

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

Die Zink RING-Finger Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12:
ihr Einfluss auf Blatt-Peroxisomen- und Glyoxysomen-
Biogenese sowie Organellenkontakt in *Arabidopsis thaliana*

Georg Hierl

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Gietl
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Die Dissertation wurde am 06.05.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.06.2010 angenommen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen.....	V
Zusammenfassung	VII
1. Einleitung	1
1.1. Peroxisomen	1
1.1.1. Peroxisomen-Biogenese	2
1.1.2. Der peroxisomale Matrixproteinimport	6
1.1.2.1. Die Peroxisomalen <i>Targeting</i>-Signale PTS1 und PTS2 und deren Erkennung durch PEX5 und PEX7	7
1.1.2.2. Das Andocken der mit dem Matrixprotein beladenen PTS-Rezeptoren PEX5 und PEX7 an die Peroxisomenmembran	10
1.1.2.3. Der Import der Matrixproteine durch die Peroxisomenmembran	10
1.1.2.4. Das Recycling der Rezeptor-Peroxine PEX5 und PEX7	11
1.1.3. Die Zink-RING-Finger-Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12	14
1.2. Glyoxysomen	18
1.3. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Ergebnisse	24
2.1. Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums.....	26
2.1.1. Die Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1	27
2.1.1.1. Zeitverlauf der Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1	28
2.1.1.2. Glyoxysomen fusionieren zum Glyoxysomale Reticulum	30
2.1.2. Die Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums ist in PEX10ΔZn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und der PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I nicht beeinträchtigt.....	31
2.1.2.1. Quantitativer Vergleich der Verteilung und Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1, PEX10ΔZn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und der PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I zeigt jeweils ein Maximum bei vier bis fünf Tagen	33
2.1.2.2. Vergleich der Kotyledonenfläche in Dunkelheit und in Licht gewachsener wt-GFP-PTS1-Pflanzen.....	35
2.1.2.3. <i>In vivo</i>-Untersuchung des Glyoxysomalen Reticulums in der PEX10ΔZn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, den PEX10ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien; den PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien, und den PEX12ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien	36
2.1.2.4. Der Matrixproteinimport der Glyoxysomen in PEX10ΔZn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen ist nicht gestört, während er in der PEX10ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II und in der PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I gestört ist.....	39

2.1.2.5.	Die Mutationen G93E und P126S im N-Terminus von PEX10 stören den Matrixproteinimport in Glyoxysomen und beeinträchtigen die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums	40
2.2.	PEX10 enthält im N-Terminus zwei essentielle Motive für die Biogenese der Blatt-Peroxisomen	42
2.2.1.	Die Aminosäuresubstitution G96E führt in homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien zu Keimlingsletalität	42
2.2.1.1.	Homozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie sterben im Keimlingsstadium, heterozygote Pflanzen zeigen ein retardiertes Wachstum	43
2.2.1.2.	Genotypisierung der Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie durch PCR und Restriktionsverdau	44
2.2.2.	Homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen auf Erde Zwergenwuchs	45
2.2.2.1.	Genotypisierung der Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie.	46
2.2.3.	Die Keimlingsletalität tritt nur bei homozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und nur im Licht auf, es handelt sich um keinen Fettmobilisierungs-Phänotyp	46
2.2.4.	Die Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen keine verringerte Photosyntheseeffizienz	48
2.3.	Die Entwicklung der Blatt-Peroxisomen in den PEX10-G93E-GFP-PTS1-, den PEX10-P126S-GFP-PTS1- und den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien	49
2.3.1.	Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt sowohl Formaberranz der Blatt-Peroxisomen als auch einen gestörten Matrixproteinimport; die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie verhält sich wie Wildtyp	49
2.3.1.1.	Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt sowohl gestörten Matrixproteinimport als auch Formaberranz; die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie gleicht dem Wildtyp	50
2.3.1.2.	Die FIB-Untersuchung bestätigt die Formaberranz der Peroxisomen in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie	52
2.3.2.	Die Blatt-Peroxisomen-Morphogenese und der Matrixproteinimport sind in den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien nicht gestört	53
2.4.	Expression von PEX10 mit N-terminalem T7-6xHis-Tag in der pex10-KO-Mutante	56
2.4.1.	Die Erzeugung der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie	56
2.4.2.	Genotypisierung der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie	57
2.4.3.	Die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie zeigt ein vermindertes Wachstum	58
2.4.4.	PEX10-6xHis-T7 lässt sich in der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie nicht lokalisieren	60
2.5.	Eine Mutation im PEX10-Zn-RING-Finger-Motiv führt zu „freien“ Mitochondrien, die zu aggregieren scheinen	62
2.5.1.	Mitochondrien aus PEX10 Δ Zn1-Pflanzen zeigen am Saccharose-Dichtegradient höhere Dichte als Wildtyp-Mitochondrien	62
2.5.2.	In der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze sind Mitochondrien-Zusammenschlüsse zu beobachten	64

2.6.	Interaktionspartner von PEX10	66
2.6.1.	AtCP1 wird in einem <i>Yeast two-Hybrid-Screen</i> als PEX10-Interaktionspartner erkannt.....	66
2.6.2.	PEX10 lässt sich in <i>E. coli</i> nativ exprimieren und anreichern	69
2.6.3.	AtCP1 lässt sich zusammen mit PEX10 präzipitieren.....	71
2.6.4.	Suche von <i>in vivo</i> -Interaktionspartnern von PEX10 mittels PEX10-6xHis-T7-Affinitätssäule	73
2.7.	Proteomik an Chloroplastenmembranen von Wildtyp und PEX10 Δ Zn lässt keine Rückschlüsse auf die Interaktion mit PEX10 zu	75
3.	Diskussion.....	77
3.1.	Die Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums in <i>A. thaliana</i> sowie der Einfluss der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX2, PEX10 und PEX12 auf dessen Ausprägung und auf den glyoxysomalen/peroxisomalen Matrixproteinimport.....	77
3.2.	Mutationen im PEX10-N-Terminus zeigen einen starken Einfluss auf den makroskopischen und mikroskopischen Phänotyp von <i>A. thaliana</i>	83
3.3.	Die Interaktionspartner von PEX10.....	90
4.	Material und Methoden.....	96
4.1.	Chemikalien	96
4.2.	Oligonukleotide	96
4.3.	Anzucht und <i>screening</i> von Organismen	98
4.3.1.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98
4.3.2.	<i>Escherichia coli</i>	99
4.4.	Molekularbiologische Techniken	99
4.4.1.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	99
4.4.2.	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	100
4.4.3.	Agarose Gelelektrophorese	101
4.4.4.	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	101
4.4.5.	Restriktionsverdau von DNA.....	101
4.4.6.	Ligation von DNA.....	102
4.4.7.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	102
4.4.8.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	102
4.4.9.	Transformation elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	103
4.4.10.	Herstellung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	104
4.4.11.	Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>	104
4.4.12.	Fällen von DNA.....	105
4.4.13.	DNA-Isolation aus <i>A. thaliana</i> mittels CTAB	105
4.4.14.	Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels <i>floral dipping</i>	106
4.4.15.	Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	107
4.5.	Proteinbiochemische Techniken	107
4.5.1.	Ermittlung optimaler Proteinexpressionsbedingungen in <i>E. coli</i>	107

Inhaltsverzeichnis

4.5.2.	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	108
4.5.3.	Isolation von PEX10-T7-6xHis-Tag aus der <i>E. coli</i> -Membran.....	109
4.5.4.	Proteinanreicherung mittels T7-Tag an PEX10.....	109
4.5.5.	Proteinanreicherung mittels His-Tag an AtCP1	110
4.5.6.	Proteinanreicherung mittels Immunpräzipitation	110
4.5.7.	Protoplastengewinnung und Inkubation mit <i>MitoTracker orange</i>	111
4.5.8.	Isolierung von Chloroplasten envelopes aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
4.5.9.	Organellenauffrennung im 30 ml Saccharose-Stufengradienten	114
4.5.10.	Denaturierender Proteinrohextrakt aus Pflanze	116
4.5.11.	SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese.....	116
4.5.12.	Coomassiefärbung.....	118
4.5.13.	Silberfärbung.....	118
4.5.14.	Western-Blots.....	119
4.5.15.	Ponceau S Färbung	119
4.5.16.	Immunodetektion.....	120
4.5.17.	Bradford	121
4.5.18.	Präzipitation von Proteinen	122
4.6.	Physiologische Experimente	122
4.6.1.	Fluorometrie	122
4.6.2.	Proteomik an Chloroplasten envelopes	123
4.7.	Mikroskopie	124
4.7.1.	Confocale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	124
4.7.2.	Elektronenmikroskopie.....	125
4.8.	Klonierungsstrategien	126
4.8.1.	PEX10-T7-6xHis-Tag in <i>E. coli</i> / <i>A. thaliana</i>	126
4.8.2.	AtCP1-T7-6xHis-Tag.....	130
4.8.3.	PEX10 N- + C-Terminus	131
5.	Anhang.....	133
5.1.	Verwendete DNA- und Protein-Marker	133
5.2.	Glycerinstocks.....	133
6.	Literaturverzeichnis	135

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DB	4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure
aa	Aminosäure(n)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Carb	Carbenicillin
CEU	<i>cohesive end ligation unit</i> (Enzymaktivität bei Ligasen)
CLSM	Confocale Laserscanning-Mikroskopie
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DTT	1,4-Dithiothreitol
ΔZn	Delta Zink (mutierte Version des Zink RING-Finger-Motivs)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
Fg	Frischgewicht
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gly	Glycin
gMDH	glyoxysomale Malatdehydrogenase
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid]
HPR	Hydroxypyruvat-Reduktase
Hygr	Hygromycin
ICL	Isocitratlyase
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	<i>lysogeny broth</i> ("Lysogene Brühe")

Abkürzungen

LD	<i>loading dye</i>
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mMDH	mitochondriale Malatdehydrogenase
mQ	durch Milli-Q-Anlage (Millipore) filtriertes Wasser
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N _{2liq}	Flüssiger Stickstoff (-196°C)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulator</i>
PBD	<i>peroxisome biogenesis disorder</i>
PEXN	Peroxin N – Protein (in Säugern und Pflanzen)
PexNp	Peroxin N – Protein (in Hefen)
<i>PEXN</i>	Peroxin N - Gen
ppm	<i>parts per million</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
PTS1	<i>Peroxisomal Targeting Signal 1</i>
PTS2	<i>Peroxisomal Targeting Signal 2</i>
Rif	Rifampicin
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur (~ 20-25 °C)
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
u	<i>enzyme unit</i> (Enzymaktivität)
unv.	unverdaut
verd.	verdaut
wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Peroxisomen sind in Eukaryonten an vielfältigen Stoffwechselprozessen, wie der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt. Zwei Hauptaufgaben der Peroxisomen in Pflanzen sind die β -Oxidation von Fettsäuren während der Speicherfett-Mobilisierung und die Photorespiration. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung eines Glyoxysomalen Reticulums im Zuge der Speicherfett-Mobilisierung im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Bei dem Glyoxysomalen Reticulum handelt es sich um die Verschmelzung einzelner, runder Glyoxysomen zu einem knotigen Gebilde in direkter Nähe zu den Lipidkörpern. Das Glyoxysomale Reticulum tritt in keimenden Samen von *Arabidopsis* nur kurzweilig auf und dient der raschen Speicherstoffmobilisierung.

Den drei peroxisomalen Membranproteinen PEX2, PEX10 und PEX12 ist im C-Terminus die Zink-RING-Finger-Domäne gemein, welche Zn^{2+} -Ionen koordiniert und der Protein-Protein-Interaktion dient bzw. eine E3-Ligasefunktion während der Ubiquitinierung erfüllt. Ein Totalausfall eines dieser Proteine in *Arabidopsis* führt zu Embryoletalität. Die Überexpression von PEX2, PEX10 und PEX12 mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger im Wildtyp-Genom (ΔZn -Mutanten) belegte die Funktion der Zink-RING-Finger auch in keimenden Samen. PEX2- ΔZn -Mutanten zeigen gestörten glyoxysomalen Matrixproteinimport; eine Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domänen in PEX10 oder PEX12 führt zu Formstörung im Sinne einer verminderten Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums.

PEX10- ΔZn -Mutanten belegen eine Beteiligung des PEX10-Zink-RING-Fingers an der Peroxisomen-Formgebung, am Organellenkontakt zwischen Blatt-Peroxisomen und Chloroplasten sowie am Kontakt zwischen Blatt-Peroxisomen und Mitochondrien im Zuge der Photorespiration. Neben dem Zink-RING-Finger im C-Terminus von PEX10 ist auch das konservierte Motiv TLGEEY im N-Terminus an der Peroxisomen-Formgebung beteiligt und zudem am peroxisomalen Matrixproteinimport. Die Punktmutation PEX10-G93E im TLGEEY-Motiv führt - wie auch der Funktionsverlust des Zink-RING-Fingers - zu Letalität in homozygoten Pflanzen, zu einem reduzierten Wachstum von heterozygoten Pflanzen, zu einer Störung des peroxisomalen Matrixproteinimports und zu einer Formstörung der Blatt-Peroxisomen. Ein Kontaktverlust zu den Chloroplasten wurde nicht beobachtet.

Bei der Suche nach Organellenkontakt vermittelnden Interaktionspartnern von PEX10 wurde das Ca^{2+} -bindende, cytosolische Protein AtCP1 mittels *Yeast two-Hybrid-Screen* identifiziert und *in vitro* als Interaktionspartner von PEX10 nachgewiesen.

Summary

In Eukaryotes, peroxisomes are involved in a large number of metabolic processes, such as the detoxification of reactive oxygen species. Two additional important peroxisomal functions in plants are photorespiration and the β -oxidation of fatty acids during storage lipid mobilization. In this thesis, the formation of a glyoxysomal reticulum during storage lipid mobilization in the *Arabidopsis* wild-type could be demonstrated. The glyoxysomal reticulum arises via the fusion of distinct, spherical glyoxysomes to form a knotted structure in direct proximity to the storage lipids. In germinating seeds of *Arabidopsis*, the glyoxysomal reticulum can be detected only during a brief window of time, during the rapid mobilization of storage lipids.

The C-terminal zinc RING-finger domain is common to the three peroxisomal membrane proteins PEX2, PEX10 and PEX12. It coordinates Zn^{2+} -ions, serves as a protein-protein interaction motif and has E3-ligase activity during ubiquitination. A complete knockout of one of these three PEX proteins in *Arabidopsis* results in embryo lethality. Overexpression of PEX2, PEX10 and PEX12 with a dysfunctional zinc RING-finger in the genomic background (ΔZn -mutants) confirmed the function of the zinc RING-finger in germinating seed. PEX2- ΔZn -mutants have an impaired glyoxysomal matrix protein import. A disruption of the zinc RING-finger domain in PEX10 and PEX12 affects the formation of the glyoxysomal reticulum.

PEX10- ΔZn -mutants corroborate the involvement of the PEX10 zinc RING-finger in peroxisomal biogenesis, in the inter-organelle contact between peroxisomes and chloroplasts in leaves, and in the contact between leaf peroxisomes and mitochondria during photorespiration. In addition to the zinc RING-finger domain in the PEX10 C-terminus, the conserved motif TLGEEY in the PEX10 N-terminus is also involved in peroxisomal biogenesis and matrix protein import. As observed for the dysfunctional (ΔZn) zinc RING-finger domain mutation, the PEX10-G93E point mutation in the TLGEEY motif also causes embryo lethality in homozygous plants. In heterozygous plants, the PEX10-G93E mutation results in reduced growth, impairment of peroxisomal matrix protein import and misshaped leaf peroxisomes. A loss of contact between chloroplasts and peroxisomes, however, was not observed.

In a yeast two-hybrid screen for interaction partners of PEX10 that mediate organelle contact, we identified a cytosolic Ca^{2+} -binding protein, AtCP1. The protein-protein interaction was confirmed in *in vitro* binding assays.

1. Einleitung

1.1. Peroxisomen

Peroxisomen sind von einer Einheitsmembran umgebene Zellorganellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen eine Vielzahl lebensnotwendiger Funktionen erfüllen. Dabei zeigen sie eine morphologische und metabolische Vielfalt, welche von Organismus, Zelltyp und nicht zuletzt von den gegebenen Umwelteinflüssen abhängt und somit Peroxisomen zu einem echten Vielzweck-Organell für die Zelle macht.

Beschrieben wurden Peroxisomen zum ersten mal 1954 in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von Mauseleber als „spherical and oval microbodies“ (Rhodin, 1954). Namensgebend war die biochemische Charakterisierung 1966 in Säugerzellen, bei der Katalase- und Peroxidase-Aktivität in den *microbodies* nachgewiesen wurde (De Duve and Baudhuin, 1966). Im selben Zeitraum wurden auch die *microbodies* in der Pflanzenzelle untersucht und 1969 als Blatt-Peroxisomen identifiziert (Mollenhauer and Morre, 1966; Frederick and Newcomb, 1969). Kurz zuvor waren in Pflanzen die Glyoxysomen als eine weitere Peroxisomenklasse beschrieben worden (Breidenbach et al., 1968) und wurden wie die Peroxisomen nach einem für sie biochemischen Charakteristikum, dem Glyoxylat-Zyklus, benannt. In den folgenden Jahren wurden noch weitere Sonderformen der Peroxisomen entdeckt und manche mit eigenen Namen versehen, wenn eine Spezialisierung vorlag, die von der Funktion der Peroxisomen abwich. So werden die Peroxisomen der Trypanosomen als Glycosomen bezeichnet (van den Bosch et al., 1992; Michels et al., 2006). In diesen spezialisierten Peroxisomen des Malariaerregers läuft der Großteil der Glycolyse ab. In einigen Ascomyceten-Arten sind zusätzlich zu Peroxisomen die sogenannten *woronin-bodies* zu finden, welche den Pilzen zum Wundschluss dienen (Soundararajan et al., 2004). Wird eine Pilzhyphe verletzt, so verschließen die *woronin-bodies* die Septal-Poren zwischen unverletzten und verletzten Zellen. Auf diese Art und Weise werden die Cytoplasmabrücken geschlossen und der Pilz „verblutet“ nicht. In Käfern der Familie *Lampyridae* dienen die Peroxisomen unter anderem zur Erzeugung von Biolumineszenz mittels Luciferase (Shimomura and Johnson, 1975). Da die Biolumineszenz die „üblichen“ peroxisomalen Aufgaben nicht beeinträchtigt, sondern vielmehr eine zusätzliche Funktion der Peroxisomen darstellt, hat sich für diesen Peroxisomen-Typ kein Eigenname etabliert.

Auch wenn es viele Arten von spezialisierten Peroxisomen gibt, so erfüllen sie doch bei Säugern, Pflanzen und Pilzen die gleichen wichtigen Funktionen. Allen ist die

β -Oxidation von Fettsäuren gemein, wobei bei Säugern nur die β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren in den Peroxisomen stattfindet, während kurzkettige Fettsäuren in den Mitochondrien oxidiert werden (Poirier et al., 2006). Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), wie etwa H_2O_2 , durch Katalase dar. Diese ROS entstehen bei der β -Oxidation als Nebenprodukt und wirken in höheren Konzentrationen als Zellgift (Halliwell, 2006). In niederen Konzentrationen dienen ROS in Pflanzen als Signalmoleküle. Ebenso wirken im Menschen die Lipid-Liganden für die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PRAR), auch Nebenprodukte der β -Oxidation, als Signalmoleküle (Kersten et al., 2000; Baker et al., 2006). Die Enzyme der peroxisomalen β -Oxidation sind zudem an der Synthese der pflanzlichen Phytohormone Jasmonsäure und Indol-3-Essigsäure beteiligt (Baker et al., 2006). Zu den weiteren Funktionen der Peroxisomen zählen die α -Oxidation von verzweigten Fettsäuren in Säugern und Pflanzen (Jansen and Wanders, 2006), die Hauptreaktionen der Photorespiration in Blatt-Peroxisomen (Reumann and Weber, 2006), bei der ein besonders enger Kontakt zwischen den Peroxisomen, den Chloroplasten und den Mitochondrien besteht, die letzten Schritte der Penicillin-Biosynthese in einigen Fadenpilzen (Muller et al., 1991) und die Synthese von Gallensäure und Lipidverbindungen wie Plasmalogen und Cholesterol (Wanders, 2004).

1.1.1. Peroxisomen-Biogenese

Es hat lange gedauert, etwas Licht in die Vorgänge der Peroxisomen-Biogenese zu bringen. Jahrzehnte diskutierte man die Entstehungs- und Verteilungsmechanismen von Peroxisomen in sich teilenden Zellen. Es standen sich das *growth-and-division-model* (Lazarow and Fujiki, 1985) und das *ER-vesiculation-model* (Beevers, 1979) gegenüber. Gemäß dem *growth-and-division-model* vermehren sich Peroxisomen ähnlich Mitochondrien und Chloroplasten durch Teilung, dem *ER-vesiculation-model* nach schnüren sich Peroxisomen vom Endoplasmatischen Reticulum ab und entstehen sozusagen neu. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, mussten die Biogenese-Faktoren der Peroxisomen entschlüsselt werden. Ein diesbezüglicher Durchbruch gelang im Jahr 1987 Veenhuis und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass *Saccharomyces cerevisiae* auf Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann (Veenhuis et al., 1987). Da in Hefe die Peroxisomen der alleinige Ort der β -Oxidation sind, würde sich eine Beeinträchtigung der Peroxisomen-Funktion sofort im Wachstum der Hefen widerspiegeln. Dies ermöglichte, gezielt nach Peroxisomen-Biogenesemutanten, *pex*-Mutanten genannt (Erdmann et al., 1989; Erdmann et al.,

1991), zu suchen und die involvierten *PEX*-Gene zu identifizieren. Die Genprodukte der *PEX*-Gene wurden als Peroxine bezeichnet (Distel, 1996), die Nomenklatur in Säugern und Pflanzen lautet PEXN, in Hefe jedoch PexNp. Es sind bisher insgesamt 32 Peroxine identifiziert worden (Vizeacoumar et al., 2004; van der Zand et al., 2006; Schrader and Fahimi, 2008), welche sich funktionell in zwei Gruppen aufteilen lassen. Bei den beiden Hauptfunktionen handelt es sich erstens um die Biogenese der sich entwickelnden Peroxisomenmembran und um die Proliferation der Peroxisomen und zweitens um den Import von Matrixproteinen in das peroxisomale Lumen.

Zur ersten Gruppe der in die Peroxisomenmembran-Biogenese involvierten Peroxine gehören PEX3, PEX16 und PEX19. Es wurde zuerst in menschlichen Zellen gezeigt, dass ein funktionelles Fehlen eines dieser *PEX*-Gene zu einer vollständigen Abwesenheit der Peroxisomen führt (Matsuzono et al., 1999; Ghaedi et al., 2000; Sacksteder et al., 2000). Gleiches konnte für PEX3 und PEX19 in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden; für PEX16 scheint es kein Homolog in der Hefe zu geben (Hettema et al., 2000). Durch funktionelle Komplementation dieser *PEX*-Mutanten war es möglich, voll funktionsfähige Peroxisomen *de novo* entstehen zu lassen (Matsuzono et al., 1999; Ghaedi et al., 2000; Honsho et al., 2002). Dies zeigt die zentrale Rolle der Peroxine PEX3, PEX16 und PEX19 in der Peroxisomenmembran-Biogenese.

PEX16 ist ein peroxisomales Membranprotein, dessen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Wie bereits erwähnt ist PEX16 in Hefen mit Ausnahme von *Yarrowia lipolytica* nicht zu finden, spielt aber in *Homo sapiens* und in *Arabidopsis thaliana* eine gewichtige Rolle in der Peroxisomenmembran-Biogenese (Honsho et al., 1998; Titorenko et al., 1998; Lin et al., 1999; Kim et al., 2006). Es gibt Hinweise auf die Beteiligung an einer möglichen Protein-Insertionsmaschinerie in der Membran, wogegen andere Befunde PEX16 in Verbindung mit der Verankerung von PEX3 in der Peroxisomenmembran sehen (Kim et al., 2006; Matsuzaki and Fujiki, 2008).

PEX3 ist ebenfalls ein peroxisomales Transmembranprotein und dient als Bindestelle für den Komplex aus PEX19 und neu synthetisierten peroxisomalen Membranproteinen (Muntau et al., 2003; Fang et al., 2004; Hoepfner et al., 2005). Vermutlich ist PEX3 eines der ersten Proteine, wenn nicht sogar das erste, welches in die *de novo*-Formation von Peroxisomen involviert ist.

Bei PEX19 handelt es sich um ein farnesyliertes, hauptsächlich cytosolisches Protein, es lokalisiert aber auch an oder in der Peroxisomenmembran. Hinzu kommt, dass PEX19 mit fast allen peroxisomalen Membranproteinen *in vitro* und *in vivo* interagiert (Snyder et al., 2000; Fransen et al., 2001; Hadden et al., 2006). Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, dass PEX19 als Rezeptor für im Cytosol neu synthetisierte peroxisomale Membranproteine dient, mit diesen einen Komplex bildet und über PEX3

an die peroxisomale Membran andockt. Dort werden anschließend die peroxisomalen Membranproteine in die Peroxisomenmembran inseriert und PEX19 kehrt ins Cytosol zurück, um wieder als Rezeptor zur Verfügung zu stehen (Rottensteiner et al., 2004; Rucktaschel et al., 2009). Zudem wird PEX19 eine Chaperon-Funktion zugeschrieben, welche die peroxisomalen Membranproteine vor Aggregation im Cytosol schützt (Jones et al., 2004; Shibata et al., 2004). PEX19 könnte auch als Membranintegrationsfaktor für peroxisomale Membranproteine dienen (Snyder et al., 2000; Fransen et al., 2001).

Peroxisomale Membranproteine besitzen nicht die herkömmlichen peroxisomalen *Targeting*-Signale (PTS) wie die peroxisomalen Matrixproteine. Der Großteil der peroxisomalen Membranproteine wird von PEX19 erkannt und besitzt dazu eine interne Erkennungssequenz. Diese PEX19-Bindestelle besteht aus einer Ansammlung basischer oder basischer und hydrophober Aminosäuren (Sparkes and Baker, 2002; Rottensteiner et al., 2004; Van Ael and Fransen, 2006). Diese Bindestellen sind jedoch so variabel, dass ein einheitliches Motiv nicht angegeben werden kann. Peroxisomale Membranproteine benötigen für ein korrektes *Targeting* zusätzlich zu dieser PEX19-Bindestelle mindestens eine Transmembrandomäne. Es werden jedoch auch Peroxine, die sich in der Peripherie der Peroxisomenmembran befinden durch PEX19 erkannt und zu den Peroxisomen gebracht. Diese besitzen anstelle der Transmembrandomäne eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, mit der sie an ein peroxisomales Transmembranprotein assoziieren werden.

Zusätzlich zu dem PEX19-abhängigen Transport von peroxisomalen Membranproteinen zu den Peroxisomen gibt es noch einen zweiten, von PEX19 unabhängigen Weg. Bei diesem Transportweg werden die peroxisomalen Membranproteine zuerst in das ER geschleust und von dort mittels Vesikeln zu den Peroxisomen transportiert. Zu diesen Proteinen gehören Pex3p und Pex22p in Hefe (Halbach et al., 2009) und PEX16 und möglicherweise PEX10 in *Arabidopsis thaliana* (Flynn et al., 2005; Mullen and Trelease, 2006; Karnik and Trelease, 2007). Auch hier ist eine eindeutige Unterscheidung der Importsignale für ER und Peroxisomen nicht möglich. Aus Lokalisationsstudien mit PEX16-Proteinsequenz-Stücken in *A. thaliana* ist bekannt, dass die beiden Importsignale für ER und Peroxisomen zu überlappen scheinen und die beiden Transmembrandomänen eine wichtige Rolle für einen korrekten Import spielen (Karnik and Trelease, 2007). Die vom ER abgeschnürten Vesikel werden als ERPIC (*ER peroxisome intermediate compartment*) bezeichnet und scheinen in Pflanzen mit bereits bestehenden Peroxisomen zu verschmelzen (Trelease and Lingard, 2006), in Hefen und Säugern jedoch neue Peroxisomen zu bilden (Kunau, 2005; Kim et al., 2006; Titorenko and Mullen, 2006). Es existieren auch Hinweise auf einen retrograden Vesikeltransport von Peroxisomen zum ER in Pflanzen. In mit Tombusvirus infizierten Pflanzenzellen

konnte gezeigt werden, dass das virale Protein p33 zuerst in die Peroxisomen importiert wird und anschließend in Vesikeln zum ER geschleust wird (Mullen and Trelease, 2006).

Peroxisomen entstehen jedoch nicht nur *de novo* durch verschmelzende ERPIC-Vesikel, sie teilen sich auch, um sich zu vermehren. Bei einem der ersten an diesem Prozess beteiligten Proteine handelt es sich um das Peroxin PEX11. In PEX11-Deletionsmutanten ist eine Vergrößerung der Peroxisomen und eine Verringerung ihrer Anzahl zu beobachten (Schrader and Fahimi, 2006; Nito et al., 2007), wogegen eine Überexpression zu einer Vermehrung der Peroxisomen führt (Schrader et al., 1998; Li et al., 2002; Rottensteiner et al., 2003; Tam et al., 2003; Orth et al., 2007). Es gibt in Pflanzen fünf Mitglieder der PEX11-Familie (PEX11a, PEX11b, PEX11c, PEX11d und PEX11e) (Lingard and Trelease, 2006), in Hefe drei (Pex11p, Pex25p und Pex27p) (Rottensteiner et al., 2003; Tam et al., 2003) und bei Säugern ebenfalls drei (PEX11 α , PEX11 β und PEX11 γ) (Schrader et al., 1998; Li et al., 2002). Zudem sind die Proteine FISSION1 (FIS1) und DYNAMIN-RELATED PROTEINs (DRPs), welche aus der Teilung bei Mitochondrien bekannt sind, an der Peroxisomenteilung beteiligt. Bei den DRPs handelt es sich um GTPasen, welche bei der Peroxisomenteilung für die Einschnürung verantwortlich sind (Thoms and Erdmann, 2005). Säuger-, Hefe- und Pflanzen-Zellen ohne das entsprechende DRP-Homolog (DLP1, Vsp1p/Dnm1p, DRP3A/3B) haben stark verlängerte Peroxisomen (Hoepfner et al., 2001; Li and Gould, 2003; Koch et al., 2004). FIS1 dient den DRPs in Peroxisomen als Membrananker (Koch et al., 2005; Schrader and Yoon, 2007). So scheint PEX11 für die Elongation und beginnende Einschnürung der Peroxisomen verantwortlich zu sein, während die DRPs die Peroxisomen voneinander abschnüren (Desai and Hu, 2008). In *S. cerevisiae* sind für die Trennung der abgeschnürten Peroxisomen Pex28p und Pex29p verantwortlich (Vizeacoumar et al., 2003). Die Proteine Pex30p, Pex31p und Pex32p scheinen am Peroxisomenwachstum beteiligt zu sein (Vizeacoumar et al., 2004).

Letztendlich ist somit sowohl das *growth-and-division-model* als auch das *ER-vesiculation-model* zumindest in Teilen bestätigt und die beiden Modelle lassen sich zu einem Gesamtmodell zusammenfügen, dem *ER semiautonomous peroxisome maturation and replication-Modell* (Mullen and Trelease, 2006). Das Zusammenspiel aus ERPIC und der Peroxisomen-Teilungsmaschinerie ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

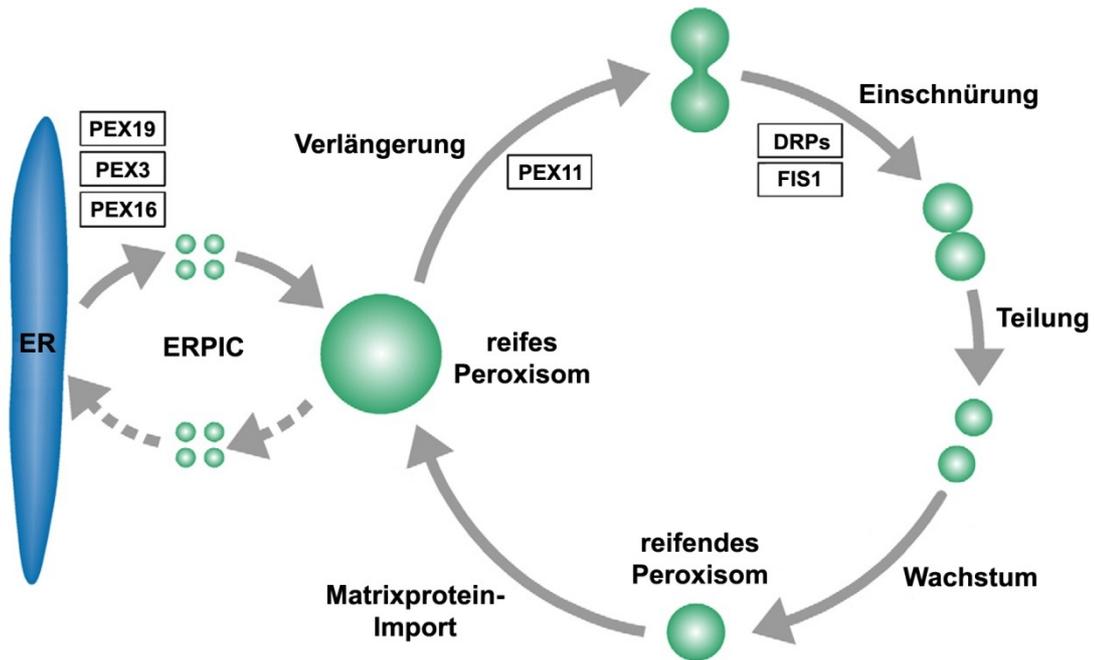


Abbildung 1: Das „ER semiautonomous peroxisome maturation and replication“-Modell. PEX19, PEX3 und PEX16 sind für die Peroxisomenmembran-Biogenese essenziell und deshalb nahe am ER und somit am Ort der *de novo*-Entstehung von Peroxisomen abgebildet. Es ist der ERPIC-Vesikelstrom vom ER zu den Peroxisomen dargestellt und der mögliche Vesikel-Rücktransport (gestrichelte Pfeile). Mitglieder der PEX11-Familie sorgen für die Elongation und beginnende Einschnürung der Peroxisomen. Im Anschluss schnüren die durch FIS1 (FISION1) an die Peroxisomenmembran verankerten DRPs (DYNAMIN-RELATED PROTEINS) die Peroxisomen ab. Nach der Teilung wachsen die Peroxisomen wieder zu einem „reifen Peroxisom“, wozu Membranmaterial vom ER und Import der peroxisomalen Matrixproteine nötig ist. (Abgeändert nach Platta and Erdmann, 2007)

1.1.2. Der peroxisomale Matrixproteinimport

Da die Peroxisomen kein eigenes Genom wie etwa Chloroplasten oder Mitochondrien besitzen, sind alle peroxisomalen Proteine kerncodiert. Peroxisomale Matrixproteine werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert, posttranslational zu den Peroxisomen gebracht und dort integriert (Lazarow and Fujiki, 1985). Peroxisomale Matrixproteine werden von einer Reihe von Peroxinen importiert, welche entweder frei im Cytosol vorliegen oder sich in der peroxisomalen Membran befinden. Auch wenn es einige Gemeinsamkeiten mit bereits bekannten Proteinimport-Maschinerien gibt, unterscheidet sich der peroxisomale Matrixproteinimport in zwei Punkten fundamental von diesen. Zum einen werden peroxisomale Matrixproteine vollständig gefaltet mit Kofaktoren und sogar in kleinen Komplexen in die Peroxisomen importiert (Glover et al.,

1994; Walton et al., 1995). Zum anderen ist keine stabile Pore in der Peroxisomenmembran bekannt, durch welche Proteine gefaltet importiert werden können. Daher wird angenommen, dass ein Translokon nur bei Bedarf generiert wird und von transientser Natur ist (Erdmann and Schliebs, 2005; Stanley and Wilmanns, 2006; Ma and Subramani, 2009).

Obwohl bis jetzt die fundamentalen Mechanismen der Proteintranslokation in die Peroxisomen nicht verstanden sind, lässt sich der Importvorgang an sich in vier grundlegende Schritte einteilen: (1) Das peroxisomale Matrixprotein wird nach seiner Synthese im Cytosol von einem Rezeptor erkannt und gebunden. (2) Der mit dem Matrixprotein beladene Rezeptor gelangt zum Peroxisom und dockt dort an bestimmte peroxisomale Membranproteine an. (3) Das Matrixprotein wird in die Peroxisomen geschleust. (4) Der Rezeptor wird in das Cytosol zurückgeführt, um wieder zur Verfügung zu stehen.

1.1.2.1. Die Peroxisomalen *Targeting*-Signale PTS1 und PTS2 und deren Erkennung durch PEX5 und PEX7

Ebenso wie der Proteinimport in anderen Zellorganellen hängt der Proteinimport in Peroxisomen von Signalsequenzen ab. Diese Signalsequenzen werden in Peroxisomen *peroxisomal targeting signal* (PTS) genannt. Bis jetzt wurden zwei konservierte Motive identifiziert, die zum Matrixproteinimport in Peroxisomen führen und als PTS1 und PTS2 bezeichnet werden. Die Mehrzahl der in Peroxisomen importierten Proteine trägt ein PTS1, in *Arabidopsis* kennt man bis jetzt etwa 220 PTS1-Proteine (Reumann, 2004). Das PTS2-Importsignal ist bei Weitem nicht so häufig und in *Arabidopsis* sind bisher 74 Kandidaten bekannt (Kamada et al., 2003). Das PTS2-Importsignal wird nach dem Import von den Proteinen abgespalten. In *C. vulgaris* und *A. thaliana* übernimmt diese Aufgabe die DEG15-Protease (Helm et al., 2007). Interessanterweise scheint es für die PTS2-tragenden Proteine funktionell keinen Unterschied zu machen, ob die Signalsequenz abgespalten wird oder nicht (Gietl et al., 1996). Zudem wurden 30 Proteine in *Arabidopsis* identifiziert, bei denen es sich um peroxisomale Matrixproteine handelt, die aber weder PTS1 noch PTS2 tragen (Reumann, 2004).

Ursprünglich wurde das PTS1 als carboxylterminales Tripeptid mit der Sequenz (S/A/C)(K/R/H)(L/M) definiert (Gould 1989), jedoch ist inzwischen bekannt, dass für einen korrekten Import gelegentlich noch zusätzliche Aminosäuren vor dem SKL, bevorzugt Leucin und Valin, von Bedeutung sind. (Brocard and Hartig, 2006). Erkannt wird PTS1 vom vornehmlich cytosolischen Peroxin PEX5. Strukturell lässt sich PEX5 in

zwei unterschiedliche Domänen aufteilen. Am Carboxyl-Terminus befindet sich die hochaffine PTS1-Bindedomäne bestehend aus sieben Tetratricopeptid-Wiederholungen (TTRs, *tetratricopeptide repeats*) und einem Helixbündel, welche bei der Ligandenbindung eine Ring-ähnliche Struktur bilden (Gatto et al., 2000; Stanley et al., 2006). Am Amino-Terminus befinden sich Bindedomänen für andere Peroxine. Hier befinden sich nur wenige streng konservierte Aminosäuren, wie zum Beispiel das Pentapeptid WXXXF/Y (Otera et al., 2002). Es wird vermutet, dass diese Domänen für das Binden an die Peroxisomenmembran und für den Kontakt zu Peroxinen der Rezeptor-Recycling-Maschinerie verantwortlich sind (Stanley et al., 2006).

Das zweite peroxisomale *Targeting*-Signal PTS2 ist ein Nonapeptid und befindet sich nahe dem Amino-Terminus und besteht aus den Aminosäuren R(L/V/I/Q)XX(L/V/I/H)(L/S/G/A)X(H/Q)L (Lazarow, 2006). Während in *S. cerevisiae* nur Thiolase ein PTS2 trägt (Marzioch et al., 1994), besitzen um ein vielfaches mehr Proteine in *Arabidopsis* ein PTS2 (Reumann et al., 2004). Interessanterweise fehlt in *Caenorhabditis elegans* der durch PTS2 vermittelte Proteinimport völlig (Motley et al., 2000). PTS2-tragende Proteine werden von dem cytosolischen Protein PEX7 erkannt. PEX7 gehört zur WD40-Protein-Familie, welche sich durch Domänen mit Wiederholungen der Aminosäuren Tryptophan (W) und Aspartat (D) auszeichnet (Marzioch et al., 1994; Zhang and Lazarow, 1995). Im Gegensatz zu PEX5 ist PEX7 alleine jedoch nicht in der Lage, den Import von PTS2-tragenden Proteinen zu vermitteln. Hierfür sind bei PEX7 ein oder mehrere Co-Faktoren nötig. Pex20p wird in *Y. lipolytica*, *P. pastoris*, *H. polymorpha* und *N. crassa* zum PTS2-abhängigen Import benötigt (Titorenko et al., 1998; Sichtung et al., 2003; Otzen et al., 2005; Leon et al., 2006), wogegen in *S. cerevisiae* die strukturell verwandten Proteine Pex18p und Pex21p notwendig sind (Purdue et al., 1998). In Säugern gibt es zwei *Splice*-Varianten von PEX5, eine kurze (PEX5S) und eine lange (PEX5L) (Otera et al., 2000). Beide Varianten sind in der Lage PTS1 zu binden und PTS1-abhängigen Matrixproteinimport zu vermitteln. Jedoch ist nur PEX5L in der Lage, an PEX7 zu binden und als Co-Faktor den PTS2-abhängigen Import zu ermöglichen (Matsumura et al., 2000). In *Arabidopsis* formen PEX5 und PEX7 einen PTS1/PTS2-Rezeptor-Komplex, indem der PEX5-N-Terminus mit dem PEX7-C-Terminus interagiert (Nito et al., 2002). In *pex5*-Mutanten, in denen speziell diese Interaktion nicht mehr zustande kommt, ist der Import von PTS1-Proteinen nicht gestört, der PTS2-Protein-Import jedoch unterbrochen (Woodward and Bartel, 2005). Beeinträchtigung des PEX5-Expressionslevels schlägt sich sowohl auf den PTS1-vermittelten als auch auf den PTS2-vermittelten Proteinimport nieder (Hayashi et al., 2005). Die Beziehungen der einzelnen Matrixproteinimportrezeptoren in den verschiedenen Spezies ist in Abbildung 2 zusammengefasst.

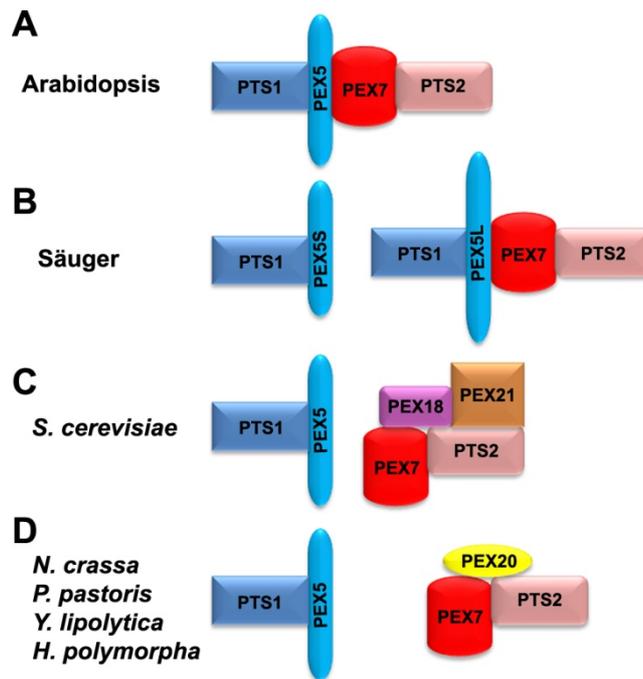


Abbildung 2: Für den PTS1- und PTS2-vermittelten Matrixproteinimport in Peroxisomen existieren verschiedene Receptor-Konstellationen in Pflanze, Säuger und Hefe. (A) In *Arabidopsis* benötigt man PEX5 sowohl für den PTS1- als auch für den PTS2-vermittelten Proteinimport. **(B)** In Säugern gibt es zwei *Splice*-Varianten von PEX5, PEX5S und PEX5L. Beide binden PTS1 aber nur PEX5L vermag PEX7 zu binden und so den Import von PTS2-Proteinen zu ermöglichen. **(C)** In *S. cerevisiae* werden PTS1-Proteine von PEX5 importiert, der Import von PTS2-Proteinen wird von PEX7 mit den Co-Rezeptoren PEX18 und PEX21 durchgeführt. **(D)** In den Hefen *N. crassa*, *P. pastoris*, *Y. lipolytica* und *H. polymorpha* verläuft der PTS1-Import wie in *S. cerevisiae*, PEX7 benötigt hier jedoch PEX20 als Co-Rezeptor für den PTS2-vermittelten Matrixproteinimport. Der Einfachheit halber wurde die Nomenklatur der Säuger und Pflanzen verwendet. (Abgeändert nach Brown and Baker, 2008)

Es werden zudem auch Proteine in Peroxisomen importiert, welche weder ein PTS1 noch ein PTS2 tragen. So bilden einige Proteine ohne ein PTS, beispielsweise Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), delta3,delta2-Enoyl-CoA-Isomerase (Eci1p) und Acyl-CoA-Oxidase (Aox), einen Komplex mit PTS-tragenden Proteinen und werden sozusagen „Huckepack“ in das Peroxisom importiert (McNew and Goodman, 1994; Yang et al., 2001; Titorenko et al., 2002). Andere Proteine, wie Katalase oder die Malatsynthase aus *H. polymorpha*, interagieren direkt mit PEX5, ohne jedoch ein PTS1 oder PTS2 zu besitzen (van der Klei and Veenhuis, 2002; van der Klei and Veenhuis, 2006). Da es sich bei der Interaktionsstelle nicht um die PTS1-Interaktionsstelle handelt, vermutet man noch ein drittes peroxisomales *Targeting*-Signal PTS3 (Brown and Baker, 2008).

1.1.2.2. Das Andocken der mit dem Matrixprotein beladenen PTS-Rezeptoren PEX5 und PEX7 an die Peroxisomenmembran

Der Proteinkomplex, der PEX5 und PEX7 das Andocken an die Peroxisomenmembran ermöglicht, besteht in Pflanzen und in Säugern aus PEX13 und PEX14, in Hefe zusätzlich aus Pex17p (Agne et al., 2003). Bei PEX13 handelt es sich um ein peroxisomales Transmembranprotein, welches sowohl den Amino-, als auch den Carboxyl-Terminus ins Cytosol exponiert. Am N-Terminus befindet sich die Interaktionsstelle für PEX7, am C-Terminus befindet sich eine SH3-Domäne (*Scr-homology 3*), welche sowohl für den Kontakt zu PEX5 als auch für den Kontakt zu PEX14 verantwortlich ist (Erdmann and Blobel, 1996; Gould et al., 1996; Pires et al., 2003; Mano et al., 2006). PEX14 ist in Säugern und Pflanzen ein integrales Membranprotein, in *S. cerevisiae* jedoch ein außen an der Peroxisomenmembran gebundenes, peripheres Membranprotein. In *S. cerevisiae* interagiert Pex14p mit Pex17p, welches ebenfalls ein peripheres Membranprotein ist (Erdmann and Schliebs, 2005). Ein Homolog zu Pex17p wurde weder in Säugern noch in Pflanzen gefunden. In allen Spezies ist PEX14 an der Bindung von PEX5 beteiligt, in Säugern und Pflanzen ist die Affinität von PEX5 zu PEX14 sogar größer als zu PEX13 (Saidowsky et al., 2001; Nito et al., 2002; Otera et al., 2002). Mutationen in *Arabidopsis* PEX13 und PEX14 zeigen sowohl für PTS1-Proteine als auch für PTS2-Proteine eine Importstörung (Mano et al., 2006).

1.1.2.3. Der Import der Matrixproteine durch die Peroxisomenmembran

Obwohl detaillierte Kenntnisse über das *Targeting* von peroxisomalen Proteinen zu den Peroxisomen bestehen, sind das Prinzip des Proteinimports und auch das Translocon selbst unbekannt. Man weiß, dass PEX5, PEX7 und in Hefe zusätzlich Pex20p aus dem Cytosol in die Peroxisomenmatrix oder zumindest in die Peroxisomenmembran integriert werden und anschließend wieder im Cytosol zu finden sind (Rehling et al., 2000; Dammai and Subramani, 2001). Dies deutet auf einen Kreislauf der Rezeptoren während des Matrixproteinimports und das Rückführen der Rezeptoren in das Cytosol hin.

Das bisher plausibelste Modell beschreibt die Formung einer transienten Pore durch PEX5 (*transient pore model*), welche als Translocon für die PTS-Proteine dienen soll (Erdmann and Schliebs, 2005). Dieses Modell stützt sich auf die Eigenschaften, die dem Peroxin PEX5 zugeschrieben werden. PEX5 wandelt sich während des Proteinimports in die Peroxisomen von einem löslichen, cytosolischen Protein durch

Konformationsänderung zu einem peroxisomalen Membranprotein. Dabei ragt der C-Terminus mit der PTS1-Bindedomäne in die Peroxisomenmatrix. (Gouveia et al., 2000). PEX5 scheint zudem in der Lage zu sein, Homooligomere zu bilden und liegt membrangebunden in Komplexen vor (Reguenga et al., 2001). Außerdem inseriert rekombinantes PEX5 spontan in Phospholipid-Membranen (Stanley et al., 2006). Mit diesen Eigenschaften ähnelt PEX5 einer heterogenen Klasse von Toxinen, welche in die Membran inserieren und dabei eine Pore bilden (Dalla Serra and Menestrina, 2003; Wai et al., 2003).

Ebenso wenig wie über das Translocon weiß man über die Trennung der an die Rezeptoren PEX5 und PEX7 gebundenen Matrixproteine und deren Entlassung in die Peroxisomenmatrix. Das einzige Protein, welches bisher mit der Entlassung der gebundenen PTS-Proteine in die Peroxisomenmatrix in Verbindung gebracht wurde, ist Pex8p in Hefe. Bei Pex8p handelt es sich um das einzige intraperoxisomale, periphere Membranprotein, welches sowohl ein PTS1- als auch ein PTS2-Signal trägt (Waterham et al., 1994; Rehling et al., 2000). In Hefe ist die bisher am besten verstandene Funktion von Pex8p die Verbindung des Docking-Komplexes aus Pex13p, Pex14p und Pex17p mit dem peroxisomalem Zink-RING (*really interesting new gene*) -Finger Komplex bestehend aus Pex2p, Pex10p und Pex12p zu dem sogenannten *importomer* (Rayapuram and Subramani, 2006). Für eine Involvierung in die Entlassung von gebundenen Matrixproteinen in die Peroxisomenmatrix sprechen die nachgewiesenen Interaktionen mit Pex5p und dem PTS2-Co-Rezeptor Pex20p (Smith and Rachubinski, 2001; Wang et al., 2003; Leon et al., 2006).

1.1.2.4. Das Recycling der Rezeptor-Peroxine PEX5 und PEX7

Nachdem die PTS-tragenden Proteine von ihren Rezeptoren getrennt und in die Peroxisomenmatrix importiert wurden, müssen die Rezeptoren PEX5 und PEX7 inklusive Co-Rezeptoren wieder in das Cytosol rückgeführt werden, um erneut zur Verfügung zu stehen. Erst kürzlich gelang es, einige Mechanismen dieses Rückführungsprozesses zu verstehen. So muss der PTS1-Rezeptor PEX5 erst ubiquitiniert werden, bevor er wieder ins Cytosol geschleust wird (Platta et al., 2004; Carvalho et al., 2007; Platta et al., 2007). Bei Ubiquitinierung handelt es sich um einen konservierten Protein-Modifikationsmechanismus, bei dem Ubiquitin kovalent an ein Proteinsubstrat gebunden wird (Hershko and Ciechanover, 1998; Walling, 2006). Die Anbindung eines Ubiquitins erfolgt in drei Schritten, nämlich der Aktivierung des Ubiquitins durch Bindung an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), die Überführung

vom Ubiquitin-aktivierenden Enzym auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und schließlich die Übertragung des Ubiquitinrestes durch eine Ubiquitinligase (E3) auf das Substrat. Hierbei bindet die Ubiquitinligase sowohl Substrat als auch das Ubiquitin-konjugierende Enzym und ist somit in der Lage, ein oder mehrere Ubiquitinmoleküle als Kette an ein Substrat anzufügen (Bachmair et al., 2001; Walling, 2006). Ubiquitinierung wirkt bei der Rückführung von PEX5 möglicherweise als Signal, da bekannt ist, dass Polyubiquitinierung als Signal zur Degradation im 26S-Proteasom dient und Monoubiquitinierung eine Weiterverwendung des modifizierten Proteins zur Folge hat (Raiborg and Stenmark, 2009) (Abbildung 3).

In Hefe konnte gezeigt werden, dass die Polyubiquitinierung von Pex5p hauptsächlich von dem E2-Protein Ubc4p abhängt und dessen Funktion zum Teil von Ubc5p oder Ubc1p übernommen werden kann (Platta et al., 2004; Kiel et al., 2005; Kragt et al., 2005). Polyubiquitinierung von PEX5 scheint nicht essenziell für die Funktion von PEX5 während des Matrixproteinimports in die Peroxisomen zu sein, es könnte jedoch einen Qualitätskontrollmechanismus darstellen (Platta et al., 2004; Kiel et al., 2005), der als RADAR (*Receptor Accumulation and Degradation in Absence of Recycling*) bezeichnet wird (Leon et al., 2006).

Monoubiquitinierung von Pex5p in Hefe wird von Pex4p (Ubc10p) und im Menschen von UbcH5a/b/c vermittelt (Platta et al., 2007; Grou et al., 2008; Williams et al., 2008). Diese Monoubiquitinierung sorgt für eine Rückführung von Pex5p in das Cytosol (Abbildung 3). Dort wird der Ubiquitinrest abgespalten und der Rezeptor steht wieder zum Matrixproteinimport zur Verfügung (Carvalho et al., 2007; Platta et al., 2007; Grou et al., 2008).

Kürzlich erst wurden die E3-Ligasen in Hefe identifiziert, welche den Ubiquitinrest von den bereits bekannten E2-Proteinen auf PEX5 übertragen. Es handelt sich hierbei um den Komplex aus den Zink-RING-Finger Peroxinen Pex2p, Pex10p und Pex12p (Williams et al., 2008; Platta et al., 2009). Pex12p ist zusammen mit Pex4p für die Monoubiquitinierung von Pex5p verantwortlich (Platta et al., 2009). Was die Polyubiquitinierung von Pex5p in Hefe betrifft, so scheinen sowohl Pex2p als auch Pex10p daran beteiligt zu sein. Jedoch scheint Pex2p einen gewichtigeren Part an der Polyubiquitinierung von Pex5p zu übernehmen, da ein für die Ubiquitinierung dysfunktionales Pex2p eine gravierendere Auswirkung auf die Polyubiquitinierung zeigt als ein dysfunktionales Pex10p (Williams et al., 2008; Platta et al., 2009; Prestele, 2009).

Vor Kurzem konnte in Pflanze die Interaktion zwischen PEX12 und PEX7 gezeigt werden (Singh et al., 2009) und in Hefe wurde eine Ubiquitinierung der Co-Rezeptoren von Pex7p, Pex18p und Pex20p an der Peroxisomenmembran festgestellt (Purdue and Lazarow, 2001; Leon et al., 2006). Da eine Beeinträchtigung der Funktion von PEX4

oder der Zink-RING-Finger-Proteine sich sowohl auf den PTS1- als auch auf den PTS2-abhängigen Import auswirkt, muss noch geklärt werden, inwieweit die Ubiquitinierungskaskaden von Pex5p auch an der Ubiquitinierung von den PTS2-Importrezeptoren beteiligt sind.

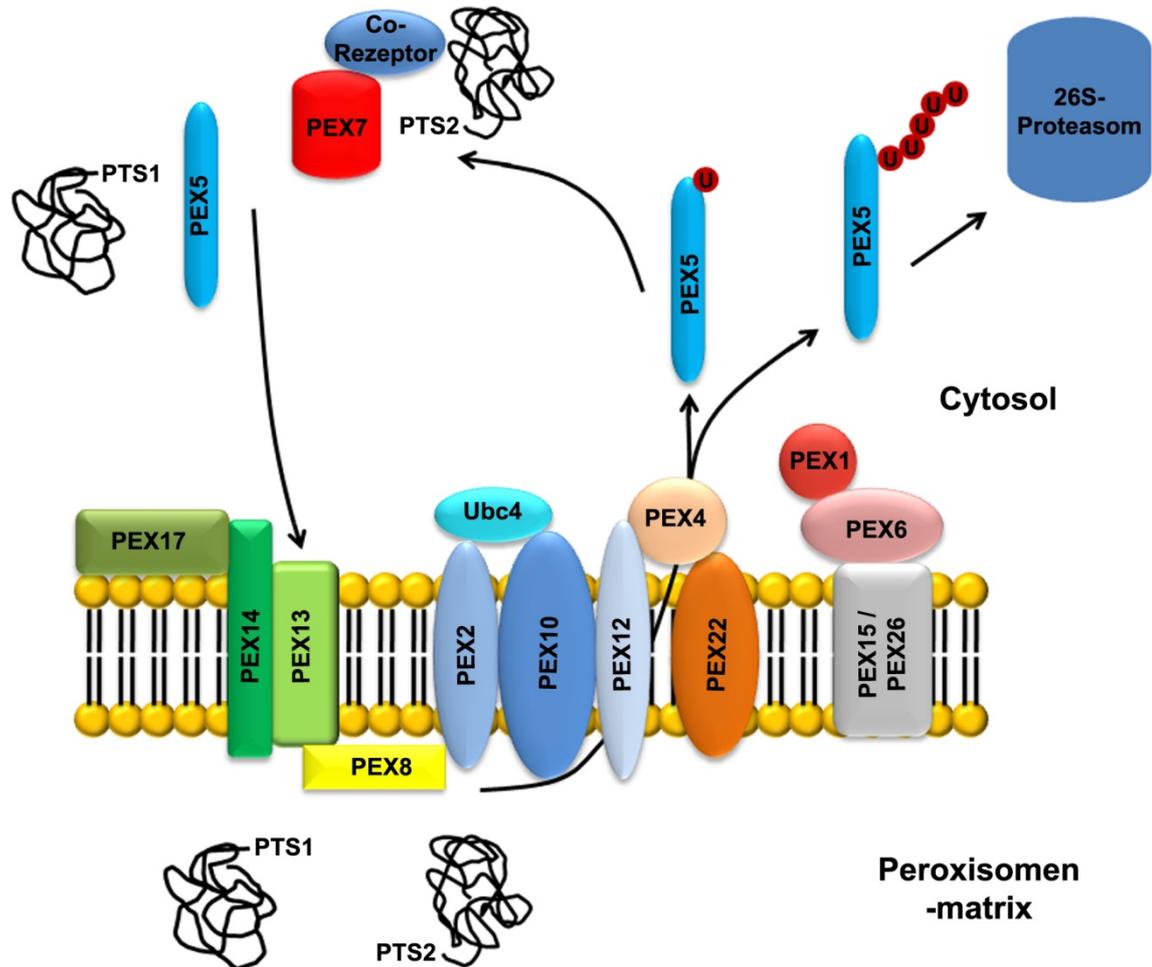


Abbildung 3: Der Matrixproteinimport in die Peroxisomen und die Rückführung der PTS1-Rezeptors PEX5 in das Cytosol. Peroxisomale Matrixproteine haben entweder eine PTS1- oder ein PTS2-Sequenz, welches von cytosolischen Rezeptoren erkannt wird. PEX5 bindet PTS1 und PEX7 bindet unter Zuhilfenahme verschiedener, Spezies-abhängiger Co-Rezeptoren PTS2. Der Rezeptor-Matrixprotein-Komplex bindet an die Peroxine PEX13 und PEX14, in Hefe zusätzlich an PEX17, an der Peroxisomenmembran und die Matrixproteine werden in das Peroxisom importiert. Dies geschieht vermutlich durch den PTS1-Rezeptor PEX5, welcher eine transiente Pore bildet. Nachdem die Rezeptoren von ihrer Fracht getrennt wurden, in Hefe vermutlich durch PEX8, wird das Translocon aufgelöst und die Rezeptoren wieder ins Cytosol zurückgeführt. Hierzu ist eine Ubiquitinierung nötig, welche in Hefe durch die E2-Proteine Ubc4 (Polyubiquitinierung) und PEX4 (Monoubiquitinierung) vorbereitet und den RING-Finger-Komplex aus PEX2, PEX10 (Polyubiquitinierung) und PEX12 (Monoubiquitinierung) als E3-Ligasen vollzogen wird. Aus der Peroxisomenmembran werden die ubiquitinierten Rezeptoren durch dem AAA-Proteinkomplex (PEX1 und PEX6) ATP-abhängig entlassen. Monoubiquitinierte Rezeptoren werden wiederverwendet, polyubiquitinierte Rezeptoren im 26S-Proteasom degradiert. (Angelehnt an Brown and Baker, 2008)

Die ATP-abhängige Ubiquitinierung der PTS-Rezeptoren ist Voraussetzung für deren Rückführung in das Cytosol. Die einzigen in Peroxisomen bekannten ATPase-Peroxine sind PEX1 und PEX6. Sie gehören zu der AAA-Protein-Familie (*ATPase associated with diverse cellular activities*) und interagieren ATP-abhängig miteinander (Miyata and Fujiki, 2005; Platta et al., 2005, Fujiki, 2008). In Hefe sind Pex1p und Pex6p über Pex15p mit der Peroxisomenmembran assoziiert, in Säugern über PEX26 (Birschmann et al., 2003; Matsumoto et al., 2003). Der genauer Freisetzungsmechanismus der Rezeptoren aus der Peroxisomenmembran durch die AAA-Proteine PEX1 und PEX6 ist unbekannt. Es existiert jedoch ein Exportsystem im Endoplasmatischen Reticulum für missgefaltete, polyubiquitinierte Proteine, welches dem der Peroxisomen zu ähneln scheint. Dieses System wird als ERAD (*endoplasmic-reticulum associated degradation*) bezeichnet (Raasi and Wolf, 2007). Hierbei scheint im Zuge des Proteinexports aus dem ER der N-Terminus des AAA-Proteins Cdc48p mit den ubiquitinierten Proteinen direkt oder indirekt zu interagieren und weist eben für diese Interaktionsregion eine sehr hohe Ähnlichkeit zu Pex1p aus Hefe auf. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird eine ATP-abhängige Konformationsänderung von PEX5 als treibende Kraft zur Freisetzung in das Cytosol vermutet (Shiozawa et al., 2004; Park et al., 2005; White and Lauring, 2007). Obwohl alle Komponenten für eine Ubiquitinierung (PEX1, PEX4, PEX6 und der Zink-RING-Finger Komplex) in Pflanzen konserviert sind, konnte eine Ubiquitinierung der Importrezeptoren bislang nicht nachgewiesen werden.

Sind die Rezeptoren in das Cytosol ausgeschleust, so werden die monoubiquitinierten durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs, *deubiquitinating enzymes*) von Ubiquitin befreit und stehen wieder als Rezeptor zur Verfügung. Polyubiquitinierte Proteine werden im 26S-Proteasom degradiert.

1.1.3. Die Zink-RING-Finger-Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12

PEX2 (At1g79819), PEX10 (At2g26350) und PEX12 (At3g04460) sind integrale Membranproteine und bilden in der Peroxisomenmembran der Hefe einen Komplex (Chang et al., 1999; Okumoto et al., 2000). Diesen drei Transmembranproteinen ist das Zink-RING (*really interesting new gene*)-Finger-Motiv im C-Terminus gemein (Freemont et al., 1991), welches alle drei Proteine in das Cytosol exponieren. Mit diesem Zink-RING-Finger-Motiv sind PEX2, PEX10 und PEX12 in der Lage, Zink-Ionen mittels konservierter Cysteine und eines konservierten Histidins in einer *cross-brace*-Struktur zu koordinieren (Abbildung 4) (Barlow et al., 1994; Borden and Freemont, 1996; Borden, 2000; Kosarev et al., 2002). Die konservierten Motive gehören dem RING-HCa-Typ an,

einem von acht RING-Typen in *Arabidopsis* (Stone et al., 2005), und lauten bei PEX2 und PEX10 C₃HC₄, bei PEX12 lautet es C₅. Durch diese Motive koordinieren PEX2 und PEX10 zwei Zink-Ionen, PEX12 koordinieren nur ein Zink-Ion, da die Cysteine an Position drei und sieben sowie das Histidin an Position vier fehlen (Abbildung 4).

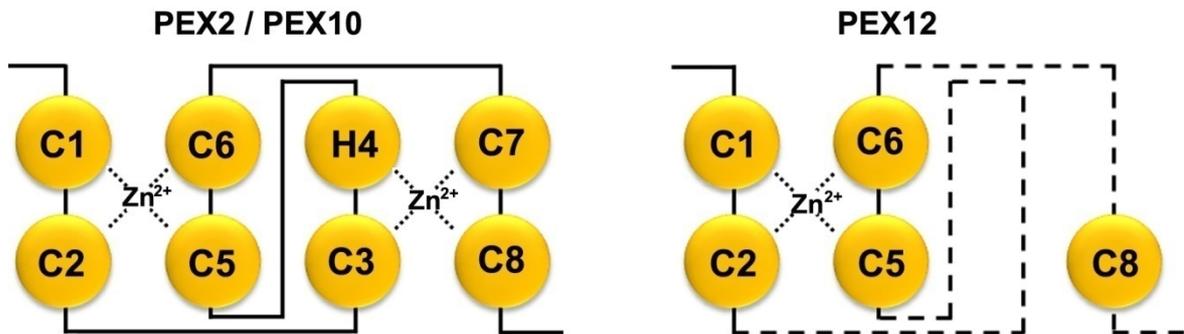


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zink-RING-Finger-Domänen von PEX2, PEX10 und PEX12. Bei PEX2 und PEX10 (links) ermöglichen sieben Cysteine (C) und ein Histidin (H) die Koordination von zwei Zn²⁺-Ionen. PEX12 (rechts) koordiniert ein Zn²⁺-Ion mittels vier Cysteinen (C). (Verändert nach Kosarev et al., 2002)

RING Finger-Proteine sind an verschiedenen Prozessen der Zellentwicklung beteiligt, in denen die RING-Finger-Domäne selbst die Aufgaben der Protein-Protein-Interaktion übernimmt (Lovering et al., 1993; Borden, 2000). *In silico*-Untersuchungen haben gezeigt, dass es in *A. thaliana* über 300 RING Finger-Proteine gibt (Bachmair et al., 2001; Kosarev et al., 2002; Stone et al., 2005) und diese durch ihre Zink-RING-Finger-Domäne möglicherweise auch als E3-Ligasen in der Ubiquitinierung fungieren können (Jackson et al., 2000).

Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass auch die Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 die Fähigkeit zur Ubiquitinierung besitzen (Williams et al., 2008; Platta et al., 2009), wobei der Zink-RING-Finger spezifisch das entsprechende E2-Protein bindet (Zheng et al., 2000; Christensen et al., 2007). Eine Beteiligung der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 am Matrixproteinimport in *Arabidopsis* konnte mittels RNAi-Linien durch Misslokalisierung des mit PTS1 versehenen Biolumineszenzmarkers GFP gezeigt werden (Nito et al., 2007).

Speziell im Falle von PEX10 werden dem Zink-RING-Finger mehrere Funktionen zugeschrieben. Zum einen katalysiert der Zink-RING-Finger im Zuge der PEX5-Polyubiquitinierung die Interaktion mit dem E2-Protein Ubc4 (Williams et al., 2008; Platta et al., 2009). Zum anderen ist der PEX10-Zink-RING-Finger auch für den Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten zuständig. Dies wird in PEX10 Δ Zn-Mutanten deutlich, in denen im Wildtyp-Hintergrund PEX10 mit

dysfunktionalem Zinkfinger unter dem 35S-Promotor überexprimiert wird. In diesen Mutanten konnte mittels Elektronenmikroskopie eine Formaberranz der Blatt-Peroxisomen und eine Kontaktverlust zu den Chloroplasten gezeigt werden. Der Kontaktverlust und die daraus resultierende Störung der Photorespiration äußert sich im makroskopischen Phänotyp der Mutante durch Chlorose und Zwergenwuchs. Kompensiert werden kann dieser Phänotyp durch Begasung mit Hoch-CO₂ (1800 ppm) (Schumann et al., 2007). Ob der für die Photorespiration ebenfalls notwendige Kontakt zwischen Peroxisomen und Mitochondrien gestört ist, ist nicht bekannt. Neben der Zink-RING-Finger-Domäne im C-Terminus besitzt PEX10 auch konservierte Motive am N-Terminus. Hierbei handelt es sich um ein konserviertes Prolin in Position 126 und das Motiv TLGEEY (aa 91-96) (Abbildung 5).

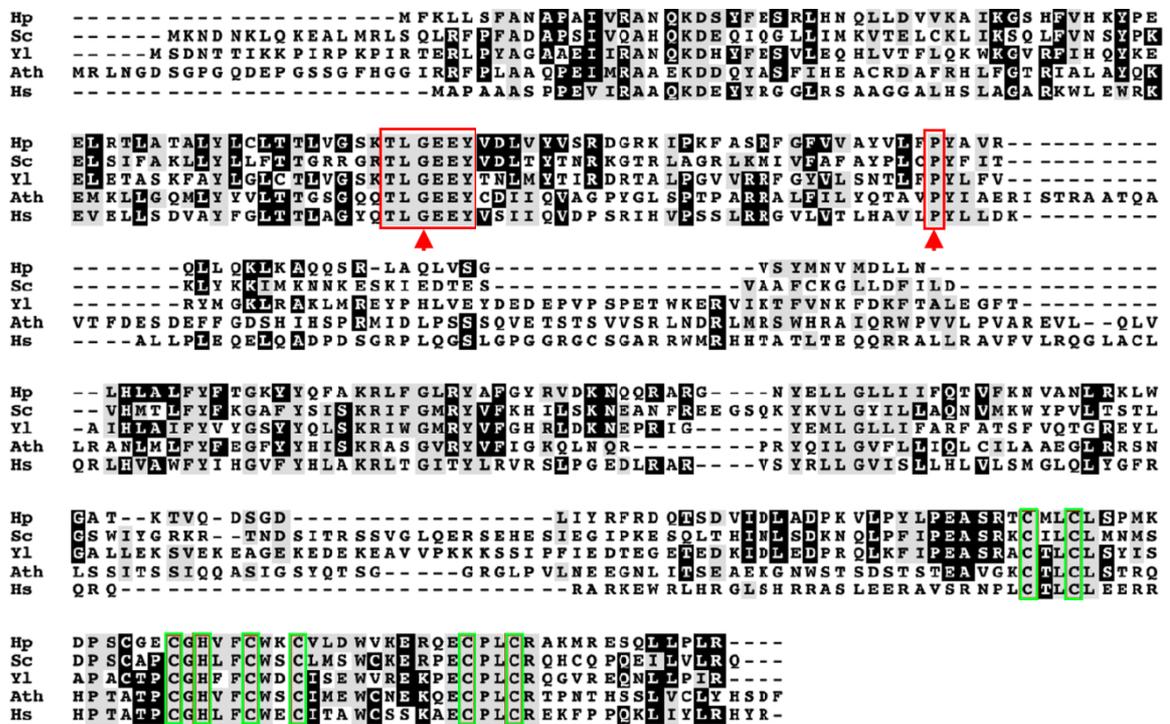


Abbildung 5: Ein Sequenzvergleich von PEX10 in verschiedenen Organismen zeigt im N-Terminus ein konserviertes TLGEEY-Motiv und ein konserviertes Prolin. Hp: *Hansenula polymorpha*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*; Ath: *Arabidopsis thaliana*; Hs: *Homo sapiens*. Die beiden N-terminal konservierten Motive sind rot eingrahmt und die Orte der TILLING-Aminosäuresubstitutionen G93E und P126S mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die Aminosäuren des C-terminal liegenden Zn-RING-Finger-Motivs sind grün gekennzeichnet. (Abgeändert nach Schumann et al., 2003)

Über die Funktion des N-Terminus von PEX10 ist nichts bekannt. Eine vollständige Funktionsunfähigkeit von PEX10 führt in *Arabidopsis* zu Embryoletalität (Sparkes et al., 2003, Schumann et al., 2003). Die *pex10*-Pflanzen sterben im Herzstadium ab;

elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ein vollständiges Fehlen von Peroxisomen sowie in Form und Anzahl stark beeinträchtigte Lipidkörper und Proteinbodies (Schumann et al., 2003).

Wie PEX10 ist auch PEX2 mit seiner Zink-RING-Finger-Domäne an der PEX5-Ubiquitinierung beteiligt und katalysiert die Interaktion mit dem E2-Protein Ubc4 in Hefe. Die Interaktion zwischen dem E2-Protein Ubc4 und PEX2 ist stärker als die Interaktion zwischen dem E2-Protein Ubc4 und PEX10 und es wird vermutet, dass PEX2 bei der Polyubiquitinierung von PEX5 und damit am Matrixproteinimport die Hauptrolle übernimmt (Platta et al., 2009). Diese Vermutung unterstützen die PEX2 Δ Zn-Mutanten. Wie im Falle der PEX10 Δ Zn-Mutanten wird hier im Wildtyp-Hintergrund PEX2 mit dysfunktionaler Zink-RING-Finger-Domäne unter dem 35S-Promotor überexprimiert. Bei der Untersuchung dieser Mutanten wurde eine peroxisomale Matrixproteinimportstörung beobachtet. Es konnte weder eine Kontaktstörung der Peroxisomen mit den Chloroplasten beobachtet werden, noch zeigten die Mutanten einen photorespiratorischen Phänotyp (Prestele, 2009). Ein Fehlen von PEX2 führt in *Arabidopsis* zu Embryoletalität (Hu et al., 2002).

Die Zink-RING-Finger-Domäne von PEX12 ist für die Monoubiquitinierung von PEX5 als E3-Ligase zusammen mit PEX4 als E2-Protein in Hefe verantwortlich und somit direkt am Matrixproteinimport beteiligt (Platta et al., 2009). Über die Funktion der PEX12-Zink-RING-Finger-Domäne in *Arabidopsis* ist nichts bekannt. RNAi-Konstrukte von PEX12 zeigen einen gestörten Import und weisen auf eine Beteiligung von PEX12 mit seiner Zink-RING-Finger-Domäne am Matrixproteinimport wie in Hefe hin (Nito et al., 2007). Wie bei den Peroxinen PEX2 und PEX10 ist ein kompletter Funktionsausfall von PEX12 in *Arabidopsis* embryonal (Fan et al., 2005). Es existieren Δ Zn-Mutanten, die in selber Weise wie die PEX10 Δ Zn-Mutanten PEX12 mit dysfunktionaler Zink-RING-Finger unter dem 35S-Promotor im Wildtyp-Hintergrund überexprimieren (Prestele, 2009). Es ist jedoch noch nichts über deren Phänotyp, makroskopisch wie mikroskopisch, bekannt.

Es ist somit wahrscheinlich, dass die Zink-RING-Finger-Domänen der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 in jedem Peroxin eine oder mehrere Funktionen übernehmen, die sich von der Funktion der Zink-RING-Finger-Domänen der anderen Peroxine unterscheidet.

1.2. Glyoxysomen

Bei Glyoxysomen handelt es sich um eine funktionell eigenständige Gruppe der Peroxisomen, welche in Pflanzen sowohl bei Keimung als auch bei Seneszenz essentielle Aufgaben übernehmen.

Bei der Keimung werden Reservestoffe mit Hilfe der Glyoxysomen mobilisiert und ermöglichen der Pflanze das Wachstum bis zum Erreichen der Photoautotrophie. Die Mobilisierung der Reservestoffe erfolgt mit Hilfe des für die Glyoxysomen namensgebenden Glyoxylat-Zyklus. Hierbei werden freie Fettsäuren in der β -Oxidation zu Acetyl-CoA-Einheiten zerlegt, aus welchen im Glyoxylat-Zyklus der C₄-Körper Succinat synthetisiert wird (Kornberg and Beevers, 1957; Cooper and Beevers, 1969). Von den fünf Enzymen des Glyoxylat-Zyklus (Citrat-Synthase, Acconitase, Isocitratlyase, Malatsynthase und Malatdehydrogenase) kommen nur zwei exklusiv in den Glyoxysomen vor, nämlich Isocitratlyase und Malatsynthase (Pracharoenwattana et al., 2005; Kunze et al., 2006; Pracharoenwattana et al., 2007); für die übrigen existieren Isoenzyme im Cytosol bzw. den Mitochondrien. Diese beiden Enzyme dienen somit auch als Markerenzyme für Glyoxysomen.

Ergrünen die Keimblätter, wandeln sich die Glyoxysomen zu Blatt-Peroxisomen (Titus and Becker, 1985; Nishimura et al., 1986) und übernehmen ihre zentrale Rolle in der Photorespiration. Beginnt die Seneszenz in den Keimblättern, so werden die Peroxisomen wieder in Glyoxysomen transformiert (De Bellis and Nishimura, 1991). Mit der Seneszenz auftretende Glyoxysomen wurden nicht nur in Keimblättern, sondern auch in seneszierenden Blättern und Blütenblättern gefunden (de Bellis et al., 1991), wodurch die Glyoxysomen vermutlich die Membranlipide der seneszierenden Zelle abgebaut und der Pflanze wieder zugeführt werden. Diese Umwandlung von Glyoxysomen zu Peroxisomen und wieder zurück bedingt einen Tausch der enzymatischen Grundausstattung der Organellen. Typisch für die Glyoxysomen sind die Enzyme Malatsynthase und Isocitratlyase und für die Peroxisomen Hydroxypyruvat-Reduktase und Glycolat-Oxidase (Hayashi et al., 2000). Die genauen Mechanismen, mit denen die Pflanze die Umwandlung steuert, sind nicht bekannt. Es konnte aber in Zellkulturen von *Pimpinella anisum* eine Umwandlung der Glyoxysomen in unspezialisierte Peroxisomen und zurück nur durch Austausch der Kohlenstoffquelle im Medium erreicht werden (Kudielka and Theimer, 1983).

Glyoxysomen benötigen eine effektive Matrixproteinimportmaschinerie, da die Umwandlung der Glyoxysomen zu Peroxisomen und damit der erwähnte Austausch der Matrixproteine schnell vonstatten gehen muss. Weil der Matrixproteinimport in die

Glyoxysomen ebenso wie der Matrixproteinimport in die Peroxisomen mit Hilfe der Peroxisomalen *Targeting* Signale 1 und 2 gesteuert wird (Gietl and Hock, 1982), ist anzunehmen, dass der Matrixproteinimport in die Glyoxysomen auf den selben Komponenten beruht und ebenso abläuft, wie der in die Peroxisomen.

Obwohl es sich bei den Glyoxysomen um spezialisierte Peroxisomen handelt, ist nicht klar, ob sie sich wie die Peroxisomen nach dem *ER semiautonomous peroxisome maturation and replication*-Modell (Mullen and Trelease, 2006) vermehren. In *Ricinus communis* konnte gezeigt werden, dass während der Keimung neu synthetisierte glyoxysomale Proteine und Membranen vom ER abstammen (Donaldson, 1976; Gonzalez and Beevers, 1976; Donaldson and Beevers, 1977; Donaldson and Beevers, 1978; Bergner and Tanner, 1981). Möglicherweise knospen glyoxysomale Vorstufen während der Samenreife zusammen mit Lipidkörpern vom ER ab und werden als eine Art Tasche an die Lipidkörper angeheftet (Wanner et al., 1981; Wanner et al., 1982). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten einen ER-Membranrest, welcher bei der Abknospung der Lipidkörper von spezialisierten Bereichen des ER durch Oleosine mit abgeschnürt wird und an den Lipidkörper verbleibt (Murphy, 1993) (Abbildung 5A). Hierbei handelt es sich nicht um angeheftete Glyoxysomen, sondern um eine ER-Tasche, welche noch Ribosomen trägt (Wanner and Theimer, 1978; Wanner et al., 1981).

In Samen dunkel gekeimter Wassermelone (*Citrullus vulgaris*) sind diese Anhänge aus rauem ER vom ersten Keimungstag an zu beobachten, lassen sich aber nicht als Glyoxysomen identifizieren. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich nur wenige, kleine Glyoxysomen frei im Cytosol. Diese sind rund und gleichmäßig über die Zelle verteilt. Messungen der Isocitratlyase und Malatsynthase in Wassermelone und Gurke zeigten an den ersten zwei Entwicklungstagen fast keinerlei Enzymaktivität. Am dritten und vierten Tag steigt deren Aktivität jedoch sprunghaft an (Trelease et al., 1971; Wanner et al., 1982). Selbiges wurde auch für die glyoxysomale Malatdehydrogenase (gMDH) in Wassermelone beobachtet. Anders, als beispielsweise mitochondriale Malatdehydrogenase (mMDH) ist in den ersten beiden Entwicklungstagen fast keine gMDH zu detektieren, am dritten Tag steigt die Aktivität jedoch rapide an (Hock and Gietl, 1982). Auch die Katalaseaktivität nimmt erst ab dem zweiten Tag zu und kann dann auch in den ER-Taschen detektiert werden. Diese Taschen nehmen ab dem dritten Tag signifikant an Größe zu und die neu hinzugekommenen Membranen tragen keine Ribosomen (Abbildung 6B) (Wanner et al., 1982). Zum Wachstum der neuen Glyoxysomen benötigte Triglyceride stammen direkt aus der *half unit*-Membran der Lipidkörper (Chapman and Trelease, 1991). Die so neu entstandenen Glyoxysomen umwachsen die Lipidkörper und verlieren hierbei jegliche Ribosomen, was

möglicherweise auf eine Differenzierung der Membraneigenschaften hinweist. Mit dem Größenzuwachs der Glyoxysomen geht eine Verkleinerung der Lipidkörper einher, die im Zuge der Reservestoff-Mobilisierung aufgebraucht werden. Dies lässt die Glyoxysomen verzweigt erscheinen und mit Cytoplasma gefüllte glyoxysomale Taschen entstehen. Dies erzeugt den Eindruck eines Reticulums und unterscheidet sich grundlegend von der runden Form der Blatt-Peroxisomen (Wanner et al., 1982).

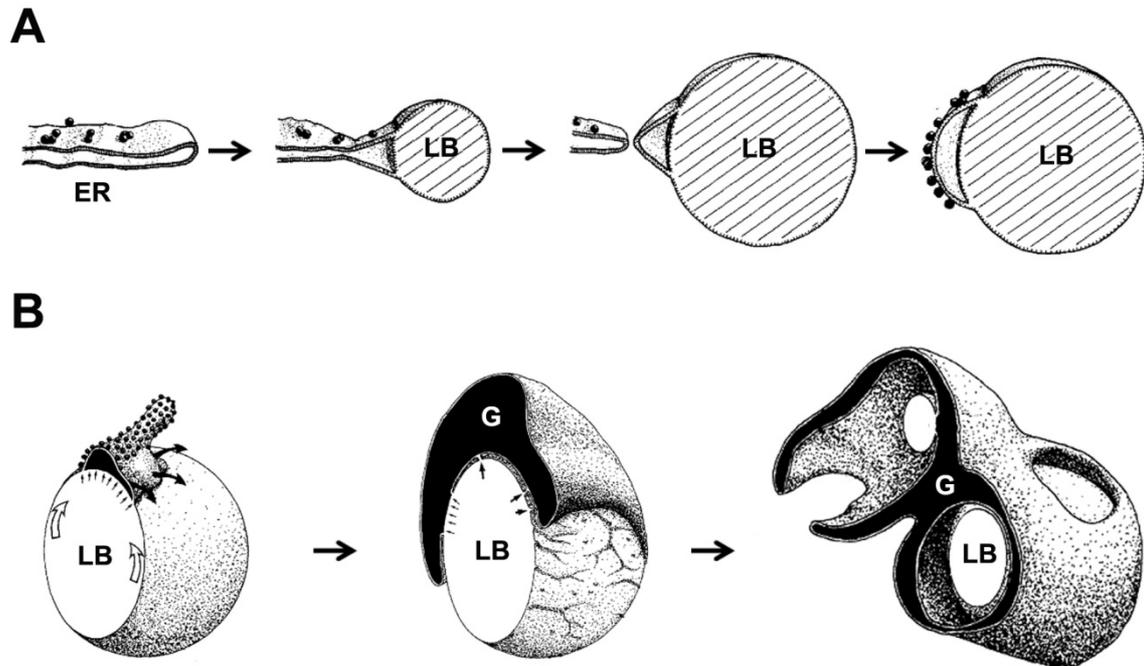


Abbildung 6: Bei der Formung der Lipidkörper werden ER-Taschen angehängt, welche sich bei der Keimung zu Glyoxysomen differenzieren. (A) Lipidkörper werden im ER bei der Samenreife gebildet. Hierbei lagern sich Speicherlipide zwischen die ER-Membranen und werden als Lipidkörper abgeschnürt. Dabei verbleibt eine ER-Tasche inklusive Ribosomen an manchen Lipidkörpern. **(B)** Bei der Samenkeimung differenziert sich die ER-Tasche zu einem Glyoxysom und verliert dabei alle Ribosomen. Das Glyoxysom umwächst die Lipidkörper und bildet ein glyoxysomales Netzwerk. **LB:** Lipidkörper, **G:** Glyoxysom, **ER:** Endoplasmatisches Reticulum (Abgeändert nach Wanner et al., 1982)

Diese Formveränderung der Glyoxysomen scheint sich nicht nur auf Wassermelone zu beschränken, sondern wurde auch in Gurke und Sonnenblume beobachtet (Gruber et al., 1970; Trelease et al., 1971; Schopfer et al., 1975) und auch das Anhängen von ER-Taschen an Lipidkörper scheint nicht Wassermelonen-typisch zu sein. In Kürbis, Raps und Sonnenblume wurden ähnliche Strukturen gefunden (Wanner et al., 1981, Wanner, 1978). Hierbei könnte es sich um eine Strategie der Ölsamen-bildenden Pflanzen handeln, „unreife“ Glyoxysomen bereits bei der Lipidkörper-Synthese mit diesen zu verbinden, um bei der Keimung eine möglichst schnelle und effiziente

Reservestoffmobilisierung zu gewährleisten. In *Arabidopsis* wurde bisher weder ein Anhängen von ER-Taschen an Lipidkörper beschrieben noch eine Ausprägung eines Glyoxysomen-Netzwerkes zur Reservestoffmobilisierung beobachtet.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Der Einfluss der Zink-RING-Finger der Peroxine PEX2 (At1g79819), PEX10 (At2g26350) und PEX12 (At3g04460) in *Arabidopsis thaliana* auf die Glyoxysomen-Biogenese ist weitgehend unbekannt. Ein Fehlen eines dieser Peroxine führt zu Embryoletalität (Hu et al., 2002; Schumann et al., 2003; Sparkes et al., 2003; Fan et al., 2005). Zur Untersuchung der Funktion der Zink-RING-Finger-Domäne standen konditional subletalen Δ Zn-Mutanten der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um Pflanzen, welche ein dysfunktionales Zink-RING-Finger-Motiv zusammen mit dem Reporterprotein GFP-PTS1 im Wildtyp-Hintergrund überexprimieren und für alle drei Peroxine als Transgenlinie und für PEX10 auch als Hybridlinie vorliegen. Bereits bekannt war eine Beeinträchtigung des Matrixproteinimports in Blatt-Peroxisomen in den PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien und formaberrante Blatt-Peroxisomen samt einem Kontaktverlust zwischen Chloroplasten und Peroxisomen in der PEX10 Δ Zn1-Linie (Schumann et al., 2007; Prestele, 2009).

In Mikroskopischen Analysen vieler Ölsamen-bildender Pflanzen konnte eine netzwerkartige Struktur der Glyoxysomen bei der Reservestoffmobilisierung beobachtet werden (Gruber et al., 1970; Trelease et al., 1971; Schopfer et al., 1975; Wanner et al., 1982). Die Formung, Ausprägung und Verteilung dieses Glyoxysomalen Reticulums sollte im Wildtyp durch Licht- und Elektronenmikroskopie eingehend untersucht werden. Basierend auf den Wildtyp-Daten sollten die Δ Zn-Mutanten sowie TILLING-Punktmutanten (PEX10-G96E und PEX10-P126S) in konservierten Domänen am N-Terminus von PEX10 bezüglich des Reticulums untersucht werden.

Um mögliche Funktionen des N-Terminus von PEX10 aufzuklären, sollten die zwei PEX10-Punktmutanten PEX10-G96E und PEX10-P126S in die Reporterlinie GFP-PTS1 rückgekreuzt werden. Die hierbei geschaffenen, von EMS-Hintergrund gesäuberten Transgenlinien werden als PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie bezeichnet und sollten durch Wachstumsversuche unter verschiedenen Bedingungen, als auch durch Licht- und Elektronenmikroskopie charakterisiert werden.

Die Beteiligung des Zink-RING-Fingers von PEX12 als E3-Ligase bei der Monoubiquitinierung des Rezeptors PEX5 wurde in Hefe nachgewiesen. Somit ist die Zink-RING-Finger-Domäne von PEX12 direkt an der des Rezeptors PEX5 ins Cytosol und damit am Matrixproteinimport in die Peroxisomen beteiligt (Platta et al., 2009). Es sollte in PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien untersucht werden, inwieweit sich die Überexpression des dysfunktionalen Zink-RING-Fingers im Wildtyp-Hintergrund auf den

makroskopischen und mikroskopischen Phänotyp der Mutanten auswirkt. Da PEX12 in Hefe eine zentrale Rolle im peroxisomalen Matrixproteinimport spielt, soll insbesondere eine mögliche Störung des Matrixproteinimports und daraus resultierende Phänotypen untersucht werden.

Exprimiert man PEX10 mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger-Motiv im Wildtyp-Hintergrund, so kommt es zwischen Blatt-Peroxisomen und Chloroplasten zu einer Kontaktstörung (Schumann et al., 2007). Eine mögliche Kontaktstörung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien soll durch Separation der Organellen im Saccharose-Stufen-Dichtegradienten und durch Lichtmikroskopie verifiziert werden. Ein PEX10-Interaktionspartner sollte auf biochemische Weise durch *Yeast two-Hybrid* und Affinitätschromatografie verschiedener Pflanzenextrakte gegen überexprimiertes, natives PEX10 identifiziert werden.

2. Ergebnisse

Es wurde zum einen die Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums für die Fettmobilisierung bei dunkel gewachsenen Keimlingen und zum anderen die Entwicklung der Blatt-Peroxisomen im Wildtyp und in diversen Mutanten untersucht. Bei dem verwendeten Wildtyp handelt es sich um eine Reporterlinie, bei der PTS1-markiertes GFP in die Glyoxysomen und Peroxisomen importiert wird (Mano et al., 2002). Diese Wildtyp-Linie wird im Folgenden als wt-GFP-PTS1 bezeichnet. Zu den untersuchten Mutanten gehört die bereits beschriebene PEX10 Δ Zn1-Mutante (Schumann et al., 2007), die in die wt-GFP-PTS1-Linie eingekreuzt wurde. Die so erzeugten Pflanzen werden als PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen bezeichnet. Zusätzlich wurde, analog zur PEX10 Δ Zn1-Mutante, die PEX10-cDNA mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger-Motiv in wt-GFP-PTS1 überexprimiert. Anders, als bei den PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen, wurde in diesen Linien an das überexprimierte PEX10 Δ Zn-Protein N-terminal einen T7-Tag angefügt. Die hier gewonnenen Linien werden als PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien bezeichnet. Als Kontrolle für die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien wurde das wt-PEX10-Protein mit N-terminal angefügtem T7-Tag in der pex10-KO-Linie überexprimiert. Diese Linien werden als PEX10-wt-T7-pex10KO-Transgenlinien bezeichnet. Ebenso wurden transgene Linien erzeugt, welche im wt-GFP-PTS1-Hintergrund PEX2 mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger-Motiv und einem T7-Tag am N-Terminus exprimieren. Diese Linien werden als PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien bezeichnet. Als Kontrolle wurde das wt-PEX2-Protein mit N-terminalem T7-Tag im wt-GFP-PTS1-Hintergrund überexprimiert. Diese Pflanzen heißen PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien. Als drittes RING-Finger-Peroxin wurde PEX12 untersucht. Auch hier wurde PEX12 mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger-Motiv und einem T7-Tag am N-Terminus im wt-GFP-PTS1-Hintergrund exprimiert. Diese Linien werden PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien genannt. Zur Kontrolle wurde wt-PEX12-Protein mit N-terminalem T7-Tag im wt-GFP-PTS1-Hintergrund überexprimiert. Diese Pflanzen werden als PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien bezeichnet. Alle Konstrukte werden unter der Kontrolle des 35S-Promotor transkribiert.

Zur Transkriptionskontrolle der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II, der PEX10-wt-T7-pex10KO-Transgenlinie, der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, II und III und der PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, III und IV und wurde eine quantitative RT-PCR (in Kooperation mit AG Schwechheimer, Lehrstuhl Systembiologie, TU München) mit Gen-spezifischen Primern

an sieben Tage alten, im Licht gewachsenen Pflanzen durchgeführt (Abbildung 7). Es wurde der Gesamt-Transkriptlevel aus endogenem Wildtyp-Transkript und mutiertem Transkript ermittelt, gegen den Transkriptlevel von ACTIN8 (*At1g49240*) normalisiert und anschließend der Expressionslevel in den Wildtyp-GFP-PTS1-Pflanzen als 1 definiert. Zur Amplifikation von ACTIN 8 wurden die Primer *ACT8 fw* und *ACT8 rv* verwendet. Für *PEX2* wurden die Primer *PEX2 fw* und *PEX2 rv*, für *PEX10* wurden die Primer *PEX10 fw* und *PEX10 rv* und für *PEX12* wurden die Primer *PEX12 fw* und *PEX12 rv* verwendet.

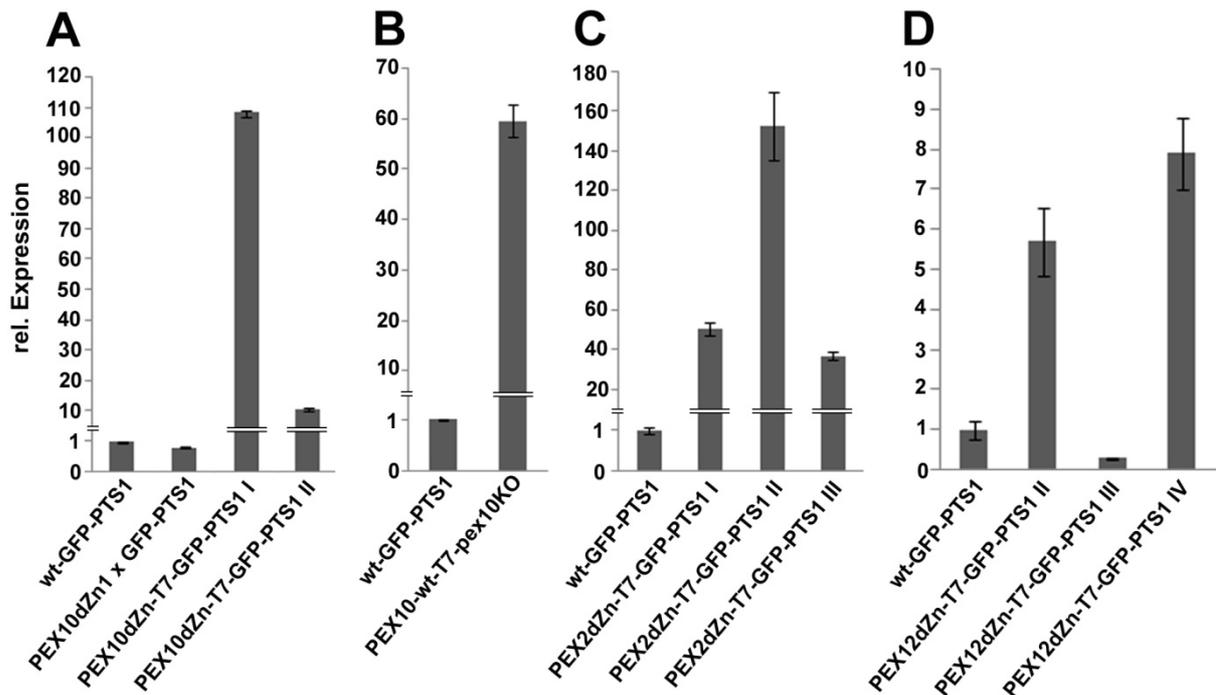


Abbildung 7: Die Δ Zn-Linien zeigen klare Überexpression auf Transkriptionsebene. Transkriptionstest an: **(A)** PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze und PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II; **(B)** Kontrollpflanze PEX10-wt-T7-pex10KO-Transgenlinie; **(C)** PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, II und III und **(D)** PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV mit der PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie III als Kontrolle.

Die Gesamt-Transkriptmenge aus endogenem Wildtyp-Transkript und mutiertem Transkript in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze erreichte etwa den Transkriptlevel des Wildtyps, sie besteht aber zu gleichen Teilen aus dem Transkript von PEX10 Δ Zn und Wildtyp-PEX10 (Schumann et al., 2007). Die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien zeigten einen weit höheren Transkriptlevel als der Wildtyp oder die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, nämlich 110-fach (Linie I) und 10-fach (Linie II). Die PEX10-wt-T7-pex10KO-Transgenlinie enthält kein Wildtyp-Transkript und der Transkriptlevel von PEX10-wt-T7 war annähernd 60-mal höher als der in der Wildtyp-Kontrolle. Es konnte in allen PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien eine deutlich

Überexpression gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Das Transkript der Linien I und III war 50 bzw. 40-fach höher als das der Wildtyp-Kontrolle, in der Linie II war der Transkriptlevel sogar auf das 150-fache erhöht. Die Transkription in den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien war nicht so stark erhöht wie in den übrigen Transgenlinien. Die Linien II und IV zeigten eine 5- bzw. 8-fache Erhöhung des Gesamttranskripts. Die Linie III zeigt keine Überexpression und wird als Kontrolle weitergeführt.

Weiterhin gibt es im N-Terminus von PEX10 zwei unter den PEX10-Proteinen aller Organismen hoch konservierte Motive: das TLGEEY (aa 90-96) und ein Prolin in Position 126 (Abbildung 5). Um diese Domänen von PEX10 zu untersuchen, wurden über das *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) zwei PEX10-TILLING-Linien des TILLING-Projekts (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes-Project*) mit Punktmutationen (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) in eben diesen Motiven zur Untersuchung ausgewählt. Im konservierten N-terminale Motiv TLGEEY kommt es durch eine Punktmutation zu der Aminosäuresubstitution G93E, das konservierte Prolin ist zu einem Serin (P126S) substituiert. Diese beiden Linien wurden zur besseren mikroskopischen Charakterisierung und um den genomischen Hintergrund zu säubern zweimal in die Reporterlinie wt-GFP-PTS1 rückgekreuzt und werden im Folgenden als PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinien bezeichnet.

2.1. Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums

Das Glyoxysomale Reticulum wurde zuerst in Wildtyp-GFP-PTS1-Pflanzen untersucht, da über dessen Bildung und Ausprägung in *Arabidopsis* nichts bekannt war. Basierend auf den im Wildtyp gewonnenen Erkenntnissen wurde untersucht, in welchem Maße sich die Überexpression eines dysfunktionalen Zn-Finger-Motivs von PEX10, PEX2 und PEX12 im wt-GFP-PTS1-Hintergrund auf die Zahl und Formbildung der Glyoxysomen auswirkt und inwieweit der Matrixproteinimport beeinflusst wird. Mit gleicher Zielsetzung wurden auch Mutationen im N-Terminus von PEX10 untersucht. Hierzu wurden die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze mit einer relativen 1-fachen Expression von und die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I (relative Expression 110-fach) und II (relative Expression 10-fach), die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I (relative Expression 50-fach), II (relative Expression 150-fach) und III (relative Expression 40-fach), die PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie, die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II (relative Expression 5-fach) und IV (relative Expression 8-fach) und die

PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie III als Kontrolle, sowie die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie untersucht. Diese Linien exprimieren GFP mit einem PTS1 (*peroxisomal targeting signal 1*) und ermöglicht so *in vivo* die Visualisierung der Peroxisomen an einem Confocalen Laserscanning-Mikroskop.

Ultrastrukturelle Untersuchungen (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München) an DAB-gefärbten Proben zeigten, dass Glyoxysomen in wt-GFP-PTS1-Pflanzen ein Netzwerk, das Glyoxysomale Reticulum, bilden. DAB färbt Peroxisomen spezifisch und ermöglichte eine eindeutige Identifizierung (Wanner et al., 1982).

Am Confocalen Laserscanning-Mikroskop konnte gezeigt werden, dass das Glyoxysomale Reticulum weder durch Mutation des Zn-RING-Finger Motivs in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, den PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II, den PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, II und III und den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, III und IV noch durch Mutationen im N-Terminus von PEX10 Einfluss in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie in Form und Ausprägung signifikant beeinträchtigt wird. Zudem wurde ein Matrixproteinimportdefekt in die Glyoxysomen bei PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II und bei PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I sowie in den TILLING-Linien PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie festgestellt.

2.1.1. Die Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1

Bei der Untersuchung der Glyoxysomen in wt-GFP-PTS1 wurde festgestellt, dass sich die Glyoxysomen, anders als die Blatt-Peroxisomen, zeitabhängig im Zuge der Reservestoffmobilisierung in der Zelle lokal konzentrieren. Es wurde beobachtet, dass sich nach etwa vier Tagen die Glyoxysomen in der Zelle an Lipidkörpern sammelten und für mehrere Tage eine dicht gedrängte Struktur bildeten. Diese Struktur wird im Folgenden als Glyoxysomales Reticulum bezeichnet. Diese Hirschgeweih-artigen Gebilde innerhalb einer Zelle dienen der Speicherstoffmobilisierung; hierauf weist auch die beginnende Vakuolisierung ohne tatsächliche Zellexpansion oder Größenzunahme der Kotyledonen hin. Die Bandbreite an Ausprägung und Anzahl dieses Reticulums schwankt im Wildtyp beträchtlich.

2.1.1.1. Zeitverlauf der Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1

Um den optimalen Zeitpunkt zur Untersuchung der Glyoxysomen zu ermitteln, wurden wt-GFP-PTS1-Pflanzen in verschiedenen Altersstufen untersucht. Es wurden Pflanzen in Dunkelheit angezogen und in den Altersstufen ein bis sieben Tage betrachtet. Zusätzlich wurden Pflanzen nach drei Tagen Dunkelheit für einen Tag belichtet. Die Kotyledonen der Pflanzen wurden eingebettet, DAB (Diaminobenzidin) gefärbt (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München) und für die Lichtmikroskopie eingesetzt (Abbildung 8). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen ein Maximum der Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums ab dem Tag 4; ab Tag 6 nimmt es wieder ab. (Abbildung 8D-G). Eine Vakuolisierung der Zellen ist ab Tag vier deutlich zu erkennen. In drei Tage alten Pflanzen, welche zusätzlich einen Tag belichtet wurden, ist eine völlige Vakuolisierung, Blatt-Peroxisomen und keine Spur eines Glyoxysomalen Reticulums zu beobachten (Abbildung 8H). Die beginnende Vakuolisierung der Zellen ohne ihre tatsächliche Größenzunahme deutet auf den Abbau von Reservestoffen hin. Da die Vakuolisierung ab dem Tag vier zeitgleich mit der Bildung des Glyoxysomalen Reticulums einhergeht, liegt die Vermutung nahe, dass die Vakuolisierung der Zelle mit der Funktion des Glyoxysomalen Reticulums in Verbindung gebracht werden kann.

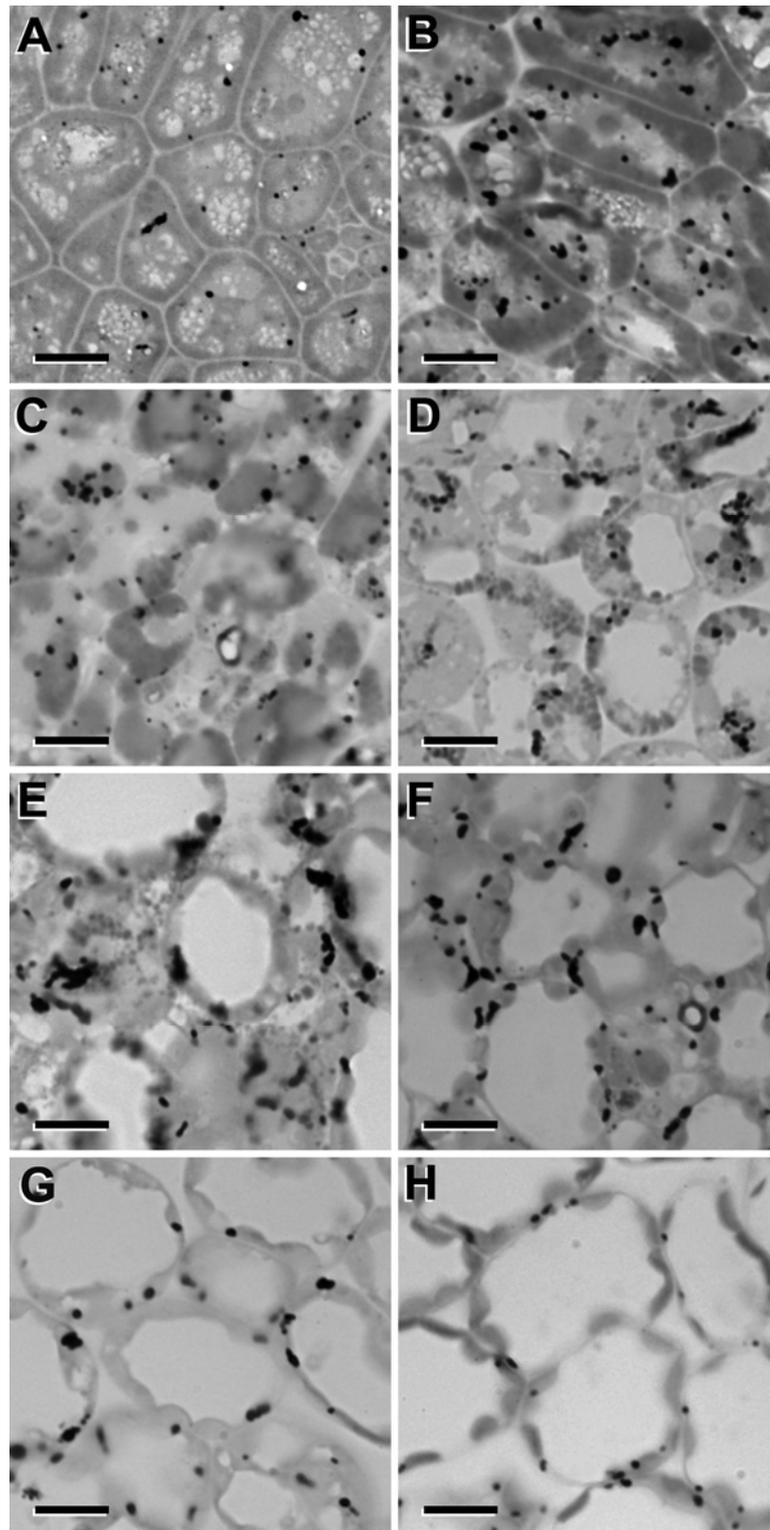


Abbildung 8: Kotyledonen von in Dunkelheit gewachsenen Wildtyp-Pflanzen zeigen am vierten und am fünften Tag die stärkste Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums. (A) 1 Tag, (B) 2 Tage, (C) 3 Tage, (D) 4 Tage, (E) 5 Tage, (F) 6 Tage, (G) 7 Tage, (H) 3 Tage dunkel + 1Tag Licht. Die Vakuolisierung beginnt am vierten Tag und deutet, da keine signifikante Zellerpansion zu beobachten ist, auf den verstärkten Abbau von Reservestoffen hin. Die drei Tage in Dunkelheit gezogene und einen Tag belichtete Pflanze zeigt bereits differenzierte Chloroplasten, eine zellfüllende Vakuole und nur noch wenige Mikrobodies. Balken: 10 µm

Die Hauptaufgabe des Glyoxysomalen Reticulums ist die Bereitstellung von Reservestoffen, das heißt, der Abbau von Lipidkörpern. Hierbei nimmt die Vakuole den Raum der abgebauten Lipidkörper ein.

2.1.1.2. Glyoxysomen fusionieren zum Glyoxysomale Reticulum

Zur Klärung der Frage, ob es sich beim Glyoxysomalen Reticulum um lokale Ansammlungen der Glyoxysomen oder um ein Netzwerk aus fusionierten Glyoxysomen handelt, wurden von Wildtyp-Pflanzen Serienschritte zur Ultrastrukturaufklärung mittels TEM (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München) angefertigt. Serienschritte in sieben Tage alten, etiolierten Wildtyp-Pflanzen zeigten am eindrucksvollsten, dass es

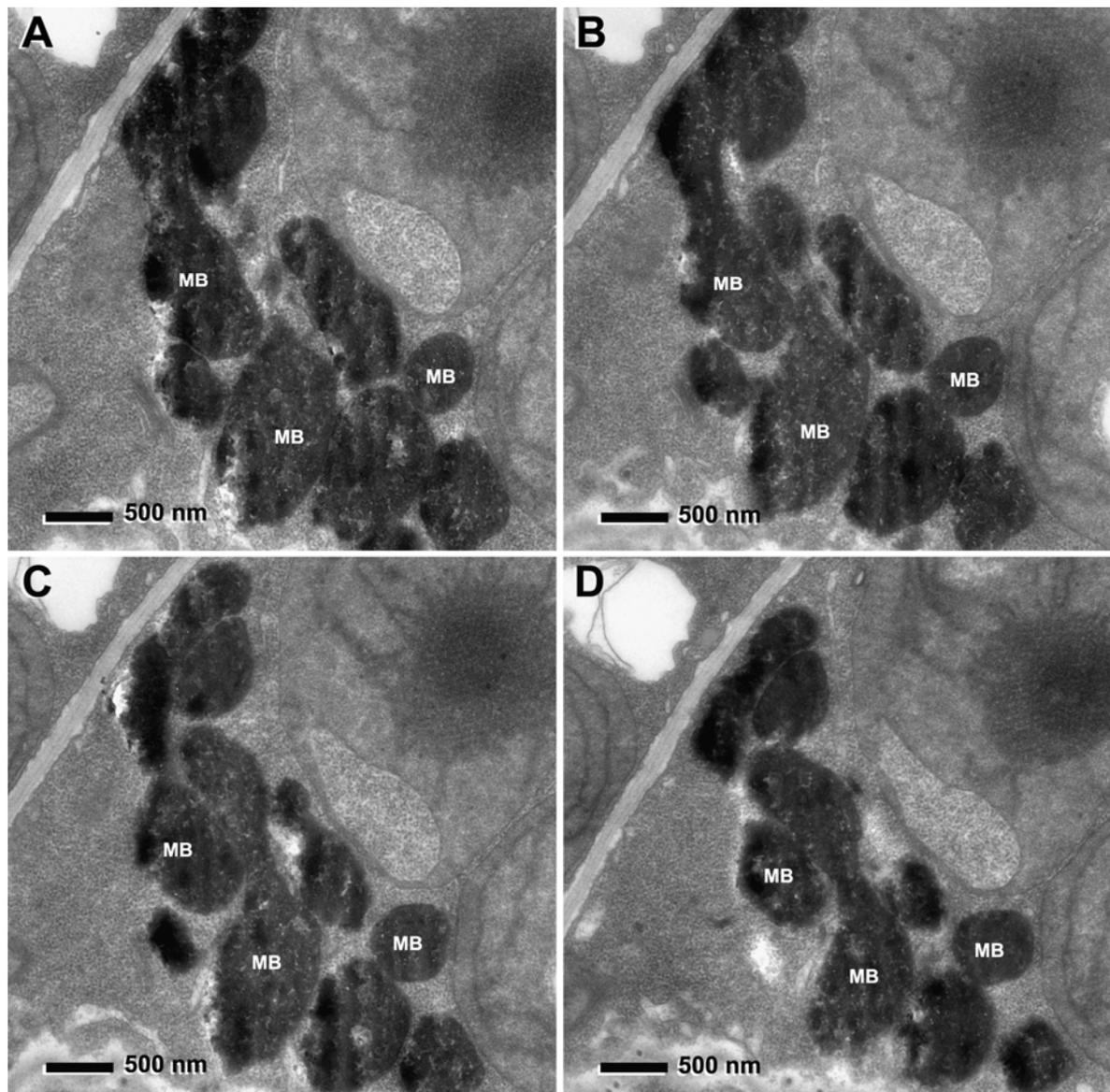


Abbildung 9: Glyoxysomen bilden ein Netzwerk. Serienschnitte (**A bis D**) durch sieben Tage alte, im Dunkeln gewachsene Kotyledonen zeigten deutlich, dass die Glyoxysomen im Zuge der Reservestoffmobilisierung ein Netzwerk ausbilden. Es ist klar zu erkennen, dass die Glyoxysomen nicht nur eng aneinander liegen, sondern miteinander verbunden sind.

MB: Glyoxysom, Balken 500 nm

sich bei dem Glyoxysomalen Reticulum sowohl um einzelne als auch um fusionierte Glyoxysomen handelt (Abbildung 9). Die Glyoxysomen bilden also im Zuge der Reservestoffmobilisierung ein Netzwerk aus. Dieses Netzwerk dürfte dazu dienen, Lipidkörper zu „umfließen“ und so die Oberfläche zwischen Lipidkörper und Glyoxysomalem Reticulum zu maximieren, um wiederum die Fett-Mobilisierung zu beschleunigen.

2.1.2. Die Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums ist in PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I nicht beeinträchtigt

Aufgrund statistischer Untersuchungen am wt-GFP-PTS1-Pflanzen wurde Tag 4 als am günstigsten für eine vergleichende Untersuchung zwischen wt-GFP-PTS1, PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I erkannt (Abbildung 11). Vier Tage alte Pflanzen wurden eingebettet, DAB-gefärbt und am Lichtmikroskop (LM) und Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München) untersucht (Abbildung 10).

Die vergleichende Auswertung der LM-Aufnahmen an den 4d alten wt-GFP-PTS1, PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I zeigte weder bei der Glyoxysomenfläche noch bei der Glyoxysomenzahl noch bei der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums einen Unterschied zu wt-GFP-PTS1-Pflanzen (Abbildung 11A-C rechts). In den lichtmikroskopischen Aufnahmen ist die Aggregation der Glyoxysomen zum Reticulum in allen Pflanzen gut zu erkennen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen sowohl im wt-GFP-PTS1, in PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I eine beginnende Bildung des Glyoxysomalen Reticulums. Der Entwicklungsstand des Glyoxysomalen Reticulums ist in allen Proben gleich, jedoch zeigen die EM-Aufnahmen eine weniger starke Ausprägung des Reticulums, als es die LM-Übersichtsbilder tun.

TEM-Aufnahmen von sieben Tage alten wt-GFP-PTS1-Pflanzen zeigten, dass es sich beim Glyoxysomalen Reticulum um ein Netzwerk von Glyoxysomen handelt (Abbildung 9). TEM-Aufnahmen von vier Tage alten wt-GFP-PTS1-Pflanzen,

PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I zeigen, dass sich die Glyoxysomen in allen Pflanzen um die Lipidkörper konzentrieren. Es ist zudem bei wt-GFP-PTS1-Pflanzen und PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen eine scheinbare Deformation einzelner Glyoxysomen zu beobachten. Dies deutet auf eine beginnende Vernetzung der Glyoxysomen untereinander zu Glyoxysomalen Reticulum hin.

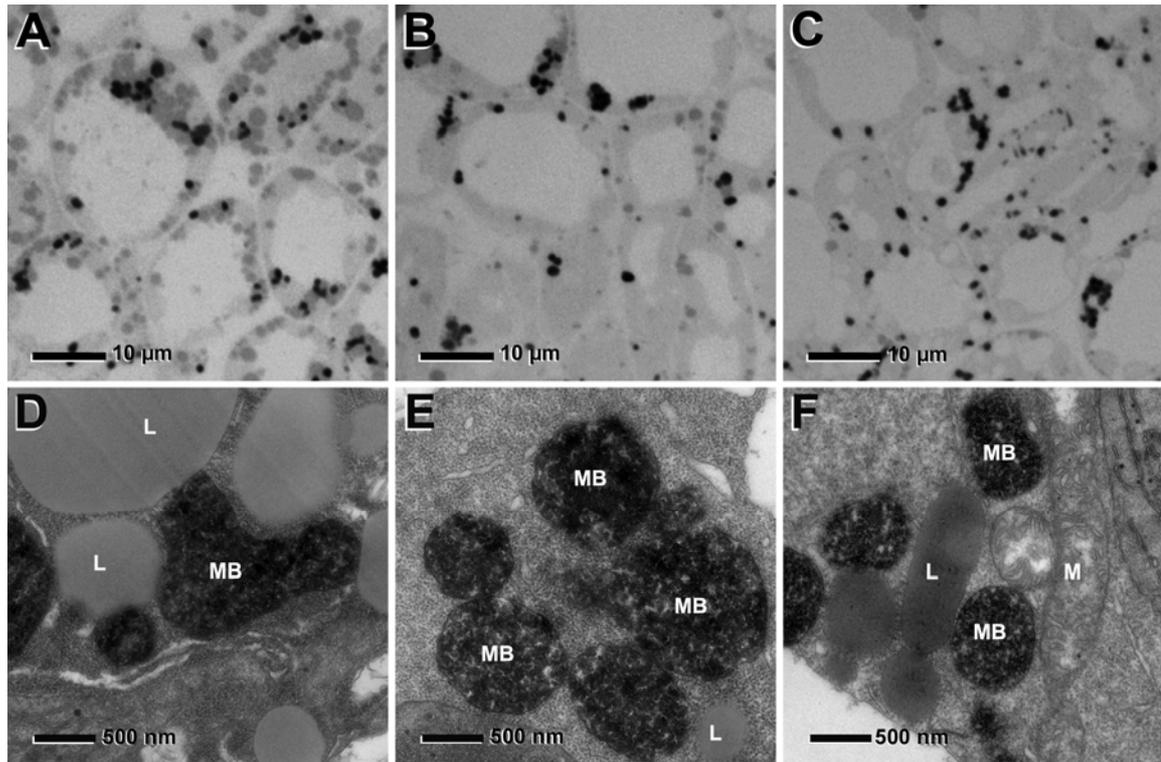


Abbildung 10: Das Glyoxysomale Reticulum in 4 Tage alten PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I ist in ähnlicher Weise ausgebildet wie in wt-GFP-PTS1-Pflanzen. (A-C) LM- (D-F) und TEM-Aufnahmen von Kotyledonen vier Tage alter, dunkel gewachsener Pflanzen. Bei (A, D) wt-GFP-PTS1, (B, E) PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und (C, F) PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I ist zu beobachten, dass sich das Glyoxysomale Reticulum aus vielen runden Glyoxysomen zusammensetzt, es jedoch auch abnorm geformte Glyoxysomen gibt, die auf ein Verschmelzen der Glyoxysomen zu einem Netzwerk hindeuten. MB: Glyoxysomen, L: Lipidkörper, M: Mitochondrium.

2.1.2.1. Quantitativer Vergleich der Verteilung und Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1, PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I zeigt jeweils ein Maximum bei vier bis fünf Tagen

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen an der wt-GFP-PTS1-Zeitreihe (Abbildung 8) wurden hinsichtlich der Glyoxysomenfläche, der Glyoxysomenzahl und der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums ausgewertet, um eine quantitative Aussage treffen zu können (Abbildung 11). Die durchschnittliche Glyoxysomenfläche wurde mit dem Programm ImageJ ermittelt, die Anzahl der Glyoxysomen/Zelle wurde durch auszählen ermittelt und für die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums wurde ein „Ausprägungs-Faktor“ festgelegt (0 = kein Reticulum, 1 = in Ansätzen, 2 = wenig, 3 = häufig).

Bei der Auswertung der durchschnittlichen Fläche der Glyoxysomen zeigte sich, dass diese bis zum fünften Entwicklungstag ansteigt und anschließend rapide abfällt (Abbildung 11A). Bei der Glyoxysomenzahl pro Zelle ist der Maximalwert bereits nach drei Tagen erreicht und fällt bis zum Tag sieben wieder langsam ab (Abbildung 11B).

Das Glyoxysomale Reticulum ist während der Entwicklungstage vier und fünf am stärksten ausgeprägt. Es entsteht nach dem dritten Tag sehr schnell und verschwindet bereits wieder ab Tag sechs (Abbildung 11C). Betrachtet man die Werte der drei Tage in Dunkelheit gewachsenen und einen Tag belichteten Pflanzen, so stellt man fest, dass diese Werte deutlich unter den Werten der Pflanzen liegen, welche vier Tage ausschließlich im Dunklen gezogen wurden (Abbildung 11A-C links). Diese Pflanzen dienen als Kontrolle, da hier die Photomorphogenese durch die Belichtung induziert wurde und aufgrund der Umwandlung der Glyoxysomen in Blatt-Peroxisomen kein Glyoxysomales Reticulum zu erwarten war.

Die vergleichende Auswertung von vier Tage alten in Dunkelheit gewachsenen wt-GFP-PTS1-Pflanzen, PEX10 Δ Zn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und Pflanzen der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt, dass eine Beeinträchtigung des Zn-RING-Finger-Motivs von PEX10 und PEX2 sich weder auf die Form, die Anzahl noch auf die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums signifikant auswirkt (Abbildung 11A-C rechts).

Abbildung 11: Die stärkste Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums ist in etiolierten Pflanzen bei vier bis fünf Tagen zu beobachten.

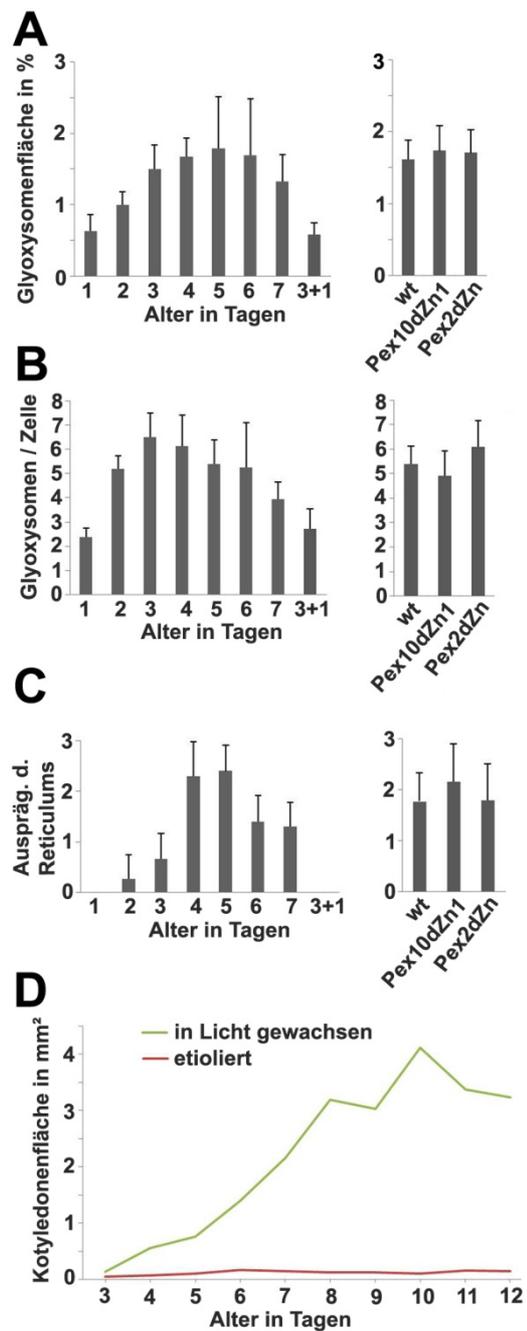
(A) Flächenvergleich des Glyoxysomalen Reticulums in einer Zeitreihe an wt- GFP-PTS1-Pflanzen (links) und zwischen vier Tage alten wt-GFP-PTS1-Pflanzen, PEX10ΔZn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und Pflanzen einer PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I (rechts).

(B) Vergleich der Glyoxysomenzahl pro Zelle in einer Zeitreihe an wt- GFP-PTS1-Pflanzen (links) und zwischen vier Tage alten wt-GFP-PTS1-Pflanzen, PEX10ΔZn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und Pflanzen einer PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I (rechts).

(C) Vergleich der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums in einer Zeitreihe an wt- GFP-PTS1-Pflanzen (links) und zwischen vier Tage alten wt-GFP-PTS1-Pflanzen, PEX10ΔZn1-GFP-PTS1-Hybridpflanzen und Pflanzen einer PEX2ΔZn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I (rechts). Grad der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums (Auspräg. d. Reticulums): 0 = kein Reticulum, 1 = in Ansätzen, 2 = wenig, 3 = häufig.

Alter in Tagen 3+1: drei Tage in Dunkelheit angezogene und einen Tag belichtete Pflanzen.

(D) Vergleich der Kotyledonengröße von in Licht und in Dunkelheit gewachsenen wt-GFP-PTS1-Pflanzen.



Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Analyse des Glyoxysomalen Reticulums bestätigt klar, dass mit beginnender Vakuolisierung ab dem Tag vier die Reservestoff-Mobilisierung intensiviert wird. Hier findet sich sowohl die maximale Glyoxysomenfläche als auch die stärkste Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums.

2.1.2.2. Vergleich der Kotyledonenfläche in Dunkelheit und in Licht gewachsener wt-GFP-PTS1-Pflanzen

Da der Übertritt keimender Pflanzen zur Photoautotrophie sich nicht in wenigen Augenblicken vollzieht, überlappen die Reservestoff-Mobilisierung und die beginnende Photoautotrophie zeitlich. Dies ist der Zeitpunkt, an dem die Pflanze immer weniger von den gespeicherten Reservestoffen abhängt und den Bedarf an Energie und Kohlenstoff durch Photoautotrophie kompensiert. Um diesen Kompensationspunkt in der Reservestoffmobilisierung zu ermitteln an dem die Pflanze zur Photoautotrophie übertritt, wurden wt-GFP-PTS1-Pflanzen in Dunkelheit und im Licht angezogen und täglich die Oberfläche der Kotyledonen bestimmt (Abbildung 11D). Es zeigte sich, dass am Tag drei die Kotyledonen in Licht und Dunkel noch von gleicher Größe waren, bereits aber am Tag vier einen Größenunterschied zeigten. Während die in Dunkelheit gewachsenen Kotyledonen nicht an Größe gewannen, nahm die Fläche und damit die Größe der Kotyledonen der in Licht angezogenen Pflanzen bis zum Tag acht linear zu. Erst ab Tag neun verringerte sich die Größenzunahme und stagnierte ab Tag zehn. Hier übernahmen die heranwachsenden Primärblätter die Aufgabe der Photosynthese. Da sich die Kotyledonen von *Arabidopsis* bereits am Tag drei nach der Keimung aus der Samenschale befreien und zu ergrünen begannen, überlappten hier bereits Speicherstoffmobilisierung und Photosynthese. Da bei in Licht und in Dunkelheit gewachsenen Pflanzen am Tag 3 die Kotyledonengröße aber noch die gleiche war, wurde die zur Verfügung stehende Energie nicht sofort in ein Größenwachstum der Kotyledonen gesteckt. Die Pflanze schien erst den in Vorstufen vorhandenen Photosyntheseapparat zur vollen Funktionalität zu entwickeln. Die Flächenvergrößerung und vollständige Ergrünung der Kotyledonen am Tag vier deutet auf beginnenden Photoautotropismus und eine schwindende Abhängigkeit von den Speicherstoffen hin. Dies wiederum deckt sich mit dem Vorkommen des Glyoxysomalen Reticulums, welches ab dem dritten Tag in dunkel gewachsenen Pflanzen zu beobachten war und sich somit mit der Übertrittsphase zum Photoautotropismus überlappte. Die verstärkte Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums an den Tagen vier und fünf in dunkel gewachsenen Pflanzen könnte eine Art Erwartungshaltung der Pflanze bezüglich dem Übertritt zur Photoautotrophie sein. Ist dies der Fall, so bildet *A. thaliana* das Glyoxysomale Reticulum beim Übertritt zur Photoautotrophie möglicherweise nur so lange aus, bis die Photosynthese den Bedarf an Energie und Kohlenstoff kompensiert. Die Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums würde somit einer möglichst raschen Reservestoffmobilisierung dienen.

2.1.2.3. *In vivo*-Untersuchung des Glyoxysomalen Reticulums in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, den PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien; den PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien, und den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien

Um einen besseren Einblick in Ausprägung und Verteilung des Glyoxysomalen Reticulums *in vivo* in Abhängigkeit von PEX10, PEX2 und PEX12 zu erlangen, wurden wt-GFP-PTS1-Pflanzen, die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II, die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, II und III, die PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie, die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, III und IV und die PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie am Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersucht (Abbildung 12). Alle Pflanzen waren vier Tage alt und in Dunkelheit gewachsen.

Die wt-GFP-PTS1-Pflanzen zeigten das bereits im Lichtmikroskop nach DAM-Färbung beobachtete Glyoxysomale Reticulum (Abbildungen 12A, E). Es war jedoch eine gewisse Varianz in der Häufigkeit und Verteilung zu beobachten. So waren in manchen Pflanzen in jeder Zelle ein oder mehrere glyoxysomale Ansammlungen zu beobachten, während in anderen Pflanzen nur in jeder zweiten oder dritten Zelle ein Reticulum ausgebildet war. Die Übergänge waren fließend. Es wurden keine Formaberranzen oder eine völlige Abwesenheit des Glyoxysomalen Reticulums beobachtet. Bei den PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen wurde die größtmögliche Ausprägungsstärke des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1 nie beobachtet, jedoch verbleibt die Ausprägung der glyoxysomalen Strukturen (Abbildung 12B, F) im beobachteten Schwankungsbereich des Wildtyps. Im Gegensatz zu den deformierten Blatt-Peroxisomen in der PEX10 Δ Zn1-Mutante (Schumann et al., 2007) wurden in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze keine abnormal geformten Glyoxysomen gefunden. Es wurden zudem die zwei unabhängigen PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II zum Vergleich untersucht (Abbildung 12C, G, Linie I; Abbildung 12D, H, Linie II). Die beiden Linien zeigen bezüglich Form und Verteilung des Glyoxysomalen Reticulums keine Unterschiede zu wt-GFP-PTS1.

Für PEX2 wurden die drei unabhängigen PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, II und III untersucht. Sowohl die PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie (Abbildung 12I, M) als auch die drei PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien (Abbildung 12J, N, Linie I; Abbildung 12K, O, Linie II; Abbildung 12L, P, Linie III) zeigen bezüglich Formgebung und Häufigkeit des Glyoxysomalen Reticulums keine Abweichungen vom wt-GFP-PTS1-Schwankungsbereich.

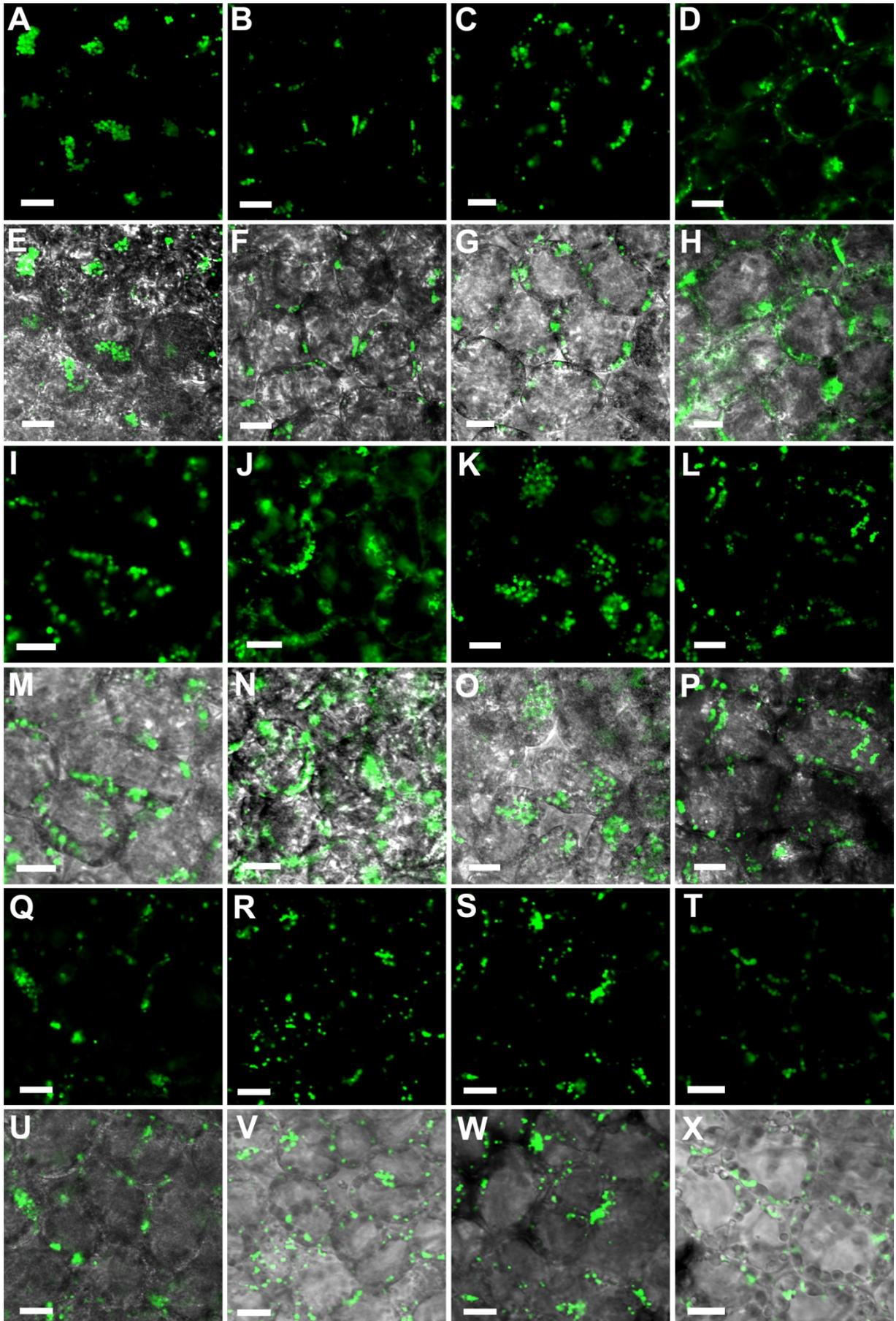


Abbildung 12: Weder die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze noch die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien, die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien und die die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien zeigen eine Abnormalität in Form oder Verteilung des Glyoxysomalen Retikulums. Die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I und die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II zeigen einen gestörten Matrixproteinimport. (A, E) wt-GFP-PTS1-Pflanze, (B, F) PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, (C, G) PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und (D, H) II, (I, M) PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie, (J, N) PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, (K, O) II und (L, P) III, (Q, U) PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie, (R, V) PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, (S, W) III, (T, X) IV. Alle Pflanzen zeigten das Glyoxysomale Reticulum in Form, Verteilung und Ausprägung, wie es auch in wt-GFP-PTS1 zu beobachten war. Nur die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I und die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II zeigen einen gestörten Matrixproteinimport. Abgebildet ist je Linie die GFP-Aufnahme und darunter eine Überlagerung des GFP-Signals mit einer Durchlicht-Aufnahme. Die verwendeten Pflanzen waren vier Tage alt und in Dunkelheit auf MS-Platten gezogen. Balken: 10 μ m.

Es wurden auch von PEX12 eine PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie und drei PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien betrachtet, wobei sich die PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie wie der Wildtyp verhielt (Abbildung 12Q, U). Die beiden PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV variierten etwas in der Ausprägung des Reticulums (Abbildung 12R, V, Linie II; Abbildung 12T, X, Linie IV), blieben aber im Wildtyp-Schwankungsbereich. Auch die nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II zeigte eine Wildtyp-typische Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums. Formaberranz wurde nicht beobachtet. Da die Formgebung der Glyoxysomen im Glyoxysomalen Reticulum von rundlich bis lang gestreckt reicht, ist das Erkennen einer tatsächlichen Formstörung stark erschwert. Anders als die Formstörungen der Peroxisomen in PEX10 Δ Zn1 gehören in diesem Fall lang gestreckte Glyoxysomen zur Norm. Eine Formstörung wird hier als starke Abweichung zu beobachteten Strukturen im wt-GFP-PTS1 behandelt und würde sich beispielsweise durch völlige Abwesenheit des Glyoxysomalen Reticulums ausdrücken.

Sowohl die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, die PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II als auch die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV waren in der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums leicht beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung wirkte sich jedoch nicht negativ auf die in Dunkelheit gewachsenen Pflanzen aus. Die nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien III zeigte eine stärkere Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums als die Linien II und IV. Die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I, II und III zeigten eine Wildtyp-ähnliche Ausprägung und Verteilung des Glyoxysomalen Reticulums.

2.1.2.4. Der Matrixproteinimport der Glyoxysomen in PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen ist nicht gestört, während er in der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II und in der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I gestört ist

Die GFP-PTS1-Markerlinien ermöglichen nicht nur, anders als bei den eingebetteten, DAB-gefärbten Proben für die Lichtmikroskopie, eine große Menge an Pflanzen *in vivo* hinsichtlich der Verteilung und Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums zu untersuchen, sie erlauben auch die Untersuchung eines möglichen Defekts im Matrixproteinimport der Glyoxysomen durch Fehllokalisierung des GFP-PTS1 ins Cytoplasma.

Weder die wt-GFP-PTS1-Pflanzen (Abbildung 12A, E) noch die PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie (Abbildung 12I, M) und PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie (Abbildung 12Q, U) zeigten einen gestörten Import: Nur die Glyoxysomen wurden durch das GFP visualisiert; keine diffuse Färbung im Cytoplasma. Dies zeigt, dass die Überexpression von GFP-PTS1 einen intakten glyoxysomalen Matrixproteinimportkomplex nicht stört oder überfordert.

Die Überexpression von PEX10 mit dysfunktionalem Zn-RING-Finger-Motiv hat in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze und der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I keinen sichtbaren Einfluss auf den Matrixproteinimport. Nur in der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II ist ein leichter Defekt im glyoxysomalen Matrixproteinimport zu detektieren, obwohl der Transkriptionslevel niedriger ist als in der Linie I (Abbildung 12D, H). Ebenso zeigt für PEX2 mit dysfunktionalem Zn-RING-Finger-Motiv nur die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I einen Matrixproteinimportdefekt (Abbildung 12J, N). Die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und III und die Kontrolle PEX2-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen keinen Importdefekt. Überexprimiert man PEX12 mit dysfunktionalem Zn-RING-Finger-Motiv in wt-GFP-PTS1, so ist keine Abnormalität im glyoxysomalen Matrixproteinimport zu beobachten. Weder die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV noch die als Kontrolle dienende PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie und die nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien III zeigen eine Matrixproteinimportstörung.

2.1.2.5. Die Mutationen G93E und P126S im N-Terminus von PEX10 stören den Matrixproteinimport in Glyoxysomen und beeinträchtigen die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums

Um den Einfluss des Peroxins PEX10 an der Formation des Glyoxysomalen Reticulum und an dessen Matrixproteinimport zu untersuchen, wurden nicht nur die C-terminalen Δ Zn-Mutanten herangezogen, sondern auch die Mutanten im N-Terminus, PEX10-G93E und PEX10-P126S, im Alter von vier Tagen betrachtet (Abbildung 13). Als Kontrolle wurde wt-GFP-PTS1 und die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze herangezogen. Es wurde weder für die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie noch für die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie eine offensichtliche Störung des Glyoxysomalen Reticulums festgestellt. Sowohl Form, Ausprägung als auch Verteilung des Glyoxysomalen Reticulums in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie konnte auch in wt-GFP-PTS1-Pflanzen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde die maximale Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums in wt-GFP-PTS1 (Abbildung 13A, E) nie in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie sowie in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze beobachtet. Im Wildtyp ist meistens eine starke Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums zu beobachten, in manchen Pflanzen kann diese Ausprägung aber auch das geringe Ausprägungsausmaß der Mutanten annehmen. Sowohl in den Mutanten im PEX10-N-Terminus als auch in den in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze ist die Ausprägungsstärke genau umgekehrt zum Wildtyp. Die Ausprägungsstärke der Glyoxysomalen Reticulums ist hier für gewöhnlich schwach, erreicht aber in Einzelfällen fast die Ausprägung des Wildtyps. Sowohl die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie als auch die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie weisen einen gestörten Import auf. Die Importstörung ist bei der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie regelmäßig und deutlich zu beobachten, bei der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie ist der Matrixproteinimportdefekt nur leicht ausgeprägt und ist nur in einigen Pflanzen zu beobachten.

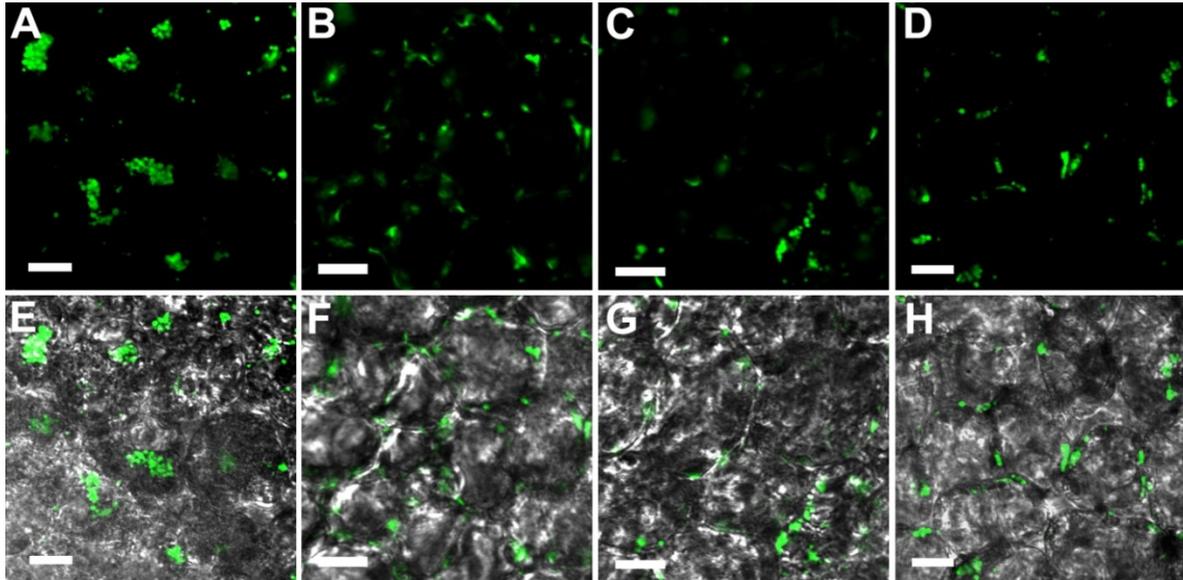


Abbildung 13: Mutationen im N-Terminus von PEX10 führen zu einer Störung des Matrixproteinimports in den Glyoxysomen. (A, E) wt-GFP-PTS1, (B, F) PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, (C, G) PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie, (D, H) PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze. In Dunkelheit auf MS-Medium gekeimte Pflanzen, 4 Tage alt. Balken: 10 μ m

PEX10 hat in den Glyoxysomen ebenso wichtige Aufgaben wie in den Peroxisomen. Bei einer Beeinträchtigung des Zink-RING-Finger-Motivs durch Überexpression von PEX10 mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger im Wildtyp-Hintergrund zeigen alle PEX10 Δ Zn-Mutanten eine Beeinträchtigung in der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums. In der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II ist sogar eine leichte Importstörung zu beobachten. Die Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 ist jedoch nicht die einzige Domäne, welche am Matrixproteinimport und der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums beteiligt ist. Die beiden Mutanten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie im N-Terminus von PEX10 weisen ebenso wie die PEX10 Δ Zn-Mutanten eine reduzierte Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums auf. Zudem zeigen beide Mutanten einen leichten Matrixproteinimportdefekt. Die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien zeigen keinerlei Defekt in der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums, jedoch ist in der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II ein deutlicher Matrixproteinimport zu beobachten.

Die beiden PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV zeigen eine ähnlich geringe Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums wie die PEX10 Δ Zn-Mutanten. Es ist keine Importstörung zu beobachten.

2.2. PEX10 enthält im N-Terminus zwei essentielle Motive für die Biogenese der Blatt-Peroxisomen

Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigten bei einer ersten Untersuchung ein Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte gezeigt werden, dass homozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen im Keimlingsstadium absterben, sofern sie im Licht gezogen werden, wogegen belichtete, heterozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie ein im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Wachstum zeigen. Um einen Defekt in der Reservestoffmobilisierung als Grund für die Keimlingsletalität bei der homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und das Wachstumsdefizit bei heterozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und homozygoten Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zu untersuchen, wurden sowohl segregierende Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie als auch homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen auf MS-Platten mit bzw. ohne Saccharose ausgesät. Die gewonnenen Daten zeigen für die segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie keinen Defekt in der Reservestoffmobilisierung. Homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen einen leichten Defekt in der Reservestoffmobilisierung.

2.2.1. Die Aminosäuresubstitution G96E führt in homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien zu Keimlingsletalität

Um homozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zu bekommen, wurden die zweimal in GFP-PTS1 rückgekreuzten Pflanzen geselbstet. Die so erhaltenen Pflanzen wurden auf MS-Platten ausgebracht, in Erde transferiert und mittels PCR genotypisiert. Es gelang nicht, eine homozygote Pflanze der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie auf Erde zu identifizieren. Daraufhin wurden, um einen möglichen Defekt in der Reservestoffmobilisierung zu untersuchen, eine segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie erneut auf MS-Platten mit und ohne Saccharose ausgesät und im Alter von 14 Tagen genotypisiert. Es konnte beobachtet werden, dass homozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie in Licht im Wachstum stark zurückbleiben und, sobald sie auf Erde überführt werden, sterben. Heterozygote

Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie entwickeln ihren makroskopischen Phänotyp erst auf Erde und zeigen ein Wachstumsdefizit.

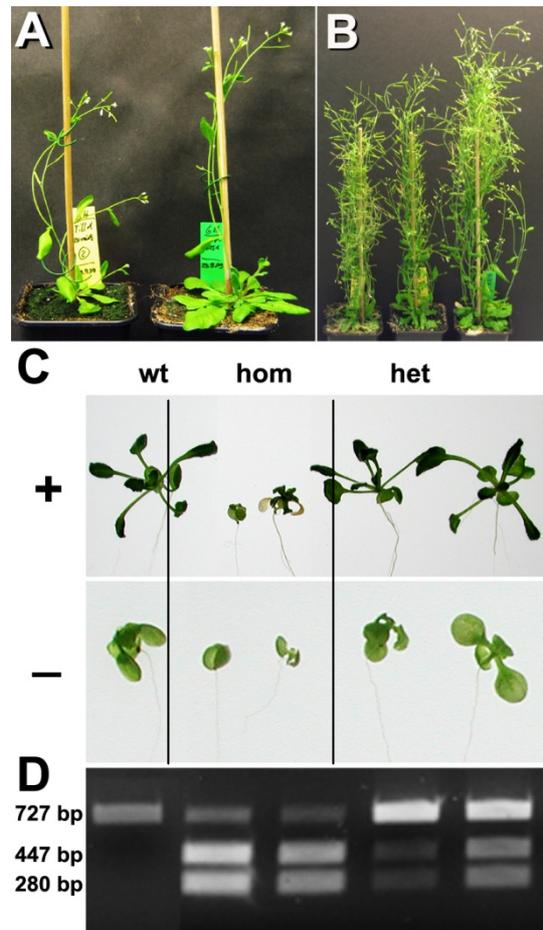
2.2.1.1. Homozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie sterben im Keimlingsstadium, heterozygote Pflanzen zeigen ein retardiertes Wachstum

Bereits auf MS-Platten mit bzw. ohne Saccharose zeigte die segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie einen etwa 25%igen Anteil an vermutlich homozygoten Pflanzen, welcher im Wachstum stark zurückbleiben, wogegen der restliche 75%-Anteil an vermutlich Wildtyp bzw. heterozygoten Pflanzen wie Wildtyp wuchsen (Abbildung 14C). Eine Genotypisierung (siehe 2.2.1.2) zeigte, dass es sich bei den kleinwüchsigen Pflanzen tatsächlich um homozygote und bei den Wildtyp-großen um heterozygote und um Wildtyp-Pflanzen handelt. Es wurden sowohl im Wachstum zurückgebliebene Pflanzen als auch Wildtyp-große auf Erde überführt und zu einem Alter von 31 Tagen herangezogen.

Abbildung 14: Homozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen sind keimlingsletal, wogegen heterozygote Pflanzen ein Wachstumsdefizit zeigen. (A)

Heterozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen (linke Pflanze) zeigen im Alter von 31 d ein Wachstumsdefizit gegenüber wt (rechte Pflanze) in Normalatmosphäre. **(B)** Eine 23-tägige Begasung mit Hoch-CO₂ (ca. 1800 ppm) kann das Wachstumsdefizit nicht ausgleichen (links: PEX10-G93E-Pflanze, 57 d Normalatmosphäre; mitte: PEX10-G93E-Pflanze 31 d Normalatmosphäre, 23 d Hoch-CO₂; rechts: wt-GFP-PTS1-Pflanze 57 d Normalatmosphäre). **(C)** 14 d alte homozygote (hom) PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen zeigen auf MS-Platten mit (+) bzw. ohne (-) Saccharose eine Wachstumsdefizienz gegenüber dem wt und den heterozygoten (het) Pflanzen.

(D) Genotypisierung der Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie. Das PCR-Produkt des wt wird nicht verdaut und zeigt eine Bande bei 727 bp, homozygote Pflanzen lassen (hom) sich fast vollständig zu den Fragmenten 447 bp und 280 bp verdauen. Heterozygote Pflanzen (het) zeigen diese Verdauprodukte nur schwach.



Die kleinwüchsigen, homozygoten Pflanzen starben wenige Tage nach der Überführung auf Erde, wogegen bei den Wildtyp-großen Pflanzen die heterozygoten im Wachstum hinter der Wildtyp-Kontrolle zurückblieben (Abbildung 14A). Um Indizien auf einen möglichen photorespiratorischen Phänotyp zu erhalten, wurde einige Pflanzen der segregierenden PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie in Hoch-CO₂-Atmosphäre (ca. 1800 ppm) überführt und ein Teil weiter unter Normalatmosphäre gezogen. Die 23 Tage CO₂-Begasung der heterozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie führte nicht zu einem Wachstum ähnlich dem des Wildtyps. Die begasteten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen konnten den Vorsprung der unter Normalatmosphäre gewachsenen Wildtyp-Pflanzen nicht aufholen. Dieser Befund lässt vermuten, dass das Wachstumsdefizit nicht in Photorespirationsproblemen liegt, die durch Hoch-CO₂ (1800 ppm) zu mildern gewesen wären.

2.2.1.2. Genotypisierung der Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie durch PCR und Restriktionsverdau

Bei der Genotypisierung durch PCR wurde die Tatsache genutzt, dass die Punktmutation in der jeweiligen Linie eine neue Restriktionsschnittstelle erzeugt oder eine bereits bestehende eliminiert. Im Fall von PEX10-G93E entstand eine Eam1104I-Schnittstelle, über die hinweg mit den flankierenden Primern *AthPEX10-S3-Sense* und *AthPEX10-Intron-Antisense* amplifiziert wurde. Durch einen Restriktionsverdau des PCR-Produkts wurde der Genomstatus der jeweiligen Pflanze bestimmt, wobei sich das PCR-Produkt des Wildtyps nicht verdauen lässt, das PCR-Produkt homozygoter Pflanzen komplett verdaut wird und das PCR-Produkt heterozygoter Pflanzen sowohl eine wt-Bande bei 727 bp als auch die Verdaufragmente bei 447 bp und 280 bp aufweisen sollte (Abbildung 14D). Die Genotypisierung zeigte, dass es sich bei den im Wachstum zurückgebliebenen Pflanzen um homozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie handelt, auch wenn noch Reste der 727 bp-Bande sichtbar waren.

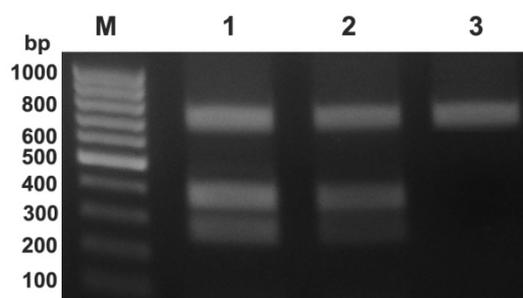


Abbildung 15: Re-PCR und Verdau an den 727 bp-Banden einer Wildtyp-Pflanze, einer homozygoten und einer heterozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen belegen einen unvollständigen Verdau durch Eam1104I bei der Genotypisierung. (1) homozygote PEX10-G93E-Pflanze, (2) heterozygote PEX10-G93E-Pflanze, (3) Wildtyp-Pflanze.

Um zu belegen, dass der Verdau durch Eam1104I nicht vollständig war, wurde die 727 bp-Bande, wie sie von einer homozygoten und einer heterozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanze und dem Wildtyp nach Verdau und Gelelektrophorese stammt, aus dem Agarosegel extrahiert, durch PCR amplifiziert und erneut verdaut. Die PCR-Produkte der homozygoten und der heterozygoten Pflanze der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie ließen sich verdauen, die des Wildtyps nicht (Abbildung 15). Dies deutet somit auf einen unvollständigen Verdau hin.

2.2.2. Homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen auf Erde Zwergenwuchs

Die zweimal in GFP-PTS1 rückgekreuzten und geselbsteten 14 Tage alten Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen auf MS-Platte mit (+) bzw. ohne (-) Saccharose keinen makroskopischen Phänotypen, der sich vom Wildtyp unterscheidet (Abbildung 16D). Überführt man homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen auf Erde, stellt sich ein deutlicher Zwergenwuchs ein (Abbildung 16A, B).

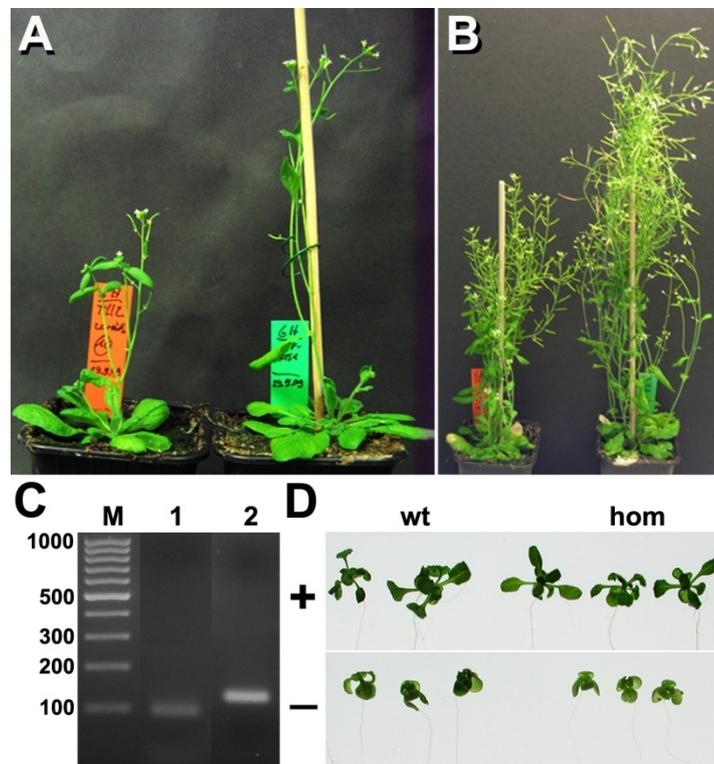


Abbildung 16: Homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen ein Wachstumsdefizienz. (A) 37d und (B) 57d alte homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanze (linke Pflanze) mit gleichaltriger wt-GFP-PTS1-Pflanze (rechte Pflanze). (C) Genotypisierung einer Wildtyp-Pflanze (1) und einer homozygoten Pflanze der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie (2). (D) Auf MS-Platten mit (+) und ohne (-) Saccharose zeigen homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen (hom) gegenüber dem Wildtyp (wt) kein vermindertes Wachstum.

2.2.2.1. Genotypisierung der Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie

Zur Genotypisierung der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen wurde sich der Punktmutation bedient, welche zur Aminosäuresubstitution P126S führt. Mit einem spezifischen Primer kann nun eine BspLI-Schnittstelle eingefügt werden, welche durch die Punktmutation eliminiert wird. Amplifiziert man nun über die Punktmutation hinweg, erhält man ein 125 bp großes PCR-Produkt. Dieses PCR-Produkt lässt sich nicht mit BspLI verdauen, wenn die Punktmutation P126S vorliegt. Handelt es sich um die Wildtyp-Sequenz, so wird das 125 bp große PCR-Produkt in die Fragmente der Größe 98 bp und 27 bp verdaut (Abbildung 16C). Zur Amplifikation wurden die Primer *PEX10TILL92077* und *AthPEX10-Intron-Antisense* verwendet.

Auf diese Art und Weise konnte eine homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie identifiziert werden (Abbildung 16C).

2.2.3. Die Keimlingsletalität tritt nur bei homozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und nur im Licht auf, es handelt sich um keinen Fettmobilisierungs-Phänotyp

Es wurde untersucht, ob die Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie eine gestörte Fettmobilisierung haben, um den Grund für die Keimlingsletalität bei homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen näher einzugrenzen. Hierfür wurde eine segregierende Pflanzenpopulation der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie auf MS-Medium mit bzw. ohne Saccharose ausgebracht und 14 Tage lang in Dunkelheit angezogen (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass auf MS-Platten mit Saccharose weder bei Pflanzen der segregierenden PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie noch bei Pflanzen der homozygoten PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie ein vermindertes Wachstum zu beobachten war

(Abbildung 17A, B). Auf Platten ohne Saccharose zeigten nur PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen ein leicht rückständiges Wachstum (Abbildung 17D). Pflanzen der segregierenden PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie wuchsen auch hier wie Wildtyp (Abbildung 17C). Die Abbildung 17 zeigt eine repräsentative Anzahl der auf MS-Platten ausgesäten Pflanzen. Es wurden etwa 100 Pflanzen je MS-Platte ausgebracht, sodass eine Segregationsanalyse möglich war. Hätte die homozygote PEX10-G93E-Mutation Auswirkungen auf die Reservestoffmobilisierung, hätten 25% der Pflanzen im Wachstum zurückbleiben müssen. Da die segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen selbst auf MS-Platten ohne Saccharose nach 14 Tagen in Dunkelheit keinen Phänotyp unterschiedlich vom Wildtyp zeigten, ist eine Störung in der Speicherstoffmobilisierung unwahrscheinlich. Jedoch zeigten homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie ein leicht vermindertes Wachstum auf MS-Platten ohne Saccharose, was auf eine Beeinträchtigung in der Reservestoff-Mobilisierung hinweisen könnte.

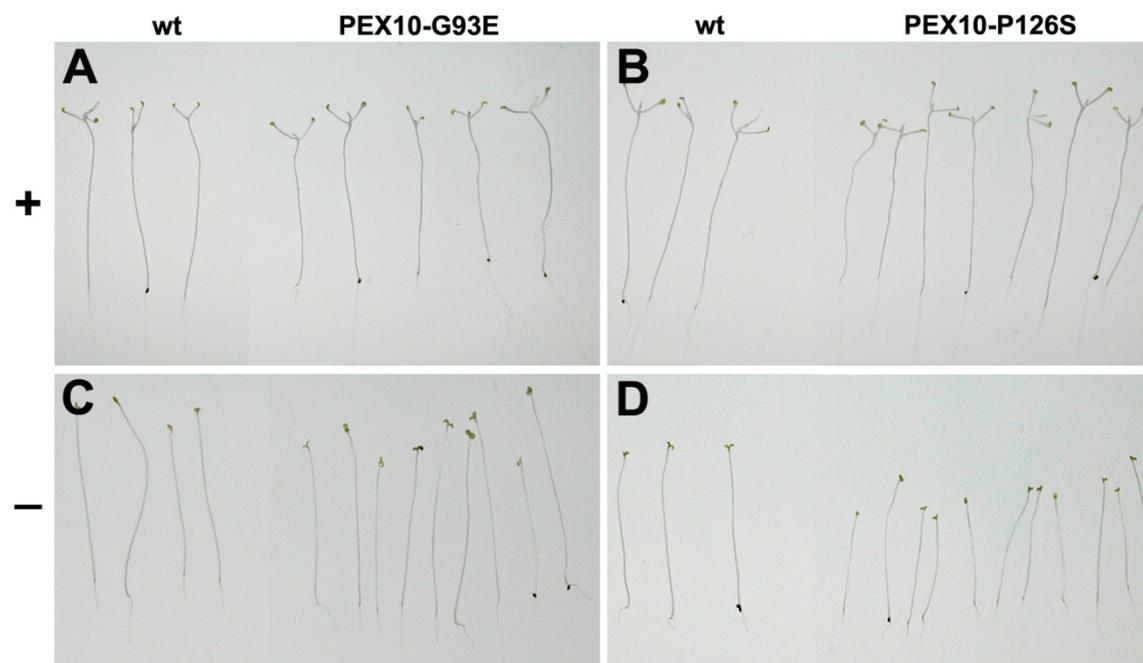


Abbildung 17: 14d dunkel gewachsene, segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen zeigen keinen Phänotyp, wogegen homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen ohne Saccharose einen Rückstand im Wachstum aufweist. (A) 14d alte dunkel gewachsene, segregierende Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie verhalten sich auf MS mit Saccharose (+), **(B)** ebenso wie homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie, wie wt. **(C)**. Auch auf MS ohne Saccharose (-) wachsen segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen wie wt. **(D)**. Homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen zeigen nach 14d in Dunkelheit auf MS ohne Saccharose ein leicht reduziertes Wachstum.

2.2.4. Die Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen keine verringerte Photosyntheseeffizienz

Um eine mögliche Verringerung der Photosyntheseleistung mit der daraus resultierenden Wachstumsdefizienz zu untersuchen, wurden eine heterozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und eine homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie im Alter von 33 Tagen hinsichtlich ihrer Photosyntheseleistung mittels PAM-2000 (*Pulse-Amplitude-Modifier*, Walz-Effeltrich, Deutschland) untersucht (Abbildung 18). Mit diesem Gerät ist es möglich, Photosyntheseparameter mittels der Chlorophyllfluoreszenz zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Photosyntheseleistung kein Unterschied zur wt-GFP-PTS1-Kontrolle besteht. Zudem konnte bei keiner der untersuchten Pflanzen Chlorose festgestellt werden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der beobachtete Zwergenwuchs sich nicht durch einen photorespiratorischen Defekt wie in PEX10 Δ Zn1 begründen lässt.

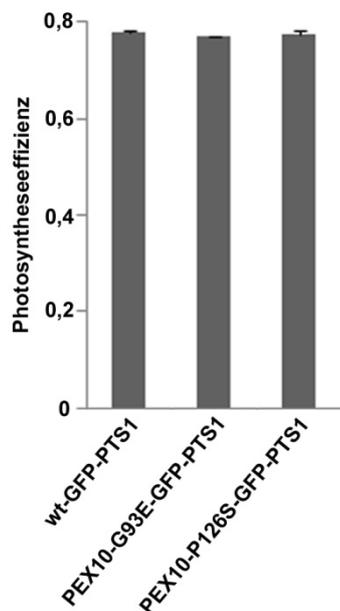


Abbildung 18: PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen die gleiche Photosyntheseeffizienz wie der wt. Die Photosyntheseeffizienz wurde an 33d alten Pflanzen bestimmt. Es wurden heterozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien, homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinien und als Kontrolle wt-GFP-PTS1 vermessen.

2.3. Die Entwicklung der Blatt-Peroxisomen in den PEX10-G93E-GFP-PTS1-, den PEX10-P126S-GFP-PTS1- und den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien

Es war das Ziel, den Einfluss von Punktmutationen im N-Terminus des in PEX10 und von einem mutierten Zn-Finger-Motivs im PEX12 auf die Blatt-Peroxisomen-Entwicklung, den Matrixproteinimport und den Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten zu untersuchen. Hierfür wurden die segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, die homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, IV, und VII sowie als Kontrolle die nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien III verwendet. Es konnte sowohl für die segregierende PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie als auch für homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie ein Matrixproteinimportdefekt nachgewiesen werden. Zudem wurde bei der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie auch starke Peroxisomen-Formaberranz festgestellt. Ein Kontaktverlust der Peroxisomen zu den Chloroplasten wurde weder in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie noch in der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie beobachtet. Die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, IV, und VII zeigten keinen Defekt im Matrixproteinimport und auch keine Peroxisomen-Formaberranz. Es konnte auch keine Störung des Organellenkontakts zwischen Peroxisomen und Chloroplasten nachgewiesen werden.

2.3.1. Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt sowohl Formaberranz der Blatt-Peroxisomen als auch einen gestörten Matrixproteinimport; die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie verhält sich wie Wildtyp

Die Untersuchung in Licht gewachsener Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie hinsichtlich ihrer Peroxisomen zeigt nur für PEX10-G93E auffällige Aberranzen. Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie wurden im Zuge einer ersten Genotypisierung nach der Selbstung auf Erde angezogen und am Confocalen Laserscanning-Mikroskop charakterisiert.

Bei der homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie wurde Keimlingsletalität beobachtet. Nur die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie konnte als homozygote

Linie erwirtschaftet werden. Um im Weiteren für die Keimlingsletalität bei der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie einen möglichen Fettmobilisierungs-Defekt auszuschließen, wurden Pflanzen auf MS ohne Saccharose in Dunkelheit und in Licht angezogen und am Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Hierbei zeigt die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie sowohl Formaberranz der Blatt-Peroxisomen als auch einen gestörten Matrixproteinimport. Die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigte keinerlei Abnormalitäten (Abbildung 19).

Zur Untersuchung des Kontakts zwischen Peroxisomen und Chloroplasten wurde Blattmaterial der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie am FIB-Mikroskop (*Focused Ion Beam*) betrachtet (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München). Als Kontrolle dienten Wildtyp und PEX10 Δ Zn1. Hierbei wurde festgestellt, dass die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, anders als PEX10 Δ Zn1, keine Störung des Kontakts aufweist.

2.3.1.1. Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt sowohl gestörten Matrixproteinimport als auch Formaberranz; die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie gleicht dem Wildtyp

Zur *in vivo*-Untersuchung der Blatt-Peroxisomen hinsichtlich Formstörung, Organellenkontakt zu Chloroplasten und Matrixproteinimport wurden die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie am Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Es wurden für beide Transgenlinien genotypisierte Pflanzen im Alter von 26 Tagen untersucht (Abbildung 19). Die untersuchten, homozygoten PEX10-P126S-Linien zeigten keine Auffälligkeiten (Abbildung 19G, J), heterozygote PEX10-G93E-Linien zeigten jedoch peroxisomale Formaberranzen ähnlich der PEX10 Δ Zn1-Mutante (Schumann et al., 2007). Es fiel auf, dass bei weitem nicht alle Peroxisomen Formaberranz zeigen, die beobachteten Aberranzen jedoch stärkere Ausprägung als in der PEX10 Δ Zn1-Mutante aufweisen. Es wurde weder eine Störung des Matrixproteinimports noch ein Kontaktverlust zu den Chloroplasten festgestellt (Abbildung 19B, E).

Um die in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie auftretende Keimlingsletalität genauer zu untersuchen, wurden Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie auf MS-Platten mit bzw. ohne Saccharose angezogen und im Alter von 14 Tagen am Confocalen Laserscanning-Mikroskop betrachtet (Abbildung 19G bis L). Heterozygote Pflanzen auf MS mit Saccharose verhielten sich wie die bereits beschriebenen 26 Tage alten heterozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie auf Erde. Homozygote, 14 Tage auf MS-Medium mit Saccharose gewachsene Pflanzen der

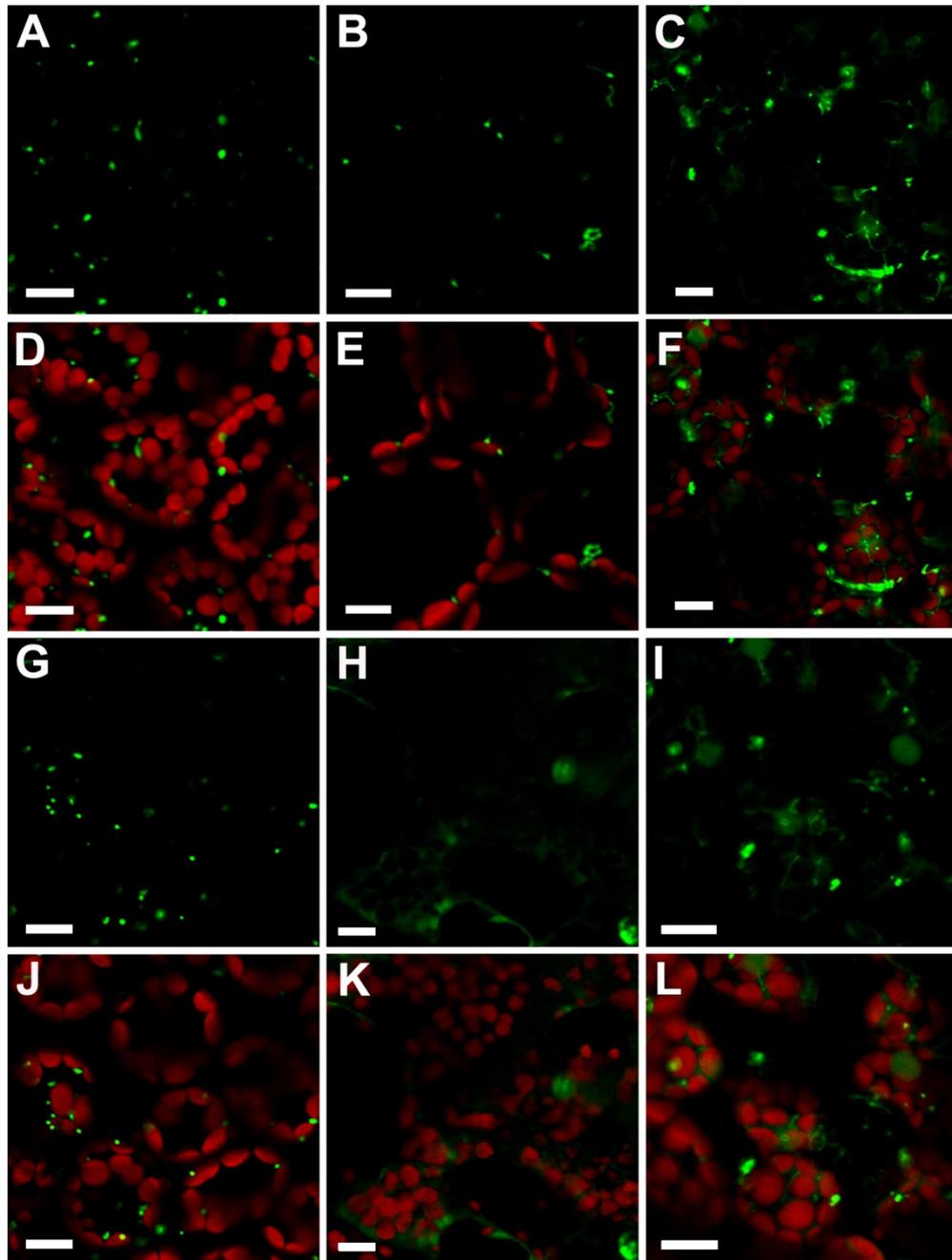


Abbildung 19: Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt nicht nur Formaberranz, sondern auch einen gestörten Matrixproteinimport. Die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie verhält sich wie wt. (A, D) wt, (B, E) heterozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, auf Erde, 26 Tage alt, (C, F) homozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, auf MS-Medium mit Saccharose, 14 Tage alt, (G, J) homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie, auf Erde, 26 Tage alt, (H, K) heterozygote und (I, L) homozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, auf MS-Medium ohne Saccharose, 14 Tage alt. Balken: 10 μ m

PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen zusätzlich zu den äußerst auffälligen Formaberranzen auch einen gestörten Import (Abbildung 19C, F). Auf MS ohne Saccharose zeigen sowohl die homozygoten als auch die heterozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie erhebliche Matrixproteinimportstörungen. Die

wt-GFP-PTS1-Pflanzen zeigen auf MS mit und ohne Saccharose, wie auf Erde, keine Störung im Matrixproteinimport oder dem Organellenkontakt (Abbildung 19A, D).

2.3.1.2. Die FIB-Untersuchung bestätigt die Formaberranz der Peroxisomen in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie

Zur genauen Untersuchung des Organellenkontakts zwischen Peroxisomen und Chloroplasten und zur Bestätigung der Formstörung der Peroxisomen wurden heterozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zur Ultrastrukturaufklärung am FIB-Mikroskop (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München) betrachtet (Abbildung 20). Als Kontrolle dienten PEX10 Δ Zn1- und Wildtyp-Pflanzen. Ein FIB-Mikroskop ermöglicht Serienschritte mit sehr geringer Schichtdicke (bis 5 nm) und EM-Auflösung. Mithilfe solcher Schnittserien war es möglich, einzelne Peroxisomen vollständig hinsichtlich Form und Kontakt zu den Chloroplasten zu untersuchen.

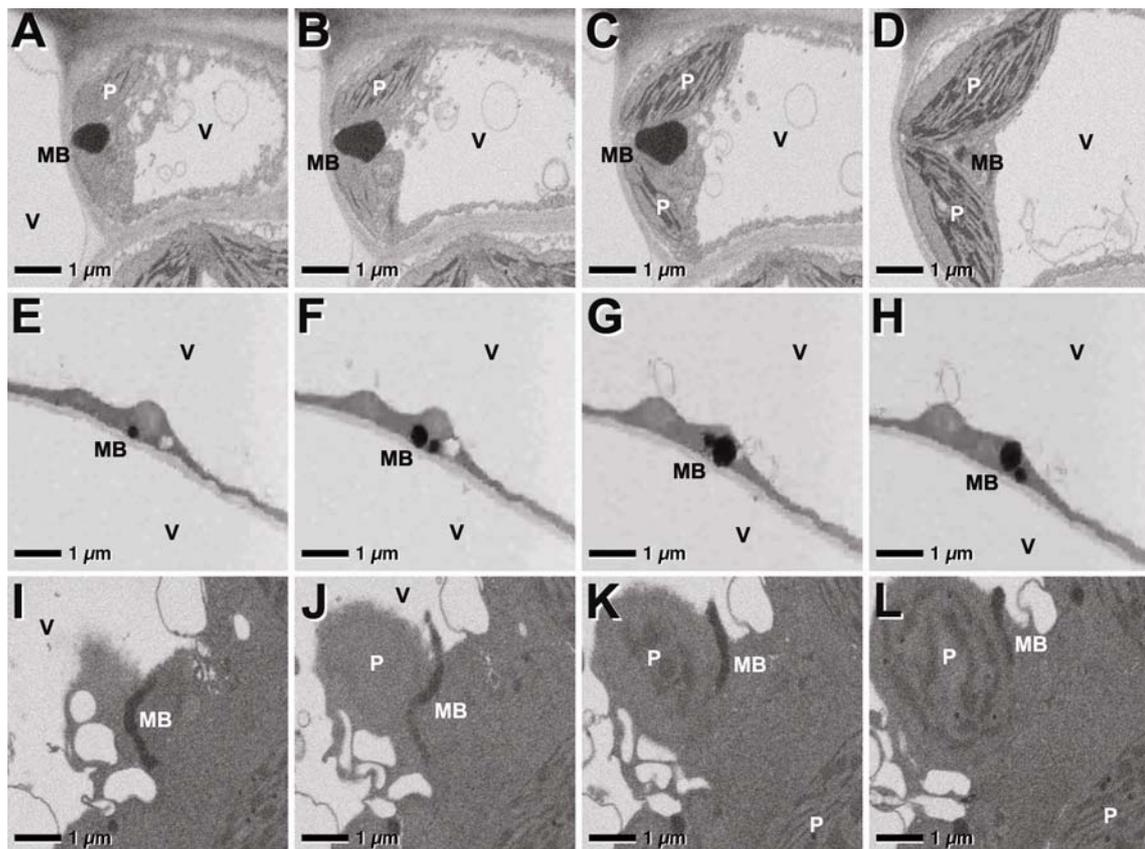


Abbildung 20: Die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigt stark formaberrante Peroxisomen, aber keinen gestörten Organellenkontakt wie in PEX10 Δ Zn1. (A – D) Wildtyp, (E – F) PEX10 Δ Zn1, (I – L) PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie. MB: Peroxisom, V: Vakuole, P: Plastid/Chloroplast.

Der Wildtyp zeigte immer eine normale, runde Form und engen Kontakt zu den Chloroplasten (Abbildung 20A-D). In der PEX10 Δ Zn1-Kontrolllinie waren viele Peroxisomen zu beobachten, die keinen Kontakt zu Chloroplasten aufweisen und sich nicht einmal in der Nähe von Chloroplasten befinden (Abbildung 20E-H). Die Peroxisomen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigten die bereits beschriebene, starke Formaberranz. Eine Kontaktstörung wie in PEX10 Δ Zn1 war nicht zu beobachten (Abbildung 20I-L). Die formgestörten Peroxisomen schienen sich sogar an die Chloroplasten zu schmiegen.

Da Peroxisomen normalerweise rund sind, haben sie ein kleines Membranoberfläche/Volumen-Verhältnis. Eine deformierte Form, wie sie in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zu beobachten ist, bedeutet einen Anstieg des Membranoberfläche/Volumen-Verhältnisses. Dies kann an eine Vergrößerung der Membranoberfläche, eine Verkleinerung des Volumen oder an beidem liegen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese Formveränderungen der Peroxisomen ein Versuch ist, mögliche Defizite wichtiger Membranproteine, wie PEX10, durch eine größere Peroxisomenoberfläche zu kompensieren.

2.3.2. Die Blatt-Peroxisomen-Morphogenese und der Matrixproteinimport sind in den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien nicht gestört

Die drei unabhängigen PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, IV, und VII und die nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie III als Kontrolle wurden am Confocalen Laserscanning-Mikroskop auf Peroxisomen-Form und Matrixproteinimport hin untersucht, um sie mit den bereits charakterisierten Δ Zn-Linien der Peroxine 2 und 10 zu vergleichen und so Einsicht in die Funktion des Zink-Fingers in PEX12 zu erlangen. Die makroskopische Untersuchung der PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, IV, und VII, der nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie III und der PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und III zeigte weder im Alter von 33 Tagen, noch im Alter von 57 Tagen in Normalatmosphäre einen Phänotyp verschieden zu gleichaltrigen wt-GFP-PTS1-Pflanzen (Abbildung 21).

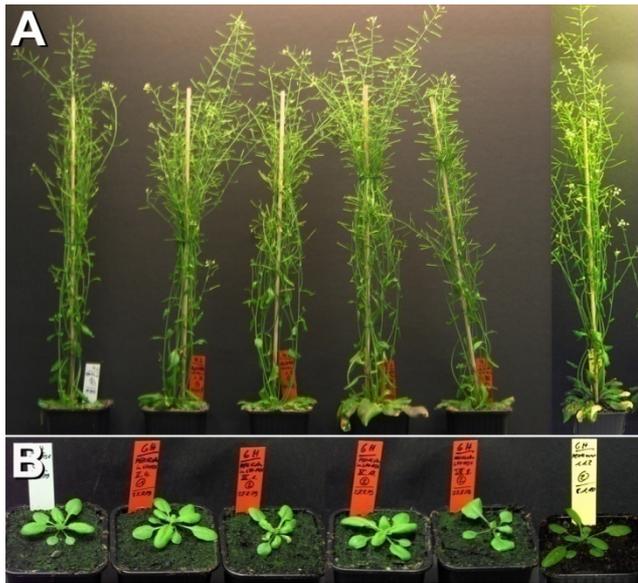


Abbildung 21: Die PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien zeigen keinen makroskopischen Phänotyp. (A) Wildtyp, PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, III, IV und VII und PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie im Alter von 57 Tagen unter Normalatmosphäre. **(B)** Wildtyp, PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, III, IV und VII und PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie im Alter von 33 Tagen unter Normalatmosphäre.

In vivo-Untersuchungen der Peroxisomen in den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II, IV und VII, der nicht exprimierende PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie III als Kontrolle und einer PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie am Confocalen Laserscanning-Mikroskop erbrachten keinen mikroskopischen Phänotyp. Weder Formaberranz noch eine Importstörung konnte beobachtet werden (Abbildung 22). Dies bedeutet im Falle der PEX12-wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie, dass der T7-Tag am N-Terminus von PEX12 keine Beeinträchtigung hervorruft. Es konnte auch kein Hinweis auf einen Kontaktverlust der Peroxisomen zu den Chloroplasten beobachtet werden.

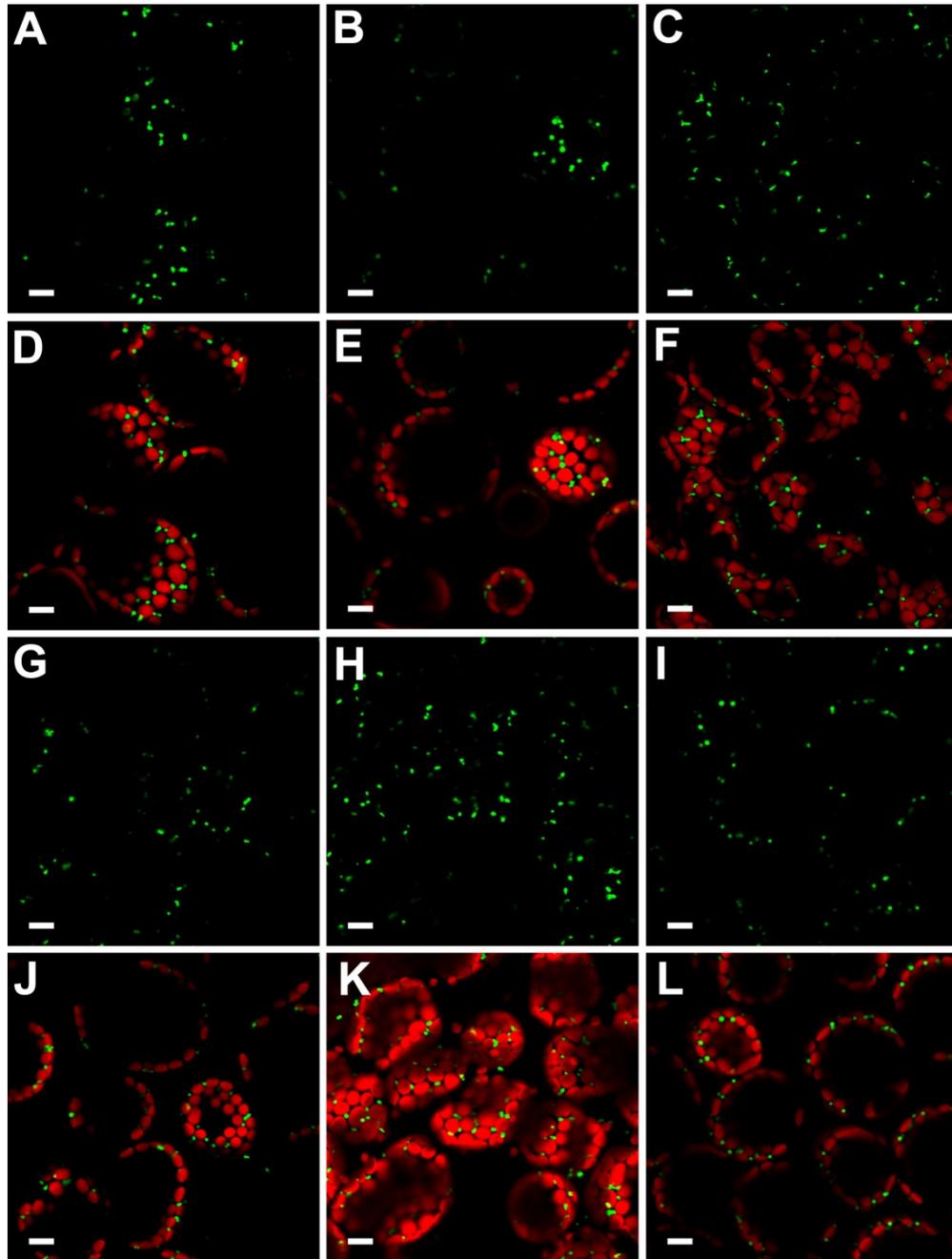


Abbildung 22: Die $PEX12\Delta Zn$ -T7-GFP-PTS1-Transgenlinien und $PEX12$ -wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie einen mikroskopischen Phänotyp nicht verschieden vom Wildtyp. wt (A, D), $PEX12$ -wt-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie (B, E), $PEX12\Delta Zn$ -T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II (C, F), III (G, J), IV (H, K) und VII (I, L). Balken: 10 μ m.

2.4. Expression von PEX10 mit N-terminalem T7-6xHis-Tag in der pex10-KO-Mutante

Welche Auswirkungen hat der T7-6xHis-Tag N-terminal an PEX10 auf den Phänotyp der Pflanze? Durch die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie wurde gezeigt, dass eine Mutation von konservierten Motiven N-Terminus von PEX10 den Phänotyp der Pflanze beeinflusst. Hierzu zählen makroskopisch ein vermindertes Wachstum und mikroskopisch eine aberrante Peroxisomenform und eine Matrixproteinimportstörung. Da bei den PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien N-terminal ein T7-Tag angehängt wurde, ist nicht auszuschließen, dass dieser Tag den N-Terminus maskiert und zum Phänotyp der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien beiträgt. Um dies zu untersuchen, wurde die PEX10-cDNA mit einem 6xHis-Tag und einem T7-Tag am N-Terminus in der pex10-KO-Mutante exprimiert. Diese Linie heißt im weiteren PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie.

Die so erzeugten Pflanzen der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie zeigen ein Wachstumsdefizit, ähnlich wie die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie, die sich nicht durch Wachstum unter erhöhtem CO₂-Druck (1800 ppm) beeinflussen lässt, wie es bei einer Beeinträchtigung der Photorespiration der Fall wäre.

2.4.1. Die Erzeugung der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie

Um eine Pflanze zu erhalten, welche nur PEX10-6xHis-T7 exprimiert, wurde die embryonale pex10-KO-Mutante mit dem PEX10-6xHis-T7-Konstrukt unter Kontrolle des 35S-Promotor komplementiert. Hierfür wurde PEX10 in den Vektor pET28(a) mit den Primern *PEX10 sense bin* und *PEX10 asense bin* kloniert und so mit einem 6xHis- und einem T7-Tag versehen. Die so getagte PEX10-cDNA wurde in den binären Vektor pCAMBIA 1301 umklontiert (Abbildung 23) und in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Durch *floral dipping* wurden eine segregierende Population von pex10-KO-Pflanzen mit dem PEX10-6xHis-T7-Konstrukt transformiert und anschließend auf Selektionsmedium nach positiven Transformanten gesucht (Abbildung 23). Die so erhaltene PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie trägt am N-Terminus von PEX10 einen 6xHis-Tag und einen T7-Tag. Zudem gewährt der pex10-KO-Hintergrund, dass kein endogenes PEX10 die Auswirkungen des maskierten N-Terminus von PEX10-6xHis-T7 verfälscht.

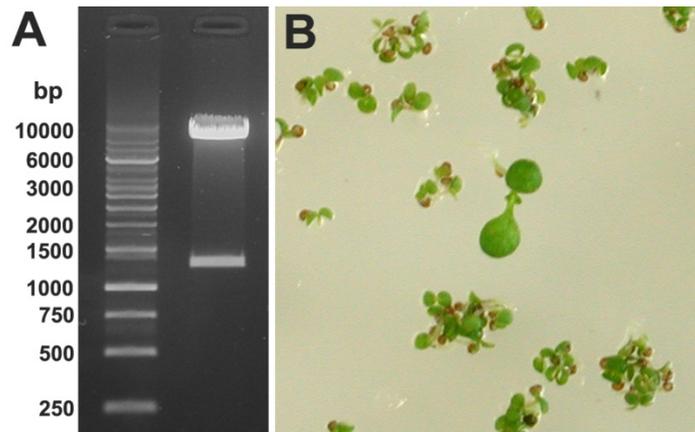


Abbildung 23: Transformation von PEX10-6xHis-T7 in die pex10-KO-Mutante. (A) Restriktionsverdau an PEX10-6xHis-T7 (1256 bp) in pCAMBIA 1301 (9813 bp) vor der Transformation in *A. tumefaciens*. **(B)** Sieben Tage auf Hygromycin-haltigem Medium selektionierte Transformanten zeigten normales Wachstum, während nicht transformierte Pflanzen im Wachstum zurückbleiben.

2.4.2. Genotypisierung der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie

Die mit PEX10-6xHis-T7 erfolgreich transformierten Pflanzen wurden für die pex10-KO-Mutation genotypisiert und für diese in die Homozygotie gebracht. Die pex10-KO-Mutante trägt ein DS-Element (Transposon) im vierten Exon. Zur Identifikation der Pflanzen, die das DS-Element homozygot in *PEX10* tragen und mit der PEX10-6xHis-T7-cDNA komplementiert wurden, wurden drei PCR-Primer-Paare erstellt, mit denen alle Segregationsmöglichkeiten in der T₂-Generation nachgewiesen werden konnten. Der am Startcodon von *PEX10* bindende *Sense*-Primer (*AthPEX10-S3-Sense*) amplifizierte mit einem auf dem fünften Exon bindenden *Antisense*-Primer (*AthPEX10-Exon-Antisense*) ein 922 bp großes Fragment, sollte zumindest eine genomische Kopie von *PEX10* vorhanden sein (Abbildung 24 A, Exon). Ein 588 bp großes Produkt wurde amplifiziert, wenn zumindest eine Kopie der transgenen PEX10-6xHis-T7-cDNA vorhanden war (Abbildung 24 B, Exon). Da die Amplifikation des längeren, genomischen Produkts von *PEX10* in Anwesenheit der PEX10-6xHis-T7-cDNA ineffizient ist, wurde mit einem *Antisense*-Primer (*AthPEX10-Intron-Antisense*), der im vierten Intron bindet, spezifisch für endogenes *PEX10* in Anwesenheit der PEX10-6xHis-T7-cDNA ein 727 bp Produkt amplifiziert (Abbildung 24 A, Intron). Die PEX10-6xHis-T7-cDNA kann mit diesem Primer nicht amplifiziert werden und auch endogenes PEX10, welches ein DS-Element trägt, wird nicht amplifiziert (Abbildung 24 B, Intron). Das DS-Element in *PEX10* wurde mit einem dritten *Antisense*-Primer (*AthPEX10-DS3'-Antisense*) amplifiziert, welcher auf

dem DS-Element bindet und ein 809 bp DNA-Fragment lieferte (Abbildung 24 B, DS-Element). Da nur in Anwesenheit des DS-Elements ein Produkt amplifiziert werden konnte, zeigt der Wildtyp keine Bande (Abbildung 24 A, DS-Element). Als Kontrolle diente der Wildtyp. Es wurden Pflanzen identifiziert, welche für das DS-Element in PEX10 homozygot sind und mit der PEX10-6xHis-T7-cDNA komplementiert wurden (Abbildung 24B).

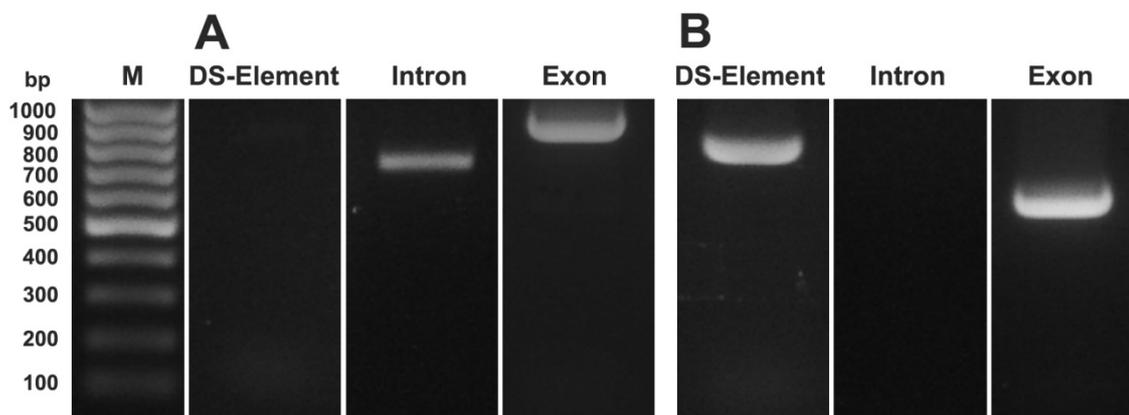


Abbildung 24: Der *pex10*-KO-Hintergrund ist homozygot. (A) PCR an Wildtyp, **(B)** PCR an der PEX10-wt-T7-*pex10*-KO-Transgenlinie.

Zwischen homozygoten und heterozygoten PEX10-6xHis-T7-Linien in homozygotem *pex10*-KO-Hintergrund kann nicht unterschieden werden, da die Insertionsstellen nicht bekannt sind. Eine Segregationsanalyse im homozygoten *pex10*-KO-Hintergrund war hinfällig, da homozygote *pex10*-KO-Pflanzen ohne die PEX10-6xHis-T7-cDNA embryonal sind und im Herzstadium absterben. Somit wird die *pex10*-KO-Pflanzen mit die PEX10-6xHis-T7-cDNA selektioniert, sobald die *pex10*-KO-Mutation in die Homozygotie gebracht ist.

2.4.3. Die PEX10-wt-T7-*pex10*-KO-Transgenlinie zeigt ein vermindertes Wachstum

Homozygote *pex10*-KO-Linien mit PEX10-6xHis-T7-cDNA wurden zur phänotypischen Analyse auf MS-Platten ausgesät, auf Erde überführt und sowohl unter Normalatmosphäre als auch unter Hoch-CO₂ (1800 ppm) angezogen. Sowohl in Normalatmosphäre als auch unter Hoch-CO₂-Atmosphäre zeigte die PEX10-wt-T7-*pex10*-KO-Transgenlinie ein vermindertes Sprosswachstum im Vergleich zu Wildtyp-

Pflanzen. Dies zeigte eine klare Beeinträchtigung des Phänotypen durch die PEX10-6xHis-T7-cDNA. Vergleicht man den Wildtyp und die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie, so stellt man fest, dass die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie weit weniger Höhenwachstum als der Wildtyp aufweist (Abbildung 25C, D), jedoch sehr viele Verzweigungen zeigte. Die Pflanzen wirkten dadurch gestaucht (Abbildung 25E, F, G, H).

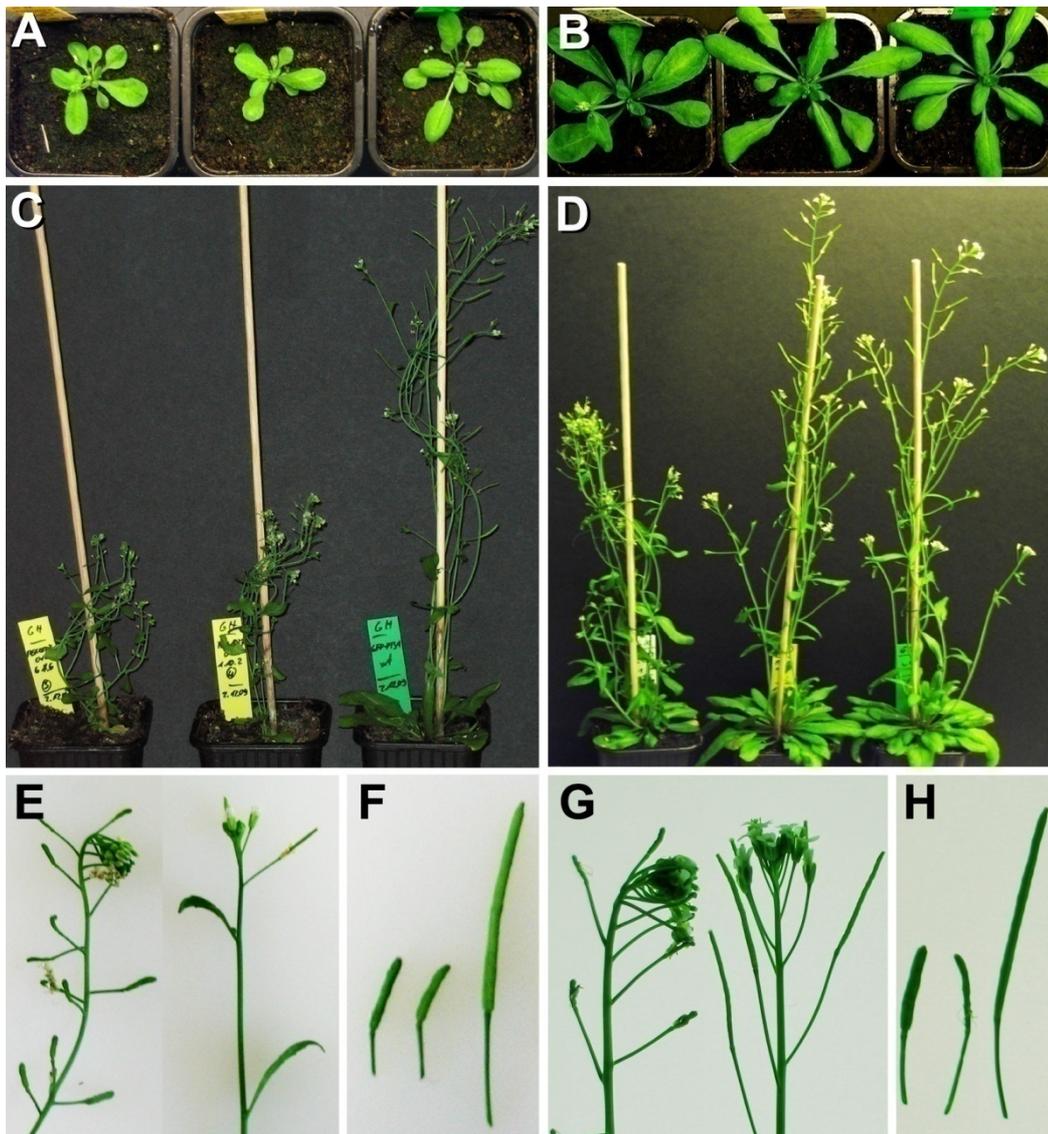


Abbildung 25: Die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie zeigt ein Wachstumsdefizit unter Normalatmosphäre und Hoch-CO₂. Unter Normalatmosphäre zeigten zwei Linien der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie und eine wt-Pflanze (rechts) im Alter von **(A)** 22 Tagen noch keinen Wachstumsunterschied, nach **(C)** 44 Tagen bleiben sie im Wachstum hinter dem wt zurück. Unter Hoch-CO₂-Atmosphäre zeigten eine PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie (links), die PEX10 Δ Zn1-Mutante (mitte) und eine wt-Pflanze (rechts) im Alter von **(B)** 22 Tagen noch keinen Wachstumsunterschied, nach **(D)** 44 Tagen bleibt die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie im Wachstum hinter dem wt zurück und , die PEX10 Δ Zn1-Mutante wächst wie der wt. Sowohl unter **(E, F)** Normalatmosphäre als auch unter **(G, H)** Hoch-CO₂ zeigt die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie eine nickende, dichte Infloreszenz und kurze Schoten.

In den Hoch-CO₂-Versuchen wurde zur Kontrolle eines mögliche Photorespirationsdefekts in der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie und der CO₂-Konzentration zusätzlich die PEX10ΔZn1-Mutante mit angezogen. Diese besitzt einen photorespiratorischen Phänotyp, der sich durch Hoch-CO₂ (1800 ppm) retten lässt. Zudem waren die Schoten stark verkürzt (Abbildung 25D). Die Pflanzen zeigten jedoch keinen Defekt in der Samenreife oder im Keimungsvermögen.

2.4.4. PEX10-6xHis-T7 lässt sich in der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie nicht lokalisieren

Um PEX10-6xHis-T7 in der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie zu lokalisieren, wurde die Expression von PEX10-6xHis-T7 geprüft. Hierzu wurde der Pflanzenrohextrakt untersucht und eine Immunpräzipitation mit α-T7-Tag-Antikörpern gegen PEX10-6xHis-T7 durchgeführt. Dies sollte zeigen, dass PEX10-6xHis-T7 in Pflanze überexprimiert wird und dass es vom α-T7-Tag-Antikörper erkannt wird. Im Rohextrakt wurde weder mit α-PEX10- noch mit α-T7-Tag-Antikörper PEX10-6xHis-T7 detektiert, was auf eine geringe Expression hinweist. Nach einer Immunpräzipitation am selbigen Pflanzenrohextrakt mit α-T7-Tag-Antikörpern wurde PEX10-6xHis-T7 nur von α-PEX10-Antikörper schwach erkannt, nicht jedoch von α-T7-Antikörper (Abbildung 26). Dies zeigte, dass der Expressionslevel von PEX10-6xHis-T7 zwar gering, das Protein aber doch vorhanden war. PEX10-6xHis-T7 in pex10-KO-Pflanzen wurden zusammen mit Wildtyp für Immuno-Gold-Elektronenmikroskopie vorbereitet und behandelt (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München). Es konnte jedoch in keiner Probe PEX10-6xHis-T7 mit Immuno-Gold markiert und somit detektiert werden. Dies lag sehr wahrscheinlich an der niedrigen Expression von PEX10-6xHis-T7. Obwohl eine 60-fache Überexpression auf Transkriptebene vorlag (Abbildung 7), schienen nur geringe Mengen translatiert zu werden. Möglicherweise reduzierte die Pflanze die Translation auf ein Maß, welches zur Kompensation des pex10-KO erforderlich ist.

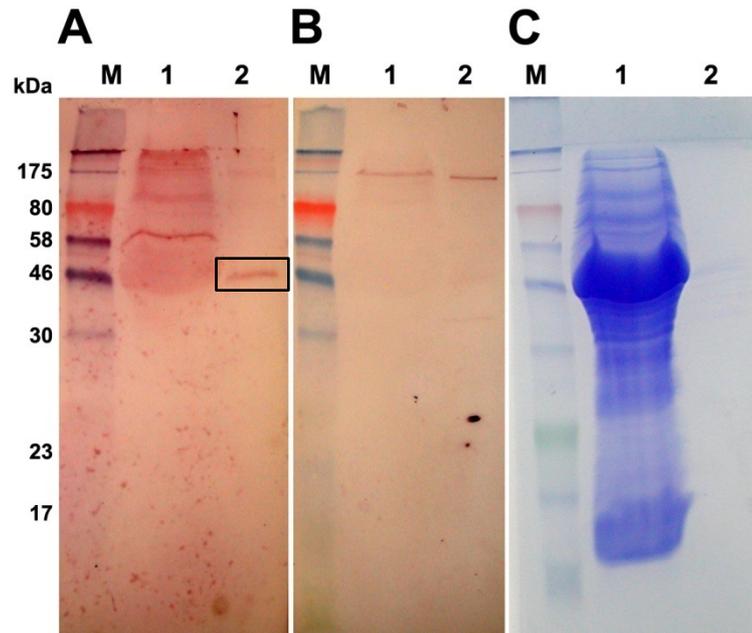


Abbildung 26: PEX10-6xHis-T7 wird nur schwach exprimiert. Es wurden 14 Tage alte PEX10-6xHis-T7 in pex10-KO-Pflanzen aufgearbeitet. Es wurde versucht, sowohl mit **(A)** α -PEX10-Antikörper, als auch mit **(B)** α -T7-Tag-Antikörper sowohl im (1) Rohextrakt als auch in einer (2) Immunpräzipitation mit α -T7-Tag-Antikörper PEX10-6xHis-T7 zu detektieren. Es gelang nur in der Immunpräzipitation PEX10-6xHis-T7 mit α -PEX10-Antikörper (A2, Kasten) zu detektieren. **(C)** Coomassie-Gel.

2.5. Eine Mutation im PEX10-Zn-RING-Finger-Motiv führt zu „freien“ Mitochondrien, die zu aggregieren scheinen

Von der PEX10 Δ Zn1-Mutante ist bekannt, dass die Überexpression der PEX10-cDNA mit dysfunktionalem Zink-Finger im Wildtyp-Hintergrund zu einer Störung des Organellenkontakts zwischen Blatt-Peroxisomen und Chloroplasten führt. Zudem zeigen die PEX10 Δ Zn1-Pflanzen einen photorespiratorischen Phänotyp, nämlich Zwergenwuchs und Chlorose in Normalatmosphäre und Rettung des Phänotyps durch Hoch-CO₂ (ca. 1800 ppm). Da der photorespiratorische Kreislauf nicht nur den Kontakt zwischen den Blatt-Peroxisomen und den Chloroplasten erfordert, sondern auch den Kontakt der Blatt-Peroxisomen zu den Mitochondrien benötigt, war es das Ziel, eine mögliche Kontaktstörung diesbezüglich in PEX10 Δ Zn-Mutanten zu untersuchen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden PEX10 Δ Zn-Mutanten hinsichtlich ihrer Organellendichte am Saccharosegradienten, ihrer Mitochondrien-Verteilung *in vivo* am Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in der PEX10 Δ Zn1-Mutante tatsächlich eine Population Mitochondrien von höherer Dichte existiert, welche im Saccharose-Stufengradienten in dichteren Schichten anzutreffen ist als Wildtyp-Mitochondrien. Zudem wurde ein vermehrtes Zusammenlagern der Mitochondrien abseits der Peroxisomen und Chloroplasten in den PEX10 Δ Zn1-Mutanten beobachtet.

2.5.1. Mitochondrien aus PEX10 Δ Zn1-Pflanzen zeigen am Saccharose-Dichtegradient höhere Dichte als Wildtyp-Mitochondrien

Zur Untersuchung eines Dichteunterschieds zwischen Wildtyp- und PEX10 Δ Zn1-Mitochondrien wurden Rohorganellen aus grünen Blättern isoliert und am Saccharose-Stufen-Gradienten aufgetrennt. Die Gradienten an Wildtyp und PEX10 Δ Zn1 wurden fraktioniert und jede Fraktion sowohl auf Saccharosegehalt mittels Refraktometer als auch auf Mitochondrienvorkommen mittels Antikörper gegen die mitochondriale Malatdehydrogenase (mMDH) untersucht. Die Wildtyp-Mitochondrien konzentrierten sich an der Interphase zwischen den Saccharose-Stufen 33% und 43% und in den ersten Fraktionen der 43%-Schicht (Abbildung 27A). Die Mitochondrien der PEX10 Δ Zn1-Pflanzen zeigten zwei Populationen. Das erste Konzentrations-Maximum wurde an der Interphase zwischen 33% und 43% Saccharose gefunden, die zweite Population

lokalisierte an der Stufen-Grenze zwischen 50% und 43%, wobei die Mehrzahl in 43% Saccharose gefunden wurde (Abbildung 27).

Aus Vorversuchen zur Isolierung von intakten Peroxisomen am Saccharose-Stufen-Gradienten war bekannt, dass es sehr schwierig ist, intakte Peroxisomen von den Chloroplasten aufgrund der Organelleninteraktion zu trennen. Da in PEX10 Δ Zn1-Pflanzen eine Störung dieses Organellenkontakts zu beobachten ist, ist es denkbar, dass auch der Kontakt zu den Mitochondrien gestört wird und auf diese Art und Weise ein Teil der Mitochondrien geringeren oder keinen Kontakt zu den Peroxisomen hat. Ohne die Bindung an die Peroxisomen und damit an die Chloroplasten sind diese „freien“ Mitochondrien in der Lage, durch Saccharoseaufnahme in tiefere und damit dichtere Gradientenschichten zu wandern. Die Chloroplasten wurden sowohl im Wildtyp als auch in PEX10 Δ Zn1-Pflanzen in den Fraktionen 20 bis 25 detektiert und lokalisieren somit mit der Mitochondrienpopulation beim Stufenübergang von 43% zu 33% (Abbildung 27B).

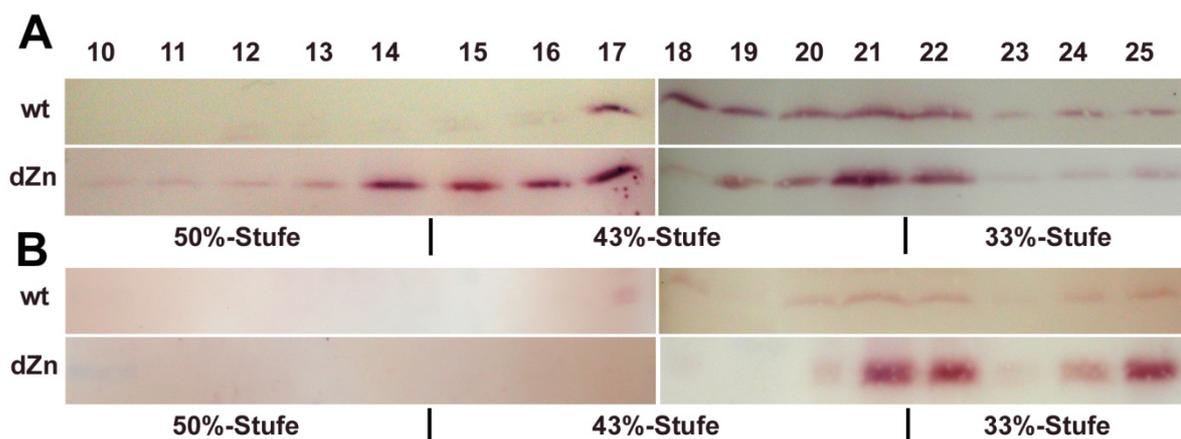


Abbildung 27: PEX10 Δ Zn1-Pflanzen besitzen eine Mitochondrien-Population mit höherer Dichte als im wt. Aufgetragen sind hier die Fraktionen 10 bis 25 der Saccharose-Stufen-Gradienten. **(A)** Die obere Zeile zeigt die Detektion der mitochondrialen Malatdehydrogenase im Wildtyp, die untere Zeile zeigt Detektion der mitochondrialen Malatdehydrogenase in PEX10 Δ Zn1-Pflanzen. **(B)** Die obere Zeile zeigt die Detektion des Chloroplasten-Hüllmembranproteins VIPP1 im Wildtyp, die untere Zeile zeigt Detektion von VIPP1 in PEX10 Δ Zn1-Pflanzen. Darunter sind die Saccharosekonzentrationen der Stufen (50%, 43%, 33%) mit den Interphasen (I) aufgetragen.

2.5.2. In der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze sind Mitochondrien-Zusammenschlüsse zu beobachten

Um die am Saccharose-Dichtegradient beobachteten zwei Mitochondrien-Populationen in PEX10 Δ Zn1 *in vivo* genauer zu untersuchen, wurde die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze am Confocalen Laserscannig-Mikroskop betrachtet. Als Kontrolle dienten wt-GFP-PTS1-Pflanzen sowie die PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II. Betrachtet wurden Protoplasten, da es nicht gelang, den Mitochondrienmarker (*MitoTracker orange*, Invitrogen) durch die Kutikula und Zellwand in das Zell-Innere zu bringen.

In der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze konnte eine gelegentliche Aggregation der Mitochondrien beobachtet werden. Dies Ansammlungen von Mitochondrien befanden sich abseits der Chloroplasten mit wenigen oder keinen Peroxisomen (Abbildung 28).

Weder im wt noch in PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie konnte eine ähnlich starke Aggregation abseits der Chloroplasten beobachtet werden. Die Anzahl der Peroxisomen und der Mitochondrien war von Protoplast zu Protoplast unterschiedlich hoch und ließ diesbezüglich keinen Mengenvergleich zwischen den einzelnen Linien zu. Es war nicht möglich, Peroxisomenzahl und Mitochondrienzahl innerhalb einer Linie in Beziehung zu setzen, da die Ausprägung der einzelnen Organellen unabhängig von einander zu variieren schien und auch Protoplasten mit Mitochondrien aber ohne Peroxisomen und umgekehrt beobachtet wurden. Ob der Kontakt zwischen Mitochondrien und Peroxisomen gestört ist, ist aus den confocalen Bildern nicht ersichtlich. Die Ansammlungen der Mitochondrien abseits der Chloroplasten könnten jedoch für eine zweite Population ohne Kontaktfähigkeit sprechen.

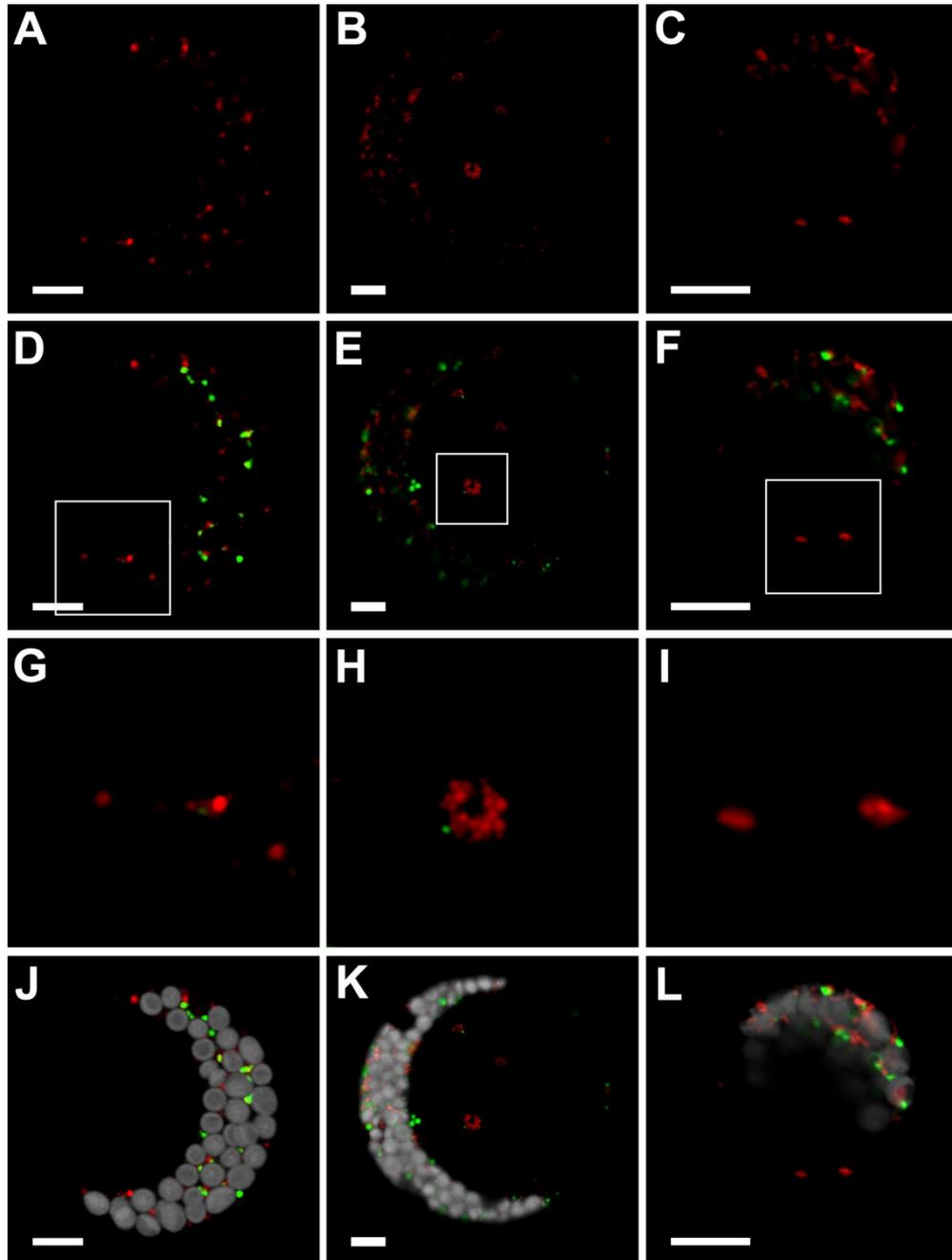


Abbildung 28: Die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze zeigt Mitochondrien-Aggregationen abseits der Chloroplasten. Weder der (A, D, G, J) wt noch die (C, F, I, L) PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie II zeigen Mitochondrienansammlungen abseits der Chloroplasten in einem Ausmaß, wie es in der (B, E, H, K) PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze zu beobachten ist.

Dargestellt sind in der ersten Zeile die Aufnahmen der Mitochondrien. Darunter ist die Überlagerung der Signale der Mitochondrien (**rot**) und der Peroxisomen (**grün**) abgebildet. Die weißen Rahmen kennzeichnen die Detail-Vergrößerungen der Mitochondrien-Aggregate, welche in der dritten Zeile abgebildet sind. Die unterste Zeile zeigt die Überlagerung der Mitochondriensignale mit denen der Peroxisomen und Chloroplasten (**weiß**). Balken: 10 μ m

2.6. Interaktionspartner von PEX10

Aus früheren Studien von PEX10 war bekannt, dass in der PEX10 Δ Zn1-Mutante eine Störung des Organellenkontaktes zwischen Peroxisomen und Chloroplasten auftritt (Schumann et al., 2007). Es ist ferner bekannt, dass Zink-RING-Finger-Domänen zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen in der Lage sind. Es besteht die Möglichkeit, dass PEX10 mit seinem Zink-RING-Finger-Motiv den Kontakt zwischen Chloroplasten und Peroxisomen vermittelt und auf direkte oder indirekte Art mit einem Chloroplasten-Membranprotein interagiert. Um diese Interaktion genauer zu charakterisieren, wurde ein *Yeast two-Hybrid-Screen* mit einer PEX10-Version ohne die beiden Transmembrandomänen als Köder durchgeführt. Hierbei wurde das Ca²⁺-bindende cytosolische Protein AtCP1 als Interaktionspartner gefunden.

Zudem wurde solubilisiertes PEX10 an eine T7-Säule gebunden und mit verschiedenen Pflanzenextrakten beladen, um Interaktionspartner direkt aus einem Pflanzen-Rohextrakt zu isolieren.

2.6.1. AtCP1 wird in einem *Yeast two-Hybrid-Screen* als PEX10-Interaktionspartner erkannt

Ziel des *Yeast two-Hybrid-Screen* (Y2H) war es, nach möglichen Interaktionspartnern von PEX10 zu suchen. Es wurde jedoch nicht die Volllänge des Peroxins 10 verwendet, sondern eine Version ohne die beiden Transmembran-Domänen, wobei der N- und der C-Terminus mit einem kurzen *Linker* von 7 Aminosäuren verbunden wurde. Die Entfernung der beiden Transmembran-Domänen erfolgte aus technischen Gründen, da für einen Y2H das angebotene Protein in löslicher Form vorliegen muss. Zudem bestand die Annahme, dass PEX10 mit anderen Proteinen über die die N- und C-terminalen Domänen, die beide ins Cytosol ragen, interagiert. Der Y2H wurde nicht selbst durchgeführt, sondern bei der Firma Hybrigenics (Paris, Frankreich) in Auftrag gegeben. Gescreent wurde gegen eine cDNA-Bibliothek aus einer Woche alten *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen und es wurden 79,5 Millionen Klone untersucht.

Im Genom von *Arabidopsis* wurden bisher knapp 28000 Gene identifiziert. Berücksichtigt man die drei möglich *reading-frames*, die beiden möglichen Orientierungen und geht von einem statistisch gleich häufigen Auftreten der Gene aus, so deckt der Y2H das *Arabidopsis*-Genom über 470-mal ab. Hierbei wurden drei Interaktionen mit PEX10 festgestellt, wobei nur die Interaktion mit AtCP1 als hoch signifikant anzusehen ist.

Der N- und der C-Terminus von PEX10 wurden gesondert mit spezifischen Primern amplifiziert und in den Vektor pEZY-CL kloniert. Für den N-Terminus wurden die Primer *AthPex 10-6xHis-Sense* und *AthPex 10-6xHis-Antisense* verwendet. Der C-Terminus wurde mit den Primern *AthPex 10-6xHis-Sense* und *AthPex 10-6xHis-Antisense* amplifiziert. Als Linker zwischen N- und C-Terminus diente ein Stück der *multiple cloning site*, die 7 Aminosäuren in *frame* lieferte. Die Gesamtgröße der gekürzten PEX10-cDNA betrug nur noch 972 bp (Abbildung 29).

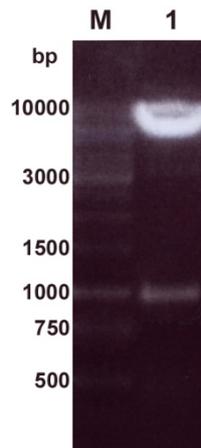


Abbildung 29: Klonierung von PEX10 ohne Transmembrandomänen. Zu sehen ist ein Restriktionsverdau an pEZY-CL mit PEX10 N+C-Terminus. Die Größe des Vektors pEZY-CL beträgt knapp 6000 bp, PEX10 N+C-Terminus ohne Transmembrandomänen ist 972 bp groß.

Die Korrektheit des Klons wurde durch Sequenzieren überprüft. Dieser Klon wurde zur Verwendung im Y2H an die Firma Hybrigenics geschickt und dort in den Hefeexpressionsvektor pB27 (Hybrigenics, Frankreich) kloniert.

Sowohl die Löslichkeit des verkürzten PEX10-Proteins als auch die optimalen Expressionsbedingungen wurden von Hybrigenics ermittelt. Hierzu zählten eine Domänenanalyse von PEX10 und später auch von AtCP1. Zudem wurde eine Toxizität für Hefe ausgeschlossen und die nötige Konzentration an 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT), nämlich 0 mM, ermittelt. Dies geschah, um mögliche Eigenaktivierung des Reportersystems durch eine Kreuzreaktion von PEX10 mit sich selbst zu verhindern. PEX10 war nicht zur Kreuzreaktion mit sich selbst, also zur Eigenaktivierung des Reportersystems, in der Lage.

Unter 79,5 Millionen getesteter Klone wurden drei Interaktionen festgestellt. Es wurden die Sequenzen der Gene At3g43300, At5g08720 und At5g49480 gefunden und analysiert (Abbildung 30).

Ergebnisse

Clone Name	Type Seq	Gene Name (Best Match)	Start..Stop (nt)	Frame	Sens	%Id 5p	%Id 3p	PBS
pB27_A-5	5p/3p	Arabidopsis thaliana - AT5G08720	1053..1987	IF		99.7	99.7	E
pB27_A-13	5p/3p	Arabidopsis thaliana - AT5G08720	1053..1987	IF		98.1	99.4	E
pB27_A-1	5p/3p	Arabidopsis thaliana - AT5G08720	1053..1987	IF		98.4	97.9	E
pB27_A-8	5p/3p	Arabidopsis thaliana - AT5G08720	1083..2011	IF		99.6	99.3	E
pB27_A-9	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..568	* X	IF	98.4	100.0	A
pB27_A-11	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..634	* X	IF	98.1	99.4	A
pB27_A-6	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..574	* X	IF	99.5	100.0	A
pB27_A-2	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..634	* X	IF	96.4	99.6	A
pB27_A-16	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..649	* X	IF	98.8	99.5	A
pB27_A-18	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..649	* X	IF	98.8	99.4	A
pB27_A-14	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	-40..568	* X	IF	99.8	100.0	A
pB27_A-15	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	21..571	X	IF	100.0	100.0	A
pB27_A-20	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	45..670	X	IF	100.0	ALU 63.7	A
pB27_A-7	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	45..670	X	IF	100.0	ALU 61.1	A
pB27_A-4	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	45..670	X	IF	100.0	ALU 59.7	A
pB27_A-12	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	207..656	X	IF	100.0	97.7	A
pB27_A-17	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	207..656	X	IF	99.8	98.2	A
pB27_A-21	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATCP1	207..656	X	IF	100.0	98.6	A
pB27_A-3	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATMIN7	1740..2252	IF		100.0	100.0	D
pB27_A-10	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATMIN7	1740..2252	IF		100.0	100.0	D
pB27_A-19	5p/3p	Arabidopsis thaliana - ATMIN7	1740..2252	IF		100.0	100.0	D

IF In Frame

A Interaktion mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit

D Mittlere Interaktionsgewissheit

Diese Interaktionsklasse beinhaltet: - falsch-positive Interaktionen

- mit Y2H schwer zu detektierende Interaktionen (geringe Abundanz der mRNA in der Klon-Bibliothek, Faltung des Ziel-Proteins, Zielprotein toxisch für Hefe)

E Interaktionen eng verwandter Proteindomänen, mögliche unspezifische Interaktionen:

- Ziel-Proteine sind auf Grund Ihrer biologischen Funktion eng verwandt

- Ziel-Protein beinhaltet ein bekanntes Protein-Protein-Interaktionsmotiv oder ein Motiv mit mehreren biochemischen Funktionen.

* Das Fragment beinhaltet die Volllänge der kodierenden Sequenz

X Das Fragment beinhaltet mindestens eine Stop-Codon in Frame

Abbildung 30: PEX10 interagiert mit AtCP1. Es wurden insgesamt drei Interaktionen gefunden, nämlich PEX10 mit At3g43300 (ATMIN7), At5g08720 und At5g49480 (ATCP1). Dabei wurde nur die Interaktion mit AtCP1 als starke und zuverlässige Interaktion bewertet, zum einen, weil die Interaktion in 14 zum Teil unterschiedlichen Klonen gefunden wurde und zum anderen, weil AtCP1 keine Eigenschaften aufweist, die auf eine falsch-positive Interaktion hinweisen.

Die Abbildung zeigt die Auswertung des von der Firma Hybrigenics durchgeführten Y2H mit PEX10 ohne Membrandomänen gegen eine cDNA-Bank aus 7 Tage alten in Licht gewachsenen *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. In der ersten Spalte der Tabelle steht der Klonname, die zweite Spalte zeigt, dass sowohl die 5'- als auch die 3'-Sequenz zur Interaktionsanalyse zur Verfügung stand. In Spalte drei ist der Genname aufgeführt, der eine Interaktion zeigt. Die nächste Spalte zeigt das Start- und das Stop-Codon der Klonsequenz relativ zu der darauf liegenden c-DNA. Die darauf folgende Spalte gibt Auskunft über den Leserahmen der cDNA. In den anschließenden Spalten wird die Orientierung und die 5'- und 3'-Übereinstimmung der Interaktor-Sequenz mit der cDNA-Referenz angegeben. In der letzten Spalte wird die Interaktion selbst evaluiert.

Das Gen At3g43300, auch AtMIN7 genannt, codiert für eins von acht Mitgliedern der *Arabidopsis* Adenosindiphosphat (ADP) ribosomaler Faktor (ARF) Guanin Nukleotid Exchange Faktor (GEF) Protein Familie (*the Arabidopsis adenosine diphosphate (ADP) ribosylation factor (ARF) guanine nucleotide exchange factor (GEF) protein family*). Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle im Vesikeltransport eukaryotischer Zellen. Es wurde ein Klon von AtMIN7 dreimal gefunden und von Hybrigenics als Interaktion von

mittlerer Interaktionsgewissheit eingestuft. Da PEX10 vermutlich nicht am Vesikeltransport beteiligt ist und AtMIN7 Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes ist, ist eine Interaktion *in vivo* als unwahrscheinlich einzustufen.

At5g08720 wurde insgesamt viermal mit zwei verschiedenen Klonen gefunden. Es ist jedoch nichts über die Funktion oder die biologischen Prozesse bekannt, in denen das Protein involviert ist. Einzig die Lokalisation in den Mitochondrien und eine vorhergesagte Zyklase/Dehydrase-Domäne (InterPro:IPR005031) ist bekannt. Zyklastasen sind an der Synthese der großen Stoffgruppe der Poliketide beteiligt. Da keine Transmembrandomänen vorhergesagt wurden und AT5G08720 somit in die Mitochondrien lokalisiert wird, ist eine Interaktion mit PEX10 auszuschließen. Die Interaktion wurde zudem von Hybrigenics als mögliche unspezifische Interaktion klassifiziert.

Als drittes Gen wurde At5g49480, auch als AtCP1 (*Arabidopsis thaliana* Calcium-bindendes Protein 1) bezeichnet, identifiziert. Es wurden neun verschiedene Klone insgesamt 14-mal gefunden. Bei AtCP1 handelt es sich um ein kleines (17,2 kDa), cytosolisches Protein, welches drei EF-Hand-Motive zur Bindung von Ca^{2+} besitzt. Ansonsten besitzt es keine vorhersagbaren Domänen. Die Interaktion wurde von Hybrigenics mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als positive Interaktion bewertet. Da es sich bei AtCP1 um ein cytosolisches Protein handelt und Calcium ein allgegenwärtiges Signal in der Pflanzenzelle darstellt, ist eine Interaktion mit PEX10 *in vivo* durchaus denkbar.

Mit fast 80 Millionen untersuchten Klonen kann der Y2H als gesättigt angesehen werden. Es wurden jedoch weder PEX2 noch PEX12 gefunden, welche mit PEX10 in der Peroxisomenmembran einen Komplex bilden. Dies könnte in der Tatsache begründet sein, dass PEX10 ohne Transmembrandomänen im Y2H angeboten wurde. Es ist durchaus denkbar, dass die Peroxine über ihre Transmembrandomänen miteinander interagieren, da diese in der Membran in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. PEX10 ohne Transmembrandomänen würde demzufolge nicht mit PEX2 und PEX12 interagieren.

2.6.2. PEX10 lässt sich in *E. coli* nativ exprimieren und anreichern

Um PEX10 biochemisch zu untersuchen, wurde dieses peroxisomale Membranprotein in Volllänge mit seinen beiden Transmembrandomänen nativ in *E. coli* exprimiert. Hierzu wurde PEX10 in den Expressionsvektor pET28(a) kloniert und in den

Überexpressionsstamm Rosetta2 DE3 transformiert. Durch die Klonierung in pET28a wurde PEX10 am N-Terminus mit einem 6xHis- und einem T7-Tag zur Anreicherung und Detektion versehen (Abbildung 31A) und wird im Folgenden als PEX10-6xHis-T7 bezeichnet.

Als optimale Expressionsbedingungen wurde eine Kultivierungstemperatur von 20°C und nicht 37°C und eine Induktionskonzentration von 50 µM und nicht 1 mM IPTG ermittelt. Bei diesen sanften Bedingungen lagert *E. coli* PEX10-6xHis-T7 nicht nur als unlösliches Protein in *inclusion bodies* ab, sondern inseriert es in seine Plasmamembranen (Abbildung 31B).

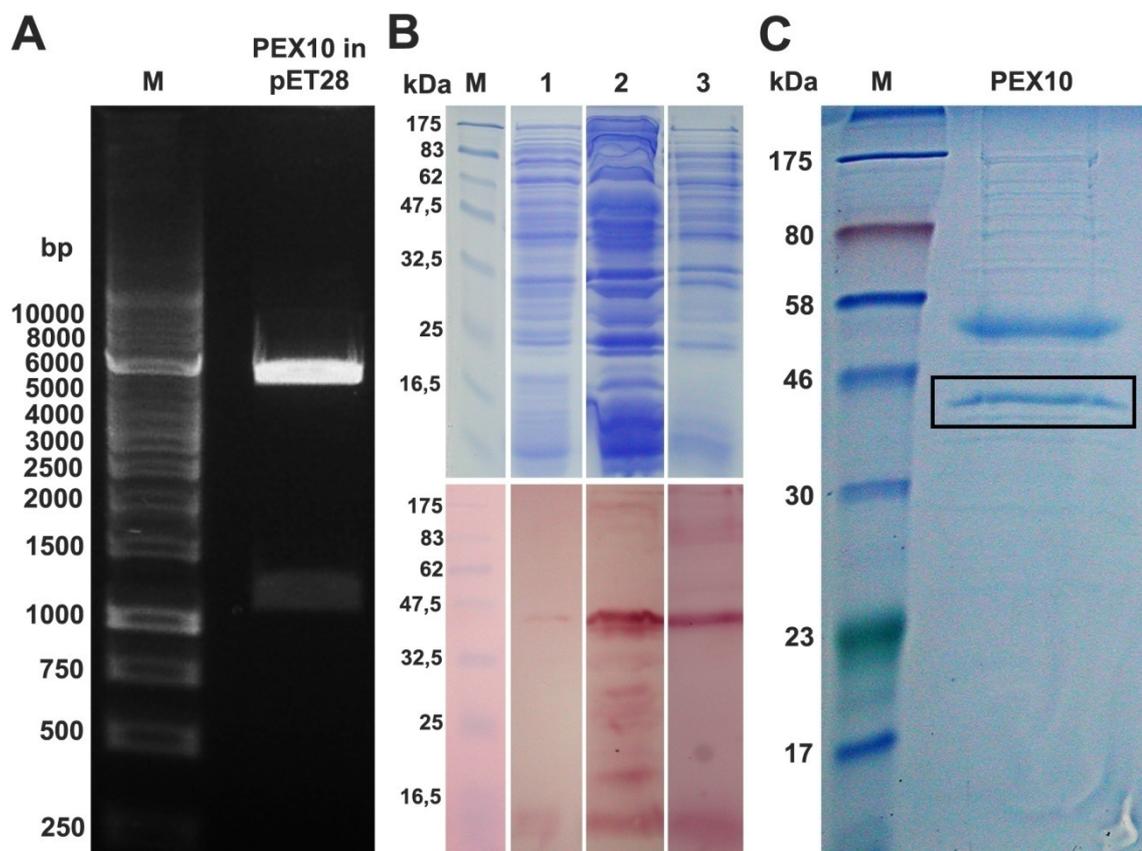


Abbildung 31: Expression und Anreicherung von nativem PEX10-6xHis-T7 aus *E. coli*. (A) Restriktionsverdau an PEX10 (1146 bp) im Vektor pET28(a) (5369 bp) vor der Transformation in den Expressionsstamm Rosetta2 DE3. (B) PEX10-6xHis-T7 lässt sich bei 20°C und einer Induktorkonzentration von 50 µM IPTG in den *E. coli*-Plasmamembranen anreichern. Dargestellt in Probe 1 sind die löslichen Proteine nach Isolation der Cytoplasmamembranen. Probe 2 zeigt die solubilisierten Cytoplasmamembranen. In Probe 3 sind die unlöslichen Proteine aufgetragen. Es sind sowohl die Coomassie-Gele (oben) als auch darunter die dazugehörigen mit α-PEX10-Antikörper behandelten Western-Blots abgebildet. (C) Solubiliertes PEX10-6xHis-T7 wurde mittels T7-Affinitätssäule so weit angereichert, dass die PEX10-6xHis-T7-Proteinbande am Coomassie-Gel gut sichtbar war. Diese Bande wurde ausgeschnitten und ihre Identität als PEX10-6xHis-T7 mittels Massenspektrometrie bestätigt.

PEX10-6xHis-T7 wurde aus den mittels Ultrazentrifugation isolierten Cytoplasmamembranen mit dem Detergens Dodecyl-Maltosid solubilisiert. Dodecyl-Maltosid wurde als Solubilisierungs-Detergens gewählt, da dieses Detergens einen niedrigen Kritischen Micellaren Punkt besitzt und deshalb schon in geringer Menge Micellen bildet, in die sich PEX10 mit seinen beiden Transmembrandomänen einlagert. Dies ist zur Stabilisierung und Konformationserhaltung von PEX10 essentiell.

Das derart aus den Plasmamembranen solubilisierte PEX10-6xHis-T7 wurde über eine T7-Affinitätssäule angereichert und durch Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 31C). Da PEX10-6xHis-T7 als Transmembranprotein während der Expression und der Aufarbeitung zur Proteingewinnung durch die *E. coli*-Membranen stabilisiert und erst sehr spät mit dem milden Detergens Dodecyl-Maltosid aus den Membranen solubilisiert wurde, ist davon auszugehen, dass ein großer Teil nativ vorlag.

2.6.3. AtCP1 lässt sich zusammen mit PEX10 präzipitieren

Zur biochemischen Untersuchung der Interaktion von PEX10 und AtCP1 *in vitro* wurde AtCP1 mit den Primern *Sense T7 pET28* und *Antisense pET28* in den Expressionsvektor pET28(a) kloniert und somit mit einem 6xHis- und einem T7-Tag versehen (AtCP1-6xHis-T7) (Abbildung 32A). Diese Tags dienten sowohl zur Anreinigung als auch zur Detektion, da kein Antikörper gegen AtCP1 vorlag. AtCP1-6xHis-T7 wurde im *E. coli*-Stamm Rosetta2 DE3 überexprimiert. Als die günstigsten Expressionsbedingungen hatte sich eine Anzuchttemperatur von 37°C und eine Induktorkonzentration von 5 mM IPTG erwiesen.

Um AtCP1-6xHis-T7 in möglichst kleinem Volumen anzureichern, wurden über eine His-Tag-Säule mit geringem Bettvolumen abgereichert (Abbildung 32B). Das so angereicherte AtCP1-6xHis-T7 wurde zusammen mit PEX10-6xHis-T7 inkubiert und anschließend wurde PEX10-6xHis-T7 mittels α -PEX10-Antikörper präzipitiert. Da sowohl AtCP1-6xHis-T7 als auch PEX10-6xHis-T7 einen T7-Tag tragen, konnten beide am Western-Blot mit α -T7-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 32). Die Größe des rekombinanten AtCP1-6xHis-T7 betrug 21 kDa. Eine Bande entsprechender Größe wurde nur bei den tatsächlichen Interaktionsproben gefunden, nicht aber in den Kontrollen. Dies weist auf eine Interaktion und eine Copräzipitation von AtCP1-6xHis-T7 mit PEX10-6xHis-T7 hin.

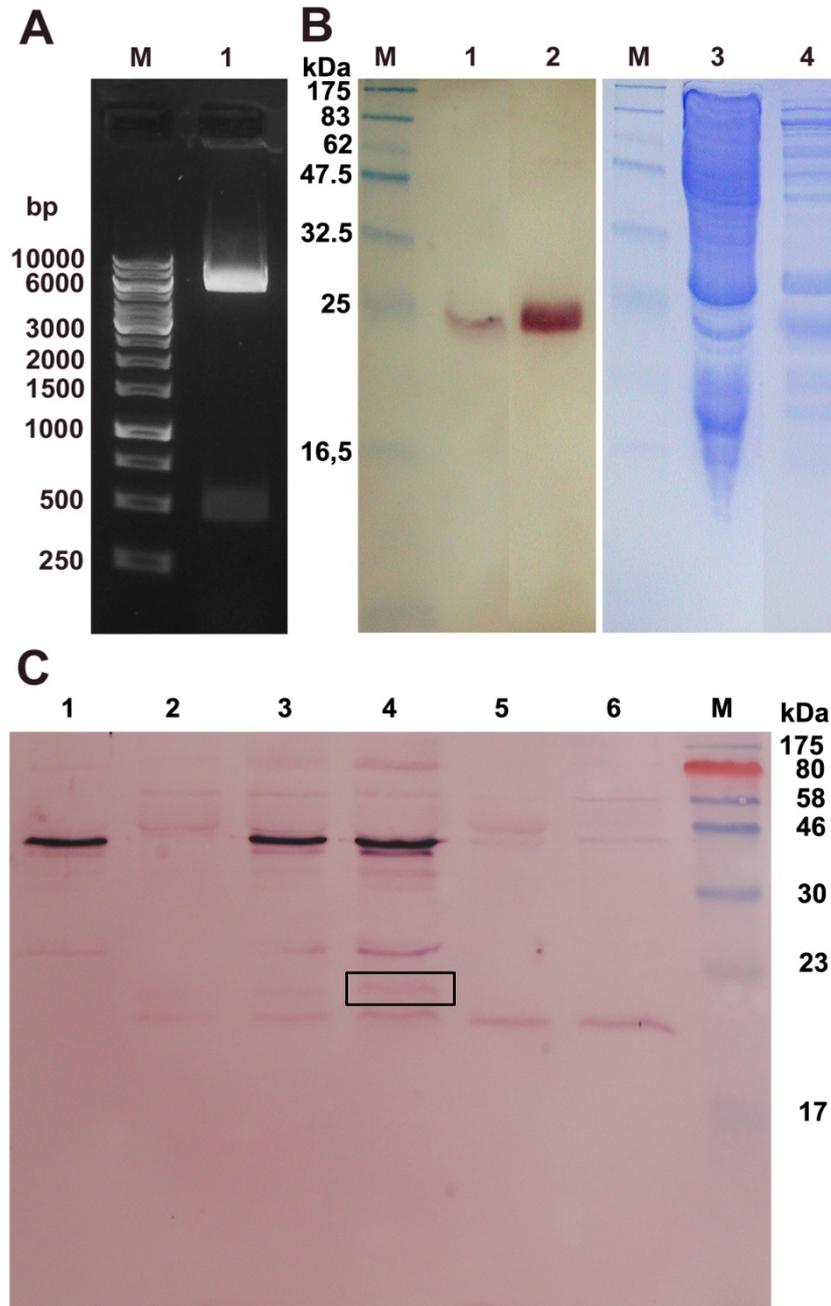


Abbildung 32: AtCP1-6xHis-T7 lässt sich mit PEX10-6xHis-T7 copräzipitieren. (A) AtCP1 (483 bp) wurde zur Überexpression in den Vektor pET28(a) (5369 bp) kloniert. (B) Exprimiertes, löslicher AtCP1-6xHis-T7 (21kDa) wurde über eine His-Tag-Säule erfolgreich angereichert. (C) Der Western-Blot zeigte in den Proben 3 und 4 die Coimmunopräzipitation von AtCP1-6xHis-T7 (21kDa) mit PEX10-6xHis-T7 (46kDa). Die Bande von AtCP1-6xHis-T7 war in Probe 4 besser als in Probe 3 zu erkennen und ist hervorgehoben (□). Die Proben 3 und 4 enthielten beide AtCP1-6xHis-T7 und PEX10-6xHis-T7, die Probe 4 enthielt jedoch noch zusätzlich 10 mM EDTA. Die Proben 1, 2, 5 und 6 waren Kontrollen der Präzipitation. Probe 1 enthielt nur PEX10-6xHis-T7, Probe 2 nur AtCP1-6xHis-T7. Die Probe 5 und 6 enthielten beide AtCP1-6xHis-T7 und PEX10-6xHis-T7, es wurde jedoch in der Probe 5 mit α -gMDH-Antikörper präzipitiert und in Probe 6 kein Antikörper verwendet.

2.6.4. Suche von *in vivo*-Interaktionspartnern von PEX10 mittels PEX10-6xHis-T7-Affinitätssäule

Um Interaktionspartner von PEX10 direkt in *Arabidopsis thaliana* zu bestimmen, wurde PEX10-6xHis-T7 an eine T7-Säule gebunden und mit Pflanzenextrakten beschickt. Es wurden sowohl alle löslichen Proteine eines Pflanzenrohextrakts als auch bestimmte Fraktionen über die PEX10-6xHis-T7-Säule geschickt. Zur Fraktionierung wurden die Pflanzen schonend im Kühlraum aufgearbeitet und durch Zentrifugation die Chloroplasten von den leichteren Organellen und dem Cytosol abgetrennt. Da ein direkter Interaktionspartner in der äußeren Chloroplastenmembran vermutet wurde, wurden die Chloroplasten weiter fraktioniert und die Hüllmembranen isoliert. Beladen wurde die PEX10-6xHis-T7-Affinitätssäule sowohl mit den isolierten Chloroplastenmembranen als auch mit der Cytoplasmafraktion. Die Cytoplasmafraktion wurde geladen, um mögliche indirekte Interaktionspartner zu identifizieren und um die Interaktion mit AtCP1 zu bestätigen.

Selbst nach Silberfärbung der Coomassie-Gele konnte keine Änderung im Bandenmusters detektiert werden, welche auf das Binden eines Interaktionspartners an PEX10 hingewiesen hätte. Der beim Beladen der T7-Säule mit PEX10-6xHis-T7 gebundene, bakterielle Proteinhintergrund war zu hoch, um die möglicherweise schwache Bande eines Interaktionspartners zu identifizieren. (Abbildung 33).

Anzunehmen ist, dass im Fall der Chloroplasten-Hüllmembranen zu wenig Protein und damit zu wenig Interaktionspartner zur Verfügung standen. Ähnliches trifft wahrscheinlich auf die cytoplasmatischen Proteine zu. Da PEX10 nur in geringer Menge exprimiert wird, ist es möglich, dass auch der Interaktionspartner nur in geringer Menge vorliegt, besonders, wenn die Interaktion eine direkte ist. Erschwerend kommt hinzu, dass PEX10-6xHis-T7 an der T7-Säule nicht sauber gereinigt werden kann und immer mit einem Protein-Hintergrund behaftet ist. Wird nur sehr wenig Interaktionspartner gebunden, so könnte dessen Bande vom Protein-Hintergrund überdeckt werden.

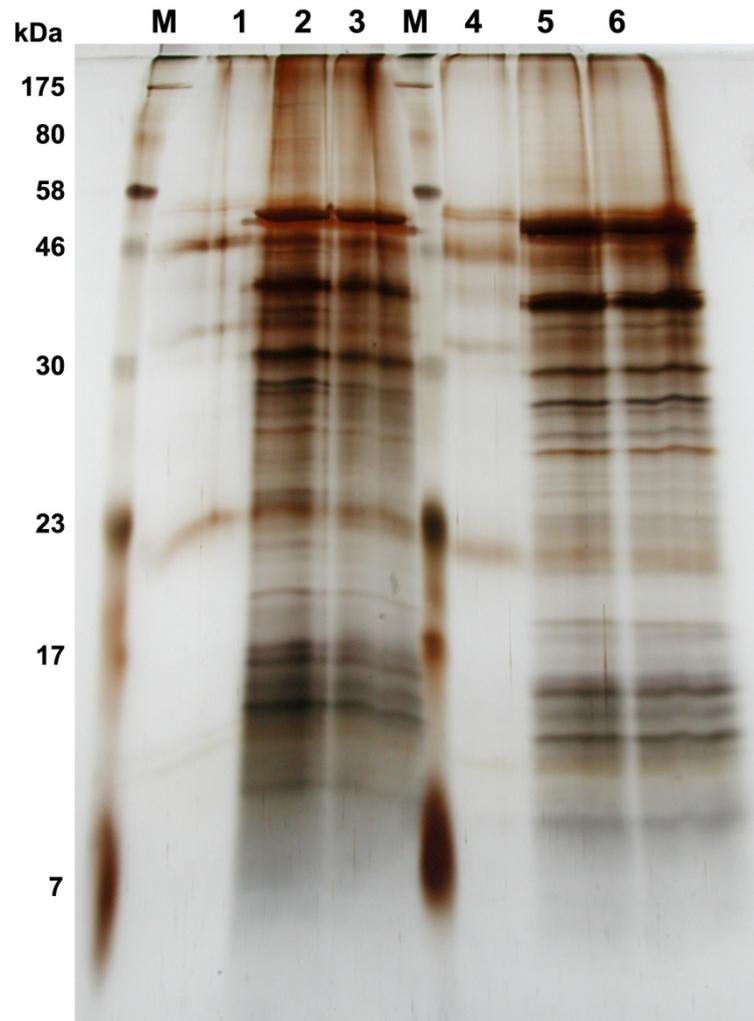


Abbildung 33: Interaktionspartner von PEX10 konnten in Pflanzenextrakten nicht identifiziert werden. Bei der Suche nach Interaktionspartnern wurden sowohl cytosolische Proteine wie AtCP1 als auch Membranproteine in den Chloroplastenmembranen getestet. Säulen, an die PEX10-6xHis-T7 über den T7-Tag gebunden wurde, wurden mit cytosolischen Proteinen (Proben 1 bis 3) und mit Chloroplastenmembran-Proteinen (Proben 4 bis 6) beladen. Als Kontrolle wurde zum einen nur das Säulenmaterial mit den Proteinextrakten beladen (Proben 1 und 4) und zum anderen nur dass mit PEX10-6xHis-T7 gebundene Säulenmaterial betrachtet. Es konnte jedoch im Vergleich mit diesen beiden Kontrollen keine zusätzliche Bande in den eigentlichen Interaktionstests (Proben 2 und 5) festgestellt werden.

2.7. Proteomik an Chloroplastenmembranen von Wildtyp und PEX10 Δ Zn lässt keine Rückschlüsse auf die Interaktion mit PEX10 zu

In früheren Studien zu PEX10 wurde offenkundig, dass eine Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domäne zu einem Kontaktverlust zwischen Peroxisomen und Chloroplasten führt (Schumann et al., 2007). Zur Untersuchung dieses Kontaktverlustes zwischen Peroxisomen und Chloroplasten in den PEX10 Δ Zn1-Pflanzen wurden sowohl vom Wildtyp als auch von PEX10 Δ Zn1 Chloroplastenmembranen isoliert. Es war das Ziel, mögliche

wt				
1	2	3	4	5
ATCG01130.1	AT2G06860.1	AT3G02060.1	AT4G00640.1	AT5G01810.1
AT1G04630.1	AT2G07390.1	AT3G02060.2	AT4G02075.1	AT5G01810.2
AT1G05290.1	AT2G07680.1	AT3G05270.1	AT4G03280.1	AT5G02500.1
<u>AT1G06950.1</u>	AT2G19820.1	AT3G12250.1	AT4G03280.2	AT5G04480.1
AT1G08260.1	AT2G24920.1	AT3G12250.2	AT4G06634.1	AT5G06950.1
<u>AT1G10890.1</u>	AT2G26420.1	AT3G12250.3	AT4G06634.2	AT5G06950.2
AT1G11380.1	AT2G27060.1	AT3G12250.4	AT4G07470.1	AT5G06950.3
AT1G18200.1	AT2G27285.1	AT3G12250.5	AT4G08740.1	AT5G06950.4
AT1G22760.1	AT2G28310.2	AT3G12580.1	AT4G12020.1	AT5G06960.1
AT1G31640.1	<u>AT2G33220.1</u>	AT3G12980.1	AT4G16790.1	AT5G06960.2
AT1G48610.1	AT2G35170.1	AT3G20760.1	AT4G32200.1	AT5G13655.1
<u>AT1G51080.1</u>	<u>AT2G37080.1</u>	AT3G22310.1		AT5G14650.1
<u>AT1G54870.1</u>	AT2G41160.1	AT3G25090.1		AT5G17580.1
<u>AT1G55970.1</u>		AT3G30470.1		AT5G25110.1
AT1G63500.1		AT3G30600.1		<u>AT5G27380.1</u>
AT1G64570.1		<u>AT3G48870.1</u>		AT5G35030.1
AT1G65070.1		AT3G49260.1		AT5G36110.1
AT1G71080.1		AT3G49260.2		AT5G38344.1
AT1G73080.1		AT3G53880.1		<u>AT5G40030.1</u>
AT1G77890.1		AT3G55480.1		AT5G40640.1
		AT3G55480.2		<u>AT5G48130.1</u>
		<u>AT3G55800.1</u>		AT5G48545.1
		AT3G61260.1		<u>AT5G50920.1</u>
		AT3G63520.1		AT5G51350.1
				AT5G54095.1
				AT5G56610.1
				AT5G56610.2
				AT5G60690.1

Tabelle 1: Die Isolation der Chloroplastenmembran-Proteine ist verunreinigt. Die MS-Vermessung der Chloroplastenmembran-Isolation aus wt-Pflanzen zeigt eine mehr als 75%ige Verunreinigung der Probe mit Proteinen, welche nicht in den Chloroplastenmembranen oder den Chloroplasten selbst anzutreffen sind. Chloroplastenproteine wurden grün hinterlegt und Chloroplasten-Hüllmembranproteine zusätzlich unterstrichen. Es wurden die ATG-Nummern der für die codierenden Gene der gefundenen Proteine aufgeführt und nach Chromosomen sortiert.

Ergebnisse

Änderungen in Proteinpopulation und Abundanz zwischen wt und PEX10 Δ Zn1-Pflanzen zu detektieren. Eine mögliche Änderung in der Proteinverteilung hätte hinsichtlich einer Interaktion wichtige Hinweise liefern können. In der massenspektroskopischen Untersuchung der Hüllmembranen wurden viele Chloroplasten-Proteine gefunden, besonders in der Präparation der Chloroplastenmembranen aus PEX10 Δ Zn1-Pflanzen. Es wurden hier fast ausschließlich Chloroplastenproteine gefunden, und zwar 32 aus 37 (Tabelle 2), wovon sich 12 Proteine als Chloroplasten-Hüllmembranproteine herausstellten. Beim wt wurden hingegen zwar viel mehr Proteine gefunden, nämlich 96, aber der Chloroplasten-Proteinanteil lag nur bei 23% (Tabelle 1). Nur das Protein TIC110 (*Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplasts 110*, At1g06950) wurde in beiden Proben gefunden und war im Wildtyp das einzige Hüllmembranprotein. Da bei weitem nicht alle Chloroplastenmembranproteine gefunden wurden und es keine ausreichende Schnittmenge zwischen den beiden MS-Vermessungen gab, war ein Vergleich hinsichtlich der Proteinverteilung nicht möglich.

Δ Zn				
1	2	3	4	5
ATCG00480.1	<u>AT2G24820.1</u>	<u>AT3G06510.1</u>	AT4G04640.1	AT5G01220.1
ATCG00490.1	AT2G28000.1	<u>AT3G17970.1</u>	AT4G13010.1	<u>AT5G01500.1</u>
AT1G03630.1	AT2G39730.1	<u>AT3G63140.1</u>	AT4G14070.1	<u>AT5G08540.1</u>
<u>AT1G06950.1</u>	<u>AT2G43950.1</u>		AT4G25450.1	AT5G14220.1
AT1G09340.1	<u>AT2G44640.1</u>		<u>AT4G25650.1</u>	<u>AT5G19620.1</u>
AT1G12840.1				AT5G22640.1
<u>AT1G12900.1</u>				<u>AT5G23890.1</u>
AT1G20020.1				AT5G42650.1
AT1G52400.1				AT5G46420.1
<u>AT1G55490.1</u>				<u>AT5G64580.1</u>
<u>AT1G70610.1</u>				
AT1G76030.1				
AT1G78000.1				
<u>AT1G79560.1</u>				

Tabelle 2: Die Isolation der Chloroplastenmembran-Protein aus PEX10 Δ Zn1-Pflanzen ist sehr sauber. Bei der MS-Vermessung der Chloroplastenmembran-Isolation aus PEX10 Δ Zn1-Pflanzen wurden nur fünf von insgesamt 37 Proteinen identifiziert, die nicht in den Chloroplasten lokalisierten. Chloroplastenproteine wurden grün hinterlegt und Chloroplasten-Hüllmembranproteine zusätzlich unterstrichen. Es wurden die ATG-Nummern der für die gefundenen Proteine codierenden Gene aufgeführt und nach Chromosomen sortiert.

3. Diskussion

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums während der Reservestoffmobilisierung zur Keimlingsentwicklung. Anhand von Zeitreihen wurde im Wildtyp der günstigste Zeitpunkt zur Beobachtung des Glyoxysomalen Reticulums ermittelt, um Vergleiche hinsichtlich Form, Verteilung und Ausprägung mit der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, den Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien der Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12, sowie den PEX10-G93E- und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinien anstellen zu können.

Im zweiten Teil wurden N-terminale PEX10-Punktmutanten in konservierten Domänen, nämlich die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie, auf ihren Phänotyp hin untersucht und charakterisiert.

Im dritten Teil der Arbeit galt das Augenmerk der Entwicklung der Blatt-Peroxisomen in den PEX10-G93E-GFP-PTS1-, den PEX10-P126S-GFP-PTS1- und den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien.

Der vierte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der PEX10-T7-6xHis-Expression in der pex10-KO-Mutante und zeigt, dass bereits die Veränderung des N-Terminus von PEX10 durch Anhängen eines T7- und 6xHis-Tags ein vermindertes Wachstum zur Folge hatte.

Im fünften Abschnitt wurde die Interaktion der Mitochondrien zu den Peroxisomen im Wildtyp und in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze untersucht, um das Auftreten zweier Mitochondrienpopulationen unterschiedlicher Dichte in der PEX10 Δ Zn1-Mutante zu untersuchen.

Das sechste und siebte Kapitel beschäftigt sich mit der Suche nach möglichen Interaktionspartnern von PEX10, da eine Überexpression von PEX10 mit dysfunktionalem Zink-RING-Finger im Wildtyp-Hintergrund zu einem Kontaktverlust zwischen Blatt-Peroxisomen und Chloroplasten führt.

3.1. Die Entwicklung des Glyoxysomalen Reticulums in *A. thaliana* sowie der Einfluss der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX2, PEX10 und PEX12 auf dessen Ausprägung und auf den glyoxysomalen/peroxisomalen Matrixproteinimport

Anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte in den Kotyledonen von *A. thaliana* die Entstehung eines Glyoxysomalen Reticulums während der Keimlingsentwicklung festgestellt werden. Ungewöhnliche Formgebungen der

Glyoxysomen wurden bereits zuvor in elektronenmikroskopischen Studien beschrieben, jedoch handelte es sich hierbei weniger um ein Reticulum, welches sich scheinbar aus mehreren Glyoxysomen zusammensetzt, sondern viel mehr um Glyoxysomen, welche von Einschlüssen und Invaginationen durchsetzt sind (Gruber et al., 1970; Trelease et al., 1971; Schopfer et al., 1975; Wanner et al., 1982). Diese Formveränderung der Glyoxysomen ist zu Beginn der Keimung noch nicht zu beobachten. Ähnlich wie bereits in vielen Spezies gezeigt sind die Glyoxysomen in *Arabidopsis* am ersten Tag der Keimung scheinbar willkürlich und einzeln über die mit Reservestoffen dicht gepackte Zelle verstreut (Trelease et al., 1971; Wanner et al., 1982; Chapman and Trelease, 1991). Diese Glyoxysomen sind verhältnismäßig klein und es ist nicht klar, ob es sich hierbei um eine ererbte Population handelt, oder ob diese während der Samenreife neu gebildet wurden. Es ist jedoch bekannt, dass zur Brechung der Samendormanz Glyoxysomen nötig sind (Penfield et al., 2007) und dass Mutationen in der β -Oxidation sich negativ auf die Samendormanz auswirken, wie die *cts* (*comatose*)-Mutante, eine ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter-Mutante in der Glyoxysomenmembran, zeigt (Russell et al., 2000; Footitt et al., 2002). Der starke Anstieg der Glyoxysomenzahl in *Arabidopsis* in den ersten Tagen der Keimung (Abbildung 11) spiegelt einen bereits in *C. vulgaris* und *C. sativus* detektierten sprunghaften Anstieg der glyoxysomalen Markerenzyme, Malatsynthase und Isocitratlyase, in diesem Zeitraum wieder (Hock, 1969; Trelease et al., 1971; Wanner et al., 1982).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dunkel gewachsene *Arabidopsis*-Keimlinge am dritten Tag ein Maximum der Glyoxysomenzahl erreichen und erste Ausprägungen des Glyoxysomalen Reticulums zu beobachten sind. In dunkel gehaltenen Pflanzen sind diese Strukturen noch über mehrere Tage hin zu beobachten, wogegen ein Tag Belichtung bei drei Tagen in Dunkelheit gezogenen Pflanzen zu deren völligem Verschwinden führt. Dies deutet auf eine zeitlich begrenzte Präsenz des Glyoxysomalen Reticulums bis zur beginnenden Photoautotrophie in *Arabidopsis* hin. Bei dem Glyoxysomalen Reticulum könnte es sich folglich um eine strukturelle Umformung der Glyoxysomen handeln, welche es der Pflanze ermöglicht, Reservestoffe möglichst schnell zu mobilisieren, um den Übertritt zur Photoautotrophie zu vollziehen. Die mit der Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums einhergehende Zellvakuolisierung in den dunkel gewachsenen Pflanzen und die Vergrößerung der effektiv genutzten Glyoxysomen-Membranoberfläche durch die Bildung eines Reticulums sprechen für diese Hypothese. Der Vergleich der Kotyledonenfläche von in Licht und in Dunkelheit gewachsener Pflanzen zeigt, dass vom Tag drei, an dem noch kein Größenunterschied zu beobachten ist, zum Tag 4 die Kotyledonenfläche der in Licht gewachsenen Pflanzen sich versiebenfacht, während die Kotyledonenfläche der in Dunkelheit gewachsenen

Pflanzen annähernd gleich bleibt. Diese rasante Vergrößerung des photosynthetisch aktiven Gewebes deutet auf einen raschen Übertritt zur Photoautotrophie hin. Ermöglicht wird dieser rasche Übertritt durch das Vorhandensein von Etioplasten in den Kotyledonen. Innerhalb kurzer Zeit werden diese durch Lichtinduktion in Chloroplasten umgewandelt (Waters and Langdale, 2009).

Warum das Glyoxysomale Reticulum in belichteten Keimlingen nicht zu finden ist, könnte mit dem durch Licht induzierbaren Teilungsprozess der Peroxisomen zusammenhängen (Desai and Hu, 2008). Hierbei könnte die Belichtung das Signal zur „Zerteilung“ des Glyoxysomalen Reticulums liefern und die Teilung, analog zur Proliferation der Peroxisomen durch PEX11, DRP und FIS1 (Zhang and Hu, 2010), einleiten. Induziert wird die Teilung der Peroxisomen durch dunkelrotes Licht, detektiert von Phytochrom A. Die daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors HYH (HY5 HOMOLOG) sorgt für eine stärkere Transkription von PEX11b und leitet somit die Peroxisomenelongation, den ersten Schritt zur Peroxisomenteilung (Abbildung 1), ein (Desai and Hu, 2008).

Die Ausprägung und Verteilung des Glyoxysomalen Reticulums innerhalb der Keimblätter einer Pflanze erscheint gleichmäßig, die Schwankungen der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums von Pflanze zu Pflanze sind jedoch beträchtlich. So entspricht die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums im Wildtyp für gewöhnlich der in Abbildung 12A dargestellten, es wurde jedoch auch gelegentlich ein weit schwächer ausgeprägtes Reticulum beobachtet. Interessanterweise scheint in den betrachteten PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen und den PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien das Gegenteil der Fall zu sein. In der Regel wird eine schwache Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums beobachtet und nur gelegentlich eine annähernd Wildtyp-typische Ausprägung. Da sich diese Schwankungen im Rahmen der im Wildtyp beobachteten Verteilungen abspielen, kann nicht von einer Formaberranz gesprochen werden. Diese tendenziell schwächere Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums in PEX10 Δ Zn-Pflanzen könnte mit der Funktion von PEX10 im Organellenkontakt und der Formgebung der Peroxisomen zusammenhängen (Schumann et al., 2007).

Zwar ist PEX10 auch in den peroxisomalen Matrixproteinimport involviert (Nito et al., 2007; Platta et al., 2009) und ein leichter Defekt konnte in einer PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie nachgewiesen werden, jedoch scheint sich eine Störung des Matrixproteinimports nicht auf die Ausbildung eines Glyoxysomalen Reticulums auszuwirken. Dieser Matriximportdefekt rührt nicht zwangsläufig von der Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domäne in PEX10 her. Importstörungen werden auch bei N-terminalen Punktmutanten von PEX10 beobachtet und auch das Anfügen

des T7-Tags an den PEX10-N-Terminus scheint sich negativ auf die Pflanze auszuwirken (siehe folgendes Kapitel). Die Unabhängigkeit der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums vom Matrixproteinimport belegen die PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien, welche für Peroxisomen (Prestele, 2009) und auch in einer PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie für Glyoxysomen einen deutlich sichtbaren Defekt im Matrixproteinimport zeigen. Das Glyoxysomale Reticulum ist in den PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien jedoch trotz gestörtem Matrixproteinimport voll ausgebildet. Hingegen ist in den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien keinerlei Störung des Matrixproteinimports zu beobachten und auch hier scheint die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums wie in den PEX10 Δ Zn-Pflanzen leicht vermindert zu sein. Grund hierfür könnte ein funktioneller Komplex zwischen PEX10 und PEX12 sein (Chang et al., 1999), der über einen Defekt in einer der Zink-RING-Finger-Domänen in PEX10 oder PEX12 destabilisiert wird. Die Funktion dieses Komplexes bei der Formung des Glyoxysomalen Reticulums wäre funktionell unabhängig vom glyoxysomalen Matrixproteinimport zu sehen, da ansonsten eine Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 oder PEX12 eine Störung im Matrixproteinimport zur Folge hätte.

Es lässt sich somit sagen, dass sich eine Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domäne der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 nur geringfügig oder gar nicht auf die Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums auswirkt. Auch makroskopisch ist keine Beeinträchtigung festzustellen. Die Pflanzen sind in der Lage in Dunkelheit auf MS-Medium wie Wildtyp-Pflanzen zu keimen und zu wachsen. Wäre die β -Oxidation durch einen gestörten Import relevanter Enzyme wie etwa dem ABC-Transporter COMATOSE (CTS; auch PXA1 bzw. PED3) oder dem Multifunktionellem Protein MFP stark gestört, so würde man eine verlängerte Samenruhe oder eine auf externe Zuckerquellen angewiesene Keimlingsentwicklung beobachten (Graham, 2008). Eben diese Effekte wurden bei RNAi-Konstrukten der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 beobachtet. In diesen Pflanzen wurde die Transkription für *PEX2* auf 31%, für *PEX10* auf 38% und für *PEX12* auf 25% herabreguliert. Die RNAi-Pflanzen konnten auf MS-Medium ohne Saccharose zwar keimen, es fand aber kein Keimlingswachstum statt. Zudem waren die Pflanzen in der Lage, auf 4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure-haltigem Medium zu wachsen (Nito et al., 2007). Dies weist auf einen Defekt im glyoxysomalen Matrixproteinimport und der daraus resultierenden Beeinträchtigung der β -Oxidation hin. Zudem ist bekannt, dass ein völliges Fehlen der Gene *PEX2*, *PEX10* oder *PEX12* in *Arabidopsis thaliana* zu Embryoletalität führt (Hu et al., 2002; Schumann et al., 2003; Sparkes et al., 2003; Fan et al., 2005); bei *PEX10* genügt ein Stopp-Codon vor der Zink-RING-Finger-Domäne, um in homozygot betroffenen Pflanzen Embryoletalität

hervorzurufen (Prestele, 2009). Dennoch wurde eine gravierende Importstörung bei den Δ Zn-Konstrukten der Peroxinen PEX2, PEX10 und PEX12 nur in einer einzigen PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass die Zink-RING-Finger-Domänen in PEX2, PEX10 und PEX12 für die frühe Entwicklung in *A. thaliana* essenziell sind, jedoch an der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums und am Import in die Glyoxysomen nicht maßgeblich beteiligt sind.

Auch an der Formgebung der Peroxisomen scheint PEX12 nicht beteiligt zu sein, da in den in Licht gewachsenen PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien (Abbildung 22) keinerlei Formaberranz wie etwa in PEX10 Δ Zn (Schumann et al., 2007) zu beobachten ist. Es ist auch in keiner Linie ein Matrixproteinimportdefekt festzustellen, was Befunden an PEX12-RNAi-Konstrukten in *Arabidopsis* (Nito et al., 2007) und *in vitro*-Experimenten in Hefe (Platta et al., 2009) entgegensteht. Eine Erklärung für das Fehlen des zu erwartenden Importdefektes in den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien könnte ein zu geringer Proteinexpressionslevel des Δ Zn-Konstrukts sein. Mengenunterschiede der Proteinexpression in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, den PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien und den PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien könnten auch das unregelmäßige Auftreten der Importstörungen in diesen Pflanzen erklären.

Ein Indiz für Mengenunterschiede in der Proteinexpression ist die qRT-PCR, welche an allen betrachteten Überexpressionslinien durchgeführt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Überexpressionslinien eine Transkription des jeweiligen Konstruktes stattfindet (Abbildung 7), mit Ausnahme der nicht exprimierenden PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie III. Die Unterschiede in den Transkriptmengen der einzelnen Linien sind enorm. Für die PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze wurde eine Gesamt-Transkriptmenge aus endogenem Wildtyp-Transkript und mutiertem Transkript ermittelt, die der Transkriptmenge des Wildtyps gleicht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Gesamt-Transkript sich aus gleichen Teilen des Transkripts von PEX10 Δ Zn und Wildtyp-PEX10 zusammensetzt (Schumann et al., 2007). Die beiden PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien I und II werden 110-fach und 10-fach überexprimiert. Ähnlich verhält es sich bei den PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien. Hier ist die Linie I auf das 50-fache, die Linie 2 auf das 150-fache und die Linie III auf das 40-fache erhöht. Bei den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV ist die Transkription verhältnismäßig niedrig mit 5-facher (Linie II) bzw. 8-facher (Linie VI) Transkription.

Solch starke Schwankungen in der Transkription könnten sich auch auf die Proteinexpression niederschlagen, jedoch treten interessanterweise die Matrixproteinimportstörungen nicht in den Linien mit den höchsten

Transkriptionsmengen auf. Dies weist darauf hin, dass die Transkriptmenge nicht direkt mit der Proteinexpressionsmenge zu korrelieren scheint und dass möglicherweise noch andere regulatorische Mechanismen eine Rolle spielen. So konnte das Protein PEX10-T7-6xHis in der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie auf biochemische Weise kaum und im TEM durch Immuno-Gold-Lokalisation gar nicht detektiert werden, obwohl die Expression des PEX10-wt-T7-pex10-KO-Konstrukts etwa 60-mal höher liegt als die Expression von PEX10 im Wildtyp.

Vergleicht man die Δ Zn-Mutanten mit RNAi-Linien, so muss man Folgendes berücksichtigen:

- (1) Weder in den Δ Zn-Mutanten noch in den RNAi-Pflanzen ist die eigentliche Menge des exprimierten Proteins bekannt. Es wurde in jedem Fall der Transkriptionslevel ermittelt. Betrachtet man in den Δ Zn-Mutanten das Verhältnis von endogenem zu mutiertem Transkript, so ist der relative Transkriptlevel an endogenem PEX10 zum Teil erheblich niedriger als der in der entsprechenden RNAi-Linie. Im Fall der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien entspricht die relative Menge des endogenen Transkripts 1% (Linie I) bzw. 10% (Linie II). Die PEX10-RNAi-Pflanze weist einen Transkriptlevel von 38% an endogenem PEX10 auf (Nito et al., 2007). Im Falle der PEX2 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien ist die relative Transkriptmenge an endogenem PEX2 in jeder Linie unter 3% verdünnt. Die entsprechende PEX2-RNAi-Linie zeigt eine Erniedrigung des endogenen Transkripts auf 31% (Nito et al., 2007). Bei den PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien II und IV wird das endogene Transkript auf 20% (Linie II) bzw. 17% (Linie IV) reduziert. Die PEX12-RNAi-Linie transkribiert 25% an endogenem PEX12 (Nito et al., 2007).

Die Analyse des PEX10-wt-T7-pex10-KO-Konstrukts zeigte, dass sich die Gesamt-Proteinmenge trotz 60-facher Überexpression nicht detektierbar ändert. Vermutlich ist die Pflanze in der Lage, die Gesamtproteinmenge zu steuern und zwischen endogenem und überexprimiertem Transkript zu diskriminieren. Wäre dies nicht der Fall, so würde man zum Beispiel in der PEX10 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie I weniger als 1% intaktes PEX10 im Vergleich zum Wildtyp finden. Eine so geringe Menge an PEX10 mit Funktionsfähiger Zink-RING-Finger-Domäne hätte in der Pflanze einen deutlichen Phänotypen, wenn nicht sogar Embryoletalität zur Folge. Es ist also nicht auszuschließen, dass in den Δ Zn-Mutanten weniger endogenes Protein vorhanden ist, als in den RNAi-Linien.

- (2) Mit den Δ Zn-Mutanten wird nur die Zink-RING-Finger-Domäne der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 beeinträchtigt. Es wird nur eine einzige funktionelle

Domäne betroffen, wogegen in den RNAi-Linien das gesamte Protein mit allen funktionellen Domänen herunterreguliert wird. Dies führt womöglich zu der in den RNAi-Linien von PEX2, PEX10 und PEX12 beobachteten peroxisomalen Matrixproteinimportstörung. In *Arabidopsis* ist die Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 für den Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten und vermutlich zwischen Peroxisomen und Mitochondrien verantwortlich und es ist anzunehmen, dass die Zink-RING-Finger-Domäne von PEX2 für die Monoubiquitinierung von PEX5 und damit für den Matrixproteinimport verantwortlich ist. Wäre für den peroxisomalen Matrixproteinimport neben der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX2 ein Komplex aus PEX2, PEX10 und PEX12 über deren Transmembrandomänen nötig, so würde man beispielsweise in einer PEX10-RNAi-Linie einen gestörten Import beobachten, obwohl die Hauptaufgabe von PEX10 mit seiner Zink-RING-Finger-Domäne der Organellenkontakt ist. Der Nachteil der RNAi-Linien liegt in dem kumulativen Effekt, der erzeugt wird, wenn ein Protein mit mehreren funktionellen Domänen heruntergeregelt wird.

Stellt man die in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnisse den Erkenntnissen aus den RNAi-Konstrukten von PEX2, PEX10 und PEX12 gegenüber, so scheinen die Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 zum einen verschiedene, funktionelle Domänen zu besitzen und zum anderen scheint die Zink-RING-Finger-Domäne der Peroxine PEX10 und PEX12 am Matrixproteinimport in die Glyoxysomen nicht maßgeblich beteiligt zu sein. Die Störung der Blatt-Peroxisomen und der Photorespiration, insbesondere durch die PEX10 Δ Zn-Mutanten, ist für die Pflanze schwerwiegender als die Beeinträchtigung des Glyoxysomalen Reticulums.

3.2. Mutationen im PEX10-N-Terminus zeigen einen starken Einfluss auf den makroskopischen und mikroskopischen Phänotyp von *A. thaliana*

Bei der Untersuchung der Punktmutanten G93E und P126S im Amino-Terminus von PEX10 konnte sowohl ein retardiertes Wachstum als auch Störung in Peroxisomenform, in der Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums und beim Matrixproteinimport beobachtet werden. Die Mutationen im PEX10-N-Terminus zeigen nicht den photorespiratorischen Phänotyp, den eine Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domäne in PEX10 hervorruft (Schumann et al., 2007).

Typisch für einen photorespiratorischen Phänotyp wären Zwergenwuchs, eine verzögerte Entwicklung und Chlorose in allen photosynthetisch aktiven Geweben, was unter erhöhten CO₂-Bedingungen (ca. 1800 ppm) gerettet werden kann. Mutanten dieses Typs wurden bereits Anfang der 1980'er Jahre intensiv von Somerville und Kollegen untersucht (Somerville and Ogren, 1980, 1981). Die Pflanzen PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie und PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen zwar ein reduziertes Wachstum, dies lässt sich aber nicht durch Hoch-CO₂-Begasung retten. Es ist auch keine Erniedrigung in der Photosyntheseeffizienz oder Chlorose zu detektieren, welche auf eine Beeinträchtigung der Photorespiration schließen lassen könnte.

Es ist nicht gelungen, eine homozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zu erhalten. Sobald homozygote Pflanzen von MS-Medium auf Erde überführt werden, sterben diese - auch unter Hoch-CO₂-Begasung. Es scheint, als herrschen auf den MS-Platten mit Saccharose so günstige Wachstumsbedingungen, dass homozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie imstande sind, 14 Tage und länger zu überleben. Dies deutet darauf hin, dass der Übertritt zur Photoautotrophie zumindest keine Schädigung des Keimlings mit sich führt. Dennoch scheint eine Photosyntheseineffizienz vorzuliegen, da auf Erde überführte Pflanzen zu „verhungern“ scheinen. Die Reservestoffmobilisierung funktioniert sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie, was Wachstumstests im Dunklen auf Platten mit und ohne Saccharose gezeigt haben. Probleme in der β -Oxidation würden bereits früh zutage treten und es wären bei 25% der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen beispielsweise eine verschlechterte Keimungsrate oder eine deutliche Wachstumsstörung auf Medium ohne Zucker zu beobachten (Hayashi et al., 2002; Fulda et al., 2004; Penfield et al., 2007). Heterozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen auf Erde ein retardiertes Wachstum, auf MS-Medium mit Saccharose keinerlei Wachstumsunterschied zum Wildtyp.

Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen sowohl in Licht als auch in Dunkelheit gewachsen einen gestörten Matrixproteinimport. Auffällig hierbei ist, dass der Matrixproteinimportdefekt bei in Dunkelheit gewachsenen Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie kaum zu detektierendem ist. Die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums ist vergleichbar mit der in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze. Dies weist in Kombination mit Wachstumsversuchen auf Medium mit und ohne Saccharose auch in homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen auf eine funktionierende β -Oxidation hin.

Der zu beobachtende Defekt des Matrixproteinimports in Licht gezogener Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie ist ungleich gravierender als der in Dunkelheit gezogener Pflanzen. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da bis jetzt nur die

Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 mit dem Matrixproteinimport in Verbindung gebracht wurde (Williams et al., 2008; Platta et al., 2009). Hierbei wird der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 E3-Ligasefunktion zugeschrieben, durch welche der den Matrixproteinimport vermittelnde Rezeptor PEX5 polyubiquitiniert wird. Die Ubiquitinierung von PEX5 ist in Hefe für die Rückführung des Rezeptors in das Cytosol nötig, wobei zwischen Monoubiquitinierung durch PEX12 und Polyubiquitinierung durch PEX2 und PEX10 unterschieden wird. Polyubiquitinierung von PEX5 scheint nicht essenziell für die Funktion von PEX5 während des Matrixproteinimports in die Peroxisomen zu sein, es könnte jedoch einen Qualitätskontrollmechanismus darstellen, welcher die Degradation in den 26S-Proteasomen vermittelt (Platta et al., 2004; Kiel et al., 2005). Der beobachtete Matrixproteinimportdefekt in den PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien zeigt jedoch, dass der N-Terminus von PEX10 auf direkte oder indirekte Weise am Matrixproteinimport beteiligt ist.

Bei der peroxisomalen Matriximportstörung in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie handelt es sich jedoch nicht um ein generelles Importproblem, da in Licht gezogene heterozygote Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie auf MS-Medium ohne Saccharose einen deutlichen Defekt im Matrixproteinimport zeigen, welcher bei heterozygoten Pflanzen auf MS-Medium mit Saccharose nicht auftritt. Zudem wäre im Fall eines allgegenwärtigen Importdefektes auch bei den dunkel gewachsenen Pflanzen, insbesondere bei homozygoten, eine deutlichere Importstörung zu beobachten.

Es scheint jedoch so, als würde der Übergang zur Photoautotrophie die Pflanzen der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie vor ein „Ernährungsproblem“ stellen, da belichtete homozygote Pflanzen im Wachstum stark zurückbleiben. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um einen Defekt in der Photorespiration, da heterozygote Pflanzen dieselbe Photosyntheseeffizienz wie der Wildtyp aufweisen und auf Erde überführte homozygote Pflanzen sich durch Hoch-CO₂ nicht retten lassen. Auf MS-Platte überleben homozygote PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen zudem 16 Tage in Licht, ohne ein Zeichen von photooxidativen Schäden wie Chlorose zu zeigen.

Da bei heterozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen ein Matrixproteinimportdefekt auftritt, wenn diese auf MS-Medium ohne Saccharose angezogen werden, scheint eine externe Zuckerquelle eine wichtige Rolle zu spielen. Die externe Zuckerzufuhr scheint jedoch das Wachstum heterozygoter PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Keimlinge nicht zu beeinflussen, da sie auf MS-Platten mit und ohne Saccharose gleich gut wachsen. Die Größenverhältnisse von homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen verändern sich auf MS-Medium mit und ohne Saccharose nicht maßgeblich zueinander. Die homozygoten Pflanzen entsprechen,

wenn auch viel kleiner, in etwa dem Entwicklungsstand des Wildtyps oder der heterozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen.

Neben der beobachteten Importstörung wurden sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen eine Formaberranz der Peroxisomen beobachtet. Die Peroxisomen sind stark verlängert, verlieren jedoch den Kontakt zu den Chloroplasten nicht, wie es in der PEX10 Δ Zn1-Mutante zu beobachten ist (Schumann et al., 2007). In der PEX10 Δ Zn1-Mutante wird eben dieser Kontaktverlust, verursacht durch das dysfunktionale Zink-RING-Finger-Motiv, für den photorespiratorischen Phänotyp verantwortlich gemacht. Da die PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie noch über ein funktionsfähiges Zink-RING-Finger-Motiv verfügt, ist der Kontakt zu den Chloroplasten und Mitochondrien vorhanden und die Photorespiration läuft ungehindert ab.

Eine ähnliche Verlängerung der Peroxisomen ist auch in Mutanten der an der Peroxisomenproliferation beteiligten Proteine beobachtet worden. PEX11 leitet die Elongation und beginnende Segmentierung der Peroxisomen ein. *Arabidopsis* verfügt über fünf PEX11-Proteine (PEX11a-e) und Überexpression oder *down regulation* einzelner PEX11-Proteine führt zu einer Elongation der Peroxisomen (Lingard and Trelease, 2006; Nito et al., 2007; Orth et al., 2007). Die Trennung der elongierten Peroxisomen wird durch die Proteine DRP (*dynamamin-related protein*) und FIS1 (FISSION1) vollzogen (Fagarasanu et al., 2007). Es wurden auch elongierte Peroxisomen in drp-Mutanten beobachtet werden, bei welchen die durch DRP vollzogene Abschnürung nicht stattfand (Mano et al., 2004; Zhang and Hu, 2009). Auch in RNAi-Doppelmutanten an *PEX3* in *Arabidopsis* konnten elongierte Peroxisomen beobachtet werden, wobei die Transkription von *PEX3-1* 17% und die von *PEX3-2* 18% betrug (Nito et al., 2007). Diese Elongation kann aber möglicherweise durch einen verminderten Import der PEX11-Proteine erklärt werden, da es sich bei den PEX11-Proteinen um peroxisomale Membranproteine handelt und diese über PEX3 in die Peroxisomenmembran integriert werden (Fang et al., 2004; Hoepfner et al., 2005). Ist zu wenig PEX11 in der Peroxisomenmembran vorhanden, versagt möglicherweise der peroxisomale Teilungsapparat und die Peroxisomen werden nur elongiert.

Diese morphologisch offensichtlichen Veränderungen der Peroxisomen konnten bis jetzt nur bei belichteten Pflanzen beobachtet werden. Die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums ist weder in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze, den PEX10-, PEX2- und PEX12- Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinien noch in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie signifikant beeinträchtigt. In Licht gewachsen zeigen diese PEX10-Mutanten jedoch schwere Formveränderungen der Peroxisomen. Dies zeigt, dass die Formveränderungen der Peroxisomen durch Licht hervorgerufen werden. PEX10 könnte

am peroxisomalen Teilungsapparat beteiligt sein. Da dieser durch Licht induziert werden kann, wäre dies eine Erklärung, warum man in den PEX10-Mutanten keine abnormal geformten Glyoxysomen beobachten kann. Möglicherweise funktioniert der Teilungsapparat der Glyoxysomen auch auf anderem Wege, unabhängig von PEX10. Auch dann würde sich eine Mutation von PEX10 bezüglich der Peroxisomenteilung erst bei Belichtung und der Umformung der Glyoxysomen zu Peroxisomen bemerkbar machen.

Wie bereits erwähnt, bleibt in PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen der Kontakt zwischen den Peroxisomen und den Chloroplasten erhalten. Die Peroxisomen sind stärker elongiert als in der PEX10 Δ Zn1-Mutante und liegen an den Chloroplasten an. Es ist nicht bekannt, ob sich daraus für die Peroxisomen eine höhere Kontaktfläche zu den Chloroplasten ergibt. Diese Veränderung des Membranoberfläche/Volumen-Verhältnisses kann durch eine Vergrößerung der Membranoberfläche, eine Verkleinerung des Volumen oder beides geschehen. Es kann auch nur spekuliert werden, ob die G93E-Mutation in PEX10 selbst zu einer Verlängerung der Peroxisomen führt, oder ob es sich um einen sekundären Effekt, zum Beispiel aufgrund der Importstörung, handelt. Es ist jedoch verführerisch, die Formveränderungen der Peroxisomen in den PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen als Versuch zu deuten, mögliche Defizite wichtiger Membranproteine, wie PEX10, durch eine größere Peroxisomenoberfläche bzw. größere Kontaktfläche zu den Chloroplasten zu kompensieren.

Der Metabolitenfluss der Photorespiration in den PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinien ist nicht gestört. Metabolomik-Studien an 14 Tage alten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen weisen auf einen nicht gestörten Metabolitenfluss hin und bestätigen durch stark erhöhte Serin- und Glycerat-Werte den gestörten Matrixproteinimport. Ähnliche Studien wurden auch an PEX2 durchgeführt und auf gleiche Weise ein gestörter Matrixproteinimport und keine Störung im Organellenkontakt und Metabolitenfluss festgestellt (Prestele, 2009). Es ist nicht bekannt, ob die Formänderung der Peroxisomen auch zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Peroxisomen und Mitochondrien führt. Da jedoch keine Verschlechterung des Metabolitenflusses festgestellt wurde, ist nicht von einer Veränderung des Kontaktes zwischen Peroxisomen und Mitochondrien auszugehen.

Der folgende schwerwiegende Phänotyp ist bei der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie zu beobachten:

- (1) Homozygote Pflanzen sterben auf Erde und bleiben auf MS-Medium im Wachstum sehr stark zurück. Sogar heterozygote Pflanzen zeigen eine Wachstumsstörung auf Erde.

(2) Matrixproteinimportdefekte können sowohl an homozygoten als auch an heterozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen beobachtet werden und Blatt-Peroxisomen zeigen eine schwere Formaberranz.

Dies belegt für das konservierte TLGEEY-Motiv in PEX10 eine mindestens ebenso wichtige Funktion, wie sie der Zink-RING-Finger-Domäne zugeschrieben wird.

Homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie zeigen auf MS-Medium mit Saccharose keinerlei Wachstumsstörungen, ein reduziertes Wachstum stellt sich erst ein, wenn die Pflanzen auf Erde gezogen werden. Interessanterweise zeigen dunkel gewachsene, homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie auf MS-Medium ohne Saccharose tatsächlich ein leicht reduziertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um eine ernsthafte Beeinträchtigung der β -Oxidation und somit der Reservestoffmobilisierung handelt, da die Wachstumsstörung ansonsten viel schwerwiegender ausfallen würde und die Pflanzen nach dem Keimen kaum noch wachsen würden. Bereits 1998 suchten Hayashi und Kollegen mit Hilfe von 4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure (2,4-DB) nach β -Oxidations-Mutanten. Bei funktionierender β -Oxidation wird 2,4-DB durch Entfernen zweier Methylengruppen zu 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), einem Herbizid, umgesetzt (Hayashi et al., 1998). Auf diese Art und Weise wurden mehrere Mutanten identifiziert, welche aufgrund eines Defekts in der β -Oxidation auf 2,4-DB-haltigem Medium zu Wachsen imstande waren. Diese Mutanten wurden als ped-Mutanten (*peroxisome defective*) bezeichnet und zeichneten sich neben ihrer 2,4-DB-Resistenz durch Abhängigkeit von einer externen Zuckerquelle aus (Hayashi et al., 1998). Studien zeigten, dass es sich bei dem *PED2*-Gen um ein Ortholog des Peroxins PEX14 handelt und dass *PED3* für den ABC-Transporter codiert, welcher die von den Lipidkörpern stammenden freien Fettsäuren in die Glyoxysomen zur β -Oxidation schleust (Hayashi et al., 2000; Hayashi et al., 2002). PEX14 spielt beim Matrixproteinimport eine wichtige Rolle, da es zusammen mit PEX13 den *Docking*-Komplex für den Importrezeptor PEX5 bildet. Fällt dieser Komplex aus, so führt dies zu einer Importstörung (Mano et al., 2006; Nito et al., 2007). Diese ped-Mutanten keimen zwar auf Medium ohne Saccharose, es findet jedoch keinerlei Keimlingswachstum statt. Da PEX10 ebenso wie PEX14 am Matrixproteinimport beteiligt ist, lässt sich vermuten, dass die Mutation P126S im PEX10-N-Terminus keinen schwerwiegenden Einfluss auf dem Matrixproteinimport für die β -Oxidation benötigter Enzyme hat, da sonst ein Phänotyp ähnlich der ped2-Mutante zu erwarten wäre. Gleiches lässt sich über die G93E-Aminosäuresubstitution sagen, welche im konservierten TLGEEY-Motiv im PEX10-N-Terminus liegt. Diese Vermutung wird durch mikroskopische Untersuchungen an Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie unterstützt, bei denen in Licht kein gestörter Import oder eine

Formaberranz der Peroxisomen wie in den PEX10 Δ Zn-Linien beobachtet wurde. Dunkel gewachsene PEX10-P126S-GFP-PTS1-Pflanzen zeigen nur gelegentlich einen schwach gestörten Matrixproteinimport und die Ausprägung des Glyoxysomalen Reticulums gleicht derer in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze.

Das konservierte Prolin P126 scheint also weder am Matrixproteinimport, der Ausbildung des Glyoxysomalen Reticulums noch an der Photorespiration maßgeblich beteiligt zu sein. Dennoch weisen homozygote PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen ein vermindertes Wachstum auf. Dieses Wachstumsdefizit lässt sich nicht durch Hoch-CO₂ (1800 ppm) beeinflussen. Es kann auch kein Anzeichen einer Beeinträchtigung der Photorespiration beobachtet werden und die gemessene Photosyntheseleistung entspricht der des Wildtyps. Das Wachstumsdefizit rührt also nicht von einer gestörten Photorespiration her. Die Funktion des konservierten Prolins im N-Terminus von PEX10 scheint für die Funktion von PEX10 keine entscheidende Rolle zu spielen, da homozygote Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie nur ein vermindertes Wachstum zeigen. Möglicherweise führt der Austausch von Prolin zu Serin zu einer Konformationsänderung, welche die Funktionalität des N-Terminus selbst nicht stört aber mögliche Interaktionen mit dem PEX10-N-Terminus erschwert.

Sowohl die Punktmutation in der PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie als auch die Punktmutation in der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie führten zu einem verminderten Wachstum. Die Wichtigkeit des PEX10-N-Terminus für die Entwicklung in *Arabidopsis* spiegelt auch die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie wieder. Die Embryoletalität der pex10-KO-Pflanze wurde mittels Überexpression eines am N-Terminus mit einem 6xHis-Tag und einem T7-Tag versehenen PEX10 unter Kontrolle des 35S-Promotors gerettet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von Wildtyp-PEX10 im KO-Hintergrund den embryoletalen Phänotyp aufhebt und die Pflanze wie den Wildtyp erscheinen lässt (Schumann et al., 2003). Interessanterweise zeigt die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie ein verringertes Wachstum, welches sich auch durch Hoch-CO₂ nicht beeinflussen lässt. Die Pflanzen wirken gestaucht, haben wesentlich kleinere Schoten als der Wildtyp und zeigen eine dichte, nickende Infloreszenz (Abbildung 25). Dies macht deutlich, dass der N-Terminus von PEX10 einen gewichtigen Einfluss auf die Entwicklung in *Arabidopsis* hat.

Die PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie zeigt einen gravierenderen Phänotyp als die PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie. Auch wenn über Peroxisomenform und Matrixproteinimport nur spekuliert werden kann, ist sie ebenso kleinwüchsig und zeigt zusätzlich durch ihre kompakte, hängende Infloreszenz und die daraus entstehenden stark verkürzten Schoten eine Beeinträchtigung in der Samenproduktion.

Auf die Frage, welche Funktion der N-Terminus von PEX10 ausübt, lässt sich noch keine klare Antwort geben. Es ist jedoch auffällig, dass sowohl Punktmutationen in konservierten Motiven als auch eine Maskierung des N-Terminus mit einer kurzen Aminosäuresequenz zu Wachstumsstörungen und im Fall einer homozygoten PEX10-G93E-Mutation sogar zum Tod der Pflanze führt. Diese Wachstumsdefizienz scheint vor allem auch unabhängig vom Matrixproteinimport in die Peroxisomen zu sein, da in homozygoten Pflanzen der PEX10-P126S-GFP-PTS1-Transgenlinie ein erniedrigtes Wachstum, aber nie ein Defekt im Matrixproteinimport detektiert wurde.

Es kann nur spekuliert werden, wie sich wohl eine abgeschwächte Form einer homozygoten PEX10-G93E-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanze auf das Wachstum der Pflanze auswirkt. Möglicherweise ähnelt der Phänotyp dem der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie und zeigt stark reduziertes Wachstum, eine abnormal geformte Infloreszenz und sehr kurze Schoten. Um dies genauer zu untersuchen, müsste man ähnlich der Untersuchungsmethode der Zink-RING-Finger-Domäne ein G93E-PEX10-Konstrukt unter dem 35S-Promotor im Wildtyp-Hintergrund überexprimieren und somit eine konditional subletale Mutante für das TLGEEY-Motiv erschaffen. Des Weiteren wäre die Kreuzung der PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie in die GFP-PTS1-Reporterlinie lohnend, um sowohl die Peroxisomenformgebung als auch den Matrixproteinimport untersuchen zu können. Auskunft über einen gestörten Import könnten auch die transiente Expression eines GFP-PTS1-Konstruktes in PEX10-wt-T7-pex10-KO-Transgenlinie-Protoplasten schnell liefern.

3.3. Die Interaktionspartner von PEX10

Der von Schumann und Kollegen beobachtete Kontaktverlust zwischen Peroxisomen und Chloroplasten (Schumann et al., 2007) belegt die Bedeutung der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 am Organellenkontakt. Eine bekannte Funktion der Zink-RING-Finger-Domäne ist die Protein-Protein-Interaktion (Lovering et al., 1993; Borden, 2000), es ist jedoch nicht bekannt, ob PEX10 mit seiner Zink-RING-Finger-Domäne den Kontakt zu den Chloroplasten direkt oder indirekt vermittelt. Es ist auch nichts über den Kontakt zwischen Peroxisomen und Mitochondrien bekannt und von welchen Proteinen er vermittelt wird.

Studien an Wildtyp-Pflanzen und PEX10 Δ Zn1-Pflanzen sollten zeigen, ob die Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 auch am Kontakt zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beteiligt ist. Organellen von Wildtyp- und PEX10 Δ Zn1-Pflanzen wurden am

Saccharose-Stufengradienten aufgetrennt. Die Immundetektion von Markerenzymen an Saccharose-Stufengradienten-Fractionen von Wildtyp und PEX10 Δ Zn1 zeigte eine unterschiedliche Mitochondrienverteilung. In der PEX10 Δ Zn1-Pflanze wurde zusätzlich zu der im Wildtyp entsprechenden Mitochondrienpopulation noch eine Mitochondrienpopulation mit höherer Dichte gefunden. Um diesen Befund genauer zu untersuchen, wurden Protoplasten von Wildtyp-GFP-PTS1-Pflanzen, PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen und PEX12 Δ Zn-T7-GFP-PTS1-Transgenlinie-Pflanzen mit *MitoTracker orange* gefärbt und unter dem Confocalen Laser Scanning-Mikroskop untersucht. In den PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze-Protoplasten konnten auffällige Ansammlungen der Mitochondrien abseits der Chloroplasten und Peroxisomen beobachtet werden, die in diesem Ausmaß weder im Wildtyp noch in der PEX12-Mutante zu beobachten waren. Da auch eine Aggregation der Mitochondrien bei Wasserstress in Wurzelhaaren von *Brassica oleracea* beobachtet werden konnte (Wu, 1987), könnte es sich bei dem Zusammenschluss der Mitochondrien um eine Reaktion auf Stress handeln. Ein solcher Stress könnte in den PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanzen durch die Störung der Photorespiration hervorgerufen werden und die Mitochondrien sogar direkt betreffen, da die Mitochondrien an der Photorespiration beteiligt sind. In Säugern gibt es Hinweise, dass sich eine Formveränderung der Mitochondrien auf das Ca^{2+} -*Signaling*, die neuronale Plastizität, den Intermediate-Metabolismus und auf die Leukozyten-Dynamik auswirkt (Camos et al., 2009); zudem scheint die Mitochondrienform, insbesondere die Mitochondrienteilung, auf die Lebenserwartung des Ascomyceten *Podospora anserina* Einfluss zu nehmen. Wird die Teilungsrate der Mitochondrien herabgesetzt, so verlängert sich dessen Lebenserwartung (Scheckhuber et al., 2007). Die mitochondriale Teilung scheint auch ein Schlüsselereignis bei einsetzender Apoptose zu sein (Camos et al., 2009). Die Verschmelzung von Mitochondrien ist essenziell für die Entwicklung der Plazenta und des Embryos (Chen et al., 2003). Diese Verschmelzung von Mitochondrien scheint vom Membranpotenzial abhängig zu sein (Meeusen et al., 2004; Sheahan et al., 2005) und es wird vermutet, dass distinkte morphologische Klassen von Mitochondrien Vorteile bei der Erfüllung spezieller zellulärer Aufgaben mit sich bringen (Sheahan et al., 2005; Camos et al., 2009). Dies könnte eine andere Erklärung für die Zusammenlagerung der Mitochondrien in der PEX10 Δ Zn1xGFP-PTS1-Hybridpflanze liefern. Es könnte sich um Mitochondrien handeln, welche die Pflanze zur ATP-Produktion verwendet. Möglicherweise sind die geschädigten Photosysteme nicht in der Lage, genügend ATP zu generieren und dieser Verlust muss durch Atmung ausgeglichen werden.

Auch ist bekannt, dass in Neuronen aktive Mitochondrien mit hohem Membranpotential zu den Orten in der Zelle wandern, an denen ein hoher Bedarf an ATP herrscht.

Funktionsbeeinträchtigte Mitochondrien mit einem niedrigen Membranpotential wandern in die entgegengesetzte Richtung und sammeln sich im Zellplasma (Carnoes et al., 2009). Die beobachteten Mitochondrienansammlungen abseits der Chloroplasten könnten durch den Metabolitenstau geschädigte Mitochondrien sein, welche sich zur Degradation sammeln. Die erhöhte Dichte dieser Mitochondrien könnte von beschädigten Membranen oder Transportern herrühren, welche die Aufnahmen von Saccharose bei der Zentrifugation im Saccharose-Stufengradienten zulassen. Ob es sich bei der Ansammlung von Mitochondrien tatsächlich um durch die Photorespiration geschädigte Mitochondrien handelt, ließe sich durch mikroskopische Untersuchungen an anderen Photorespirationsmutanten in Erfahrung bringen. Es stellt sich nämlich die Frage, ob die Aggregation und der damit einhergehende Kontaktverlust der Mitochondrien zu den Peroxisomen primär durch die Beeinträchtigung der Zink-RING-Finger-Domäne von PEX10 oder sekundär durch Schädigung aufgrund gestörter Photorespiration durch den Kontaktverlust Peroxisom – Chloroplast zustande kommt. Ist die Funktionsstörung der Zink-RING-Finger-Domäne für den Kontakt verantwortlich, so wird man in den anderen Photorespirationsmutanten keinen Kontaktverlust zwischen Peroxisomen und Mitochondrien beobachten können. Liegt die Kontaktstörung aber im gestörten Ablauf der Photorespiration begründet, so ist diese auch in anderen Photorespirationsmutanten zu erwarten.

Um mögliche Interaktionspartner von PEX10 in der Chloroplastenmembran oder der Mitochondrienmembran zu identifizieren, wurde ein *Yeast two-Hybrid* (Y2H) durch die Firma Hybrigenics (Paris, Frankreich) durchgeführt. Als möglicher Interaktionspartner von PEX10 wurde AtCP1 (At5g49480) identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein 14 kDa kleines, cytosolisches, Calmodulin-ähnliches Protein, welches drei Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Domänen trägt (Jang et al., 1998). Eine erhöhte Transkription von AtCP1 wurde unter Salzstress und nach Behandlung mit Genotoxinen festgestellt (Jang et al., 1998; Piao et al., 2001; Chen et al., 2003) und belegt damit die Beteiligung von AtCP1 an einer insbesondere durch Salzstress ausgelösten Signalkaskade in *A. thaliana*. Dies wird durch den Befund gestützt, dass die Transkription von AtCP1 auch durch Überexpression einer in der Salzstressantwort beteiligten Kinase, nämlich AtGSK1, induziert wird (Piao et al., 2001). Abscisinsäure scheint keinerlei Einfluss auf die Transkription von AtCP1 auszuüben (Jang et al., 1998). Welchen Effekt die Interaktion von AtCP1 mit PEX10 zur Folge hat, ist nicht bekannt. Man weiß von einigen Calmodulin-ähnlichen Proteinen, dass sie während der Antwort auf Salzstress eine Rolle spielen. So interagiert CML18 unter Salzstressbedingungen mit dem Na^+/H^+ -Antiporter AtNHX1, welcher in der Tonoplastenmembran sitzt. Die Interaktion ist pH-abhängig und

reduziert die Aktivität des Antiporters (DeFalco et al., 2010). AtCP1 könnte auf ähnliche Weise wirken und durch ein Anbinden an PEX10 dessen Aktivität regulieren.

Die Interaktion zwischen PEX10 und AtCP1 wurde als stark und sehr wahrscheinlich eingestuft und *in vitro*-Untersuchungen an den überexprimierten Proteinen PEX10-T7-6xHis und AtCP1-T7-6xHis zeigten eine Interaktion zwischen PEX10 und AtCP1. Aus den Y2H-Ergebnissen geht nicht hervor, ob AtCP1 mit dem N-Terminus, dem C-Terminus oder beiden Enden von PEX10 interagiert. Über welche Domäne PEX10 mit AtCP1 interagiert, ist nicht bekannt. Am wahrscheinlichsten ist die Zink-RING-Finger-Domäne im C-Terminus von PEX10, da Zink-RING-Finger-Domänen ein bekanntes Motiv zur Protein-Protein-Interaktion darstellen. Da AtCP1 über keine expliziten Protein-Protein-Interaktionsdomänen verfügt, kann keine Vorhersage bezüglich einer Kontakt-domäne für AtCP1 getroffen werden.

Es liegen noch keine gefestigten Daten über AtCP1-KO-Pflanzen vor. Die untersuchten KO-Pflanzen tragen noch eine weitere T-DNA-Insertion, welche bislang nicht beseitigt werden konnte. Trotz dieser Hintergrundmutationen ist bisher bei keiner AtCP1-KO-Pflanze ein Phänotyp aufgetreten. Hätte AtCP1 eine entscheidende Funktion im PEX10-vermittelten Organellenkontakt, so würde man in den AtCP1-KO-Pflanzen einen ähnlichen Phänotyp wie in der PEX10 Δ Zn1-Pflanze erwarten. Es würde Chlorose und Zwergenwuchs auftreten. Dieser Befund erklärt zwar nicht die Funktion der Interaktion zwischen PEX10 und AtCP1, lässt die Beteiligung von AtCP1 am Organellenkontakt jedoch als unwahrscheinlich erscheinen.

Neben AtCP1 wurden noch die durch die Gene At3g43300 (AtMIN7) und At5g08720 codierten Proteine gefunden. Die Wahrscheinlichkeiten der jeweiligen Interaktion wurden als niedrig eingestuft.

Über At5g08720 ist nur sehr wenig bekannt. Es handelt sich um ein mitochondriales Protein, welches sich jedoch nicht in der Mitochondrienmembran befindet. Eine Zyklase/Dehydrase-Domäne deutet auf die Beteiligung von At5g08720 an der Poliketid-Synthese hin.

AtMIN7 ist zentral im Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen beteiligt und gehört zur Familie der *Arabidopsis* Adenosindiphosphat (ADP) ribosomaler Faktor (ARF) Guanin Nukleotid Exchange Faktor (GEF) Proteine. Diese Proteine sind hauptsächlich cytosolisch lokalisiert, können aber vermutlich transient an Membranen anbinden, um den Vesikeltransport zu vermitteln (Anders et al., 2008). Die ARF-GEF-Proteine sind auch der Ansatzort des Pilzgiftes Brefeldin, welcher den Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat unterbindet (Klausner et al., 1992; Tanaka et al., 2009). Ein Verlust der AtMIN7-Aktivität führt zu einer erhöhten Pathogenanfälligkeit der Pflanze. Es ist bekannt, dass es sich bei AtMIN7 (*Arabidopsis thaliana* HopM Interaktor 7) um ein Zielprotein des

Virulenzproteines HopM1 aus *Pseudomonas syringae* handelt. HopM1 destabilisiert AtMIN7, was zu Polyubiquitinierung und Degradation in den 26S-Proteasomen führt (Nomura et al., 2006).

Beide Proteine sind sowohl durch ihre Funktion als auch durch ihre Lokalisation unwahrscheinliche Kandidaten für eine Interaktion mit PEX10 und wurden deswegen nicht weiter untersucht.

Die geringe Ausbeute an möglichen Interaktionspartnern von PEX10 liegt nicht etwa an einer zu geringen Tiefe des Y2H-Screens: es wurden annähernd 80 Millionen Klone untersucht und somit das *Arabidopsis*-Genom rein rechnerisch mehr als 470-mal abgedeckt. Bei dem Y2H wurden aber als „positive Kontrolle“ sozusagen zumindest die beiden Peroxine PEX2 und PEX12 unter den Interaktionspartnern erwartet, da diese mit PEX10 in der Peroxisomenmembran einen Komplex bilden (Okumoto et al., 2000; Eckert and Erdmann, 2003). Diese wurden möglicherweise nicht identifiziert, da man von Transmembranproteinen weiß, dass sie mittels ihrer Transmembrandomänen interagieren können (Moore et al., 2008). Da PEX10 jedoch ohne Transmembranregionen als *bait* angeboten wurde, wäre eine Interaktion über die Transmembrandomänen nicht möglich. Auch von PEX19 ist eine Interaktion mit PEX10 bekannt (Fransen et al., 2001; Eckert and Erdmann, 2003). Man weiß jedoch auch, dass für ein korrektes *Targeting* von PEX12 zu den Peroxisomen die Transmembrandomäne von entscheidender Bedeutung ist (Okumoto et al., 2000). Gilt dies auch für PEX10, so sind die Transmembrandomänen möglicherweise auch für die Interaktion mit PEX19 mitverantwortlich.

Bei den *in vitro*-Interaktionsstudien zwischen PEX10 und AtCP1 ist es gelungen, PEX10 mit seinen Transmembrandomänen nativ zu exprimieren und in der *E. coli*-Membran anzureichern. Es wurden auch Interaktionsstudien mit Proteinextrakten aus verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Es konnte jedoch weder aus *Arabidopsis thaliana* noch aus *Spinacia oleracea* ein Protein identifiziert werden, welches in so großer Menge an PEX10 bindet, um es am SDS-Gel sichtbar zu machen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die niedrige Abundanz von PEX10 in der Wildtyp-Pflanze. So ist es nicht möglich, PEX10 am TEM oder in einem Pflanzenrohextrakt immunologisch zu detektieren. Selbst bei Überexpression des PEX10-T7-6xHis-Konstrukts in der pex10-KO-Pflanze konnte dies nur schwach am Western-Blot detektiert werden. Wenn nun also PEX10 nur in geringer Menge in Pflanze vorkommt, so liegt es nahe, dass die mit PEX10 interagierenden Proteine ebenso in geringer Menge vorkommen. Berücksichtigt man die Tatsache, dass PEX10 über den N-Terminus an die T7-Agarose gebunden war und nicht wie in der Immunpräzipitation mit AtCP1 dieser frei beweglich war, so könnte diese Reduktion der Bewegungsfreiheit mögliche Interaktionen sterisch behindern. Auch darf

nicht außer Acht gelassen werden, dass über die Menge an korrekt gefaltetem PEX10 keine Aussage getroffen werden kann, da es diesbezüglich keine Funktionsanalyse gibt. Möglicherweise ist der Prozentsatz an nativem PEX10 so gering, dass er zwar genügt, um überexprimiertes AtCP1 in ausreichender Menge zu binden, jedoch für die Anreicherung möglicher Bindungspartner aus einem Pflanzenrohextrakt nicht genügt.

Um mögliche Bindungspartner von PEX10 speziell in der Chloroplastenmembran zu identifizieren, wurde eine Proteom-Analyse an isolierten Chloroplasten-Hüllmembranen durchgeführt. Dabei wurde der Wildtyp mit der PEX10 Δ Zn1-Mutante verglichen. Es war nicht möglich, eine genügend große Menge an Chloroplasten-Hüllmembranproteinen zu identifizieren, um einen Vergleich zwischen Wildtyp und der PEX10 Δ Zn1-Mutante anzustellen. Von den etwa 150 bisher bekannten Chloroplasten-Hüllmembranproteinen in C3-Pflanzen (Bräutigam et al., 2008) wurden nur einige wenige identifiziert. Ein möglicher Grund für die geringe Proteinausbeute liegt in der aufwendigen Präparationsmethode, durch die nur geringe Mengen an Hüllmembranen gewonnen werden können. Ähnliche Studien zeigten, dass die Hüllmembran-Isolation aus *Arabidopsis* ungleich schwieriger ist als zum Beispiel aus Erbse (Bräutigam et al., 2008). Die MS-Analyse zeigt jedoch, dass die Präparationen besonders für die PEX10 Δ Zn1-Mutante sehr sauber waren. Würde man diesen Ansatz weiter verfolgen, so wäre man in der Lage, durch weitere MS-Analysen einen weit größeren Bereich der Chloroplasten-Hüllmembranproteine abzudecken und Vergleiche zwischen Wildtyp und der PEX10 Δ Zn1-Mutante anzustellen.

Die Beteiligung von PEX10 am Organellenkontakt und die mögliche Involvierung am Matrixproteinimport in die Blattperoxisomen mit verschiedenen Domänen ist unter den RING-Peroxinen einzigartig und könnte für Pflanzen spezifisch sein. Ein Peroxin könnte mehr als eine Funktion besitzen, und die Höheren Eukaryoten auf diese Art und Weise von den Niederen Eukaryoten differenzieren.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalie von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

4.2. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden in autoklaviertem mQ-Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Analyse der Primer auf die Bildung möglicher unerwünschter Sekundärstrukturen hin wurde *in silico* auf der Internetseite <http://www.cybergene.se/Primerdesign/genewalker/genewalker11.html> der Firma *Cybergene* durchgeführt. Die so ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) der Primer wurden zur Berechnung der *Annealing* Temperatur in PCR-Reaktionen herangezogen.

Primer	Sequenz [5' - 3']	T _m [°C]	Verwendung
PEX10 sense bin	CACGGATCCATGAGGCTTAATGGGGATTTCG	68	Klonierung von PEX10 in den Überexpressionsvektor pET28a und in den binären Vektor pCAMBIA 1301; <u>BamHI</u>
PEX10 asense bin	AAA <u>GAGCTCCACGTG</u> CTAAAAATCAGAATGATACAAACA	72	s.o. <u>SacI, PmlI</u>
AthPEX10-S3-Sense	ATGAGGCTTAATGGGGATTTCG	57	Kontrolle der PEX10-KO-Mutation und der PEX10-T7-6xHis-Insertion
AthPEX10-Intron-Antisense	GACAATTATATCAATATCAGCGG	59	s.o.
AthPEX10-DS3'-Antisense	GGTCCCGTCCGATTTCTGACT	59	s.o.
AthPEX10 Exon	CACAGGCCATCGCTGAATAG	56	s.o.

Material und Methoden

AthPEX10-S3-Sense	ATGAGGCTTAATGGGGATTTCG	57	Zygotiebestimmung der PEX10-G93E-Mutation
AthPEX10-Intron-Antisense	GACAATTATATCAATATCAGCGG	59	s.o.
PEX10TILL92077	TTTGTTTCATATTGTACCAGACCGCGGTT	65	Zygotiebestimmung der PEX10-P126S-Mutation
AthPEX10-Intron-Antisense	GACAATTATATCAATATCAGCGG	59	s.o.
nc-nterm-s	CGATCGATCAGTGAATTCATGAGGCTTAATGGGGATTTCG	73	Klonierung des PEX10-N-Terminus in den Vektor pEZS-CL für den Y2H; <u>EcoRI</u>
nc-nterm-as	TCGACGGTACCGCGGGCAACAGGAAGAACCAC	71	s.o. <u>KpnI</u>
nc-cterm-s	GCGGCCGTGGATCCCGTCGGAGTAATTTGTCATCTATC	74	Klonierung des PEX10-C-Terminus in den Vektor pEZS-CL für den Y2H; <u>BamHI</u>
nc-cterm-as	GCGACTCTAGAAAAATCAGAATGATACAAACA	67	s.o. <u>XbaI</u>
PEX2 fw	GGCAACTTGTGTGGAATGAA	55	qRT-PCR, Amplifikation des Gesamttranskripts
PEX2 rv	TCTTAACAGCTGAAGAGTTGAGCA	60	s.o.
PEX10 fw	TGGTCTACCTCCGATTCAACTT	58	s.o.
PEX10 rv	GGTGCTGACGGGTGCTTA	53	s.o.
PEX12 fw	CTCCAACAGTGTACCCTCCAC	58	s.o.
PEX12 rv	ATTCTTCTTTGGCCATCTTT	56	s.o.
ACT8 fw	TCAGCACTTCCAGCAGATG	56	s.o.
ACT8 rv	CTGTGGACAATGCCTGGAC	54	s.o.
Sense T7 pET28	GTCGCGGATCCATGTGTCCTTCTGGTAGAATCGC	72	Klonierung von AtCP1 in den Expressionsvektor pET28a; <u>BamHI</u>
Antisense pET28	TGGTGCTCGAGTCAACACCCAAAGATCTTAAGCAG	71	s.o. <u>XhoI</u>

Tabelle 3: Primerliste. Aufgeführt sind die für diese Arbeit verwendeten Primer mit Namen, Sequenz, Schmelztemperatur, Verwendungszweck und Restriktionsschnittstellen.

4.3. Anzucht und *screening* von Organismen

4.3.1. *Arabidopsis thaliana*

Soweit nicht anders angegeben werden *A. thaliana*-Pflanzen auf MS-Platten vorgezogen. Die hierfür benötigten Samen werden in 80% EtOH mit 0,1 % Triton-x-100 für eine halbe Stunde unter Schütteln sterilisiert. Die Samen werden sedimentiert und der Überstand wird steril abgenommen. Die Samen werden daraufhin fünfmal mit sterilem mQ-Wasser für je fünf Minuten gewaschen und anschließend unter Zuhilfenahme einer 1000 ml-Pipette auf 15 cm-MS-Agarplatten ausgebracht. Platten für Dunkelkeimung werden mit Alu-Folie umwickelt. Zur Brechung der Samenruhe werden die Platten für etwa 48 h bei 4°C gelagert und zur Keimung in den Zellkulturraum bei 22°C und Dauerlicht (250 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) überführt. Nach zehn bis zwölf Tagen werden die Keimlinge in Pflanztöpfe mit Einheitserde mit einer Bodenschicht aus Perlit überführt. Das weitere Wachstum findet in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 65% rel. Luftfeuchte, 22°C und 8 h Dunkelheit, 75% rel. Luftfeuchte, 18°C) oder im Gewächshaus statt, wobei die Bedingungen in Gewächshaus, insbesondere Luftfeuchtigkeit und Temperatur stärker schwanken als in der Phytokammer. Die Phytokammer ermöglicht zudem eine Begasung mit CO₂ zur Erzeugung einer Hoch-CO₂-Atmosphäre (ca. 1800 ppm, entspricht einer Flussrate von 40 ml/min). Dies ermöglicht es, den makroskopischen Phänotyp in photorespiratorischen Mutanten zu unterdrücken und diese zur Samenreife zu führen.

Das *Screening* von PEX10- und PEX12-Mutanten erfolgt auf 15 cm-MS-Agarplatten. Hierfür werden etwa 3000 sterilisierte Samen pro MS-Platte ausplattiert und auf positive Transformanten mittels Hygromycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) selektiert.

MS-Medium (pro Liter): 2,5 ml 400x Mikrosalze
 100 ml 10x Makrosalze
 10 g Saccharose
 1 g MES
 pH-Wert auf 5,8 mit KOH einstellen
 9 g Agar (wenn Platten gegossen werden)
 Antibiotika werden nach dem Autoklavieren dem
 handwarmen Medium steril zugegeben

Mikrosalze (pro Liter): 27,8 mg FeSO₄•7H₂O, 37,2 mg Na₂EDTA•2H₂O, 0,75 mg KJ, 10 mg MnSO₄•H₂O, 3 mg H₃BO₃, 2 mg ZnSO₄•7H₂O, 0,25 mg Na₂MoSO₄•2H₂O, 0,025 mg CuSO₄•5H₂O, 0,025 mg CoCl₂•6H₂O

Makrosalze (pro Liter): 16,5 g NH₄NO₃, 19 g KNO₃, 1,7 g KH₂PO₄, 4,4 g CaCl₂•2H₂O, 3,7 g MgSO₄•7H₂O

Erde: Fruhstorfer Einheitserde Typ T

4.3.2. *Escherichia coli*

E. coli wird in LB-Medium bei 37°C und 200 rpm kultiviert, sofern nicht anders angegeben. Übernacht- und Vorkulturen von *E. coli* werden mit einer Einzelkolonie von Platte in 5 ml angeimpft und über Nacht bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt. Hauptkulturen werden mit einer Verdünnungsstufe von 1:1000 (sofern nicht anders angegeben) aus einer Vorkultur angeimpft.

Agrobacterium tumefaciens wird ebenfalls in LB-Medium kultiviert, jedoch bei einer Temperatur von 28-30°C und für mindestens 24 h.

LB-Medium (pro Liter): 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen
18 g Agar (wenn Platten gegossen werden)
Antibiotika werden nach dem Autoklavieren dem handwarmen Medium steril zugegeben

4.4. Molekularbiologische Techniken

4.4.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wird zur analytischen Amplifikation von DNA-Fragmenten standardmäßig in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz besteht aus 1 µl Templat-DNA, 0,2 µl Phire™ Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, Finnland), 4 µl vom 5x Phire™ Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (Endkonzentration 0,5 mM),

je 1 µl Primer (Endkonzentration 5 µM) und H₂O ad 20µl (hier 11,8 µl). Die PCR-Reaktion selbst beginnt mit einem initialen zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 98°C. Darauf folgen 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 5 sec bei 98°C, dem *Annealing* mit einer den Primern entsprechenden *Annealing*-Temperatur für 10 sec und die Elongation bei 72°C für 20 sec/kb. Die finale Extension wird ebenfalls bei 72°C für 2 Minuten durchgeführt.

Wird ein präparativer PCR-Lauf durchgeführt, etwa zu einer Klonierung, dann wird eine Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*Proof-Reading*) verwendet. Anwendung finden hier die High-Fidelity (Roche, Deutschland) und die Phusion (Finnzymes, Finnland). Zu beachten ist hier jedoch die für gewöhnlich längere Extensionszeit pro kb.

4.4.2. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) wurde in Kooperation mit der AG Schwechheimer, TU München, wie folgt durchgeführt:

Aus sieben Tage alten Keimlingen wird mittels NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) die Gesamt-RNA isoliert und 2 µg für die cDNA-Synthese mittels M-MUL V Reverse Transcriptase (Fermentas, Deutschland) eingesetzt. Um Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wird während der Extraktion DNase zugegeben. Zur Quantifizierung des Transkriptlevels in einer zweistufigen qRT-PCR wird der C1000 Thermal Cycler mit CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Deutschland) und der iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Deutschland) eingesetzt. Der initiale Denaturierungsschritt der qRT-PCR-Reaktion bei 95°C dauert 10 min. In den folgenden 40 Zyklen wird bei 95°C für 10 sec denaturiert und bei 60°C für 25 sec elongiert. Normalisiert werden die Transkriptlevel der Mutanten gegen den Transkriptlevel von ACT8 (AT1G49240). Zum Primerdesign wird die Software ProbeFinder <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000> (Roche, Deutschland) zu Hilfe genommen.

4.4.3. Agarose Gelelektrophorese

Durch Aufkochen in einer Mikrowelle bringt man die Agarose (1-3% w/v) in 1xTAE-Puffer in Lösung. Nach Abkühlen auf Handwärme wird Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben und die Gele gegossen. Zur Elektrophorese werden selbst konstruierte Kammern (Josef Reischenbeck) bei 200V für etwa 30 min betrieben. Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgt auf einem UV-Schirm mittels Doc-it Apparatur und Software (LTF Labortechnik GmbH und Co KG, Deutschland).

50x TAE: 2 M Tris/HCL
 5,7 % Essigsäure (v/v)
 50 mM EDTA
 pH-Wert auf 8,0 einstellen

Ethidiumbromid-Stammlösung (1% w/v)

4.4.4. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Banden aus Agarosegelen zu präparativen Zwecken wurde mit dem Gelextraktionskit Nucleospin® Extrakt II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) durchgeführt. Die Elution erfolgt in 15-50 µl Wasser.

4.4.5. Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA mittels Restriktionsenzymen erfolgt in einem Gesamtvolumen von 40 µl. standardmäßig wird 1 u Enzym und etwa 1-5 µg DNA eingesetzt. Die Reaktion läuft in einer 1x Pufferlösung bei 37°C für 1,5 h ab, wobei die beim Enzym mitgelieferte Pufferstammlösung mit Wasser auf eine 1x Pufferlösung verdünnt wird. Bei einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde das Programm DoubleDigest™ <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest> (Fermentas, Deutschland) herangezogen. Restriktionsenzyme wurden standardmäßig von Fermentas bezogen.

4.4.6. Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde standardmäßig in 20 µl Volumen durchgeführt. Für die Ligationsreaktion werden 1000 CEU (*cohesive end ligation unit*) T4-DNA-Ligase (Fermentas, Deutschland) eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge des Vektors beträgt für gewöhnlich 20-100 ng, vom Insert wird, je nach Größe, ein bis zu fünffacher Stoffmengenüberschuss zugegeben. Die Reaktion läuft in 1x T4-DNA-Ligase-Puffer bei RT für etwa 1 h oder bei 4°C über Nacht ab. Für eine Transformation wird der gesamte Ligationsansatz verwendet.

4.4.7. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation werden der 20 µl Transformationsansatz mit 80µl auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten Zellen in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Es folgt ein Temperaturschock für 30 sec bei 42°C. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Es werden 900 µl SOC-Medium (siehe *Herstellung chemisch kompetenter E. coli*) zugegeben und unter Schütteln für 1 h inkubiert. Im Anschluss wird der Transformationsansatz auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* folgt dem Protokoll nach Inoue (Inoue et al., 1990). Dabei werden 250 ml SOB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 geschüttelt. Wenn diese OD₆₀₀ erreicht ist, werden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4000g und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 80 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert. Es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4000g und 4°C für 10 min. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 20 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert. Es wird 1,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) unter Schütteln langsam zugegeben. Die Zellen werden erneut für 10 min auf Eis gelagert und anschließend als 210 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Gelagert werden kompetente Zellen bei -80°C . Sämtliche Arbeitsschritte sind im Kühlraum durchzuführen.

SOB-Medium:	2 % Bactotrypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 10 mM NaCl 2,5 mM KCL 10 mM MgSO_4 pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen 10 mM MgCl_2 (sterilfiltriert nach Autoklavieren zugeben)
SOC-Medium:	SOB-Medium 20 mM Glucose (nach Autoklavieren zugeben, ansonsten wie SOB-Medium)
Transformationspuffer:	55 mM MnCl_2 15 mM CaCl_2 250 mM KCL 10 mM PIPES (aus 0,1 M PIPES, pH 6,7) Der Transformationspuffer wird sterilfiltriert.

4.4.9. Transformation elektrokompenter *A. tumefaciens*

Die Transformation von elektrokompenten *A. tumefaciens* erfolgt in einem Elektroporator (Parameter: $V= 2000 \text{ V}$, $R= 700\Omega$, $C= 25 \mu\text{F}$, $T=17,5 \text{ ms}$). Verwendet wurde der elektrokompente Agrobakterienstamm C58 pGV3101 (Van Larebeke et al., 1974) mit Ti-Plasmid pMP90 (bakterielle Resistenzmarker gegen Rifampicin und Gentamycin (Koncz and Schell, 1986; Ferrando et al., 2000), Stammsammlung #845).

Die kompetenten Agrobakteien werden auf Eis aufgetaut. 80 μl der kompetenten Zellen werden mit 1 μl Plasmid-DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt und unter den oben genannten Parametern elektroporiert. Die Zellen werden mit 600 μl LB-Medium versetzt und für etwa 2 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 1200 rpm für 2 min. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert. Die Selektion auf positive Transformanten hin geschieht auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika für 2 Tage bei 28°C .

4.4.10. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Es wird eine 500 ml Übernachtkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 bei 28°C geschüttelt und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Nach Sedimentation bei 4000g und 4°C für 10 min werden die Zellen in kaltem Wasser gewaschen und erneut für 10 min bei 4000g und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Danach wird das Pellet in 20 ml 10% Glycerin (steril) resuspendiert und erneut für 10 min bei 4000g und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss an die Resuspension der Zellen in 3 ml 10% Glycerin (steril) werden 250 µl Aliquots in N₂liqu eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.11. Plasmid Präparation aus *E. coli* / *A. tumefaciens*

Zur Sequenzierung wurden Plasmide mittels dem NucleoSpin® Plasmid Kitt der Firma Macherey-Nagel isoliert, für die übrigen analytischen und präparativen Anwendungen wurde dem Protokoll nach Hattori (Hattori and Sakaki, 1986) gefolgt.

Es werden in einem 2 ml Reaktionsgefäß in zwei Zentrifugationsschritten (14000 rpm, 2 min) insgesamt 4 ml einer Übernachtkultur pelletiert und anschließend in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT werden 200 µl der Lösung II zugegeben und mehrere Male invertiert. Einer Inkubation auf Eis für 5 min folgt die Zugabe von 150 µl Lösung III. Nach erneutem Invertieren folgt eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min. Nach der folgenden Zentrifugation bei 14000rpm für 10 min wird der Überstand mit 500 µl Phenol gemischt und nach 2 min Inkubationszeit bei RT erfolgt die Zugabe von 200 µl Chloroform. Die Probe wird gemischt und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Überführen der wässrigen Phase in 1 ml 96% Ethanol folgt eine mindestens 20-minütige Inkubation bei RT. Im Anschluss wird die Probe bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und das so erhaltene Pellet in 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet und in 50 µl TE-RNase aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C kann die Plasmidpräparation für weiterführende Experimente verwendet werden.

Lösung I:	50 mM Glucose	
	10 mM EDTA	
	25 mM Tris/HCL	pH 8,0

Lösung II:	0,2 M NaOH 1% SDS (w/v) (hält nur etwa 6 Wochen)
Lösung III:	3 M K-Acetat 11,5% Eisessig (v/v)
TE-RNase:	1 mM EDTA 10 mM Tris/HCL pH 8,0 100 µg/ml RNase

4.4.12. Fällern von DNA

Um die DNA in einem Versuchsansatz zu präzipitieren, wird dem Ansatz Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 75% (v/v) und Na-Acetat zu einer Endkonzentration von 60 mM zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei -20°C erfolgt eine Zentrifugation bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) und 4°C für 20 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in TE-Puffer oder Wasser gelöst.

TE-Puffer:	1 mM EDTA 10 mM Tris/HCL pH 8,0
------------	---

4.4.13. DNA-Isolation aus *A. thaliana* mittels CTAB

Die Isolation pflanzlicher DNA erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Murray und Thompson (Murray and Thompson, 1980):

Eine kleine Menge Pflanzenmaterial (bis 100 mg) wird in N₂liq_u schockgefroren, aufgeschlossen und unter Zugabe des 2x CTAB-Puffers für mindestens 10 min bei 65°C inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlphase werden 300 µl Chloroform zugegeben und gründlich gevortext. Der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation folgt die Überführung der wässrigen Phase in 300 µl 2-Propanol. Nach gründlichem Mischen wird die Probe für 5 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wird der Ethanol abgenommen, das Pellet

luftgetrocknet und in 50 µl TE-RNase (siehe *Plasmid Präparation aus E. coli / A. thumefaciens*) aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C kann die DNA-Präparation für weiterführende Experimente verwendet werden.

2x CTAB-Puffer: 2% CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) (w/v)
 1,4 M NaCl
 20 mM EDTA
 100 mM Tris/HCL pH 8,0

4.4.14. Transformation von *A. thaliana* mittels *floral dipping*

Mit der Methode des *floral dipping* (Clough and Bent, 1998) ist es möglich, Infloreszenzen von etwa 3 Wochen alten *Arabidopsis* (Columbia 0) Pflanzen mittels Agrobakterien zu transformieren. Die Pflanzen werden hierfür je Transformationsansatz in vier großen Pflanztöpfen (9 x 9 cm) zu etwa 20 Pflanzen je Topf angezogen.

Zur Transformation wird eine 400 ml LB-Übernachtskultur mit das gewünschte Konstrukt tragenden Agrobakterien mit entsprechenden Antibiotika (Kan₅₀ und Rif₅₀ für pCAMBIA) herangezogen. Die Zellen werden bei 5000g für 8 min in einem sterilen Zentrifugationsgefäß sedimentiert und das Pellet in 350 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Nach Überführen des resuspendierten Pellets in ein steriles 400 ml Dipgefäß erfolgt die eigentliche Transformation durch Eintauchen so vieler Infloreszenzen, wie möglich. Eingetaucht wird für ca. 10 sec. und nicht befeuchtete Infloreszenzen werden mittels Pipette einzeln benetzt. Zur Schaffung optimaler Transformationsbedingungen werden die Töpfe über Nacht in Cellofanfolie eingepackt. Die Prozedur wird nach drei Tagen wiederholt, um die Transformationseffizienz zu erhöhen.

Infiltrationsmedium: 50 g Saccharose
(pro Liter) 500 µl Vac-IN-Stuff (Silwet L-77, Lehle Seeds, USA)
 10 µl BAP (Benzylaminopurin, 1 mg/ml in DMSO oder EtOH)

4.4.15. Kreuzung von *A. thaliana*

Zur Kreuzung von *Arabidopsis* Pflanzen eignet sich als Pollenspender nur eine seit kurzem geöffnete Blüte, als Pollenempfänger werden kurz vor der Öffnung stehende Infloreszenzen verwendet. Zur Übertragung des Pollens auf die Empfängernarbe werden an der Empfängerpflanze alle Infloreszenzen bis auf drei entfernt. Bei diesen drei Infloreszenzen werden mittels Pinzette die Kelch-, die Blüten- und die Staubblätter entfernt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Narbe nicht in Kontakt mit den noch unreifen Antheren kommt. Zur Bestäubung mit Fremdpollen wird der Spenderpflanze eine „reife“ Blüte abgenommen und leicht zusammengedrückt. Aus der gespreizten Blüte wird eine Anthere entnommen und damit über die freigelegte Narbe der Empfängerpflanze gestrichen, sodass der Pollen daran sichtbar hängen bleibt. Nach der erfolgreichen Bestäubung wird der Griffel mit einem Stück Cellofanfolie umwickelt, um vor Fremdbestäubung und Pollenverlust zu schützen.

4.5. Proteinbiochemische Techniken

4.5.1. Ermittlung optimaler Proteinexpressionsbedingungen in *E. coli*

Zur Ermittlung der optimalen Proteinexpressionsbedingungen in *E. coli* werden die Parameter Temperatur und IPTG-Konzentration (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) betrachtet. Hierzu werden 25 ml-Kulturen bei den Temperaturen 20°C, 30°C und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4-0,6 geschüttelt und dann mit verschiedenen Konzentrationen IPTG (0, 5, 50, 100, 200, 500, 1000 μ M IPTG) induziert. Die induzierten Kulturen werden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag geerntet.

Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation bei 4000 g und 4°C für 20 min. Nach Verwerfen des Überstands wird das Pellet je g Feuchtgewicht in 3 ml des Puffers 1 resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen werden diese in N_{2liq} schockgefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgt ein DNase-Verdau (20 μ g DNase/ml Zellaufschluss) bei 37°C, bis der Zellaufschluss nicht mehr viskos ist. Nach der Abtrennung der löslichen Proteine im Überstand von den unlöslichen Proteinen in den *Inclusion Bodies* im Pellet durch Zentrifugation (50000g, 4°C, 20 min) können die löslichen Proteine analysiert werden.

Unlösliche Proteine müssen zu Analysezwecken in Lösung gebracht werden. Nach der Resuspension des Pellets in Puffer 1 (10 ml/g Feuchtgewicht) folgt eine erneute Zentrifugation (50000g, 4°C, 20 min). Der Überstand wird verworfen und das gewaschene Pellet in 3 ml/ g Feuchtgewicht resuspendiert und gerührt, bis die Lösung translucient erscheint. Nach erneuter Zentrifugation bei 50000g und 4°C für 20 min enthält der Überstand nun die unlöslichen Proteine.

Es wird von jeder Probe die gleiche Proteinmenge geladen, die Analyse erfolgt mittels Western-Blot und Immunodetektion (siehe *Western-Blot* und *Immunodetektion*)

Es zeigte sich, dass PEX10-T7-6xHis bei 20°C und eine IPTG-Konzentration von 50 µM am besten löslich exprimiert werden kann. Die optimalen Expressionsbedingungen von AtCP1 liegen bei 37°C und 5 µM IPTG.

Puffer 1:	500 mM NaCl 1 mg/ml Lysozym 150 µM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 50 mM in Isopropanol, Aufbewahrung RT bis 6 Monate) 20 mM Na-Phosphat pH 7,4
Puffer 2:	20 mM Na-Phosphat 500 mM NaCl 8 M Harnstoff pH 7,4
DNase (1 mg/ml):	2 mg/ml DNase 150 µM NaCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM Tris/HCl pH 7,5 wenn gelöst, gleiches Volumen an Glycerin zugeben und vorsichtig invertieren, Aufbewahrung bei -20°C

4.5.2. Proteinexpression in *E. coli*

Die Proteinexpression wird in größerem Maßstab (mehrere Liter) durchgeführt. Hierzu wird die Hauptkultur aus einer Übernachtskultur 1:1000 angeimpft und bei der als optimal bestimmten Temperatur bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4-0,6 geschüttelt. Nach der Induktion mit der ermittelten IPTG-Konzentration wird über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen (dem Protokoll in *Ermittlung optimaler Proteinexpressionsbedingungen in E. coli* folgen) geerntet.

4.5.3. Isolation von PEX10-T7-6xHis-Tag aus der *E. coli*-Membran

Das integrale Membranprotein PEX10-T7-6xHis-Tag wird bei den ermittelten Expressionsparametern (20°C, 50 µM IPTG) vermehrt in die *E. coli*-Membranen integriert und durch ein Ernten dieser Membranen nativ angereichert.

Der die löslichen Proteine enthaltende Überstand wird für 1 h bei 60000 rpm und 4°C (Ultrazentrifuge L80, Rotor 70.1 Ti, Beckmann) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird vorsichtig bei 4°C in Membranpuffer (0,5 ml/ Pellet) resuspendiert, dann auf 0,2% Dodecyl-β-D-Maltosid verdünnt (mit Membranpuffer ohne Detergens) und 1 h bei 4°C geschwenkt. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation bei 60000 rpm und 4°C für 1 h, um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand enthält solubilisiertes PEX10-T7-6xHis-Tag.

Membranpuffer	300 mM NaCl
	Na-Phosphat pH 8,0
	2% Dodecyl-β-D-Maltosid (w/v, Roth)
	Proteaseinhibitoren (cOmplete Mini, EDTA-frei, Protease Inhibitor Cocktail, Roche)

4.5.4. Proteinanreicherung mittels T7-Tag an PEX10

Da PEX10-T7-His-Tag nur in geringer Mengen angereichert wird, ist das Säulenbettvolumen gering zu halten (200-500 µl). Die T7-Agarose (Novagen) wird mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer equilibrier und im Anschluss mit solubilisiertem PEX10-T7-6xHis-Tag beladen. Nach Waschen der Säule mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer wird mit 5 x 1 Säulenvolumen 0,1 M Zitronensäure pH 2,2 in jeweils 150 µl Neutralisatinspuffer (2M Tris pH 10,4) eluiert. Nach Elution wird die T7-Agarose mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer mit 0.02% NaN₃ (w/v) gewaschen und bei 4°C gelagert.

10xBindepuffer	42.9 mM Na ₂ HPO ₄
	14.7 mM KH ₂ PO ₄
	27 mM KCl
	1.37 M NaCl
	0,2% Dodecyl-β-D-Maltosid (w/v, Roth)
	0.02% NaN ₃ (w/v)
	pH 7.5

4.5.5. Proteinanreicherung mittels His-Tag an AtCP1

Bei einer His-Tag Reinigung bedient man sich der Affinität von Histidin für zweiwertige Metallionen, zumeist Nickel und der kompetitiven Eigenschaft von Imidazol gegenüber Histidin in eben dieser Affinität.

Nach Equilibrierung der Ni-Matrix (Ni-NTA-Superflow, Qiagen; Protino Ni-TED 2000, gepackte Säulchen, Macherey-Nagel) mit 10 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer wird die Probe auf die Säule geladen (Bettvolumen möglichst gering halten). Steht eine FPLC zur Verfügung, kann das Laden, Waschen und Eluieren mittels UV-Detektor überwacht werden. Nach einem weiteren Waschschrift von 10 Säulenvolumen Equilibrierungspuffer folgt die Elution der gebundenen Proteine mittels Imidazol-Stufengradienten (oder linearem Gradienten an der FPLC). Ist die Elutionskonzentration bekannt, so wird zuerst mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer mit 5 mM Imidazol gewaschen, dann mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer mit 50 mM Imidazol (für AtCP1) eluiert und das Eluat fraktioniert. Nach der Elution der Zielproteine wird die Ni-Matrix mit zehn Säulenvolumen Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol gewaschen und schließlich mit 10 Säulenvolumen Lagerpuffer gewaschen und in diesem bei 4°C aufbewahrt. Die Regeneration der Ni-Matrix erfolgt nach Standardprotokollen der jeweiligen Firma.

Equilibrierungspuffer: 300 mM NaCl
 Na-Phosphat pH 8,0

Elutionspuffer: 300 mM NaCl
 5-500 mM Imidazol (Roth)
 Na-Phosphat pH 8,0

Lagerpuffer: 300 mM NaCl
 0,2% NaN₃ (w/v)
 Na-Phosphat pH 8,0

4.5.6. Proteinanreicherung mittels Immunpräzipitation

Erfolgt die Immunpräzipitation aus *Arabidopsis*, so wird zuerst ein Proteinrohextrakt hergestellt. Es werden 1-2 g (max. 5 g) Blattmaterial in N₂liq schockgefroren und in einem gekühlten Mörser aufgeschlossen. Es wird 1 ml Aufschlusspuffer/g Pflanzenmaterial zugegeben und ein Homogenisat hergestellt. Nach Filtration durch zwei

Lagen Miracloth (Calbiochem) ist der Proteinrohextrakt zur Weiterverwendung in der Immunpräzipitation bereit.

Dem Proteinrohextrakt wird der Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein in zehnfach höherer Konzentration (α -PEX10-Antikörper 1:100) als für den Einsatz im Western-Blot zugegeben und für 1 h bei 4°C geschwenkt oder invertiert. Nach 1 h werden 20-50 μ l Protein A/G Agarose (Santa Cruz Biotech) zugegeben und eine weitere Stunde bei 4°C geschwenkt. Nach Sedimentierung der Agarose (Tischzentrifuge, 2000 rpm, 1 min, RT) wird diese dreimal in Aufschlusspuffer gewaschen, anschließend in 1x *loading dye* Westenaufgekocht und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (siehe *SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese* und *Western-Blot*).

Aufschlusspuffer: 100 mM NaCl
 10% Glycerol
 50 mM Tris/HCl pH 7,4
 Proteaseinhibitoren (cOmplete Mini, EDTA-frei, Protease Inhibitor Cocktail, Roche)

4.5.7. Protoplastengewinnung und Inkubation mit *MitoTracker orange*

Zur Protoplastierung von pflanzlichem Gewebe (hier 2-3 g Blätter) wird dieses sofort nach der Ernte in einer Petrischale mit 15-20 ml Enzymlösung auf einem Kippschüttler für 3-4 h bei RT inkubiert. Die Ernte der Protoplasten erfolgt durch Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz (Maschenweite 50 μ m) und anschließende Zentrifugation des Durchflusses bei 60g für 2 min. Der Überstand wird verworfen und das Protoplastenpellet in 10 ml WIMK vorsichtig resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt, beim zweiten Mal wird das Pellet jedoch in 1 ml WIMK resuspendiert und MitoTracker® Orange zu einer Endkonzentration von 0,5 μ M zugegeben. Bereits nach wenigen Minuten Inkubationszeit können die Proben untersucht werden.

Enzymlösung: 1% Cellulase „Onozuka“ R-10 (Yakult, Japan)
 0,25% Macerozym R-10 (Yakult, Japan)
 400 mM Mannitol
 8 mM CaCl₂
 1% BSA
 5 mM MES-KOH pH 5,6

Die Herstellung der Enzymlösung erfolgt nach Standardprotokollen (Sambrook and Russel 2001). Dabei wird eine Stammlösung mit 2% Cellulase, 0,5% Macerozym und 10 mM MES-KOH (pH 5,6) zweimal je 40 min dialysiert und mit PMSF (0,5 mM) behandelt. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von Mannitol (400 mM) und CaCl_2 (8 mM) und eine Inkubation bei 55°C für 30 min. Nach Zugabe von 1% BSA wird die Lösung sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

MitoTracker® Orange: 10 µM MitoTracker® Orange (Invitrogen) in WIMK

WIMK-Lösung: 0,5 mM Mannitol
5 mM MES-KOH pH 5,6
autoklavieren

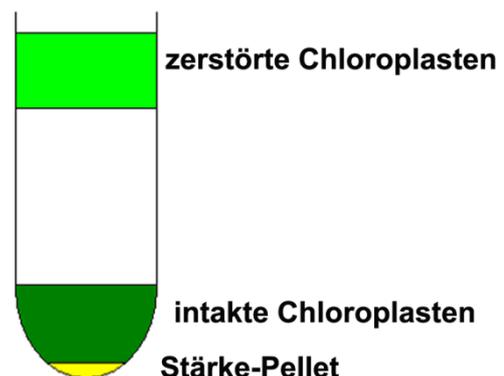
4.5.8. Isolierung von Chloroplastenvelopes aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolation von Chloroplastenvelopes werden etwa 400 g Blattmaterial je Ansatz benötigt. Das Alter der zu verwendenden Pflanzen sollte 2-3 Wochen betragen, sie sollten aber auf keinen Fall blühen (lässt sich durch Wachstum unter Kurztagbedingungen hinauszögern). Alle folgenden Schritte werden im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt.

Das Pflanzenmaterial wird im Homogenisationsmedium bei 4°C mittels Mixer in kurzen Stößen aufgearbeitet und zur Grobfiltrierung durch vier Lagen Verbandsmull filtriert. Nach anschließender Feinfiltrierung durch ein Nylonnetz (Maschenweite 50 µm) erfolgt die Pelletierung der Chloroplasten bei 2070g und 4°C für 2 min. Der Überstand wird verworfen (vollständig!) und das Pellet zügig mittels Schwenken und Spatel in insgesamt 30 ml Waschpuffer resuspendiert.

Die Abtrennung der intakten Chloroplasten erfolgt im Percoll-Gradienten. Nach Mischen von einem Volumen Percoll (GE Helathcare) mit einem Volumen Gradientenmedium erfolgt die Linearisierung von 30 ml Gradienten durch Zentrifugation (38700g, 4°C, 55 min). Es wird je Gradient vorsichtig 5 ml Chloroplastensuspension geladen und bei 13300g und 4°C für 10 min zentrifugiert (siehe Abbildung 34).

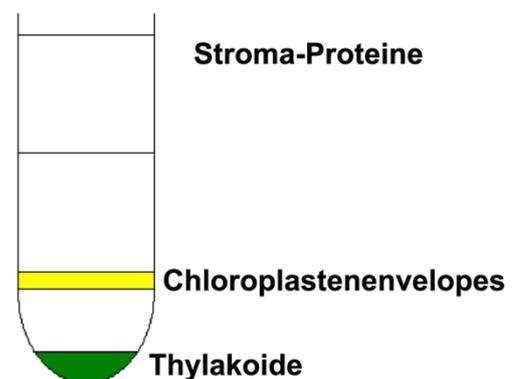
Abbildung 34: Percoll-Gradient mit intakten Chloroplasten. Die Abbildung zeigt die Lage der zerstörten und intakten Chloroplasten sowie das entstehende Stärkepellet.



Nach Absaugen des Überstandes inklusive der zerstörten Chloroplasten mittels Vakuum-Pumpe werden 10 ml der intakten Chloroplasten vorsichtig mit einer 5 ml Pipette mit abgeschnittenen Spitzen geerntet, ohne dabei in das Stärkepellet zu stoßen. Die so geernteten Chloroplasten werden mit Waschpuffer 1:4 verdünnt und bei 2070g und 4°C für 2 min pelletiert. Die so pelletierten Chloroplasten werden in insgesamt 12 ml Hypotonischem Medium resuspendiert.

Die Gewinnung der Hüllmembranen erfolgt im Saccharose-Stufengradienten. Hierzu werden Gradienten mit 3 ml 0,93 M Saccharose, 2,5 ml 0,6 M Saccharose und 2 ml 0,3 M Saccharose (in 4 mM MgCl₂, 10 mM MOPS/NaOH, pH 7,8) geschichtet. Nach Filtration der geplatzten Chloroplasten durch ein Nylonnetz (Maschenweite 50 µm) wird die die Hüllmembranen enthaltende Suspension vorsichtig á 3 ml auf die Stufengradienten geladen. Nach Zentrifugation bei 20000 rpm und 4°C für 75 min (Ultrazentrifuge L7-55, Rotor SW41 Ti, Beckmann) lokalisieren die Hüllmembranen an der 0,93 M-0,6 M-Gradienten-Interphase (Abbildung 35).

Abbildung 35: Isolierte Chloroplastenvelopes. Die Abbildung zeigt die Lage der Stroma-Proteine, der Thylakoide und der Chloroplastenvelopes im Saccharose-Stufengradienten.



Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes werden die Chloroplastenvelopes abpipettiert. Sollten die Chloroplastenvelopes sichtbar mit Thylakoiden kontaminiert sein, so werden diese in einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert um die Thylakoiden zu pelletieren. Die Hüllmembransuspension wird 1:4 in Waschmedium verdünnt und bei 25000 rpm und 4°C für 1 h (Ultrazentrifuge L7-55, Rotor SW41 Ti, Beckmann) zentrifugiert. Das Chloroplastenvelope-Pellet wird in 50-100µl Waschmedium resuspendiert und nach Einfrieren in N₂Liqu bei -80°C gelagert.

Homogenisationsmedium	0,45 M Sorbitol 10 mM EDTA 10 mM NaHCO ₃ 0,1% BSA (w/v) 20 mM Tricin/KOH	pH 8,4
Waschpuffer:	0,3 M Sorbitol 5 mM MgCl ₂ 2,5 mM EDTA 20 mM Tricin/KOH	pH 7,6
Gradientenmedium:	0,6 M Sorbitol 10 mM MgCl ₂ 5 mM EDTA 40 mM Tricin/KOH	pH 7,6
Hypotonisches Medium:	10 mM MOPS/NaOH 4 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 0,5 mM ε-Amino-Caprone Proteaseinhibitoren frisch zugeben	pH 7,8
Waschmedium:	10 mM MOPS/NaOH 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 0,5 mM ε-Amino-Caprone Proteaseinhibitoren frisch zugeben	pH 7,8

4.5.9. Organellenauffrennung im 30 ml Saccharose-Stufengradienten

Pro 30 ml Gradient werden 30 g *Arabidopsis*-Rosettenblätter eingesetzt. Diese werden bei 4°C in einer Mixer mit 200 ml Homogenisationsmedium in kurzen Stößen homogenisiert. Nach der Filtration des Homogenisats erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 270g und 4°C für 10 min. Der Überstand wird erneut zentrifugiert (10800g, 4°C, 15 min) und das so erhaltene Pellet vorsichtig (!) in 3 ml Homogenisationspuffer resuspendiert. Es werden die 3 ml der Suspension vorsichtig (!) auf einen Stufengradienten geladen und dieser bei 25000 rpm und 4°C für 3 h zentrifugiert (Ultrazentrifuge L7-55, Beckmann, Rotor AH 627, Sorval).

Der Stufengradient besteht aus Saccharosekonzentrationen von 10% bis 57%. Die einzelnen Konzentrationsstufen, und das Schichtvolumen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Schichtung selbst erfolgt langsam mit gekühlter Saccharose.

60% Saccharose [ml]	Gradientenmedium [ml]	Endkonzentration (w/v)	Schichtvolumen [ml]
19.0 ml	1.0	57%	5
21.6 ml	4.3	50%	7
14.6 ml	5.8	43%	7
16.6 ml	13.5	33%	5
15.0 ml	30.0	20%	3
3.5 ml	17.5	10%	3

Tabelle 4: Erstellung der Saccharosekonzentrationen für den Stufengradienten. In der Tabelle sind die Mengenverhältnisse von 60%iger Saccharose und Gradientenmedium angegeben, um die benötigten Saccharosekonzentrationen für den Stufengradienten zu erzielen.

Geerntet wird der Gradient von oben durch langsames Abpipettieren in 1 ml Schritten. Alle Schritte werden im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt.

Homogenisationspuffer: 50 mM HEPES
250 mM Saccharose
10 mM KCl
1 mM MgCl₂
1 mM Na₂EDTA
10 mM DTT (frisch zugeben)
pH 7.5

Gradientenmedium: 10 mM Na₂EDTA
5 mM MgCl₂
pH 7.5 (mit KOH)

Saccharose (60%): 132 g Saccharose
88 ml Gradientenmedium

4.5.10. Denaturierender Proteinrohextrakt aus Pflanze

Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana* erfolgt nach einem leicht modifiziertem Protokoll nach Martinez-Garcia (Martínez-García et al., 1999).

Etwa 100 mg Blattmaterial wird in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß in N₂liq_u schockgefroren und mit einem gekühlten Pistill zerstoßen. Nach Zugabe von 200 µl Puffer E wird auf Eis ein Homogenisat hergestellt. Nach Erwärmung auf RT wird das Homogenisat in einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1/10 Volumen Puffer Z versetzt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und 40 µl für PAGE eingesetzt.

Puffer E:	1% SDS (w/v)	
	10% Glycerin (v/v)	
	50 mM Na ₂ S ₂ O ₅	
	125 mM Tris/HCL	pH 6,8

Puffer Z:	12% SDS (w/v)	
	10% Glycerin (v/v)	
	22% β-Mercaptoethanol (v/v)	
	0,1% Bromphenolblau (w/v)	
	125 mM Tris/HCL	pH 6,8

4.5.11. SDS-Polyakrylamid Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wird eine diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Zur Fokussierung der Proteine im Sammelgel bedient man sich der Eigenschaft des Glycins als Zwitterion, welches im leicht sauren Milieu selbst protoniert wird und langsamer läuft als die Cl⁻-Ionen. Es entsteht zwischen dem Leitton (Cl⁻) und dem Folgeion (Glycin) ein Bereich mit sehr hoher Spannung, in dem die Proteine fokussieren. Dies ist nur möglich, da SDS (Natriumdodecylsulfat) den Gelen zugesetzt wird, welches die Tertiär- und Quartär-Struktur der Proteine aufbricht und dieses in einem konstanten Masse/Ladungs-Verhältniss negativ lädt. Beim Erreichen des Trenngels schlägt die Ladung des Glycin um und die Proteine werden nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt.

Verwendet werden Trenngele von 7,5% bis 15% (siehe Tabelle 5) mit einem 5% Sammelgel nach Laemmli (Laemmli, 1970). Gegossen werden die Gele in Biorad Mini-Protean VI® Kammern (Biorad, München). Die Überschichtung des gegossenen

Trenngels mit Isopropanol gewährleistet eine gerade Lauffront. Nach der Trenngelpolymerisation und dem Entfernen des Alkohols wird das Sammelgel aufgegossen und es werden Kämme zur Erzeugung der Auftragstaschen luftblasenfrei eingesetzt. Polymerisierte Gele können in Feuchten Tüchern und Frischhaltefolie eine Woche bei 4°C gelagert werden. Bei der Herstellung sowohl des Trenn- als auch der Sammelgels ist darauf zu achten, dass APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalbildner und TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin, Serva, Heidelberg) als Radikalstabilisator zuletzt zugegeben werden, da mit deren Zugabe die Polymerisationsreaktion beginnt.

Proben für die Elektrophorese werden mit 6-fach Auftragspuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Durchgeführt wird die Elektrophorese bei 130V für ca. 1h in SDS-Laufpuffer.

für 2 Trenngele	Trenngel 7,5%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%
Acrylamid-Stamm-Lsg.	5 ml	8,3 ml	10 ml
mQ	11 ml	7,7 ml	6 ml
2 M Tris/HCL pH 8,8	3,72 ml		
10% SDS (w/v)	200 µl		
10% APS (w/v)	200 µl		
TEMED	6,7 µl		

Tabelle 5: Mengenzusammensetzung der PAGE-Trenngele in verschiedenen Konzentrationen für 2 Trenngele bei einem Gesamtvolumen von 20 ml.

Sammelgel 5% (10 ml):
 1.7 ml Akrylamid-Stammlösung
 6,9 ml mQ
 1,25 ml 1M Tris/HCl pH 6,6
 100 µl 10% (w/v) SDS
 150 µl 10% (w/v) APS
 5 µl TEMED

6-fach Auftragspuffer:
 350 mM Tris/HCl pH6,6
 30% Glycerin (v/v)
 10% SDS (w/v)
 0,5% Bromphenolblau (w/v)
 10% β-Mercaptoethanol (v/v) (möglichst frisch zugeben)

10-fach SDS-Laufpuffer:
 1,9 M Glycin
 1% SDS (w/v)
 250mM Tris pH 8,3

4.5.12. Coomassiefärbung

Zur Detektion der Proteine im PAGE-Gel werden diese Coomassie-gefärbt. Hierfür werden die PAGE-Gele nach der Elektrophorese für wenige Stunden bis über Nacht in die Coomassie-Lösung gelegt und unter langsamen Schütteln inkubiert. Entfärbt werden die Gele durch Überführen in Entfärber-Lösung, welche mehrmals gewechselt werden muss.

Coomassie-Lösung: 40% Methanol (v/v)
 10% Eisessig (v/v)
 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v)

Entfärber-Lösung: 40% Methanol (v/v)
 10% Eisessig (v/v)

4.5.13. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Blum (Blum et al., 1987) durchgeführt. Der Vorteil einer Silberfärbung liegt in der hohen Sensitivität. Es können noch Proteinmengen von 1 bis 10 ng nachgewiesen werden.

Zuerst werden die Proteine im Gel fixiert und anschließend gewaschen. Es folgt eine Sensibilisierung der Proteine mit Natriumthiosulfat und erneutes Waschen. Bei der Imprägnierung mit Silbernitrat werden Silber-Ionen von geladenen Resten der Proteine komplexiert und es kommt zu einer Silberkeimbildung. Es folgen ein erneuter Waschschrift und die Entwicklung. Im Entwicklungsschritt kommt unter anderem auch das Reduktionsmittel Natriumthiosulfat zum Einsatz, welches ähnlich wie in der Photographie die Silber-Ionen reduziert. Dabei werden zuerst die Silbernitratkeime reduziert, da ihr Redoxpotential etwas höher liegt als bei freien Silber-Ionen. Die Entwicklungsreaktion darf nicht zu lange andauern, da sonst auch freie Silber-Ionen reduziert werden (Hintergrund). Hierzu wird mit Wasser gewaschen und mit einer Methanol/Eisessiglösung abgestoppt. Der letzte Schritt ist eine Waschung mit Methanol. In dieser Waschlösung ist das Gel einige Wochen bei 4°C stabil.

Schritt	Dauer	Agentien
Fixieren	> 1h	50% MeOH, 12% HAc, 0,02% FA (Formaldehyd)
Waschen	3x 20 min	50% EtOH
Sensibilisieren	60 sec	0,02% Natriumthiosulfat (w/v)
Waschen	3x 20 sec	mQ
Imprägnieren	20 min	0,2% Silbernitrat (w/v), 0,03% FA
Waschen	3x 20 sec	mQ
Entwickeln	<10 min	6% Natriumcarbonat (w/v), 0,02% FA, 0,0004% Natriumthiosulfat (w/v)
Waschen	2x 2 min	mQ
Abstoppen	10 min	50% MeOH, 12% HAc
Waschen	> 20 min	50% MeOH

Tabelle 6: Silberfärbung nach Blum (1987). In der obigen Tabelle sind die Schritte, deren Dauer und die verwendeten Lösungen für eine Silberfärbung an PAGE-Gelen aufgelistet.

4.5.14. Western-Blots

Zur immunologischen Detektion wurden die Proteine nach Auftrennung durch PAGE auf Nitrozellulose-Membranen übertragen und fixiert. Hierfür wird zuvor in Puffer A equilibrierte Nitrozellulose (Protran Nitrozellulose-Transfärbemembran, Porengröße 2µm, Whatman) mit dem zu blottenden Gel luftblasenfrei belegt und in eine Haltevorrichtung eingespannt. Das Tankblotten erfolgt gekühlt (durch Kühlraum oder Kühlakku) bei 100V und 350 mA für 1 h im Puffer A (Mini-Trans-Blot® Kammer, Biorad, München).

10x Puffer A: 1,92 M Glycin
 250 mM Tris/HCL pH 8,3

4.5.15. Ponceau S Färbung

Zur Detektion der erfolgreich auf Nitrozellulose transferierten Proteine werden die Membranen nach dem Blotten zweimal für 5 min mit mQ gewaschen und anschließend für fünf bis zehn Minuten mit Ponceau S überschichtet. Zur Entfernung des Hintergrunds

wird mehrmals mit mQ gewaschen, bis die Proteinbanden zu erkennen sind. Diese lassen sich durch weiteres Waschen auch entfärben.

Ponceau S: 0,6% TCA (Trichloressigsäure) (v/v)
 0,4% Ponceau

4.5.16. Immunodetektion

Nach dem Proteintransfer auf die Membran und eventueller Ponceau S Färbung wird diese mit TBS (tris buffered saline) gewaschen und im Anschluss mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA, Fulka) oder 5% (w/v) Magermilchpulver (Saliter, Kempten) in TBS für eine Stunde unter langsamen Schütteln geblockt. Dem Blocken folgte die einstündige Dekoration mit dem primären Antikörper verdünnt in 1% BSA in TBS mit 0,02% NaN₃. Im Anschluss wird sechsmal für je fünf Minuten mit TBST (tris buffered saline + tween) gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (anti-Rabbit aus Ziege, Sigma), gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (AP), dekoriert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen für je fünf Minuten mit TBST wird die Membran fünf Minuten in AP-Puffer equilibriert. Im Anschluss wird die Farbreaktion zur Detektion gestartet. Hierfür wird die Membran in Dunkelheit mit 5 ml der AP-Färbelösung inkubiert, bis Banden sichtbar werden. Abgestoppt wird die Farbreaktion durch Waschen der Membran mit mQ. Die fertig entwickelten Blots können in mQ dunkel mehrere Tage aufbewahrt werden, dann beginnen sie nachzudunkeln.

10x TBS: 200 mM Tris/HCl
 1,5 M NaCl
 pH 7,5 mit HCl einstellen

TBST: 1x TBS
 0,05% Tween 20 (v/v)

AP-Puffer: 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 100 mM Tris/HCl
 pH 9,5 mit NaOH einstellen

NBT-Stammlösung: 5% NBT (w/v) (Nitrotetrazoliumblau, Boehringer, Ingelheim)
 in 70% DMF (Dimethylformamid)

BCIP-Stammlösung: 5% BCIP (w/v) (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat, Boehringer, Ingelheim) in 100% DMF (Dimethylformamid)

AP-Färbelösung: 5 ml AP-Puffer
30 µl NBT
15 µl BCIP

In der folgenden Tabelle werden die verwendeten Antikörper mit Verdünnung (in TBST, 1% BSA, 0,02% NaN₃) und Herkunft für die Immunodetektion aufgelistet:

Antikörper	gewonnen aus	Verdünnung für Westen-Blot
α-PEX10	Hase	1:1000
α-gMDH	Hase	1:3000
α-VIPP	Hase	1:2000
goat- α-rabbit IgG (H+L)-AP-Konjugat (Milipore)	Ziege	1:50000
α-T7-AP-Konjugat (Novagen)	Maus	1:10000

Tabelle 7: Antikörperliste

4.5.17. Bradford

Zur Ermittlung des Proteingehalts einer Lösung wird standardmäßig ein Bradford-Assay durchgeführt. Diese photometrische Nachweismethode detektiert Proteinkonzentrationen in der Größenordnung von 0,5 µg Protein/ml, im günstigsten Fall sogar bis 0,05 µg Protein/ml. Die Detektionssensitivität ist von der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins abhängig zu machen, da der Farbstoff im Bradford-Reagenz, Coomassie-Brilliantblue G250, als Hauptreaktionspartner die geladene, polare Aminosäure Arginin bevorzugt. Es werden auch die Aminosäuren Lys, His, Thr, Phe und Trp gebunden. Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 595 nm, da sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes in Anwesenheit von Protein von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Als Absorptionskoeffizient von Coomassie Brillant Blau an BSA wurde als 0,058 l/mol cm ermittelt. Es werden Dreifachestimmungen nach dem Probenansatz in Tabelle 8 gemessen.:

zu messende Probe	Nullwert
x µl Probe	-
200µl Bradford-Lösung	200 µl Bradford-Lösung
(800-x) µl mQ	800 µl mQ

Tabelle 8: Messansatz zu Proteinbestimmung mittels Bradford.

4.5.18. Präzipitation von Proteinen

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration werden Proteine ausgefällt und in geringerem Volumen wieder resuspendiert. Angewendet wurden sowohl die Präzipitation mittels Trichloressigsäure als auch die Aceton-Fällung.

Proteine werden mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt, wenn schon eine Proteinkonzentration von $>5 \mu\text{g/ml}$ vorliegt. Dazu wird zum Vollumen der Probe das gleiche Vollumen an 100% TCA zugegeben und gevortext. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wird die Probe für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Präzipitat in einem kleinen Volumen NaOH gelöst und kann weiterverwendet werden.

Die Acetonfällung eignet sich bei Proteinkonzentrationen $<1 \mu\text{g/ml}$. Es werden zur Probe fünf Volumen kalter Aceton (-20°C) zugegeben und gevortext. Nach einer Inkubation bei -20°C für 30 min erfolgt die Pelletierung der Proteine bei 10000g und 4°C für 5 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Nach lösen der Proteine im gewünschten Puffer können diese weiterverwendet werden.

4.6. Physiologische Experimente

4.6.1. Fluorometrie

Mittels des portablen Fluorometers PAM-2000 (*Pulse-Amplitude-Modifier*, Walz-Effeltrich, Deutschland) ist es möglich Photosynthese-Parameter auf Basis der Chlorophyll-Fluoreszenz zu bestimmen. Hierbei wird nach einem Lichtpuls die Fluoreszenz des Photosystems II bestimmt, welche Einsicht in den Elektronentransport

durch den Plastoquinon-pool liefert. Der wichtigste daraus errechnete Wert ist die photosynthetische Leistung Y (*photosynthetic yield*), welche wie folgt definiert ist:

$$Y = (F_m - F_t) / F_m$$

Dabei stellt F_m die maximale Fluoreszenzleistung eines lichtadaptierten Blattes und F_t die gemessene Fluoreszenz zum Zeitpunkt t dar.

4.6.2. Proteomik an Chloroplasten envelopes

Die Proteomik an isolierten Chloroplasten envelopes wurde in Kooperation mit der AG Weckwerth (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam) durchgeführt.

Zur Vorreinigung der Chloroplasten envelopes wird sowohl die Wildtyp-Probe als auch die PEX10 Δ Zn-Probe zuerst über SDS-PAGE gereinigt und „gestreckt“. Nach vollendetem Gellauf werden die Gelbanen der beiden Proben ausgeschnitten und in je 8 gleiche Teile zerschnitten und in je ein Reaktionsgefäß überführt.

Im Folgenden werden die Gelstücke für 10 min in mQ unter Schütteln gewaschen. Nach Verwerfen der Flüssigkeit schütteln die Gelstücke für 10 min in 0,1 M NH₄HCO₃. Es wird das gleiche Volumen an Acetonitril zugegeben und erneut für 10 min geschüttelt. Die Flüssigkeit wird abgenommen und verworfen. Sind die Gelstücke noch nicht vollständig entfärbt, so wird erneut mit NH₄HCO₃ und Acetonitril gewaschen. Diese Prozedur wird wiederholt, bis die Gelstücke vollständig entfärbt sind.

Die Gelstücke werden an der Speedvac bis zur Trockene einrotiert und im Anschluss mit Verdaupuffer versehen, bis sie gut bedeckt sind. Nach einer halben Stunde Inkubation bei RT wird die Flüssigkeit abgenommen und verworfen. Die Gelstücke werden mit Verdaupuffer ohne Trypsin überschichtet und über Nacht bei 37°C langsam invertiert. Nach der Zugabe von 40 μ l 5% Ameisensäure (v/v) werden die Proben 5 min geschüttelt und die Flüssigkeit wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke werden für 45 min bei RT mit 200 μ l 1% Ameisensäure (v/v), 5% Acetonitril (v/v) unter Schütteln inkubiert und der daraus resultierende Überstand wird mit dem vorhergehenden der jeweiligen Probe vereint. Im Anschluss werden die Gelstücke für 45 min bei RT mit 200 μ l 1% Ameisensäure (v/v), 50% Acetonitril (v/v) unter Schütteln inkubiert und der daraus resultierende Überstand wird mit den anderen jeweiligen Probe vereint. Schließlich

werden die Gelstücke für 45 min bei RT mit 200µl 1% Ameisensäure (v/v), 90% Acetonitril (v/v) unter Schütteln inkubiert und der daraus resultierende Überstand wird mit den anderen jeweiligen Probe vereint. Die Gelstücke werden verworfen, die Flüssigkeit wird einrotiert und das Pellet bis zur Vermessung bei -20°C gelagert.

Die Pellets werden in 0,1% Ameisensäure (v/v), 20% Acetonitril (v/v) gelöst und massenspektrometrisch in einer GC-TOF-MS-Apparatur (Gaschromatographie-time-of-flight-Massenspektrometer) vermessen. Die so erhaltenen Chromatogramme wurden mittels der LECO®ChromaTOF™ Software und der Golmer Spektrenbibliothek GMD@CSB.DB abgeglichen und aus den Daten die in den Proben enthaltenden Proteine ermittelt.

Verdaupuffer: 25 mM NH₄HCO₃
 10% Acetonitril (v/v)
 5 mM CaCl₂
 12,5 ng/µl Trypsin (Roche)

4.7. Mikroskopie

4.7.1. Confocale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Pflanzenmaterial zur Betrachtung am Confocalen Laserscanning-Mikroskop (Fluoview FV 1000, Olympus, Japan) wird sowohl auf Erde als auch auf MS-Platten angezogen. Die zu betrachtenden Pflanzen oder Pflanzenteile werden sofort auf einen vorbereiteten Objektträger mit MS-Medium gelegt und mit einem Deckglas versehen. Dieses wird nicht zu fest angedrückt, da sonst das Präparat zerdrückt wird. Die Auswahl des zu betrachtenden Bereichs wird unter Durchlicht entschieden.

Die Fluoreszenzaufnahmen werden in Dunkelheit gemacht, für das Flurochrom GFP wird mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm (6-7,5% Laserstärke und eine Lichtintensität zwischen 390 und 490 hv) angeregt, detektiert wird im Bereich von 500 nm bis 510 nm. Die Excitation des MitoTracker® Orange erfolgt bei einer Wellenlänge von 561 nm (10,5% Laserstärke und eine Lichtintensität zwischen 440 und 490 hv), detektiert wird im Bereich von 570 nm bis 598 nm. Die Autofluoreszenz von Chlorophyll ist nach einer Anregung bei 488 nm (6-7,5% Laserstärke und eine Lichtintensität mit 440 hv) bei 592

nm bis 630 nm zu detektieren. Die Rauschunterdrückung wird zwischen 20% und 50% gehalten, die Durchlichtstärke muss der Objektdicke angepasst werden.

Verwendet wurden die Objektive 10x (UPLFLN 10x, NA: 0,30), 40x (PLABPO 40x, NA: 0,90) und 60x (UPLSAPO 60x W, NA: 1,20).

4.7.2. Elektronenmikroskopie

Die Proben, Kotyledonen und Blätter, werden unter dem Binokular mit einer neuen Rasierklinge in Cacodylat-Puffer mit Fixans in etwa 1x1 mm große Stücke geschnitten. Die Proben werden 30 min bis 2 h auf Eis inkubiert, um eine vollständige Infiltration mit dem Fixans und den Erhalt der Enzymaktivität der Katalase für die DAB-Färbung zu gewährleisten. In der folgenden Stunde wird viermal mit Cacodylat-Puffer gewaschen (auf Eis) und anschließend bei RT für 2 h mit 2% DAB in Cacodylat-Puffer inkubiert. Nach einer Inkubation über Nacht in Cacodylat-Puffer mit 2% DAB und 0,03% H₂O₂ wird die Probe für zweimal 15 min und einmal 30 min in Cacodylat-Puffer gewaschen. Es folgt eine Behandlung mit 1% OsO₂ in Cacodylat-Puffer für 160 min und ein anschließender Waschschrift für 30 min in Cacodylat-Puffer. Im Anschluss wird mit ddH₂O für 30 min und zweimal für 15 min gewaschen.

Entwässert werden die Proben in 10% Aceton (35 min), 20% Aceton (über Nacht), 20% Aceton, 1% UrAc (35 min), 40% Aceton (30 min), 60% Aceton (30 min), 80% Aceton (35 min) und 100% Aceton für insgesamt 2 h mit regelmäßigem Acetontausch.

Eingebettet werden die Proben in einem 1:1 Gemisch aus Spurr's` niedrigviskosem Harz und Aceton über Nacht. Es folgt ein Inkubationsschritt mit einem Harz/Acetonverhältniss von 2:1 für 2 h und anschließende eine Inkubation im Harz für mindestens 4 h. Die Auspolymerisierung erfolgt bei 63°C für 12 h.

Cacodylat-Puffer: 2 mM MgCl₂
 75 mM Natriumcacodylat pH 7,0

Fixans: 2,5% Glutaraldehyd (v/v)

4.8. Klonierungsstrategien

4.8.1. PEX10-T7-6xHis-Tag in *E. coli* / *A. thaliana*

Ziel dieser Klonierung war es, PEX10 mit einem T7- und einem 6xHis-Tag für die Expression sowohl in *E. coli* als auch in *A. thaliana* zu versehen. Zur Amplifikation der PEX10-cDNA werden die Primer *PEX10 sense bin* und *PEX10 asense bin* verwendet (siehe *Oligonukleotide*). Die amapifizierte PEX10-cDNA wird mittels der Restriktionsschnittstellen BamHI und SacI in das Plasmid pET28a (Novagen) ligiert. Dieses Plasmid trägt N-terminal vor der MCS (*multible cloning site*) sowohl den T7- und 6xHis-Tag und ermöglicht eine Überexpression von PEX10-T7-6xHis-Tag in *E. coli*. Als Überexpressionsstamm dient Rosetta 2 (DE3) (Novagen).

Zur Expression in *A. thaliana* wird PEX10-T7-6xHis-Tag mittels Restriktionsverdau (NcoI/PmlI) aus pET28a ausgeschnitten und in das NcoI/PmlI-verdaute binäre Plasmid pCAMBIA1301 ligiert. Hierbei wird in der T-DNA-Region von pCAMBIA1301 das GUS-Reporter gen durch PEX10-T7-6xHis-Tag ersetzt.

Im Folgenden sind die cDNA von PEX10-T7-6xHis-Tag und dessen *in silico*-Transkript, pET28a mit MCS und pCAMBIA1301 mit T-DNA-Region aufgelistet:

cDNA von PEX10-T7-6xHis-Tag (1248 bp):

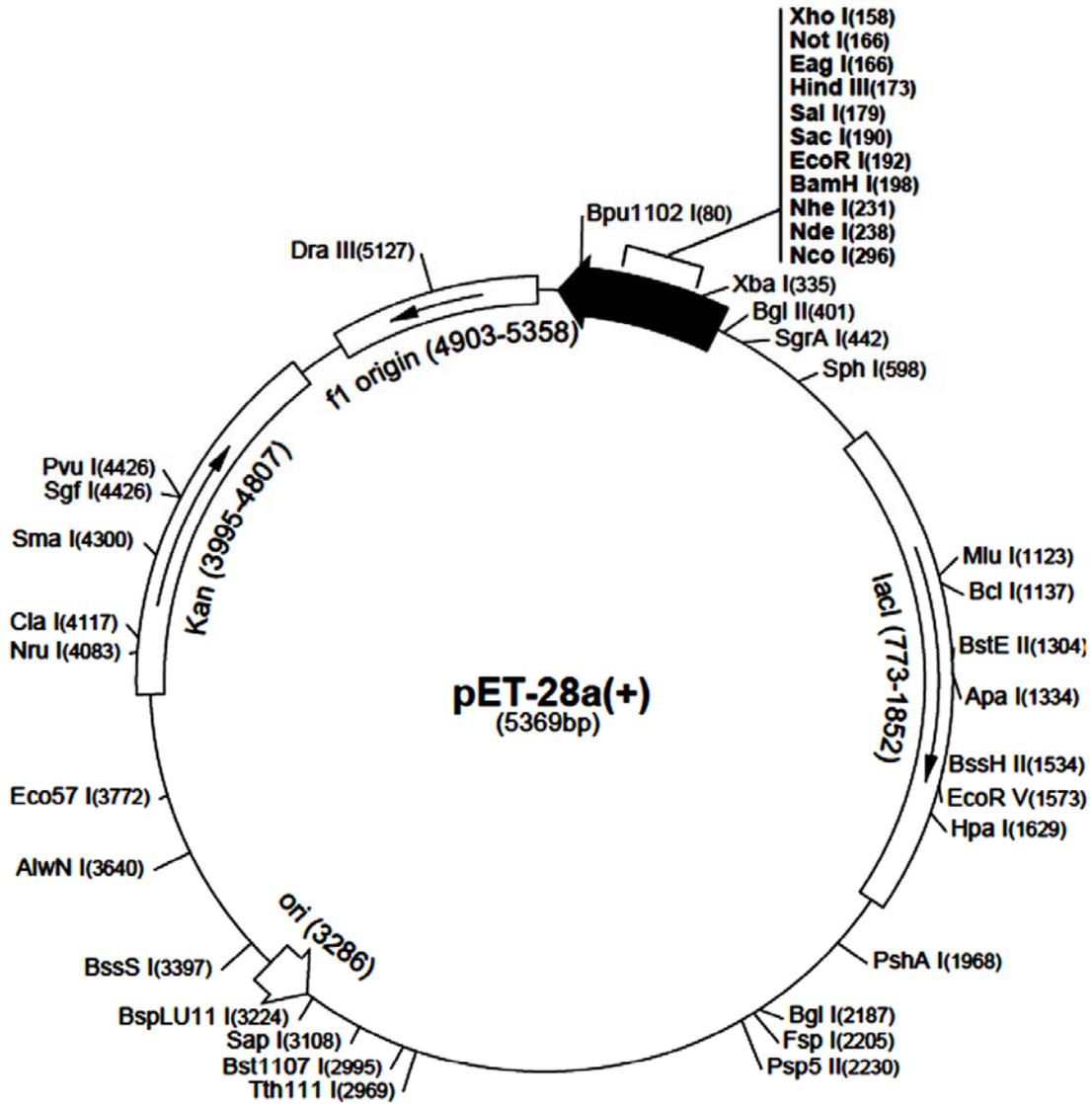
```
atgggcagcagc catcatcatcatcatcac agcagcggcctggtgccgcgcccagccat atggctagcatg
actggtggacagcaaatgggtcgcggatccatgaggcttaatggggattcgggtcgggtcaggatgaacc
ggttcgagcgggtttcacggcgaatcagacgattcccgttagcagctcagccggagattatgagagctgct
gagaaagacgatcaatacgttctttcatccacgaagcttgccgcgatgccttccgacaccttttcggtaca
agaatcgctcttgcttaccagaaggagatgaagctacttggacagatgctttactatgttcttacgacaggt
tcagggcaacaaactttaggagaggaatattgtgacattatacaggttgcagggccttatggactctctct
acaccagctagacgtgctttgttcataattgtaccagaccgagttccatatacgcagagagaattagcact
cgagctgctacgcaagcagtcacctttgatgagtctgatgagtttttggatagtcatatccactcacca
agaatgatagatcttccatcttcatctcaagttgaaacttcaacttctgtagtatctaggttaaacgataga
cttatgagatcgtggcaccgagctattcagcgatggcctgtggttcttctgttgcccggaagtcttaciaa
ctggttttgcggtgccaatctgatgctcttctactttgaagggtttttattatcatatacgaacgtgcatcc
ggggttcggttatgttttcataggaaagcaactgaatcagagacctagataccaaattcttgggggttttctt
ctaatacaattgtgcatccttgctgctgagggccttgctgcggagtaatttgcacatctactagctccatt
cagcaggcttctataggatcttatcaaaccttcaggagggagaggtttacctgttttaaatgaagaggggaat
ttgataacttcggaagctgaaaagggaaactggtctacctccgattcaacttcaacggaggcagtagggaaa
tgcactctctgcttaagcaccgctcagcaccacaacggccactccttgtggtcatgtgtttgttgagctgc
attatggaatggtgcaacgagaagcaagaatgccctctttgtcgaacgcccaataccattcaagtttggtt
tgtttgatcattctgatttttag
```

Proteinsequenz von PEX10-T7-6xHis-Tag (46158 Da):

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMRLNGDSGPGQDEPGSSGFHGGIRRFPLAAQPEIMRAA
EKDDQYASFIHEACRDAFRHLFGTRIALAYQKEMKLLGQMLYYVLTGSGQQTGEEYCDIIQVAGPYGLSP
TPARRALFILYQTAVPYIAERISTRATQAVTFDESDEFFGDSHIHSPRMIDLPSSSQVETSTSVVSRNLDR
LMRSWHRAIQRWPVVLVAREVLQVLRANLMLFYFEGFYHISKRASGVRYVFIGKQLNQRPRYQILGVFL
LIQLCILAAEGLRRSNLSSITSSIQQASIGSYQTSGGRGLPVLNEEGLITSEAEKGNWSTSDSTSTEAVGK
CTLCLSTRQHPTATPCGHVFCWSCIMEWCNEKQECPLCRTPNTHSSLVCLYHSDF-

Farbcode-Erklärung: 6xHis-Tag, T7-Tag, PEX10

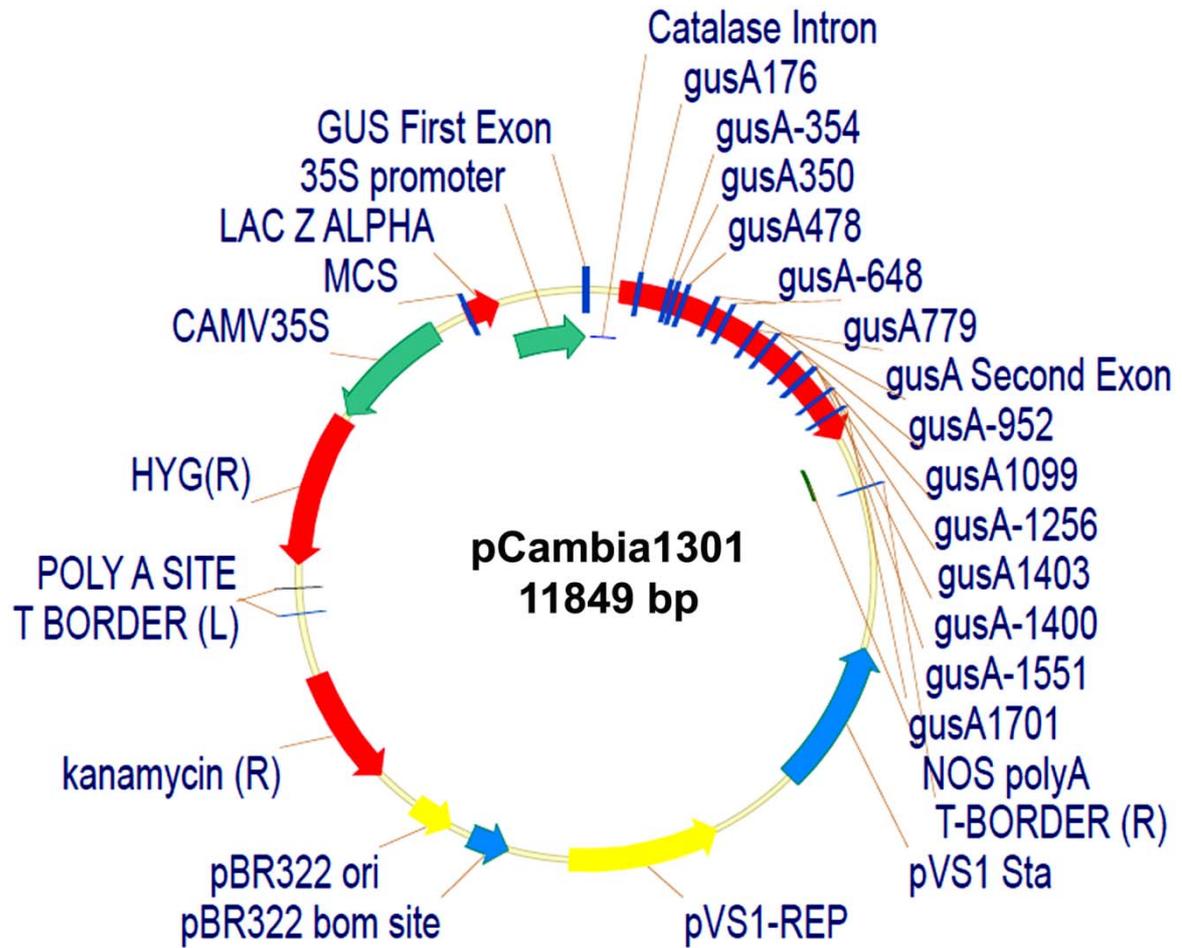
pET28a mit MCS:



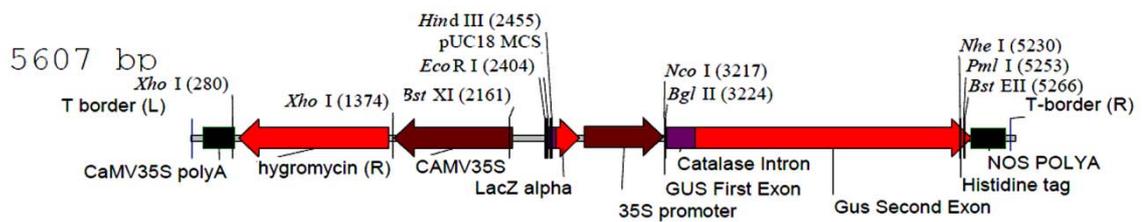
MCS pET-28a(+)



pCambia1301 mit T-DNA-Region:



T-DNA-Region pCambia1301



4.8.2. AtCP1-T7-6xHis-Tag

Zur Überexpression in *E. coli* wurde die cDNA von AtCP1 mit den Primern *Sense T7 pET28* und *Antisense T7 pET28* (siehe *Oligonukleotide*) amplifiziert und mittels BamHI/XhoI-Verdau in pET28a kloniert. Als Überexpressionsstamm dient Rosetta 2 (DE3) (Novagen).

Es ist die cDNA- und Protein-Sequenz von AtCP1 aufgelistet. Die Vektorkarte mit MCS von pET28a ist im vorangehenden Abschnitt zu finden.

cDNA von AtCP1-T7-6xHis-Tag (585 bp):

```
atgggcagcagc catcatcatcatcatca agcagcggcctggtgccgcgcccagccat atggc
tagcatgactggtggacagcaaatgggt cgcggatcc atgtgtccttctggtagaatcgcgattc
cgataaccaccaccggaatccaaatttcgaccagctttcgaaatcatcgacacagatcacgac
ggtaaaatcagcagcgcgatctccgtgcattctacgccgaatccctccggtgaaaacaacga
cgagacgatgatcggaacgatgatcagtagcggacgcgaacaaagacggattcgttgagttcg
atgaattcgagaaagtctagaaaacgacgccgtttctagatctggtaacggaggagacgatgga
ttgatgaaagatgtgtttaaggtgatggataaagacggagatgggagactgagttacggagatct
gaagagttatatggattcggctggttttagctgtaaccgacgatgaaatcaaatctatgattcgat
tagccggtggtgatttaaacgacggcgtttcgttcgacgggtctgcttaagatctttgggtgt tga
```

Proteinsequenz von AtCP1-T7-6xHis-Tag (20755 Da):

```
MGSS HHHHHHSSGLVPRGSH MASMTGGQOMGRGS MCPSGRIAIPIITTTANPNFRPAFEIIDTDHD
GKISSDDLRAFYAGIPSGENNDETMIGTMSVADANKDGFVEFDEFEKVLETPFSRSGNGGDDG
LMKDVFVKMDKDGRLSYGDLKSYMDSAGLAVTDDEIKSMIRLAGGDLNDGVSFDGLLKI FGC-
```

Farbcode-Erklärung: **6xHis-Tag**, **T7-Tag**, **AtCP1**

4.8.3. PEX10 N- + C-Terminus

Der PEX10 N- + C-Terminus wurden getrennt in das Plasmid pEZX-CL kloniert. Hierfür wird der N-Terminus von PEX10 mit den Primern *nc-nterm-s* und *nc-nterm-as* amplifiziert und nach Restriktionsverdau EcoRI/KpnI in das Plasmid pEZX-CL kloniert. Der C-Terminus von PEX10 wird mit den Primern *nc-cterm-s* und *nc-cterm-as* amplifiziert und nach Restriktionsverdau BamHI/XbaI in das Plasmid pEZX-CL kloniert.

Im folgenden ist die cDNA- und Protein-Sequenz von PEX10 N- + C-Terminus aufgelistet:

cDNA von PEX10 N- + C-Terminus (975 bp)

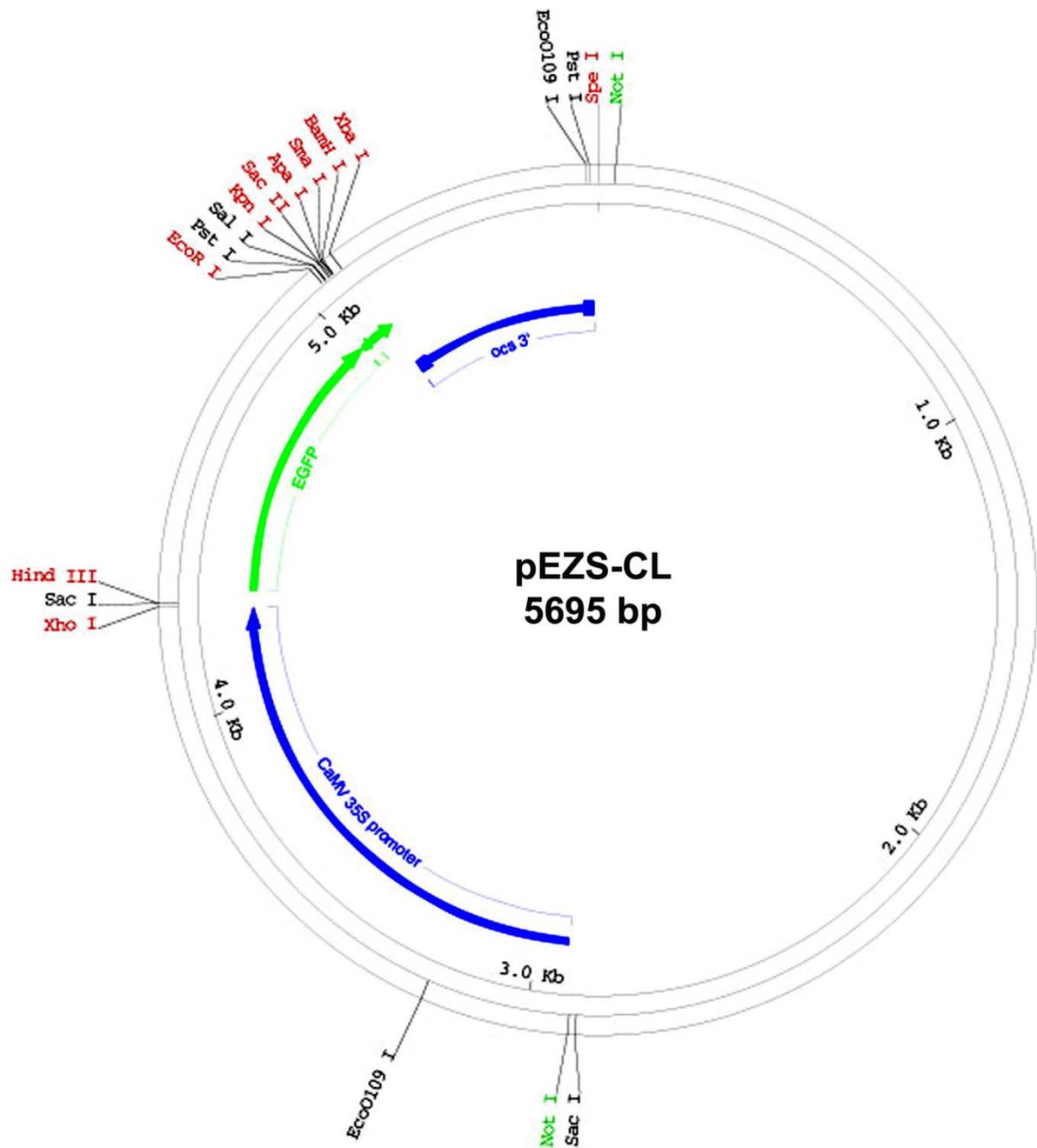
```
atgaggcttaatggggattcgggtccgggtcaggatgaacccggttcgagcgggtttcacggcggaatcaga
cgattcccgtagcagctcagccggagattatgagagctgctgagaaagacgatcaatacgttctttcacc
cacgaagcttgcccgatgccttccgacaccttttcgggtacaagaatcgctcttgcttaccagaaggagatg
aagctacttggacagatgctttactatgttcttacgacaggttcagggcaacaaactttaggagaggaatat
tgtgacattatacaggttgcagggccttatggactctctcctacaccagctagacgtgctttgttcatttg
taccagaccgcagttccatataatcgagagagaattagcactcgagctgctacgcaagcagtcaccttggat
gagtctgatgagtttttgggtgatagtcatatccactcaccagaagaatgatagatcttccatcttccatcaca
gttgaaacttcaacttctgtagatctaggttaaaccgatagacttatgagatcgtggcaccgagctattcag
cgatggcctgtggttcttctgttggccgcGGTACCGCGGGCCCGGGATCCcgtcggagtaatttgcattct
atcactagctccattcagcaggcttctataggatcttatcaaaacttcaggagggagaggtttacctgtttta
aatgaagaggggaatttgataacttcggaagctgaaaagggaaactggctctacctccgattcaacttcaacg
gaggcagtagggaaatgcactctctgcttaagcaccgcgcagcaccacaacggccactccttgtggatcatgtg
tttggttggagctgcattatggaatggtgcaacgagaagcaagaatgccctcttggtcgaacgccaatacc
cattcaagtttggtttggtttggatcattctgatttttag
```

Proteinsequenz von PEX10 N- + C-Terminus (35665 Da):

```
MRLNGDSGPGQDEPGSSGFHGGIRRFPLAAQPEIMRAAEKDDQYASFIHEACRDAFRHLFGTRIALAYQKEM
KLLGQMLYYVLTGSGQQLGEEYCDIIQVAGPYGLSPTPARRALFILIYQTAVPYIAERISTRATQAVTFD
ESDEFFGDSHIHSPRIMIDLPSQQVETSTSVVSRNLNDRMLRSHWHRAIQRWPVLPVARGTAGPGSRRLSS
ITSSIQQASIGSYQTSGGRGLPVLNEEGNLIITSEAEKGNWSTSDSTSTEAVGKCTLCLSTRQHPTATPCGHV
FCWSCIMEWCNEKQECPLCRTPNTHSSSLVCLYHSDF-
```

Farbcode-Erklärung: PEX10 N- + C-Terminus

pCSZ-CL:



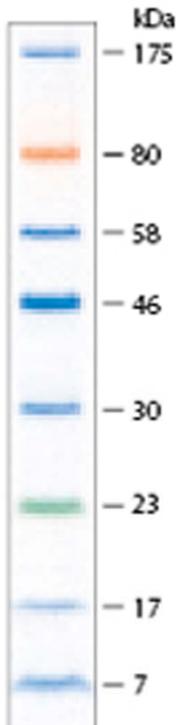
MCS von pCSZ-CL:

EcoRI
KpnI
SacII
ApaI
SmaI
BamHI
XbaI
 g|aattctgcagtcgacgggtac|cgc|gggccc|c|gg|gatccaccggggccgcgact|ctaga

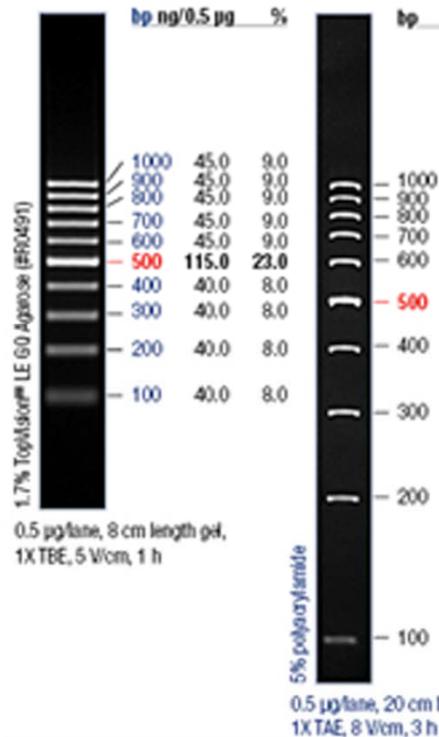
5. Anhang

5.1. Verwendete DNA- und Protein-Marker

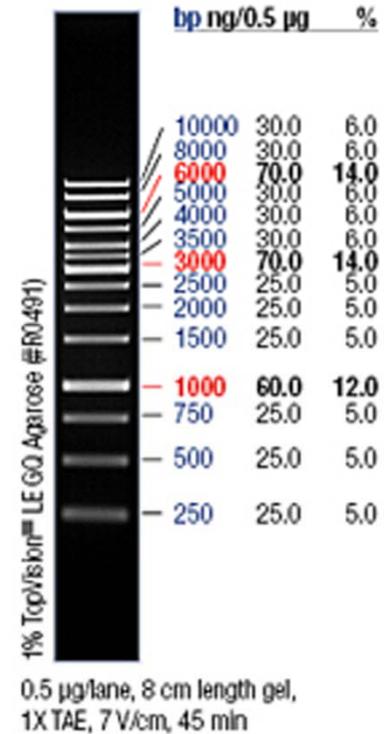
ColorPlus Prestained Protein Marker (NEB)



GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas)



GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas)



5.2. Glycerinstocks

Konstrukt	Plasmid	Vektor	Resistenz/en	Reporter
Plasmide				
	pET28a	DH5α	Kan	-
	pEZX-CL	DH5α	Amp	EGFP
	pCambia1301	DH5α	Kan, Hyg	GUS
Klone in DH5α				
PEX10-T7-6xHis	pET28a	DH5α	Kan	-
PEX10 N- + C-Terminus	pEZX-CL	DH5α	Amp	EGFP
ATCP1-T7-6xHis	RAFL4	DH5α	Amp	-

Überexpressionsklone				
PEX10-T7-6xHis	pET28a	Rosetta 2 (DE3)	Kan, Chlor	-
ATCP1-T7-6xHis	pET28a	Rosetta 2 (DE3)	Kan, Chlor	-
Klone in binären Vektoren				
PEX10-T7-6xHis	pCambia1301	DH5 α	Kan, Hyg	-
PEX10-T7-6xHis	pCambia1301	<i>A. thumefaciens</i>	Kan, Hyg	-

Tabelle 9: Lister der im Zuge dieser Arbeit angelegten Glycerinkulturen. Antibiotika: Amp= Ampecilin (50 $\mu\text{g/ml}$), Chlor= Chloramphenikol (34 $\mu\text{g/ml}$), Hyg= Hygromycin (in Pflanze, 100 $\mu\text{g/ml}$), Kan= Kanamycin (25 $\mu\text{g/ml}$).

6. Literaturverzeichnis

- Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwächter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W, Kunau W-H** (2003) Pex8p: An Intraperoxisomal Organizer of the Peroxisomal Import Machinery. *Molecular Cell* **11**: 635-646
- Anders N, Nielsen M, Keicher J, Stierhof YD, Furutani M, Tasaka M, Skriver K, Jurgens G** (2008) Membrane association of the Arabidopsis ARF exchange factor GNOM involves interaction of conserved domains. *Plant Cell* **20**: 142-151
- Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, Eisenhaber F** (2001) Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci* **6**: 463-470
- Baker A, Graham IA, Holdsworth M, Smith SM, Theodoulou FL** (2006) Chewing the fat: beta-oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci* **11**: 124-132
- Barlow PN, Luisi B, Milner A, Elliott M, Everett R** (1994) Structure of the C3HC4 domain by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol* **237**: 201-211
- Beevers H** (1979) Microbodies in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **30**: 159-193
- Bergner U, Tanner W** (1981) Occurrence of several glycoproteins in glyoxysomal membranes of castor bean. *FEBS Lett* **131**: 68-72
- Birschmann I, Stroobants AK, van den Berg M, Schafer A, Rosenkranz K, Kunau WH, Tabak HF** (2003) Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol Biol Cell* **14**: 2226-2236
- Blum H, Beier H, Gross HJ** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Borden KL** (2000) RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* **295**: 1103-1112
- Borden KL, Freemont PS** (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 395-401
- Bräutigam A, Hofmann-Benning S, Weber APM** (2008) Running head: Comparative proteomics of C3 and C4 plastid envelopes. *Plant Physiology Preview* **10.1104**: 108.121012
- Bräutigam A, Shrestha RP, Whitten D, Wilkerson CG, Carr KM, Froehlich JE, Weber AP** (2008) Low-coverage massively parallel pyrosequencing of cDNAs enables proteomics in non-model species: comparison of a species-specific database generated by pyrosequencing with databases from related species for proteome analysis of pea chloroplast envelopes. *J Biotechnol* **136**: 44-53
- Breidenbach RW, Kahn A, Beevers H** (1968) Characterization of Glyoxysomes From Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* **43**: 705-713
- Brocard C, Hartig A** (2006) Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1565-1573
- Brown L-A, Baker A** (2008) Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (Review). *Molecular Membrane Biology* **25**: 363 - 375
- Camoses F, Bonekamp NA, Delille HK, Schrader M** (2009) Organelle dynamics and dysfunction: A closer link between peroxisomes and mitochondria. *J Inher Metab Dis* **32**: 163-180
- Carvalho AF, Pinto MP, Grou CP, Alencastre IS, Franssen M, Sa-Miranda C, Azevedo JE** (2007) Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J Biol Chem* **282**: 31267-31272
- Chang CC, Warren DS, Sacksteder KA, Gould SJ** (1999) PEX12 interacts with PEX5 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* **147**: 761-774

- Chapman KD, Trelease RN** (1991) Acquisition of membrane lipids by differentiating glyoxysomes: role of lipid bodies. *J Cell Biol* **115**: 995-1007
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC** (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**: 189-200
- Chen IP, Haehnel U, Altschmied L, Schubert I, Puchta H** (2003) The transcriptional response of Arabidopsis to genotoxic stress - a high-density colony array study (HDCA). *Plant J* **35**: 771-786
- Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE** (2007) E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 941-948
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743
- Cooper TG, Beevers H** (1969) Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J Biol Chem* **244**: 3514-3520
- Dalla Serra M, Menestrina G** (2003) Liposomes in the study of pore-forming toxins. *Methods Enzymol* **372**: 99-124
- 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
- De Bellis L, Nishimura M** (1991) Development of Enzymes of the Glyoxylate Cycle during Senescence of Pumpkin Cotyledons. *Plant Cell Physiol.* **32**: 555-561
- de Bellis L, Tsugeki R, Nishimura M** (1991) Glyoxylate Cycle Enzymes in Peroxisomes Isolated from Petals of Pumpkin (*Cucurbita* sp.) during Senescence. *Plant Cell Physiol.* **32**: 1227-1235
- De Duve C, Baudhuin P** (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**: 323-357
- DeFalco TA, Bender KW, Snedden WA** (2010) Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem J* **425**: 27-40
- Desai M, Hu J** (2008) Light induces peroxisome proliferation in *Arabidopsis* seedlings through the photoreceptor phytochrome A, the transcription factor HY5 HOMOLOG, and the peroxisomal protein PEROXIN11b. *Plant Physiol* **146**: 1117-1127
- Distel B** (1996) A Unified Nomenclature for Peroxisome Biogenesis Factors. *The Journal of Cell Biology* **135**: 1-3
- Donaldson RP** (1976) Membrane Lipid Metabolism in Germinating Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* **57**: 510-515
- Donaldson RP, Beevers H** (1977) Lipid Composition of Organelles from Germinating Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* **59**: 259-263
- Donaldson RP, Beevers H** (1978) Organelle membranes from germinating castor bean endosperm. I. A comparison of purified endoplasmic reticulum glyoxysomes and mitochondria. *Protoplasma*: 317-328
- Eckert JH, Erdmann R** (2003) Peroxisome biogenesis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **147**: 75-121
- Erdmann R, Blobel G** (1996) Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J Cell Biol* **135**: 111-121
- Erdmann R, Schliebs W** (2005) Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 738-742
- Erdmann R, Veenhuis M, Mertens D, Kunau WH** (1989) Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5419-5423
- Erdmann R, Wiebel FF, Flessau A, Rytka J, Beyer A, Frohlich KU, Kunau WH** (1991) PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* **64**: 499-510

- Fagarasanu A, Fagarasanu M, Rachubinski RA** (2007) Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 321-344
- Fan J, Quan S, Orth T, Awai C, Chory J, Hu J** (2005) The Arabidopsis PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. *Plant Physiol* **139**: 231-239
- Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ** (2004) PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **164**: 863-875
- Ferrando A, Farràs R, Jásik J, Schell J, Koncz C** (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *The Plant Journal* **22**: 553-560
- Flynn CR, Heinze M, Schumann U, Gietl C, Trelease RN** (2005) Compartmentalization of the plant peroxin, AtPex10p, within subdomain(s) of ER. *Plant Science* **168**: 635-652
- Footitt S, Slocombe SP, Lerner V, Kurup S, Wu Y, Larson T, Graham I, Baker A, Holdsworth M** (2002) Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *Embo J* **21**: 2912-2922
- Fransen M, Wylin T, Brees C, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP** (2001) Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol Cell Biol* **21**: 4413-4424
- Frederick SE, Newcomb EH** (1969) Microbody-Like Organelles in Leaf Cells. *Science* **163**: 1353-1355
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J** (1991) A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* **64**: 483-484
- Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, Browse J** (2004) Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**: 394-405
- Gatto GJ, Jr., Geisbrecht BV, Gould SJ, Berg JM** (2000) Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol* **7**: 1091-1095
- Ghaedi K, Honsho M, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y** (2000) PEX3 is the causal gene responsible for peroxisome membrane assembly-defective Zellweger syndrome of complementation group G. *Am J Hum Genet* **67**: 976-981
- Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y, Fujiki Y** (2000) The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**: 2085-2102
- Gietl C, Hock B** (1982) Organelle-Bound Malate Dehydrogenase Isoenzymes Are Synthesized as Higher Molecular Weight Precursors. *Plant Physiol* **70**: 483-487
- Gietl C, Seidel C, Svendsen I** (1996) Plant glyoxysomal but not mitochondrial malate dehydrogenase can fold without chaperone assistance. *Biochim Biophys Acta* **1274**: 48-58
- Glover JR, Andrews DW, Rachubinski RA** (1994) *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10541-10545
- Gonzalez E, Beevers H** (1976) Role of the Endoplasmic Reticulum in Glyoxysome Formation in Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* **57**: 406-409
- Gould SJ, Kalish JE, Morrell JC, Bjorkman J, Urquhart AJ, Crane DI** (1996) Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTs1 receptor. *J Cell Biol* **135**: 85-95
- Gouveia AM, Reguenga C, Oliveira ME, Sa-Miranda C, Azevedo JE** (2000) Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein. *J Biol Chem* **275**: 32444-32451
- Graham IA** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 115-142

- Grou CP, Carvalho AF, Pinto MP, Wiese S, Piechura H, Meyer HE, Warscheid B, Sa-Miranda C, Azevedo JE** (2008) Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J Biol Chem* **283**: 14190-14197
- Gruber PJ, Trelease RN, Becker WM, Newcomb EH** (1970) A correlative ultrastructural and enzymatic study of cotyledonary microbodies following germination of fatstoring seeds. *Planta*: 269-288
- Hadden DA, Phillipson BA, Johnston KA, Brown LA, Manfield IW, El-Shami M, Sparkes IA, Baker A** (2006) Arabidopsis PEX19 is a dimeric protein that binds the peroxin PEX10. *Mol Membr Biol* **23**: 325-336
- Halbach A, Rucktaschel R, Rottensteiner H, Erdmann R** (2009) The N-domain of Pex22p can functionally replace the Pex3p N-domain in targeting and peroxisome formation. *J Biol Chem* **284**: 3906-3916
- Halliwell B** (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* **141**: 312-322
- Hattori M, Sakaki Y** (1986) Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal Biochem* **152**: 232-238
- Hayashi M, Nito K, Takei-Hoshi R, Yagi M, Kondo M, Suenaga A, Yamaya T, Nishimura M** (2002) Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell Physiol* **43**: 1-11
- 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. *Embo J* **19**: 5701-5710
- Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Kato A, Mano S, De Bellis L, Hayashi-Ishimaru Y, Yamaguchi K, Hayashi H, Nishimura M** (2000) Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**: 295-304
- Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Nishimura M** (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of Arabidopsis have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell* **10**: 183-195
- Hayashi M, Yagi M, Nito K, Kamada T, Nishimura M** (2005) Differential contribution of two peroxisomal protein receptors to the maintenance of peroxisomal functions in Arabidopsis. *J Biol Chem* **280**: 14829-14835
- Helm M, Lück C, Prestele J, Hierl G, Huesgen PF, Frohlich T, Arnold GJ, Adamska I, Gorg A, Lottspeich F, Gietl C** (2007) Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11501-11506
- Hershko A, Ciechanover A** (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479
- Hettema EH, Girzalsky W, van Den Berg M, Erdmann R, Distel B** (2000) *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *Embo J* **19**: 223-233
- Hock B** (1969) Die Hemmung der Isocitratlyase bei Wassermelonenkeimlingen durch Weißlicht. *Planta* **85**: 340-350
- Hock B, Gietl C** (1982) Cell-free synthesis of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase: a comparison with the mitochondrial isoenzyme. *Ann N Y Acad Sci* **386**: 350-376
- Hoepfner D, Berg Mvd, Philippsen P, Tabak HF, Hettema EH** (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
- Hoepfner D, Schildknegt D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF** (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**: 85-95

- Honsho M, Hiroshige T, Fujiki Y** (2002) The membrane biogenesis peroxin Pex16p. Topogenesis and functional roles in peroxisomal membrane assembly. *J Biol Chem* **277**: 44513-44524
- Honsho M, Tamura S, Shimosawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y** (1998) Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet* **63**: 1622-1630
- 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
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD** (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **10**: 429-439
- Jang HJ, Pih KT, Kang SG, Lim JH, Jin JB, Piao HL, Hwang I** (1998) Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress. *Plant Mol Biol* **37**: 839-847
- Jansen GA, Wanders RJ** (2006) Alpha-oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1403-1412
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ** (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **164**: 57-67
- Kamada T, Nito K, Hayashi H, Mano S, Hayashi M, Nishimura M** (2003) Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **44**: 1275-1289
- Karnik SK, Trelease RN** (2007) Arabidopsis peroxin 16 trafficks through the ER and an intermediate compartment to pre-existing peroxisomes via overlapping molecular targeting signals. *J Exp Bot* **58**: 1677-1693
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W** (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**: 421-424
- Kiel JA, Emrich K, Meyer HE, Kunau WH** (2005) Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. *J Biol Chem* **280**: 1921-1930
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U, Lippincott-Schwartz J** (2006) The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol* **173**: 521-532
- Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J** (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**: 1071-1080
- Koch A, Schneider G, Luers GH, Schrader M** (2004) Peroxisome elongation and constriction but not fission can occur independently of dynamin-like protein 1. *J Cell Sci* **117**: 3995-4006
- Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M** (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **16**: 5077-5086
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**: 383-396
- Kornberg HL, Beevers H** (1957) The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Biochim Biophys Acta* **26**: 531-537
- Kosarev P, Mayer KF, Hardtke CS** (2002) Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the Arabidopsis genome. *Genome Biol* **3**: research0016.0011-research0016.0012

- Kragt A, Voorn-Brouwer T, van den Berg M, Distel B** (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells. *J Biol Chem* **280**: 7867-7874
- Kudielka RA, Theimer RR** (1983) Repression of glyoxysomal enzyme activities in anise (*Pimpinella anisum*) suspension cultures. *Plant sci. Lett.*: 245-252
- Kunau WH** (2005) Peroxisome biogenesis: end of the debate. *Curr Biol* **15**: R774-776
- Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM, Hartig A** (2006) A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1441-1452
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lazarow PB** (2006) The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1599-1604
- Lazarow PB, Fujiki Y** (1985) Biogenesis of Peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology* **1**: 489-530
- Leon S, Goodman JM, Subramani S** (2006) Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1552-1564
- Leon S, Zhang L, McDonald WH, Yates J, 3rd, Cregg JM, Subramani S** (2006) Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *J Cell Biol* **172**: 67-78
- Li X, Baumgart E, Dong GX, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Valle D, Smith KD, Gould SJ** (2002) PEX11alpha is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated peroxisome proliferation. *Mol Cell Biol* **22**: 8226-8240
- Li X, Gould SJ** (2003) The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J Biol Chem* **278**: 17012-17020
- Lin Y, Sun L, Nguyen LV, Rachubinski RA, Goodman HM** (1999) The Pex16p homolog SSE1 and storage organelle formation in *Arabidopsis* seeds. *Science* **284**: 328-330
- Lingard MJ, Trelease RN** (2006) Five *Arabidopsis* peroxin 11 homologs individually promote peroxisome elongation, duplication or aggregation. *J Cell Sci* **119**: 1961-1972
- Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS** (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2112-2116
- Ma C, Subramani S** (2009) Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *IUBMB Life* **61**: 713-722
- Mano S, Nakamori C, Hayashi M, Kato A, Kondo M, Nishimura M** (2002) Distribution and characterization of peroxisomes in *Arabidopsis* by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant Cell Physiol* **43**: 331-341
- Mano S, Nakamori C, Kondo M, Hayashi H, Nishimura M** (2004) An *Arabidopsis* dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division. *The Plant Journal* **38**: 487-498
- Mano S, Nakamori C, Nito K, Kondo M, Nishimura M** (2006) The *Arabidopsis* pex12 and pex13 mutants are defective in both PTS1- and PTS2-dependent protein transport to peroxisomes. *Plant J* **47**: 604-618
- Martínez-García JF, Monte E, Quail PH** (1999) A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *The Plant Journal* **20**: 251-257

- Marzioch M, Erdmann R, Veenhuis M, Kunau WH** (1994) PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *Embo J* **13**: 4908-4918
- Matsumoto N, Tamura S, Fujiki Y** (2003) The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* **5**: 454-460
- 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. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. *J Biol Chem* **275**: 21715-21721
- Matsuzaki T, Fujiki Y** (2008) The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *J Cell Biol* **183**: 1275-1286
- Matsuzono Y, Kinoshita N, Tamura S, Shimozawa N, Hamasaki M, Ghaedi K, Wanders RJ, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y** (1999) Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2116-2121
- McNew JA, Goodman JM** (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* **127**: 1245-1257
- Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J** (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* **305**: 1747-1752
- Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V** (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1463-1477
- Miyata N, Fujiki Y** (2005) Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol Cell Biol* **25**: 10822-10832
- Mollenhauer HH, Morre DJ** (1966) Tubular connections between dictyosomes and forming secretory vesicles in plant Golgi apparatus. *J Cell Biol* **29**: 373-376
- Moore DT, Berger BW, DeGrado WF** (2008) Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure* **16**: 991-1001
- Motley AM, Hettema EH, Ketting R, Plasterk R, Tabak HF** (2000) *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Rep* **1**: 40-46
- Mullen RT, Trelease RN** (2006) The ER-peroxisome connection in plants: Development of the "ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication" model for plant peroxisome biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1655-1668
- Muller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wosten HA, van der Voort LH, Smaal EB, Verkleij AJ** (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Embo J* **10**: 489-495
- Muntau AC, Roscher AA, Kunau WH, Dodt G** (2003) The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. *Eur J Cell Biol* **82**: 333-342
- Murphy DJ** (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog Lipid Res* **32**: 247-280
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4325
- 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.* **81**: 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

- Nito K, Kamigaki A, Kondo M, Hayashi M, Nishimura M** (2007) Functional classification of Arabidopsis peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants. *Plant Cell Physiol* **48**: 763-774
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplun N, Jones J, He SY** (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**: 220-223
- Okumoto K, Abe I, Fujiki Y** (2000) Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *J Biol Chem* **275**: 25700-25710
- Orth T, Reumann S, Zhang X, Fan J, Wenzel D, Quan S, Hu J** (2007) The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 333-350
- 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. *J Biol Chem* **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. *Mol Cell Biol* **22**: 1639-1655
- Otzen M, Wang D, Lunenborg MG, van der Klei IJ** (2005) Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *J Cell Sci* **118**: 3409-3418
- Park S, Isaacson R, Kim HT, Silver PA, Wagner G** (2005) Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites. *Structure* **13**: 995-1005
- Penfield S, Pinfield-Wells HM, Graham IA** (2007) Lipid metabolism and seed dormancy, Vol 27. Blackwell, Oxford
- Piao HL, Lim JH, Kim SJ, Cheong GW, Hwang I** (2001) Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant J* **27**: 305-314
- Pires JR, Hong X, Brockmann C, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J, Oschkinat H, Erdmann R** (2003) The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p. *J Mol Biol* **326**: 1427-1435
- Platta HW, El Magraoui F, Baumer BE, Schlee D, Girzalsky W, Erdmann R** (2009) Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Mol Cell Biol* **29**: 5505-5516
- Platta HW, El Magraoui F, Schlee D, Grunau S, Girzalsky W, Erdmann R** (2007) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J Cell Biol* **177**: 197-204
- Platta HW, Erdmann R** (2007) The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett* **581**: 2811-2819
- Platta HW, Girzalsky W, Erdmann R** (2004) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem J* **384**: 37-45
- Platta HW, Grunau S, Rosenkranz K, Girzalsky W, Erdmann R** (2005) Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* **7**: 817-822
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK** (2006) Peroxisomal beta-oxidation-a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1413-1426
- Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM** (2005) Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell* **17**: 2037-2048

- Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM** (2007) Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in beta-oxidation but not in the glyoxylate cycle. *Plant J* **50**: 381-390
- Prestele J** (2009) Funktionelle Charakterisierung der pflanzlichen Zink RING-Finger Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12 in Arabidopsis thaliana. Doktorarbeit. Technische Universität München, Freising
- Purdue PE, Lazarow PB** (2001) Pex18p is constitutively degraded during peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* **276**: 47684-47689
- Purdue PE, Yang X, Lazarow PB** (1998) Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* **143**: 1859-1869
- Raasi S, Wolf DH** (2007) Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 780-791
- Raiborg C, Stenmark H** (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**: 445-452
- Rayapuram N, Subramani S** (2006) The importomer--a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1613-1619
- Reguenga C, Oliveira MEM, Gouveia AMM, Sa-Miranda C, Azevedo JE** (2001) Characterization of the Mammalian Peroxisomal Import Machinery. Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly. *J. Biol. Chem.* **276**: 29935-29942
- Rehling P, Skaletz-Rorowski A, Girzalsky W, Voorn-Brouwer T, Franse MM, Distel B, Veenhuis M, Kunau WH, Erdmann R** (2000) Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor pex5p. *J Biol Chem* **275**: 3593-3602
- Reumann S** (2004) Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol* **135**: 783-800
- Reumann S, Ma C, Lemke S, Babujee L** (2004) AraPeroX. A Database of Putative Arabidopsis Proteins from Plant Peroxisomes. *Plant Physiol.* **136**: 2587-2608
- Reumann S, Weber AP** (2006) Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1496-1510
- Rhodin J** (1954) Correlation of ultrastructural organisation and funktion in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Stockholm University, Stockholm
- Rottensteiner H, Kramer A, Lorenzen S, Stein K, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Erdmann R** (2004) Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol Biol Cell* **15**: 3406-3417
- Rottensteiner H, Stein K, Sonnenhol E, Erdmann R** (2003) Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* **14**: 4316-4328
- Rucktaschel R, Thoms S, Sidorovitch V, Halbach A, Pechlivanis M, Volkmer R, Alexandrov K, Kuhlmann J, Rottensteiner H, Erdmann R** (2009) Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* **284**: 20885-20896
- Russell L, Larner V, Kurup S, Bougourd S, Holdsworth M** (2000) The Arabidopsis COMATOSE locus regulates germination potential. *Development* **127**: 3759-3767
- Sacksteder KA, Jones JM, South ST, Li X, Liu Y, Gould SJ** (2000) PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* **148**: 931-944

- Saidowsky J, Dodt G, Kirchberg K, Wegner A, Nastainczyk W, Kunau WH, Schliebs W** (2001) The di-aromatic pentapeptide repeats of the human peroxisome import receptor PEX5 are separate high affinity binding sites for the peroxisomal membrane protein PEX14. *J Biol Chem* **276**: 34524-34529
- Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nystrom T, Osiewacz HD** (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol* **9**: 99-105
- Schopfer P, Bajaracharya D, Falk H, Thien W** (1975) Phytochromgesteuerte Entwicklung von Zellorganellen (Plastiden, Microbodies, Mitochondrien). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*: 245-268
- Schrader M, Fahimi HD** (2006) Growth and division of peroxisomes. *Int Rev Cytol* **255**: 237-290
- Schrader M, Fahimi HD** (2008) The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* **129**: 421-440
- Schrader M, Reuber BE, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Obie C, Stroh TA, Valle D, Schroer TA, Gould SJ** (1998) Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* **273**: 29607-29614
- Schrader M, Yoon Y** (2007) Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays* **29**: 1105-1114
- Schumann U, Prestele J, O'Geen H, Brueggeman R, Wanner G, Gietl C** (2007) Requirement of the C3HC4 zinc RING finger of the Arabidopsis PEX10 for photorespiration and leaf peroxisome contact with chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1069-1074
- Schumann U, Wanner G, Veenhuis M, Schmid M, Gietl C** (2003) AthPEX10, a nuclear gene essential for peroxisome and storage organelle formation during Arabidopsis embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9626-9631
- Sheahan MB, McCurdy DW, Rose RJ** (2005) Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *Plant J* **44**: 744-755
- Shibata H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H** (2004) Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins. *J Biol Chem* **279**: 38486-38494
- Shimomura O, Johnson FH** (1975) Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 1546-1549
- Shiozawa K, Maita N, Tomii K, Seto A, Goda N, Akiyama Y, Shimizu T, Shirakawa M, Hiroaki H** (2004) Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain. *J Biol Chem* **279**: 50060-50068
- 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. *Mol Biol Cell* **14**: 810-821
- Singh T, Hayashi M, Mano S, Arai Y, Goto S, Nishimura M** (2009) Molecular components required for the targeting of PEX7 to peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*
- Smith JJ, Rachubinski RA** (2001) A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **276**: 1618-1625
- Snyder WB, Koller A, Choy AJ, Subramani S** (2000) The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* **149**: 1171-1178
- Somerville CR, Ogren WL** (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2684-2687

- Somerville CR, Ogren WL** (1981) Photorespiration-deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana* Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity. *Plant Physiol* **67**: 666-671
- Soundararajan S, Jedd G, Li X, Ramos-Pamplona M, Chua NH, Naqvi NI** (2004) Woronin Body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during Nitrogen starvation stress. *Plant Cell* **16**: 1564-1574
- Sparkes IA, Baker A** (2002) Peroxisome biogenesis and protein import in plants, animals and yeasts: enigma and variations? (Review). *Mol Membr Biol* **19**: 171-185
- Sparkes IA, Brandizzi F, Slocombe SP, El-Shami M, Hawes C, Baker A** (2003) An *Arabidopsis* pex10 null mutant is embryo lethal, implicating peroxisomes in an essential role during plant embryogenesis. *Plant Physiol* **133**: 1809-1819
- Stanley WA, Filipp FV, Kursula P, Schuller N, Erdmann R, Schliebs W, Sattler M, Wilmanns M** (2006) Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p. *Mol Cell* **24**: 653-663
- Stanley WA, Wilmanns M** (2006) Dynamic architecture of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1592-1598
- Stone SL, Hauksdottir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J** (2005) Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**: 13-30
- Tam YY, Torres-Guzman JC, Vizeacoumar FJ, Smith JJ, Marelli M, Aitchison JD, Rachubinski RA** (2003) Pex11-related proteins in peroxisome dynamics: a role for the novel peroxin Pex27p in controlling peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 4089-4102
- Tanaka H, Kitakura S, De Rycke R, De Groot R, Friml J** (2009) Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking. *Curr Biol* **19**: 391-397
- Thoms S, Erdmann R** (2005) Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *Febs J* **272**: 5169-5181
- Titorenko VI, Mullen RT** (2006) Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J Cell Biol* **174**: 11-17
- Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H, Rachubinski RA** (2002) Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* **156**: 481-494
- Titorenko VI, Smith JJ, Szilard RK, Rachubinski RA** (1998) Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. *J Cell Biol* **142**: 403-420
- Titus D, Becker W** (1985) Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* **101**: 1288-1299
- Trelease RN, Becker WM, Gruber PJ, Newcomb EH** (1971) Microbodies (Glyoxysomes and Peroxisomes) in Cucumber Cotyledons: Correlative Biochemical and Ultrastructural Study in Light- and Dark-grown Seedlings. *Plant Physiol* **48**: 461-475
- Trelease RN, Lingard MJ** (2006) Participation of the plant ER in peroxisomal biogenesis. *Plant Cell Monographs*: 205-232
- Van Ael E, Fransen M** (2006) Targeting signals in peroxisomal membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1629-1638
- van den Bosch H, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM** (1992) Biochemistry of Peroxisomes. *Annual Review of Biochemistry* **61**: 157-197
- van der Klei I, Veenhuis M** (2002) Peroxisomes: flexible and dynamic organelles. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 500-505
- van der Klei IJ, Veenhuis M** (2006) PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1794-1800

- van der Zand A, Braakman I, Geuze HJ, Tabak HF** (2006) The return of the peroxisome. *J Cell Sci* **119**: 989-994
- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J** (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**: 169-170
- Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH, Harder W** (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**: 77-84
- Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, Aitchison JD, Rachubinski RA** (2004) Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal integral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**: 665-677
- Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Tam YY, Aitchison JD, Rachubinski RA** (2003) YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **161**: 321-332
- Wai SN, Lindmark B, Soderblom T, Takade A, Westermarck M, Oscarsson J, Jass J, Richter-Dahlfors A, Mizunoe Y, Uhlin BE** (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35
- Walling LL** (2006) Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 227-233
- Walton PA, Hill PE, Subramani S** (1995) Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* **6**: 675-683
- Wanders RJ** (2004) Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *Am J Med Genet A* **126A**: 355-375
- Wang D, Visser NV, Veenhuis M, van der Klei IJ** (2003) Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* **278**: 43340-43345
- Wanner G, Formanek H, Theimer RR** (1981) The Ontogeny of Lipid Bodies (Spherosomes) in Plant Cells. *Planta* **151**: 109-123
- Wanner G, Theimer RR** (1978) Membranous Appendices of Spherosomes (Oleosomes). *Planta* **140**: 163-169
- Wanner G, Vigil EL, Theimer RR** (1982) Ontogeny of microbodies (glyoxysomes) in cotyledons of dark-grown watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) seedlings. *Planta* **156**: 314-325
- Waterham HR, Titorenko VI, Haima P, Cregg JM, 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
- Waters MT, Langdale JA** (2009) The making of a chloroplast. *Embo J* **28**: 2861-2873
- White SR, Lauring B** (2007) AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* **8**: 1657-1667
- Williams C, van den Berg M, Geers E, Distel B** (2008) Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**: 620-624
- Woodward AW, Bartel B** (2005) The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Mol Biol Cell* **16**: 573-583
- Wu F** (1987) Localization of mitochondria in plant cells by vital staining with rhodamine 123. *Planta* **171**: 346-357
- Yang X, Purdue PE, Lazarow PB** (2001) Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *Eur J Cell Biol* **80**: 126-138
- Zhang JW, Hu J** (2009) Two small protein families, DYNAMIN-RELATED PROTEIN3 and FISSION1, are required for peroxisome fission in Arabidopsis. *The Plant Journal* **57**: 146-159

- Zhang JW, Lazarow PB** (1995) PEB1 (PAS7) in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a hydrophilic, intra-peroxisomal protein that is a member of the WD repeat family and is essential for the import of thiolase into peroxisomes. *J Cell Biol* **129**: 65-80
- Zhang X, Hu J** (2010) The Arabidopsis Chloroplast Division Protein DYNAMIN-RELATED PROTEIN5B Also Mediates Peroxisome Division. *Plant Cell*
- Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP** (2000) Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102**: 533-539

Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Christine Gietl für die Überlassung dieses faszinierenden Projektes, für die zielstrebigen Diskussionen und Betreuung der letzten Jahre, für die Unterstützung ihrer Doktoranden mit allen ihr zur Verfügung stehenden Mitteln und die Offenheit gegenüber anderen, welche zu vielen fruchtbaren Kooperationen und uns auf viele interessante Kongresse geführt hat. Ich möchte Ihr auch für die vielen Einladungen, sei es zum Essen oder zum Geburtstag, danken und besonders für die direkte, offene Art, mit der sie ihre Doktoranden behandelt, danke Christine.

Dem Ordinarius des Lehrstuhls für Botanik der TU-München Herrn Prof. Dr. Erwin Grill möchte ich für die anregenden Gespräche und Inspirationen danken, für die er sich trotz seines vollen Terminkalenders immer Zeit genommen hat. Ich verdanke ihm auch die Vermittlung des Stipendiums der Bayerische Forschungsstiftung, auch dafür möchte ich mich bedanken.

Der Bayerische Forschungsstiftung verdanke ich die Finanzierung des Großteils meiner Arbeit und die Gelder für meine zahlreichen Forschungsaufenthalte und Kongresse im In- und Ausland. Dafür möchte ich mich bedanken.

Bei Prof. Dr. R. Hückelhoven möchte ich mich für das freundliche Verfassen des Gutachtens bedanken und freue mich auf die kommende Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Klaus Lenzian verdient gleich zweifach meinen Dank, da er mir nicht nur mit seinem profunden botanischen Wissen immer zur Seite stand, sondern meine Leidenschaft für das Holzhandwerk teilt, was zu vielen interessanten und erbaulichen Gesprächen geführt hat. Vielen Dank, Herr Lenzian.

Prof. Dr. Gerhard Wanner und seinen beiden Mitarbeiterinnen Conny Niemann und Silvia Dobler möchte ich für die vielen mikroskopischen Aufnahmen danken. Die Gespräche mit Gerhard Wanner waren immer anschaulich („...und die Peroxisomen schauen aus wie Kadoffin“...), angenehm und äußerst informativ. Ich bin stets gern zu ihm gefahren und jedes mal schlauer zurück gekommen. Danke Gerhard.

Prof. Dr. Kay Schneitz möchte ich für seine etwas genetischere Sicht der Dinge (im Gegensatz zu meiner eher biochemischen) danken, mit der er oft Schwung und neue Anstöße in vielen Diskussionen gebracht hat.

Außerdem möchte ich Dr. Alexander Christmann danken, der die gute Seele des ABA-Labors ist und immer ein offenes Ohr und einen Rat parat hatte. Danke Alex.

Dr. Farhah Assaad möchte ich mich für ihre nützlichen Vorschläge während der Mittwochsseminare und die Korrektur so mancher englischer Manuskripte danken.

Bei meinen bereits promovierten Arbeitskollegen (die Glücklichen) Dr. Jana Wünschmann, Dr. Ralph Blum, Dr. Arthur Korte, Dr. Lynette Fulton, Dr. Jakob Prestele

und Dr. Sebastian Grünwald möchte ich mich für ein super Arbeitsklima bedanken. Wir hatten viel Spaß, im Biergarten und am Rechner.

An dieser Stelle möchte ich auch noch allen danken, die's noch vor sich haben und mir mit Rat, Tat oder Getränk zur Seite gestanden sind.

Bei Christian Kornbauer und Christoph Heidersberger möchte ich mich für ihre organisatorischen Tätigkeiten bedanken, bei Frau Johanna Berger für die hervorragende Betreuung des Materiallagers und ihre stets gute Laune.

Caroline Klaus, Lisa Held und Michael Schmidt danke ich für ihre unermüdlichen Anstrengungen, die Pflanzen zu versorgen und immer einen Platz zu finden, wo man doch noch eben schnell was hinstellen konnte.

Für die vielen Instandhaltungsarbeiten, Sonderanfertigungen und besonders für die technischen Gespräche danke ich Herrn Josef Reischenbeck.

Frau Beate Seliger und Frau Ulrike Schubert sind die beiden guten Seelen des Instituts (wenn es um die Verwaltung geht). Ich möchte ihnen für die zahllosen Ratschläge und Hilfestellungen in Verwaltungsangelegenheiten danken.

Bei Prof. Dr. Claus Schwechheimer und Dr. Erika Isono möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der qRT-PCR bedanken.

Prof. Dr. Steffen Reinbothe danke ich für meinen Forschungsaufenthalt in Grenoble und Prof. Dr. Wolfram Weckwerth danke ich für die mehrwöchige Kooperation in Golm.

Besonders möchte ich meinen Laborkollegen Jakob Prestele, Stefan Hetkamp und vor allem Esther Dolze danken. Ich bin totfroh, dass wir einen ähnlichen Musikgeschmack haben.

Ich danke auch meiner Freundin Jana Hakenjos für ihr Verständnis und ihre Geduld während meiner Schreiberei und vor allem für's Korrekturlesen. Sie hat es immer wieder geschafft, mich auf andere Gedanken zu bringen, wenn es nötig war.

Zuletzt danke ich meinen Eltern Friedrich und Monika und meiner Schwester Eva. Sie haben mir jegliche Unterstützung zukommen lassen und mir stets den Rücken frei gehalten, sooft sie nur konnten, oft musste ich nicht einmal fragen. Danke!

Enden möchte ich mit folgendem Zitat aus *Rumo* (Walter Moers, 2003):

„Raus mit der Sprache Doktor – was ist das?“

„Das ist, äh, eine Doktorarbeit.“

„Eine Doktorarbeit?“ lacht Schmeik „Jetzt bin ich aber erleichtert. Ich dachte schon, es sei eine schreckliche Krankheit.“

„Das ist eine Doktorarbeit gewissermaßen auch.“