugabe von  $\text{CO}_2$  wirkt sich auf den Phänotyp der dZn-Linien offenbar ähnlich kompensatorisch aus wie die Zugabe von Zucker. Dies betrifft in erster Linie aber die Ausbildung der Wurzeln, während die Zuckerbeigabe den chlorotischen Phänotyp nicht vollständig kompensieren kann.

Für eine objektivere Darstellung der Wachstumsverhältnisse wurden die zurückgelegten Wurzelstrecken der verschiedenen Linien bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen grafisch aufgetragen. Abb. C63 fasst die Mittelwerte aller fünf Linien in den drei Versuchsansätzen zusammen und bestätigt mathematisch den Eindruck der Übersichtsbilder.

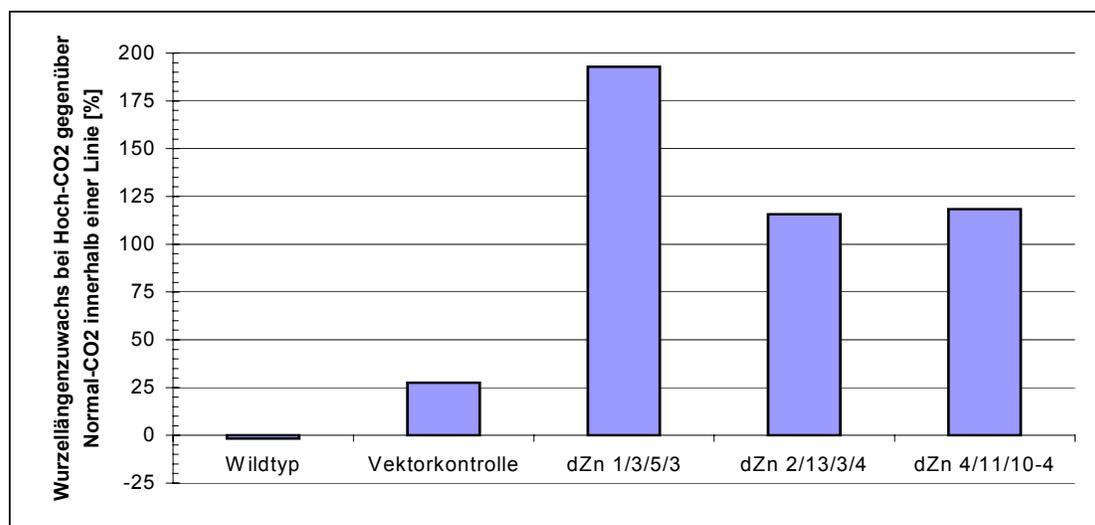


**Abb. C63:** Mittelwerte der Wurzellängen verschiedener dZn-Linien und ihrer Kontrollen nach 2 Wochen Wachstum unter unterschiedlichen Bedingungen und Tag/Nacht-Wechsel. Die linken und mittleren Kolonnen spiegeln das Wachstum unter atmosphärischem  $\text{CO}_2$ -Gehalt wider, links mit Zucker, in der Mitte und rechts ohne Zucker. Rechts wurde der  $\text{CO}_2$ -Gehalt zusätzlich auf 0,5% erhöht. Ohne Zucker und bei Normalatmosphäre bleibt das Wurzelwachstum der dZn-Linien deutlich hinter den Kontrollen zurück (mittlere Kolonnen). Durch Zugabe von Zucker (linke Kolonnen) oder Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Gehalts (rechte Kolonnen) kann der Phänotyp jedoch vollständig unterdrückt werden.

Zwar ist auch das Wachstum der Vektorkontrolle ohne Zucker und bei Normal- $\text{CO}_2$  gegenüber erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Gehalt teils inhibiert (bei hoher Standardabweichung), doch der

Unterschied in den Wurzellängen im Vergleich zu den dZn-Linien ist immer noch sehr eindrücklich. Unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen verschwindet dieser Unterschied in den Wurzellängen praktisch ganz und alle fünf Pflanzenlinien zeigen ein ziemlich einheitliches Wachstum.

Für die bessere Darstellung der schädlichen Auswirkung einer Photorespiration auf die Vertreter der dZn-Linien bei atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen, wurden die zurückgelegten Wurzellängen der fünf Pflanzenlinien unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen mit denen des atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Gehalts in ein prozentuales Verhältnis gesetzt (Abb. C64).

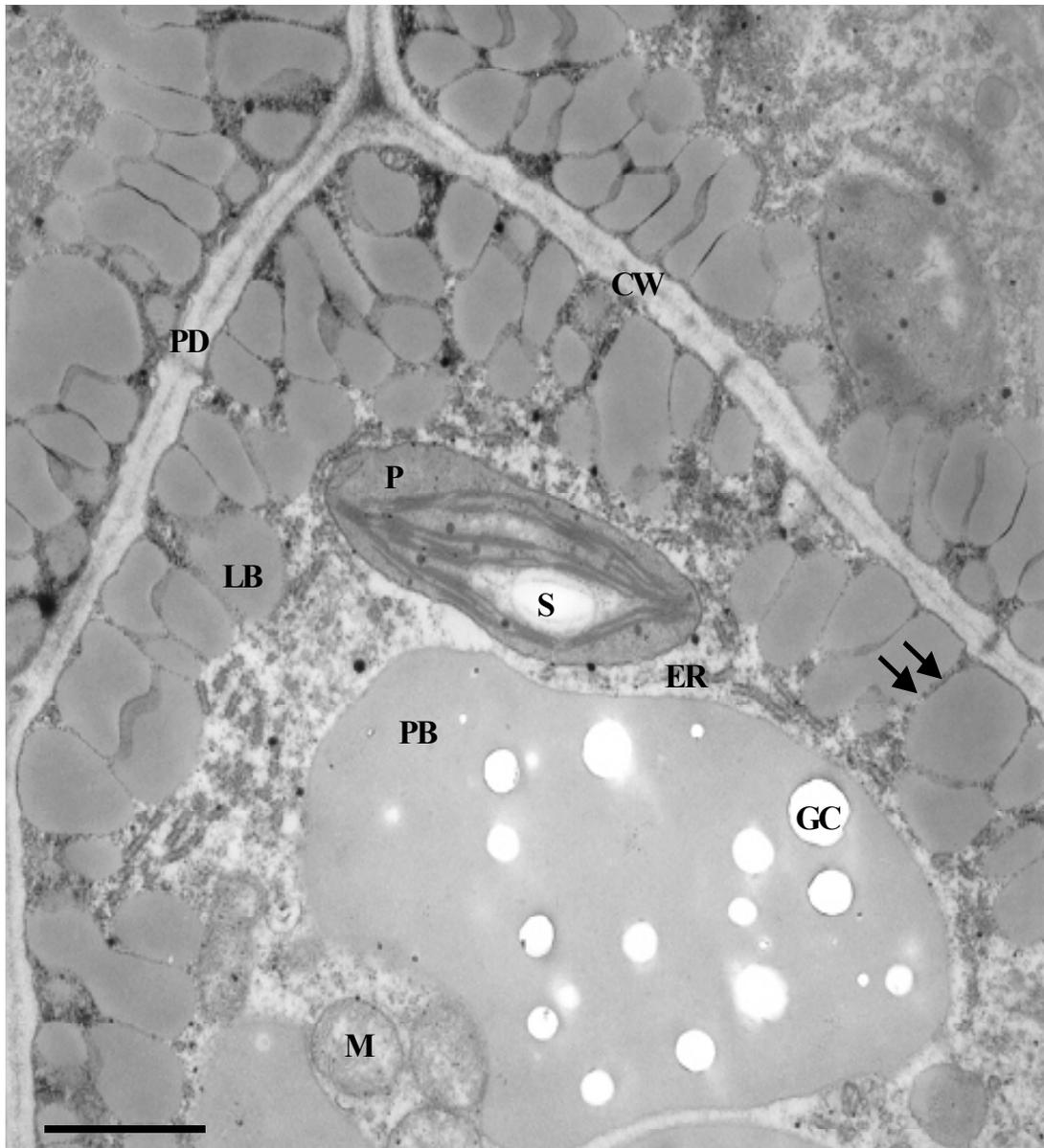


**Abb. C64:** Prozentuale Darstellung der Wurzellängenzuwachsraten unterschiedlicher Pflanzenlinien unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen gegenüber atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Werten bei Tag/Nacht-Wechsel. Während die Kontrollen unter Normalbedingungen im Längenzuwachs stagnieren (Wildtyp) oder maximal 28% zulegen können (Vektorkontrolle), zeigen die Vertreter der dZn-Linien in der Hoch-CO<sub>2</sub>-Kammer eine Verdopplung (dZn2/13/3/4; dZn4/11/10-4) bis Verdreifachung (dZn1/3/5/3) ihrer Wachstumswerte.

Der Wachstumszuwachs der Wildtyppflanzen ist unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen mit minus 1,7% fast null und indiziert, dass die Pflanzen unter normalen CO<sub>2</sub>-Bedingungen durch die Oxygenase-Aktivität der „Rubisco“ keinen nennenswerten Nachteil erleiden. Die Vektorkontrolle wächst hingegen in der Hoch-CO<sub>2</sub>-Kammer um durchschnittlich fast 28% besser als unter Normalbedingungen, weshalb aufgrund der geringen Keimlingsanzahl Streuungen von rund einem Drittel der Zahlenwerte zu berücksichtigen sind. Dennoch sind die Unterschiede im Längenzuwachs bei den untersuchten dZn-Linien augenscheinlich. So wächst die dZn-Linie 1/3/5/3 unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen um 193% besser als bei atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Werten. Die beiden anderen Vertreter der dZn-Linien zeigen Zuwachswerte um 116% und 118% gegenüber normalen CO<sub>2</sub>-Bedingungen, was den Einfluss der Photorespiration auf das Keimlingswachstum eindrücklich belegt.

## 27.6 Elektronenmikroskopische Analyse des Phänotyps

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Prof. G. Wanner am Department Biologie I, der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.



**Abb. C65:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch den Embryo einer Zinkfinger-disruption-Linie des „walking-stick“-Stadiums. Die Ausbildung sekundärer Zellwände (CW) ist in vollem Gange. Speicherproteine und Globoidkristalle (GC) werden synthetisiert und in großen Proteinkörpern (PB) abgelagert. Die zahlreich vorhandenen Lipidkörper (LB) werden aufgrund ihrer Dichte gegen die Plasmamembran gedrückt. Die Pfeile kennzeichnen Kanäle, die vom Endoplasmatischen Retikulum in die Oleosomen führen. Wohl entwickelte Chloroplasten (P) mit ihren Thylakoiden und Stärkekörnern (S), Mitochondrien (M) und Endoplasmatisches Retikulum (ER) sind erkennbar. Die dZn-Linie unterscheidet sich somit auf Ultrastrukturebene nicht vom Wildtyp desselben Stadiums. (PD; Plasmodesmata), Balkenlänge 1  $\mu\text{m}$ .

Der makroskopische Phänotyp der dZn-Linie manifestiert sich erst einige Tage nach Lichtkeimung, während er unter Dunkelbedingungen gegenüber den Kontrollen unauffällig bleibt. Daraus lässt sich die Entwicklung funktionaler Speicherorganellen wie Lipid- und Proteinkörper postulieren, die zur Mobilisierung der in ihr enthaltenen Reservestoffe notwendig sind. In Abb. C65 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch den Embryo einer dZn-Linie im „walking-stick“-Stadium dargestellt.

Bereits auf den ersten Blick sind die zahlreich ausgebildeten Lipidkörper mit ihren Kanälen zum Endoplasmatischen Retikulum erkennbar. Auch die Proteinkörper mit ihren Phytatkristalloiden sind gegenüber Wildtypembryonen nicht zu unterscheiden. Chloroplasten mit ihren Thylakoidmembranen, Mitochondrien und sekundäre Zellwände mit Plasmodesmata benachbarter Zellen sind sichtbar. Im Cytosol sind die mit Ribosomen besetzten Membranen des Endoplasmatischen Retikulums gut zu erkennen. Insgesamt lässt sich die dZn-Linie auf Ultrastrukturebene nicht von anderen Embryonen des Wildtyps unterscheiden. Die Mechanismen, welche zur Ausprägung des zwergenhaften Phänotyps führen, müssen somit zu einem späteren Zeitpunkt als der Embryogenese einsetzen.

### **27.7 Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Expression von *dZnpex10* und der phänotypischen Merkmalsausprägung innerhalb der dZn-Linie 1/3/5/3**

Insgesamt wurden 51 transgene kanamycinresistente Linien mit mindestens einer Insertion der dysfunktionalen cDNA von *Athpex10* gescreent. Da die Phänotypen aller unabhängigen Linien in der Stärke ihrer Ausprägung Unterschiede zeigten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem extremen Phänotyp der dZn-Linie 1/3/5/3 ursächlich um einen Positionseffekt handeln könnte. Durch die Insertion eines Transgen in das Genom der Pflanze könnte ein essentielles Enzym der Photorespiration zerstört worden sein. Dieser Ausfall könnte neben peroxisomal lokalisierten Enzymen auch die involvierten Chloroplasten oder Mitochondrien betreffen. Der Phänotyp stünde somit kausal nicht mit der Expression der *pex10*-cDNA in Zusammenhang, sondern vielmehr mit der Dysfunktion eines Gens, das im Metabolismus der Photorespiration eine Schlüsselposition besitzt. Um diese Frage zu klären, wurde die dZn-Linie 1/3/5/3 einerseits in den Wildtyp ausgekreuzt und andererseits eine Transkriptanalyse durchgeführt.

#### **27.7.1 Rückkreuzung der homozygoten dZn-Linie 1/3/5/3 mit einer Wildtyp-Linie**

Unter der Voraussetzung, dass es sich bei der phänotypischen dZn-Linie 1/3/5/3 um einen dominant-negativen Effekt handelt, könnte sich der Phänotyp idealerweise auch bei einer Rückkreuzung mit einer Wildtyp-Linie ausbilden. In den Nachkommen der Rückkreuzun-

gen wäre aber auf jeden Fall auch ein gesundes Allel ohne dZn-Insertion vorhanden, so dass sich ein eventueller Positionseffekt in Form eines „Knockouts“ eines unbekanntes essentiellen Gens nicht mehr negativ auf den Phänotyp auswirken sollte. Ein auftretender negativer Phänotyp würde sich somit kausal mit der Expression des dysfunktionalen dZn-*pex10* in Verbindung bringen lassen.

Allerdings gehen diese Überlegungen von einem Idealfall aus, der zwar einen Positionseffekt ausschliessen kann, bei Nichteintreten deshalb aber nicht automatisch einen Positionseffekt fordert. Denkbar wäre nämlich auch ein Gen-Dosis-Effekt, der bei Halbierung des dZn-Transkripts das Verhältnis von dysfunktionalem *pex10* zu endogenem funktionalem *PEX10* in einem „Protein-Expressionsfenster“ so weit verschiebt, dass nur noch ein sehr milder oder unauffälliger Phänotyp übrig bleibt.

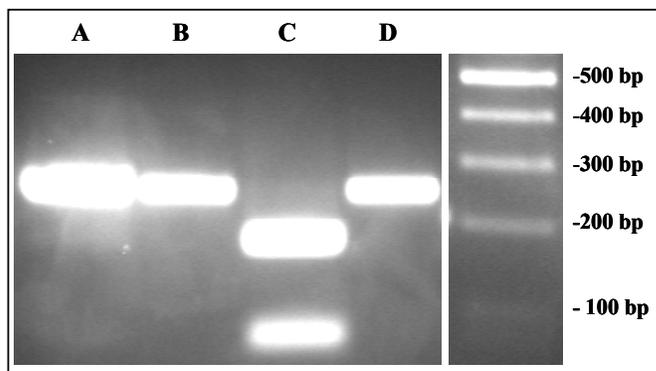
Tatsächlich ist der zur Aufklärung eines Zusammenhangs von Insertion und Merkmalsausprägung wichtige Phänotyp der Rückkreuzung zwischen Pollen der dZn-Linie und Gameten der Wildtyp-Linie in allen Fällen unauffällig geblieben und wuchs entsprechend den Wildtyp-Kontrollen (nicht dargestellt). Eine weitergehende Aussage zur Ursache des Phänotyps mit den Mitteln der Rückkreuzung ist damit nicht möglich.

### **27.7.2 Transkriptanalyse auffälliger und unauffälliger homozygoter dZn-Linien**

Die dZn-Linie 1/3/5/3 war die extremste von vier phänotypischen Linien aus insgesamt 51 untersuchten Linien, die einen reproduzierbaren Phänotyp zeigte und sich unter Ausschaltung der Photorespiration vollständig komplementieren ließ. Mithilfe der Transkriptanalyse sollte geprüft werden, ob erstens das dysfunktionelle *pex10* in den dZn-Linien transkribiert wird, ob es zweitens unter Umständen zu einem *Silencing* des endogenen *PEX10* kam und ob es drittens einen Zusammenhang zwischen der Transkriptmenge und der Ausbildung eines Phänotyps gibt.

#### **27.7.2.1 Vorversuch zur Spezifität von *MbiI* in den Nukleotidsequenzen von *pex10*- und Wildtyp *PEX10*-cDNA**

Vor der Durchführung der Transkriptanalyse wurde getestet, ob das Restriktionsenzym *MbiI* innerhalb des erwarteten Nukleotidbereichs spezifisch die cDNA von dZn-*pex10* schneidet und das funktionelle Zinkfingermotiv unangetastet läßt. Sowohl im Wildtyp als auch im dZn-PCR-Produkt musste ein 248 bp Fragment amplifiziert werden, das im Fall von dZn *pex10* nach Verdau mit *MbiI* in zwei 72 bp und 176 bp lange Fragmente verdaut werden sollte.

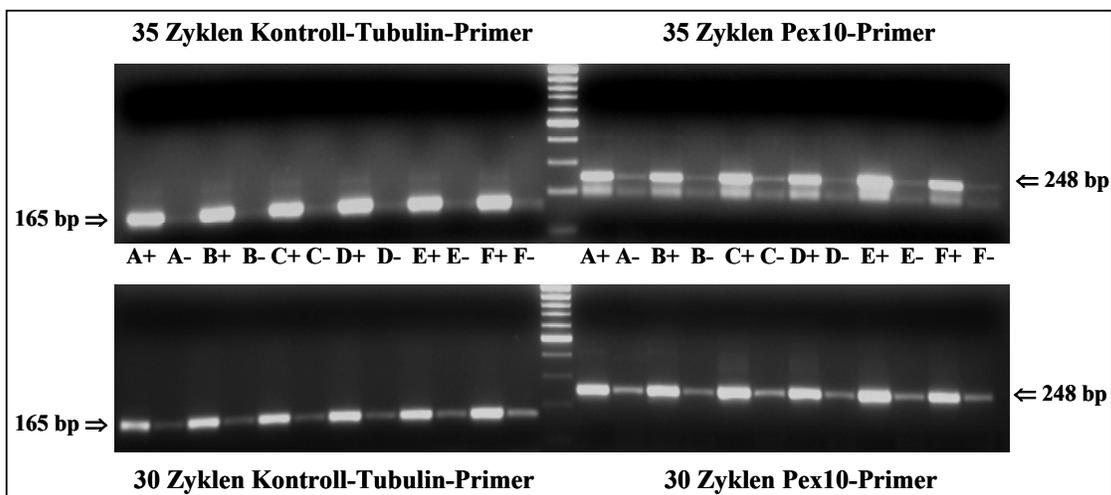


**Abb. C66:** Darstellung von PCR-Produkten mit cDNA-Templates von *Arabidopsis*-Wildtyp-*PEX10* (A+B) und *dZnpex10* (C+D) mit teils anschließendem Verdau mit dem Restriktionsenzym *MbiI* (A+C). Nur die *dZnpex10*-cDNA in Spur C wird verdaut. Das rechte Teilbild zeigt einen dazugehörigen 100bp-Leitermarker.

Aus Abb. C66 ist ersichtlich, dass die PCR-Produkte hinsichtlich Länge und Verdau den Erwartungen entsprechen. Nur das PCR-Produkt der *pex10*-cDNA kann durch *MbiI* verdaut werden (Abb. C66, Spur C), nicht aber die Wildtyp-cDNA (Spur A).

### 27.7.2.2 Vergleich der Transkriptmengen in verschiedenen Pflanzenlinien

Zur Analyse der Transkriptprodukte verschiedener *dZn*-Linien untereinander und im Vergleich zu den Kontrollen des Wildtyps und der Vektorkontrolle wurden verschiedene PCR mit 30 und 35 Zyklen durchgeführt. Als Kontrolle dienten PCR-Ansätze mit  $\beta$ -Tubulin-Primern. Das Ergebnis ist in Abb. C67 dargestellt und gibt in zweierlei Hinsicht Auskunft.



**Abb. C67:** Transkriptanalyse der cDNA von *AthPEX10/pex10* in verschiedenen Pflanzenlinien. Links:  $\beta$ -Tubulin-Kontroll-Transkripte; rechts: *PEX10/pex10*-Transkripte; oben: 35 PCR-Zyklen; unten: 30 PCR-Zyklen; (A), Col. wt; (B), Vektorkontrolle; (C), *dZn* 1/3/5/3; (D), *dZn* 4/11/10-4; (E), *dZn* 2/9/8; (F), *dZn* 3/6/5-A; (+), mit Reverser Transkriptase; (-), ohne Reverse Transkriptase (MOCK). Sichtbar sind sehr ähnliche Transkriptmengen sowohl bezüglich der verschiedenen *dZn*-Linien untereinander als auch in Relation zu den Kontroll-Linien Col. Wildtyp und Vektorkontrolle.

Zum einen unterscheiden sich die Transkriptmengen der verschiedenen *dZn*-Linien untereinander kaum. Bezüglich der idealen *dZn*-Linie *dZn* 1/3/5/3 und weiteren *dZn*-Linien, die

einen eingeschränkten oder keinen Phänotyp zeigen, ist auf Ebene der Transkriptmenge kein Unterschied festzumachen, der den Phänotyp in dZn 1/3/5/3 fordern würde. Zum andern ist aber auch kein Unterschied zwischen den dZn-Linien und ihren beiden Kontrollen Wildtyp und Vektorkontrolle erkennbar. Der Faktor in der Transkriptquantität liegt bei allen Linien zwischen maximal 0,5 und 2 bezogen auf eine der Kontrollen.

Aufgrund der ähnlichen Transkriptmengen von *PEX10/pex10* in völlig verschiedenen Linien ist somit die Expression eines photorespiratorisch auffälligen Phänotyps nicht erklärbar. Dies schliesst eine eventuell unterschiedliche Proteinexpression, die nicht mit der Transkriptmenge korreliert nicht aus. Desweiteren ist ein sehr enges „Proteinfenster“, bei dem ein Phänotyp sichtbar wird, bzw. unauffällig bleibt nicht auszuschliessen, mit dieser Methode jedoch auch nicht aufzuklären.

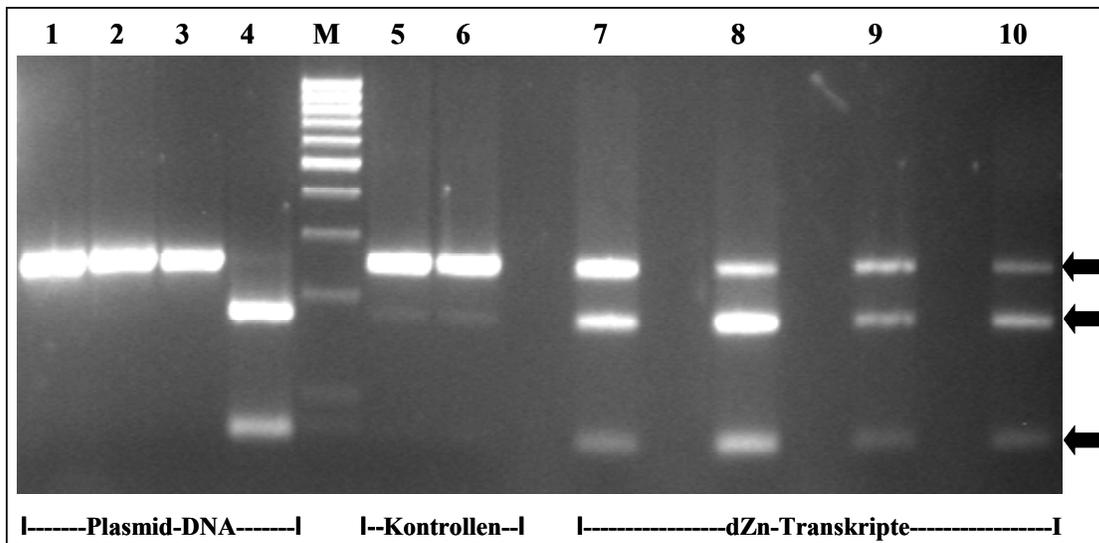
### 27.7.2.3 Der Vergleich von Transkriptverteilungen innerhalb einer Linie nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *MbiI*

Zur Beurteilung der Quantitäten an endogenem *PEX10*- und exogenem *pex10*-Transkript wurden die cDNA Banden der *PEX10/pex10* Transkripte verschiedener Linien aus einem präparativen Gel ausgeschnitten und nach Aufreinigung mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss zeigte ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *MbiI*, das spezifisch nur im dysfunktionalen Zinkfinger schneidet, ob es auffällige Unterschiede in der Verteilung zwischen „funktionellem“ und „dysfunktionellem“ Transkript innerhalb der einzelnen dZn- Linien gibt. Ausserdem war es möglich, mit dieser Methode ein eventuelles *Silencing* des endogenen *PEX10* in einer phänotypisch auffälligen Linie zu screenen.

Abb. C68 zeigt den Verdau mit Plasmid-DNA von Wildtyp *PEX10* und dysfunktionalem *pex10* über Nacht mit *MbiI*. Während der Verdau in Spur 4 mit dZn*pex10*-cDNA vollständig abläuft, wird die Wildtyp-cDNA in Spur 2 nicht fragmentiert. Dasselbe gilt für die amplifizierten Transkriptprodukte der beiden Kontrollen Wildtyp (Spur 5) und Vektorkontrolle (Spur 6), die nur unverdaute 248 bp-Produkte zeigen. In allen transgenen dZn-Linien kann hingegen ein *MbiI*-Verdau stattfinden wie die jeweiligen zusätzlichen Fragmente bei 176 bp und 72 bp zeigen.

Eine Ausschaltung des endogenen *PEX10* ist nicht zu beobachten, wie die deutlich vorhandenen unverdauten Banden von 248 bp Länge zeigen. Die Verteilung der Quantitäten zwischen *PEX10* und *pex10* zeigt für die phänotypische Extremlinie dZn 1/3/5/3 in Spur 7 relativ betrachtet den geringsten Anteil an dysfunktionalem *pex10*. Der Anteil beträgt deutlich weniger als die Hälfte des Gesamttranskripts während er bei den phänotypischen dZn-Linien, die unter Hoch-CO<sub>2</sub> nur teilweise zu retten sind deutlich mehr als die Hälfte des Gesamttranskripts beträgt (Spur 8+10). Die phänotypisch unauffällige Linie in Spur 9 ver-

hält sich in der Verteilung der Quantitäten allerdings sehr ähnlich der Ideallinie in Spur 7, so dass ein Zusammenhang zwischen der relativen Transkriptdosis an dysfunktionalem *pex10* und der Ausbildung eines chlorotischen und zwergenhaften Phänotyps nicht sehr wahrscheinlich erscheint.



**Abb. C68:** Transkriptverteilung zwischen *PEX10* und *pex10*-cDNA in verschiedenen dZn-Linien nach Amplifikation der Transkripte und Verdau der PCR-Produkte mit *MbiI*. (1), *PEX10*-Plasmid-DNA unverdaut; (2), *PEX10*-Plasmid-DNA *MbiI* verdaut; (3), dZn-Plasmid-DNA unverdaut; (4) dZn-Plasmid-DNA *MbiI* verdaut; (5), Wildtyp-Transkript *MbiI* verdaut; (6), Vektorkontrolle-Transkript *MbiI* verdaut; (7), dZn 1/3/5/3 Transkript *MbiI* verdaut; (8), dZn 4/11/10-4 Transkript *MbiI* verdaut; (9), dZn 2/9/8 Transkript *MbiI* verdaut; (10) dZn 3/6/5-A Transkript *MbiI* verdaut. Die Pfeile kennzeichnen von oben nach unten ein unverdautes 248 bp PCR-Produkt, ein grösseres 176 bp- und ein kleineres 72 bp- Fragment nach Verdau mit *MbiI*. Der Verdau erfolgte über Nacht und lief potentiell vollständig ab wie Spur Nr. 4 zeigt. Die Wildtyp-*PEX10*-cDNA wird hingegen nicht verdaut (Spur 2, 5 und 6); (M) 100 bp-Leitermarker.

Allerdings bleibt die Frage offen, ob das Transkriptmuster in den verschiedenen dZn-Linien auch den Expressionsgrad der beiden verschiedenen Proteine entsprechend widerspiegelt. Ein stringenter Zusammenhang zwischen Transkriptmenge und Expressionsgrad eines Proteins muss nicht gegeben sein.

### 27.7.3 Die Bestimmung der Insertionsstellen im Genom der dZn-Linie 1/3/5/3 (in Zusammenarbeit mit Dr. H. Horvarth)

Die Bestimmung der Insertionskalkulationen könnten einen Hinweis darauf geben, ob der ideale Phänotyp der dZn-Linie 1/3/5/3 durch die Expression der dysfunktionalen *pex10*-cDNA hervorgerufen wurde oder vielmehr ein unbeabsichtigter Sekundäreffekt durch Aus-

schalten eines essentiellen Gens für seine Ausprägung verantwortlich ist. Deshalb wurde die Bestimmung der Insertionslokalisationen dankenswerterweise von Dr. Henriette Horvath am „Department of Crop and Soil Sciences“ der „Washington State University“ in Pullman, USA durchgeführt.

Das Ergebnis der Southern Blot-Analyse ergab die komplizierte Situation, dass die Linie dZn 1/3/5/3 sechs komplette oder partielle Insertionen besitzt. Generell ergeben sich daraus folgende Möglichkeiten: (1) Alle 6 Insertionen sind am selben Chromosomenort nebeneinander eingefügt, (2) 5 Insertionen erfolgten an einem Chromosomenort und 1 an einem anderen Ort im selben Chromosom oder einem anderen, (3) 4 Insertionen sind an einem Ort erfolgt und zwei zusammen an einem anderen Ort oder an zwei separaten Orten, u.s.w., und schliesslich (z) alle 6 Insertionen sind an verschiedenen Orten erfolgt. Falls mehrere Insertionen am selben Ort stattfinden, können diese *head to tail*, *tail to tail* oder *head to head* erfolgen (Stahl *et al.*, 2002).

In vorliegendem Fall konnten insgesamt zwei genomische Insertionsstellen bestimmt werden, in die Transgene inseriert wurden. Eine der beiden Insertionslokalisationen wurde mithilfe der *TAIL-PCR* für eine rechte T-DNA Border identifiziert, die andere konnte nicht näher identifiziert werden. Dabei spiegelt letztere ein komplexes Integrationsmuster von mindestens vier Genkopien der dysfunktionalen *pex10*-cDNA wider, die entweder vollständig oder teilweise im Genom integriert sind.

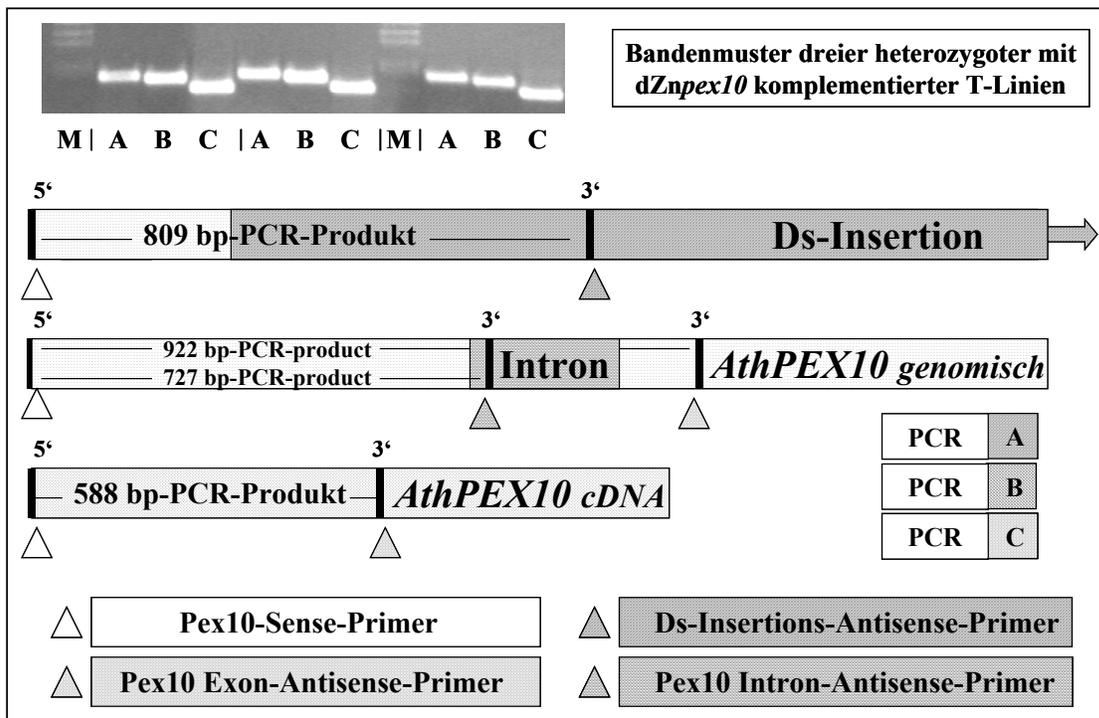
Ein PCR-Produkt identifizierte 526 bp der „*right border*“- flankierenden Sequenz im *Arabidopsis thaliana* Chromosom III. Die Sequenz ist zu 98 % identisch mit dem Homolog auf dem BAC Klon T22E [GenBank No. AL132975] und die Insertion liegt 340 bp oberhalb der codierenden Region des putativen *Arabidopsis*-Proteins. Dieses ist dem MtN24-Gen aus *Medicago trunculata* sehr ähnlich und enthält eine prokaryotische Membranlipoprotein-Lipid-Andockstelle. Das MtN24-Gen wird während der Entwicklung der Wurzelknöllchen induziert. Bislang konnte jedoch keine Funktion des Proteins in *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Gamas *et al.*, 1996). Während also ein Loci identifiziert werden konnte, von dem ausgehend ein Einfluss auf die Photorespiration unwahrscheinlich ist, bleibt der zweite Locus unbekannt und damit die Möglichkeit offen, ein essentielles Gen in der Photorespiration getroffen zu haben.

### **27.8 Die Komplementation der Transposon-Linie mit dZn*pex10* und ihre Charakterisierung nach phäno- und genotypischen Gesichtspunkten**

Um die Bedeutung des Zinkfingermotivs für die Funktionalität von *AthPEX10* einerseits beweisen zu können und andererseits im Grad seiner phänotypischen Auswirkung zu beur-

teilen, wurde ein Komplementationsversuch mit dem dysfunktionalen *dZnpex10* und der letalen Transposonlinie durchgeführt.

Insgesamt wurden 48 doppelresistente transgene Keimlinge der Transposonlinie, die einerseits ein Ds-Element enthielten und zum andern mit *dZnpex10* transformiert wurden untersucht. Diese Pflanzen waren in der Lage auf MS-Platten zu wachsen, die sowohl Kanamycin, als auch Bialaphos als Selektionsmarker enthielten. Da statistisch ein Viertel aller Pflanzen homozygot für das Transposon sein sollten und gleichzeitig mit *dZnpex10* komplementiert wären, müsste sich in 12 Pflanzen ein Phänotyp manifestieren, der durch die Klonierung von *dZnpex10* verursacht wird. Tatsächlich zeigte sich aber ausnahmslos bei allen Pflanzen ein normales Wachstum, das durch jenes von Wildtyppflanzen nicht zu unterscheiden war. Deshalb wurde von 10 Individuen aus zwei verschiedenen Linien genomische DNA isoliert, um die Pflanzen hinsichtlich einer Homozygotie für das Transposon zu untersuchen. Abb. C69 zeigt stellvertretend das Bandenmuster von drei Individuen, welche jedoch mit den restlichen 7 Pflanzen identisch waren.



**Abb. C69:** PCR zur genotypischen Charakterisierung vitaler Transposon-Linien, die mit *dZnpex10* komplementiert wurden. (PCR A), *PEX10*-Sense-Primer und Transposon-Insertions-Antisense-Primer; (PCR B), *PEX10* Sense-Primer und *PEX10* Intron-Antisense-Primer; (PCR C), *PEX10* Sense-Primer und *PEX10* Exon-Antisense-Primer; (M) Leitermarker. Sichtbar sind ausschliesslich heterozygote komplementierte T-Linien, die somit alle noch das endogene *PEX10*-Gen aufweisen. Für eine genauere Beschreibung der Primerstrategie siehe Kapitel 26.4.2.3 zur Charakterisierung der Transposon-Linie.

Aus dem spezifischen Bandenmuster aller getesteten transgenen Pflanzen geht hervor, dass kein pflanzliches Individuum existiert, das in der Lage ist, trotz eines vollständigen Knock-outs des Wildtyp-Gens für *PEX10*, mithilfe des überexprimierten dZnpex10p zu überleben.

Die Öffnung von Schoten dieser genotypischen Pflanzen ergab makroskopisch dasselbe Bild segregierender Samen wie in der unkomplementierten Transposon-Linie. Neben sich völlig normal entwickelnden Samen waren auch letale Embryonen erkennbar, deren Entwicklung vorzeitig stagnierte und die ein phänotypisches Abbild zeigten, wie es für letale Embryonen der Transposon-Linie beschrieben worden ist.

Damit konnte gezeigt werden, dass der Austausch von vier Liganden innerhalb des C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-Zinkfingermotivs von *AthPEX10* zur selben letalen Wirkung führt, wie die völlige Ausschaltung des Gens durch Erzeugung einer Transposon-Linie.

## D. DISKUSSION

### 28 Die Klonierung des Gens für den PTS2-Rezeptor Pex7p aus *A. thaliana*

Mit der glyoxysomalen Malatdehydrogenase aus der Wassermelone konnte 1994 erstmalig ein PTS2-tragendes Enzym in Pflanzen identifiziert werden (Gietl *et al.*, 1994). Doch die Gesamtzahl pflanzlicher Proteine, die über ein PTS2-Signal in die Peroxisomenmatrix transportiert werden, ist mit bis jetzt sechs Enzymen eher niedrig einzuschätzen, damit allerdings immer noch höher als in anderen Organismen (Swinkels *et al.*, 1991; Mullen, 2002). Mit der Klonierung von *AthPEX7* (zusammen mit *AthPEX10*) im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die cDNA eines pflanzlichen PTS2-Rezeptors isoliert (Schumann *et al.*, 1999b). Ein Sequenzvergleich der Aminosäuren mit anderen Organismen ergibt interessanterweise für *H. sapiens* mit 44% Identität und 55% Ähnlichkeit die grösste Homologie, gefolgt von *PEX7* in der Maus und verschiedenen Hefen (vgl. Schumann *et al.*, 1999b), was auf eine relativ konservierte Funktion des Peroxins in Säugern und Pflanze hinweisen könnte.

*AthPEX7* gehört zur Familie der WD-40 Proteine. Diese sind charakterisiert durch sechs Wiederholungen aus etwa 40 Aminosäuren und einem zentralen Tryptophan (W)-Asparaginsäure (D) -Motiv. WD-40 Proteine stehen meist in Interaktion zu TPR-Proteinen (*tetratricopeptide repeat*), zu denen auch der PTS1-Rezeptor Pex5p gehört (Sacksteder & Gould, 2000).

Die Lokalisation des PTS2-Rezeptors Pex7p ist umstritten. Er wurde in Hefen und Säugern sowohl intraperoxisomal, als auch cytosolisch nachgewiesen (Übersichtartikel Eckert & Erdmann, 2003). In Hefen gibt es jedoch auch widersprüchliche Befunde, die ausschliesslich eine intraperoxisomale Lokalisation des PTS2-Rezeptors postulieren (Zhang & Lazarow, 1996).

Da die Funktion des Proteins als „Peroxisomales Targetingsignal Typ 2“ (PTS2) bereits anhand der *PEX7*-Homologe aus anderen Organismen beschrieben worden ist (Marzioch *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Elgersma *et al.*, 1998), wurde es im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Allerdings bleibt festzuhalten, dass in Pflanzen bis 2002 die Interaktion von Pex7p mit PTS2-Proteinen nicht gezeigt werden konnte (Mullen, 2002).

Die Untersuchungen von Nito *et al.* (2002) bestätigten jedoch eine Funktion als pflanzlichen PTS2-Rezeptor für die in dieser Dissertation klonierte Gensequenz. *AthPex7p* interagiert im *yeast two-hybrid* System mit PTS2-enthaltenden Proteinsequenzen und führte zur Aktivierung der Reporter-gen-Expression. Die Autoren konnten ausserdem eine Interaktion von Pex7p mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p aufzeigen, aber keine Korrelation von

Pex7p mit dem Docking-Komplex an der peroxisomalen Membran selbst, so dass in Pflanzen der PTS2-Importmechanismus stringent vom PTS1-Importpfad abhängig zu sein scheint.

Der Targeting Rezeptor *PEX7* für peroxisomale Matrixproteine mit einem Typ-2-Signal wurde vor einem Jahrzehnt erstmals in *Sacharomyces cerevisiae* identifiziert (Marzioch *et al.*, 1994; Zhang & Lazarow, 1995). Seine Sequenz und Funktion als PTS2-Rezeptor ist, neben weiteren Hefen wie *P. pastoris* und *S. pombe*, auch in *N. crassa* (Sichting *et al.*, 2003), Kleinsäugetern (Mukai *et al.*, 2002) und dem Menschen erforscht (Braverman *et al.*, 1997) und führt bei einem Funktionsausfall im menschlichen Organismus zum Krankheitsbild der Rhizomelischen Chondrodysplasia punctata (RCDP), einer letalen autosomalen rezessiven Krankheit, welche mit 23% die zweithäufigste von insgesamt 13 Komplementationsgruppen der *Peroxisome Biogenesis Disorders* (PBDs) darstellt. RCDP-Patienten zeichnen sich durch ein verkürztes Wachstum der proximalen Gliedmassen aus, die hauptsächlich die Knochen vom Knie bis zum Fuss und vom Ellbogen bis zur Hand betreffen. Die endochondrale<sup>1</sup> Knochenbildung ist erheblich gestört, Linsentrübungen der Augen treten auf und die geistige Entwicklung retardiert. Auf biochemischer Ebene ist die Oxidation von Phytansäure sowie die Plasmalogen-Biosynthese beeinträchtigt, und die Kinder erreichen für gewöhnlich nur ein Alter von unter 2 Jahren (Übersichtartikel Purdue *et al.*, 1999; Internet-Links: *PEX7*). Aufgrund der dramatischen Folgen für den menschlichen Organismus infolge eines Funktionsausfalls von *HsPEX7* ist auch für Pflanzen von einer erheblichen Beeinträchtigung des peroxisomalen Stoffwechsels auszugehen. Bislang liegen hierzu jedoch noch keine Untersuchungen in Bezug auf *knockout*-Linien oder überexprimierter dysfunktionaler PTS2-Rezeptoren vor, die einen Einblick in die physiologischen und phänotypischen Auswirkungen von *Athpex7* geben könnten und dadurch neue Erkenntnisse für die Bedeutung des PTS2-Rezeptors in Pflanzen ermöglichen würden.

## 29 Die Klonierung des Gens für das integrale Membranprotein Pex10p aus *Arabidopsis thaliana*

„... Pex2p, Pex10p und Pex12p sind integrale peroxisomale Membranproteine (PMPs) mit einem Zink-RING-Finger Motiv am Carboxyl-Terminus. Ihre Rolle im Matrixprotein-Import ist vollkommen unbekannt ...“ (Übersichtartikel Johnson & Olsen, 2001).

Um das Targeting von Membranproteinen zu untersuchen, die in der Importmaschinerie peroxisomaler Matrixproteine involviert sind, wurde das Volllänge-Gen *PEX10* aus *Arabidopsis thaliana* kloniert (Schumann *et al.*, 1999a) und charakterisiert. Dies gelang mithilfe

<sup>1</sup> im Knorpel liegend

fe von *PEX10*-Homologen aus Mensch und Hefe, mit denen die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) nach Bereichen mit hoher Ähnlichkeit innerhalb des Genoms von *Arabidopsis* durchsucht wurde. Pex10p aus *Arabidopsis* ist nur zu 35% identisch mit den Homologen aus Mensch und *H. polymorpha*, die Ähnlichkeit liegt bei 56%. Zu anderen Hefen wie *P. pastoris* oder *S. cerevisiae* zeigen die Vergleichswerte sogar noch geringere Gemeinsamkeiten, was auf eine eigenständige Bedeutung des pflanzlichen Peroxins gegenüber anderen Organismen hindeuten könnte.

Fast parallel zu der in dieser Arbeit klonierten Nukleotidsequenz wurde ein zweites *AthPEX10*-Gen von Baker *et al.* (2000) veröffentlicht, dessen Sequenz sich in sieben Positionen unterscheidet. Diese Unterschiede führten auf Peptidebene zu zwei Translationsänderungen, nämlich den Aminosäuren M184→K und P199→L. Die anfängliche Vermutung, dass somit zwei Kopien von *AthPEX10* im Genom von *Arabidopsis* existieren könnten, wurde durch einen Southern Blot mit *AthPEX10*, der jedoch nur spezifische Einzelbanden ergab, widerlegt (Baker *et al.*, 2000). Somit mussten beide Sequenzen in Konkurrenz zueinander betrachtet werden. Nach der vollständigen Entschlüsselung des Genoms von *A. thaliana* besteht inzwischen Klarheit darüber, dass nur eine Kopie von *PEX10* besteht. Der Vergleich der cDNA-Abfolge von *AthPEX10* aus vorliegender Untersuchung mit der des genomischen Klon zeigt die völlige Kongruenz beider Sequenzen und damit die Validität der cDNA aus der vorliegenden Arbeit. Als Grund für die beiden unterschiedlichen *PEX10*-Sequenzen könnte neben Sequenzierfehlern jedoch auch die Verwendung eines unterschiedlichen Ökotyps in der Untersuchung von Baker *et al.* (2000) in Erwägung gezogen werden, der sich in seiner cDNA-Sequenz unterscheidet.

Mit der Klonierung von *PEX10* (und *PEX7*) wurden bis heute 7 von vermutlich 15 Peroxin-Homologen aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Ein weiteres Peroxin, PEX6, konnte aus der Sonnenblume *Helianthus annuus* identifiziert werden (Kaplan *et al.*, 2001). Den Überblick über alle bereits klonierten pflanzlichen Peroxine mit Hinweisen zu ihrer Sequenz gibt Tab. D1 wieder.

Weitere putative *Arabidopsis*-Peroxine, die sich aus verschiedenen Sequenz-Homologien bekannter Peroxine mit dem *Arabidopsis*-Genom ergeben, sind in Tab. A1 der Einleitung aufgeführt. Da von den insgesamt 25 bekannten *PEX*-Genen aus verschiedenen Hefen für 12 von ihnen im Menschen kein Homolog zu finden ist und von diesen 12 auch 10 im *Arabidopsis*-Genom absent sind, könnte dies für eine besonders konservierte Funktion der Peroxisomen-Biogenese zwischen Säugern und Pflanzen sprechen, was jedoch nicht im Gegensatz zu einer eigenständigen oder pleiotropen Funktion von *AthPEX10* stehen muss.

Gen	Art	Accession Number	Referenz
PEX1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF275382	Lopez-Huertas <i>et al.</i> , 2000
PEX2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG52254	Hu <i>et al.</i> , 2002
PEX5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF074843	Brickner <i>et al.</i> , 1998
	<i>Citrullus vulgaris</i>	AF068690	Wimmer <i>et al.</i> , 1998
	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF053104	Kragler <i>et al.</i> , 1998
PEX6	<i>Helianthus annuus</i>	AJ305171	Kaplan <i>et al.</i> , 2001
PEX7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF130973	Schumann <i>et al.</i> , 1999
PEX10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF119572	Schumann <i>et al.</i> , 1999
		AJ276134	Baker <i>et al.</i> , 2000
PEX14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ251524	Lopez-Huertas <i>et al.</i> , 1999
		AB037538	Hayashi <i>et al.</i> , 2000
PEX16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF085354	Lin <i>et al.</i> , 1999

**Tab. D1:** Bislang klonierte PEX-Gene in verschiedenen Pflanzenarten (verändert nach Charlton & Lopez-Huertas, 2002).

Interessanterweise existiert in *AthPex10p* mit der äussersten C-terminalen YHSDF-Sequenz ein kürzlich entdecktes aromatisches ER-*retrieval*-Signalmotiv, das ausreichend ist, um Reporterproteine wie GFP-LAMP1 oder GFP-Cf9 ins Endoplasmatische Retikulum von *S. cerevisiae* zu lokalisieren (mündliche Mitteilung Mullen, 2003). Die Existenz eines solchen Signals könnte ein Hinweis darauf sein, dass *AthPex10p* von post-ER-Kompartimenten zurück ins ER transportiert wird, um dort erneut seine Funktion bei der Vesikelbildung zu erfüllen (mündliche Mitteilung Mullen, 2003).

### 30 Die Herstellung und Bewertung eines Antikörpers gegen *AthPex10px6His*

Für Lokalisationsstudien des Genprodukts von *AthPEX10* sollte ein Antiserum gegen das Volllängen-Protein von *PEX10*-cDNA aus der Immunisierung eines Huhns und eines Kaninchens gewonnen werden.

Mithilfe des Expressionsvektors pQE-60 von Qiagen war es möglich, ein rekombinantes Protein mit einem 6xHistidin-Arm am C-Terminus von *AthPex10p* zu exprimieren. Das Histidin-Hexamer erlaubte es, das Zielprotein über die Bindung an eine Nickelchelate-Säule aufzureinigen. Ein Vorversuch ergab, dass sich das Membranprotein in *E. coli* in Form von *Inclusionbodies* ablagerte. Ausserdem wurde das Zielprotein mit seinem Histidin-tag und einer Grösse von etwa 43 kDa von endogen exprimiertem *E. coli*-Protein gleicher Gröszenordnung überlagert, was eine Expressionskontrolle des Zielproteins nur mittels der Konjugat-Detektion einer Nickel-NTA-Alkalischen-Phosphatase ermöglichte. Versuche,

die Bildung von *Inclusionbodies* zu verhindern, indem die Induktionsbedingungen durch Erniedrigung der Temperatur oder der IPTG-Konzentration verändert wurden, führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Der daher notwendige Aufschluß der *Inclusionbodies* mittels 6M Guanidiniumhydrochlorid solubilisierte das Zielprotein, so dass eine Aufreinigung des Antigens unter denaturierenden Bedingungen stattfinden konnte. Die native oder denaturierte Konformation von *AthPex10p* spielte für die Gewinnung des Antiserums nur eine untergeordnete Rolle, weil der Antikörper hauptsächlich in *Western-Blots* eingesetzt wurde. Im Fall von Protein-Bindungsstudien zur Funktion von *AthPex10p* hätte das Membranprotein jedoch in nativer Form vorliegen müssen, so dass ein anderes Expressionssystem hätte ausgetestet werden müssen.

Die Elution des Zielproteins erfolgte bei verschiedenen pH-Stufen. Bereits beim ersten Waschschrift wurde auch ein bemerkenswerter Anteil des Zielproteins zusammen mit unspezifisch gebundenen Proteinen ausgewaschen. Der zweite Waschschrift bei niedrigerem pH-Wert sollte hauptsächlich das Zielprotein in monomerer Form eluieren, enthielt jedoch nur sehr wenig Protein überhaupt. Erst bei pH 4,5 zeigte sich ein deutlicher Peak des Zielproteins, das je nach Versuchsansatz eine Reinheit von 60-90% aufwies. Neben der Möglichkeit von Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen könnte es sich hierbei zum Teil auch um Degradationsprodukte des Zielproteins gehandelt haben. Die Eluierung des Antigens mit 8 M Harnstoff von der Nickel-Chelat-Säule wäre für eine Immunisierung von Tieren toxisch gewesen. Die Verdünnung auf 2 M Harnstoff-Lösung brachte den Nachteil mit sich, dass die Antigen-Konzentration unterhalb des geforderten Bereichs von mindestens 0,2 mg/ml lag. Eine Aufkonzentrierung der Lösungsvolumina mithilfe von „Centriplus“-Zentrifugen-Filtereinsätzen von Millipore war allerdings sehr unbefriedigend. Zum einen ging ein erheblicher Anteil des zuvor aufgereinigten Zielproteins verloren, was bis zu 60% der Ausgangsmenge ausmachen konnte. Zum andern verstopften die Porenöffnungen der Filter sehr rasch, was zeitaufwendige Zentrifugenläufe und den Austausch der Filter zur Folge hatte. Die Verwendung dieses Systems kann aufgrund der Erfahrungen nicht empfohlen werden.

Das Antigen wurde zur Immunisierung eines Huhns und eines Kaninchens eingesetzt. Die Immunisierung einer Legehenne bringt den Vorteil mit sich, dass die Antikörper aus dem Eidotter gewonnen werden und somit fast beliebig reproduzierbar sind. Die Hälfte des gewonnenen Rohimmunserums aus beiden Tieren wurde zur Affinitätsreinigung weiterverwendet.

Nach der Auslieferung der verschiedenen Antiseren wurden diese zuerst in verschiedenen Stämmen von *Hansenula polymorpha* getestet, die zum einen *AthPex10p* und zum andern *HppPex10p* überexprimierten. Als Negativ-Kontrolle diente ein *Hppex10*-defizienter Stamm. Es zeigte sich, dass weder das Rohimmunserum, noch der affinitätsgereinigte An-

tikörper des Huhns *AthPex10p* erkannten. Das Huhn schien keinerlei Antikörper gegen das Antigen ausgebildet zu haben. Auch der affinitätsgereinigte Antikörper des Kaninchens erkannte *AthPex10p* deutlich schlechter als das entsprechende Rohimmunserum. Letzteres ergab jedoch spezifische Signale sowohl mit Rohproteinextrakt des überexprimierten *Arabidopsis*-Pex10p als auch des *Hansenula*-Pex10p, das auf einer Lauffront von 31 kDa detektierbar ist (Baerends *et al.*, 1996). Im *pex10*-Stamm von *Hansenula* ergab der Antikörper keinerlei Signalbanden.

Aufgrund der Spezifität des Rohimmunserums wurde der Antikörper nun im pflanzlichen System ausgetestet. Dies erfolgte zuerst in Rohproteinextrakten von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen und von Pflanzen, in denen Pex10p unter dem 35S-Promotor überexprimiert wurde. In beiden Fällen blieben die Blots ohne jegliche Signale. Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn der Antikörper in angereicherten Organellenfraktionen eines Saccharosegradienten von *Arabidopsis*- und Wassermelonenkeimlingen des Wildtyps eingesetzt wurde, die sowohl unter Dunkel- als auch Lichtbedingungen gekeimt waren. Ein spezifisches Signal war nur in zwei deutlich zu großen Banden von ~ 55 kDa und 75 kDa sichtbar. Auch die Änderung des Detektionssystems von der Alkalinen Phosphatase hin zum sensitiveren Chemilumineszenz-Verfahren ging nicht mit einer Veränderung der Signale bezüglich ihrer Größe einher.

Dies wirft die Frage auf, ob der Titer des Antikörpers grundsätzlich zu gering ist, um das pflanzliche Pex10p zu erkennen oder ob die Menge an endogen exprimiertem Protein für eine Signalerzeugung zu niedrig ist. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass der spezifische Antikörper  $\alpha$ -*Hansenula*-Pex10p ebenfalls nicht in der Lage ist endogen exprimiertes *HpPex10p* in Wildtypstämmen zu detektieren, so dass von einem sehr niedrigen Expressionsniveau von endogen erzeugten Pex10p zumindest in *Hansenula polymorpha* auszugehen ist (Tan *et al.*, 1995). Da sowohl der spezifisch gegen *HpPex10p* gerichtete Antikörper als auch  $\alpha$ -*AthPex10p* überexprimiertes *Hansenula*-Pex10p erkennen, nicht aber endogene Expressionsmengen des Membranproteins, könnte dies als Parallele auch auf eine sehr niedrige Expression des pflanzlichen Pex10p hinweisen. Veenhuis *et al.* (1996) berichten von einem generell sehr niedrigen Expressionsgrad peroxisomaler Membranproteine (PMPs), der verhindert, dass sich diese Proteine in WT-Zellen mit elektronenmikroskopischen Methoden detektieren lassen. So bleibt festzuhalten, dass auch der gegen *AthPex10p* gerichtete Antikörper bei ersten elektronenmikroskopischen *in situ*-Immunogoldmarkierungen von Wildtypembryonen keine distinkten Signale ergab. Zwar lag die Konzentration an Goldpartikeln in *Arabidopsis*-Embryonen des Wildtyps mit 12 dots/ $\mu\text{m}^2$  gegenüber 3,9 dots/ $\mu\text{m}^2$  um den Faktor drei höher als in der Probe des Nullserums, aber in einem einmaligen Versuch ergab sich kein auffälliges Verteilungsmuster der Markierungen für bestimmte Kompartimente der Pflanzenzelle.

Ob sich der Antikörper für weitergehende *in situ*-Untersuchungen von *AthPex10p* eignet, ist nach den bisherigen Erfahrungen mit Vorsicht zu betrachten. Seine Funktionalität für biochemische Lokalisationsstudien von *AthPex10p* in transgenen Hefen zeigte hingegen zufriedenstellende Ergebnisse.

Anzumerken bleibt, dass die Weitergabe des Antikörpers und seine Verwendung in *Arabidopsis*-Zellen von Suspensions-Kulturen in der Arbeitsgruppe am *Department of Biology* an der *Arizona State University* (USA) ein distinktes Signal von endogen exprimierten *AthPex10p* nach Auftrennung von Organellen in einem Saccharose-Gradienten ergab. Der Antikörper erkannte *AthPex10p* auch in transienten und stabil transformierten Suspensionszellen von *Nicotiana tabacum*. Dort wurde ein Antigen in retikulären/membranösen Strukturen erkannt, die dem Endoplasmatische Retikulum ähnelten, so dass *AthPex10p* als ein frühes Peroxin innerhalb des ER fungieren könnte (Prof. Dr. D. Trelease, mündliche Mitteilung).

### **31 Funktionsanalyse von *AthPex10p* in *Hansenula polymorpha***

Für den Nachweis, dass es sich bei der klonierten Sequenz der *AthPEX10*-cDNA tatsächlich um das homologe pflanzliche Peroxin von *PEX10* handelte, sollte einerseits über biochemische Lokalisationsstudien versucht werden, das Targeting von *AthPex10p* in die Peroxisomen von *Hansenula* nachzuweisen und andererseits über die Komplementation eines *pex10*-defizienten *Hansenula*-Stammes die Funktionalität der *AthPEX10*-cDNA für die Biogenese peroxisomaler Strukturen zu belegen.

Für die Untersuchungen mit überexprimierten *AthPEX10* eignet sich *H. polymorpha* besonders gut, weil in Studien von Tan *et al.* (1995) an *pex10*-defizienten *Hansenula*-Stämmen keine peroxisomenähnliche Strukturen mehr festgestellt wurden und die Matrixenzyme im Cytosol lokalisiert waren. Die Überexpression von *HpPEX10* bei methanolinduziertem Wachstum führte zwar zu einer numerischen Erhöhung der Peroxisomen um das 2,5 bis 5-fache gegenüber Wildtypzellen, aber die Integrität und die Fähigkeit zum Import von Matrix-Proteinen waren durch die Überexpression nicht beeinträchtigt. Somit war davon auszugehen, dass die zu beobachtenden phänotypischen und biochemischen Effekte in dieser Untersuchung allein durch die Peptideigenschaften von *Arabidopsis*-Pex10p hervorgerufen werden und nicht durch unbeabsichtigte Nebeneffekte.

### 31.1 Die Komplementation eines *pex10*-defizienten *Hansenula*-Stammes mit dem Volllängen-Gen *AthPEX10* und Hybridkonstrukten aus Hefe und Pflanze

In Komplementationsstudien eines *pex10*-defizienten *Hansenula*-Stammes mit dem Volllängenklon von *AthPEX10*-cDNA und Peptidhybriden aus *Arabidopsis* und *Hansenula* wurden einerseits die physiologischen Eigenschaften bezüglich der Fähigkeit des Wachstums auf methanolhaltigem Medium untersucht und zum andern die morphologischen Strukturen im Hinblick auf die Ausbildung peroxisomaler Strukturen. Die Entscheidung darüber, welche Abschnitte der Aminosäuresequenz im *AthPex10p* deletiert wird, um durch einen entsprechenden Abschnitt des *Hansenula*-Proteins ersetzt zu werden, richtete sich nach dem Grad der Homologie im *Alignment* der beiden Peptide. Insgesamt liessen sich drei Abschnitte zwischen 21 und 26 AS ausmachen, in denen das 381 AS lange *AthPex10p* keinem homologen Abschnitt in dem um 86 AS kürzeren *Hansenula*-Pex10p entsprach. Diese betrafen den N-terminalen Abschnitt, der unmittelbar mit dem Startmethionin beginnt (HK1), sowie zwei weitere Bereiche geringer Homologie etwa in der Mitte des Proteins (HK2; HK3). Das vierte Hybridkonstrukt (HK4) ersetzte drei kleinere, nicht homologe Abschnitte des *AthPex10p* durch den Austausch seines gesamten C-terminalen Drittels mit der PEX10-cDNA von *Hansenula*. Beide N-terminal liegenden potentiell transmembrandurchspannenden *Arabidopsis*-Abschnitte waren von diesem Austausch nicht betroffen. Als Positivkontrolle zur Komplementation diente der Volllängenklon von *HpPEX10*-cDNA, die Vektortransformation ohne Insert wurde zur Negativkontrolle verwendet. Die Insertionen der verschiedenen Hefekonstrukte standen unter der Kontrolle des starken Alkoholoxidase-Promotors, der durch Glucose reprimiert und durch Methanol induziert wird. Die Expression der cDNA startet erst durch die Zugabe von Methanol. Ein Wachstum der Transformanten auf methanolhaltigem Medium kann jedoch nur stattfinden, wenn die Komplementation des peroxisomalen Defekts vollständig erfolgt ist und alle Matrixproteine importiert werden können. Selbst kleine Mengen an Alkoholoxidase, die durch einen ineffizienten Import im Cytosol verbleiben, verhindern das Wachstum der Zellen. Deshalb wurden die Hefestämme zuerst von glucosehaltigem Medium auf ein Glycerin/Methanol-Gemisch transferiert. Durch Glycerin als Kohlenstoffquelle erfolgte die schwache Induktion des Fremdproteins durch leichte Derepression des Promotors. Die Zellen sind in der Lage, unter Verbrauch des Glycerins zu wachsen und das Fremdprotein steht bereits zur Verfügung, sobald die Organismen auf die Nutzung des Methanols angewiesen sind, wofür funktionale Peroxisomen unabdingbar sind. Allerdings funktioniert die Komplementation von *pex10*-defizienten *Hansenula*-Mutanten mit *HpPEX10* unter dem AOX-Promoter auch schon bei einem direkten Transfer von Glucose auf Methanol, wenn gleich weniger optimal als unter einem endogenen Promotor (Kiel *et al.*, 1995).

Da jedoch aufgrund der Differenzen zwischen dem pflanzlichen und dem Hefeperoxin nicht unbedingt von einer funktionalen Komplementation des *Hansenula*-Proteins durch *AthPex10p* auszugehen ist, wurde auch die morphologische Fähigkeit zur Ausbildung peroxisomenähnlicher Strukturen im Elektronenmikroskop überprüft.

### **31.1.1 Die physiologische Charakterisierung komplementierter *pex10*-defizienter *Hansenula*-Stämme anhand des Wachstums auf methanolhaltigem Medium**

Gegenüber dem Wachstum von Hefeklonen auf verschiedenen Agarplatten mit Selektionsmedium haben Flüssigkulturen den Vorteil, dass ein Wachstum, insbesondere das schwach ausgeprägtes Teilwachstum von Hefeklonen über die Erfassung des Parameters der optischen Dichte objektiv erfasst werden kann. Ausserdem bieten Flüssigkulturen die Möglichkeit jeweils mehrere *pex*-Klone parallel in einem Erlenmeyerkolben anzuzüpfen und ein effizientes Screening nach wachstumsfähigen Klonen durchzuführen. Das Ergebnis der Wachstumsraten in verschiedenen Flüssigkulturen ergab für die verschiedenen Hefekonstrukte sehr eindeutige Resultate. Das Wachstum des *pex10*-defizienten Hefestammes konnte in allen drei Medien stattfinden, sofern dieser mit *HpPEX10* komplementiert wurde. Dies betraf glucosehaltiges Medium, ein Glycerin/Methanol-Medium und Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle. Das Negativkonstrukt des leeren Vektors führte auf Methanol-Medium erwartungsgemäss zum Nullwachstum, nicht aber auf glucosehaltigem Medium. Somit konnte von zuverlässigen Versuchsbedingungen ausgegangen werden, sowohl was die Transformation der Hefen an sich betrifft, als auch die Wachstumsbedingungen in den verschiedenen Medien. Das Wachstum aller Konstrukte, also sowohl des *Ath*-Konstrukt als auch der vier Hybridkonstrukte war auf glucosehaltigem Medium möglich und erreichte nach Wachstum über Nacht seine stationäre Phase. Auch auf Glycerol/Methanol-Medium sind peroxisomendefiziente Stämme in der Lage, allein Glycerol zu metabolisieren, wenngleich der Promotor durch Anwesenheit von Methanol die Induktion des Fremdproteins bereits induziert. Ob daraus peroxisomenähnliche Strukturen entstehen können, ist durch die Erfassung der Zellzahlen mittels der Optischen Dichte nicht möglich und bedurfte der Anwendung elektronenmikroskopischer Mittel. Das Wachstum auf Methanol zeigte für das pflanzliche Vollängen-Gen sowie alle vier Hybridkonstrukte denselben Verlauf wie die Negativkontrolle. Somit muss davon ausgegangen werden, dass eine funktionelle Komplementation eines *Hppex10*-Stammes weder mit dem Peroxin aus *Arabidopsis*, noch mit einem der vier Hybridkonstrukte möglich war.

### 31.1.2 Die elektronenmikroskopische Kontrolle der Fähigkeit zur Komplementation

Da weder *AthPEX10* noch eines der Hybridkonstrukte in der Lage war, eine *pex10*-defiziente Mutante von *Hansenula* funktionell in ihrem Wachstum auf Methanol zu komplementieren, sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen die Ausbildung peroxisomaler Strukturen abklären. Früher durchgeführte Experimente mit *Hansenula* hatten gezeigt, dass selbst geringe Mengen cytosolischer Alkoholoxidase das Wachstum der Hefen auf Methanol verhindert (van der Klei *et al.*, 1991). Somit würde eine nur teilweise Komplementation des Peroxin-Defektes, in der nicht alle Schlüsselenzyme des Methanolstoffwechsels (Alkoholoxidase, Katalase und Dihydroxyacetonsynthase) vollständig in die Peroxisomen-Matrix transportiert werden dazu führen, dass diese Stämme beim Screenen auf Methanol nicht erkannt werden. Probleme, die einerseits durch die Generierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehen und andererseits durch unkontrollierbare Flüsse von methanolinduziertem Formaldehyd, würden das Wachstum der Hefen verhindern.

Die morphologische Restaurierung dysfunktionaler Peroxisomen könnte jedoch durch Untersuchungen der Ultrastruktur von Hefezellen sichtbar werden. Hierfür wurde neben dem peroxisomendefizienten *pex10*-Stamm B1 auch ein Leucin-defizienter Wildtyp-Stamm *HpNCYC495* verwendet, der in der Lage ist, Peroxisomen auszubilden und somit auf Methanol zu wachsen. In ihm wurde *AthPex10p* zuerst überexprimiert, um eventuell störende Auswirkungen des pflanzlichen Peroxins auf die Biogenese der Peroxisomen in *Hansenula* berücksichtigen zu können. Untersuchungen mit *PEX14* aus *H. polymorpha* hatten gezeigt, dass das Mengenverhältnis der verschiedenen Peroxine zueinander für ihre korrekte Funktion essentiell sein kann. Unter dem starken Alkoholoxidase-Promotor führte die Expression von *Pex14p* zu einem Peroxisomen-defizienten Phänotyp (Komori *et al.*, 1997).

Als Ergebnis der Überexpression von *AthPex10p* in *HpNCYC495* zeigte das elektronenmikroskopische Bild jedoch normal ausgebildete Peroxisomen, so dass es im Fall von *PEX10* nicht zu unkontrollierbaren Sekundäreffekten kam. Eine zweite Positivkontrolle ergab sich aus der Komplementation des *pex10*-defizienten B1-Stammes, der mit der *HpPEX10*-cDNA komplementiert worden ist und die Funktionalität seiner Peroxisomen bereits durch das Wachstum auf Methanol bewiesen hatte. Die EM-Aufnahmen zeigten erwartungsgemäss Peroxisomenstrukturen, wie sie auch im Wildtypstamm sichtbar waren.

Die Ultrazellstrukturen der Hybridkonstrukte HK1, HK2 und HK3, die auf Glycerin/Methanol-Medium angezogen wurden, ergaben keine peroxisomenähnliche Formationen. Die Interpretation teils sichtbarer membranöser Strukturen als Vorformen peroxisomaler Membranvesikel, wie sie für verschiedene *pex*-Mutanten von Veenhuis *et al.* (1996) beschrieben wurden und die sich durch Überexpression von *HpPex10p* ausbildeten, war

ohne eine Immunodetektion mit Antikörpern gegen peroxisomale Membranproteine nicht möglich.

Überraschenderweise zeigte jedoch das Hybridkonstrukt HK4, bei dem das C-terminale Drittel des *Arabidopsis*-Gens durch *Hansenula-PEX10* ersetzt wurde, völlig normale Peroxisomen, die morphologisch gegenüber den Positivkontrollen nicht zu unterscheiden waren. Das anschließende Überimpfen des Stammes auf methanolhaltiges Medium führte zu keinem weiteren Wachstum, wodurch eine Kontamination mit Wildtyp-Hefen ausgeschlossen werden konnte. Somit war von einer Teilkomplementation einer *pex10*-defizienten *Hansenula*-Mutante mit einem Hybridkonstrukt aus Pflanze und Hefe auszugehen.

### 31.1.3 Die Bewertung der Komplementationsversuche

Der Volllängenklon von *Arabidopsis-PEX10* war nicht in der Lage eine *pex10*-defiziente Hefemutante zu komplementieren. Damit stellt sich die Frage, ob eine Komplementation zwischen zwei systematisch nur wenig verwandten Organismen wie Hefe und Pflanze zu erwarten gewesen wäre. Neben dem Grad der Verwandtschaft und der Ähnlichkeit beider Proteine muss hierbei auch die mögliche Funktion des Proteins berücksichtigt werden. Zwar wurden auch schon in der Vergangenheit pflanzliche Gene durch Komplementation von Hefemutanten kloniert (Corey *et al.*, 1993; Minet *et al.*, 1992), allerdings wurden die Erfolge zumeist mit Genen erzielt, deren Proteine Stoffwechsellaufgaben erfüllen und die deshalb wesentlich leichter ihre Funktion in einem heterologen Organismus erfüllen können, als dies für eine komplexe Komponente des Import/Translokations-Apparates anzunehmen ist, die dazu noch mit mehreren Fremdproteinen interagieren können muss (nachgewiesen für Pex2p, Pex5p, Pex12p sowie Pex19p). Aus diesem Grund scheint ein Peroxin anderen Systemanforderungen ausgesetzt zu sein als ein Enzym. Der Versuch, eine Hefemutante mit einem Defekt in der Biogenese von Peroxisomen erfolgreich durch ein homologes Gen aus Säuger oder Pflanze zu komplementieren, wurde bislang noch für kein Peroxin beschrieben. Das Experiment mit dem menschlichen Peroxin für *PEX6* einen *pex6*-defizienten *Pichia pastoris*-Stamm zu gesunden, schlug fehl (Yahraus *et al.*, 1996) und das Volllängen-Gen für den PTS1-Rezeptor *PEX5* aus der Wassermelone komplementiert funktionell keine *pex5*-Mutante aus *H. polymorpha*, selbst wenn morphologische Strukturen peroxisomaler Organellen elektronenmikroskopisch sichtbar sind (Wimmer *et al.*, 1998). Auch der menschliche PTS1-Rezeptor war nicht in der Lage, eine *pex5*-defiziente Hefe von *P. pastoris* funktionell zu retten (Wiemer *et al.*, 1995).

So ist teilweise noch nicht einmal die Komplementation von homologen Peroxinen in nahe verwandten Hefen möglich. Heyman *et al.* (1994) scheiterten bei dem Versuch, mit Pex1p

aus *Saccharomyces cerevisiae* eine *pex1*-defiziente Hefe von *P. pastoris* zu komplementieren. Auch der Test, mit *PEX8* aus *H. polymorpha* eine *Pppex8*-Mutante zu retten, verlief negativ (Liu *et al.*, 1995). Die PTS1-Rezeptoren aus *H. polymorpha* und *P. pastoris* sind zu 55% identisch und dennoch ist die Komplementation einer *pex5*-Mutante in *Hansenula* mit dem Homolog aus *Pichia pastoris* misslungen (van der Klei *et al.*, 1995).

Es gibt allerdings auch Berichte von erfolgreichen Komplementationen in Hefen. So lassen sich die jeweiligen *PEX11*-Peroxine aus *Candida boidinii* und *Saccharomyces cerevisiae* für wechselseitige Komplementationen von *pex11*-Stämmen verwenden, wobei der Phänotyp der komplementierten Hefen trotzdem nicht jenem des Wildtyps entspricht, obwohl die Identität der beiden Gene sogar auf DNA-Ebene über 93 % beträgt (Sakai *et al.*, 1995). *PEX3* aus *S. cerevisiae* ist in der Lage, die Peroxisomen-Biogenese einer *pex3*-defizienten *Hansenula*-Mutante zu induzieren und ihr somit das Wachstum auf Methanol zu ermöglichen (Kiel *et al.*, 1995). Und auch in Säugern liessen sich *pex6*-defiziente Hamster- und Zelllinien des Menschen (Zellwegersyndrom) durch das homologe Peroxin aus der Ratte komplementieren (Tsukamoto *et al.*, 1995).

Einwächter *et al.* (2001) berichten sogar von einer kollektiven Funktion dreier Nicht-Orthologe, nämlich *YPex20p*, *ScPex18p/Pex21p* und *HsPex5pL* beim frühen PTS2-Importmechanismus. Alle vier Peroxine beinhalten eine konservierte Region am C-Terminus, die eine *Pex7p-binding-box* darstellen könnte. Zusätzlich ist den vier Peroxinen aus drei Organismen ein „WxxxF-Strukturmotiv“ gemeinsam, das auch alle bekannten PTS1-Rezeptoren besitzen und das für die Bindung an die putativen Docking-Proteine *Pex13p* und/oder *Pex14p* benutzt wird. Heterolog exprimiertes *YPex20p* kann eine Doppel-*knockout*-Mutante  $\Delta pex18/\Delta pex21$  aus *S. cerevisiae* funktionell teilkomplementieren. Und die Übernahme einer missense-Mutation (S280F) in einer zentralen Position der konservierten Domäne, die eine Interaktion zwischen *Pex5pL* und *Pex7p* in Säugern verhindert, unterbindet auch die Interaktion zwischen *ScPex7p* und *YPex20p* sowie *ScPex7p* und *ScPex18p/ScPex21p*. Allerdings bleibt offen, ob es sich bei den Interaktionen der Peroxine um direkte Bindungen zwischen den Domänen handelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass frühe Schritte des peroxisomalen Protein-Imports höher konserviert sind, als die Involvierung nicht-orthologer Peroxine erahnen läßt (Einwächter *et al.*, 2001).

Dennoch bleibt festzuhalten, dass es sich bei Berichten erfolgreicher Komplementationen orthologer Peroxine um den Austausch von Proteinen aus nahe verwandten Organismen handelte und es bislang nicht gelungen ist, eine peroxisomendefekte Hefemutante durch das heterologe Peroxin eines höheren Eukaryonten, gleichgültig ob Pflanze oder Säuger, funktional zu komplementieren. In vorliegender Untersuchung ist dies auch nicht für eine Teilkomplementation und der Bildung dysfunktionaler Peroxisomen gelungen, wie dies in

Studien mit dem PTS1-Rezeptor *PEX5* aus *Citrullus vulgaris* sehr wohl gelang (Wimmer *et al.*, 1998). Die Autoren konnten in einer *pex5*-defizienten *Hansenula*-Mutante mit dem *PEX5*-Homolog aus der Wassermelone peroxisomenähnliche Strukturen erzeugen, was in vorliegender Untersuchung analog mit dem Volllängen-Gen *PEX10* aus *Arabidopsis* nicht möglich war. Offensichtlich war das pflanzliche Peroxin nicht in der Lage die für eine Teilkomplementation notwendigen Interaktionen mit anderen hefeartigen Peroxinen einzugehen, vorausgesetzt, *Arabidopsis-PEX10* besitzt funktional dieselben Aufgaben wie sein Homolog aus der Hefe und verfügt über das entsprechende Targeting-Signal, um korrekt in die Peroxisomen-Membran von *Hansenula* geleitet zu werden. Die Bedeutung zur Fähigkeit der Interaktion von Peroxinen wurde durch eine Untersuchung von Gould *et al.* (1996) unterstrichen, die in *two-hybrid*-Studien zwar die Interaktion von *PpPEX5* mit *PpPEX13* zeigen konnten, aber sobald sie *PpPEX13* durch das menschliche Homolog ersetzten, ging die Befähigung zur Interaktion der beiden Proteine verloren.

Da das Hybridkonstrukt HK4 jedoch morphologisch dysfunktionale Peroxisomen ausbilden konnte, bleibt die Frage offen, ob für die Ausbildung solcher Strukturen der C-terminale *Hansenula*-Abschnitt im Verbund mit der N-terminalen *Arabidopsis*-Sequenz verantwortlich ist, oder ob allein der C-Terminus des Hefedrittels mit seinem RING-Finger-Motiv, -ohne die *Arabidopsis*-Informationen-, peroxisomenartige Strukturen hätte ausbilden können. Die Interaktion von Pex10p mit Pex12p erfolgt über die C-terminalen RING-Domänen und stellt den gleichen Mechanismus dar, mit dem Pex12p den PTS1-Rezeptor an sich zu binden vermag (Chang *et al.*, 1999; Okumoto *et al.*, 2000). Zur Klärung dieser Frage hätte ein Komplementationsversuch mit einer *pex10*-defizienten Hefe und der ausschliesslich C-terminalen Aminosäuresequenz aus *HpPEX10* die notwendigen Informationen liefern können.

### 31.2 Die Lokalisation von *AthPex10p* in *Hansenula polymorpha*

Damit ein Protein in die Peroxisomen geleitet werden kann, muss es zwangsläufig über ein peroxisomenspezifisches Targetingsignal verfügen. Für den Beweis, dass es sich bei dem Volllängenklon von *AthPEX10* tatsächlich um das Peroxin-Homolog von *HpPEX10* handelt, wäre deshalb die biochemische Lokalisation des pflanzlichen Proteins innerhalb der Peroxisomen eine ausreichende Bestätigung für dessen peroxisomalen Charakter.

Zu diesem Zweck wurde *AthPEX10* in einen Wildtypstamm (NCYC495) von *Hansenula* kloniert. Diese Hefe war in der Lage, funktionale Peroxisomen auszubilden, wie ihr Wachstum auf Methanol zuvor bewiesen hatte. Erwartungsgemäss sollte sich deshalb *AthPex10p* als pflanzliches Peroxin innerhalb der Organellenfraktion einer Differentialzentrifugation lokalisieren lassen. Parallel zu diesem Versuchsansatz wurde *AthPex10p*

auch in einem peroxisomendefizienten *Hppex10*-Stamm überexprimiert, der als Negativ-Kontrolle eines peroxisomalen *AthPex10p*-Targetings diente. Bei diesem Versuch musste sich *AthPex10p* in der cytosolischen Fraktion der Differentialzentrifugation wiederfinden lassen, weil sich in diesem Hefestamm keine Peroxisomen ausbilden können.

Die Dekorierung der Fraktionen mit  $\alpha$ -Pex10p erbrachte ein unerwartetes Ergebnis. In der Organellenfraktion des Wildtyp-Stammes fand sich der geringste Anteil an *AthPex10p*. Seine Hauptmenge wurde im Überstand S3 detektiert, in dem sich neben cytosolischen Proteinen nur kleinere membranöse Strukturen wiederfinden. Die Zuverlässigkeit der Zentrifugation konnte durch die Detektion der cytosolischen Ethanoldehydrogenase (EDH) in S3 bestätigt werden, während sich der mitochondriale Marker Porin korrekterweise im Pellet P3 wiederfand. Das Ergebnis des peroxisomendefizienten Stammes ergab die Lokalisierung von *AthPex10p* im Überstand S3, was auch zu erwarten war. Somit muss davon ausgegangen werden, dass *AthPex10p* kein geeignetes peroxisomales Targeting-Signal enthält, um in die Peroxisomen von *H. polymorpha* geleitet zu werden.

Ein Saccharosegradient des postnuklearen Überstandes, der die einzelnen Organellenfraktionen nach ihrer Dichte auftrennt, sollte die genauere Lokalisation von *AthPex10p* klären helfen und den Befund aus der Differentialzentrifugation bestätigen.

Das Ergebnis des Saccharosegradienten von überexprimierten *AthPex10p* in *wtHp* weist eindeutig auf eine Lokalisation in den oberen cytosolischen Fraktionen 18-23 hin. Allerdings findet sich das Peroxin auch schon in den Fraktionen 16+17, zwei Fraktionen oberhalb des Proteinpeaks, der auch die Aktivität des Cytochrom  $c$  als Mitochondrienmarker widerspiegelt. In diese Fraktionen sedimentieren sehr leichte Membranvesikel, an die *AthPex10p* gebunden sein könnte.

Die Auftrennung des Gradienten an sich kann als zuverlässig angesehen werden, wie die Auswertung verschiedener Marker ergab. Der peroxisomale Peak lag in den Fraktionen 5-7 und korreliert keinesfalls mit der Detektion von *AthPex10p*. Der Gehalt an peroxisomaler Alkoholoxidase (AOX) steigt zwar zu den oberen Fraktionen hin stark an, was auf geplatzte Peroxisomen hinweist und die nicht beprobten Fraktionen 21-23 könnten absolut betrachtet sogar den Peroxisomen-Peak an AOX in Fraktion 7 übertreffen. Da *AthPex10p* jedoch in Fraktionen detektierbar ist, deren Gehalt an AOX deutlich unterhalb jener der peroxisomalen Fraktionen liegt, ist von keiner Verfälschung des Untersuchungsergebnisses durch den Zusammenhang geplatzter Peroxisomen mit dem Nachweis an *AthPex10p* auszugehen. - *AthPex10p* wird in *Hansenula* nicht in existierende Peroxisomen transportiert. Die Ausbildung dieser Organellen konnte neben dem biochemischen Nachweis von AOX auch durch den elektronenmikroskopischen Befund sichtbarer Peroxisomen in diesem Hefekonstrukt verifiziert werden.

Anders die biochemische Auswertung des Gradienten von *AthPEX10::Hppex10*. Die EM-Aufnahmen des *pex10*-defizienten Hefekonstrukts zeigten keine peroxisomalen Organellen. Der Befund war aus dem Kurvenverlauf der AOX im Saccharosegradienten auch zu postulieren. Die Aktivität der AOX ist in dem theoretischen peroxisomalen Peak bei Fraktion 6 (van der Klei *et al.*, 1998) nicht nachweisbar und steigt erst ab den Fraktionen 15 sprunghaft an. Eine Detektion mit  $\alpha$ -Pex10p machte somit keinen Sinn, weil *AthPex10p* in den cytosolischen Fraktionen verbleiben musste.

Damit spielt es für das Targeting und die Lokalisation von *AthPex10p* in *Hansenula polymorpha* keine Rolle, ob die Hefen Peroxisomen ausbilden können oder nicht, was in Gegensatz zu der Detektion von *HpPex10p::wtHp* steht. Dort cofraktioniert das Hefeperoxin ausnahmslos mit Peroxisomen (Tan *et al.*, 1995; Komori *et al.*, 1997; Baerends *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte bei einer spezifischen Immunomarkierung mit  $\alpha$ -*HpPex10p* die vorwiegende Lokalisation des Hefeproteins in kleineren Organellen festgestellt werden (van der Klei *et al.*, 1998b). Dies weist vielleicht auf eine frühe Rolle von *HpPex10p* in der Entwicklung von Peroxisomen hin. Ausserdem fanden Baerends *et al.* (2000) in einer *pex3*-Mutante von *Hansenula*, in der *PEX3* durch den teilweise Austausch konservierter Aminosäuren dysfunktional wurde, eine duale Verteilung von *HpPex3p*, *HpPex10p* und *HpPex14p*. Die drei Peroxine konnten einerseits in den peroxisomalen Fraktionen 6-9 intakter Organellen eines Saccharosegradienten detektiert werden, andererseits fanden sich *Pex3p* und *Pex14* in Fraktionen 16-19 zusammen mit der mitochondrialen Fraktion, während *Pex10p* vorwiegend in Abschnitten leichterer Dichte (19-21) sedimentierte und somit mit nicht weiter identifizierten subzellulären Strukturen assoziiert sein könnte. Zusammenfassend lassen die Untersuchungsergebnisse in transgenen Hefen folgende Schlussfolgerungen zu:

- Das Volllängen-Gen von *AthPex10p* ist nicht in der Lage das fehlende Peroxin aus der Hefe zu ersetzen.
- Ein Hybrid-Konstrukt aus N-terminalem *AthPex10p* und C-terminalem *HpPex10p* führt zur Ausbildung morphologischer, aber dysfunktionaler Peroxisomen.
- Die Lokalisationsuntersuchung des Volllängen-Gens ergibt keinen Hinweis auf ein Targeting des pflanzlichen Peroxins in die Peroxisomen von *H. polymorpha*. Stattdessen gibt es Anzeichen auf eine Assoziation von *AthPex10p* mit leichten Membranstrukturen.

Vergegenwärtigt man sich die mögliche Colokalisation von *AthPex10p* mit der ER-Lokalisierung in *H. polymorpha* und bringt diese in einen Zusammenhang mit dem neu entdeckten putativen ER-*retrieval*-Signalmotiv (ER-RSM) am C-Terminus von *AthPex10p*, so könnte dies die Erklärung dafür liefern, warum das pflanzliche Volllängen-

Gen nicht in die Hefe-Peroxisomen geleitet wurde. Der Austausch des C-terminalen *Arabidopsis-PEX10* gegen den homologen Hefeabschnitt und damit die Deletion des ER-RSM könnte das Targeting in die Hefeperoxisomen bewirkt haben und damit auch eine morphologische Ausbildung der Organellen. Die Existenz des ER-RSM im *Arabidopsis-PEX10* würde somit auf die besondere Involvierung des ER innerhalb des pflanzlichen Organismus hindeuten, der im Gegensatz zur Funktion in *Hansenula polymorpha* steht.

## 32 Die Analyse einer *PEX10*-Transposon-Linie

In Hefen und Säugern codiert *PEX10* für ein integrales Membranprotein, das für die Biogenese von Peroxisomen und den Import von Matrix-Proteinen in die Organellen lebensnotwendig ist (vgl. Kapitel 6). Die Dysfunktionalität des Gens verhindert das Überleben von Hefen auf methanolhaltigem Medium und führt in der Entwicklung des Menschen zum frühzeitigen Tod, wie es für das Krankheitsbild des Zellwegersyndroms und der NALD beschrieben ist.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass das pflanzliche Homolog für *PEX10* aus *Arabidopsis thaliana* für die Biogenese von Peroxisomen, Oleosomen (Lipidkörper) und Proteinbodies zuständig ist. In einer *peX10*-Transposon-Linie führte die Ausschaltung des Gens zur Letalität des sich entwickelnden Embryos im Herzblatt-Stadium. Die Korrelation des letalen Phänotyps und der Ausschaltung von *AthPEX10* zeigte sich durch die erfolgreiche Komplementation der Mutante mit der cDNA des Vollängen-Gens.

### 32.1 Die genetische Phänotypanalyse

Da alle Nachkommen der Transposonlinie in Bezug auf ihr Markergen für Kanamycinresistenz fortdauernd segregierten und nicht in einen homozygoten Zustand gebracht werden konnten, mussten die genotypischen Embryonen ohne ein Wildtyp-Allel von *PEX10* bereits bei ihrer Entwicklung innerhalb der Schoten abgestorben sein. Der Blick in die Schoten ergab eine letale Segregationsrate von etwa 21,5 % statt der zu erwartenden 25% bezogen auf alle befruchteten Samenanlagen. Diese verringerte Sterblichkeitsrate erklärt sich erfahrungsgemäss durch die allgemein geringere genetische Fitness der mutierten Gameten in ihrer Konkurrenz zu Wildtyp-Allelen und entspricht somit durchaus den Erwartungen für Segregationsverhältnisse eines letalen Allels innerhalb einer nicht gekoppelten Vererbung.

Eine Analyse der Ausrichtung des DsG-Elements innerhalb des *PEX10*-Gens ergab die Insertion in Leserichtung von *PEX10* als Voraussetzung für die wünschenswerte *in frame fu-*

sion des *Uid*-Gens mit dem Zielgen, was eine Expression des Reporter-Glucuronidase-Enzyms möglich machen würde. Allerdings konnte keine GUS-Färbung beobachtet werden. Die Ursache hierfür könnte in einem ungeeigneten *T-DNA border splicing* gelegen haben, so dass letztlich keine *in frame fusion* erzielt werden konnte.

### 32.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen an letalen Embryonen der T-Linie

Nachdem eine Transposon-Schote geöffnet wurde, ließen sich grundsätzlich drei Typen von Samen unterscheiden. Sehr kleine nicht-befruchtete Samenanlagen waren aufgrund ihrer Größe und Degenerierung sehr einfach von sich entwickelnden fertilen Samenanlagen zu unterscheiden. Solche „tauben“ Samen fanden sich gelegentlich auch in Wildtypschoten und wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Für Transposon-Schoten typisch waren allerdings in ihrer Entwicklung stagnierende letale Samen, die sich von vitalen Samen zunehmend unterscheiden liessen, sobald die Embryonen das Herz-Stadium überschritten hatten. Mit fortdauernder Ontogenese waren 98% der homozygoten Transposon-Individuen nicht mehr in der Lage, den Übergang vom Herz-Stadium in das Torpedo-Stadium zu vollziehen. Der Zusammenhang zwischen stagnierender Entwicklung und Homozygotie in Bezug auf das *knockout*-Gen *pex10* zeigte sich dabei über die Kontrolle der Ontogenese von Wildtyp-Embryonen. Ihre Entwicklung innerhalb einer Schote verläuft zwar nicht absolut synchron, sie divergiert jedoch nur um wenige Stunden (Bowman, 1994; Seiten 353-354). Der in dieser Arbeit verwendete Divergenzindex (vgl. Kapitel 26.5.1) zeigte in Bezug auf die temporären Entwicklungsunterschiede individueller Embryonen derselben Schote einen erheblichen Sicherheitspuffer, der einerseits verhinderte, dass vitale Spätentwickler als letal gekennzeichnet wurden und ermöglichte andererseits dennoch die frühzeitige Identifizierung homozygoter *k.o.*-Embryonen. Dies war für elektronenmikroskopische Untersuchungen wichtig, in denen die Minimierung degenerativer Sekundäreffekte angestrebt wurde. Die Vertrauenswürdigkeit des Indexes wurde auch durch die Rate der frühzeitig als letal identifizierten Embryonen bestätigt, die identisch war mit der Rate von ganzen, abgereiften Samen des Ruhestadiums und die sich sehr einfach von normal entwickelten Samen unterscheiden liessen.

Im Mikroskop war eine mangelhafte Zelldifferenzierung typisch für die letalen Embryonen. Die Zellteilungen selbst schienen nicht mit dem Entwicklungsstopp ihrer Ausdifferenzierung einherzugehen. Globularstadien letaler Individuen zeigten einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp in der Anzahl der Zellen und wirkten ballonartig aufgeblasen, die Synchronität in der Anlage der beiden Keimblätter des Herz-Stadiums war oftmals nicht gegeben oder sie wirkten degeneriert.

Da die Gewebespezialisierung und Organellendifferenzierung in Wildtyp-Embryonen im mittleren Globularstadium, bzw. Frühen Herz-Stadium einsetzt (Bowman, 1994; Seiten 351-356), läßt der Phänotyp lichtmikroskopischer Transposon-Individuen des Globular- bis Herz-Stadiums somit auf schwerwiegende Fehler innerhalb des Ablaufs dieser Entwicklungsschritte schliessen.

### 32.3 Die elektronenmikroskopische Charakterisierung von *pex10*-defizienten *Arabidopsis*-Embryonen

Die zytologischen Befunde der Ultrastrukturanalysen letaler *Athpex10*-Mutanten der Transposon-Linie in vorliegender Untersuchung weisen auf eine direkte oder indirekte Involvierung von *AthPex10p* in der Peroxisomen-Biogenese sowie der Ausbildung von Oleosomen und Speicherproteinkörpern unter Einbeziehung des Endoplasmatischen Retikulums hin. Für diese Interpretation sprechen verschiedene Hinweise:

- Während in Wildtyp-Embryonen charakteristische **Peroxisomen** mit Matrix-Inhalt sichtbar sind, bleiben diese Organellen in *pex10*-Embryonen völlig absent. Ob sich allerdings sehr kleine membranöse Vesikel (*ghost sheets*) ausbilden können, ähnlich wie bei *pex10*-defizienten Hefen von *P. pastoris* (Kalish *et al.*, 1995) oder in Fibroblasten-Zellen des Menschen (Chang *et al.*, 1999b), kann ohne weitere Immunodetektion nicht geklärt werden. Neben einem unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Peroxin-Defizienz von *AthPex10p* und der Peroxisomen-Absenz, könnte auch ein indirekter Zusammenhang zur Missbildung von Lipidkörper bestehen. Chapman & Trelease (1991) wiesen diesen Organellen eine kontrovers diskutierte Bedeutung bei der Versorgung von Peroxisomen mit Membranlipiden zu. Neben der Umwandlung von Speicherlipiden zu Kohlenhydraten beim Keimungsprozess, könnten die Lipidkörper als zusätzliche Aufgabe Peroxisomen mit unpolaren Lipiden und Phospholipiden zur Erweiterung ihrer Membranen versorgen. Fehlen Lipidkörper infolge der *Athpex10*-Defizienz, so bilden sich auch keine peroxisomale Membranen mehr aus.
- In letalen Embryonen bilden sich ganze Stapel zusammengepresster ER-Membranen, die parallel oder sphäroidal angeordnet sein können (vgl. Kapitel 26.6.2). Zwischen einer oberen und unteren Phospholipidmonolayer befindet sich Material derselben typischen Elektronendichte wie der Matrixinhalt von **Lipidkörpern** (Oleosomen) in Wildtyp-Embryonen. An diesen Monolayer-Membranen des Wildtyps translateren Ribosomen des rauen ER oleosinische Proteine für die Insertion in die ER-Membran. Gleichzeitig werden die von den Plastiden angelieferten Fettsäuren von Enzymen der Triacylglycerol-Synthese umgebaut und in die Doppelhälfte der ER-Membranen importiert.

Der Zwischenraum zwischen den Membranen wird dabei im Wildtyp zunehmend mit Speichermaterial ausgefüllt während sich die äussere Membranhälfte immer weiter abschnürt, bis es schliesslich zur Abknospung eines Lipidkörpers kommt. Durch diesen Abschnürungsvorgang ist gewährleistet, dass die polare Seite der Phospholipide zum Cytosol hin ausgerichtet ist und die hydrophoben Fettsäurereste zur Triacylglyceridmatrix zeigen. Dieser Weg beinhaltet, dass die entsprechenden Membranbereiche des ER vor dem Abschnürungsvorgang mit den Lipidkörper-Proteinen ausgestattet werden (Wanner *et al.*, 1981; Huang, 1992). Ein alternatives Modell von Napier *et al.* (1996) beschreibt die Bildung eines Öltröpfchens auf cytosolischer Seite des ER, das erst nach seiner Freisetzung vom ER mit einer Phospholipidmonolayermembran und Proteinen ausgestattet wird. In *Athpex10*-Mutanten scheint hingegen die Bildung oder Abschnürung der Lipidkörper-Membran vom ER schwerwiegend gestört zu sein, so dass es zur Anhäufung von Triacylglycerol zwischen den beiden Membranhälften des ER kommt. Davon unberührt ist offensichtlich die Biogenese sehr kleiner Lipidkörper mit einfachen ribosomenbesetzten Membranen. Dieser Oleosomentypus in letalen Embryonen des Herz-Stadiums kann vom ER auch ohne die Präsenz von *AthPex10p* entwickelt werden. Die Art dieser Organellen erinnert dabei stark an entstehende junge Lipidkörper des Torpedo-Stadiums in *Arabidopsis* (Bowman, 1994) sowie an reifende Keimblätter von *Cucurbita* und *Citrullus*, wie sie von Wanner *et al.* (1981) beschrieben wurden.

- In Wildtypzellen werden Globuline und Albumine an Polysomen des ER synthetisiert und in das ER-Lumen transportiert. Dort werden die Speicherproteine in Vesikel verpackt und über den Golgi-Apparat zu den eigentlichen Speichervakuolen verfrachtet, die man als **Proteinkörper** bezeichnet. In letalen Zellen zeigt das ER ein ausgedehntes Netzwerk untypisch geschwollenen ER-Lumens, das immer weiter aufbläht, bis es schliesslich in zahlreiche Vakuolen übergeht, die nach Anzahl und Umriss mit Proteinkörpern gesunder Zellen vergleichbar sind. Allerdings enthalten sie im Gegensatz zu vitalen Zellen nur amorphes, faserartiges Material, das zu Aggregaten präzipitiert. Die Aufgabe von *AthPex10p* scheint somit in einem primären Import dieser Matrixproteine in die Membranvesikel zu liegen, die ihre Cargoproteine vom ER zum Golgi-Apparat transportieren und von dort zu den Speichervakuolen. In *pex10*-Mutanten kommt es hingegen zur Akkumulation der Speicherproteine innerhalb des ER und nicht zur Befüllung der Membranvesikel.

Weitere Hinweise auf die Rolle von *AthPex10p* als ein sehr frühes Peroxin in der Peroxisomenbiogenese ergaben Untersuchungen von Heinze *et al.* (2000) sowie Flynn *et al.* (2002) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Trelease an der *Arizona State University* mit Flüssig-Suspensions-Kulturen von *A. thaliana* und *N. tabacum*, in denen der in dieser Dissertation hergestellte Antikörper gegen *AthPex10p*-6His für Zellfraktionierungs- und Im-

munofluoreszenz-Studien eingesetzt wurde. Endogen exprimiertes *AthPex10p* wurde in Organellen aus Arabidopsiszellen, die in einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt wurden, innerhalb des ER detektiert sowie in präperoxisomalen Vesikeln zusammen mit dem peroxisomalen Membranprotein Ascorbatperoxidase, -nicht jedoch in der Gradientenfraktion reifer Peroxisomen. Auch in mit *AthPex10p* transient und stabil transformierten Tabakzellen fanden sich deutliche Hinweise auf die Lokalisation von *AthPex10p* in präperoxisomalen Vesikeln und der Involvierung des ER bei der pflanzlichen Biogenese von Peroxisomen (Prof. Dr. D. Trelease, mündliche Mitteilung).

Peroxisomale Membranen in Pflanzen besitzen mehrere unterschiedliche Phospholipide, wie z.B. Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol oder Phosphatidylglycerol und die Glyoxysomen der Keimlinge weisen zusätzlich noch beträchtliche Mengen an unpolaren Triacylglycerolen auf (Chapman & Trelease, 1991; Übersichtartikel Trelease, 2002). Da biologische Membranen niemals *de novo* synthetisiert werden können, sind Peroxisomen aber nicht in der Lage, ihre eigenen Membran-Lipide zu synthetisieren (Lazarow & Fujiki, 1985; Chapman & Trelease, 1991; Übersichtartikel Trelease, 2002). Dieses Paradigma läßt für die Bildung von Peroxisomen nur zwei Möglichkeiten zu. Entweder vollzieht sich ihre Biogenese über die Teilung von bereits existierenden Peroxisomen oder sie entstehen über die Entwicklung von Membranen aus einem anderen Zellorganell, wie dem des Endoplasmatischen Retikulums (Charlton & Lopez-Huertas, 2002). Während die Vermehrung von Peroxisomen durch Organellenteilung in Hefen unstrittig gezeigt werden konnte (z.B. Hoepfner *et al.*, 2001) und als effizienter und schneller Weg der Peroxisomenvermehrung betrachtet werden kann (Veenhuis & van der Klei, 2002), ist die Involvierung des ER als Ort der Peroxisomeninitiierung immer noch eine sehr kontroverse Debatte (z.B. Subramani, 1996; Mullen *et al.*, 2001; vgl. Kapitel 5).

Klassische Untersuchungen des ER resultierten in drei morphologisch verschiedene Subkompartimente. Raves ER, glattes ER und die Kernhüllenmembran lassen sich voneinander abgrenzen. Neuere Analysen führten zur Identifizierung spezialisierter Subdomänen des ER, die sich in Bezug auf ihre Gestalt, der Zusammensetzung ihrer Proteine und ihrer Funktion unterscheiden (Sitia & Meldolesi, 1992; Hobman *et al.*, 1998).

In Hefen wurde der Nachweis auf spezielle Subdomänen des ER, die als alternativer oder paralleler Biogeneseweg von Peroxisomen über die Bildung von Membranvesikeln gelten, von verschiedenen Arbeitsgruppen erbracht (Übersichtsartikel Titorenko & Rachubinski, 2001a; Titorenko & Rachubinski, 2001b; van der Klei & Veenhuis, 2002). In Säugern lieferten Geuze *et al.* (2003) unter Verwendung elektronenmikroskopischer und immunocytochemischer Mittel mit dreidimensionalen Bilderserien dendritischer Mauszellen einen beeindruckenden Beweis für das ER als Hauptquelle peroxisomaler Membranproteine. Pex13p und PMP70 konnten hierbei in speziellen Subdomänen des ER lokalisiert werden.

Diese gingen in ein peroxisomales Retikulum über, von dem sich schliesslich reife Peroxisomen abschnürten. Auch von Pflanzen sind spezialisierte Subdomänen des ER bekannt, wie sie von Okita & Rogers (1996) für ER-lokalisierte Proteinkörper beschrieben wurden, in denen Speicherproteine der Samen synthetisiert und aufbewahrt werden. Mullen *et al.* (1999) untersuchten das Targeting der pflanzlichen Ascorbatperoxidase (APX), die in Tabakzellen transient exprimiert wurde und lokalisierten das peroxisomale Membranprotein in bestimmten Subdomänen des ER und ebenso in Peroxisomen. Nach Behandlung mit Brefeldin A (BFA), einem starken Toxin, das die Abschnürung von ER-Vesikeln verhindert, akkumulierte APX im retikular-zirkulären Netzwerk der Zellen und wurde nach Entfernung des BFA an Vorläuferformen der Peroxisomen weitergeleitet. Die charakteristische spezielle Subdomäne des ER bezeichneten die Autoren als peroxisomales ER (pER). Peroxisomale Membranproteine werden demnach indirekt in das pER geleitet, wo sie sich über die Ausbildung von Vesikeln und der Aufnahme von Matrixproteinen zu frühen Peroxisomen weiterentwickeln.

In *H. polymorpha* akkumulierte das Membran-gebundene Peroxin Pex3p innerhalb des ER und zwar sowohl wenn es überexprimiert wurde, als auch nach Behandlung der Zellen mit BFA (Baerends *et al.*, 1996; Salomons *et al.*, 1997). Faber *et al.* (2002) zeigten, dass die 50 N-terminalen Aminosäuren von *HpPex3p* mit der Bildung von vesikulären Membranstrukturen verknüpft sind. Ultrastrukturelle und biochemische Befunde weisen auf die Kernhüllenmembran als Ursprung dieser Vesikel hin, die ebenfalls Pex14p beinhalten und sich zu funktionalen Peroxisomen entwickeln können, sobald das Volllängen-Protein von *HpPex3p* eingeführt wird. In *P. pastoris* untersuchten Faber *et al.* (1998) die Involvierung von Pex1p und Pex6p bei der Ausbildung von Peroxisomen und fanden in  $\Delta pex1$  und  $\Delta pex6$ -Stämmen nur noch kleine vesikuläre Membranreste, während der Hauptteil an peroxisomalen Matrixproteinen im Cytosol lokalisiert war. Zellfraktionierungen ergaben eine vorwiegende Assoziation der beiden Peroxine mit membranösen subzellulären Strukturen, die sich von Peroxisomen unterscheiden ließen. Die Autoren diskutieren als Ursprung dieser Vesikel das Endoplasmatische Retikulum. In *pex1*-, *pex2*-, *pex6*- und *pex9*-Mutanten von *Y. lipolytica* ist nicht nur die Peroxisomen-Biogenese betroffen, sondern auch der Austritt einer extrazellulären Vorläufer-Protease aus dem ER sowie die Protein-Sekretion. Die Peroxine Pex2p und Pex16p werden in *Y. lipolytica* über das ER in die Peroxisomen geleitet, wo sie als integrales (Pex2p), bzw. peripher gebundenes Membranprotein (Pex16p) detektierbar sind (Eitzen *et al.*, 1997; Titorenko *et al.*, 1997; Titorenko & Rachubinski, 1998). In Zellen des Menschen hingegen verhält sich Pex16p wie ein integrales Membranprotein, dessen Termini zum Cytoplasma hin exponieren. Seine Lokalisation ist ausschliesslich auf die Peroxisomen beschränkt und findet sich in keinen anderen Zellkompartimenten. Der Einsatz von BFA beeinflusst folglich auch nicht das Targeting von

Pex16myc in die Peroxisomen. Die Inaktivierung des Peroxins verhindert die Ausbildung von Peroxisomen, während seine Expression zur Neubildung von Peroxisomen auch bei völliger Abwesenheit bereits existierender Organellen führt (South & Gould, 1999). In Pflanzen untersuchten Lin *et al.* (1999) eine rezessive *pex16*-homologe Transposon-Insertionslinie von *A. thaliana* und benannten sie ursprünglich als *sse1* für *shrunk seed mutant*. Homozygote *sse1*-Zellen von reifen Samen enthielten nur wenige Lipidkörper und Speicherproteinkörper fehlten gänzlich. Stattdessen akkumulierten die Stärkekörner. Die Keimung solcher Samen war nicht mehr möglich. Ob die Biogenese von Peroxisomen durch *sse1* betroffen war, es sich bei diesem Gen also überhaupt um ein Peroxin handelt, konnte von den Autoren aufgrund des Untersuchungsobjektes abgereifter Samen nicht geklärt werden. Dort sind Peroxisomen nicht notwendigerweise anzutreffen (Olsen & Harada, 1995). Lin *et al.* (1999) schliessen deshalb eine funktionelle Expression von *AthPex16p* in keimenden Samen zur Aufrechterhaltung restlicher Oleosomen und die gleichzeitige nicht-Involvierung in der Peroxisomen- und Glyoxysomen-Biogenese nicht aus. Bemerkenswert ist jedoch, dass *AthSSE1* Mutanten von *Ylpex16* in Bezug auf ihre Fähigkeit zum Wachstum auf Ölsäure als Kohlenstoffquelle, wofür funktionale Peroxisomen benötigt werden, sowie im Hinblick der Beförderung von Plasmamembran- und Zellwand-assoziiierter Proteine komplementieren konnte, was auf eine Funktion des pflanzlichen *PEX16*-Gens als Peroxin hindeutet.

Mutationen im RING-Finger-Peroxin Pex2p führen in *Y. lipolytica* zur Anhäufung von drei bestimmten Subpopulationen von Peroxisomen, die sich nicht zu reifen Organellen weiterentwickeln konnten. Die unnatürlichen vesikulären Strukturen sind von mehreren Membraneinheiten umgeben und einige der peroxisomalen Strukturen sind mit Elementen des ER sowie des Golgi-Apparates assoziiert (Titorenko *et al.*, 1996; Eitzen *et al.*, 1996). In *pex2*-defizienten Säugern überleben junge Mäuse zwar im Uterus, sterben aber bereits wenige Stunden nach ihrer Geburt an den Folgen schwerer neuronaler Schädigungen und eines abnormalen peroxisomalen Stoffwechsels. Statt intakter Peroxisomen bilden sich nur leere Membranhüllen aus (Faust *et al.*, 2001). In *Arabidopsis*-Pflanzen wurde *PEX2* ursprünglich als *TED3* kloniert. *det3*-Mutanten wirken als dominanter Suppressor von *det1*-Mutanten mit abnormaler Photomorphogenese. Interaktionen von *TED3* mit *DET1* und *COPI* sowie ihren Suppressor-Mutanten wurden im Hinblick auf die Photomorphogenese der *Arabidopsis*-Keimlinge untersucht und zeigten, dass homozygote *pex2*-Mutanten bereits im Embryonalstadium absterben (Hu *et al.*, 2002). Für *AthPex2p* wird von den Autoren eine von Peroxisomen erzeugte Signalwirkung diskutiert, die über eine negative Rückkopplung über *DET1* die nukleare Genexpression steuert.

All diese Beispiele zeigen wie unterschiedlich oder evtl. auch vielfältig die Funktionen verschiedener *PEX*-Gene innerhalb anders gearteter systematischer Organismen sein kön-

nen. In Pflanzen konnte bislang jedoch nur für *AthPex14p* der direkte Nachweis als Vertreter eines peroxisomalen Membran-Proteins gleich für drei verschiedene Typen von Peroxisomen erbracht werden (Hayashi *et al.*, 2000). Betrachtet man sich alle bisherigen Befunde zur Funktion pflanzlicher Peroxine, so zeigen sie neben deren vielfältigen Aufgaben, dass diese nicht ausschliesslich auf die Peroxisomen-Biogenese beschränkt sind. Mögliche Doppelfunktionen von Peroxinen sind von anderen Organismen bekannt, wie z.B. der Hefe *H. polymorpha*. Bellu *et al.* (2001) konnten in *Hansenula* eine zusätzliche und damit multiple Funktion von *HpPex14p* aufzeigen. Neben der Importfunktion von PTS1-Rezeptor-Cargo-Proteinen in die Peroxisomen, besitzt *HpPex14p* auch eine essentielle Bedeutung bei der Pexophagie. Dieser selektive Prozess der Peroxisomendegradation, der z.B. bei einer Beschädigung der Organellenmembran und ausströmender Matrixproteine eine wichtige Rolle spielt (Sepulveda-Saavedra *et al.*, 1992), wird durch die Deletion der N-terminalen 31 Aminosäuren von *HpPex14* verhindert und damit auch die Kontrolle zur Überlebensfähigkeit der Zelle auf methanolhaltigem Medium (Bellu *et al.*, 2001). In *H. sapiens* konnten Gavva *et al.* (2002) für *PEX14* eine neue bifunktionale Aufgabe des Peroxins feststellen. Neben seiner essentiellen Funktion als Docking-Mechanismus von Rezeptorproteinen an der Peroxisomen-Membran, ist es auch in der Lage, als transkriptionaler Korepressor und Modulator von Polypeptid-Transporten zu fungieren. In Pflanzen fehlt bislang der Nachweis für eine solche Doppelfunktion, also dass ein Peroxin Funktionen ausserhalb der eigentlichen Organellenentwicklung übernehmen kann und trotzdem essentielle Aufgaben für die Existenz von Peroxisomen besitzt und somit per Definition ein Peroxin ist.

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse der *Athpex10*-Transposon-Linie und ihre Verknüpfung mit der physiologischen Bedeutung des Proteins für die Peroxisomenfunktion innerhalb der *zincfinger-disruption*-Linie, können diesen Zusammenhang liefern.

### **32.4 Die Komplementation letaler Genotypen mit dem Volllängklon von *AthPEX10* und der cDNA des zerstörten Zinkfinger-Motivs**

Durch die erfolgreiche Komplementation der beiden Transposon-Linien T3 und T7 mit der cDNA des Volllängklons von *AthPEX10* konnte der Zusammenhang zwischen den phänotypischen Auswirkungen der *pex10*-Defizienz und ihrer Kompensation hergestellt werden. Die Möglichkeit, dass es durch die Verwendung des sehr starken Promotors 35SS1 zum *Silencing* des Genprodukts kommen könnte, ist bei dem Komplementationsversuch nicht eingetreten. Auch führte die Überexprimierung des Proteins nicht zu unerwünschten Sekundäreffekten, die eine Kompensation des letalen Phänotyps überdeckt haben könnte, was mit den Untersuchungen von Tan *et al.* (1995) an überexprimierten *HpPex10p* in *H.*

*polymorpha* kongruent ist. Stattdessen zeigte sich, dass homozygote *pex10*-T-Linien einen völlig unauffälligen Phänotyp entwickelten, sobald sie mit der cDNA von *AthPEX10* komplementiert worden waren. Der erfolgreiche *rescue*-Versuch zeigte sich einerseits als Hinweis durch die Segregationsraten überlebender Keimlinge auf Selektionsmedium und zum andern endgültig über die Analyse der Genotypen.

Der Misserfolg bei der Komplementation letaler Transposon-Individuen mit der *pex10*-cDNA eines zerstörten Zinkfinger-Motivs offenbart die Bedeutung der Domäne für die Interaktionseigenschaften des Peroxins mit anderen Proteinen. Für die Aktivität des Proteins im Hinblick auf die Fähigkeit, Zinkionen koordinieren zu können, ist ein intaktes C3HC4-Motiv essentiell (Kalish *et al.*, 1995). Die Autoren erzeugten in *P. pastoris* Punktmutationen in zwei Cysteinen und dem konservierten Histidin der Zinkfinger-Domäne und ersetzten diese durch zwei Serine und ein Tryptophan, welche für die zinkbindende Funktion von *PEX10* keine Rolle spielen. Die Unfähigkeit der Domäne Zn-Ionen zu koordinieren, zeigte sich physikalisch über die Methoden der Atom-Absorptions-Spektrometrie und biologisch über das Nullwachstum der Mutanten auf Methanol als Kohlenstoffquelle. In Patientenzelllinien von *H. sapiens* konnte die Bedeutung der C3HC4-Domäne für die unterschiedliche Ausprägung der klinischen Krankheitsbilder sehr eindrücklich gezeigt werden (Warren *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2000). Während Patienten mit *frameshift*-, *nonsense*- oder *splice site*- Mutationen am schwerwiegenden Zellweger-Syndrom erkrankten, führte die Aminosäure-Substitution H290Q innerhalb des Zinkfinger-Motivs nur zur teilweisen Dysfunktionalität des Peroxins und dem milder ausgeprägten Krankheitsbild der Neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD). Das in dieser Untersuchung eingesetzte dZn-Konstrukt unterschied sich jedoch in vier Liganden des Zinkfingermotivs und führte somit einen vollständigen Funktionsausfall der Interaktionsfähigkeit von *PEX10* herbei. Als Konsequenz liess sich der *pex10*-k.o-Defekt der T-Linie mit der cDNA von *dZnpex10* nicht kompensieren.

### **33 Die Charakterisierung einer überexprimierten dZn-Linie mit dysfunktionalem RING-Finger-Motiv**

Der Name „RING-Finger“ leitet sich aus seiner Struktur ab, in der eine kleine Gruppe konservierter Aminosäuren ein Zinkion binden und dadurch eine relativ unabhängige Domäne innerhalb des Proteins bilden. Vier Paare metallbindender Aminosäuren umkapseln zwei Zinkionen in einer bestimmten tetraedrischen Anordnung (Barlow *et al.*, 1994) und definieren eine Familie von Proteinen, die in Pflanzen, Pilzen, Vertebraten und Viren vorkommt (Freemont, 1993). Entstanden ist der Begriff 1991, als US-Forscher ein Gen mit einem interessanten Sequenzmotiv fanden, dass sie als *really interesting new gene*, kurz RING bezeichnet hatten. Das Motiv zeigte sich als weit verbreitet und ist in über 400 Pro-

teinen in Form der RING-Domäne enthalten. Aufgrund ihrer Protein-Eigenschaft, ein zentrales Zinkion in einer spezifischen (fingerartigen) Topologie koordinieren zu können, entstand das Zink-Finger-Motiv und als Ableitung die Bezeichnung als „RING-Finger“ (Neumann, 2002). Die RING-Domäne ist in Zellen sowohl für die Aufrechterhaltung der Struktur als auch der zellulären Funktion eines solchen Proteins notwendig. Durch die Selbstanordnung der RING-Domänen, in die sich die Partnerproteine einpassen, entstehen Verbindungskörper, die strukturell als polyvalente Gerüststrukturen wirken. Die Aktivitätseigenschaften von Partnerproteinen werden dadurch thermodynamisch und katalytisch über die Verknüpfung raumzeitlicher enzymatischer Reaktionen vervielfältigt, was die Effizienz und Interaktionsmöglichkeiten der Verbindungen stark erhöht (Kentsis *et al.*, 2002). Welche Auswirkungen *pex10*-Mutationen auf die Peroxisomen-Biogenese verschiedener Organismen haben, wurde in Kapitel 3 der Einleitung ausführlich beschrieben und konnte in vorliegender Untersuchung durch den Nachweis belegt werden, dass *dZnpex10* nicht in der Lage war, den letalen Phänotyp der Transposonlinie durch Komplementation zu beheben.

In *P. pastoris* und *H. sapiens* führt die Ausschaltung des *PEX10*-Gens zwar zu sichtbaren peroxisomalen Membranstrukturen (*ghost sheets*), die jedoch keine Importkompetenz mehr für Matrixproteine aufweisen (Kalish *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1999b). In Zellstudien Chinesischer Hamsterovariolen (CHO) sprechen die Resultate eines defekten *PEX10*-Gens ebenfalls für eine Funktion von Pex10p beim PTS1-vermittelten Matrix-Proteinimport, zusammen mit Pex2p und Pex12p (Okumoto *et al.*, 2000). In *H. polymorpha* sind hingegen in *pex10*-defizienten Zellen keine leeren Membranvesikel sichtbar und *HpPex10p* ist in Wildtyp-Stämmen hauptsächlich in kleineren jungen Peroxisomen lokalisierbar (Tan *et al.*, 1995; van der Klei *et al.*, 1998). Dies deutet in *Hansenula* auf eine frühe Rolle des Peroxins bei der Organellen-Biogenese hin und entspricht somit eher den Befunden von *AthPex10p* in letalen Embryonen der Transposon-Linie als den Ergebnisse in *P. pastoris* und Säugern. Um die Frage zu klären, ob im Laufe der Evolution das Peroxin-Homolog für *PEX10* in Pflanzen unterschiedliche Aufgaben als in Hefen und Säugern übernommen hat oder ob es eine pleiotrope Funktion besitzt, wurde die cDNA von *Athpex10* mit einem dysfunktionalen RING-Finger-Motiv in *Arabidopsis*-Wildtyp überexprimiert. Im RING-Finger-Peroxin Pex12p von CHO-Zellen ist das Zinkfinger-Motiv zwar für die Funktion des Proteins notwendig, aber nicht für das Targeting in die Peroxisomen (Okumoto *et al.*, 2000).

Anhand physiologischer Charakterisationsstudien der Zinkfinger-disruption-Linie (*dZn*-Linie) konnte die Korrelation zwischen der Funktion von *AthPex10p* und ihrer photorespiratorischen Leistungsfähigkeit hergestellt werden und somit der unmittelbare Nachweis von *AthPex10p* als ein definitionsgemässes Peroxin (Distel *et al.*, 1996). Die Synthese aus

den Erkenntnissen der Transposon-Linie mit denen der dZn-Linien erlaubt den Einblick in die charakteristischen Eigenarten von *AthPEX10* bei der Peroxisomen-Biogenese sowie der Funktion dieser Organellen in Pflanzen.

### 33.1 Die makroskopische Phänotypbestimmung auffälliger dZn-Linien

Das dysfunktionale dZnpex10 wurde in *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen so überexprimiert, dass intaktes und dysfunktionelles *AthPex10p* um die Rezeptorbindungsstellen des Peroxins konkurrierten. Die Auswirkungen des dysfunktionalen Zink-Fingers können einerseits die Glyoxysomen bei der Keimung und andererseits die Blattperoxisomen beim Photosyntheseprozess betreffen. Während sich der Einfluss auf die Blattperoxisomen klar manifestierte, waren diese Einflüsse auf die Glyoxysomen jedoch nicht augenscheinlich, was im Folgenden diskutiert wird.

Der makroskopische Phänotyp dreier unabhängiger Zindefinger-disruption (dZn)-Linien war unter Starklichtbedingungen und atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen gegenüber den Kontroll-Linien (Wildtyp und Vektorkontrolle) deutlich auffällig (vgl. Kapitel 27.3 und Kapitel 27.5.3). Besonders die dZn-Linie 1/3/5/3 zeichnete sich durch einen extrem zwerghaften Habitus mit ausgebleicht wirkenden Blättern und einer verzögerten Entwicklung aus. Metrische Daten zur Wurzellängenentwicklung von Keimlingen zeigten deutliche Rückstände verschiedener dZn-Linien, die sich durch Umgehung der Photorespiration vollständig kompensieren ließen. Die verminderte Effizienz der Photosyntheseleistung wirkte sich auf die Fähigkeit zur Bildung von Reservestoffen aus, worauf insgesamt kleinere Samen der dZn-Linie 1/3/5/3 hinweisen, die einen besonders zwerghaften Phänotyp ausbildete. Bei der Dunkelkeimung zeigte diese Linie gegenüber den Kontrollen ein verringertes Wurzelwachstum, während zwei weitere dZn-Linien mit einem milder ausgeprägten Phänotyp adulter Pflanzen nur geringfügig oder kein schlechteres Wurzellängenwachstum während der Keimung aufwiesen als die Kontroll-Linien. Sobald sich die phänotypische dZn-Linie 1/3/5/3 unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen normal entwickeln kann, reifen Samen in ihr heran, die sich bei der Dunkelkeimung in ihrer Wachstumsleistung nicht mehr von den Kontrollen unterscheiden lassen. Ob sich daraus auch unmittelbar Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit von Glyoxysomen schliessen lassen, muss dennoch mit großer Vorsicht betrachtet werden. Zwar scheint auf den ersten Blick die Umwandlung von Reservelipide in Zucker nicht inhibiert zu sein, doch wäre auch eine rasche Degradation dysfunktioneller Glyoxysomen denkbar oder alternativ eine ausreichende Leistungseffizienz funktionaler Organellen, die immer noch genügend Saccharose für den Keimungsprozess bereit stellen könnten.

Desweiteren muss sich ein gestörter oder suboptimaler Umwandlungsprozess von Speicherfetten nicht grundsätzlich negativ auswirken, solange es durch den Block nicht zur Akkumulation von toxischen Komponenten kommt. Der weitere Abbau von sich anreichernden Zwischenprodukten in dysfunktionalen Glyoxysomen könnte dann von ausreichend intakten Microbodies übernommen werden. Bei diesen Überlegungen darf allerdings nicht davon ausgegangen werden, dass es *a priori* zu dysfunktionalen Glyoxysomen neben völlig intakten Zellorganellen kommt. Vielmehr ist von einer stochastischen und daher gleichmässigen Verteilung der Expressionsprodukte von *PEX10* und *dZnpex10* in den Microbodies auszugehen. Bei einem engen „Proteinfenster“ ist dennoch eine Relation von *PEX10* zu *dZnpex10* vorstellbar, bei der ein Teil der Glyoxysomen seine Funktion noch erfüllen kann, während andere vorzeitig degradiert werden. Den gleichen Effekt hätte eine insgesamt niedrige Proteinkonzentration von *PEX10* mit nur wenigen Interaktionsbindungsstellen auf die Funktionalitätseigenschaften eines Organells. Der „Falscheinbau“ eines *dZnPex10p* würde sich unter solchen Bedingungen gravierender auswirken, als unter den nivellierenden Umständen einer hohen Anzahl von Bindungskomplexen.

Für eine Inhibition des Pflanzenwachstums infolge gestörter Photorespiration sprechen auch die Ergebnisse der Wurzellängenentwicklung von Keimlingen unter Dauerlichtbedingungen bei Normalatmosphäre. Unter diesen restriktiven Verhältnissen zeigt die *dZn*-Linie erst nach drei Tagen ein schwächeres Wurzelwachstum als die Kontrollen. Die Diskrepanz in der Längenzunahme erhöht sich mit zunehmender Zeit extrem und korreliert mit der Bedeutung der Zuckerbildung aus der Photosynthese bei gleichzeitiger Bedeutungslosigkeit der Speicherlipide für das pflanzliche Wachstum (Hayashi, 2000a). Die Kompensation aller makroskopisch sichtbaren Phänomene war unter Beibehaltung der Starklichtbedingungen durch eine Erhöhung des  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnisses möglich. Unter diesen permissiven Wachstumsbedingungen zeigten die verschiedenen *dZn*-Linien eine vollständige oder annähernd vollständige Kompensation ihres Phänotyps.

Der Stoffwechselweg der Photorespiration in Höheren Pflanzen umfasst drei Typen von Organellen: Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen (vgl. Kapitel 27.4). Die Transportprozesse greifen deshalb an vielen verschiedenen Schritten des Glykolatwegs ein. Welche Bedeutung eine Unterbrechung des Systems für die Pflanzenzelle hat, zeigten umfangreiche Untersuchungen von Somerville & Ogren schon vor mehr als 20 Jahren an unterschiedlichen Mutanten von *Arabidopsis*, die in einem bestimmten Enzym innerhalb des Prozesses der Photorespiration gestört waren. Infolge dessen akkumulierten sie toxische Verbindungen oder wiesen einen Mangel an essentiellen Substanzen auf (Somerville *et al.*, 1982). Dies betrifft zum Beispiel Mutanten mit einer Defizienz in der Phosphoglykolat-Phosphatase-Aktivität, einem in den Chloroplasten lokalisierten Enzym, das spezifisch Phosphoglykolat zu Glykolat hydrolisiert. Solche Mutanten waren bei einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt

von 1% nicht von Wildtyppflanzen zu unterscheiden. Sobald sie jedoch atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen ausgesetzt waren, zeigten sie einen chlorotischen Phänotyp und begannen abzusterben. Dieser Prozess war umkehrbar, wenn die Oxygenase-Tätigkeit von Ribulosebisdiphosphat durch Erhöhung des Kohlendioxid-Gehaltes unterbunden wurde und somit keine Photorespiration mehr stattfinden konnte (Somerville & Ogren, 1979). Ein weiteres Beispiel einer Mutante mit ähnlichem Phänotyp, der sich durch ein erhöhtes CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis kompensieren läßt, ist für die Aktivität der Glutamat-Synthase in den Chloroplasten beschrieben, deren Ausfall zum erhöhten Ammoniakgehalt in den Zellen und infolge dessen einer verringerten Lebensfähigkeit der Pflanzen führt (Somerville & Ogren, 1980a). Auch eine Mutante mit einem Defekt im chloroplastischen Dicarboxylat-Transport ist unter Umgehung der Photorespiration lebensfähig, verliert aber unter normalatmosphärischen Verhältnissen innerhalb von 3-4 Tagen ihre Vitalität (Somerville & Ogren, 1983).

Drei unabhängige Mutanten mit einem Totalausfall in der peroxisomalen Serin-Glyoxylat-Aminotransferase führten ebenso zur Einstellung des Pflanzenwachstums und Chlorose der Blätter durch einen Block im photorespiratorischen Stoffwechsel unmittelbar hinter der Synthese von Serin und unterstützen die Hypothese, dass der in die Photorespiration eintretende Kohlenstoff grösstenteils wieder in den Calvinzyklus zurückkehren können muss, um normale Photosyntheseraten aufrecht zu erhalten (Somerville & Ogren, 1980b).

Ein Defekt innerhalb eines mitochondrialen Enzyms der Photorespiration, der Serin-Transhydroxymethylase, führt zur Anhäufung von Glycin und einer dramatischen Abnahme von Serin in den Mitochondrien. Der biochemische Phänotyp war ähnlich den Mutanten mit einer Defizienz in der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase und ließ sich durch 1% CO<sub>2</sub> bei atmosphärischem O<sub>2</sub>-Gehalt umgehen (Somerville & Ogren, 1981).

Ein Defekt, der die Photorespiration nur indirekt betrifft, indem die Aktivität der Ribulose-1,5-Bisdiphosphat (RuBP)-Carboxylase zerstört ist, führt desgleichen zu einem kränkenden Phänotyp unter Normalatmosphäre, der unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Bedingungen kompensiert werden kann (Somerville *et al.*, 1982). Allerdings unterscheidet sich dieser Phänotyp von den oben beschriebenen Mutanten mit einem Defekt im photorespiratorischen Kohlenstoff- oder Stickstoff-Metabolismus insoweit, als dass deren Phänotyp durch die Erhöhung des Verhältnisses zwischen CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> kompensiert werden kann. Die Unterdrückung der Photorespiration ist somit sowohl durch die Zunahme des CO<sub>2</sub>-Gehaltes als auch durch die Verringerung der O<sub>2</sub>-Konzentration möglich. Zur Kompensation der RuBP-Carboxylase-Mutante ist jedoch die absolute Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration notwendig, da die Photosyntheserate ganz unabhängig vom O<sub>2</sub>-Gehalt verringert ist (Somerville *et al.*, 1982).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Phänotypen der dZn-Linien wären somit in ihrer Fähigkeit, sich durch Erhöhung des CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnisses phänotypisch retten zu lassen, den

verschiedenen Mutanten aus der Arbeitsgruppe von Somerville sehr ähnlich. Die Mutationen in einzelnen Enzymen an sehr unterschiedlichen Stellen der Photorespiration führten in der Folge zu chlorotischen Verhältnissen, der Einstellung des Wachstums und dem Absterben der Pflanze. Dieses Bild spiegelt sich auch in den verschiedenen dZn-Linien in unterschiedlich starker Weise wider, wofür ein Dosiseffekt des dysfunktional exprimierten Pex10p verantwortlich sein könnte. Durch die Anhäufung giftiger Zwischenprodukte, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder NH<sub>3</sub> kann es bei einem gestörten Prozess innerhalb der Photorespiration in den Peroxisomen zu Primärschäden kommen, die sich von den glyoxysomalen Abläufen der  $\beta$ -Oxidation unterscheiden würden. Alternativ oder zusätzlich ist auch eine indirekte Schädigung durch photooxidative Prozesse möglich, die zur Photoinhibition führen (siehe folgendes Kapitel).

Der Zusammenhang zwischen der gestörten Photorespiration und einer Überexpression von dZnpex10 im Wildtyp-Hintergrund wird durch die physiologischen Untersuchungen zur Chlorophyllfluoreszenz und der Konzentration an Blattpigmenten bestätigt und soll im Folgenden diskutiert werden.

### 33.2 Die physiologische Phänotypbestimmung einer ausgewählten dZn-Linie

Die Analyse von Veränderungen in der Chlorophyll-Fluoreszenzstrahlung durch pulsmodierte Anregung und ihre Detektion mit dem PAM-Instrument, hat sich als wirkungsvolles Werkzeug einer schnellen und nicht-invasiven Abschätzung photosynthetischer Elektronen-Transportraten in Blättern erwiesen (Demming-Adams *et al.*, 1996). Über die Untersuchung der Fluoreszenz des Chlorophyll *a* wird ein Einblick in die Funktion des gesamten photosynthetischen Systems ermöglicht und der Beziehung zwischen Licht- und Dunkelreaktion bei der Photosynthese (Jones, 1992; Seiten 179-185).

Die Photosynthese-Parameter der dZn-Linie 1/3/5/3 waren bei 5-fach höheren CO<sub>2</sub>-Konzentrationen als jenen der Normalatmosphäre von den Werten der beiden Kontrollen nicht zu unterscheiden. Zieht man dZn-Keimlinge jedoch unter restriktiven Gewächshaus-Bedingungen auf, so geht der makroskopisch sichtbare Phänotyp, zwergenhaftes Wachstum und chlorotische Blätter, mit einem herabgesetzten Ertrag der Photosyntheseleistung einher (vgl. Kapitel 27.5.1). Einen ähnlichen Phänotyp beschreiben verschiedenen Autoren in der Arbeitsgruppe von Nishimura mit verschiedenen *ped*-Mutanten (Hayashi *et al.*, 1998a; Hayashi *et al.*, 2000), wobei *ped* die Abkürzung für *peroxisome defective* darstellt. Eine *ped1*-Mutante mit einem glyoxysomalen Thiolase-Defekt ist nach der Keimung nicht in der Lage, grüne Keim- und Folgeblätter auszubilden. Der Mangel an Aktivität der  $\beta$ -Oxidation von Speicherlipiden verhindert die Produktion von Zucker und führt ohne exo-

gene Zuckerunterstützung zum Tod des Keimlings. Die Zwischenmetabolite des Fettabbaus akkumulierten innerhalb der Glyoxysomen und führten morphologisch zu vergrößerten vesikelähnlichen Strukturen der Organellen.

Eine *ped2*-Mutante mit einem Defekt im putativen Rezeptor-Andock-Apparat *AthPEX14* zeigte sich zwar fähig, Keimblätter und geringe Mengen an Chlorophyll auszubilden. Allerdings war die Mutante nicht in der Lage, Folgeblätter ohne die Unterstützung zuckerhaltigen Mediums aufzubauen. Verursacht wurde dieser Phänotyp durch eine verminderte Importeffizienz der Thiolase-Vorläuferform, die sich im Cytosol anreicherte und zu einer nur schwachen Aktivität der  $\beta$ -Oxidation geführt hat. Erst in einem späten Stadium des postgerminativen Wachstums konnte die reife Form des glyoxysomalen Enzyms innerhalb der Organellen nachgewiesen werden (Hayashi *et al.*, 1998a). Die *ped2*-Mutante war durch Zuckergaben bei der Keimung überlebensfähig und benötigte diese Zuckerunterstützung mit der Ausbildung von photosynthetisch aktiven Blattmaterial nicht mehr. Dennoch waren *pex14*-Pflanzen unter Normalbedingungen der Luft phänotypisch zwergenhaft und trugen nur ausgebleicht wirkende Blätter. Unter Hoch-CO<sub>2</sub>-Verhältnissen mit unterdrückter Photorespiration wuchsen die *ped2*-Mutante, eine weitere Mutante mit einem Defekt in der mitochondrialen Serin-Transhydroxymethylase (*stm*) als Negativkontrolle, sowie die Wildtypform sehr einheitlich und unauffällig. Nach dem Transfer der Pflanzen in Umgebungsluft zeigten die *ped2*- als auch die *stm*-Mutanten einen verringerten photosynthetischen Ertrag und chlorotische Blätter geringer Grösse, während die Wildtyppflanzen ein normales Wachstum entwickeln konnten (Hayashi *et al.* 2000).

Dieser photorespiratorisch erkennbare Phänotyp in *pex14*-Mutanten ist den überexprimierten *pex10*-Mutanten der dZn-Linie 1/3/5/3 sehr ähnlich. Durch die Oxygenase Funktion der RuBisCO, die unter atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen mit 21% Luftsauerstoff unweigerlich stattfindet, wird Phosphoglykolat als Nebenprodukt der Oxygenase-Reaktion nicht mehr von den photorespiratorischen Enzymen metabolisiert und kann folglich auch nicht mehr dem Calvin-Zyklus zugeführt werden. Unter diesen Bedingungen wären die *pex10::wt*-Linien, ebenso wie die *pex14*-Mutante, nicht mehr in der Lage, die ausreichende Aktivität des Calvin-Zyklus sicherzustellen. Unter hohen Lichtbedingungen, wie sie im Gewächshaus bei Sommer und restriktiver Bedingungen in den Phytokammern auftreten, verursacht die gestörte Photorespiration eine Photoinhibition aufgrund einer überschüssigen Bereitstellung von Energie bei der Lichtreaktion der Photosynthese. Die Photosysteme sind durch die hohen Quantenflussdichten voll energetisiert, können diese Energie wegen des Substratmangels jedoch nicht zur Reduktion von CO<sub>2</sub> verwenden. Bei Starklichtverhältnissen wird deshalb überschüssige Anregungsenergie in photochemische Arbeit investiert, weil ihre Ableitung in Form von Wärme und Fluoreszenzstrahlung nur in einem beschränkten Umfang möglich ist (vgl. Kapitel 20.5). Dabei kann innerhalb des Prozesses

die Erzeugung von reaktionsfreudigen Sauerstoffradikalen den Photosynthese-Apparat zerstören.

Für die Einwirkung der Photoinhibition auf die dZn-Linien spricht der Einfluss der Lichtintensitäten auf die Ausbildung des Phänotyps. Wachsen die dZn-Linien nur bei geringen Lichtmengen heran, so fällt die Ausprägung des zwerghaften Wuchses mit chlorotischen Blättern wesentlich geringer aus als bei hohen Lichtintensitäten, bei denen die Photorespiration in gesunden C3-Pflanzen als ein Verteidigungsmechanismus gegen gefährliche Lichtmengen fungieren kann (Kozaki & Takeba, 1996). Die Autoren bewiesen durch Sense und Antisense-Expression variabler Mengen an Glutamin-Synthetase in transgenen Tabakpflanzen den direkten Zusammenhang zwischen der Toleranz hoher Lichtintensitäten und der Aktivität photorespiratorischer Prozesse. Glutamin-Synthetase stellt ein Schlüsselenzym bei der Photorespiration innerhalb der Chloroplasten dar. Intakte Peroxisomen in Pflanzen sind somit eine Voraussetzung für den Schutz vor photooxidativen Schäden.

Die Entwicklung von chlorophyllarmen dZn-Linien mit zwerghaftem Wuchs unter Starklichtbedingungen bei atmosphärischem  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Luft könnten somit ursächlich durch direkte Schädigung ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ) infolge einer dysfunktionalen Photorespiration mit ineffizientem Matrixproteinimport von Katalase oder Serin/Glyoxylat-Aminotransferase evoziert werden und/oder indirekt durch Photoinhibition und der Bildung von Sauerstoffradikalen. Alternativ ist allerdings auch ein adaptiver Prozess der dZn-Pflanzen über einen Rückkopplungsmechanismus denkbar, der unter photorespiratorischen Bedingungen die quantitative Reduzierung des Photosyntheseapparates einleitet, um die Produktion toxischer Komponenten nicht über ein zellkritisches Maß ansteigen zu lassen. Ob hierbei giftige Nebenprodukte wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder die Anreicherung eines Metaboliten wie z.B. Glykolat beim Übergang in die Peroxisomen eine Rolle spielen könnten, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

### 33.3 Die ultrastrukturelle Phänotypbestimmung einer auffälligen dZn-Linie

Um die gegenüber der letalen Transposonlinie milden und physiologisch erfassbaren Phänotypen der dZn-Linien auf elektronenmikroskopischer Ebene zu analysieren, wurden die für die *pex10*-cDNA homozygoten Embryonen der dZn-Linie 1/3/5/3 ultrastrukturell untersucht. Während in letalen Embryonen der Transposonlinie abnorme Zellstrukturen bereits im Globular- und Herzstadium auftreten (vgl. Kapitel 26.5.2), zeigten Wildtyp-Embryonen mit überexprimierter dZn-cDNA im *walking-stick*-Stadium eine völlig unauffällige Zellultrastruktur. Speicherproteine und Lipidkörper füllen dicht gepackt das gesamte Cytosol aus. Die morphologischen Strukturen der Lipidkörper wirken in Wildtypembryonen dieses Stadiums ähnlich komprimiert wie in der dZn-Linie, was auf eine vergleichba-

re Dichte dieser Speicherorganellen hinweist. Die insgesamt geringe Anzahl von Peroxisomen in Wildtypzellen dieses Entwicklungsstadiums erlaubt keine Aussage darüber, ob sich weniger oder abnormale Organellen in der dZn-Linie ausgebildet haben. Aufgrund der Resultate aus der T-Linie, in der *AthPEX10* eine essentielle Komponente bei der Biogenese von Protein- und Lipidkörpern darstellt, scheint deren Entwicklung in der dZn-Linie nicht beeinträchtigt zu sein, wie die EM-Aufnahmen zeigen. Dieser Befund war aufgrund der metrischen Wachstumsuntersuchungen von dunkel gekeimten dZn-Linien nicht überraschend. Anzahl und Umfang der Membranen sind offensichtlich ausreichend, um eine unauffällige Entwicklung des Embryos und dessen Versorgung mit Zucker und Aminosäuren bei der Keimung zu gewährleisten. Aufgrund der zweidimensionalen Auflösung der Bilder kann dennoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Quantität der Hüllmembranen durch die Überexpression des dysfunktionalen *pex10*-Gens betroffen ist. In diesem Fall müssten entweder verbliebene Speicherkörper größere Volumina ausbilden, um die Reserveinhaltsstoffe aufzunehmen oder es käme zur Anreicherung von Vorstufen der Reservestoffe innerhalb des ER. Diese Anomalitäten wären aufgrund des kompakten Zellinhalts jedoch kaum zu erkennen, zumal wenn sich Abweichungen nur im Prozentbereich bewegen. Ausserdem lassen die Erkenntnisse der T-Linie auf eine sehr frühe wichtige Rolle von *AthPex10p* bei der Membranbiogenese schliessen. Damit ist auch ein frühzeitiger Abbau degenerierter Membranen vorstellbar, so dass die stochastische Konkurrenz des endogenen *PEX10* mit dysfunktionalem *pex10* um Rezeptorbindungsstellen zur Ausbildung einer ausreichenden Zahl intakter Organellen führt. Sepulveda-Saavedra *et al.* (1992) beschreiben die Degradation von Peroxisomen in zwei verschiedenen Hefen nach der Membranschädigung mit dem Toxin T-514. In eukaryotischen Zellen gibt es zwei Systeme zur regulierten Degradation von Proteinen. Diese umfassen sowohl die Entfernung abnormaler Proteine infolge Mutationen als auch den Abbau regulärer Proteine durch Lysosomen und Proteasomen. Diese Degradationsprozesse sind für diverse zelluläre Mechanismen sehr wichtig und der Ausfall eines Abbau-Systems führt zu schwerwiegenden Krankheiten und Alterungsprozessen (Übersichtartikel Bellu & Kiel, 2003). So stellt sich die paradoxe Überlegung, dass gerade durch die essentielle Bedeutung von *AthPEX10* bei der frühen Embryogenese infolge vorzeitiger Degradationen dysfunktionaler Proteinkomplexe, keine sichtbaren Schäden zu Tage treten müssen. Die zweite Aufgabe von *AthPex10p* als Komponente des Translokations-Apparates muss hingegen bei einem Funktionsausfall des Peroxins nicht unmittelbar letale Folgen haben. Dies folgt, weil entweder das endogen exprimierte *PEX10* ausreichend funktionell ist und die Anzahl „intakter“ Translokations-Apparate ausreichend für das Überleben der Zellen ist, oder weil sich dieser Teil der pleiotropen Funktion von *AthPex10p* *a priori* nicht letal auswirkt, sondern nur zu einem kränkenden Phänotyp mit schwachem Wachstum führen würde. Hierfür spricht, dass die *ped2*-Mutante mit

einem Defekt in *AthPEX14* ebenfalls lebensfähig ist, sobald sie den Prozess der postgerminativen Keimung durch Zuckerbeigabe überstanden hat. Der Komplex der Translokationsmaschinerie von Matrixproteinen in die Peroxisomen würde durch diesen Apparat nur sehr effizient gestaltet, aber er wäre nicht grundsätzlich unmöglich, falls eine Peroxin-Komponente ausfällt. Dafür spricht der zeitlich verzögerte Import von Thiolase in die Peroxisomen der *ped2*-Mutante und die anfänglich cytosolische Anreicherung ihrer Vorläuferform (Hayashi *et al.*, 1998a; Hayashi *et al.*, 2000).

Ein weiteres Indiz, dass Pex14p die Effizienz des Import-Apparates nur erhöht, kommt von Untersuchungen an *H. polymorpha* (Salomons *et al.*, 2000). In einer *Hppex14*-Nullmutante konnte der PTS1-Importdefekt durch Überexpression des PTS1-Rezeptors Pex5p kompensiert werden. Unter solchen Bedingungen akkumulierte ein Großteil von Pex5p an der Aussenseite der peroxisomalen Membran. Dieser Effekt konnte in Wildtypzellen trotz einer Überexpression von Pex5p nicht beobachtet werden. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass nur ein geringer Teil der PTS1-Matrixproteine importiert werden konnte, die Restauration des Imports war für die meisten PTS1-Proteine nicht möglich. Aus diesem Import-Phänomen schlussfolgerten Kiel & Veenhuis (2000), dass nur einige der PTS1-Proteine komplett auf Pex14p angewiesen sind, während andere das Docking-Protein nicht benötigen, solange Pex5p ausreichend vorhanden ist.

Die Übertragung von Befunden eines Peroxins im Docking-Mechanismus (Pex14p) auf diejenigen des Translokations-Apparates (Pex10p) sind aber nur mit Vorsicht zu führen, da der Vorgang einer Translokation von Proteinkomplexen durch die geschlossene Membran eines Organells sicherlich andere Anforderungen an die Interaktionseigenschaften der beteiligten Komponenten stellen dürfte, als dies durch die Affinität eines Bindungsproteins an den Shuttle-Rezeptor erforderlich ist.

Ob eine *Athpex10-k.o.*-Mutante in Bezug auf die Organisation des Embryos letal ist, aber in Bezug auf photorespiratorische Effekte dennoch eingeschränkt lebensfähig wäre, könnte das Pflanzenkonstrukt einer *pex10*-Nullmutante mit einem induzierbaren Promotor, gekoppelt an den Volllängenklon von *PEX10* klären. Durch Expression des *PEX10*-Gens während der kritischen Embryogenese könnten Pflanzen heranreifen, deren phänotypisches Verhalten nach Ausschalten des Promotors und einem abnehmendem Expressionsgrad von Pex10p untersucht werden könnte.

### 34 Die Synthese aus Resultaten mit *AthPEX10* in Hefe, Transposon- und dZn-Linie und die Erstellung eines funktionalen Modells für *AthPEX10p*

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Dissertation kurz rekapituliert und in einen Gesamtzusammenhang gestellt. Ihre Bewertung dient der Entwicklung eines hypothetischen Modells der putativen Funktion von *PEX10* in *Arabidopsis thaliana*.

- Der in dieser Untersuchung generierte, gegen *AthPex10p6xHis* gerichtete Antikörper detektiert in nicht transformierten *Arabidopsis*-Suspensionszellen das endogene Pex10p-Signal innerhalb des ER und präperoxisomaler Vesikel, aber nicht in reifen Peroxisomen (mündliche Mitteilung Prof. Dr. D. Trelease, 2002).

→ Die Erkenntnisse unterstützten eine Hypothese zur Funktion von *AthPex10p* als ein frühes Peroxin mit der Involvierung peroxisomaler Subkompartimente des ER.

Allerdings dient der Befund alleine nicht als Beweis, dass es sich bei *AthPex10p* definitionsgemäss überhaupt um ein Peroxin handelt.

- In *pex10*-defizienten Hefen von *H. polymorpha* führt die Expression des *Arabidopsis* Vollängen-Gens sowie dreier Hybridkonstrukte mit partiell N-terminalen AS-Sequenzen aus der Hefe nicht zur Ausbildung von Peroxisomen. Die biochemische Lokalisation von *AthPEX10::wtHp* führt zu keiner peroxisomalen Detektion des pflanzlichen Peroxins. Stattdessen ist eine Kolokalisation mit leichten membranösen Strukturen, wie z.B. des Endoplasmatischen Retikulums nicht auszuschliessen.

Morphologische Peroxisomen bilden sich hingegen in einem Hybridkonstrukt aus, bei dem die C-terminale *Arabidopsis*-Sequenz durch *Hansenula-PEX10* ersetzt wurde.

→ Es ist nicht auszuschliessen, dass *Arabidopsis*-Pex10p in *Hansenula* in ER-Kompartimente transloziert werden könnte. Die Einführung des C-terminalen Hefe-Drittels, verbunden mit der Deletion eines ER-Retrieval-Signal-Motivs (ER-RSM) von *AthPex10p* (mündliche Mitteilung Dr. R. Mullen, 2003), führte zur Ausbildung morphologischer Peroxisomen in *Hppex10*-defizienten *Hansenula*-Zellen und könnte dadurch auf die Funktion von *AthPex10p* als ein Peroxin hinweisen. Gleichzeitig würde die Existenz des ER-RSM in *Arabidopsis* und dessen Absenz in *Hansenula* die besonderen Eigenschaften des pflanzlichen Pex10-Proteins hervorheben.

Deutlich einschränkend ist hierbei zu erwähnen, dass eine Kolokalisation von *AthPex10p* mit Strukturen des ER nicht zwingend ist. *AthPex10p* könnte in *Hansenula* theoretisch auch mit anderen leichten Membran-Strukturen wie Mitochondrien assoziiert sein oder sich im Cytoplasma lokalisieren. Desweiteren ist das Targeting eines ausschliesslich C-terminalen Abschnitts von *Hansenula*-Pex10p in peroxisomale Vesikel

und damit die morphologische Ausbildung von Peroxisomen, ganz ohne eine Komponente des *Arabidopsis*-Gens, nicht auszuschliessen. Ob die alleinige Deletion des ER-RSM aus fünf AS in *AthPex10p* ebenfalls die Teilkomplementation in *pex10*-defizienten Hefezellen ermöglichen würde, wäre einerseits für den definitiven Nachweis von *AthPex10p* als pflanzliches Peroxin und andererseits für die Verifizierung der Peptidsequenz YHSDF als putatives ER-RSM in *Arabidopsis* sehr aufschlussreich.

- Die Ausschaltung des endogenen *PEX10*-Gens in einer Transposon-Linie von *Arabidopsis thaliana* führt in homozygoten Samen zu einer abnormalen Entwicklung des Embryos. Die ER-abhängige Biogenese von Lipid- und Proteinkörpern ist schwerwiegend gestört, Peroxisomen werden nicht ausgebildet.

→ Die Absenz multipler Organellen läßt auf eine pleiotrope Funktion von *AthPex10p* zu einem frühen Zeitpunkt der Membranbiogenese mit stringenter Involvierung des ER schliessen. Diese frühe Aufgabe von *AthPex10p* bei der Membranformation stünde ontogenetisch vor einer Funktion innerhalb des Translokations-Apparates, wie er in Hefen und Säugern postuliert wird (Übersichtartikel Purdue & Lazarow, 2001). Desweiteren ist auch eine Rolle von *AthPex10p* in Form einer kontinuierlichen Entwicklung als Helferkomponente früher Protein-Insertionen in die Membran zu deren Biogenese denkbar und schliesslich der funktionelle Übergang von *AthPex10p* in den Translokations-Apparat. Die vermutete Existenz eines ER-*retrieval*-Signalmotivs könnte darauf hinweisen, dass zur Aufrechterhaltung der Translokations-Maschinerie quantitativ nur wenig Pex10p mit veränderten Interaktionseigenschaften notwendig ist. Nach der Ausbildung einer funktionellen Peroxisomen-Membran könnte somit ein Großteil von Pex10p ins ER zurück transportiert werden, um dort erneut seine Aufgabe bei der Membranbiogenese wahrzunehmen. Die Eigenschaft von *AthPex10p*, von post-ER-Kompartimenten ins ER zurück transportiert zu werden, könnte auch eine Erklärung für bislang erfolglose Detektionen von *AthPex10p* in reifen Peroxisomen liefern. Dessen relativ hohe Konzentration in präperoxisomalen Vesikeln und ER-Kompartimenten würde die vergleichsweise und vielleicht absolut niedrige Konzentration von *AthPex10p* innerhalb der Translokations-Maschinerie, verbunden mit der Schwierigkeit diese Funktion im Trans-Membranprozess auch immunologisch nachweisen zu können, erklären.

Gegen obige Überlegungen spricht jedoch der fehlende Beweis für eine direkte Involvierung von *AthPex10p* bei der Peroxisomenbiogenese. Die Absenz dieser Organellen in letalen Transposonembryonen liesse sich theoretisch auch durch Sekundäreffekte erklären. Ein Einwand gegen solche Sekundäreffekte ist allerdings das ultrastrukturelle Muster letaler Embryonen. Zum Zeitpunkt des Todes ist ihre zelluläre Ausdifferenzierung ein Mosaik entwickelter und retardierter Zellkomponenten. Da nicht alle Organel-

len in ihrer Entwicklung gehemmt werden, scheint *AthPex10p* eine unmittelbare Bedeutung nur für Lipid-, Proteinkörper und Peroxisomen zu besitzen. Mitochondrien scheinen hingegen normal ausgestaltet zu sein, was gegen eine Beteiligung von *AthPex10p* innerhalb deren Entwicklung spricht.

- Die Überexpression eines dysfunktionalen *PEX10*-Gens in *Arabidopsis*-Wildtyp führte zur Generierung chlorotischer und phänotypisch zwergenhafter Pflanzenlinien mit verringerten photosynthetischen Leistungen unter atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Bedingungen. Die Kompensation der phänotypischen Auffälligkeiten war durch die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration mit einhergehender Unterdrückung der Photorespiration möglich.

→ Die Korrelation zwischen der Ausbildung bzw. Suppression eines phänotypischen Erscheinungsbildes und unterschiedlicher Konzentrationen an CO<sub>2</sub> (bei konstantem Sauerstoffgehalt) der Luft, ist ausschliesslich durch kausal photorespiratorische Effekte erklärbar. Der Prozess der Photorespiration umfasst die Integrität dreier Organellen (Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien), einschliesslich der daran beteiligten Enzyme. Aus den Erkenntnissen der letalen Transposon-Linie ist eine Beeinträchtigung von Chloroplasten und Mitochondrien nicht erkennbar. Die Pathogenität letaler Zellen tritt bereits zu einem Zeitpunkt auf, indem sich Chloroplasten noch gar nicht ausdifferenziert haben, während Mitochondrien ultrastrukturell auch noch in letalen Embryonen sichtbar sind. Desweiteren ergibt sich durch theoretische Überlegungen zur Funktion von Chloroplasten und Mitochondrien, dass eine gestörte Biogenese dieser Organellen, ganz unabhängig von photorespiratorischen Effekten, schwerwiegende Auswirkungen auf den Energiehaushalt einer Zelle mit sich brächte.

Somit bleibt für die alternative Erklärung phänotypischer dZn-Linien bei Annahme des schlechtesten Falles, die zufällige Insertion des Plasmids in eines von acht Genen, das für ein photorespiratorisches Enzym codiert. Zusätzlich muss die Insertion in eines von 15 möglichen *Arabidopsis*-Peroxinen bedacht werden, abzüglich *PEX2* (Hu *et al.*, 2002), *PEX5* (Wimmer *et al.*, 1998), *PEX7* (Nito *et al.*, 2002), *PEX10* (vgl. Kapitel 26 & Schumann *et al.*, 2003), *PEX14* (Hayashi *et al.*, 2000) und *PEX16* (Lin *et al.*, 1999), deren Null-Mutanten zu einem letalen Phänotyp in Pflanzen führen würden. Bei annähernd 26.000 Genen in *Arabidopsis thaliana* (MGRP, 2000) erscheint die Wahrscheinlichkeit, in drei unabhängig erzeugten dZn-Linien jeweils eines von 16 in Frage kommenden Genen mit einer Involvierung innerhalb der Photorespiration ausgeschaltet zu haben, mit  $4 \cdot 10^{-9}$  sehr unwahrscheinlich zu sein. Damit ist die Korrelation des photorespiratorischen Phänotypus in dZn-Linien plausibel durch die Überexpression des dysfunktionalen *dZnpex10*-Gens zu erklären und eine Funktion von *AthPEX10* in der Translokationsmaschinerie unterhalb der putativen Docking-Proteine Pex13p und

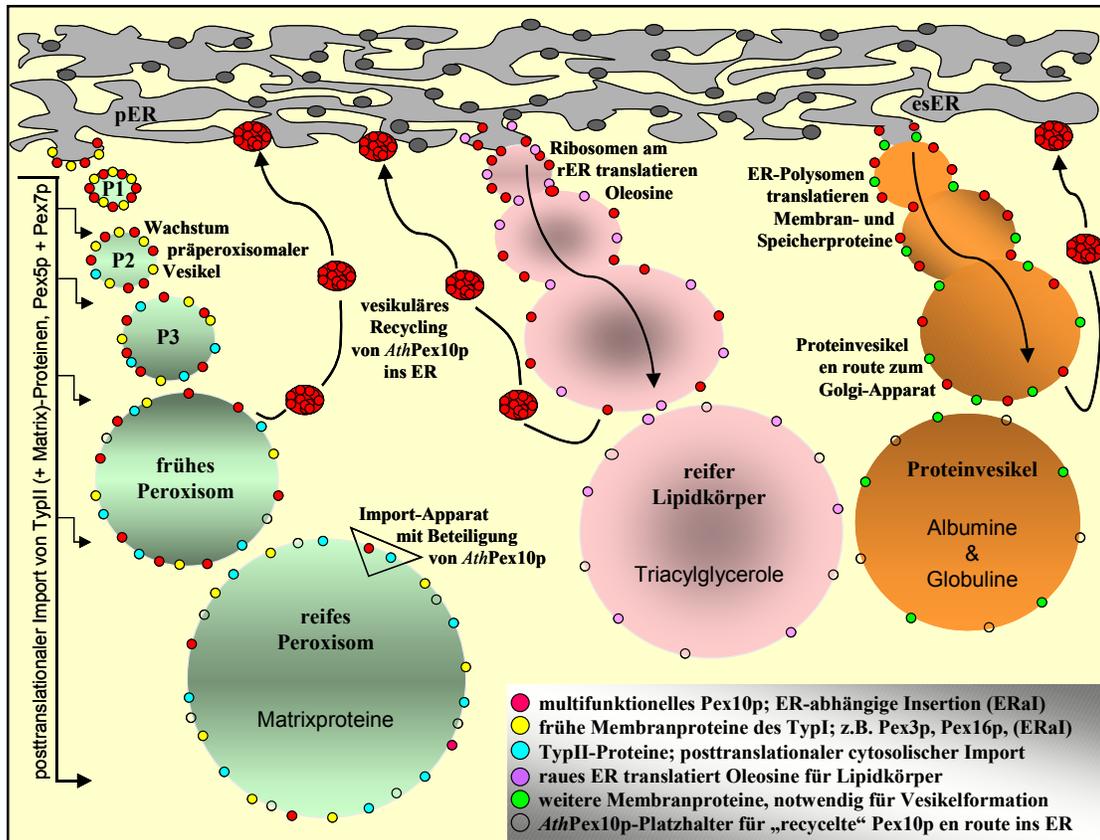
Pex14p wahrscheinlich, - so wie er aus Hefen und Säugern bekannt ist (Übersichtartikel Purdue & Lazarow, 2001) und für Pex14p von Hayashi *et al.* (2000) auch an *Arabidopsis* gezeigt werden konnte.

Ein weiterer indirekter, aber sehr bemerkenswerter Beweis für die Funktion von *AthPEX10* als ein Peroxin stammt von Untersuchungen am Peroxisomen-Proliferator *AthPEX1* (Lopez-Huertas *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe um Dr. Alison Baker untersuchte die stressinduzierte Peroxisomen-Biogenese anhand des Signalmoleküls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei oxidativem Stress reagieren die Zellen mit einer Proliferation von Peroxisomen und der Induktion peroxisomaler Gene. In Northern Blots konnte gezeigt werden, dass *AthPEX1* bereits nach 10 min etwa 10-fach stärker induziert wird, nachdem die Blätter mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Berührung kamen. Dasselbe Ergebnis bezüglich *AthPEX1* ergab sich bei der Durchführung einer semiquantitativen RT-PCR mit genspezifischen Primern gegen weitere *PEX*-Gene wie *AthPEX5*, *AthPEX14* und *AthPEX10*.

Somit demonstrierten Lopez-Huertas *et al.* (2000) nicht nur erstmalig die Biogenese von Peroxisomen als direkte Antwort auf das zelluläre Stresssignal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sondern auch indirekt die Involvierung von *AthPex10p* als eines von mehreren Peroxinen in Blatt-Peroxisomen ausgewachsener Pflanzen. Ihre Ergebnisse entsprechen vollständig den Erkenntnissen aus verschiedenen dZn-Linien: *AthPEX10* ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine Komponente bei der Peroxisomen-Biogenese, also definitionsgemäss ein Peroxin. Ob es analog zu Hefen und Säugern als Bestandteil des Translokations-Apparates (zusammen mit *PEX12* und *PEX2*) für die Shuttle-Rezeptoren *PEX5* und *PEX7*, unterhalb des Docking-Mechanismus aus *PEX13* und *PEX14* und oberhalb des Rezeptorrecycling-Prozesses aus *PEX1* und *PEX6* eingreift, bleibt zukünftigen *in situ*-Lokalisationsstudien überlassen.

Die zwei folgenden Abbildungen D1 und D2 spiegeln den Versuch wider, die Erkenntnisse aus den Untersuchungen einer Transposon-Linie (*PEX10*-Nullmutante), dreier verschiedener dZn-Linien mit überexprimierten dysfunktionalem Zinkfingermotiv in einem *Arabidopsis*-Wildtyp-Hintergrund, von Komplementations- und biochemischen Lokalisationsuntersuchungen an Hefen, sowie die Erfahrungen mit einem Antikörper gegen Pex10p-6xHis in einem Modell zur möglichen (pleiotropen) Funktion von *AthPEX10* zu kombinieren.

Abb. D1 beschreibt die putativ frühe Aufgabe von Pex10p bei der Membranformation in *Arabidopsis*, die neben den Peroxisomen auch die Biogenese von Lipid- und Proteinkörpern betrifft.

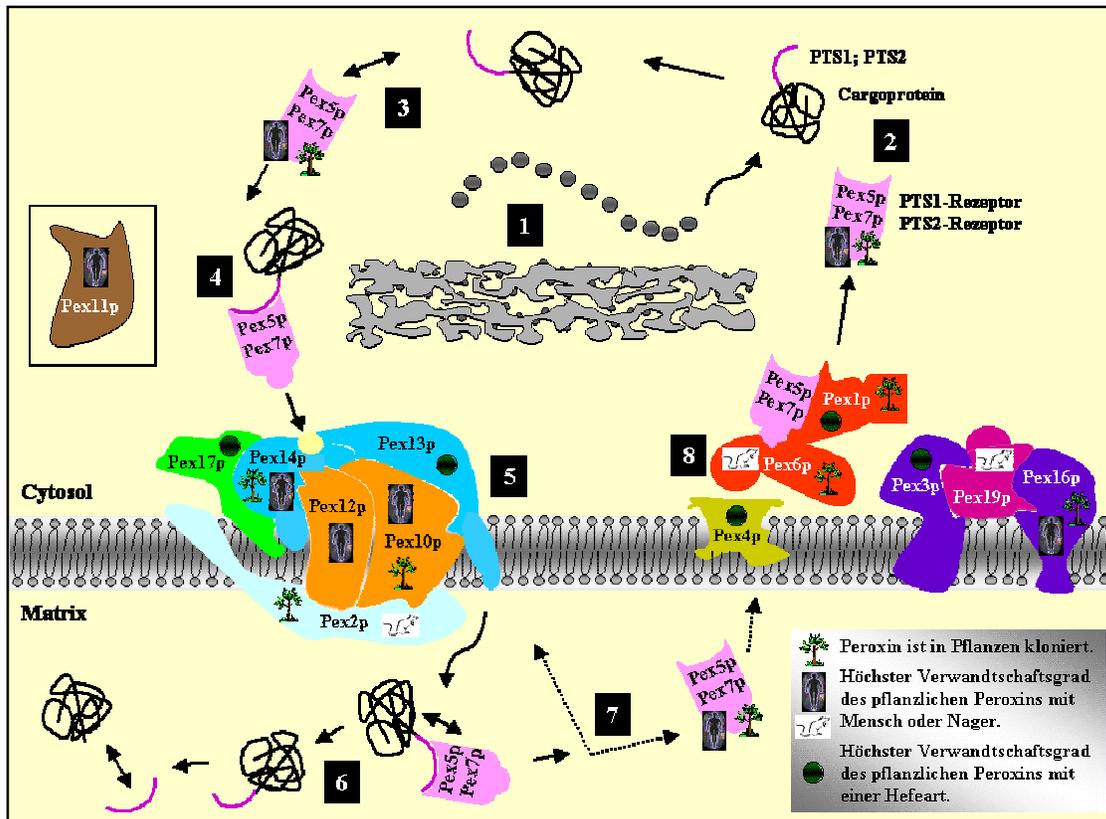


**Abb. D1:** Hypothetisches Modell zur Funktion von Pex10p in *Arabidopsis thaliana*. Dargestellt ist die schematische Ontogenese dreier Organellen-Typen (Peroxisom, Lipid- und Proteinkörper), deren Entwicklung in *Arabidopsis* notwendigerweise mit der Existenz von *PEX10* verknüpft scheint.

Peroxisomen entstehen über die Abschnürung präperoxisomaler Vesikel an einem peroxisomalen ER-Kompartiment (pER), an denen „frühe“ Membranproteine des Typ I und Pex10p ER-abhängig inseriert werden. Durch den posttranslationalen Import weiterer Membranproteine des Typ II und von Matrixproteinen entwickeln sich frühe Peroxisomen schliesslich zu funktionellen reifen Peroxisomen. Nach der Abschnürung von präperoxisomalen Vesikeln vom ER werden die dafür benötigten Pex10p-Proteine über ihr putatives ER-*retrieval* Signalmotiv ins ER für neue Aufgaben zurückgeschleust. Am Import-Apparat reifer Peroxisomen manifestiert sich die pleiotrope Funktion von Pex10p, die durch das Dreieck gekennzeichnet ist und in Abb. D2 diskutiert wird.

Für die Entstehung von Oleosomen besitzt Pex10p eine wichtige Funktion während der Abschnürung oder bereits bei der Bildung von Lipidbody-Membranen im Zusammenspiel mit oleosinischen Proteinen. Auch die Formation von Proteinvesikeln von der *export site* des ER (esER) auf dem Weg zum Golgi-Apparat, scheint mit der Existenz von Pex10p essentiell verknüpft zu sein.

In Peroxisomen könnte das „frühe“ Membranprotein Pex10p zusammen mit anderen peroxisomalen Membranproteinen (PMP) des „Typ I“ posttranslational zu rauem ER (rER) oder peroxisomalem ER (pER) transportiert werden, wo es die Bildung einer präperoxisomalen Membran organisiert. An diesem Prozess sind wahrscheinlich weitere „frühe“ Membranproteine, wie Pex2p, Pex3p und Pex16p beteiligt.



**Abb. D2:** Hypothetisches Modell zum Translokations-Apparat und der möglichen Funktion von vermutlich insgesamt 15 Peroxinen in *Arabidopsis thaliana*. Der Baum symbolisiert die Klonierung des Peroxins in Pflanzen. Zusätzlich wird der höchste Verwandtschaftsgrad eines pflanzlichen Peroxins mit einem nicht-pflanzlichen Ortholog angegeben (Mullen *et al.*, 2001). Falls eine Klonierung in Pflanzen noch nicht erfolgt ist, richtet sich die mögliche Funktion des pflanzlichen Peroxins nach dem Homolog mit dem höchsten Verwandtschaftsgrad.

-1: Peroxisomale Membranproteine des Typ I (Pex2p, Pex3p, Pex16p und Pex10p) werden am pER in frühe Membranen inseriert. Typ II-Proteine werden an cytosolischen Ribosomen translatiert und posttranslational in die Peroxisomen-Membran eingebaut (Pex19p). -2: Im Cytosol befinden sich peroxisomale Matrixproteine und Rezeptor-Peroxine (Pex5p und Pex7p). -3: PTS1- oder PTS2-Proteine interagieren mit dem PTS1-Rezeptor Pex5p oder dem PTS2-Rezeptor Pex7p und bewegen sich als Shuttle-Cargo-Verbindung (SCV) in Richtung der peroxisomalen Membran. -4: Die Rezeptoren binden an den Docking-Mechanismus aus Pex13p und Pex14p, an dem peripher auch Pex17p beteiligt sein könnte. -5: Nach dem Andocken erfolgt wahrscheinlich die Passage der vollständigen SCV über den Translokations-Apparat aus Pex10p, Pex12p und evtl. Pex2p in die peroxisomale Matrix. -6: Die SCV löst sich auf, PTS2 spaltet sich vom Propeptid durch eine bislang unbekannte Protease ab. -7: Die Shuttle-Rezeptoren werden aus dem Peroxisomen-Innenraum ins Cytosol „recycelt“. Dieser Schritt erfolgt entweder über den Translokations-Apparat aus Pex10, Pex12p und Pex2p oder über einen alternativen Weg, an dem Pex1p und Pex6p als letzter Schritt beim Importmechanismus beteiligt sind, der unterhalb von Pex10p, Pex12p und Pex2p liegt. Pex4p könnte eine Funktion bei der Freilassung der Importrezeptoren ins Cytosol besitzen. -8: Die Shuttle-Rezeptoren wurden ins Cytosol transloziert und sind in der Lage, neue Cargoproteine zu übernehmen. Pex11p ist ein Membran-Protein mit Beteiligung an der Peroxisomen-Proliferation und steht ausserhalb des Import-Apparates.

Die Nichtexpression dieser „frühen“ Membranproteine verhindert in Hefen und Säugern die Membranformation. Über den weiteren direkten Import von Membranproteinen des „TypII“ (z.B. Pex19p) und von Matrixproteinen entwickeln sich die präperoxisomalen Vesikel zu jungen Peroxisomen. Beim Matrixprotein-Import dürfte zumindest ein Teil der Pex10-Proteine für die Bildung eines Translokations-Apparates benötigt werden (angedeutet durch das Dreieck), der nachfolgend genauer beschrieben ist. Pex10p, das aufgrund seiner Interaktionseigenschaften ausschliesslich für die frühe Membranformation notwendig war, könnte durch ein *ER-retrieval* Signalmotiv (ER-RSM) für neue Aufgaben bei der Membranbildung innerhalb des ER recycelt werden.

In Lipidkörpern fungiert Pex10p im Zusammenspiel mit Oleosinen bei der Bildung oder Abschnürung der Lipidkörper-Membran. Denkbar wäre ein Recycling von Pex10p nach erfolgter Abschnürung der Membran vom ER, ähnlich wie nach der Vesikelabschnürung für Speicher-Proteine von der *export site* des ER (esER) auf ihrem Weg zum Golgi-Apparat.

In Abb. D2 ist eine putativ erweiterte oder pleiotrope Funktion von *AthPex10p* als Komponente des Translokationsapparates innerhalb der peroxisomalen Membran beschrieben, die sich weitgehend an den Erkenntnissen des Import-Apparates in Hefen und Säugern orientiert (vgl. Kapitel 6.1).

Das Modell impliziert alle 15 vermuteten Peroxin-Homologe, die in *Arabidopsis* vorkommen (vgl. Kapitel 4). Es berücksichtigt jedoch nicht die vermutete Oligomerisierung verschiedener Peroxine zu Protein-Aggregaten, was für eine kombinatorische Vielfalt der Interaktionen von Bedeutung ist (Thoms & Erdmann, 2003). Das Schema übernimmt zwangsläufig mögliche Peroxinfunktionen aus Säugern oder Hefen, da viele pflanzliche Peroxin-Orthologe noch nicht kloniert wurden (Pex3p, Pex4p, Pex11p, Pex12p, Pex13p, Pex17p und Pex19p). Funktionsanalysen existieren hingegen von Pex1p, Pex2p, Pex5p, Pex6p (aus Sonnenblume kloniert), Pex7p, Pex10p (vorliegende Arbeit), Pex14p und Pex16p. Davon betroffen sind jedoch keine *in situ*-Lokalisationsuntersuchungen der Peroxine. Zudem ist bei einigen Peroxinen unterstellt, dass sie neben ihrer beschriebenen Funktion, teils ausserhalb der Peroxisomen-Biogenese (Pex2p und Pex16p), auch eine pleiotrope Funktion innerhalb des Import-Apparates besitzen, die sich aus der Analogie zu Säugern oder Hefen ergibt (Pex1p, Pex2p, Pex10p, Pex16p).

Abschliessend bleibt anzumerken, dass die Modelle lediglich als hypothetische Arbeitsgrundlage künftiger Untersuchungen zur Aufgabe pflanzlicher Peroxine dienen können. Mit neuen Erkenntnissen zu ihrer Funktion, werden sich auch die Entwürfe ändern.

## Literatur

- Agne, B., Meindl, N.M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Girzalsky, W., Kunau, W.-H.** (2003). Pex8p: An Intraperoxisomal Organizer of the Peroxisomal Import. *Molecular Cell* 11: 635-646.
- Albertini, M., Girzalsky, W., Veenhuis, M., Kunau, W.-H.** (2001). Pex12p of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of a multi-protein complex essential for peroxisomal matrix protein import. *European Journal of Cell Biology* 80: 257-270.
- Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J.A.K.W., Veenhuis, M., Kunau, W.-H.** (1997). Pex14p, a Peroxisomal Membrane Protein Binding Both Receptors of the Two PTS-Dependent Import Pathways. *Cell* 89: 83-92.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., Ohsumi, Y.** (1994). Ultrastructural Analysis of the Autophagic Process in Yeast: Detection of Autophagosomes and Their Characterization. *The Journal of Cell Biology* 124: 903-913.
- Backeshoff, K. & Stabenau, H.** (1989). Peroxisomes in the Alga *Vaucheria* are Neither of the Leaf Peroxisomal Nor of the Glyoxysomal Type. *Bot. Acta* 103: 190-196.
- Baerends, R.J.S., Faber K.N., Kram, A.M., 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.
- 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* *PEX3* gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J. Biol. Chem.* 271: 8887-8894.
- Baker, A., Charlton, W., Johnson, B., Lopez-Huertas, E., Oh, J., Sparkes, I., Thomas, J.** (2000). Biochemical and molecular approaches to understanding protein import into peroxisomes. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 499-504.
- Barlow, P.N., Luisi, B., Milner, A., Elliot, M., Everett, R.** (1994). Structure of the C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> Domain by <sup>1</sup>H-nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 237: 201-211.
- Beevers, H.** (1979). Microbodies In Higher Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 159-193.
- Bellu, A.R., & Kiel, J.A.K.W.** (2003). Selective Degradation of Peroxisomes in Yeasts. *Microscopy Research and Technique* 61: 161-170.

- Bellu, A.R., Komori, M., van der Klei, I.J., Kiel, J.A.K.W., Veenhuis, M.** (2001). Peroxisome Biogenesis and Selective Degradation Converge at Pex14p. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 44570-44574.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B.J.** (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1859.
- Borden, K.L.B. & Freemont P.S.** (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Current Opinion in Structural Biology* 6: 395-401.
- Bowman, J.** (1994). *Arabidopsis, An Atlas of Morphology and Development*, (Springer-Verlag, New York), 450 Seiten.
- Braverman, N., Dodt, G., Gould, S., Valle, D.** (1998). An isoform of Pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Human Molecular Genetics* 7: 1195-1205.
- Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S.J., Valle, D.** (1997). Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat. Genet.* 15: 369-76.
- Breidenbach, R.W., Kahn, A., Beevers, H.** (1968). Characterization of Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol.* 43: 705-713.
- Brickner, D.G., Brickner, J.H., Olsen, J.J.** (1998). Sequence analysis of a cDNA encoding Pex5p, a peroxisomal targeting signal type 1 receptor from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 330.
- Brocard, C., Lametschwandtner, G., Koudelka, R., Hartig, A.** (1997). Pex14p is a member of the protein linkage map of Pex5p. *The EMBO Journal* 16: 5491-5500.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A.** (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* 247: 295-311.
- Cancio, I., Orbea, A., Völkl, A., Fahimi, H.D., Cajaraville M.P.** (1998). Induction of Peroxisomal Oxidases in Mussels: Comparison of Effects of Lubricant Oil and Benzo(a)pyrene with Two Typical Peroxisome Proliferators on Peroxisome Structure and Function in *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicology and applied Pharmacology* 149: 64-72.
- Canvin, D.T.** (1979). Photorespiration : Comparison Between C3 and C4 Plants. In *Photosynthesis II. Photosynthetic Carbon Metabolism and Related Processes*, Ed. M. Gibbs, E.

Latzko. *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series 6: 368-396. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

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

**Chang, C.-C., Warren, D.S., Sacksteder, K.A., Gould, S.J.** (1999a). PEX12 Interacts with PEX5 and PEX10 and Acts Downstream of Receptor Docking in Peroxisomal Matrix Protein Import. *The Journal of Cell Biology* 147: 761-773.

**Chapman, K.D. & Trelease R.N.** (1991). Acquisition of Membrane Lipids by Differentiating Glyoxysomes: Role of Lipid Bodies. *The Journal of Cell Biology* 115: 995-1007.

**Charlton, W. & Lopez-Huertas, E.** (2002). PEX Genes in Plants and other organisms, in: A. Baker and I.A. Graham (Eds.), *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers. 385-426.

**Collins, C.S., Kalish, J.E., Morrell, J.C., McCaffery, J.M., Gould, S.J.** (2000). The Peroxisome Biogenesis Factors Pex4p, Pex22p, Pex1p, and Pex6p Act in the Terminal Steps of Peroxisomal Matrix Protein Import. *Molecular and Cellular Biology* 20: 7516-7526.

**Cooper, T.G. & Beevers, H.** (1969a). Mitochondria and Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. Enzyme Constituents and Catalytic Capacity. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 3507-3513.

**Cooper, T.G. & Beevers, H.** (1969b).  $\beta$ -Oxidation in Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 3514-3520.

**Cooper, T.G.** (1971). The Activation of Fatty Acids in Castor Bean Endosperm. *The Journal of Biological Chemistry* 246: 3451-3455.

**Corey, E.J., Matsuda, S.P.T., Bartel, B.** (1993). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11628-11632.

**Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Rio, L.A.** (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 145-150.

**Courtois-Verniquet, F. & Douce, R.** (1993). Lack of aconitase in glyoxysomes and peroxisomes. *Biochemical Journal* 294: 103-107.

- Crookes, W.J. & Olsen, L.J.** (1998). The Effects of Chaperones and the Influence of Protein Assembly on Peroxisomal Protein Import. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 17236-17242.
- Crookes, W.J. & Olsen, L.J.** (1999). Peroxin Puzzles and Folded Freight: Peroxisomal Protein Import in Review. *Naturwissenschaften* 86: 51-61.
- D'Alessio, J.M., Bebee, R., Hartley, J.L., Noon, M.C., Polayes, D.** (1992). Lambda Zip-Lox: Automatic subcloning of cDNA. *Focus* 14: 76-79.
- Dammai, V. & Subramani, S.** (2001). The Human Peroxisomal Targeting Signal Receptor, Pex5p, Is Translocated into the Peroxisomal Matrix and Recycled to the Cytosol. *Cell* 105: 187-196.
- Dansen, T.B. & Wirtz, K.W.A.** (2001). The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 51: 223-230.
- De Bellis, L., Hayashi, M., Biagi, P.P., Hara-Nishimura, I., Alpi, A., Nishimura, M.** (1994). Immunological analysis of aconitase in pumpkin cotyledons: the absence of aconitase in glyoxysomes. *Physiologia Plantarum* 90: 757-762.
- De Bellis, L., Picciarelli, P., Pistelli, L., Alpi, A.** (1990). Localisation of glyoxylate-cycle marker enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons. *Planta* 180: 435-439.
- de Duve, C. & Baudhuin, P.** (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357.
- Demming-Adams, B., Adams III, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R., Verhoeven, A.S.** (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum* 98: 253-264.
- Distel, B. et al.** (1996). A Unified Nomenclature for Peroxisome Biogenesis Factors. *The Journal of Cell Biology* 135: 1-3.
- Dodt, G. & 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. *The Journal of Cell Biology* 135: 1763-1774.
- Dodt, G., Warren, D., Becker, E., Rehling, P., Gould, S.J.** (2001). Domain Mapping of Human PEX5 Reveals Functional and Structural Similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 41769-41781.

- Douma, A.C., Veenhuis, M., de Koning, W., Evers, M.E., Harder, W.** (1985). Dihydroxy-acetone synthase is localized in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol.* 143: 237-243.
- Eckert, J.H. & Erdmann, R.** (2003). Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147: 75-121.
- Eilers, T. et al.** (2001). Identification and Biochemical Characterization of *Arabidopsis thaliana* Sulfite Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 46989-46994.
- Einwächter, H., Sowinski, S., Kunau, W.-H., Schliebs, W.** (2001). *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfil a common function in the early Steps of the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO reports* 2: 1035-1039.
- Eitzen, G.A., Szilard, R.K., Rachubinski, R.A.** (1997). Enlarged Peroxisomes Are Present in Oleic Acid-grown *Yarrowia lipolytica* Overexpressing the *PEX16* Gene Encoding an Intraperoxisomal Peripheral Membrane Peroxin. *The Journal of Cell Biology* 137: 1265-1278.
- Eitzen, G.A., Titorenko, V.I., Smith, J.J., Veenhuis, M., Szilard, R.K., Rachubinski, R.A.** (1996). The *Yarrowia lipolytica* Gene *PAY5* Encodes a Peroxisomal Integral Membrane Protein Homologous to the Mammalian Peroxisome Assembly Factor PAF-1. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 20300-20306.
- 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*. *The Journal of Cell Biology* 140: 807-820.
- Elgersma, Y., van den Berg, M., Tabak, H.F., Distel, B.** (1993). An Efficient Positive Selection Procedure for the Isolation of Peroxisomal Import and Peroxisome Assembly Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135: 731-740.
- Elgersma, Y., Vos, A., van den Berg, M., van Roermund, C.W.T., van der Sluijs, P., Distel, B., Tabak, H.F.** (1996). Analysis of the Carboxyl-terminal Peroxisomal Targeting Signal 1 in a Homologous Context in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 26375-26382.
- Erdmann, R., & Blobel, G.** (1996). Identification of Pex13p, a Peroxisomal Membrane Receptor for the PTS1 Recognition Factor. *The Journal of Cell Biology* 135: 111-121.
- Erdmann, R., Veenhuis, M., Kunau, W.H.** (1997). Peroxisomes: organelles at the crossroads. *Trends in Cell Biology* 7: 400-407.

- Faber, K.N., Haan, G.J., Baerends, J.S., Kram, A.M., Veenhuis, M.** (2002a). Normal Peroxisome Development from Vesicles Induced by Truncated *Hansenula polymorpha* Pex3p. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 11026-11033.
- Faber, K.N., Heyman, J.A., Subramani, S.** (1998). Two AAA Family Peroxins, PpPex1p and PpPex6p, Interact with Each Other in an ATP-Dependent Manner and Are Associated with Different Subcellular Membranous Structures Distinct from Peroxisomes. *Molecular and Cellular Biology* 18: 936-943.
- Faber, K.N., van Dijk, R., Keizer-Gunnink, I., Koek, A., van der Klei, I.J., Veenhuis, M.** (2002b). Import of assembled PTS1 proteins into peroxisomes of the yeast *Hansenula polymorpha*: Yes and No!. *Biochimica et Biophysica Acta* 1591: 157-162.
- Fahimi, H.D. & Baumgart, E.** (1999). Siehe Internet-Link: [www.uni-heidelberg.de/uni/presse/ruca99\\_2/zellbiologie.html](http://www.uni-heidelberg.de/uni/presse/ruca99_2/zellbiologie.html)
- Faust, P.L., Su, H.-M., Moser, A., Moser, H.W.** (2001). The Peroxisome Deficient PEX2 Zellweger Mouse : Pathologic and Biochemical Correlates of Lipid Dysfunction. *Journal of Molecular Neuroscience* 16: 289-298.
- Flynn, C.R., Mullen, R.T., Trelease, R.N.** (1998). Mutational analyses of a type 2 peroxisomal targeting signal that is capable of directing oligomeric protein import into tobacco BY-2 glyoxysomes. *The Plant Journal* 16: 709-720.
- Flynn, R., Trelease, R.N., Schumann, U., Gietl, C.** (2000). Abs # 241: The Arabidopsis peroxin 10 homolog, AtPex10p, is localized to a subdomain of the plant endoplasmic reticulum. Posterpräsentation der *American Society of Plant Biologists*.
- Fransen, M., Terlecky, S.R., Subramani, S.** (1998). Identification of a human PTS1 receptor docking protein directly required for peroxisomal protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8087-8092.
- Fransen, M., Wylin, T., Brees, C., Mannaerts, G.P., van Veldhoven, P.P.** (2001). Human Pex19p Binds Peroxisomal Integral Membrane Proteins at Regions Distinct from Their Sorting Sequences. *Molecular and Cellular Biology* 21: 4413-4424.
- Frederick, S.E. & Newcomb, E.H.** (1969a). Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.* 43: 343-352.
- Frederick, S.E. & Newcomb, E.H.** (1969b). Microbody-Like Organelles in Leaf Cells. *Science* 163: 1353-1355.
- Frederick, S.E., Newcomb, E.H., Vigil, E.L., Wergin, W.P.** (1968). Finestructure characterisation of plant microbodies. *Planta* 81: 229-252.

- Freemont, P.S.** (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc-finger. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 684: 174-192.
- Fujiki, Y.** (1997). Molecular defects in genetic diseases of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1361: 235-250.
- Gamas, P., Niebel, Fde C., Lescure, N., Cullimore, J.** (1996). Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 233-42.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Gavva, N.R., Wen, S.-C., Daftari, P., Moniwa, M., Yang, W.-M., Yang-Feng, L.-P., Seto, E., Davie, J.R., Shen, C.-K.J.** (2002). NAPP2, a Peroxisomal Membrane Protein, Is Also a Transcriptional Corepressor. *Genomics* 79: 423-431.
- Geuze, H.J., Murk, J.L., Stroobants, A.K., Griffith, J.M., Kleijmeer, M.J., Koster, A.J., Verkleij, A.J., Distel, B., Tabak, H.F.** (2003). Involvement of the Endoplasmic Reticulum in Peroxisome Formation. *Molecular Biology of the Cell* 14: 2900-2907.
- Gietl, C. & Schmid, M.** (2001). Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften* 88: 49-58.
- Gietl, C.** (1990). Glyoxysomal malate dehydrogenase from watermelon is synthesized with an amino-terminal transit peptide. *Proc. Natl. acad. Sci.* 87: 5773-5777.
- Gietl, C.** (1996). Protein targeting and import into plant peroxisomes. *Physiol. Plant.* 97: 599-608.
- Gietl, C., Faber, K.N., van der Klei, I.J., Veenhuis, M.** (1994). Mutational analysis of the N-terminal topogenic signal of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase using the heterologous host *Hansenula polymorpha*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 3151-3155.
- Girzalsky, W., Rehling, P., Stein, K., Kipper, J., Blank, L., Kunau, W.-H., Erdmann, R.** (1999). Involvement of Pex13p in Pex14p Localization and Peroxisomal Targeting Signal 2-dependent Protein Import into Peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* 144: 1151-1162.
- Gleeson, M.A.G., Sudbery, P.E.** (1988). Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 4, 293-303.
- Goldfischer, S., Moore, C.L., Johnson, A.B., Spiro, A.J.; Valsamis, M.P., Wisniewski, H.K., Ritch, R.H., Norton, W.T., Rapin, I., Gartner, L.M.** (1973). Peroxisomal and Mitochondrial Defects in the Cerebro-Hepato-Renal Syndrome. *Science* 182: 62-64.

- Götte, K., Girzalsky, W., Linkert, M., Baumgart, E., Kammerer, S., Kunau, W.-H., Erdmann, R.** (1998). Pex19p, a Farnesylated Protein essential for Peroxisome Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 18: 616-628.
- Gould, S.J. & Collins, C.S.** (2002). Peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 382-389.
- 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. *The Journal of Cell Biology* 135: 85-95.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., Subramani, S.** (1989). A Conserved Tripeptide Sorts Proteins to Peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* 108: 1657-1664.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Schneider, M., Howell, S.H., Garrard, L.J., Goodman, J.M., Distel, B., Tabak, H., Subramani, S.** (1990). Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J.* 9: 85-90.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Subramani, S.** (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. of Cell Biol.* 105: 2923-2931.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Subramani, S.** (1988). Identification of Peroxisomal Targeting Signals Located at the Carboxy Terminus of Four Peroxisomal Proteins. *The Journal of Cell Biology* 107: 897-905.
- Gunkel, K., van der Klei, I., Barth, G., Veenhuis, M.** (1999). Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after a shift of cells from acetate/oleate/ethylamin into glucose/ammonium sulfate-containing media. *FEBS Letters* 451: 1-4.
- Gut, H. & Matile, P.** (1988). Apparent induction of key enzymes of the glyoxylic acid cycle in senescent barley leaves. *Planta* 176: 548-550.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hayashi, H., De Bellis, L., Yamaguchi, K., Kato, A., Hayashi, M., Nishimura, M.** (1998). Molecular Characterization of a Glyoxysomal Long Chain Acyl-CoA Oxidase That Is Synthesized as a Precursor of Higher Molecular Mass in Pumpkin. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 8301-8307.
- Hayashi, M.** (2000a). Plant Peroxisomes: Molecular Basis of the Regulation of their Functions. *J. Plant Res.* 113: 103-109.

- Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T., Nishimura, M.** (2000). *AtPex14p* maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes. *The EMBO Journal* 19: 5701-5710.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Nishimura, M.** (1998a). 2,4-Dichlorophenoxybutyric Acid-resistant Mutants of *Arabidopsis* Have Defects in Glyoxysomal Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation. *The Plant Cell* 10: 183-195.
- Heinze, M., Flynn, R., Trelease, R.N., Schumann, U., Gietl, C.** (2002). Abs # 219: *AtPex10p*, a putative peroxin ortholog, exists in the ER, not peroxisomes, of non-transformed cells. Posterpräsentation der *American Society of Plant Biologists*.
- Hettema, E.H., Distel, B., Tabak, H.F.** (1999). Import of proteins into peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1451: 17-34.
- Hettema, E.H., Girzalsky, W., van den Berg, M., Erdmann, R., Distel, B.** (2000). *Saccharomyces cerevisiae* *Pex3p* and *Pex19p* are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *The EMBO Journal* 19: 223-233.
- Heyman, J.A., Monosov, E., Subramani, S.** (1994). Role of *PAS1* Gene of *Pichia pastoris* in Peroxisome Biogenesis. *The Journal of Cell Biology* 127: 1259-1273.
- Hobman, T.C., Zhao, B., Chan, H., Farquhar, M.G.** (1998). Immunolocalization and Characterization of a Subdomain of the Endoplasmic Reticulum That Concentrates Proteins Involved in COPII Vesicle Biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 9: 1265-1278.
- 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*. *The Journal of Cell Biology* 155: 979-990.
- Hoffmann, T.** (2001). Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Dissertation Technische Universität München.
- Holroyd, C. & Erdmann, R.** (2001). Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS Letters* 501: 6-10.
- Honsho, M. & Fujiki, Y.** (2001). Topogenesis of Peroxisomal Membrane Protein Requires a Short, Positively Charged Intervening-loop Sequence and Flanking Hydrophobic Segments. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 9375-9382.
- Honsho, M., Hiroshige, T., Fujiki, Y.** (2002). The Membrane Biogenesis Peroxin *Pex16p*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 44513-44524.

- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R.** (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77: 61-68.
- Hu, J., Aguirre, M., Peto, C., Alonso, J., Ecker, J., Chory, J.** (2002). A Role for Peroxisomes in Photomorphogenesis and Development of *Arabidopsis*. *Science* 297: 405-409.
- Huang, A.H.C. & Beevers, H.** (1971). Isolation of Microbodies from Plant Tissues. *Plant Physiol.* 48: 637-641.
- Huang, A.H.C.** (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 177-200.
- Huang, A.H.C.** (1993). Oil bodies in maize and other species. *In Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and storage lipids of Plants*, eds. N. Murata and C. Somerville (Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville MD), pp.215-227.
- Huang, A.H.C.** (1996). Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110: 1055-1061.
- 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. *The Journal of Cell Biology* 140: 49-60.
- Hutton, D. & Stumpf, P.K.** (1969). Fat Metabolism in Higher Plants XXXVII. Characterization of the  $\beta$ -Oxidation Systems From Maturing and Germinating Castor Bean Seeds. *Plant Physiol.* 44: 508-516.
- Iida, R., Yasuda, T., Tsubota, E., Takatsuka, H., Masuyama, M., Matsuki, T., Kishi, K.** (2003). M-LP, Mpv17-like Protein, Has a Peroxisomal Membrane Targeting Signal Comprising a Transmembrane Domain and a Positively Charged Loop and Up-regulates Expression of the Manganese Superoxide Dismutase Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 6301-6306.
- Imsande, J., Berkemeyer, M., Scheibe, R., Schumann, U., Gietl, C., Palmer, R.G.** (2001). A Soybean Plastid-Targeted NADH-Malate Dehydrogenase: Cloning And Expression Analyses. *American Journal of Botany* 88: 2136-2142.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Internet-Links Pex7:** <http://www.peroxisome.org/Scientist/Biogenesis/peroxins/pex7.html> & <http://www.hopkinschildrens.org/pages/research/archivedetails.cfm?spotlightid=37>
- Jedd, G. & Chua, N.-H.** (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology* 2: 226-231.

- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6: 3901- 3907.
- Johnson, M.A., Waterham, H.R., Ksheminska, G.P., Fayura, L.R., Cereghino, J.L., stasyk, O.V., Veenhuis, M., Kulachkovsky, A.R., Sibirny, A.A., Cregg, J.M.** (1999). Positive Selection of Novel Peroxisome Biogenesis-Defective Mutants of the Yeast *Pichia pastoris*. *Genetics* 151: 1379-1391.
- Johnson, T.L. & Olsen, L.J.** (2001). Building New Models for Peroxisome Biogenesis. *Plant Physiology* 127: 731-739.
- Jones, H.G.** (1992). Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press.
- Jones, J.M., Morrell, J.C., Gould, S.J.** (2001). Multiple Distinct Targeting Signals in Integral Peroxisomal Membrane Proteins. *The Journal of Cell Biology* 153: 1141-1149.
- Kalish, J.E., Theda, C., Morrell, J.C., Berg, J.M., Gould, S.J.** (1995). Formation of the Peroxisome Lumen Is Abolished by Loss of *Pichia pastoris* Pas7p, a Zinc-Binding Integral Membrane Protein of the Peroxisome. *Molecular and Cellular Biology* 15: 6406-6419.
- Kaplan, C.P., Thomas, J.E., Charlton, W.L., Baker, A.** (2001). Identification and characterisation of PEX6 orthologues from plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1539: 173-180.
- Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M.** (1996). Targeting and Processing of a Chimeric Protein with the N-Terminal Presequence of the Precursor to Glyoxysomal Citrate Synthase. *The Plant Cell* 8: 1601-1611.
- Keller, G.-A., Krisans, S., Gould, S.J., Sommer, J.M., Wang, C.C, Schliebs, W., Kunau, W., Brody, S., Subramani, S.** (1991). Evolutionary Conservation of a Microbody Targeting Signal That Targets Proteins to Peroxisomes, Glyoxysomes, and Glycosomes. *The Journal of Cell Biology* 114: 893-904.
- Kentsis, A., Gordon, R.E., Borden, K.L.B.** (2002). Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly. *PNAS* 99: 15404-15409.
- Kiel, J.A.K.W. & Veenhuis, M.** (2000). Peroxisomal matrix protein import. Suppression of protein import defects in *Hansenula polymorpha pex* mutants by overproduction of the PTS1 receptor Pex5p. *Cell Biochem Biophys* 32: 9-19.
- Kiel, J.A.K.W., Keizer-Gunnink, I., Krause, T., Komori, M., Veenhuis, M.** (1995). Heterologous complementation of peroxisome function in yeast: the *Saccharomyces cere-*

*visiae* PAS3 gene restores peroxisome biogenesis in a *Hansenula polymorpha* per9 disruption mutant. *FEBS Letters* 377: 434-438.

**Komori, M., Rasmussen, S.W., Kiel, J.A.K.W., Baerends, R.J.S., Cregg, J.M., van der Klei, I.J., Veenhuis, M.** (1997). The *Hansenula polymorpha* *PEX14* gene encodes a novel peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *The EMBO Journal* 16: 44-53.

**Kozaki, A. & Takeba, G.** (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560.

**Kragler, F., Lametschwandtner, G., Christmann, J., Hartig, A., Harada, J.J.** (1998). Identification and analysis of the plant peroxisomal targeting signal 1 receptor NtPEX5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13336-13341.

**Kunce, C.M., Trelease, R.N., Doman, D.C.** (1984). Ontogeny of glyoxysomes in maturing and germinated cotton seeds- a morphometric analysis. *Planta* 161: 156-164.

**Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.

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

**Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J., Hartig, A.** (1998). The Difference in Recognition of Terminal Tripeptides as Peroxisomal Targeting Signal 1 between Yeast and Human Is Due to Different Affinities of Their Receptor Pex5p to the Cognate Signal and to Residues Adjacent to It. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 33635-33643.

**Landolt, R. & Matile, P.** (1990). Glyoxysome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Science* 72: 159-163.

**Lazarow, P.B. & Fujiki, J.** (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev. Cell Biol* 1: 489-530.

**Lazarow, P.B.** (1993). Genetic approaches to studying peroxisome biogenesis. *Trends in Cell Biology* 3: 89-93.

**Legakis, J.E., Koepke, J.I., Jedeszko, C., Barlaskar, F., Terlecky, L.J., Edwards, H.J., Walton, P.A., Terlecky, S.R.** (2002). Peroxisome Senescence in Human Fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell* 13: 4243-4255.

**Lichtenthaler, H.K.** (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

- Lin, Y., Sun, L., Nguyen, L.V., Rachubinski, R.A., Goodman H.M.** (1999). The Pex16p Homolog SSE1 and Storage Organelle Formation in *Arabidopsis* Seeds. *Science* 284: 328-330.
- Liu, C. & Meinke, D.W.** (1998). The *titan* mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *The Plant Journal* 16: 21-31.
- Liu, H., Tan, X., Russell, K.A., Veenhuis, M., Cregg, J.M.** (1995). *PER3*, a Gene Required for Peroxisome Biogenesis in *Pichia pastoris*, Encodes a Peroxisomal Membrane Protein Involved in Protein Import. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 10940-10951.
- Liu, Y.G. & Whittier, R.F.** (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25: 674-681.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Whittier, R.F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8: 457-463.
- Lopez-Huertas, E., Charlton, W.L., Johnson, B., Graham, I.A., Baker, A.** (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal* 19: 6770-6777.
- Lopez-Huertas, E., Oh, J., Baker, A.** (1999). Antibodies against Pex14p block ATP-independent binding of matrix proteins to peroxisomes *in vitro*. *FEBS Lett.* 459: 27-229.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M., Kunau, W.H.** (1994). PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *The EMBO Journal* 13: 4908-4918.
- Masters, C. & Crane, D.** (1998). On the role of the peroxisome in cell differentiation and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 187: 85-97.
- Matsumura, T., Otera, H., Fujiki, Y.** (2000). Disruption of the Interaction of the Longer Isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p Abolishes Peroxisome Targeting Signal Type 2 Protein Import in Mammals. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 21715-21721.
- McCammon, 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.
- McCullum, D., Monosov, E., Subramani, S.** (1993). The *pas8* Mutant of *Pichia pastoris* Exhibits the Peroxisomal Protein Import Deficiencies of Zellweger Syndrome Cells- The PAS8 Protein Binds to the COOH-Terminal Tripeptide Peroxisomal Targeting Signal, and Is a Member of the TPR Protein Family. *The Journal of Cell Biology* 121: 761-774.

- Meyer, K., Leube, M.P., Grill, E.** (1994). A Protein Phosphatase 2C Involved in ABA Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.
- MGRP** (2000). *Arabidopsis thaliana*- Multinational Genome Research Project. Poster-präsentation. *Nature* 408.
- Minet, M., Dufour, M.E., Lacroute, F.** (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *The Plant Journal* 2: 417-422.
- Minorsky, P.V.** (2002). The Hot and the Classic. Peroxisomes: Organelles Of Diverse Function. *Plant Physiology* 130: 517-518.
- Mollenhauer, H.H., Morre, D.J., Kelley, A.G.** (1966). The widespread occurrence of plant cytosomes resembling animal microbodies. *Protoplasma* 62: 44-52.
- Moser, A.B. et al.** (1995). Phenotype of patients with peroxisomal disorders subdivided into sixteen complementation groups. *The Journal of Pediatrics* 127: 13-22.
- Moser, H.W.** (1999). Genotype-Phenotype Correlations in Disorders of Peroxisome Biogenesis. *Molecular Genetics and Metabolism* 68: 316-327.
- Motley, A.M., Hettema, E.H., Ketting, R., Plasterk, R., Tabak, H.F.** (2000). *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO reports* 1: 40-46.
- Muench, D.G., Mullen, R.T.** (2003). Peroxisome dynamics in plant cells: a role for the cytoskeleton. *Plant Science* 164: 307-315.
- Mukai, S., Ghaedi, K., Fujiki, Y.** (2002). Intracellular Localization, Function, and Dysfunction of the Peroxisome-targeting Signal Type 2 Receptor, Pex7p, in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 9548-9561.
- Mullen, R.T., & Trelease, R.N.** (2000). The Sorting Signals for Peroxisomal Membrane-bound Ascorbate Peroxidase Are within Its C-terminal Tail. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 16337-16344.
- Mullen, R.T.** (2002). Targeting and import of matrix proteins into peroxisomes, in: A. Baker and I.A. Graham (Eds.), *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers. 339-383.
- Mullen, R.T., Flynn, C.R., Trelease, R.N.** (2001). How are peroxisomes formed? The role of the endoplasmic reticulum and peroxins. *TRENDS in Plant Science* 6: 256-261.
- Mullen, R.T., Lee, M.S., Flynn, C.R., Trelease, R.N.** (1997). Diverse Amino Acid Residues Function within the Type 1 Peroxisomal Targeting Signal. *Plant Physiol.* 115: 881-889.

- Mullen, R.T., Lisenbee, C.S., Miernyk, J.A., Trelease, R.N.** (1999). Peroxisomal Membrane Ascorbate Peroxidase Is Sorted to a Membranous Network That Resembles a Subdomain of the Endoplasmic Reticulum. *The Plant Cell* 11: 2167-2185.
- Muller, W.H., van der Krift, T.P., Krouwer, A.J., Wosten, H.A., van der Voort, L.H., Smaal, E.B., Verkleij, A.J.** (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *The EMBO Journal* 10: 489-485.
- Murashige, T. & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakamura, T., Meyer, C., Sano, H.** (2002). Molecular cloning and characterization of plant genes encoding novel peroxisomal molybdoenzymes of the sulphite oxidase family. *Journal of Experimental Botany* 53: 1833-1836.
- Napier, J.A., Stobart, A.K., Shewry, P.R.** (1996). The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* 31: 945-956.
- Neumann, R.** (2002). Die Ringe der Cleopatra. *Laborjournal* 1-2: 31.
- Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H., Akazawa, T., Yokota, S.** (1986). Immunocytochemical Analysis Shows that Glyoxysomes Are Directly Transformed to Leaf Peroxisomes during Greening of Pumpkin Cotyledons. *Plant Physiol* 80: 313-316.
- Nito, K., Hayashi, M., Nishimura, M.** (2002). Direct Interaction and Determination of Binding Domains among Peroxisomal Import Factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43: 355-366.
- Ogren, W.L.** (1984). Photorespiration: Pathways, Regulation, And Modification. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 415-442.
- Okita, T.W. & Rogers, J.C.** (1996). Compartmentation of Proteins in the Endomembrane System of Plant Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 327-350.
- Okumoto, K., Abe, I., Fujiki, Y.** (2000). Molecular Anatomy of the Peroxin Pex12p. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 25700-25710.
- Okumoto, K., Itoh, R., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Tamura, S., Kondo, N., Fujiki, Y.** (1998). Mutations in *PEX10* is the cause of Zellweger peroxisome deficiency syndrome of complementation group B. *Human Molecular Genetics* 7: 1399-1405.
- Olsen, L. & Harada, J.J.** (1995). Peroxisomes And Their Assembly In Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 123-146.
- Olsen, L.** (1998). The surprising complexity of peroxisome biogenesis. *Plant Molecular Biology* 38: 163-189.

- Otegui, M.S., Capp, R., and Staehelin, L.A.** (2002). Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 14: 1311-1327.
- Otera, H. et al.** (1998). Peroxisome Targeting Signal Type 1 (PTS1) Receptor Is Involved in Import of Both PTS1 and PTS2: Studies with *PEX5*-Defective CHO Cell Mutants. *Molecular and Cellular Biology* 18: 388-399.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N., Fujiki, Y.** (2000). The Mammalian Peroxin Pex5pL, the Longer Isoform of the Mobile Peroxisome Targeting Signal (PTS) Type 1 Transporter, Translocates the Pex7p•PTS2 Protein Complex into Peroxisomes via Its Initial Docking Site, Pex14p. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 21703-21714.
- Otera, H., Setoguchi, K., Hamasaki, M., Kumashiro, T., Shimizu, N., Fujiki, Y.** (2002). Peroxisomal Targeting Signal Receptor Pex5p Interacts with Cargoes and Import Machinery Components in a Spatiotemporally Differentiated Manner: Conserved Pex5p WXXXF/Y Motifs Are Critical for Matrix Protein Import. *Molecular and Cellular Biology* 22: 1639-1655.
- Parinov, S., Sevugan, M., Ye, D., Yang, W.-C., Kumaran, M., Sundaresan, V.** (1999). Analysis of flanking sequences from Dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2263-2270.
- Parveen, Z., Large, A., Grewal, N., Lata, N., Cancio, I., Cajaraville, M.P., Perry, C.J., Connock, M.J.** (2001). D-Aspartate oxidase and D-amino acid oxidase are localised in the peroxisomes of terrestrial gastropods. *European Journal of Cell Biology* 80: 651-660.
- Pastori, G.M. & del Rio, L.A.** (1997). Natural Senescence of Pea Leaves. An Activated Oxygen-Mediated Function for Peroxisomes. *Plant Physiol.* 113: 411-418.
- Pause, B., Saffrich, R., Hunziker, A., Ansorge, W., Just, W.W.** (2000). Targeting of the 22 kDa integral peroxisomal membrane protein. *FEBS Letters* 471: 23-28.
- Perichon, R., Bourre, J.M., Kelly, J.F., Roth, G.S.** (1998). The role of peroxisomes in aging. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 641-652.
- Pistelli, L., De Bellis, L., Alpi, A.** (1991). Peroxisomal enzyme activities in attached senescing leaves. *Planta* 184: 151-153.
- Pistelli, L., De Bellis, L., Alpi, A.** (1995). Evidences of glyoxylate cycle in peroxisomes of senescent cotyledons. *Plant Science* 109: 13-21.
- Purdue, P.E. & Lazarow, P.B.** (1995). Peroxisomal Biogenesis: Multiple Pathways of Protein Import. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 30065-30068.

**Purdue, P.E. & Lazarow, P.B.** (2001). Peroxisome Biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 701-752.

**Purdue, P.E., Skoneczny, M., Yang, X., Zhang, J.W., Lazarow, P.B.** (1999). Rhizomelic chondrodysplasia punctata, a peroxisomal biogenesis disorder caused by defects in Pex7p, a peroxisomal protein import receptor: a minireview. *Neurochem. Res.* 24: 581-586.

**Rachubinski, R.A., & Subramani, S.** (1995). How Proteins Penetrate Peroxisomes. *Cell* 83: 525-528.

**Reggiori, F., & Klionsky, D.J.** (2002). Autophagy in the Eukaryotic Cell. *Eukaryotic Cell* 1: 11-21.

**Reumann, S.** (2000). The Structural Properties of Plant Peroxisomes and Their Metabolic Significance. *Biol. Chem.* 381: 639-648.

**Rodrigues-Pousada, R.A., De Rycke, R., Dedonder, A., Van Caeneghem, W., Engler, G., Van Montagu, M., Van der Straeten, D.** (1993). The Arabidopsis 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene 1 Is Expressed during Early Development. *The Plant Cell* 5: 897-911.

**Sacksteder, K.A. & Gould, S.J.** (2000). The Genetics of Peroxisome Biogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 34: 623-652.

**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. *The Journal of Cell Biology* 148: 931-944.

**Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.** (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

**Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G.A., Subramani, S.** (1998). Peroxisome Degradation by Microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of Specific Steps and Morphological Intermediates. *The Journal of Cell Biology* 141: 625-636.

**Sakai, Y., Marshall, P.A., Saiganji, A., Takabe, K., Saiki, H., Kato, N., Goodman, J.M.** (1995). The *candida boidinii* Peroxisomal Membrane Protein Pmp30 Has a Role in Peroxisomal Proliferation and Is Functionally Homologous to Pmp27 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 177: 6773-6781.

**Salomons, F.A., Kiel, J.A.K.W., Faber, K.N., Veenhuis, M., van der Klei, I.J.** (2000). Overproduction of Pex5p stimulates import of alcohol oxidase and dihydroxyacetone synthase in a *Hansenula polymorpha pex14* null mutant. *Journal of Biological Chemistry* 275, 12603-12611.

- Salomons, F.A., van der Klei, I.J., Kram, A.M., Harder, W., Veenhuis, M.** (1997). Brefeldin A interferes with peroxisomal protein sorting in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Letters* 411: 133-139.
- Sambrook, J. & Russel, D.W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, M.J., Imanaka, T., Shio, H., Small, G.M., Lazarow, P.B.** (1988). Peroxisomal Membrane Ghosts in Zellweger Syndrome- Aberrant Organelle Assembly. *Science* 239: 1536-1538.
- Sautter C.** (1986). Microbody transition in greening watermelon cotyledons Double immunocytochemical labeling of isocitrate lyase and hydroxypyruvate reductase. *Planta* 167: 491-503.
- Schreiber U.** (1997). Herstellerhandbuch zum Fluoreszenzmessgerät PAM 2000; Firma Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland.
- Schroeter, B., Green, T.G.A., Seppelt, R.D., Kappen, L.** (1992). Monitoring photosynthetic activity of crustose lichens using a PAM-2000 fluorescence system. *Oecologia* 92: 457-462.
- Schubert, K.R.** (1986). Products of Biological Nitrogen Fixation In Higher Plants: Synthesis, Transport, and Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574.
- Schumann U., Wanner G., Schmid M., Gietl C.** (2003). AthPEX10, a nuclear gene essential for peroxisome and storage organelle formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *PNAS* 100: 9626-9631.
- Schumann, U., Gietl, C., Schmid, M.** (1999a). Sequence Analysis of a cDNA Encoding Pex10p, a Zinc-binding Peroxisomal Integral Membrane Protein from *Arabidopsis* (Accession no. AF119572) (PGR 99-25). *Plant Physiol.* 119: 1147.
- Schumann, U., Gietl, C., Schmid, M.** (1999b). Sequence Analysis of a cDNA Encoding Pex7p, a Peroxisomal Targeting Signal 2 Receptor from *Arabidopsis*. (Accession No. AF130973) (PGR 99-060). *Plant Physiol.* 120: 339.
- Sepulveda-Saavedra, J., van der Klei, I.J., Keizer, I., Lopez, A.P., Harder, W., Veenhuis, M.** (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 91: 207-212.
- Shimizu, N., Itoh, R., Hirono, Y., Otera, H., Ghaedi, K., Tateishi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Harano, T., Mukai, S., Fujiki, Y.** (1999). The Peroxin Pex14. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 12593-12604.

**Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Orii, T., Shirayoshi, Y., Mori, T., Fujiki, Y.** (1992). A Human Gene Responsible for Zellweger Syndrome That Affects Peroxisome Assembly. *Science* 255: 1132-1134.

**Sichting, M., Schell-Steven, A., Prokisch, H., Erdmann, R., Rottensteiner, H.** (2003). Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* Function Together in PTS2-dependent Protein Import into Peroxisomes. *Molecular Biology of the Cell* 14: 810-821.

**Sitia, R. & Meldolesi, J.** (1992). Endoplasmatic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol. Biol. Cell* 3: 1067-1072.

**Slawecki, M.L., Dodt, G., Steinberg, S., Moser, A.B., Moser, H.W., Gould, S.J.** (1995). Identification of three distinct peroxisomal protein import defects in patients with peroxisome biogenesis disorders. *Journal of Cell Science* 108: 1817-1829.

**Smith, J.J. et al.** (2002). Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function. *The Journal of Cell Biology* 158: 259-271.

**Smith, K.J., Dipreta, E., Skelton, H.** (2001). Peroxisomes in Dermatology. Part I. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery: Incorporating Medical and Surgical Dermatology* 5: 231-243.

**Smith, M.D., & Schnell, D.J.** (2001). Peroxisomal Protein Import: The Paradigm Shifts. *Cell* 105: 293-296.

**Snyder, W.B., Faber, K.N., Wenzel, T.J., Koller, A., Lüers, G.H., Rangell, L., Keller, G.A., Subramani, S.** (1999). Pex19p Interacts with Pex3p and Pex10p and Is Essential for Peroxisome Biogenesis in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology of the Cell* 10: 1745-1761.

**Snyder, W.B., Koller, A., Choy, J., Subramani, S.** (2000). The Peroxin Pex19p Interacts with Multiple, Integral Membrane Proteins at the Peroxisomal Membrane. *The Journal of Cell Biology* 149: 1171-1177.

**Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J.G., and Ohlrogge, J.B.** (2000). Lipids. In *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, eds. (Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville MD), pp. 456-527.

**Somerville, C.R., & Ogren, W.L.** (1979). A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Nature* 280: 833-836.

**Somerville, C.R., & Ogren, W.L.** (1980). Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* 286: 257-259.

**Somerville, C.R., & Ogren, W.L.** (1980). Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glycolate aminotransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 2684-2687.

- Somerville, C.R., & Ogren, W.L.** (1981). Photorespiration-deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana* Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity. *Plant Physiol.* 67: 666-671.
- Somerville, C.R., Portis, A.R., Ogren, W.L.,** (1982). A Mutant of *Arabidopsis thaliana* Which Lacks Activation of RuBP Carboxylase *In Vivo*. *Plant Physiol.* 70: 381-387.
- Somerville, S.C. & Ogren, W.L.** (1983). An *Arabidopsis thaliana* mutant defective in chloroplast dicarboxylate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1290-1294.
- Song, S.** (2003). Letters. Comment. *Diabetologia* 46: 132-137.
- South, S.T. & Gould, S.J.** (1999). Peroxisome Synthesis in the Absence of Preexisting Peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* 144: 255-266.
- South, S.T., Baumgart, E., Gould, S.J.** (2001). Inactivation of the endoplasmic reticulum protein translocation factor, Sec61p, or its homolog, Ssh1p, does not affect peroxisome biogenesis. *PNAS* 98: 12027-12031.
- South, S.T., Sacksteder, K.A., Li, X., Liu, Y., Gould, S.J.** (2000). Inhibitors of COPI and COPII Do Not Block *PEX3*-mediated Peroxisome Synthesis. *The Journal of Cell Biology* 149: 1345-1359.
- Stabenau, H., Winkler, U., Säftel, W.** (1989). Compartmentation of Peroxisomal Enzymes in Algae of the Group of Prasinophyceae. *Plant Physiol.* 90: 754-759.
- Stahl, R., Horvath, H., Van Fleet, J., Voetz, M., von Wettstein, D., Wolf, N.** (2002). T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *PNAS* 99: 2146-2151.
- Stein, K., Schell-Steven, A., Erdmann, R., Rottensteiner, H.** (2002). Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the Peroxisomal Docking Machinery: Implications for the First Steps in PTS2 Protein Import. *Molecular and Cellular Biology* 22: 6056-6069.
- Subramani, S.** (1993). Protein Import into Peroxisomes and Biogenesis of the Organelle. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9: 445-478.
- Subramani, S.** (1996). Protein Translocation into Peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 271: 32483-32486.
- Subramani, S.** (1998). Components Involved in Peroxisome Import, Biogenesis, Proliferation, Turnover, and Movement. *Physiological Reviews* 78: 171-188.
- Subramani, S.** (2002). Hitchhiking fads en route to peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* 156: 415-417.
- Subramani, S., Koller, A., Snyder, W.B.** (2000). Import of Peroxisomal Matrix and Membrane Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 399-418.

- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.G., Dean, C., Ma, H., Martienssen, R.** (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development* 9: 1797-1810.
- 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. *The Embo Journal* 10: 3255-3262.
- Szilard, R.K., & Rachubinski, R.A.** (2000). Tetratricopeptide repeat domain of *Yarrowia lipolytica* Pex5p is essential for recognition of the type 1 peroxisomal targeting signal but does not confer full biological activity on Pex5p. *Biochem. J.* 346: 177-184.
- Tabak, H.F., Braakman, I., Distel, B.** (1999). Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends in Cell Biology* 9: 447-453.
- Tan, X., Waterham, H.R., Veenhuis, M., Cregg, J.M.** (1995). The *Hansenula Polymorpha* PER8 gene encodes a novel peroxisomal integral membrane protein involved in proliferation. *The Journal of Cell Biology* 128, 307-319.
- Taub, J., Lau, J.F., Ma, C., Hahn, J.H., Hoque, R., Rothblatt, J., Chalfie, M.** (1999). A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* *daf-C* and *clk-1* mutants. *Nature* 399: 162-166.
- Terlecky, S.R. & Fransen, M.** (2000). How Peroxisomes Arise. *Traffic* 1: 465-473.
- Thieringer, H., Moellers, B., Dodt, G., Kunau, W.-H., Driscoll, M.** (2003). Modeling human peroxisome biogenesis disorders in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Science* 116: 1797-1804.
- Thoms, S. & Erdmann, R.** (2003). Peroxisomenbiogenese: Peroxine und Präimplete. *BIOspektrum* 3: 269-271.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., Wolf, D.H.** (1994). Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 349: 275-280.
- Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A.** (1998). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *TIBS* 23: 231-233.
- Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A.** (2000). Peroxisomal Membrane Fusion Requires Two AAA Family ATPases, Pex1p and Pex6p. *The Journal of CellBiology* 150: 881-886.
- Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A.** (2001a). The Life Cycle of the Peroxisome. *Nature Reviews* 2: 357-368.
- Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A.** (2001b). Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends in Cell Biology* 11: 22-29.

- 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*. *The Journal of Cell Biology* 148: 29-43.
- Titorenko, V.I., Eitzen, G.A., Rachubinski, R.A.** (1996). Mutations in the *PAY5* Gene of the Yeast *Yarrowia lipolytica* Cause the Accumulation of Multiple Subpopulations of Peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 20307-20314.
- Titorenko, V.I., Keizer, I., Harder, W., Veenhuis, M.** (1995). Isolation and Characterization of Mutants Impaired in the Selective Degradation of Peroxisomes in the Yeast *Hansenula polymorpha*. *Journal of Bacteriology* 177: 357-363.
- Titorenko, V.I., Nicaud, J.-M., Wang, H., Chan, H., Rachubinski, R.A.** (2002). Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Cell Biology* 156: 481-494.
- 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*. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5210-5226.
- Titorenko, V.I., Smith, J.J., Szilard, R.K., Rachubinski, R.A.** (1998). Pex20p of the Yeast *Yarrowia lipolytica* Is Required for the Oligomerization of Thiolase in the Cytosol and for Its Targeting to the Peroxisome. *The Journal of Cell Biology* 142: 403-420.
- Titus, D.E. & Becker, W.M.** (1985). Investigation of the Glyoxysome-Peroxisome Transition in Germinating Cucumber Cotyledons Using Double-label Immunoelectron Microscopy. *The Journal of Cell Biology* 101: 1288-1299.
- Trelease, R.N.** (1984). Biogenesis of Glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 321-347.
- Trelease, R.N.** (2002). Peroxisomal biogenesis and acquisition of membrane proteins, in: A. Baker and I.A. Graham (Eds.), *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers. 305-338.
- Trelease, R.N., Becker, W.M., Gruber, P.J., Newcomb, E.H.** (1971). Microbodies (Glyoxysomes and Peroxisomes) in Cucumber Cotyledons. *Plant Physiol.* 48: 461-475.
- Tsukamoto, T., Miura, S., Nakai, T., Yokota, S., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Oorii, T., Fujiki, Y., Sakai, F., Bogaki, A., Yasumo, H., Osumi, T.** (1995). Peroxisome assembly factor-2, a putative ATPase cloned by functional complementation on a peroxisome-deficient mammalian cell mutant. *Nature Genet.* 11: 395-401.
- Tsukamoto, T., Yokota, S., Fujiki, Y.** (1990). Isolation and Characterization of Chinese Hamster Ovary Cell Mutants Defective in Assembly of Peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* 110: 651-660.

- van den Bosch, H., Schutgens, R.B.H., Wanders, R.J.A., Tager, J.M.** (1992). Biochemistry of Peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 157-197.
- van der Klei, I.J, Hilbrands, R.E., Kiel, J.A.K.W, Soeren, W.R., Cregg, J.M, Veenhuis, M.** (1998 b). The ubiquitin-conjugated enzyme Pex4p of *Hansenula polymorpha* is required for efficient functioning of the PTS1 import machinery. *The EMBO Journal* 17: 3608-3618.
- van der Klei, I.J. & Veenhuis, M.** (1997). Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle. *Trends in Microbiology* 5: 502-509.
- van der Klei, I.J. & Veenhuis, M.** (2002). Peroxisomes: flexible and dynamic organelles. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 500-505.
- van der Klei, I.J., Harder, W., Veenhuis, M.** (1991). Methanol-metabolism in a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha*: a physiological study. *Archives of Microbiology* 156: 15-23.
- van der Klei, I.J., Hilbrands, R.E., Swaving, G.J., Waterham, H.R., Vrieling, E.G., Titorenko, V.I., Cregg, J.M., Harder, W., Veenhuis, M.** (1995). The *Hansenula polymorpha* *PER3* Gene Is Essential for the Import of PTS1 Proteins into the Peroxisomal Matrix. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17229-17236.
- van der Klei, I.J., van der Heide, M., Baerends, R.J.S., Rechinger, K.B., Nicolay, K., Kiel, J.A.K.W., Veenhuis, M.** (1998). The *Hansenula polymorpha* *per6* mutant is affected in two adjacent genes which encode dihydroxyacetone kinase and a novel protein, Pak1p, involved in peroxisome integrity. *Curr. Genet.* 34: 1-11.
- Van Der Leij, I., Van den Berg, M., Boot, R., Franse, M., Distel, B., Tabak, H.F.** (1992). Isolation of Peroxisome Assembly Mutants from *Saccharomyces cerevisiae* with Different Morphologies Using a Novel Positive Selection Procedure. *The Journal of Cell Biology* 119: 153-162.
- Veenhuis, M & van der Klei, I.J.** (2002). Peroxisomes: surprisingly versatile organelles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1555: 44-47.
- Veenhuis, M., Kiel, J.A.K.W., Van der Klei, I.** (2003). Peroxisome Assembly in Yeast. *Microscopy Research and Technique* 61: 139-150.
- Veenhuis, M., Komori, M., Salomons, F., Hilbrands, R.E., Hut, H., Baerends, R.J.S., Kiel, J.A.K.W., van der Klei, I.** (1996). Peroxisomal remnants in peroxisome-deficient mutants of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Letters* 383: 114-118.
- Verduyn, C., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A.** (1984). Colorimetric alcohol assays with alcohol oxidase. *J. Microbiol. Methods* 2: 203-209.

- Walton, P.A., Hill, P.E., Subramani, S.** (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell.* 6: 675-683.
- Wang, X., Unruh, M.J., Goodman, J.M.** (2001). Discrete Targeting Signals Direct Pmp47 to Oleate-induced Peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 10897-10905.
- Wanner, G., Formanek, H., and Theimer, R.R.** (1981). The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta* 151: 109-123.
- Warren, D.S., Morell, J.C., Moser, H.W., Valle, D., Gould, S.J.** (1998). Identification of *PEX10*, the Gene Defective in Complementation Group 7 of the Peroxisome-Biogenesis Disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 347-359.
- Warren, D.S., Wolfe, B.D., Gould, S.J.** (2000). Phenotype-genotype relationships in *PEX10*-deficient peroxisome biogenesis disorder patients. *Hum. Mutat.* 15: 509-521.
- Warren, G. & Wickner, W.** (1996). Organelle Inheritance. *Cell* 84: 395-400.
- Waterham, H.R., Titorenko, V.I., Haima, P., Cregg, J.M., Harder, W., Veenhuis, M.** (1994). The *Hansenula polymorpha* PER1 gene is essential for peroxisome biogenesis and encodes a peroxisomal matrix protein with both carboxy- and amino-terminal targeting signals. *J. Cell Biol.* 127: 737-749.
- Webb, M.A. & Newcomb, E.H.** (1987). Cellular compartmentation of ureide biogenesis in root nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Planta* 172: 162-175.
- Wiemer, E.A.C., Nuttley, W.M., Bertolaet, B.L., Li, X., Francke, U., Wheelock, M.J., Anne, U.K., Johnson, K.R., Subramani, S.** (1995). Human Peroxisomal Targeting Signal-1 Receptor Restores Peroxisomal Protein Import in Cells from Patients with Fatal Peroxisomal Disorders. *The Journal of Cell Biology* 130: 51-65.
- Will, G.K., Soukupova, M., Hong, X., Erdmann, K.S., Kiel, J.A.K.W., Dodt, G., Kunau, W.-H., Erdmann, R.** (1999). Identification and Characterization of the Human Orthologue of Yeast Pex14p. *Molecular and Cellular Biology* 19: 2265-2277.
- Wimmer, C.** (1997). Untersuchungen zum Proteinimport in Glyoxysomen der Wassermelone [*Citrullus vulgaris* SCHRAD.]: Isolierung der cDNA für den Importrezeptor für Matrixproteine mit dem peroxisomalen Targeting Signal 1 und Charakterisierung des Genprodukts. Dissertation, Technische Universität München.
- Wimmer, C., Schmid, M., Veenhuis, M., Gietl, C.** (1998). The Plant PTS1 receptor: similarities and differences to its human and yeast counterparts. *The Plant Journal* 16: 453-464.

- Winkler, U., Säftel, W., Stabenau, H.** (1988).  $\beta$ -Oxidation of fatty acids in algae: Localization of thiolase and acyl-CoA oxidizing enzymes in three different organisms. *Planta* 175: 91-98.
- Yahraus, T., Braverman, N., Dodt, G., Kalish, J.E., Morrell, J.C., Moser, H.W., Valle, D., Gould, S.J.** (1996). The peroxisome biogenesis disorder group 4 gene, PXAAA1, encodes a cytoplasmic ATPase required for stability of the PTS1 receptor. *The EMBO Journal* 15: 2914-2923.
- Yokota, S., Togo, S.H., Maebuchi, M., Bun-ya, M., Haraguchi, C.M., Kamiryo, T.** (2002). Peroxisomes of the nematode *Caenorhabditis elegans*: distribution and morphological characteristics. *Histochem Cell Biol* 118: 329-336.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M., Schell, J.** (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO Journal* 2: 2143-2150.
- Zhang, J.W. & Lazarow, P.B.** (1995). *PEB1 (PAS7)* in *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Hydrophilic, Intra-peroxisomal Protein That Is a Member of the WD Repeat Family and Is Essential for the Import of Thiolase into Peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* 129: 65-80.
- Zhang, J.W. & 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. *The Journal of Cell Biology* 132: 325-334.
- Zhang, J.W., Han, Y., Lazarow, P.B.** (1993). Novel Peroxisome Clustering Mutants and Peroxisome Biogenesis Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 123: 1133-1147.
- Zolman, B., Silva, I.D., Bartel, B.** (2001). The Arabidopsis *pxa1* Mutant Is Defective in an ATP-Binding Cassette Transporter-Like Protein Required for Peroxisomal Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation. *Plant Physiology* 127: 1266-1278.

## Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit bin ich Privatdozentin Dr. C. Gietl zu großem Dank verpflichtet.

Bei Prof. Dr. E. Grill bedanke ich mich herzlich für sein andauerndes Interesse am Fortgang der Arbeit und die wertvolle Kritik.

Für die intensive Betreuung in den beiden Anfangsjahren sei meinem Mentor Dr. M. Schmid am Max-Planck-Institut in Tübingen aufrichtig gedankt. Für das ein oder andere graue Haar auf deinem Haupt bekenne ich mich ausdrücklich schuldig (steht dir aber ganz gut!) und bitte für alle Situationen um Entschuldigung, in denen ich deine Toleranz überstrapaziert habe. Deinen vorwurfsvollen Blick bei meinem Versuch, ein Restriktionsenzym vor der Anwendung sorgfältig aufzutauen, werde ich sicherlich nicht vergessen!

Mein ganzer Respekt gebührt Prof. Dr. G. Wanner am Department I der Ludwig-Maximilian-Universität München für die aufregenden elektronenmikroskopischen Bilder von Pflanzenembryonen.

Dr. H. Horvarth (*Washington State University*) möchte ich sehr herzlich für den Enthusiasmus beim Mappen der dZn-Linie danken und Prof. Dr. D. von Wettstein für seine stets aufmunternden Diskussionsbeiträge. Sie haben viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Für die großzügige Überlassung der Phytokammern zur Durchführung der CO<sub>2</sub>-Versuche bin ich Prof. Dr. H. Schnyder und Dr. R. Schäufele am Lehrstuhl für Grünlandlehre des Wissenschaftszentrum Weihenstephan sehr dankbar.

Prof. Dr. M. Veenhuis verdanke ich lehrreiche und schöne Erfahrungen am Institut für Eukaryotische Mikrobiologie der Reichsuniversität Groningen (Niederlande). Die freundliche Aufnahme in Ihrem Labor hat mir viel bedeutet. Besonderen Dank bei der Durchführung der Elektronenmikroskopie schulde ich Ineke Keizer und Klaas Sjollema, für geduldiges Antworten auf tausend Fragen und ein gelegentliches Leben ausserhalb des Labors Anna-Rita Bellu, Marco Lutz und Katja Gunkel. -Hartelijk bedankt allemaal!

Eine besondere Freude ist es, mich bei meinen Post-Doc-Kollegen Dr. A. Christmann und Dr. M. Meinhard zu bedanken. Meine oftmals nervigen Fragen „wie geht das?, warum funktioniert das nicht?, warum funktioniert das denn immer noch nicht?“ konnten Euch (fast) nie aus der Fassung bringen.- Ohne die Vorliebe für traurigen Scheibletten-Käse zwischen zwei Halbweiss-Brotten (doch doch Alex!) oder der ängstlichen Gewissheit, kein Meniskus der Welt würde 15 Minuten Fussball schadlos überstehen (nein nein Michi, das ist keine Übertreibung!), wärt Ihr Kollegen, die für eine Klonierung zweifellos in Frage kämen (ohne Umweltstudien zur Langzeitverträglichkeit natürlich in geringer Auflage).

Schliesslich möchte ich mich bei all meinen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die ich hier nicht namentlich aufführen kann, aber die durch ihre Anwesenheit, die alltäglichen Problemchen und Probleme viel leichter gemacht haben (zumindest die, an denen Ihr schuldlos gewesen seid ☺). Herzlichen Dank, Alles Gute, Servus und Auf Wiedersehen!