

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin - Abteilung Neuropädiatrie  
(Prof. Dr. med. J. Gärtner)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Peroxisomale Biogenese**  
**Beteiligung Dynamin-ähnlicher Proteine und die Rolle des**  
**endoplasmatischen Retikulums**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jessica Frick, geb. Schwarz

aus Lüneburg

Göttingen 2016

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. H. K. Kroemer
<b>I. Berichterstatter:</b>	PD Dr. S. Thoms
<b>II. Berichterstatter/in:</b>	Prof. Dr. R. Kehlenbach
<b>III. Berichterstatter/in:</b>	Prof. Dr. R. Mausberg
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	19.09.2016

**Inhalt**

Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Aufbau und Funktion von Peroxisomen.....	2
1.2 Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen .....	2
1.3 Entstehung von Peroxisomen .....	6
1.3.1 Peroxisomale Membranbiogenese .....	6
1.3.2 Matrixprotein-Import .....	8
1.3.3 Die Rolle von Dynamin-ähnlichen Proteinen in der peroxisomalen Entstehung ...	10
1.3.4 Biogenese-Modelle .....	13
1.4 Zielsetzung .....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Chemikalien .....	16
2.2 Geräte .....	17
2.3 Aufreinigungs- und Reaktionssysteme (Kits) .....	18
2.4 Mikroorganismen – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
2.5 Plasmide und Vektoren .....	19
2.6 Oligonukleotide .....	20
2.7 Antikörper .....	21
2.7.1 Primär-Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie .....	21
2.7.2 Sekundär-Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie .....	21
2.8 Medien für Hefekulturen .....	22
2.9 Puffer und Lösungen .....	23
2.10 Herstellung von Mowiol.....	24

---

2.11 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.11.1 Bestimmung der Zelldichte.....	25
2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.11.3 PCR-basiertes Tagging von Hefe-Genen.....	25
2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.11.5 Transformation von kompetenten Hefezellen.....	27
2.11.6 Genomische DNA.....	27
2.11.7 Hefe-Kolonie-PCR.....	29
2.12 Puls-Chase-Experiment.....	30
2.13 Einbettung von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	30
2.14 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	31
2.15 Mikroskopische Analysen.....	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Die Rolle von Vps1p in der peroxisomalen Biogenese.....	34
3.1.1 Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen im Zeitverlauf in Wildtypzellen.....	35
3.1.2 Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen im Zeitverlauf in $\Delta vps1p$ - Zellen.....	38
3.1.3 Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen bei Zellen mit Vps1p- Überexpression.....	42
3.1.3.1 Herstellung von Zellen mit Vps1p-Überexpression.....	42
3.1.3.2 Auswertung der Zelllinie mit Vps1p-Überexpression.....	43
3.1.4 Vergleich von Wildtyp-, $\Delta vps1p$ - und Vps1p-Überexpressionszellen.....	45
3.1.4.1 Vergleich der mittleren Peroxisomenzahl pro Zelle.....	46
3.1.4.2 Häufigkeit von elongierten peroxisomalen Strukturen im Vergleich.....	47
3.1.5 Überblick über die Rolle von Vps1p an der peroxisomalen Biogenese.....	49
3.2 Peroxisomenbildung.....	50

---

3.2.1 Vergleich der Peroxisomen-Bildung in Wildtyp- und $\Delta$ pex3p-Zellen .....	51
3.2.2 Zwischenbilanz .....	54
3.2.3 Weiterführende Analysen .....	55
3.2.3.1 Pex3p-Spots – Reife Peroxisomen? .....	55
3.2.3.2 Lokalisation von Pex3p im Rahmen der Neogenese .....	56
3.2.3.3 Lokalisation von reifen Peroxisomen in Wildtypzellen.....	57
3.3 Darstellung von Peroxisomen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	59
3.3.1 Herstellung geeigneter Zelllinien .....	59
3.3.2 Optimierung des Immunfluoreszenz-Protokolls .....	60
3.3.3 Darstellung von Pex3p mittels Immunfluoreszenz .....	61
3.3.4 Darstellung von Pex3p in Kombination mit dem ER mittels Immunfluoreszenz.....	62
3.3.5 Darstellung von Peroxisomen und ER mittels konfokaler Mikroskopie .....	64
3.3.5.1 Morphologischer Zusammenhang von Peroxisomen und ER in der Ebene ....	64
3.3.5.2 Dreidimensionale Darstellung von <i>S. cerevisiae</i> .....	66
3.3.6 Immunfluoreszenz mit Atto590r- und Atto647m-Antikörpern für die STED- Mikroskopie .....	67
4 Diskussion .....	69
4.1 Vps1p in der peroxisomalen Entstehung.....	69
4.1.1 Versuchsmethodik.....	69
4.1.2 Vps1p und Peroxisomen .....	71
4.2 Peroxisomenbildung .....	73
4.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie – Beziehung zwischen Peroxisomen und ER .....	75
4.4 <i>S. cerevisiae</i> und STED-Mikroskopie .....	78
4.5 Modell zur peroxisomalen Biogenese .....	79
5 Zusammenfassung .....	80
6 Literaturverzeichnis.....	81

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen .....	3
Tabelle 2: Chemikalien .....	16
Tabelle 3: Geräte .....	17
Tabelle 4: Aufreinigungs- und Reaktionssysteme .....	18
Tabelle 5: Stämme von <i>S. cerevisiae</i> mit Stammbezeichnung, Genotyp und Herkunft .....	19
Tabelle 6: Plasmide und Vektoren .....	19
Tabelle 7: Oligonukleotide .....	20
Tabelle 8: Primäre Antikörper mit Verdünnungsangabe .....	21
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper mit Verdünnungsangabe .....	21
Tabelle 10: Amplifikationsprogramm für das Taging von Hefe-Genen .....	26
Tabelle 11: Amplifikationsprogramm zur Transformationskontrolle .....	29

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1:	Membranbiosynthese von Peroxisomen am Beispiel von PMP der Klasse I.....	7
Abbildung 1.2:	Matrixproteintransport .....	9
Abbildung 1.3:	Struktur der Dynamin-Familie .....	11
Abbildung 1.4:	Modelle der Peroxisomenentstehung .....	14
Abbildung 3.1:	Häufigkeit von Peroxisomen in Wildtypzellen 45 min, 2 h und 3,5 h nach Galaktose-Puls .....	35
Abbildung 3.2 a-b:	Wildtypzellen 45 min nach Galaktose-Puls .....	36
Abbildung 3.3 a-b:	Wildtypzellen 2 h und 3,5h nach Galaktose-Puls .....	37
Abbildung 3.4:	Peroxisomale Häufigkeit in $\Delta vps1p$ -Zellen 45 min, 2 h und 3,5 h nach Galaktose-Puls .....	38
Abbildung 3.5 a-b:	$\Delta vps1p$ -Zellen 45 min nach Galaktose-Puls .....	39
Abbildung 3.6:	$\Delta vps1p$ -Zellen 2 h nach Galatose-Puls .....	40
Abbildung 3.7:	$\Delta vps1p$ -Zellen 3,5 h nach Galaktose-Puls .....	41
Abbildung 3.8 a-b:	Konstrukt des N-terminalen VPS1-Genabschnitts.....	43
Abbildung 3.9:	Peroxisomale Häufigkeit in Zellen mit Vps1p-Überexpression 45 min, 2h und 3,5 h nach Galaktose-Puls .....	44
Abbildung 3.10 a-c:	Zellen mit Vps1p-Überproduktion 45 min, 2 h und 3,5 h nach Galaktose-Puls.....	45
Abbildung 3.11:	Zunahme von Peroxisomen im Zeitverlauf bei Vps1p-Wildtyp, -Knock-out und -Überexpression .....	47
Abbildung 3.12:	Anzahl von elongierten peroxisomalen Strukturen in Vps1p-Wildtyp, -Knock-out und -Überexpression .....	48
Abbildung 3.13 a-b:	Transport von Pex3p bei Wildtypzellen und Zellen mit Pex3p-abhängiger Neogenese .....	52

---

Abbildung 3.14 a-c: Wildtypzellen – Lokalisation von Galaktose-abhängig gebildetem Pex3p bei bereits bestehenden Peroxisomen .....	53
Abbildung 3.15 a-c: $\Delta$ pex3p-Zellen – Lokalisation von Pex3p im Prozess der peroxisomalen Neogenese .....	53
Abbildung 3.16 a-b: Lokalisation von Pex3p .....	55
Abbildung 3.17: Lokalisation von neugebildetem Pex3p in <i>S. cerevisiae</i> .....	56
Abbildung 3.18: Lokalisation von Peroxisomen in <i>S. cerevisiae</i> .....	58
Abbildung 3.19: Konstrukt des C-terminalen PEX3-Genabschnitts mit 6HA-Tag und PCR-Produkt .....	59
Abbildung 3.20: Immunfluoreszenz – Einzelfärbung ER .....	61
Abbildung 3.21: Immunfluoreszenzmikroskopie – Einzelfärbung von Peroxisomen .....	62
Abbildung 3.22: Immunfluoreszenzmikroskopie – Doppelfärbung Peroxisomen und ER .....	63
Abbildung 3.23 a-h: Konfokale-Immunfluoreszenzmikroskopie 1 – Assoziation von Peroxisomen und ER .....	65
Abbildung 3.24 a-d: Konfokale-Immunfluoreszenzmikroskopie 2 – Assoziation von Peroxisomen und ER .....	65
Abbildung 3.25: Konfokale Mikroskopie – Dreidimensionale Darstellung .....	66
Abbildung 3.26 a-b: STED-mikroskopische Aufnahmen von <i>S. cerevisiae</i> unter Verwendung von Atto647 und Atto590 in Einzelfärbungen .....	68
Abbildung 4.1 I-IV: Beteiligung des Dynamin-ähnlichen Proteins Vps1p an der peroxisomalen Entstehung .....	72
Abbildung 4.2 a-c: Verknüpfung von Peroxisomen und ER .....	76
Abbildung 4.3: Modifiziertes Teilungsmodell .....	79



---

---

**Abkürzungsverzeichnis**

ATP:	Adenosintriphosphat
bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserumalbumin
Cy3:	Carbocyanin 3
DAPI:	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA/DNS:	Desoxyribonukleinsäure
Dlp1:	<i>dynamin-like protein</i> (Dynamin-ähnliches Protein)
Dnm1:	<i>dynamin 1 gene</i>
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO:	Dimethylsulfoxid
Drp:	<i>dynamin-related proteins</i> (Dynamin-ähnliche Proteine)
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ER:	endoplasmatisches Retikulum
GFP:	<i>green fluorescent protein</i>
GTP:	Guanosintriphosphat
GED:	GTPase-Effektor-Domäne
HA-Tag:	Hämagglutinin Tag
HCl:	Chlorwasserstoff
H <sub>2</sub> O:	Wasser
IF:	Immunfluoreszenz
Leu:	Leucin
LMP:	<i>low melting point</i>
LSM:	<i>laser scanning microscopy</i>
MgCl <sub>2</sub> :	Magnesiumchlorid

Mgm1:	<i>Mitochondrial genome maintenance protein 1</i>
MRT:	Magnetresonanztomographie
NaCl:	Natriumchlorid
NH <sub>4</sub> OAc:	Ammoniumessigsäure
OD:	optische Dichte
o/e:	Überexpression
PBD:	Peroxisomenbiogenese-Defekte
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI:	Phenol-Chloroform-Isopropanol
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PEG:	Polyethylenglykol
PEX:	Gen, das für ein Peroxin kodiert
Pex:	Peroxin
PMP:	peroxisomales Membranprotein
PRD:	Prolin-reiche Domäne
Prom:	Promotor
PTS:	peroxisomales <i>targeting</i> -Signal
RNA/RNS:	Ribonukleinsäure
rpm:	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD:	<i>synthetic complete drop out</i>
SKL:	Tripeptid aus Serin-Lysin-Leucin
STED:	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
TAE:	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TE:	Tris-EDTA
U:	<i>unit</i> (Enzymaktivität)

Ura:	Uracil
VLCA:	<i>very long chain fatty acids</i>
Vps1:	<i>vacuolar protein sorting 1</i>
w/v:	<i>weight/volume</i>
YPD:	<i>yeast peptone dextrose</i>

## NUKLEINSÄURECODE

<b>Nucleinsäure</b>	<b>Abkürzung</b>
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

## 1 Einleitung

Schon eine einzelne Punktmutation im Genom eines Individuums kann die Fehlkonstruktion von Zellbestandteilen herbeiführen, und dies kann dann bis hin zu einem lebensunfähigen Wesen führen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Peroxisomen. Peroxisomen sind ebensolche Bestandteile von Zellen, die bei einer Mutation ein „Chaos“ im Organismus bewirken können.

Peroxisomen sind Bestandteile eukaryonter Zellen. Das Organell hat eine Größe von ungefähr 0,5-1  $\mu\text{m}$  und verfügt über eine enorm wichtige Bedeutung für den Stoffwechsel seines jeweiligen Organismus. Dies wird vor allem durch das Krankheitsspektrum verdeutlicht, welches aufgrund einer gestörten Peroxisomenbiogenese in menschlichen Zellen zustande kommt.

Seinen Namen erhielt das Organell 1966. Dieser entstand durch die Anwesenheit von Oxidase und Katalase in der Matrix und dem damit verbundenen Auftreten von Wasserstoffperoxid (De Duve und Baudhuin 1966). In den folgenden Jahren wurde eine Reihe weiterer Funktionen des peroxisomalen Stoffwechsels entdeckt. Auf diese soll in der Einleitung zunächst eingegangen werden. Es folgt eine kurze Zusammenfassung über die wichtigsten Krankheitsbilder, die durch eine gestörte peroxisomale Biogenese entstehen. Im Anschluss wird ein Überblick über die Entwicklung und den aktuellen Forschungsstand gegeben, um abschließend auf die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit einzugehen.

## 1.1 Aufbau und Funktion von Peroxisomen

Peroxisomen treten ubiquitär in eukaryonten Zellen auf. Beim Menschen finden sie sich beispielsweise in allen Zellen, mit Ausnahme der Erythrozyten. Die größte Anzahl in menschlichen Zellen ist in Leber- und Nierengewebe zu finden (Weller und Gärtner 2002). Peroxisomen verfügen über eine Membran, die die peroxisomale Matrix mit den darin enthaltenen Enzymen umschließt und eine Vielzahl Organell-spezifischer integraler Membranproteine enthält (Schrader und Fahimi 2008; Weller und Gärtner 2002). Es sind mittlerweile mehr als 50 verschiedene Matrixproteine – größtenteils Enzyme – bekannt, die für verschiedene anabole und katabole Stoffwechselwege zur Verfügung stehen. Eine wichtige Funktion besteht in der  $\beta$ -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren (*VLCFA*), die in den Peroxisomen lokalisiert stattfindet und zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Das entstandene Wasserstoffperoxid wird durch Katalase (das häufigste Protein der peroxisomalen Matrix) zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt. Weitere Funktionen der Peroxisomen beinhalten Reaktionsschritte der Plasmalogenbiosynthese und der Cholesterol- und Gallensäuresynthese als anabole Stoffwechselwege sowie den Abbau von Phytan- und Pristansäure als weitere katabole Vorgänge (Doenecke 2005; Rassow 2008; Weller und Gärtner 2002). Plasmalogene sind in besonders hohen Konzentrationen in Gehirn und Leber vorzufinden. Daher kommt es bei einer Vielzahl der Krankheitsbilder zu einer zerebralen Beteiligung. Auf die genaue Ausprägung und die klinischen Merkmale der verschiedenen peroxisomalen Erkrankungen wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

## 1.2 Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen

Das gesamte Spektrum der peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen wird in zwei große Gruppen unterteilt. Gruppe 1 fasst die Peroxisomenbiogenese-Defekte (PBD) zusammen. Bei Patienten dieser Gruppe werden Peroxisomen entweder gar nicht oder nur sehr unvollständig gebildet, so dass mehrere peroxisomale Funktionen beeinträchtigt sind. In Gruppe 2 liegt lediglich ein isolierter Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges vor. Die übrigen Peroxisomenstrukturen und -funktionen sind nicht betroffen (Gärtner 2007; Moser 2000; Raymond 2001; Weller und Gärtner 2002). Einen Überblick über die Einteilung der peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen gibt Tabelle 1.

Peroxisomenbiogenese Defekte (PBD)	Isolierte Defekte peroxisomaler Stoffwechselwege
Zellweger-Syndrom*	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
Neonatale Adrenoleukodystrophie*	Acyl-CoA-Oxidase-1-Defekt (Pseudo-neonatale Adrenoleukodystrophie)
Infantiler Morbus Refsum*	Thiolase-Defekt (Pseudo-Zellweger)
Rhizomelia chondrodysplasia punctata	Morbus Refsum (adulte Form)
	Hyperoxalurie Typ I
	Störungen der Gallensäurensynthese
	Aktalasia (Katalase-Mangel)

**Tabelle 1: Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen**

Dargestellt sind die wichtigsten peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen und ihre Einteilung in PBD und Einzel-Enzymdefekte; mit \* gekennzeichnete Erkrankungen sind Teil des Zellweger-Spektrums (Raymond 2001; Weller und Gärtner 2002).

Die meisten peroxisomalen Erkrankungen unterliegen einem autosomal-rezessiven Erbgang. In der Gruppe der Peroxisomenbiogenese-Defekte ist das Zellweger-Spektrum mit 80% der häufigste vorkommende Typ. Es beinhaltet das Zellweger-Syndrom als schwerste Erkrankungsform. Betroffene Patienten versterben oftmals innerhalb der ersten Lebensmonate. Die neonatale Adrenoleukodystrophie und der infantile Morbus Refsum stellen weniger stark ausgeprägte Formen desselben Spektrums dar. Betroffene Kinder können das erste Lebensjahr überleben. Klinisch fallen die Patienten des Zellweger-Spektrums durch typische faziale Dysmorphien – flache, hohe Stirn, tiefe Nasenwurzel, Hypertelorismus, Epikanthus, leicht mongoloide Lidachse, dysplastische Ohren und Mikrognathie – auf. Darüber hinaus leiden sie an Muskelhypotonie, Trinkschwäche, Gedeihstörungen, Krampfanfällen und psychomotorischer Retardierung. Die Augen können in Form von Katarakt, Hornhauttrübung, Glaukom oder Pigmentretinopathie mitbetroffen sein. Aufgrund der hohen Dichte an Peroxisomen in Leber- und Nierenzellen können zusätzlich Zystennieren und Leberveränderungen auftreten, ebenso kommt es zu Störungen der Hirnentwicklung. Daher wird die Erkrankung auch als zerebrohepatorenales Syndrom bezeichnet. Neben dem Zellweger-Spektrum gehört die Rhizomelia chondrodysplasia punctata zu der Gruppe der PBDs. Bei dieser Erkrankung liegen als Leitsymptome eine Verkürzung der proximalen langen Röhrenknochen, Wachstumsstörungen und punktförmige Verkalkungen vor. Die übrigen Symptome sind denen des Zellweger-Spektrums ähnlich, wenn auch die Überlebensprognosen deutlich günstiger sind. Betroffene Patienten haben oftmals eine Überlebensdauer von mehreren Jahren (Gärtner 2007; Weller et al. 2003; Weller und Gärtner 2002).

Die X-chromosomal-rezessiv vererbte Adrenoleukodystrophie wird durch einen Einzelenzym-Defekt hervorgerufen. Die Ursache dieser Erkrankung liegt in einer Mutation in

dem Gen, welches für ein ATP-bindendes Membranprotein, einen ABC-Transporter, kodiert. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches vermutlich an dem Transport von überlangkettigen Fettsäuren in die Peroxisomen beteiligt ist (Gärtner 2000; Gärtner 2007; Raymond 2001). Bei einem Defekt des Transporters werden diese nicht abgebaut. Die überlangkettigen Fettsäuren akkumulieren in sämtlichen Geweben. Zu einer Manifestation der Erkrankung kommt es in der weißen Hirnsubstanz, den Leydig-Zellen des Hodens und den Zellen der Nebennierenrinde. Die Ausprägung des Phänotyps ist dabei sehr variabel. Bei der kindlich zerebralen Form handelt es sich um den schwersten Typ, betroffene Kinder versterben meist im zweiten Lebensjahrzehnt. Adulte Formen weisen hingegen eine langsame Progredienz auf. Frühe Anzeichen der kindlich zerebralen Form beinhalten Persönlichkeitsveränderungen, Aufmerksamkeitsverlust und eine Beeinträchtigung von Sehen und Hören. Die Nebennieren-Beteiligung manifestiert sich im Rahmen einer Insuffizienz unter dem klinischen Bild eines Morbus Addison. Später kommen Spastiken und Demenz hinzu. Aufgrund der raschen Progredienz führt die Krankheit innerhalb weniger Jahre zum Tod (Gärtner 2000; Gärtner 2007; Raymond 2001).

Während bei den Einzelenzymdefekten, wie am Beispiel der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie gezeigt, jeweils für das Krankheitsbild typische Mutationen vorliegen, die zu einem Funktionsverlust des jeweiligen Stoffwechselweges führen, ist dies bei den Peroxisomenbiogenese-Defekten anders. Bei einigen der Peroxisomenbiogenese-Defekten fehlen die Peroxisomen als vollständige Organellen, es werden lediglich einige peroxisomale Proteine gebildet, die frei im Zytosol vorliegen.

In den letzten Jahren wurden allerdings Peroxisomenbiogenese-Defekte mit milderen Verläufen beschrieben, deren Ursachen Mutationen in verschiedenen peroxisomalen Genen waren. So wurden beispielsweise Patienten mit einer Mutation in PEX16 beschrieben, die eine vergleichsweise milde klinische Ausprägung vorwiesen (Ebberink et al. 2010). Im Vorschulalter zeigten die Patienten zunächst lediglich eine fortschreitende Paraparese und Ataxie, mit typischen Mustern der Leukodystrophie und Hirnatrophie im MRT. Später kamen die Ausbildung eines Katarakts und eine periphere Neuropathie hinzu. Normalerweise führen Mutationen in PEX16, das in den peroxisomalen Membranprotein-Import involviert ist, zu deutlich schwerwiegenderen Krankheitsbildern. Die Fibroblasten dieser Patienten sind typischerweise durch die totale Abwesenheit peroxisomaler Strukturen gekennzeichnet. Bei den beschriebenen Patienten waren hingegen vergrößerte, aber Import-kompetente

Peroxisomen nachweisbar, die lediglich in ihrer Anzahl vermindert waren (Ebberink et al. 2010).

In einem weiteren Artikel wurden zwei Patienten beschrieben, die bei normaler Intelligenz mit Kleinhirnatrophie, fortschreitender Ataxie, Neuropathie und einer Verminderung der Vibrationswahrnehmung auffällig wurden (Regal et al. 2010). Bei beiden Patienten lagen Mutationen in PEX10 vor. Nach Meinung der Autoren müssen die Peroxisomenbiogenese-Defekte demnächst als Differentialdiagnose bei der autosomal rezessiven Ataxie in Betracht gezogen werden (Regal et al. 2010). Dass auch Mutationen in PEX2 zu milden Verläufen von Peroxisomenbiogenese-Defekten führen können, zeigt die Beschreibung von zwei Brüdern, die lediglich eine isolierte Kleinhirnataxie aufwiesen. Die Autoren zogen ebenfalls den Schluss, dass das systematische Screening nach peroxisomalen Gendefekten zukünftig in Betracht gezogen werden muss, da diese vermutlich eine häufige Ursache für die autosomal rezessive zerebelläre Ataxie sind (Sevin et al. 2012).

Waterham et al. berichteten 2007 über einen Fall eines weiblichen Neugeborenen gesunder Eltern, welches neben einer Dystrophie eine stammbetonte muskuläre Hypotonie, wenig spontane Bewegungen und fehlende Muskeleigenreflexe zeigte. Zusätzlich fehlten der Lichtreflex und die Fixierung von Gegenständen, dies als Zeichen einer nicht ausreichenden Hirnentwicklung. Laborchemisch fielen eine erhöhte Lactatkonzentration im Blut und erhöhte Konzentrationen an überlangkettigen Fettsäuren im Plasma auf. Die Untersuchungen zeigten einen Teilungsdefekt sowohl von Peroxisomen als auch von Mitochondrien. An der Teilung der beiden Organellen ist das DLP1-Protein beteiligt, passend hierzu wurde bei der Patientin eine Mutation im DLP1-Gen gefunden (Waterham et al. 2007). Somit gibt es auch Erkrankungen, bei denen neben den Peroxisomen auch weitere Organellen, die Mitochondrien, mitbetroffen sein können.

In den letzten 55 Jahren – seit ihrer Erstbeschreibung – wurde viel über die peroxisomale Funktion und Entstehung herausgefunden. Gerade der Pathomechanismus des Zellweger-Syndroms hat zum Verständnis der Peroxisomen beigetragen (Santos et al. 1988). Und auch die kürzlich beschriebenen Krankheitsbilder führen zu neuen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Peroxisomen-Forschung. Es gibt noch viele Unklarheiten, vor allem im Bereich der peroxisomalen Biogenese. Darauf soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.



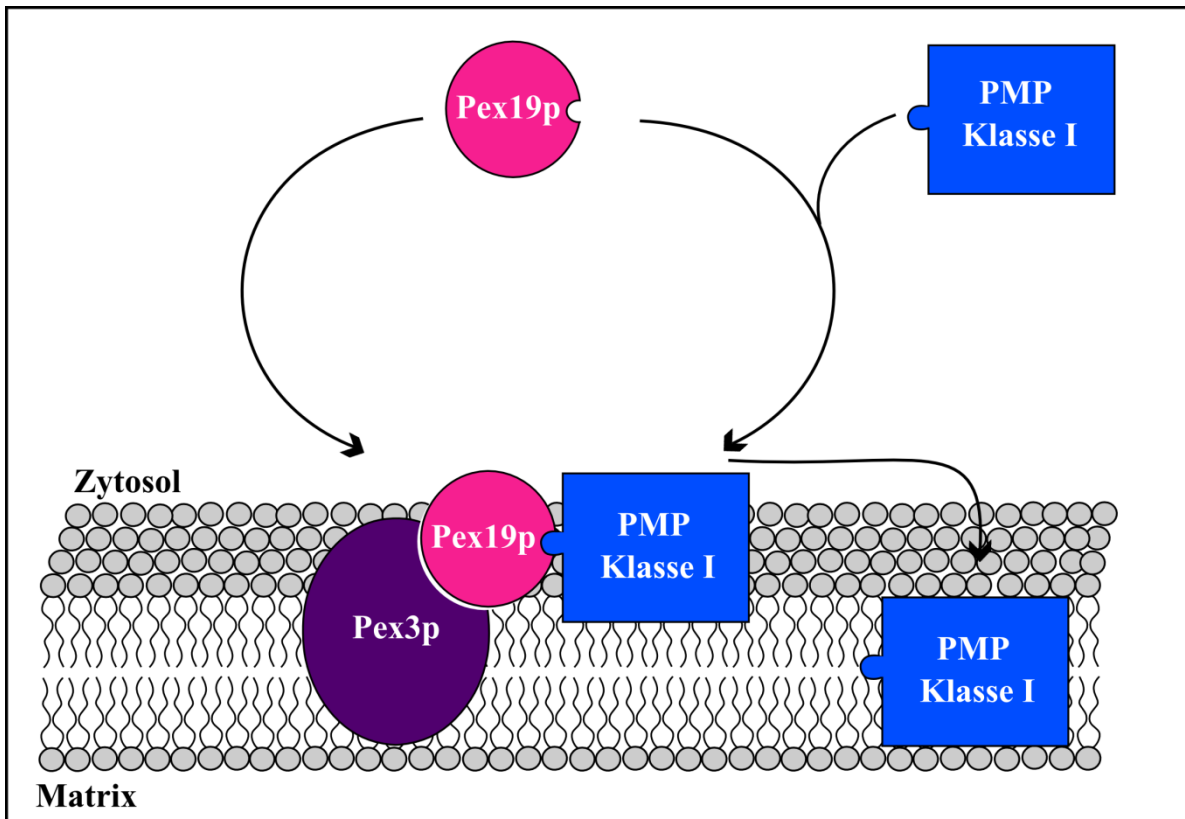
## 1.3 Entstehung von Peroxisomen

Bis heute ist zwar geklärt und anerkannt, dass Zellen, die beispielsweise durch eine Mutation frei von Peroxisomen sind und diese – nach einem nötigen Impulse – zunächst via *de novo*-Synthese bilden müssen, dieses über das ER tun. Es wird vermutet, dass die Bildung von Peroxisomen in menschlichen Zellen ähnlich wie die Bildung von Peroxisomen in *S. cerevisiae* vonstattengeht. Nach wie vor gibt es allerdings unterschiedliche Ansichten, wie sich Peroxisomen in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* vermehren. So vermuten Hoepfner et al., dass in Wildtypzellen derselbe Prozess abläuft wie in Zellen, die Peroxisomen *de novo* bilden müssen. Ihre Ergebnisse zeigten, dass sowohl Pex3p als auch Pex19p zunächst am ER auftauchen, bevor sie in Peroxisomen sichtbar werden. Anhand dieser Ergebnisse schlossen sie darauf zurück, dass auch in Wildtypzellen das ER an der Bildung von Peroxisomen beteiligt sein muss (Hoepfner et al. 2005). Andere Daten belegen allerdings, dass die Entstehung von Peroxisomen in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* eher dem „Wachstums- und Teilungsmodell“ entspricht (Motley und Hettema 2007). Für ein besseres Verständnis soll an dieser Stelle zunächst auf die Entstehung und Bedeutung von peroxisomalen Membranproteinen eingegangen werden. Für die Nomenklatur gilt, dass sämtliche peroxisomale Proteine in *S. cerevisiae* in dieser Arbeit durch ein kleines „p“ gekennzeichnet sind. Die peroxisomalen Proteine der Metazoen werden hingegen nicht mit einem „p“ gekennzeichnet, sondern lediglich z.B. als Pex16 bezeichnet. Darüber hinaus werden bei allen Spezies sämtliche peroxisomalen Proteine als Peroxine bezeichnet, die durch die sogenannten PEX-Gene verschlüsselt werden (Thoms und Erdmann 2005b). Pex3p zum Beispiel ist ein vom *PEX3*-Gen kodiertes Protein in *S. cerevisiae*.

### 1.3.1 Peroxisomale Membranbiogenese

Die peroxisomale Membran beinhaltet verschiedene Proteine, die sowohl für den Transport von unterschiedlichen Metaboliten als auch für die peroxisomale Entstehung verantwortlich sind (Thoms und Erdmann 2005b). Zur peroxisomalen Membranbiogenese gibt es verschiedene Modelle, eines davon wird hier vorgestellt. Danach gibt es zwei verschiedene Arten von peroxisomalen Membranproteinen (PMP). Solche der Klasse I enthalten ein

Zielsignal, welches dazu führt, dass sie von Pex19p erkannt und direkt in die Peroxisomen gebracht werden. Ein vereinfachtes Modell dieser Interaktion ist in Abbildung 1.1 dargestellt.



**Abb. 1.1: Membranbiosynthese von Peroxisomen am Beispiel von PMP der Klasse I**

Neugebildete PMPs der Klasse I, die sich im Zytosol befinden, werden durch Pex19p erkannt, gebunden und an die peroxisomale Membran transportiert. Nach dortiger Interaktion mit Pex3p werden die PMPs der Klasse I in die peroxisomale Membran integriert (modifiziert nach Thoms und Erdmann 2005b, S. 325).

PMPs der Klasse II besitzen keine solche Signalsequenz und werden dementsprechend nicht von Pex19p gebunden (Jones et al. 2004; Sacksteder et al. 2000). Neben Pex19p, welches als Chaperon agiert und somit dafür verantwortlich ist, neugebildete PMPs der Klasse I zu binden, ihre korrekte Faltung zu erleichtern und sie in die Peroxisomen einzuschleusen, sind zwei weitere Peroxine entdeckt worden, die eine essentielle Rolle in der Biogenese von peroxisomalen Membranproteinen spielen. Dabei handelt es sich um Pex3p und Pex16. Fehlt eines dieser drei Proteine, können keine peroxisomalen Strukturen gebildet werden.

Sowohl in menschlichen Zellen als auch in Zellen von *S. cerevisiae* entstehen in einem solchen Fall peroxisomale Ghosts. Dabei liegen PMPs und peroxisomale Enzyme im Zytosol der Zelle vor (Hetteema et al. 2000; Sacksteder et al. 2000). Pex16 ist dafür verantwortlich, dass Pex3 in das ER und auch auf direktem Weg in Peroxisomen gelangen kann.

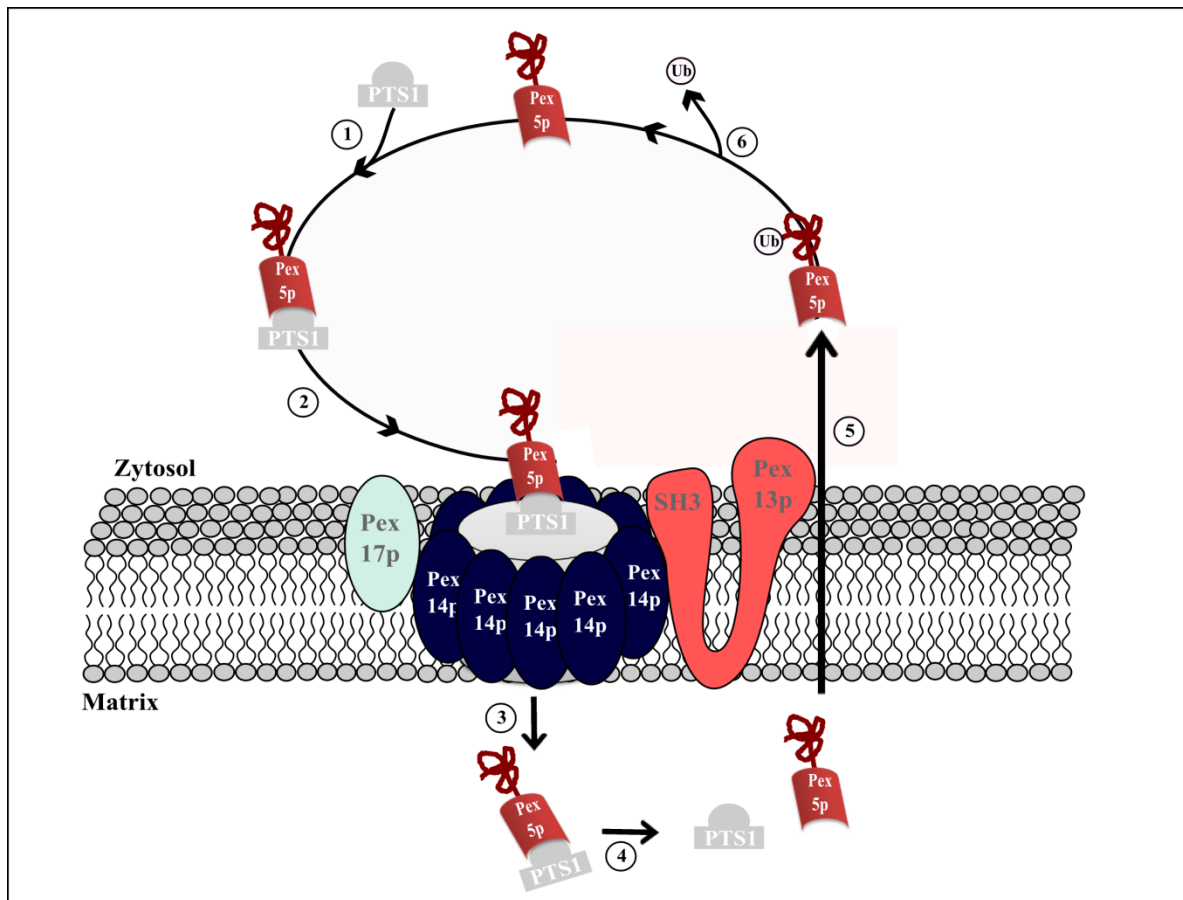
In *S. cerevisiae* kommt Pex16 allerdings nicht vor (Kim et al. 2006; Matsuzaki und Fujiki 2008). Pex3p besitzt eine Art Rezeptorfunktion. Durch Pex19p erkannte und transportierte PMPs der Klasse I werden vermutlich durch eine Interaktion mit Pex3p in die peroxisomale Membran eingebaut (siehe Abb. 1.1).

Van der Zand et al. konnten 2010 und 2012 zeigen, dass insgesamt 16 PMPs, die zu ganz unterschiedlichen Teilen der Membran beitragen, in *S. cerevisiae* zunächst im ER zu finden waren, bevor sie dann letztendlich in die Peroxisomen gelangten. Der Weg dieser PMPs in das ER läuft mit Hilfe der Proteinimport-Komplexe Sec61p und Get3p ab. Der Weg aus dem ER hin zu reifen Peroxisomen findet wiederum in einem Pex3p-Pex19p-abhängigen Schritt statt. Wichtig ist dabei, dass diese Prozesse sowohl im Wildtyp als auch in Zellen ablaufen, die aufgrund einer Mutation Peroxisomen *de novo* bilden müssen (van der Zand et al. 2010). Dies verdeutlicht, dass es einen engen funktionellen Zusammenhang zwischen Peroxisomen und dem ER geben muss. Somit ist es nicht erstaunlich, dass bereits 1972 mittels Elektronenmikroskopie Hinweise gefunden wurden, die eine enge räumliche Verknüpfung zwischen diesen beiden Organellen nahelegten (Novikoff und Novikoff 1972). Andere Meinungen besagen allerdings, dass der ER-vermittelte Weg des Protein-Imports lediglich in Zellen eine Rolle spielt, die aufgrund einer Mutation Peroxisomen *de novo* bilden müssen (Motley und Hettema 2007). Hierauf wird in Kapitel 1.3.4 eingegangen.

### ***1.3.2 Matrixprotein-Import***

Bei den nachfolgenden Modellen handelt es sich jeweils um Modelle der Entstehung von Peroxisomen in Hefezellen, wir gehen davon aus, dass die Entstehung von Peroxisomen in menschlichen Zellen ähnlich hierzu verläuft. Die einzelnen Abläufe lassen sich zum Teil in Hefezellen besser mechanisch untersuchen.

Neben den PMPs müssen auch Matrixproteine im Rahmen der Peroxisomenentstehung in Peroxisomen importiert werden. Peroxisomen verfügen nicht über eine eigene DNA. Die mRNA ihrer Proteine werden im Nukleus transkribiert und an freien Ribosomen translatiert. Anschließend werden sie aus dem Zytosol in die Peroxisomen transportiert (Lazarow und Fujiki 1985). An diesem Transport sind verschiedene Strukturen beteiligt. Ein vereinfachtes Modell der Abläufe zeigt Abbildung 1.2.



### Abb. 1.2: Matrixproteintransport

Der Transport von Matrixproteinen aus dem Zytosol erfolgt in mehreren Schritten (Weg von Proteinen mit PTS2-Signal ist nicht dargestellt): Das PTS1-Signal wird durch Pex5p erkannt und gebunden (1).

Dieser Komplex bindet an den Docking-Komplex, welcher wiederum aus Pex13p, Pex14p und Pex17p besteht (2). Als nächstes folgt der Transport über die Membran in das Peroxisom (3) und die Lösung des Rezeptor-Protein-Komplexes (4).

Das freie Pex5p wird über die Membran zurück ins Zytosol transportiert (5), ubiquitinyliert und steht nach abschließender Deubiquitinierung (6) für erneute Importprozesse zur Verfügung (Abbildung modifiziert nach Ma et al. 2001, S. 9; Heiland und Erdmann 2005, S. 2365).

Die meisten Matrixproteine verfügen über ein sogenanntes *peroxisomales targeting signal* (PTS). Dieses befindet sich entweder am C- oder am N-terminalen Ende. Der größte Anteil der Matrixproteine besitzt ein C-terminales Signal. Dieses wird als PTS1 bezeichnet und umfasst ein Tripeptid, welches z.B. aus Serin-Lysin-Leucin (SKL) besteht. PTS2 befindet sich hingegen am N-Terminus des Proteins, besteht aus ungefähr 20 Aminosäuren und ist bei weniger als 10% der Matrixproteine zu finden. Die Matrixproteine werden an den Zielsignalen durch zwei im Zytosol befindliche Peroxine – Pex5p und Pex7p – gebunden und durch diese zu der peroxisomalen Membran dirigiert. Matrixproteine, die über ein PTS1 verfügen, werden durch Pex5p erkannt. Der für die N-terminalen Signale zuständige Rezeptor ist das Pex7p (Gould et al. 1989; Swinkels et al. 1991; Thoms und Erdmann 2005b).

Nachdem die Matrixproteine durch die löslichen Rezeptoren im Zytosol gebunden wurden, findet der Transport über die peroxisomale Membran durch eine Interaktion des Pex5p-PTS1-Matrixprotein- bzw. Matrixprotein-PTS2-Pex7p-Komplexes mit dem sogenannten Docking-Komplex, bestehend aus Pex13p, Pex14p und Pex17p, statt. Dieser befindet sich in der peroxisomalen Membran. Am Ende der Interaktion befindet sich das Matrixprotein innerhalb des Peroxisoms, während Pex5p und Pex7p durch verschiedene Ubiquitylierungsprozesse im Zytosol für einen erneuten Transportzyklus zur Verfügung gestellt werden (Rayapuram und Subramani 2006; Sacksteder und Gould 2000; Thoms und Erdmann 2005b; 2006).

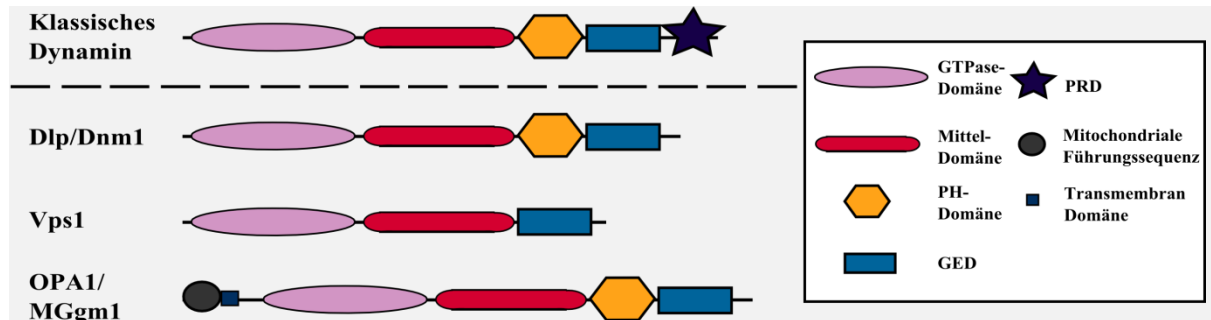
### ***1.3.3 Die Rolle von Dynamin-ähnlichen Proteinen in der peroxisomalen Entstehung***

Der Transport von Membranbestandteilen zwischen den einzelnen Zellkompartimenten ist ein wichtiger Prozess in eukaryotischen Zellen. Dieser ist nötig, damit sich bestimmte Organellen in den Zellen differenzieren können. Zur Durchführung dieses komplexen Ablaufs werden verschiedene Proteine benötigt, die zum einen Aufgaben wie Vermehrung und Fusion von Membrankompartimenten, aber auch die Zielsteuerung von Proteinen zum Funktionsort übernehmen. An diesem Prozess sind unter anderem die klassischen Dynamine und die Dynamin-ähnlichen Proteine (Drps) beteiligt. In diesem Abschnitt wird zunächst auf den Aufbau der Drps im Vergleich zu den klassischen Dynaminen eingegangen. Da Drps auch eine wichtige Rolle im Bereich der peroxisomalen Biogenese spielen und von besonderer Bedeutung für einen Teil der Versuche dieser Arbeit sind, soll an dieser Stelle näher auf ihre Funktion eingegangen werden.

Dynamin und die der Dynamin-Familie zugerechneten Drps werden als große GTPasen bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den kleinen GTPasen (z.B. Ras) durch ihre niedrigere Bindungsaffinität für GTP und ihre Oligomerisierungs-abhängige GTPase-Aktivierung. Einige der Dynamin-ähnlichen Proteine sind auch in der Lage, mit der Lipidmembran zu interagieren (Praefcke und McMahon 2004).

Die Drps ähneln dem klassischen Dynamin in ihrem Aufbau, ihnen fehlt lediglich eine Prolin-reiche Domäne (PRD) an ihrem Carboxyl-Terminus. Die übrigen Motive sind mit denen des Dynamins übereinstimmend (siehe hierzu Abbildung 1.3): eine GTPase-Domäne, gefolgt von einer sogenannten Mittel-Domäne und der GTPase-Effektor-Domäne (GED). Zusätzlich hierzu sind bei einigen Drps Bereiche zu finden, die dafür verantwortlich sind,

Ziellmembranen zu binden (z.B. die Pleckstrin-Homologie- (PH) und die Transmembran-Domänen, die jeweils mit Lipidmembranen interagieren können) oder auch dafür sorgen, die Drps zu bestimmten Zielen, beispielsweise in das Innere von Mitochondrien zu transportieren (in der Abbildung als mitochondriale Führungssequenz bezeichnet) (Praefcke und McMahon 2004).



**Abb. 1.3: Struktur der Dynamin-Familie**

Die Domänen der Dynamin-Familie sind durch verschiedenfarbige Symbole dargestellt und der Legende zu entnehmen. Es ist zu erkennen, dass sich die Drps nur gering von dem klassischen Dynamin unterscheiden. Anders als die Drps besitzt dieses eine Prolin-reiche Domäne (PRD) am Carboxyl-Terminus. Davon abgesehen verfügen sämtliche Mitglieder der Dynamin-Familie über eine GTPase-Domäne, welche das GTP bindet und hydrolysiert, eine Mittel-Domäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Die GED ist an der Oligomerisierung und Stimulierung der GTPase-Aktivität beteiligt. Mit Ausnahme des Vps1 enthalten die übrigen dargestellten Dynamine eine Domäne, die für die Interaktion mit der Lipidmembran verantwortlich ist (Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH)/Transmembran Domäne).

Humane Drps: Dlp, OPA1. In *S. cerevisiae* vorkommende Drps: Dnm1, Vps1, Mgm1 (Abbildung modifiziert nach Praefcke und McMahon 2004, S. 137).

Wichtige Aufgaben der Dynamin-Familie sind die Vesikel-Spaltung und Verschmelzung einzelner Organellen. Diese Fähigkeit beruht darauf, dass die GED in der Lage ist, sowohl mit der GTPase- und der Mittel-Domäne als auch mit sich selbst zu interagieren (Smirnova et al., 1999; Zhang und Hinshaw 2001). Diese Interaktion bewirkt unter Anwesenheit von GTP die Oligomerisierung des jeweiligen Drps und führt durch einen Zusammenschluss mehrerer Drps zu einer Ringbildung. Diese Ringe sind beispielsweise in der Lage, Vesikel abzuspalten (Praefcke und McMahon 2004; Yoon et al. 2001).

Ein wichtiges Drp in Säugetierzellen ist das Dlp1. Dieses Protein ist ebenfalls in der Lage Ringe zu bilden und Membranen zu konstringieren und abzuschneiden. Es ist an der äußeren Membran der Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und an Peroxisomen lokalisiert (Praefcke und McMahon 2004). Auch die Teilung von Peroxisomen verläuft in Säugetier-Zellen Dlp1-abhängig. Koch et al. zeigten 2003, dass ein Knock-out von Dlp1 zu

einer Verlängerung von Peroxisomen führt, außerdem wiesen sie das Dlp1 an bestimmten Stellen an diesen verlängerten peroxisomalen Strukturen nach. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass die Hydrolyse von GTP durch Dlp1 verantwortlich für die regelrechte Teilung von Peroxisomen sei (Koch et al. 2003).

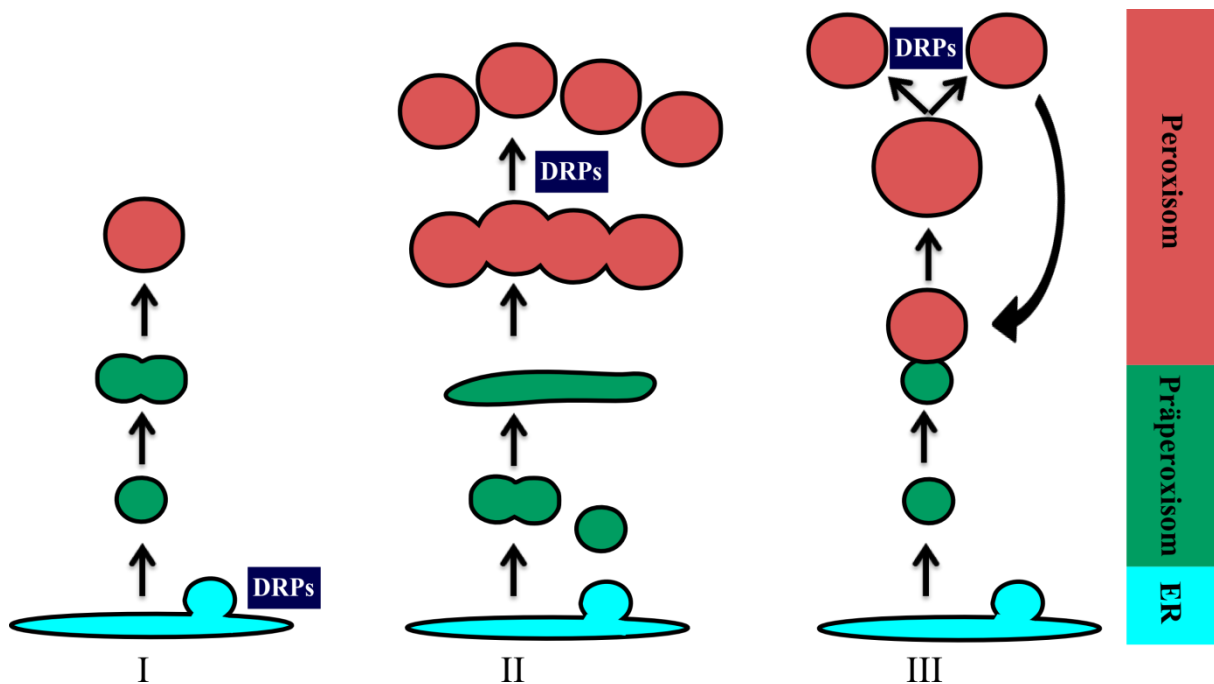
Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert drei verschiedene Drps, das klassische Dynamin kommt hier nicht vor: Vps1p, Dnm1p (mit der größten Ähnlichkeit zum Dlp1 in Säugetierzellen) und Mgm1p. Während zunächst vermutet wurde, dass lediglich Vps1p an der Teilung von Peroxisomen beteiligt ist (Hoepfner et al. 2001), konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch Dnm1p bei diesem Prozess eine Rolle spielt (Kuravi et al. 2006). Die alleinige Abwesenheit von Vps1p führt bereits zu einer deutlichen Reduktion der Peroxisomenzahl. Werden allerdings beide Drps gemeinsam ausgeschaltet, führt dies zu einer noch geringeren Anzahl mit durchschnittlich einem Peroxisom pro Zelle. Diese Aspekte zeigen, dass Drps an der peroxisomalen Biogenese beteiligt sind, jedenfalls wenn diese aus bereits existierenden Peroxisomen entstehen. Der Frage, welche Rolle Drps in der Neogenese von Peroxisomen spielen, gingen Motley und Hettema nach. Dazu nutzten sie Zellen, die aufgrund eines Teilungsdefekts zunächst keine Peroxisomen aufwiesen und diese folglich *de novo* bilden mussten, wenn durch einen entsprechenden Impuls die Bildung von Peroxisomen induziert wurde. Sie konnten zeigen, dass dieser Prozess zum einen wesentlich langsamer abläuft als die Bildung von Peroxisomen durch Teilung aus bereits bestehenden und zum anderen zunächst Drp-unabhängig ist. Ihrer Meinung nach sind Drps nicht für die Bereitstellung der peroxisomalen Proteine aus dem ER verantwortlich, sondern spielen lediglich eine Rolle in der Teilung von bereits bestehenden Peroxisomen (Motley und Hettema 2007). Es gibt derzeit verschiedene Modelle, die versuchen zu erklären, wie die Bildung von Peroxisomen abläuft und welche Rolle dabei das ER spielt.

## ***1.3.4 Biogenese-Modelle***

Bereits zu Beginn der peroxisomalen Forschungsgeschichte wurde vermutet, dass Peroxisomen in einem engen Zusammenhang mit dem ER stehen und möglicherweise aus diesem hervorgehen. Diese Vermutung wurde durch die enge räumliche Lokalisation dieser beiden Organellen unterstützt (Novikoff und Novikoff 1972; Schrader und Fahimi 2008). Da allerdings gezeigt werden konnte, dass der größte Teil peroxisomaler Proteine an freien Ribosomen im Zytosol der Zelle gebildet wird, trat diese Hypothese der peroxisomalen Entstehung eher in den Hintergrund (Goldman und Blobel 1978). Derzeit existieren drei Modelle, die versuchen die Entwicklung von Peroxisomen und die Rolle, die das ER dabei spielt, zu klären. Diese Modelle sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

Die beiden ersten Modelle gehen davon aus, dass sich Peroxisomen kontinuierlich *de novo* aus dem ER entwickeln. Bei beiden Modellen entstehen zunächst sogenannte Präperoxisomen – also peroxisomale Vorstufen – die zu reifen Peroxisomen heranwachsen und in diesem Zustand in der Lage sind, Matrixproteine zu importieren. Diese beiden Modelle unterscheiden sich lediglich in dem Wirkort der Drps. Während das erste Modell ein Einwirken der Drps direkt an der Membran des ER postuliert (Kunau 2005; van der Zand et al. 2006), entstehen die Präperoxisomen im zweiten Modell zunächst Drp-unabhängig aus dem ER, fusionieren miteinander und werden dann in einem Drp-abhängigen Schritt in mehrere reife Peroxisomen geteilt (Thoms und Erdmann 2005a).





**Abb. 1.4: Modelle der Peroxisomenentstehung**

Die Modelle I und II gehen davon aus, dass Peroxisomen kontinuierlich neu aus dem ER entstehen. Die aus dem ER hervorgehenden Membranstrukturen werden als Präperoxisomen bezeichnet. Das Einwirken der Drps wird entweder direkt an der ER-Membran (Modell I) oder aber zu einem späteren Zeitpunkt der Reifung, nachdem die Präperoxisomen miteinander verschmolzen sind und sich zu reifen Peroxisomen ausgebildet haben (Modell II), vermutet. Modell III geht hingegen davon aus, dass neue Peroxisomen lediglich durch Teilung aus bereits bestehenden Peroxisomen entstehen. Die für die Teilung erforderlichen Strukturen wie z.B. Lipide und PMPs werden in Form von Präperoxisomen durch das ER bereitgestellt und verschmelzen mit bereits existierenden Peroxisomen, bevor es zu einer Teilung kommt (modifiziert nach Motley und Hettema 2007, S. 400).

Im Gegensatz dazu steht das dritte Modell, welches davon ausgeht, dass Peroxisomen mittels Wachstum und anschließender Teilung entstehen. In diesem Modell wird vermutet, dass bestehende Peroxisomen mit präperoxisomalen Strukturen fusionieren. Die präperoxisomalen Strukturen werden durch das ER bereitgestellt und enthalten wichtige PMPs und Lipide. Abschließend werden die herangewachsenen Peroxisomen durch Drps geteilt. In diesem Modell findet folglich keine *de novo*-Bildung von Peroxisomen, sondern lediglich ein Stofftransport über das ER mit abschließender Teilung von vorbestehenden Peroxisomen statt (Lazarow und Fujiki 1985; Motley und Hettema 2007).

## 1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit soll zum Verständnis der Peroxisomenbiogenese beitragen. Es wird zunächst auf die Rolle des Drps Vps1p im Rahmen der frühen peroxisomalen Entstehung eingegangen. Dazu wurden verschiedene Hefestämme hergestellt, in denen zum einen das PEX3-Gen, aber auch das für Vps1p kodierende Gen manipuliert wurden. Weiterhin wird der räumliche Zusammenhang zwischen Peroxisomen und dem ER untersucht, indem bei allen Versuchen auch immer die Lokalisation der Peroxisomen in Relation zum ER beurteilt wird. Außerdem wurde ein Versuchsprotokoll erstellt, welches erlauben soll Peroxisomen in *S. cerevisiae* mit Hilfe hochauflösender STED-Mikroskopie zu untersuchen. Ziel dabei ist es, den räumlichen Zusammenhang zwischen Peroxisomen und ER näher beurteilen und dies auch in einen dreidimensionalen Kontext setzen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden für die Durchführung der Versuche genutzt. Sofern es nicht anders vermerkt ist, wurden diese von den unten angegebenen Firmen bezogen.

Produkt	Firma
4% Paraformaldehyd in PBS	USBiological
40% PEG3350	Sigma
5xHIFI-Puffer	BioCat
Agar	Carl Roth
Agarose	Bioline
Albumin-Fraktion V	Roth
Aminosäuren	Sigma-Aldrich oder Carl Roth
Ampicillin	Serva
clonNAT	WERNER BioAgents
Cl-Puffer	Qiagen
D-(+)-Raffinose pentahydrate	Roth
Dapi	Sigma
DMSO	Serva
D-Sorbit	Roth
EDTA	Roth
Ethanol	Sigma-Aldrich
Galactose	Roth
GelRed	BioTrend
GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331	Fermentas
Glass beads (acid washed)	Sigma
Glucose wasserfrei	Roth
Glycerol	Sigma/Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Immedge Pen	Vector
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich

LiOAc	Sigma/Roth
LMP-Agarose	Bethesda Research Laboratories
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Mowiol 4-88	Roth
Natriumacetat (NaAc)	Sigma/Roth
NaCl	Roth
Natriumhydrogendiphosphat dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	Sigma/Roth
NH <sub>4</sub> Oac	Sigma/Roth
Oligonukleotide	Metabion
Phenol Chloroform Isoamylalkohol	Roth
Pepton	Sigma/Roth
Pepton aus Casein	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma/Roth
Precissor-Polymerase	Invitrogen
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen
RNase A	Invitrogen
Solution B	eigene Herstellung
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
TRIS	Roth
Triton X	Sigma/Roth
Triton-X100	Roth
Vent-DNA-Polymerase	New England BioLabs
Yeast Nitrogen Base wo amino acids	Sigma
Zymolyase 20T	USBiological
β-Mercaptoethanol	Sigma

**Tabelle 2: Chemikalien**

### 2.2 Geräte

Geräte	Firma
Autoclave	Tecnomara
AXIO CAM HR	Zeiss
BioDocAnalyse-Transilluminator	BioDoc
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank	Memmert
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Drehrad	Schütt

Fastblot B43	Biometra
Inkubator	Incutec
Luminescent Image Analyzer	FUJI Film
Mikroskop AXIO	Zeiss
pH-Meter G820	Schott Gerät
Spannungsquelle	Biometra
Spectrophotometer	Nano Drop
Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortex	Janke & Kunkel
Zentrifuge für Falcons (Rotatanta)	Hettich
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich

**Tabelle 3: Geräte**

### 2.3 Aufreinigungs- und Reaktionssysteme (Kits)

Bezeichnung	Firma
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Nucleospin Extrakt II	Macherey-Nagel
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel

**Tabelle 4: Aufreinigungs- und Reaktionssysteme**

2.4 Mikroorganismen – *Saccharomyces cerevisiae*

Hefe	alternative Bezeichnung	relevanter Genotyp	Genotyp	Quelle
YST 401		BY4742 $\alpha$ Wildtyp	MATa; $\Delta$ his3; $\Delta$ leu2; $\Delta$ lys2; $\Delta$ ura3	Euroscarf
YST 1268	GALprom-GFP-PEX3, HDEL-dsRed	GALprom-GFP-PEX3, HDEL-dsRed	kanMX6-GALprom-GFP-PEX3; LEU2::HDEL-dsRed [YST831 mit PST 821 (EcoRV)]	Labor
YST 1269	GALprom-GFP-PEX3 $\Delta$ vps1 HDEL-dsRed	GALprom-GFP-PEX3 $\Delta$ vps1 HDEL-dsRed	YST 1227 NT2::vps1 [KO mit PST579 und OST424 u. 425] [YST 1227=Dvps1 LEU2::HDEL-dsRed] 443 chlo (579,424,25)	Labor
YST 1288		VPS1prom:: NT2-TEF1prom (VPS1 Überexpression)	YST 1268 VPS1prom:: NT2-TEFprom [PST 574 = pYM-N20, OST 660 u. 661]	diese Arbeit
YST 1108		$\Delta$ pex3	BY4742 $\alpha$ pex3::kanMX6	Euroscarf
YST 1141	$\Delta$ pex3 + GALprom-2xDendraPEX3	$\Delta$ pex3 + GALprom-2xDendraPEX3	BY4742 $\alpha$ PEX3::kanMX6 [YST 1108] + pGAL1prom-2xDendra-PEX3 (LEU2) [PST 918]	Labor
YST 1289	Wildtyp + GALprom-2xDendraPEX3	Wildtyp + GALprom-2xDendraPEX3	BY4742 $\alpha$ [YST 401] + pGAL1prom-2xDendra-PEX3 (LEU2) [PST 918]	diese Arbeit
	$\Delta$ pex3 + GALprom-2xDendraPEX3 + HcRed-SKL	$\Delta$ pex3 + GALprom-2xDendraPEX3 + HcRed-SKL	BY4742 $\alpha$ PEX3::kanMX6 [YST 1108] + pHcRed-SKL (LEU2) [PST 1041] + pGALprom-2xDendra-PEX3 (URA3) [PST 967]	diese Arbeit
YST 1226	$\Delta$ pex3 HDEL-dsRed	$\Delta$ pex3 HDEL-dsRed	BY4742 $\alpha$ pex3::kanMX6 [YST 1108] LEU2::HDEL-dsRed [PST 821]	Labor
		$\Delta$ pex3 HDEL-dsRed GALprom-2xDendraPEX3	YST 1226 + pGALprom-2xDendra-PEX3 (URA3) [PST 967]	diese Arbeit
		pHcRed-SKL pSEC63-GFP (Wildtyp)	BY4742 $\alpha$ + pLEU2::HcRed-SKL [PST 1041] pSEC63-GFP URA3 [PST 428]	diese Arbeit
YST 1285		PEX3-6HA	BY4742 $\alpha$ pex3term::6HA-natNT2 [PST 524 = pYM17, OST 641/2]	diese Arbeit
	Immun-fluoreszenz	PEX3-6HA + SEC63-GFP	BY4742 $\alpha$ PEX3-6HA::natNT2 [YST 1285] + pSEC63-GFP LEU2 [PST 398]	diese Arbeit

Tabelle 5: Stämme von *S. cerevisiae* mit Stammbezeichnung, Genotyp und Herkunft

## 2.5 Plasmide und Vektoren

Plasmid-Nr.	Bezeichnung
PST 574	pYM-N20 [benutzt für cloNAT-TEF-3HA]
PST 1041	pEX097 TPI1-HcRed-SKL (PGK1term) (Ycplac111) (LEU/CEN)
PST 967	pRS416 GAL2xDendraPEX3 (URA)

PST 918	GAL1prom-2xDendra-PEX3 (LEU)
PST 428	SEC63-GFP (URA)
PST 398	YCplac111 SEC63-GFP (LEU/CEN)
PST 821	HDEL-DsRED "Iana" (LEU)

**Tabelle 6: Plasmide und Vektoren**

### 2.6 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung
OST 660	GGACCGTACG AAAACTGCAC ATTTTATATT ATCAGATATC CGTACGCTGCAGGTCGAC	VPS1 Überexpression
OST 661	CAAAGCGTCCTGAAGCTTGTTAATAGTAGAAATTAATGCTCATC CATCGATGAATTCTCTGTCTCG (rev)	VPS1 Überexpression
OST 647	cCAGAACCTTTCAGTCGCCGGtcACAAGCgtcgtcCTCTTGCTCCATCA Gtaggc	Testprimer VPS1 Überexpression
OST 700	GGTCTCCTGGTGACAATACCAGT (rev)	Testprimer VPS1 Überexpression
OST 641	CCAGCGTATACAGCAACTTTGGCGTCTCCAGCTCGTTTTTCCTTCA AGCCT CGTACGCTGCAGGTCGAC	PEX3-6HA
OST 642	CAGGGTAATGTCATGTTACCTATTGCACACTTACTGTATTAAGA TTACGC ATCGATGAATTCGAGCTCG	PEX3-6HA
OST 643	GCGCTACGTTTGTTAGTATTC (rev)	Testprimer Immunfloreszenz
OST 645	GCTGGAGGTCACCAACGTCAAC (forw)	Testprimer Immunfluoreszenz

**Tabelle 7: Oligonukleotide**

## 2.7 Antikörper

Die im Folgenden aufgeführten Antikörper wurden für diese Arbeit verwendet. In der Tabelle sind die Bezeichnung der Antikörper, das jeweilige Ziel-Antigen, die Herkunft und die verwendeten Verdünnungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie angegeben. Die vor den Antikörpernamen angegebenen Kleinbuchstaben geben das jeweilige Tier an, aus dem der Antikörper gewonnen wurde bzw. gegen welches er gerichtet ist (m=Maus, r=Kaninchen).

### 2.7.1 Primär-Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Bezeichnung	Primär-Antikörper	Verdünnung	Quelle
$\alpha$ HA <sub>r</sub>	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) gegen HA-Tag	1:200	Abcam
$\alpha$ GFP <sub>m</sub>	monoklonaler Antikörper (Maus) gegen GFP	1:200	Abcam

Tabelle 8: Primäre Antikörper mit Verdünnungsangabe

### 2.7.2 Sekundär-Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Bezeichnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Quelle
Atto590 <sub>r</sub>	Antikörper aus der Ziege gerichtet gegen Kaninchen-Protein	1:200	MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen
Atto647 <sub>m</sub>	Antikörper aus dem Schaaf gerichtet gegen Maus-Protein	1:200	MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen
Alexa488 <sub>m</sub>	Antikörper aus dem Affen gerichtet gegen Maus-Protein	1:200	Invitrogen
Cy3 <sub>r</sub>	Antikörper aus der Ziege gerichtet gegen Kaninchen-Protein	1:200	JacksonImmuno-Research

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper mit Verdünnungsangabe



### 2.8 Medien für Hefekulturen

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte auf Agar-Platten im Brutschrank bzw. in 10 ml flüssigem Medium (soweit nicht anders vermerkt) im Schüttler (200 rpm) bei jeweils 30°C.

Der jeweiligen genetischen Situation und Versuchsfragestellung angepasst, erfolgte die Anzucht der Hefekultur entweder in YP-Vollmedium oder Sx-Drop-out-Medium und mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (s.u.). Zu beachten ist, dass bei der Herstellung des Sx-Drop-out-Mediums der pH stets auf 6,5 eingestellt wurde, da dies für eine möglichst effiziente Transformation besonders wichtig ist. Zur Herstellung von Agar-Platten wurden 2% (w/v) Agar zu den Medien hinzugegeben.

Die Medien wurden mit Ausnahme der Raffinose bei 121°C für 15 min autoklaviert. Die Raffinose wurde stets frisch angesetzt und steril filtriert.

#### YP-Medium:

1% (w/v) Yeast extract, 2% (w/v) Peptone

je nach Fragestellung wurde 2% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Galaktose oder 4% (w/v) Raffinose als zusätzliche Kohlenstoffquelle hinzugegeben.

#### Sx-Medium:

0,6% (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,08% (w/v) Synthetic Complete Drop Out Mix (SC drop-out)

je nach Fragestellung wurde 2% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Galaktose oder 4% (w/v) Raffinose als zusätzliche Kohlenstoffquelle hinzugegeben.

#### Aminosäuremischung für den SC drop-out Mix:

2 g Adenin-hemisulfat

2 g L-Arginin-HCl

2 g L-Histidin-HCl

2 g L-Isoleucin

2 g L-Leucin

2 g L-Lysin-HCl

2 g L-Methionin

3 g L-Phenylalanin

- 2 g L-Threonin
- 2 g L-Serin
- 3 g L-Tryptophan
- 2 g L-Tyrosin
- 1,2 g Uracil
- 9 g L-Valin

Um das benötigte Selektionsmedium zu erhalten, wurden die jeweiligen Aminosäuren weggelassen.

### **2.9 Puffer und Lösungen**

#### 5xDNA-Ladepuffer (Orange G):

15% Ficoll 400; 200 mM EDTA; 0,1% Orange G

#### Breaking-Puffer:

2 % Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8

#### „Janke-Puffer“:

500 mM Tris-HCl pH 9,2; 22,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 160 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; 20% DMSO; 1% Triton-X100

#### PBS:

140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4

#### PBST:

PBS mit 0,1% (v/v) Tween-20

#### PCI:

25 mM Phenol; 24 mM CHCl<sub>3</sub>; 1 mM Isoamylalkohol

#### PEG-COMP:

100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA/NaOH pH 8; 40% PEG 3350

#### Permeabilisierungslösung:

PBS mit 0,1% Triton X-100; 10 mM Glycin; 0,1% BSA

### Solution B:

1 M  $K_2HPO_4$  + 1 M  $KH_2PO_4$  mischen und auf pH 7,5 einstellen; 100 mM dieser Lösung;  
1,2 M Sorbitol

➤ Die fertige Lösung wurde anschließend steril filtriert.

### SORB:

100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA/NaOH pH 8; 1 M Sorbitol

### TAE-Puffer:

40 mM Tris-HCl pH 8; 0,1% (v/v) Eisessig; 1 mM EDTA pH 8

### TE:

10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

## **2.10 Herstellung von Mowiol**

Für das dauerhafte Einbetten von Zellen der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde Mowiol verwendet, welches wie folgt zubereitet wurde.

Zunächst wurden 6 g Glycerin mit 2,4 g Mowiol gemischt und bei Raumtemperatur unter Rühren eine Stunde gelöst. Anschließend wurden dem Gemisch 6 ml Wasser hinzugegeben und alles für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 12 ml 0,2M Tris-HCl pH 8,5 hinzugegeben und alles für zwei Stunden bei 50°C inkubiert. Währenddessen wurde die Lösung alle 20 min für jeweils zwei Minuten auf einem Magnetrührer vermischt. Das fertige Mowiol wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.11 Molekularbiologische Methoden

#### 2.11.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Dichtebestimmung von *S. cerevisiae* in flüssigem Medium wurde ein Biophotometer benutzt. Bei einer Wellenlänge von 600 nm entspricht eine  $OD_{600}=1$  ungefähr  $3 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter Flüssigkultur.

#### 2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Nukleinsäuren-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde photometrisch mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Dabei entspricht eine  $OD_{260}=1$  ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA in der Lösung.

#### 2.11.3 PCR-basiertes Tagging von Hefe-Genen

Das Protokoll für das Tagging von Hefe-Genen beruht auf den Angaben bei Janke et al. 2004. Zunächst wurde ein PCR-Mix von 50 µl hergestellt. Der Ansatz erfolgte stets auf Eis.

PCR-Mix: 5 µl eines 10% (w/v) „Janke Puffer“  
4,67 µl eines 3,75 mM dNTP-Mix  
0,4 µl eines 100 µM Sx-Primer  
0,4 µl eines 100 µM Sy-Primer  
100 µg/ml Plasmid (DNA-Matritze)  
35,78 µl H<sub>2</sub>O

Nach dem Mischen erfolgte ein *hot start*. Die Menge der Polymerasen wurde abweichend vom ursprünglichen Protokoll auf 2,5 U Taq-Polymerase und 0,5 U Vent-Polymerase erhöht.

Amplifikationsprogramm:

Zyklen	Temperatur	Reaktionszeit
1	97°C	3 min
Zugabe der Polymerasen		
10	97°C	1 min
	54°C	30 sec
	68°C	2 min 40 sec
20	97°C	1 min
	54°C	30 sec
	68°C	2 min 40 sec + 20 sec/Zyklus
	4°C	

**Tabelle 10: Amplifikationsprogramm für das Tagging von Hefe-Genen**

Das Protokoll wurde für das auf natNT2-basierende pYM17-Plasmid (6HA-Tag) durchgeführt. Die Kontrolle des PCR-Produktes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und zeigte eine Bande bei der erwarteten Größe von 1670 bp.

**2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Durch PCR entstandene DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt um diese anschließend zu analysieren. Bei dieser Methode wird die unterschiedliche Mobilität der negativ geladenen DNA genutzt, die von der Molekülgröße und -form und der Agarosekonzentration des Gels abhängig ist. Es wurden horizontale Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1% (w/v) Agarose verwendet. Dabei wurde die Agarose in TAE-Puffer gelöst. Zum Färben der Nukleinsäuren wurde der Fluoreszenzfarbstoff GelRed mit einer Konzentration von 1% (v/v) direkt in die Gellösung gegeben. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit dem 5xDNA-Ladepuffer vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V und Raumtemperatur. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm analysiert, wodurch die mit GelRed gefärbten DNA-Banden sichtbar gemacht wurden.

### **2.11.5 Transformation von kompetenten Hefezellen**

Die Methode dieser Hefe-DNA-Transformation beruht auf dem Protokoll von Schiestl und Gietz (Schiestl und Gietz 1989).

Herstellung kompetenter Hefezellen: Zunächst wurde von dem jeweiligen Hefestamm eine Vorkultur in YPD-Medium angelegt und diese über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte mit einem Photometer bestimmt und die Zellen so verdünnt, dass nach einer weiteren Inkubation von 5 Stunden in 50 ml vorgewärmtem YPD-Medium eine  $OD_{600}=0,6$  erreicht wurde. Nachdem die Zellen mit sterilem  $H_2O$  und SORB gewaschen wurden, wurde das Zellpellet in 360  $\mu l$  SORB gelöst und mit 0,4 mg Lachsspermien-DNA vermischt, die als Träger der Einzelstrang-DNA diente. Die Lachsspermien-DNA wurde vor Gebrauch bei  $95^\circ C$  für 10 Minuten denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Die hergestellten kompetenten Hefestämme wurden aliquotiert und nicht direkt benötigte Zellen bei  $-80^\circ C$  gelagert.

Transformation: Für die Transformation mit Plasmid-DNA wurden 10  $\mu l$  der kompetenten Zellen genutzt, sollte ein PCR-Produkt transformiert werden, wurden 50  $\mu l$  benötigt. Nach Zugabe von 4-5  $\mu g$  DNA und der 6fachen Menge (ausgehend vom Gesamtvolumen) PEG-COMP, wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde DMSO mit einer Endkonzentration von 10% hinzugegeben. Dann erfolgte eine Hitzeschockreaktion im Wasserbad bei  $42^\circ C$  für 15 Minuten. Abschließend wurden die Zellen bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 150  $\mu l$   $H_2O$  resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die jeweiligen Selektionsplatten gegeben und wie oben beschrieben bei  $30^\circ C$  für 3 Tage inkubiert. Wenn das PCR-Produkt den Marker natNT2 enthielt, wurde das Zellpellet in 3 ml YPD-Medium gelöst, im Schüttler für 5 Stunden bei  $30^\circ C$  inkubiert, anschließend bei 2000 rpm zentrifugiert und erst dann auf die Selektionsplatten aufgetragen.

### **2.11.6 Genomische DNA**

Mit Hilfe des folgenden Protokolls wurde genomische DNA aus *S. cerevisiae* hergestellt um im Anschluss mittels einer Hefe-Kolonie-PCR festzustellen, ob die Integration von DNA in das Hefegenom erfolgreich war. Zunächst wurde eine 5 ml Vorkultur in YPD-Medium

angesetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach einem Waschschrift mit ca. 350 µl H<sub>2</sub>O wurde das Zellpellet in 200 µl Breaking-Puffer gelöst und mit derselben Menge Glass Beads vermischt. Nach der Zugabe von 200 µl PCI wurden die Proben für 1 Minute auf dem Vortex geschüttelt, anschließend für 1 Minute auf Eis gekühlt und dieser Vorgang zwei weitere Male wiederholt. Dann wurden dem Gemisch 200 µl TE hinzugegeben und alles bei 4°C für 10 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die entstandene wässrige Phase wurde abgenommen und in eine neue Eppendorf-Tube überführt. Hierbei musste gewährleistet werden, dass von der Proteinphase nichts mitüberführt wurde. Nach Zugabe von 1 ml 100% Ethanol (-20°C) wurde das Gemisch erneut bei 4°C für 10 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 400 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Nach der Zugabe von 6 µl einer 5 mg/ml RNaseA wurden die Proben für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Dann erfolgte die Zugabe von 10 µl 3M NH<sub>4</sub>OAc und 1 ml 100% Ethanol (-20°C). Nachdem alles gut gemischt wurde, erfolgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurden die Proben bei 4°C für 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 750 µl 70% Ethanol (-20°C) hinzugegeben und das Gemisch ein letztes Mal bei 4°C für 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei 50°C ca. 5 Minuten getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl TE gelöst. Die enthaltene Konzentration DNA wurde mit Hilfe des Spektralphotometers bestimmt.

### 2.11.7 Hefe-Kolonie-PCR

Bei diesem Versuch wurde der Genabschnitt des Hefestammes amplifiziert, der die zuvor neu integrierte DNA enthalten musste, sofern die Transformation erfolgreich war. Als Matrize diente die genomische DNA des jeweils zu testenden Stammes von *S. cerevisiae*. Der Reaktionsmix wurde auf Eis angesetzt.

Reaktionsmix: 10% (w/v) CI-Puffer  
 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,187 mM dNTP's  
 100 pmol S<sub>x</sub>-Primer  
 100 pmol S<sub>y</sub>-Primer  
 1% (w/v) Triton X-100

Zunächst wurden die Hefezellen dem Reaktionsgemisch direkt zugegeben. Dies führte in der Amplifikation allerdings nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Darum wurde genomische DNA aus dem Hefestamm gewonnen und diese dann mit einer Endkonzentration von 10 ng/μl in das Reaktionsgemisch gegeben.

#### Amplifikationsprogramm:

Zyklen	Temperatur	Reaktionszeit
1	95°C	3 min
34	95°C	30 sec
	54°C	30 sec
	72°C	2 min
1	72°C	5 min
	4°C	

**Tabelle 11: Amplifikationsprogramm zur Transformationskontrolle**

Nach der Amplifikation erfolgte die Analyse der Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese.



### 2.12 Puls-Chase-Experiment

Der Versuchsablauf beruht auf den Angaben von Hoepfner et al. 2005.

Die Grundlage des Versuchs besteht darin, dass die Bildung des peroxisomalen Matrixproteins Pex3p unter die Kontrolle eines Galaktose-abhängigen Promotors gestellt wurde. Folglich konnte Pex3p in den verwendeten *S. cerevisiae*-Stämmen nur dann gebildet werden, wenn Galaktose zur Verfügung gestellt wurde (Puls). Darüber hinaus war das Genom der verwendeten Hefestämme so verändert, dass zwischen dem Galaktose-Promotor und dem Gen für Pex3p ein fluoreszierendes Protein eingefügt war. Dies ermöglichte eine Verfolgung (Chase) des neugebildeten Pex3p mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Zunächst wurden die Zellen in 10 ml YP- oder dem jeweiligen Drop-out-Medium mit 2% (w/v) Glukose für mindestens 5 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frisch angesetztes, steril filtriertes Medium (YP oder Drop-out) mit 4% (w/v) Raffinose umgesetzt und über Nacht (allerdings maximal 10 Stunden) bei 30°C inkubiert, so dass am nächsten Morgen eine maximale  $OD_{600}=2$  erreicht wurde. Die Zellen wurden dann für 3 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10 ml YP-Medium mit 2% (w/v) Galaktose resuspendiert.

Dieser Galaktose-induzierte Puls dauerte 1 Stunde. Während dieser Zeit wurden die Zellen wie üblich bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 20 ml YP-Medium mit 4% (w/v) Glukose resuspendiert (t=0).

Nun wurde die Galaktose-abhängige Bildung von Pex3p mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 45 Minuten, 2 Stunden und 3,5 Stunden. Zu diesen Zeitpunkten wurde jeweils 1 ml der Zellen entnommen und diese mit Hilfe von 1% LMP-Agarose eingebettet.

### 2.13 Einbettung von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Soweit nicht anders angegeben, wurde 1 ml der zu analysierenden Zellschlamm entnommen, bei 13.900 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden 100 µl 4% Paraformaldehyd in PBS zur Fixierung auf die Zellen gegeben. Nach 1 min Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in PBS gelöst. Nach einer letzten Zentrifugation und Abnehmen des Überstands wurden ca. 3 µl

Zellen mit der gleichen Menge 1%-iger LMP-Agarose auf einem Objektträger vermischt. Die LMP-Agarose wurde zuvor im Wasserbad geschmolzen. Sollten die Zellen mit Hilfe der Live-Zell-Mikroskopie analysiert werden, entfiel der Fixierungsschritt mittels Paraformaldehyd, die Zellen wurden folglich direkt mit PBS gewaschen. Um die schonende Fixierung der Hefezellen zu optimieren, wurde die 1%-ige LMP-Agarose in 4% (w/v) YPD gelöst. Abschließend wurden die Zellen durch ein Deckglas abgedeckt und konnten je nach Fragestellung am Mikroskop analysiert werden.

### 2.14 Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Verfahren zur Immunfluoreszenzmikroskopie beruht auf der Arbeit *Fluorescence Microscopy Methods for Yeast* (Pringle et al. 1989) und wurde nach eigenem Bedarf modifiziert.

Vorbereitung der Objektträger: Die Objektträger wurden zunächst mit Ethanol gesäubert. Anschließend wurden mit Hilfe des Immedge-Pen Felder aufgetragen. In diese Felder wurden 20 µl Poly-L-Lysin 0,1 % (w/v) gegeben und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach wurde das überschüssige Poly-L-Lysin aspiriert und die Objektträger bei 30°C über Nacht getrocknet.

Ansetzen einer Vorkultur: Am Vortag des Versuchs wurden die jeweiligen Zelllinien entweder in 10 ml YPD-Vollmedium oder ggf. in SD-Leu- oder SD-Ura-Drop-out-Medium bis zum Abend bei 30°C im Schüttelschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellkonzentration bei OD<sub>600</sub> festgestellt und die Menge Zellen in 50 ml vorgewärmtes Medium umgesetzt, die bei der geplanten Inkubationszeit benötigt wurden, um am Morgen des Versuchstages eine max. OD<sub>600</sub>=2 zu erhalten. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 30°C im Schüttelschrank.

Zellgewinnung: Zunächst wurde die optische Dichte erneut gemessen und die Menge entnommen, die 10 OD<sub>600</sub> entsprach. Diese Menge wurde für 3 Minuten bei 13.900 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 0,5 ml Solution B gelöst, dann wurde das Gemisch erneut zentrifugiert.

Fixierung: Der entstandene Überstand wurde abgenommen und 1 ml 4%-iges Paraformaldehyd in PBS auf das Zellpellet gegeben. Dieses Gemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu fixieren.

Wandverdau: Nach dem Fixieren wurden die Zellen zunächst zweimal mit Solution B gewaschen (siehe Abschnitt Zellgewinnung). Dann wurden die Zellen in einem Gemisch aus 1 ml Solution B, 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 20  $\mu$ l eines 20T Zymolyase-Stockes (5 mg/ml Zymolyase in KPi (pH7,5)) gelöst und bei 37°C im Schüttler auf mittlerer Schüttelstufe für 45 Minuten inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut zweimal mit Solution B gewaschen, allerdings muss dabei beachtet werden, dass die Zellen nach Abschluss des Wandverdaues nur noch bei max. 6.000 rpm zentrifugiert werden durften.

Permeabilisierung: Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen in 200  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer gelöst und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Waschschrift.

Blocken: Es wurden 0,5 ml 10% BSA zum Zellpellet hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein letzter Waschschrift und dann wurden die Zellen in 0,3 ml Solution B gelöst.

Auftragen auf Objektträger: Auf die am Vortag vorbereiteten Objektträger wurden jeweils 20  $\mu$ l der Zellsuspension gegeben. Nach 5 Minuten wurde die Zellsuspension aspiriert und der Überstand auf dem Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet.

Primär-Antikörper: Auf die Zellen, die sich nun auf den Feldern des Objektträgers befanden, wurde anschließend 20  $\mu$ l der Lösung gegeben, die den oder die primären Antikörper enthielten (Verdünnung s. Material Tab. 9). Die Objektträger wurden über Nacht in einer Kammer bei 4°C und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Waschen: Am nächsten Tag wurden die primären Antikörper aspiriert und die Felder zehnmal mit 50  $\mu$ l 1% (w/v) BSA in PBS gewaschen. Dabei wurde zunächst ein Teil der Felder siebenmal gewaschen, in dem jeweils 20  $\mu$ l der Lösung auf die Felder aufgetragen wurden und diese dann anschließend wieder aspiriert wurden.

Nach dem 7. Waschschrift wurde die Lösung auf den Feldern belassen und zunächst der andere Teil der Felder ebenfalls siebenmal gewaschen, so dass die Lösung über einen längeren Zeitraum einwirken konnte.

Sekundär-Antikörper: Nachdem jedes Feld zehnmal gewaschen worden war, wurden 20  $\mu$ l des jeweiligen sekundären Antikörpers aufgetragen (Verdünnung s. Methoden, Tab. 9). Dieser wurde bei 30°C für 2 Stunden in der Feuchtluftkammer inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Waschzyklus (siehe Abschnitt Waschen). Für Doppelfärbungen wurde

ein erneuter Inkubationsschritt mit dem zweiten sekundären Antikörper durchgeführt und nach abgelaufener Inkubationszeit erfolgte wieder der oben beschriebene Waschzyklus.

Einbettung: Vor der Einbettung mit Mowiol ist es notwendig im Waschzyklus einen 15-minütigen Inkubationsschritt mit mit DAPI versetztem PBS einzuschleiben (1 µl DAPI auf 1ml PBS 1%) um eine Färbung der Zellkerne zu erhalten. Bei der Einbettung mit ProLong Gold ist dieses Vorgehen nicht nötig, da das verwendete ProLong Gold bereits diesen Kern markierenden blauen Fluoreszenzfarbstoff enthält.

Jeweils 20 µl Einbettmedium wurden auf die Felder gegeben, dann wurden die Felder mit einem Deckglas abgedeckt und die Objektträger im Kühlschrank über Nacht ausgehärtet. Anschließend konnten die Zellen unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

### **2.15 Mikroskopische Analysen**

Sämtliche mikroskopische Analysen wurden mit dem Axio-Mikroskop von Zeiss durchgeführt und mit der Axio Cam HR ebenfalls von Zeiss aufgenommen.

Die Proben des Immunfluoreszenzversuchs wurden zusätzlich mittels konfokaler Mikroskopie (Zeiss LSM 710) untersucht. Sämtliche Maßstabsbalken in den Abbildungen stehen für eine Größe von 2 µm.

---

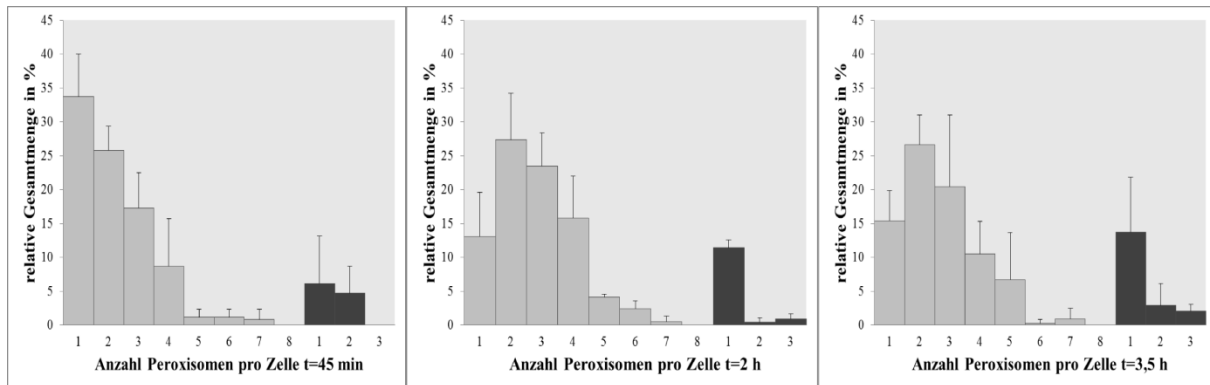
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Rolle von Vps1p in der peroxisomalen Biogenese

Dieser Versuch wurde durchgeführt um zu klären, ob Vps1p an der Neuentstehung von Peroxisomen in *S. cerevisiae* beteiligt ist. In den verwendeten Zellstämmen wurde das peroxisomale Membranprotein Pex3p unter den Einfluss eines Galaktose-Promotors gestellt. Neues Pex3p konnte nur nach Inkubation mit Galaktose gebildet werden. Da Pex3p neben Pex19p maßgeblich an der Bildung von Peroxisomen beteiligt ist, können diese nicht entstehen, wenn kein Pex3p vorhanden ist. Bei den für diesen Versuch genutzten Zellen handelte es sich zu Versuchsbeginn um  $\Delta$ pex3p-Zellen, in denen folglich keine Peroxisomen vorhanden waren. Erst unter Zugabe von Galaktose konnte Pex3p und damit neue Peroxisomen entstehen. Es handelt sich also um Peroxisomenneogenese. Die Zellen wurden genetisch so manipuliert, dass sowohl Peroxisomen als auch das ER mittels eingebrachter Markerproteine fluoreszierten. Damit war es möglich zu jedem Zeitpunkt den räumlichen Zusammenhang von Peroxisomen und ER zu beurteilen. Um den Einfluss von Vps1p an der peroxisomalen Biogenese zu klären, wurden vergleichsweise Wildtyp-,  $\Delta$ vps1p- und Vps1p-Überexpressions-Zellen untersucht. Die Zellen wurden 45 Minuten in Galaktose-haltigem Medium inkubiert (Puls) und danach in YPD-Vollmedium umgesetzt um den Promotor zu unterdrücken und somit eine zu starke Expression von neuem Pex3p zu vermeiden. Die Aufnahmen wurden 45 Minuten, 2 Stunden und 3,5 Stunden nach Beendigung des Pulses durchgeführt. Der Versuch wurde insgesamt dreimal ausgeführt. Bei der Versuchsauswertung wurden die Peroxisomen in durchschnittlich 60 Zellen pro Versuchszeitpunkt und Versuchstag gezählt, dabei wurde jede der jeweils sieben aufgenommenen Ebenen bewertet. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Auswertung der einzelnen Zelltypen skizziert. Im Anschluss erfolgt ein Vergleich von Wildtyp-,  $\Delta$ vps1p- und Vps1p-Überexpressions-Zellen.

### 3.1.1 Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen im Zeitverlauf in Wildtypzellen

Bei der Auswertung der Galaktose-abhängigen Neubildung von Peroxisomen in Vps1p-Wildtyp-Zellen zeigte sich, dass im Zeitverlauf von 45 Minuten bis 3,5 Stunden nach erfolgtem Galaktose-Puls die durchschnittliche Anzahl an Peroxisomen zunahm.



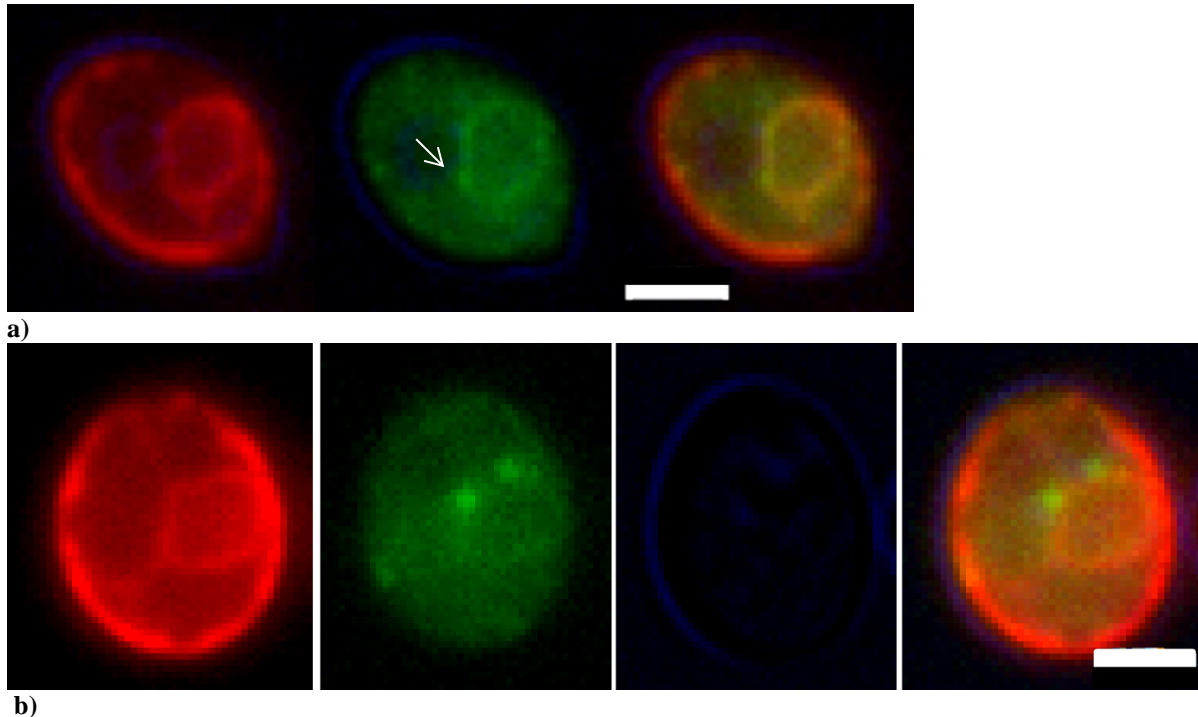
**Abb. 3.1: Häufigkeit von Peroxisomen in Wildtypzellen 45 min, 2 h und 3,5 h nach Galaktose-Puls**

In Hellgrau dargestellt sind die Häufigkeiten von morphologisch normal konfigurierten Peroxisomen pro Zelle. Die dunkelgrauen Balken stehen für die Anzahl an elongiert erscheinenden peroxisomalen Strukturen. Die Zellzahlen der Rubriken wurden in Bezug auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen relativiert.

Der Abbildung 3.1 sind die Häufigkeiten von Peroxisomen pro Vps1p-Wildtypzelle zu entnehmen. Diese Art der Darstellung verdeutlicht, wie sich die peroxisomale Verteilung in den Zellen über den Zeitverlauf verschiebt. Während nach 45 Minuten noch bei ca. 60 % der Zellen nur 1-2 Peroxisomen vorhanden waren, lag die durchschnittliche Peroxisomenzahl 3,5 Stunden nach Galaktose-Puls eher bei 2-3 pro Zelle. Bei genauer Betrachtung der Zellen konnte außerdem festgestellt werden, dass in einer geringen Anzahl Zellen die peroxisomalen Strukturen eher elongiert, statt wie sonst punktförmig konfiguriert auftraten (dargestellt als dunkle Balken in Abb. 3.1). Dieser Zustand wurde bei  $\Delta vps1p$ -Zellen gehäuft beobachtet (Abschnitt 3.1.2). Es ist darüber hinaus interessant, die Abbildung 3.1 mit den Abbildungen der peroxisomalen Häufigkeiten in  $\Delta vps1p$ - und Vps1p-Überexpressionszellen (Abb. 3.4 und 3.9) zu vergleichen. Hierauf wird jedoch in Abschnitt 3.1.4 näher eingegangen.

Da durch die genetische Manipulation Peroxisomen und ER mittels Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden konnten, war es möglich neben der peroxisomalen Häufigkeit in den Vps1p-Wildtyp-Zellen auch die enge Verbindung von Peroxisomen und ER näher zu beobachten und im Zeitverlauf zu beurteilen. Vor allem 45 Minuten nach Beendigung des Galaktose-Pulses zeigte sich deutlich, dass die beiden Fluorophore kolokalisierten. Diese

Kolokalisation und auch die frühe Bildung von Peroxisomen, die Zellkern-nah in enger Verbindung mit dem ER stattfindet, sind in Abbildung 3.2 (a-b) dargestellt.



**Abb. 3.2 a-b: Wildtypzellen 45 min nach Galaktose-Puls**

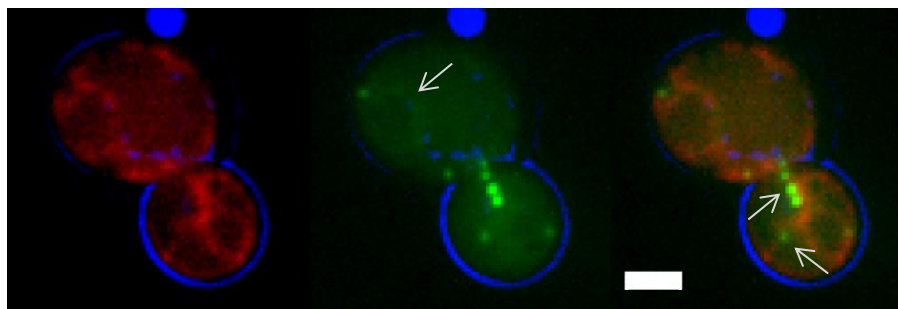
rot: HDEL-DsRed (ER); grün: GFP-Pex3p (Peroxisomen); blau: Durchlicht (Zellkontur)

Das Pex3p stellt sich nach 45 min sowohl in einer ringförmigen Struktur dar, die mit der perinukleären Struktur des ERs deckungsgleich ist (a) als auch als punktförmige Struktur am Zellkern-nahen ER (b).

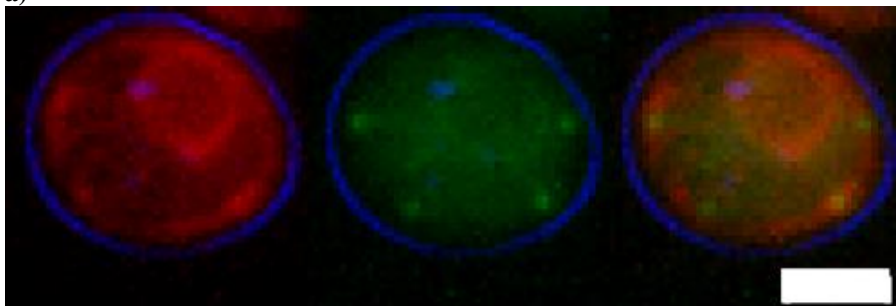
In Abbildung 3.2 b befinden sich zwei Peroxisomen eng assoziiert mit dem perinukleären ER, wie es für diesen Zeitpunkt bei Wildtypzellen typisch ist. Ein weiteres typisches Bild ist in Abbildung 3.2 a gezeigt. Hier hat sich am perinukleären ER bisher nur ein kleines Peroxisomen gebildet (Pfeil). Die dargestellte Ebene wurde gewählt, um zu verdeutlichen, dass noch eine große Menge des Pex3p am bzw. im ER lokalisiert ist. In dem Mischbild dieser Abbildung wird deutlich, dass diese Struktur im roten (ER) und grünen (Pex3p) Kanal deckungsgleich ist. Die beiden Strukturen kolokalisieren. Diese Beobachtung wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt beschrieben (Hoepfner et al. 2005). Die Struktur wurde als peroxisomales ER bezeichnet. Hoepfner und seine Arbeitsgruppe haben außerdem bewiesen, dass das Auftreten von Pex3p im ER nicht aufgrund einer Fehllokalisierung durch die genetische Manipulation zustande kommt. Selbst wenn vollausbildete Peroxisomen in Zellen vorliegen, durchläuft Pex3p zunächst das ER, bevor es in Peroxisomen sichtbar wird (Hoepfner et al. 2005). Auch in der Zelle in Abbildung 3.2 b, in der sich ja bereits zwei

deutlich fluoreszierende Peroxisomen gebildet haben, ist schwach angedeutet noch das mit dem ER kolocalisierende Pex3p zu erkennen. Bemerkenswert ist dabei, dass zu jedem Zeitpunkt lediglich das Zellkern-nahe ER mit dem Pex3p-Pool kolocalisiert. Im peripheren ER-Netzwerk ist kein Pex3p zu finden. Folglich ist das peroxisomale ER perinukleär lokalisiert.

Im Zeitverlauf nimmt der ER-lokalisierte Pool von Pex3p immer mehr ab. Es wird sozusagen aus dem ER geschwemmt, möglicherweise um für die Bildung von neuen Peroxisomen zur Verfügung zu stehen. Nach 2 bzw. 3,5 Stunden ist nur noch ein geringer Teil des Pex3p im ER auszumachen. Die größte Menge befindet sich zu diesen Zeitpunkten in den neugebildeten Peroxisomen (s. Abb. 3.3 a-b). Wenn man die Abbildungen genau betrachtet, scheinen die entstandenen Peroxisomen außerdem im Zeitverlauf von zentral (perinukleär) nach peripher abzuwandern.



a)



b)

**Abb. 3.3 a-b: Wildtypzellen 2 h (a) und 3,5 h (b) nach Galaktose-Puls**

rot: HDEL-DsRed (ER); grün: GFP-Pex3p (Peroxisomen); blau: Durchlicht (Zellkontur)

a) Nach 2 h ist ein peroxisomaler ER-Ring immer noch schwach zu erkennen (Pfeil im grünen Kanal). Die Pfeile im Mischbild weisen auf die enge Assoziation von Peroxisomen und ER-Netz hin (siehe Text).

b) Das Pex3p scheint nach 3,5 h mittlerweile weitestgehend das ER verlassen zu haben.

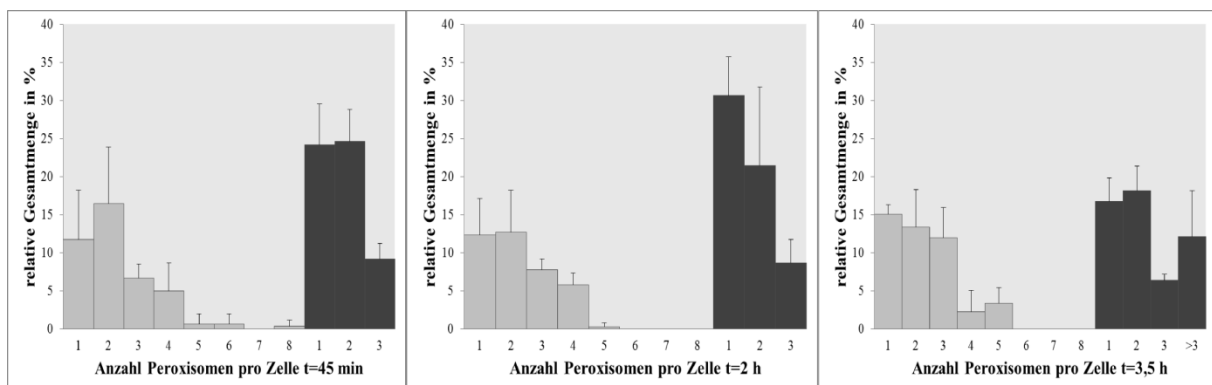
Die Peroxisomen, die man nach 45 Minuten in den Zellen erkennen kann, scheinen am perinukleären ER zu entstehen (s. Abb. 3.2 a-b). Die Tatsache, dass Peroxisomen genau in dieser Lokalisation entstehen, wird verständlich, wenn man bedenkt, dass das neugebildete



Pex3p zunächst im ER auftaucht. Denn wie bereits beschrieben, ist das peroxisomale ER nur perinukleär lokalisiert. Nach 2 Stunden befindet sich ein Teil der Peroxisomen immer noch am perinukleären ER, ein Teil der Peroxisomen bewegt sich zu diesem Zeitpunkt allerdings in die Peripherie. Auch hierbei besteht eine enge Assoziation zu einem Teil des ERs. Eine solche Situation ist in Abbildung 3.3 a mit Hilfe von Pfeilen im Mischbild verdeutlicht. Man kann erkennen, dass die Peroxisomen an einem ER-Steg hängen, der vom Zentrum in die Peripherie ausstrahlt. Nach 3,5 Stunden ist dann der größte Teil der Peroxisomen am peripheren ER, also Zellrand-nah lokalisiert (s. Abb. 3.3 b). Nachdem der Phänotyp von Wildtypzellen in Bezug auf die peroxisomale Biogenese ausführlich beschrieben wurde, stellt sich die Frage ob und ggf. wie sich dieser verändert, wenn das Vps1p deletiert bzw. überexprimiert wird.

### 3.1.2 Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen im Zeitverlauf in $\Delta vps1p$ -Zellen

Bei der Auswertung der Galaktose-abhängigen Neubildung von Peroxisomen in  $\Delta vps1p$ -Zellen konnte beobachtet werden, dass die Gesamtmenge von Peroxisomen pro Zelle geringer ausfiel, als dies bei den Wildtypzellen der Fall war (s. Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Peroxisomale Häufigkeit in  $\Delta vps1p$ -Zellen 45 min, 2 h und 3,5 h nach Galaktose-Puls**

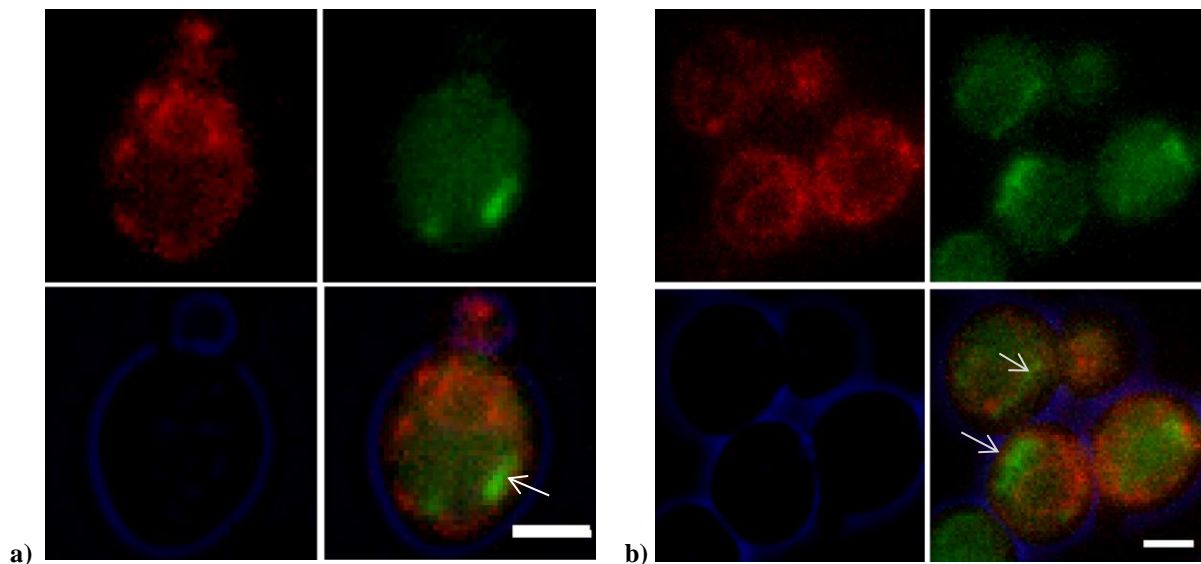
In Hellgrau dargestellt ist die Anzahl von morphologisch normal konfigurierten Peroxisomen pro Zelle. Die dunkelgrauen Balken stehen für die jeweiligen Mengen an elongiert erscheinenden peroxisomalen Strukturen. Die Gesamtmenge der ausgewerteten Zellen ist hier in relativen Zahlen dargestellt.

Deutlich vermehrt waren dagegen die elongiert erscheinenden peroxisomalen Strukturen (dargestellt als dunkelgraue Balken). Während diese Strukturen bei den Wildtypzellen eher

eine Ausnahme darstellten, traten sie bei den  $\Delta vps1p$ -Zellen sogar häufiger auf als die normal konfigurierten Peroxisomen.

Obwohl die Gesamtmenge der normalen Peroxisomen leicht vermindert war, nahm sie im Zeitverlauf nicht so deutlich zu, wie man dies erwartet hätte und wie es bei den Wildtypzellen der Fall war. Dafür erhöhte sich die Menge der elongierten peroxisomalen Strukturen pro Zelle deutlich. Ein weiterer Unterschied zu den Wildtypzellen bestand darin, dass bei Zellen des  $\Delta vps1p$ -Stammes weder nach 45 Minuten, noch zu einem späteren Zeitpunkt eine Speicherung des Pex3p im ER - wie sie bei den Vps1p-Wildtypzellen anhand der Deckungsgleichheit im Mischbild gezeigt werden konnte - zu erkennen ist.

Zwei Beispiele für die Verteilung des Pex3p in  $\Delta vps1p$ -Zellen 45 Minuten nach Galaktose-Puls sind der Abbildung 3.5 a-b zu entnehmen. Anders als bei den Wildtypzellen, bei denen zu diesem Zeitpunkt entweder das Pex3p im ER gespeichert vorlag oder die Peroxisomen als fluoreszierende Punkte am ER-Netzwerk imponierten, sind bei diesem Zellstamm wie bereits beschrieben elongierte peroxisomale Strukturen zu beobachten (in den Abbildungen durch Pfeile markiert).



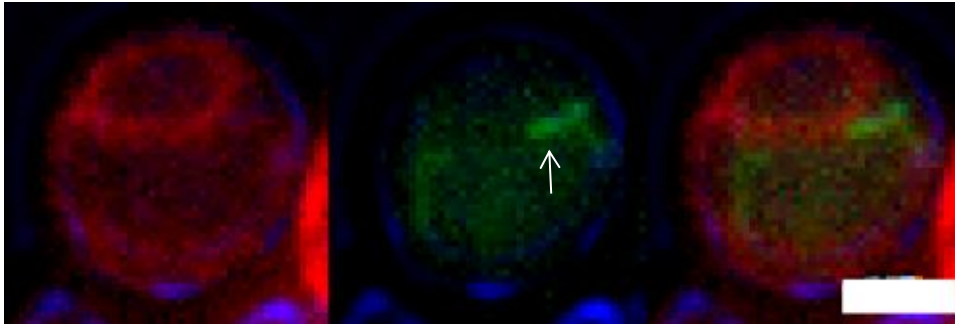
**Abb. 3.5 a-b:  $\Delta vps1p$ -Zellen 45 min nach Galaktose-Puls**

rot: HDEL-DsRed (ER); grün: GFP-Pex3 (Peroxisomen); blau: Durchlicht (Zellkontur)

Zu sehen sind zwei Beispiele für die Pex3p-Verteilung in  $\Delta vps1p$ -Zellen. Die Pfeile deuten jeweils auf die elongierten peroxisomalen Strukturen in den Zellen hin.

Zwei Stunden nach Beendigung des Galaktose-Pulses sind diese elongierten Strukturen noch vorhanden. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.6 (s. Pfeil) zu finden. Das langgezogene

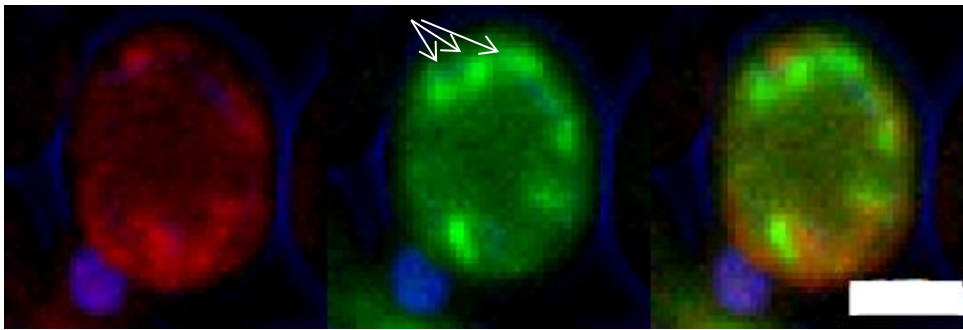
Peroxisomen in dieser Abbildung schmiegt sich dem perinukleären ER-Ring an, ist mit diesem im Unterschied zum Wildtyp allerdings nicht deckungsgleich.



**Abb. 3.6:  $\Delta vps1p$ -Zellen 2 h nach Galaktose-Puls**

rot: HDEL-DsRed (ER); grün: GFP-Pex3p (Peroxisomen); blau: Durchlicht (Zellkontur)  
Der Pfeil deutet auf die Wurm-förmige Konfiguration des Peroxisoms hin.

Auch nach 3,5 Stunden erscheinen die Peroxisomen noch als elongierte Strukturen, allerdings kann man zu diesem Zeitpunkt ein neues Phänomen erkennen: die langgezogenen Peroxisomen scheinen sich jeweils in mehrere kleinere aufzuteilen (s. Abbildung 3.7). Während die Struktur der Peroxisomen zuvor als Wurm-förmig beschrieben werden konnte, kann man die Fluoreszenz nun mit Perlen vergleichen, die auf einen Faden aufgefädelt sind. Möglicherweise verbirgt sich hinter dieser Konfiguration die verzögerte Aufspaltung eines elongierten Peroxisoms in einzelne Peroxisomen. Bei der Auswertung dieser Strukturen war es schwierig, diese in eine Kategorie einzuordnen. Da die Peroxisomen immer noch zusammenhängend erscheinen, konnten sie nicht zu den normal konfigurierten Strukturen gezählt werden. Das Beispiel in Abbildung 3.7 zeigt aber auch deutlich, dass es sich hierbei nicht nur um ein einzelnes elongiertes Peroxisomen handelt. Darum wurde zu dem Zeitpunkt 3,5 Stunden nach Beendigung des Galaktose-Pulses in der Abbildung 3.4 ein weiterer Balken eingeführt, der für mehr als 3 elongierte peroxisomale Strukturen pro Zelle steht. Zellen, die ähnlich konfiguriert waren wie die in Abb. 3.7, fielen unter diese Kategorie.



**Abb. 3.7:  $\Delta vps1p$ -Zellen 3,5 h nach Galaktose-Puls**

rot: HDEL-DsRed (ER); grün: GFP-Pex3p (Peroxisomen); blau: Durchlicht (Zellkontur)

Besonders zu beachten ist in diesem Beispiel die Perlenketten-ähnliche Konfiguration der Peroxisomen (Pfeile).

Es liegt nahe zu vermuten, dass die verzögerte Aufspaltung durch die Abwesenheit von Vps1p hervorgerufen wird. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass bei Wildtypzellen ein solcher Phänotyp zu keinem Zeitpunkt zu beobachten ist. Es wird deutlich, dass sich der Phänotyp in Bezug auf die Peroxisomenneogenese verändert, wenn in einem Zellstamm das Vps1p ausgeschaltet wird.

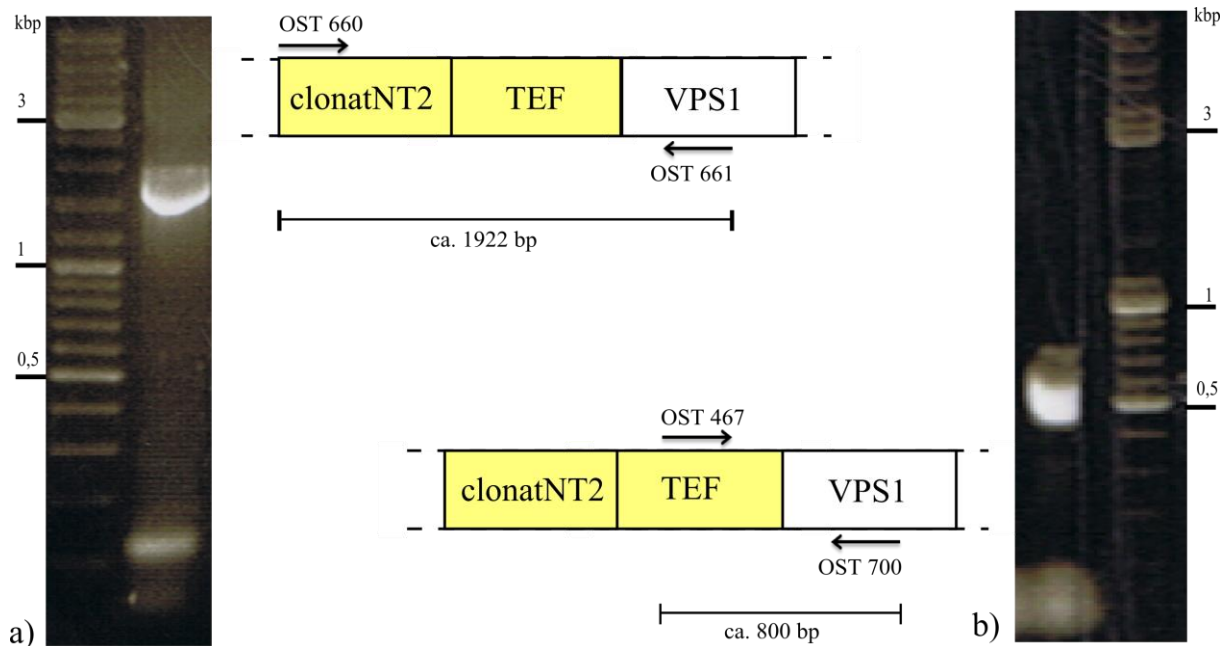
Im Folgenden soll geklärt werden, inwiefern sich der Phänotyp verändert, wenn Vps1p überexprimiert wird.

### ***3.1.3 Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen bei Zellen mit Vps1p-Überexpression***

In einer letzten Versuchsreihe wurden Zellen untersucht, in denen eine Vps1p-Überexpression vorlag. Dies sollte zeigen, ob die erhöhte Produktion von Vps1p die Ausbildung reifer Peroxisomen beschleunigt.

#### ***3.1.3.1 Herstellung von Zellen mit Vps1p-Überexpression***

In den für den Versuch benötigten Zellen musste das VPS1 genomisch verändert werden. Hierzu wurde ein TEF-Promotor am N-Terminus des Gens integriert, dies führte zu einer Überexpression von Vps1p. Zunächst wurde ein DNA-Produkt amplifiziert, das einen Selektionsmarker und den TEF1-Promotor kodiert und durch kurzen Überhang auf der 5'-Seite des VPS1-Gens integriert werden kann. Die Größe des PCR-Produkts betrug ca. 1900 Basenpaare (Abb. 3.8 a). Anschließend wurde das PCR-Produkt in kompetente Zellen von *S. cerevisiae* transformiert.



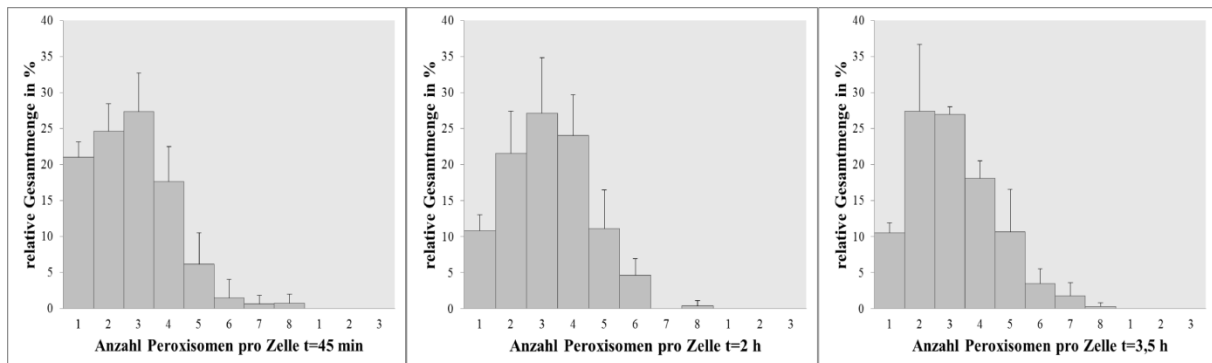
**Abb. 3.8 a-b: Konstrukt des N-terminalen VPS1-Genabschnitts**

Das unter a dargestellte Konstrukt wurde mit Hilfe der Primer OST 660 und 661 amplifiziert. Die erwartete Größe von 1922 Basenpaaren wurde mit der Agarose-Gelelektrophorese getestet und bestätigt. Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend in *S. cerevisiae* transformiert. Die in b gezeigte Amplifikation macht deutlich, dass bei erfolgreicher Transformation mit dem verwendeten Primerpaar (OST 647 und 700) ein Genabschnitt amplifiziert werden muss, der eine ungefähre Größe von 800 Basenpaaren aufweist. Dies wurde erneut mittels Gelelektrophorese getestet.

Abschließend wurde genomische DNA aus den transformierten Zellen hergestellt, um die erfolgreiche Transformation mit Hilfe eines Primerpaares anhand einer Kolonie-PCR zu testen. Die jeweiligen Konstrukte und die Bilder der Agarose-Gelelektrophoresen sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

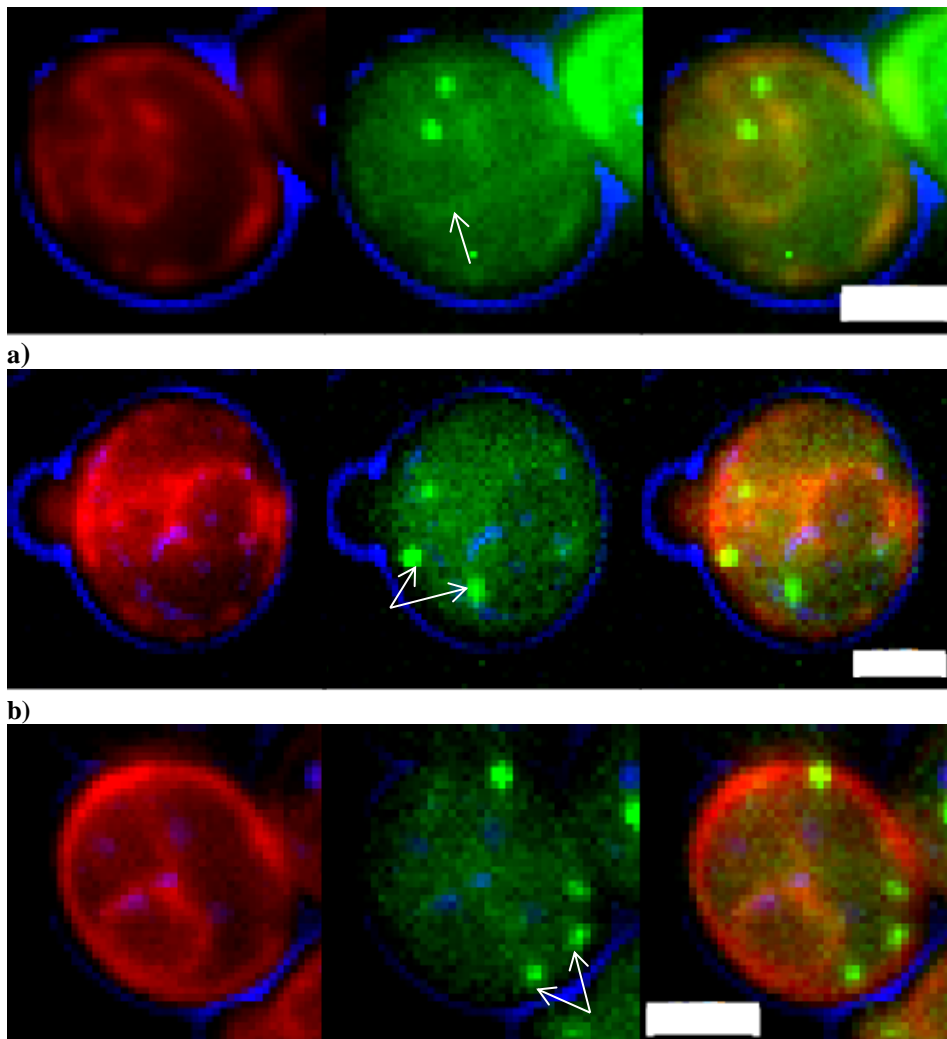
### 3.1.3.2 Auswertung der Zelllinie mit *Vps1p*-Überexpression

Die Auswertung der Galaktose-abhängigen Neubildung von Peroxisomen bei einer *Vps1p*-Überexpression zeigte im Vergleich zu Wildtypzellen einen anderen Phänotyp in Bezug auf die Peroxisomenmenge pro Zelle. Bereits nach 45 Minuten waren in *Vps1p*-überexprimierenden Zellen ungefähr ähnlich viele Peroxisomen wie in Wildtypzellen nach 2 Stunden zu finden. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits in etwas mehr als 50% der Zellen 2 bis 3 neue Peroxisomen entstanden, bei Wildtypzellen waren es im Vergleich nach 45 Minuten nur 1 bis 2 Peroxisomen die neu gebildet wurden (siehe Abbildung 3.9 und im Vergleich Abb. 3.1).



**Abb. 3.9: Peroxisomale Häufigkeit in Zellen mit Vps1p-Überexpression 45 min, 2 h und 3,5 h nach Galaktose-Puls**  
 In hellgrau dargestellt sind die Mengen von morphologisch normal konfigurierten Peroxisomen pro Zelle. Die Gesamtmenge der ausgewerteten Zellen ist durch relative Zahlen angegeben. Elongierte peroxisomale Strukturen traten bei dieser Zelllinie nicht auf, der Vollständigkeit halber wurden diese aber bei der Beschriftung der x-Achse mitaufgeführt.

Im Zeitverlauf nahm die Gesamtmenge der Peroxisomen pro Zelle – wie auch bei Wildtypzellen – zunächst zu. Anders als bei diesen traten allerdings zu keinem Zeitpunkt Zellen auf, die elongiert erscheinende peroxisomale Strukturen aufwiesen. Die Ausbildung dieses Phänotyps kann offensichtlich durch eine Überexpression von Vps1p unterdrückt werden. In Abbildung 3.10 ist jeweils ein Beispiel einer Zelle 45 Minuten (a), 2 Stunden (b) und 3,5 Stunden (c) nach Galaktose-Puls dargestellt. Es ist zu erkennen, dass auch bei Zellen mit Vps1p-Überproduktion eine Übereinstimmung der Lokalisation von Pex3p und ER, ähnlich der Konfiguration in Wildtypzellen, zu finden ist. Im Vergleich zu den Wildtypzellen ist diese Übereinstimmung allerdings bereits nach 45 Minuten weniger intensiv (s. Pfeil in der Abb.3.20 a). Nach 2 bzw. 3,5 Stunden ist die Überlagerung schwach angedeutet zwar immer noch zu erkennen, sie nimmt aber immer weiter ab. Wenn man davon ausgeht, dass die Überlagerung bedeutet, dass das Pex3p im ER gespeichert wird, bis es für die Produktion von neuen Peroxisomen herangezogen wird, könnte man vermuten, dass die verminderte Überlagerungsintensität bedeutet, dass die größte Menge des Pex3p aus dem ER geschleust wurde und sich nun in den neugebildeten Peroxisomen befindet. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die neugebildeten Peroxisomen nach 2 bzw. 3,5 Stunden wesentlich intensiver fluoreszierten (s. Pfeile in Abb. 3.10 b-c). Folglich wird die Produktion von neuen Peroxisomen durch die erhöhte Menge Vps1p beschleunigt.



**Abb. 3.10 a-c: Zellen mit Vps1p-Überproduktion 45 min (a), 2 h (b) und 3,5 h (c) nach Galaktose-Puls**  
 rot: HDEL-DsRed (ER); grün: GFP-Pex3p (Peroxisomen); blau: Durchlicht (Zellkontur). Maßstabsbalken: 2  $\mu$ m  
 Dargestellt sind Beispiele der jeweiligen Peroxisomenmenge und -verteilung in der Zelle im Zeitverlauf von 45 Minuten (a) bis 3,5 Stunden (c).

### 3.1.4 Vergleich von Wildtyp-, $\Delta$ vps1p- und Vps1p-Überexpressionszellen

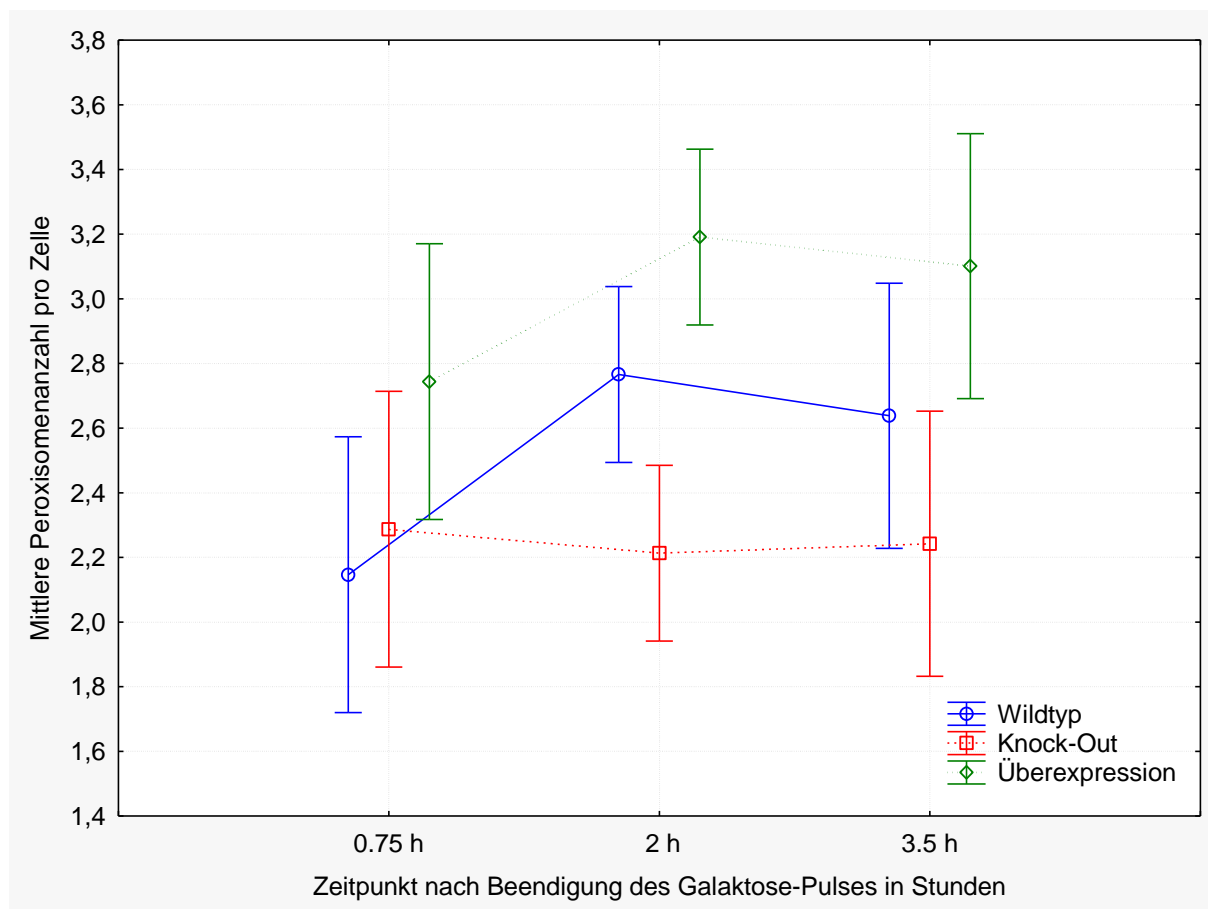
In den vorherigen Kapiteln wurden bereits die unterschiedlichen Phänotypen der einzelnen Zellstämme beschrieben. An dieser Stelle sollen nun die Ausprägungen von Vps1p-Knock-out und -Überexpression mit dem Wildtyp verglichen werden. Um die unterschiedlichen Situationen besser miteinander vergleichen zu können, werden in diesem Kapitel zwei unterschiedliche Graphiken genutzt. Zum einen wird die mittlere Peroxisomenzahl pro Zelle zu den untersuchten Zeitpunkten bei allen drei Zelllinien verglichen. Eine zweite Graphik



vergleicht das Auftreten von elongierten peroxisomalen Strukturen bei den drei Zelllinien, dies geschieht ebenfalls zu allen drei Versuchszeitpunkten.

### *3.1.4.1 Vergleich der mittleren Peroxisomenzahl pro Zelle*

In Abbildung 3.11 sind die mittleren Peroxisomenanzahlen in Bezug auf normal konfigurierte Peroxisomen dargestellt. Es fällt auf, dass die durchschnittliche Galaktose-abhängige Neubildung von Peroxisomen zu allen Zeitpunkten am höchsten ist, wenn eine Vps1p-Überproduktion vorliegt. Zu Beginn des Versuchs, also 45 Minuten nach Beendigung des Galaktose-Pulses, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und Vps1p-Überexpressionszellen ( $p=0,003$ ). Die Zellen mit Vps1p-Überexpression haben zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt bereits so viele Peroxisomen ausgebildet, wie dies bei Wildtypzellen 2 Stunden nach Beendigung des Pulses der Fall ist. Außerdem steigt bei beiden Zellstämmen die mittlere Peroxisomenzahl im Zeitverlauf zunächst an. Wenn man nun Wildtypzellen und solche mit Vps1p-Knock-out miteinander vergleicht, ist in Bezug auf die morphologisch unauffälligen Peroxisomen der Unterschied mit  $p=0,1$  nicht signifikant. Allerdings unterscheiden sich diese beiden Zellstämme in der Ausbildung der elongierten peroxisomalen Strukturen (Abschnitt 3.1.4.2). Im Unterschied zu Wildtyp- und Vps1p-Überexpressionszellen bleibt bei  $\Delta vps1p$ -Zellen die mittlere Peroxisomenzahl im Zeitverlauf nahezu konstant bei einem Wert, der dem Häufigkeitswert von Peroxisomen in Wildtypzellen zu Versuchsbeginn (also 45 Minuten nach Beendigung des Galaktose-Pulses) entspricht.

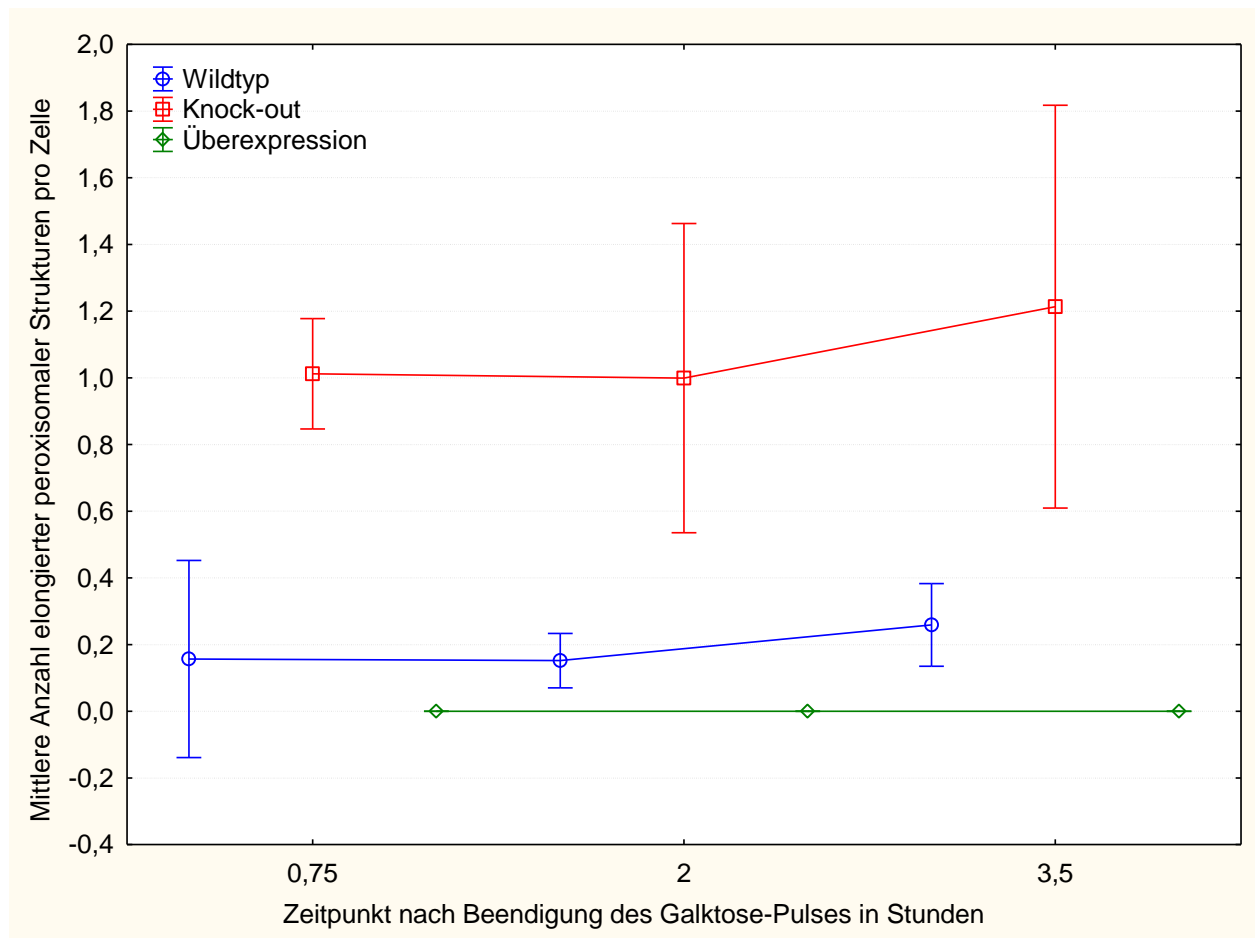


**Abb. 3.11: Zunahme von Peroxisomen im Zeitverlauf bei Vps1p-Wildtyp, -Knock-out und -Überexpression**  
 Dargestellt sind die mittleren Peroxisomenanzahlen pro Zelle bezogen auf alle Zellen, bei denen morphologisch normale Peroxisomen auftraten.

### 3.1.4.2 Häufigkeit von elongierten peroxisomalen Strukturen im Vergleich

Nachdem zunächst die Anzahl der Peroxisomen in den verschiedenen Zellstämmen verglichen wurde, wird in diesem Kapitel auf das Auftreten von elongierten peroxisomalen Strukturen eingegangen. In Kapitel 3.1.4.1 wurde darauf hingewiesen, dass der Unterschied in der mittleren Peroxisomenanzahl bei Wildtypzellen und  $\Delta vps1p$ -Zellen nicht signifikant ist. Wenn man nun allerdings die Häufigkeit der elongierten peroxisomalen Strukturen, die bei den Knock-out-Zellen den Phänotyp darstellen, bei Wildtyp- und Knock-out-Zellen vergleicht, kann man einen signifikanten Unterschied feststellen ( $p=0,000001$ ).

Der Abbildung 3.12 sind die mittleren Anzahlen dieser elongierten peroxisomalen Strukturen bei allen drei Zelllinien zu den drei Versuchszeitpunkten nach Beendigung des Galaktose-Pulses zu entnehmen.



**Abb. 3.12: Anzahl von elongierten peroxisomalen Strukturen in Vps1p-Wildtyp, -Knock-out und -Überexpression**  
Dargestellt ist die mittlere Anzahl von elongierten peroxisomalen Strukturen pro Zelle in Bezug auf alle gezählten Zellen im Zeitverlauf.

Es ist deutlich zu erkennen, dass elongierte Strukturen vor allem bei Zellen mit einem Vps1p-Knock-out auftreten. Bei Wildtypzellen sind diese in geringerer Ausprägung ebenfalls zu finden. Bei einer Überexpression des Vps1p wird das Auftreten von elongierten peroxisomalen Strukturen komplett unterdrückt.

Der Abbildung ist deutlich zu entnehmen, dass bei einem Vps1p-Knock-out elongierte peroxisomale Strukturen gehäuft auftreten. Bei Wildtypzellen sind sie hingegen in deutlich geringer Anzahl zu finden und bei Zellen mit einer Vps1p-Überexpression zeigen sich darüber hinaus gar keine elongierten Peroxisomen. Die Ausbildung von elongierten peroxisomalen Strukturen wird durch eine Überexpression von Vps1p vollständig unterdrückt.

---

### ***3.1.5 Überblick über die Rolle von Vps1p an der peroxisomalen Biogenese***

Sowohl ein Knock-out als auch die Überexpression von Vps1p führen zu signifikant unterschiedlichen Phänotypen der frühen Peroxisomenbiogenese im Vergleich zum Wildtyp. Während ein Knock-out von Vps1p zu einer überwiegenden Ausbildung von elongierten peroxisomalen Strukturen und damit vermutlich zu einer verzögerten Aufspaltung dieser in mehrere Peroxisomen führt, werden bei einer Überproduktion von Vps1p signifikant mehr neue Peroxisomen gebildet, als dies bei den Wildtypzellen der Fall ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass elongierte peroxisomale Strukturen nicht nur bei  $\Delta vps1p$ -Zellen vorkommen. Diese ungewöhnlichen Strukturen treten vereinzelt auch bei Wildtypzellen auf. Bei Überproduktion von Vps1p verschwindet dieser Phänotyp vollkommen. Vps1p scheint eine Rolle bei der Verbindung von Pex3p und ER zu spielen. Bei  $\Delta vps1p$ -Zellen konnte die Kolokalisation der beiden Organellen, die auf ER-gespeichertem Pex3p beruht, anders als bei Wildtyp- und VPS1p-Überexpressionszellen, nicht beobachtet werden.

---

### 3.2 Peroxisomenbildung

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Peroxisomen in *S. cerevisiae* nur dann *de novo* gebildet werden, wenn in einer Zelle zuvor keine Peroxisomen vorhanden sind. Darüber hinaus solle dieser Prozess im Vergleich zu der Peroxisomenbildung in Wildtypzellen deutlich langsamer vonstattengehen (Motley und Hettema 2007). Weitere Ansätze zeigen, dass Peroxisomen *de novo* mit Beteiligung des ER entstehen (Kim et al. 2006; van der Zand et al. 2010; van der Zand et al. 2012).

Mit Hilfe des folgenden Versuchs soll untersucht werden, inwieweit Unterschiede im Pex3p-Transport in der peroxisomalen Neogenese bei Zellen ohne Peroxisomen, im Vergleich zum Pex3p-Transport in Peroxisomen bei Zellen mit bereits vorhandenen Peroxisomen zu erkennen sind. Neogenese ist in diesem Zusammenhang die Neuentstehung von Peroxisomen in Zellen, die zuvor frei von Peroxisomen waren. Sie steht im Gegensatz zur peroxisomalen Teilung, die nach bisheriger Auffassung als Hauptmechanismus für die Bildung von Peroxisomen in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* postuliert wird.

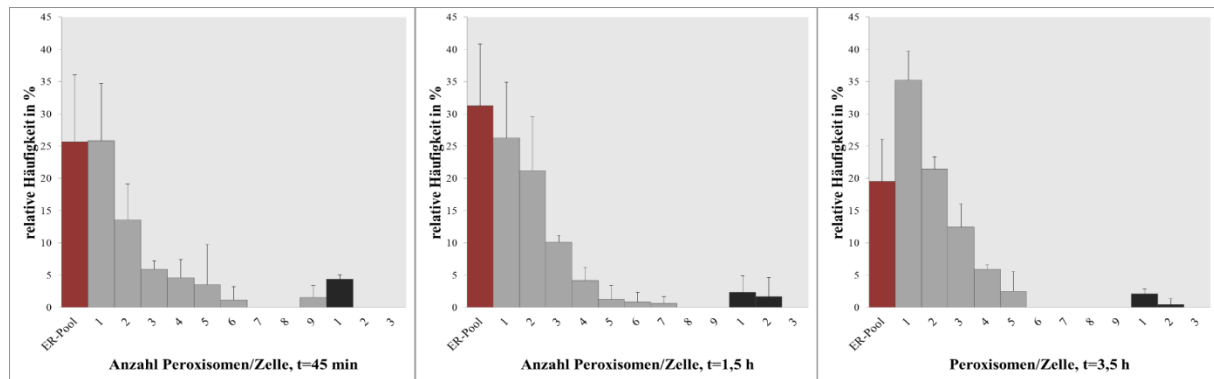
Für den Versuch wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Bei einer der beiden Zelllinien handelte es sich um  $\Delta$ pex3p-Zellen, in denen Pex3p von einem Plasmid mit 2xDendra fusioniert und unter der Kontrolle eines Galaktose-Promotors exprimiert wurde (*YST 1289: GALprom-2xDendraPEX3*). So können Peroxisomen, die nach Galaktose-Induktion neugebildet wurden, mit Hilfe des Dendra-Fluoreszenzproteins mikroskopisch sichtbar gemacht und somit der Verlauf der Pex3p-abhängigen Neogenese verfolgt werden. Diese Zelllinie ist also so konstruiert, dass vor der Induktion mit Galaktose keine Peroxisomen vorhanden sind. Sämtliche Peroxisomen müssen also neu gebildet werden. Bei der zweiten Zelllinie handelte es sich um Wildtypzellen, die ebenfalls GALprom-2xDendra-Pex3p exprimieren. Sie enthalten also ein normales Pex3p-Allel und damit auch Peroxisomen bereits vor dem Pulse-Chase-Experiment. In diesen Zellen soll der Weg des Galaktose-abhängig neugebildeten Pex3p untersucht und mit den Zellen, in denen Neogenese abläuft, verglichen werden. Der Prozess der Neogenese in Abwesenheit von vorher bereits existierenden Peroxisomen wurde im Vergleich zum Pex3p-Transport als wesentlich aufwändiger beschrieben. Daher müsste es zu signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Zelllinien kommen, wenn in Wildtypzellen tatsächlich keine Neogenese stattfindet und neue Peroxisomen lediglich durch Teilung aus bereits Bestehenden entstehen. Die beiden

Zelllinien wurden jeweils für 45 Minuten in Galaktose-haltigem Medium induziert und anschließend in YPD-Vollmedium umgesetzt, um die Expression von neuem Pex3p nach dem Galaktose-Puls zu unterdrücken. Anschließend wurden nach 45 Minuten, 1,5 und 3,5 Stunden Proben entnommen. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Für jede Zelllinie wurden insgesamt die Floreszenzen in 210 Zellen aus drei voneinander unabhängigen Kulturen gezählt (70 Zellen pro Versuchstag und Zellkultur). Hierbei wurde jede der jeweils neun mikroskopisch aufgenommenen Ebenen analysiert.

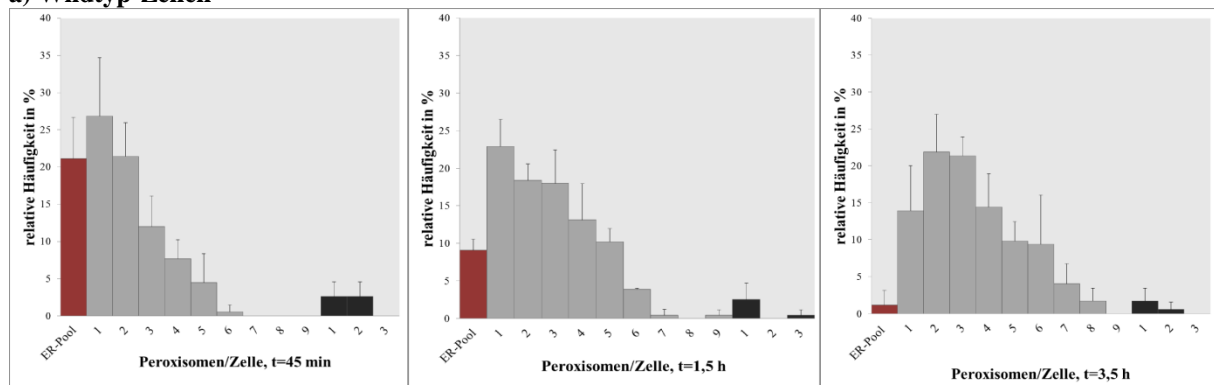
### *3.2.1 Vergleich der Peroxisomen-Bildung in Wildtyp- und $\Delta$ pex3p-Zellen*

Die Ergebnisse der Versuchsauszahlung sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Es ist jeweils die Anzahl von Peroxisomen pro Zelle und die relative Gesamtmenge von Zellen mit dieser Peroxisomen-Anzahl, bezogen auf alle gezählten Zellen, aufgetragen. Dabei wird zwischen drei verschiedenen peroxisomalen Konfigurationen unterschieden: die frühe Lokalisation von Pex3p in einem ER-Pool, die punktförmige Fluoreszenz vermutlich reifer Peroxisomen und die elongierte peroxisomale Struktur, die in 3.1.2 näher beschrieben wurde.

Wie der Abbildung 3.13 zu entnehmen ist, gibt es keine großen Unterschiede in Bezug auf den Transport von Pex3p bei Wildtypzellen und der Pex3p-abhängigen Neogenese. Lediglich in einem Punkt unterschieden sich die beiden Zelllinien. Während bei  $\Delta$ pex3p-Zellen (Neogenese) der ER-lokalisierte Pex3p-Pool im Zeitverlauf drastisch abnimmt, bleibt dieser bei den Wildtypzellen über den Zeitverlauf nahezu konstant. Korrelierend dazu ist die Menge an neugebildeten Peroxisomen bei  $\Delta$ pex3p-Zellen höher als bei den Wildtypzellen. Dies kann damit erklärt werden, dass durch die bereits vorhandenen Peroxisomen bei einer bestimmten Menge ein Synthesestopp einsetzt. Allerdings liegt kein zeitlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien vor. Dieser wäre zu erwarten gewesen, wenn in der einen Zelllinie nur Biogenese also Teilung aus bereits bestehenden Peroxisomen stattfinden würde, während in der anderen Zelllinie die Peroxisomen mittels Neogenese entstehen.



#### a) Wildtyp-Zellen



#### b) $\Delta$ pex3p-Zellen

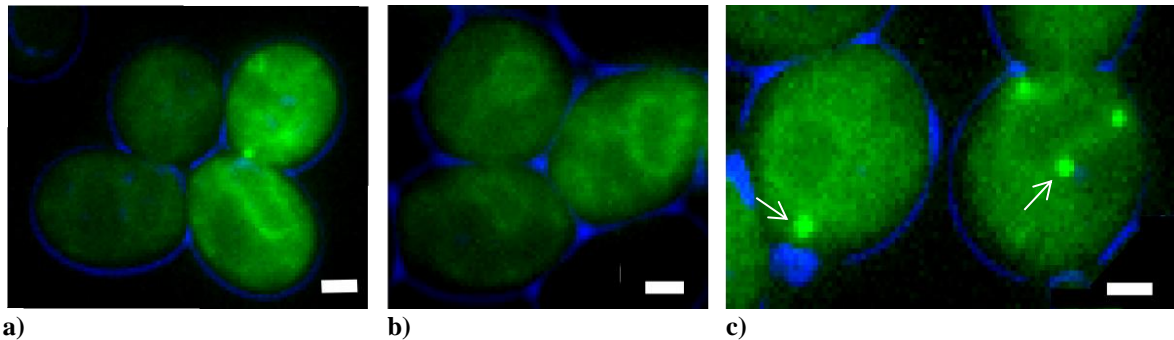
### Abb. 3.13 a-b: Transport von Pex3p bei Wildtypzellen und Zellen mit Pex3p-abhängiger Neogenese

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten von Galaktose-abhängig neugebildetem Pex3p im Zeitverlauf (45 min, 1,5 h und 3,5 h nach Beendigung des Galaktose-Pulses) in Wildtyp- (a) und  $\Delta$ pex3p-Zellen (b).

Die Anzahl der fluoreszierenden Spots pro Zelle in Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen wurde ausgewertet. Der rote Balken steht jeweils für den prozentualen Anteil an Zellen, bei denen sich das Galaktose-abhängig neugebildete Pex3p lediglich im ER-Pool befindet. Die hellgrauen Balken repräsentieren die punktförmige, peroxisomale Pex3p-Fluoreszenz. Elongiert erscheinende peroxisomale Strukturen sind durch die dunkelgrauen Balken dargestellt.

Die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen diese Beobachtungen anhand von jeweils typischen Zellen der beiden Zelllinien zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei den Wildtypzellen in Abb. 3.14 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl nach 45 Minuten und 1,5 Stunden aber auch nach 3,5 Stunden die Menge des mit dem ER-kolokalisierenden Pex3p in einer Großzahl der Zellen immer noch vorhanden ist. Passend dazu sind in den übrigen Zellen größtenteils nur ein bis zwei fluoreszierende Spots zu erkennen, die für die Bildung von neuen Peroxisomen sprechen könnten. Das Pex3p wird zunächst im ER gespeichert, um zu einem späteren Zeitpunkt, wenn erneut neue Peroxisomen benötigt werden, zur Verfügung zu stehen. Im Vergleich dazu sind die Bilder der Abbildung 3.15 zu sehen, die zeigen, dass das Pex3p, welches sich zu Beginn – also 45 Minuten nach der Induktion mit Galaktose – wie bei den Wildtypzellen noch in dem ER-lokalisierendem Pex3p-Pool befand. Bereits nach 1,5 Stunden hat dieses Pex3p allerdings schon deutlich abgenommen und sich in neuen Peroxisomen

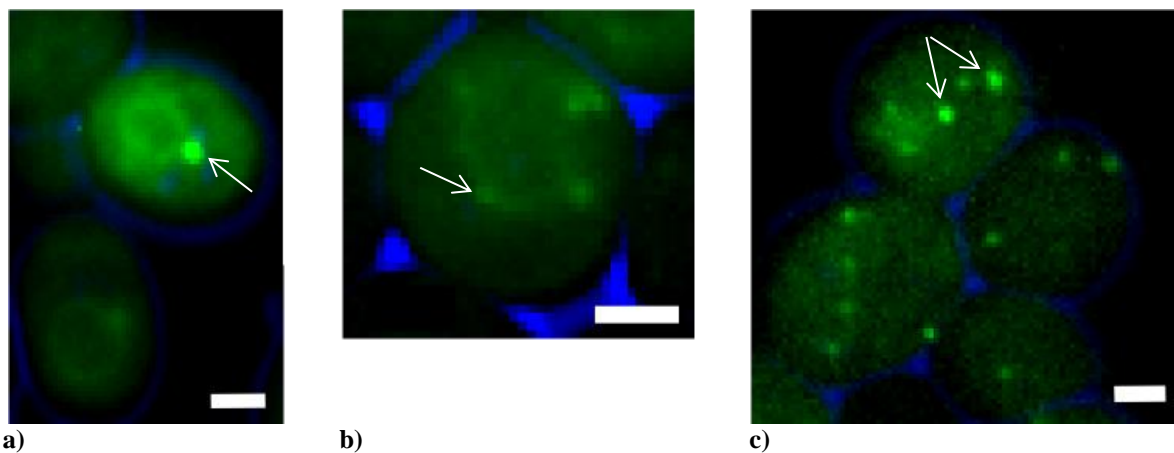
lokalisiert. Nach 3,5 Stunden ist dementsprechend nahezu kein Pex3p mehr in dem ER-Pool zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass sämtliches durch die Galaktose-Induktion neugebildetes Pex3p für die Bildung von neuen Peroxisomen gebraucht wurde.



**Abb. 3.14 a-c: Wildtypzellen – Lokalisation von Galaktose-abhängig gebildetem Pex3p bei bereits bestehenden Peroxisomen**

grün: 2xDendra (Pex3p), blau: Durchlicht (Zellkontur)

Dargestellt ist die Lokalisation von Galaktose-abhängig neu gebildetem Pex3p in Wildtypzellen im Zeitverlauf jeweils 45 Minuten (a), 1,5 Stunden (b) und 3,5 Stunden (c) nach Beendigung des Galaktose-Pulses. Besonders zu beachten ist der lange bestehende Pex3p-Pool im ER. Die Pfeile in (c) sollen auf die Konfiguration der Pex3p-markierte Peroxisomen hinweisen (vergleiche hierzu auch die Spots in Abb. 3.15 a-c).



**Abb. 3.15 a-c:  $\Delta$ pex3p-Zellen – Lokalisation von Pex3p im Prozess peroxisomalen Neogenese**

grün: 2xDendra (Pex3p), blau: Durchlicht (Zellkontur)

Dargestellt ist die Lokalisation von Galaktose abhängig neugebildetem Pex3p in Zellen, die zuvor frei von Peroxisomen waren ( $\Delta$ pex3p). Zu sehen ist der Prozess der Neogenese im Zeitverlauf jeweils 45 Minuten (a), 1,5 Stunden (b) und 3,5 Stunden (c) nach Beendigung des Galaktose-Pulses. Der Pex3p-Pool im ER wird relativ zügig erschöpft. Pfeile weisen auf die Konfiguration der Pex3p-markierte neu entstandenen Peroxisomen hin. Im Vergleich zu den Wildtypzellen treten mehr mit Pex3p-markierte Peroxisomen auf. Die Konfiguration der Peroxisomen scheint hingegen nicht abzuweichen.



---

### 3.2.2 Zwischenbilanz

Der Unterschied der beiden Zelllinien besteht vor allem darin, dass Pex3p in den Zellen, in denen Neogenese abläuft, über den Zeitverlauf zügig aus der anfänglichen Lokalisation im ER verschwindet und in neugebildeten Peroxisomen erscheint. Bei den Wildtypzellen, in denen bereits Peroxisomen bestehen, wird das durch den Galaktose-Puls gebildete Pex3p hingegen über einen längeren Zeitraum im ER gespeichert. Die Pex3p-Spots, die in diesen Zellen gebildet werden, sind zwar in ihrer Gesamtzahl geringer als in den Zellen, in denen zuvor keine Peroxisomen vorlagen, sie unterscheiden sich in ihrer Konfiguration allerdings nicht von diesen (siehe hierzu Abb. 3.14 c und im Vergleich Abb. 3.15 a-c).

Wenn man nun davon ausgehen würde, dass neue Peroxisomen in den Wildtypzellen lediglich durch Transport von einzelnen Komponenten in bestehende Peroxisomen und deren anschließender Teilung entstehen, müssten sich die Lokalisationen und die Menge des Pex3p in den beiden Zelllinien eigentlich unterscheiden. In den Wildtypzellen müssten die Pex3p-Spots deutlich kleiner ausfallen und diese müssten auch mehr über die Zelle verteilt sein. In dem Versuch konnte aber gezeigt werden, dass sich die Pex3p-Spots in den Zellen zwar in ihrer Anzahl, nicht aber in ihrer Größe und Intensität unterscheiden. Der Unterschied in der Anzahl kann damit begründet werden, dass in Zellen in denen bereits Peroxisomen vorhanden sind, der Reiz, neue Peroxisomen zu bilden, geringer ist als in Zellen, in denen keine Peroxisomen vorliegen.

Merkmale, die für grundsätzlich verschiedene Mechanismen in der peroxisomalen Bildung in beiden Zelllinien sprechen würden, sind hingegen nicht zu sehen. Allerdings ist zu bedenken, dass zu jedem Zeitpunkt lediglich Pex3p betrachtet wird und dementsprechend nur Vermutungen angestellt werden können, ob dieses in punktförmiger Fluoreszenz vorliegende Pex3p nun wirklich ein reifes neugebildetes Peroxisom darstellt (wovon in der  $\Delta$ pex3p-Zelllinie, bei der Neogenese stattfindet, ausgegangen werden muss) oder aber lediglich Pex3p ist, welches in ein bereits bestehendes Peroxisom transportiert wurde. Diese Frage soll im nächsten Abschnitt geklärt werden.

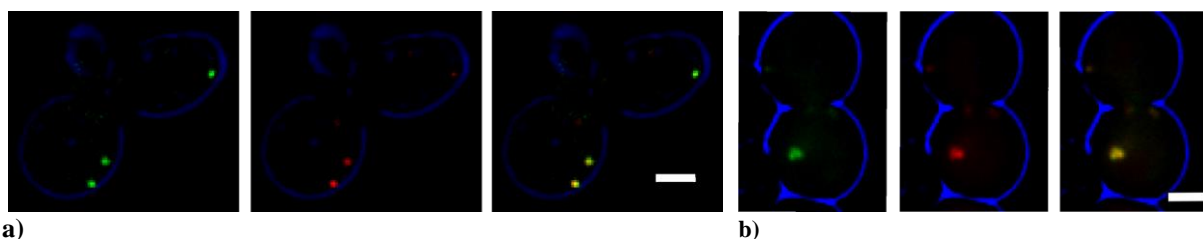
### 3.2.3 Weiterführende Analysen

Das folgende Kapitel beschreibt die Ergebnisse aus Versuchen mit drei verschiedenen Zelllinien, die weiteren Aufschluss über die peroxisomale Entstehung geben sollen.

#### 3.2.3.1 Pex3p-Spots – Reife Peroxisomen?

Der folgenden Abschnitt soll die Frage klären, ob es sich bei den Pex3p-Spots aus Versuch 3.2.1 um reife Peroxisomen handelt.

Zunächst wurde die Situation in Zellen, in denen sicher Neogenese stattfindet, näher betrachtet. Dazu wurden erneut  $\Delta$ pex3p-Zellen hergestellt, in denen Pex3p mit 2xDendra fusioniert und unter die Kontrolle eines Galaktose-Promotors gestellt wurde. Außerdem wurde in diese Zellen ein Plasmid transformiert, welches für ein Fusionsprotein aus SKL und HcRed kodiert. Da SKL ein Marker für reife Peroxisomen ist, würde eine Kolo-kalisation von Pex3p-Spots mit HcRed-SKL für die Hypothese sprechen, dass es sich bei den nach Galaktose-Induktion gebildeten Pex3p-Spots aus Versuch 3.2.1 um reife Peroxisomen handelt. Die Versuchsdurchführung ist mit der im Abschnitt 3.2 beschriebenen identisch. Der einzige Unterschied besteht darin, dass lediglich nach 3 Stunden eine Probe entnommen wurde, da in dieser Situation die späte Lokalisation von Pex3p in den Zellen von Interesse ist. In Abbildung 3.16 sind Zellen der Versuchslinie dargestellt.



**Abb. 3.16 a-b: Lokalisation von Pex3p**

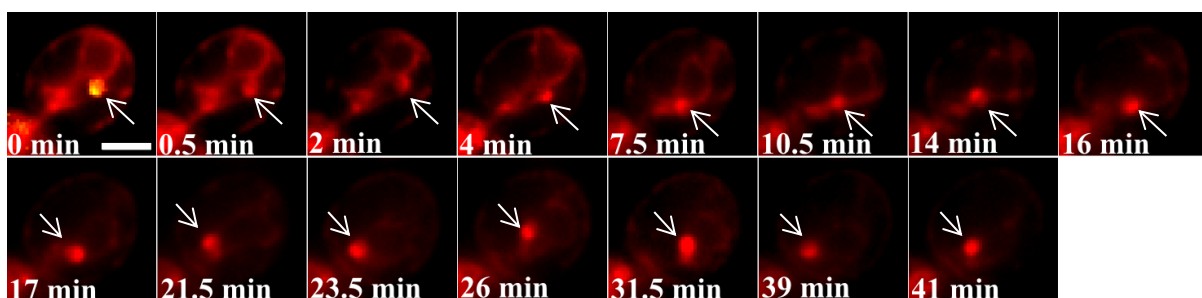
grün: 2xDendra (Pex3p); rot: HcRed (SKL); blau: Durchlicht (Zellkontur)

Zu beachten ist die Kolo-kalisation von Pex3p und SKL in den Zellen. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Pex3p-Spots um reife Peroxisomen handelt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass Pex3p und SKL kolokalysieren. Damit wird die Hypothese bestätigt, dass es sich bei den nach Galaktose-Induktion neu entstandenen Pex3p-Spots um reife Peroxisomen handelt.

### 3.2.3.2 Lokalisation von Pex3p im Rahmen der Neogenese

Eine zweite Zelllinie wurde untersucht, um herauszufinden wo das Galaktose-abhängig neugebildete Pex3p innerhalb der Zellen, in denen Neogenese stattfindet, lokalisiert ist. Da in vorherigen Versuchen eine enge räumliche Nähe zum ER festgestellt wurde, diente das ER auch in diesem Versuch als orientierende Struktur. Dazu wurden  $\Delta$ pex3p-Zellen genutzt, in denen wiederum Pex3p mit 2xDendra fusioniert und unter die Kontrolle eines Galaktose-Promotors gestellt wurde. Bei diesen Zellen wurde nun zusätzlich dsRed mit ER-Retentionssignal genomisch integriert. Anders als in den vorherigen Experimenten wurden diese Zellen durch Live-Zell-Mikroskopie untersucht. Daher wurden die Zellen zuvor nicht mit Paraformaldehyd fixiert. Um eine optimale Versorgung der Zellen über den Versuchsablauf zu gewährleisten, wurde zudem die zur Einbettung genutzte LMP-Agarose in YPD gelöst, wie in Kapitel 2.13 genauer erklärt wurde. Um ein starkes Ausbleichen der Fluorophore über den Verlauf des Versuchs zu vermeiden und damit eine längere Versuchsdauer zu ermöglichen, wurde das zuvor grün fluoreszierende Dendra nach einmaliger Aufnahme zur Identifikation des neugebildeten Pex3p umgefärbt. Diese Umfärbung wurde durch eine 5 Sekunden andauernde Bestrahlung bei 360 nm (DAPI-Kanal) erreicht und führte dazu, dass nach Bestrahlung sowohl ER als auch Pex3p rot fluoreszierten und mit einem einzigen Kanal aufgenommen werden konnten. Es wurde alle 30 Sekunden eine Aufnahme gemacht.



**Abb. 3.17: Lokalisation von neugebildetem Pex3p in *S. cerevisiae***

rot: HDEL-DsRed (ER); zum Zeitpunkt 0 Minuten gelb: 2xDendra (Pex3p)

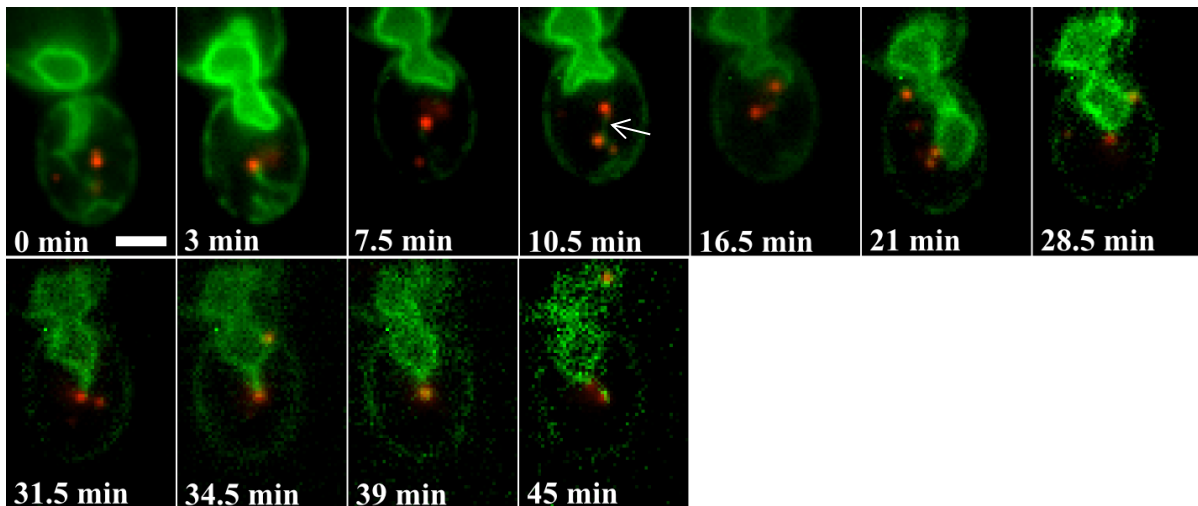
Die mit einem Pfeil markierte gelbe Struktur zu Versuchsbeginn (0 Minuten) stellt das Galaktose-abhängig neugebildete Pex3p dar, welches in dieser Zeitsequenz beobachtet wurde. Zur Verdeutlichung wurde das Pex3p auch nach Umfärben jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Ausschnitte aus dieser Sequenz sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass neugebildetes Pex3p anscheinend über den gesamten Zeitverlauf am ER klebt und sich die beiden Organellen die gesamte Zeit simultan zu bewegen scheinen. Die Pfeile in der Abbildung deuten auf das neugebildete Pex3p hin, welches zu Versuchsbeginn noch grün, danach ebenfalls rot fluoreszierte.

### ***3.2.3.3 Lokalisation von reifen Peroxisomen in Wildtypzellen***

Beiden in den vorherigen Experimenten verwendeten Zelllinien liegt zugrunde, dass durch eine Mutation zu Versuchsbeginn keine Peroxisomen vorliegen und diese folglich mittels Neogenese gebildet werden müssen.

Um zu klären, wo sich reife Peroxisomen in Wildtypzellen aufhalten, wurden für diesen Versuch in die Zellen Plasmide transformiert, welche für ein Fusionsprotein aus SKL und HcRed und ein zweites Fusionsprotein aus GFP und dem ER-Protein Sec63 kodieren. Somit kann auch in diesen Wildtypzellen die Lokalisation von reifen Peroxisomen innerhalb der Zelle und in Bezug zum ER beurteilt werden. Durch einen Vergleich mit den anderen Zelllinien könnten mögliche Abweichungen in der Lokalisation von Peroxisomen in diesen Wildtypzellen und von Peroxisomen in den Zellen, die aufgrund einer Mutation Peroxisomen *de novo* herstellen müssen, erkannt werden. Die Zellen wurden ebenfalls mittels Live-Zell-Mikroskopie untersucht, so dass Bewegungsprozesse der beiden Organellen anhand der Film-Sequenzen beurteilt werden konnten. Es wurden alle 1,5 Minuten über insgesamt 45 Minuten Aufnahmen gemacht, ein Ausschnitt hieraus ist in Abbildung 3.18 dargestellt.



**Abb. 3.18: Lokalisation von Peroxisomen in *S. cerevisiae***

grün: Sec63-GFP (ER); rot: HcRed-SKL (Peroxisomen)

Dargestellt ist eine Abfolge von Aufnahmen über 45 Minuten, die die enge Verbindung und simultane Bewegung von Peroxisomen und dem ER verdeutlichen soll. Peroxisomen scheinen zu jedem Zeitpunkt mit Strukturen des ER verbunden zu sein. Der Pfeil bei  $t = 10,5$  min deutet auf eine ER-Brücke hin, an bzw. mit der sich die Peroxisomen bewegen.

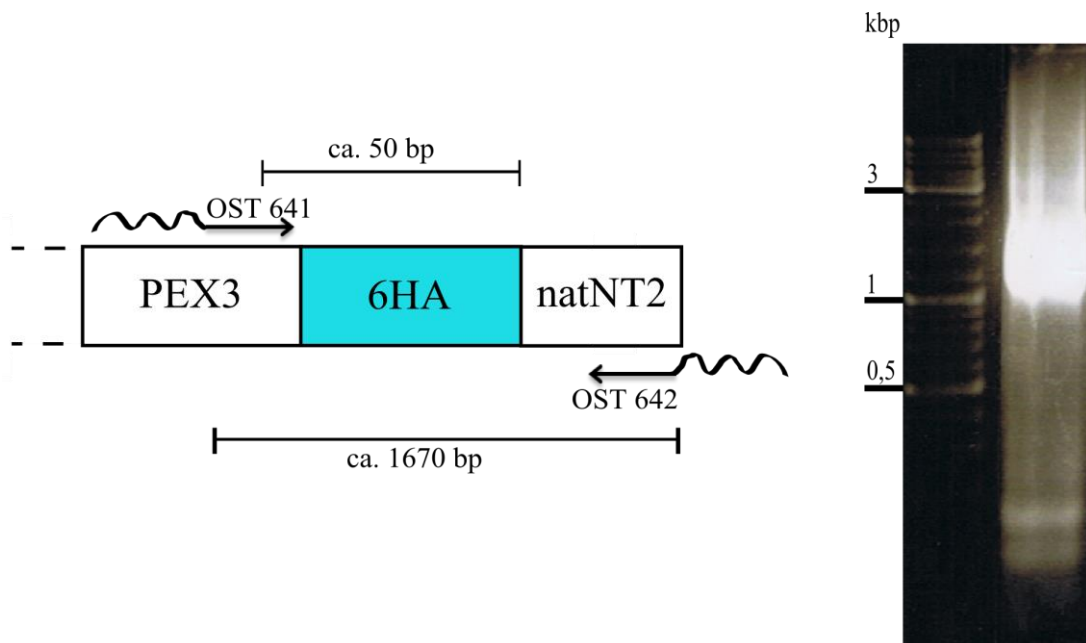
Auch bei diesen Wildtypzellen liegen die reifen Peroxisomen ähnlich verteilt vor, wie dies bei den beiden vorherigen Zelllinien der Fall war. Außerdem fällt auch hier auf, dass ER und Peroxisomen simultane Bewegungen ausführen und die gesamte Zeit verbunden scheinen. Besonders eindrücklich sind dabei die ER-Brücken, die durch die gesamte Zelle ziehen und an denen sich die Peroxisomen formieren (zum Zeitpunkt 10,5 Minuten beispielhaft mit einem Pfeil markiert).

### 3.3 Darstellung von Peroxisomen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um Peroxisomen mittels sekundärer Immunfluoreszenz (IF) darzustellen und Aufschluss über den morphologischen Zusammenhang zwischen Peroxisomen und dem ER zu erhalten. In der Forschung mit Hefe ist die IF-Technik in den letzten Jahren in den Hintergrund getreten, da direkte Fluoreszenz-Mikroskopie technisch einfacher durchzuführen ist. Die Entwicklung des unter 2.14 beschriebenen Versuchsprotokolls zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie soll auch die Möglichkeit bieten, als Sekundär-Antikörper Fluorophore zu verwenden, die für die hoch-auflösende STED-Mikroskopie geeignet sind.

#### 3.3.1 Herstellung geeigneter Zelllinien

Um Peroxisomen in *S. cerevisiae* darzustellen, wurde in Wildtypzellen zunächst das peroxisomale Membranprotein Pex3p genomisch mit einem C-terminalen 6HA-Tag versehen.



**Abb. 3.19 Konstrukt des C-terminalen PEX3-Genabschnitts mit 6HA-Tag und PCR-Produkt**

Das Konstrukt wurde mit Hilfe der Primer OST 641 und 642 amplifiziert. Bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese trat ein Produkt mit einer Bande bei ungefähr 1670 Basenpaaren auf, die der des gewünschten Produkts entsprach. Das Konstrukt wurde abschließend in kompetente Hefezellen transformiert.

Zunächst wurde ein DNA-Produkt nach dem Versuchsprotokoll von Janke et. al (2004) amplifiziert. Das entstandene Produkt kodierte ein 6HA-Tag für den C-Terminus von Pex3p. Zur Kontrolle des PCR-Produktes diente eine Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 3.19), die eine Bande bei der erwarteten Größe von 1670 Basenpaaren aufwies. Anschließend wurde das Produkt in kompetente Hefezellen transformiert. Die Kontrolle erfolgte mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung. Der Genotyp des resultierenden Stammes lautet BY4741 PEX3-6HA::natNT2 (YST 1285).

### ***3.3.2 Optimierung des Immunfluoreszenz-Protokolls***

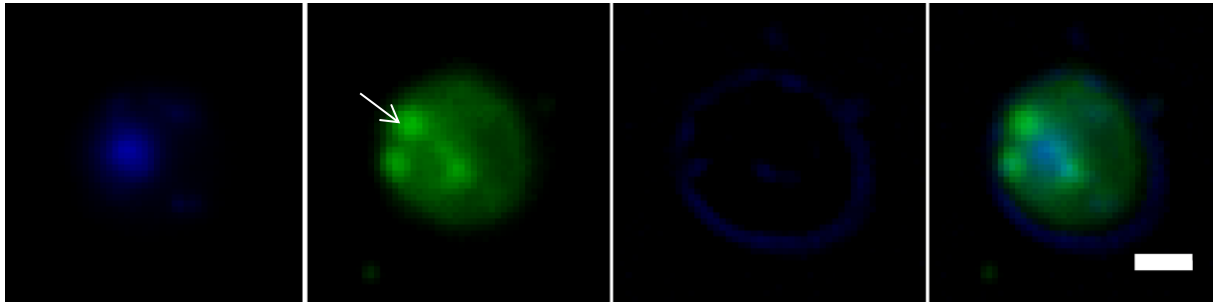
Das eingefügte HA-Tag diente im weiteren Verlauf als Ansatzpunkt für einen primären Antikörper. Zunächst musste bei der Erstellung des Versuchsprotokolls der Schritt der Inkubation mit Zymolyase etabliert werden. Die Zymolyase führt zu einem Verdau der Zellwand. Dies ist nötig, um im weiteren Verlauf die Primär- und Sekundär-Antikörper in das Innere der Zelle bringen zu können. Allerdings leidet die Stabilität der Zellen unter diesem Zellwandverdau, so dass bei weiteren Waschungsschritten eine geringere Zentrifugationskraft von maximal 6.000 rpm gewählt werden musste, um im Anschluss unter dem Mikroskop vollständige Zellen betrachten zu können. Es wurde eine optimale Inkubationszeit des Zell-Zymolyase-Gemisches für die Versuche dieser Arbeit von 45 Minuten ermittelt.

Darüber hinaus war für den Versuchsablauf und eine gute mikroskopische Auswertung die Zahl der Zellen am Morgen des Versuchstages überaus wichtig. Hierzu wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte zu diesem Zeitpunkt eine max.  $OD_{600}=2$  nicht überschritt.

Um bei der mikroskopischen Auswertung störende Nebenfluoreszenzen zu vermeiden, musste nach Aufbringen der Primär- und Sekundär-Antikörper ausgiebig gewaschen werden. Der Objektträger wurde mit PBS-BSA-Lösung bedeckt und anschließend luftgetrocknet. Dieser Ablauf erbrachte aber nicht die gewünschten Erfolge, es zeigten sich viele Nebenfluoreszenzen. Es etablierte sich das separate Waschen eines jeden Feldes mit jeweils insgesamt zehnmaligem Aufbringen und anschließendem Aspirieren der PBS-BSA-Lösung.

Für das Einbetten der Proben wurde zunächst ProLong Gold verwendet, welches DAPI enthielt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher den Zellkern und teilweise die Mitochondrien markiert. Demnach wurde mit Hilfe des Einbettmediums der Zellkern ohne

einen weiteren Inkubationsschritt markiert. Allerdings härtete ProLong Gold nicht vollständig aus, so dass sich die Struktur des ER nach dem Einbetten veränderte. Statt der gewohnten retikulären Struktur entstand nach wenigen Tagen eine punktförmige Fluoreszenz, wie in Abbildung 3.20 dargestellt.



**Abb. 3.20: Immunfluoreszenz – Einzelfärbung ER**

DAPI-hellblau: DNS (Zellkern und Mitochondrien), Atto647-grün: Sec63 (ER), Durchlicht-dunkelblau (Zellrand)

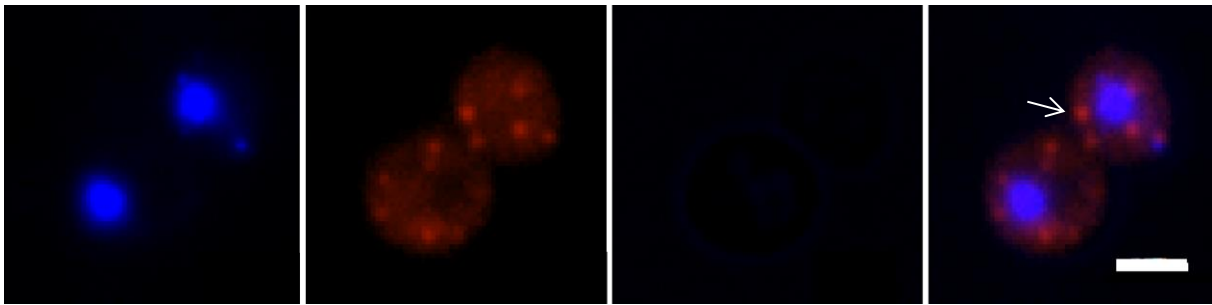
Zu beachten sind die punktförmigen Fluoreszenzen im grünen Kanal (Pfeil), die sich nach mehrtägiger Lagerung bei 4°C ausgebildet haben und das ER darstellen.

Um Verformungen des ERs vorzubeugen, wurde Mowiol anstatt ProLong Gold verwendet. Bei dieser Substanz blieb die retikuläre Struktur des ER auch nach mehreren Wochen erhalten. Um trotzdem eine Färbung der Zellkerne zu erlangen, wurden die Proben im letzten Waschschrift für 5 Minuten in mit DAPI versetztem PBS inkubiert.

### ***3.3.3 Darstellung von Pex3p mittels Immunfluoreszenz***

Wie bereits beschrieben, dient das 6HA-Tag am C-Terminus von Pex3 als Zielstruktur für einen primären Antikörper. Dieser konnte durch Inkubation mit den Zellen über die zuvor verdaute Zellwand in das Zellinnere gelangen. Der in einem zweiten Inkubationsschritt hinzugegebene Sekundär-Antikörper konnte an den Primär-Antikörper binden und ermöglichte so die Darstellung der räumlichen Verteilung des Pex3p in der Zelle.





**Abb. 3.21: Immunfluoreszenzmikroskopie – Einzelfärbung von Peroxisomen**

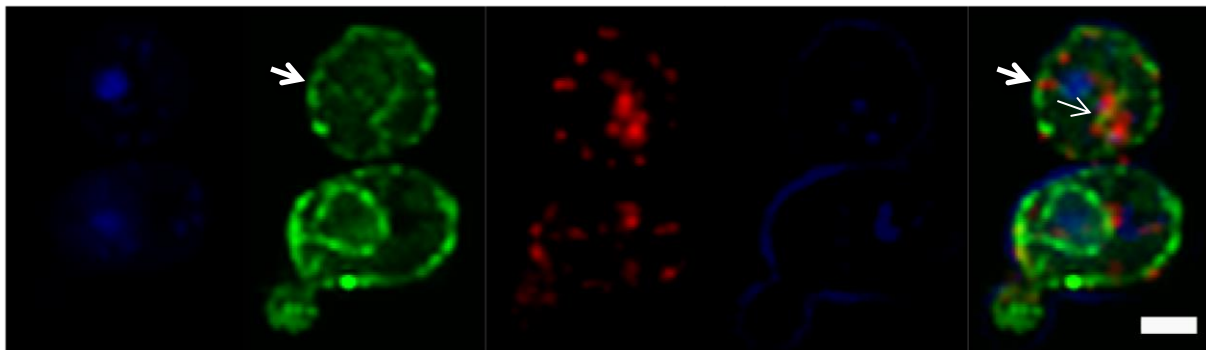
DAPI-hellblau: DNS (Zellkern und Mitochondrien), Atto590-rot: Pex3p (Peroxisomen), Durchlicht-dunkelblau: Zellrand. Der Pfeil deutet auf die Zellkern-nahe Verteilung von Pex3p hin.

Die Abbildung 3.21 zeigt ein starkes Fluoreszenzsignal an den Stellen, an denen zunächst der Primär-Antikörper an das 6HA-Tag gebunden und im Anschluss die Interaktion mit dem Sekundär-Antikörper stattgefunden hat. Die rot fluoreszierenden Strukturen stellen folglich die Peroxisomen in der Zelle dar. Die hellblaue Fluoreszenz ist das Ergebnis einer Färbung mit DAPI. Die Einzelfärbung, die in Abbildung 3.21 dargestellt ist, zeigt, dass Peroxisomen in *S. cerevisiae* sowohl in der Nähe des Zellkerns (siehe Pfeil) als auch in der Peripherie zu finden sind.

### 3.3.4 Darstellung von *Pex3p* in Kombination mit dem ER mittels Immunfluoreszenz

Um eine genauere Aussage über die exakte Lokalisation und auch mögliche Kolo-kalisationen mit dem ER machen zu können, wurde der Versuch erweitert. Hierzu wurde in den PEX3-6HA-Stamm ein Plasmid transformiert, welches ein Fusionsprotein aus Sec63 und GFP kodiert. Somit fluoreszierte das ER wegen des GFPs zum einen primär, zum anderen konnte mit einem weiteren primären Antikörper, diesmal gegen das GFP-Molekül gerichtet, und einem passenden sekundären Antikörper das Signal verstärkt und für die sekundäre Immunfluoreszenz nutzbar gemacht werden (siehe Abbildung 3.22). Im Folgenden musste auch die Wahl und Anwendung der Antikörper optimiert werden. Eine Verdünnung sowohl der Primär- als auch Sekundär-Antikörper von 1/200 in PBS stellte sich bei mehreren Vergleichen als am erfolgreichsten dar. Bei den Doppelfärbungen zeigte sich, dass eine Inkubation der Zellen mit beiden Sekundär-Antikörpern zur gleichen Zeit nicht die gewünschten Erfolge erbrachte. Darum wurden die sekundären Antikörper im abschließenden Versuchsprotokoll separat jeweils für 2 Stunden bei 30°C mit den Zellen inkubiert. Die

Primär-Antikörper wurden im Gemisch über Nacht bei 4°C inkubiert, weil hier eine Einzelbehandlung keine Vorteile erbrachte. Die besten Signale wurden mit einer Antikörpermischung aus einem Anti-HA-Antikörper (Kaninchen polyklonal;  $\alpha$ HAR) und Anti-GFP-Antikörper (Maus monoklonal;  $\alpha$ GFPm) als Primär-Antikörper und einem Cy3 gekoppelten  $\alpha$ Kaninchen-IgG-Antikörper und einem Alexa488 gekoppelten  $\alpha$ Maus-IgG-Antikörper erzielt.



**Abb. 3.22: Immunfluoreszenzmikroskopie – Doppelfärbung Peroxisomen und ER**

DAPI-hellblau: DNS (Zellkern und Mitochondrien), Alexa488-grün: Sec63 (ER), Cy3-rot: Pex3p (Peroxisomen), Durchlicht-dunkelblau (Zellrand). Maßstabsbalken: 2 $\mu$ m. Der dünne Pfeil weist auf einen „ER-Steg“ mit eng assoziierten Peroxisomen hin. Die dicken Pfeile zeigen beispielhaft die enge Verknüpfung der Peroxisomen in das periphere ER-Netzwerk.

In der Abbildung 3.22 ist zu erkennen, dass Peroxisomen und ER eng miteinander assoziiert sind. Jedes einzelne Peroxisom scheint mit dem ER-Netzwerk verbunden zu sein. Zum Teil sitzen die Peroxisomen am perinukleären ER, es finden sich aber auch Peroxisomen, die in der Peripherie angesiedelt sind. Bei genauer Beobachtung zeigt sich, dass die Peroxisomen eng in das ER-Netz eingliedert sind (Abbildung 3.22). Besonders bemerkenswert sind dabei die Peroxisomen in der Mitte der oberen Zelle, die sich an einen dort befindlichen „ER-Steg“ (markiert durch den dünnen Pfeil) anschmiegen. Um die Frage zu klären, ob diese Assoziation von Peroxisomen und ER der Realität entspricht oder eventuell durch die relativ geringe Auflösung vorgetäuscht wird, wurden die Proben im Anschluss mittels Konfokalmikroskopie analysiert.

### ***3.3.5 Darstellung von Peroxisomen und ER mittels konfokaler Mikroskopie***

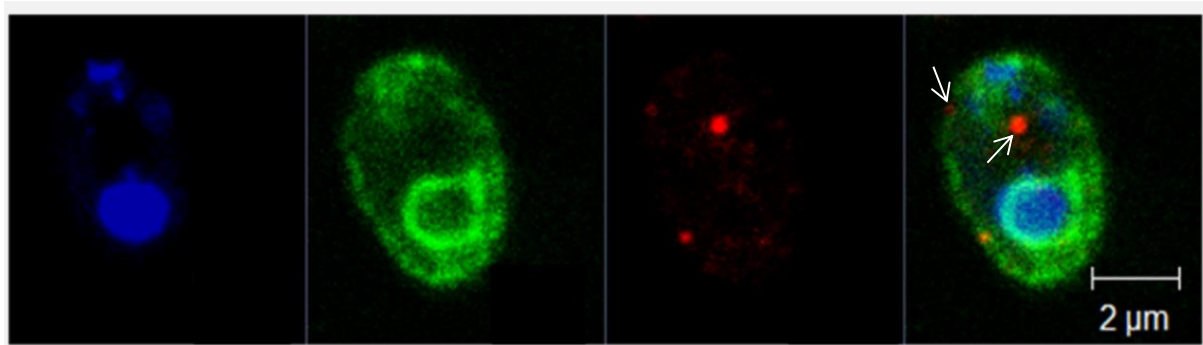
Um eine höhere Auflösung der Zellen und ihrer Organellen zu erhalten und somit eine bessere Aussage über die morphologischen Zusammenhänge zwischen Peroxisomen und dem ER in *S. cerevisiae* erhalten zu können, wurden die Proben zusätzlich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe eines Konfokalmikroskops untersucht.

Durch Laserlicht, welches engmaschig über das Präparat läuft (LSM), werden die Fluoreszenz-Farbstoffe angeregt. Wenn das detektierte Licht erfasst wird, kann Licht, welches von außerhalb der aktuell aufgenommenen Ebene kommt, durch eine Lochblende blockiert werden. Durch die erhöhte Auflösung insbesondere in der z-Ebene ist es zusätzlich möglich, ein dreidimensionales Bild zu erstellen.

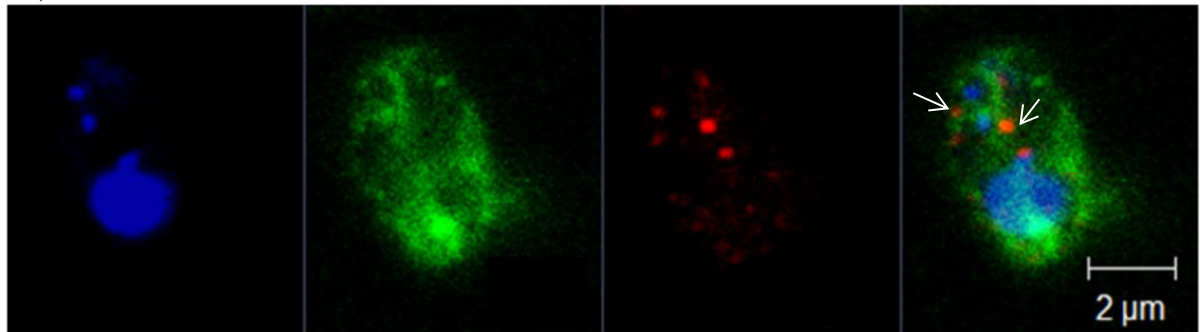
#### ***3.3.5.1 Morphologischer Zusammenhang von Peroxisomen und ER in der Ebene***

In den folgenden Abbildungen ist der *S. cerevisiae*-Stamm YST 1285 mit integriertem Sec63-GFP anhand einiger Beispiele aus der Konfokalmikroskopie dargestellt. Als Primär- und Sekundär-Antikörper wurde die schon unter 3.3.3 genannte Kombination genutzt.

Die einzelnen Beispiele sollen die räumliche Nähe von Peroxisomen und ER, die in der konventionellen Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtet wurden, unterstützend verdeutlichen und die Hypothese einer permanenten engen Assoziation von Peroxisomen und ER verstärken.



a-d)

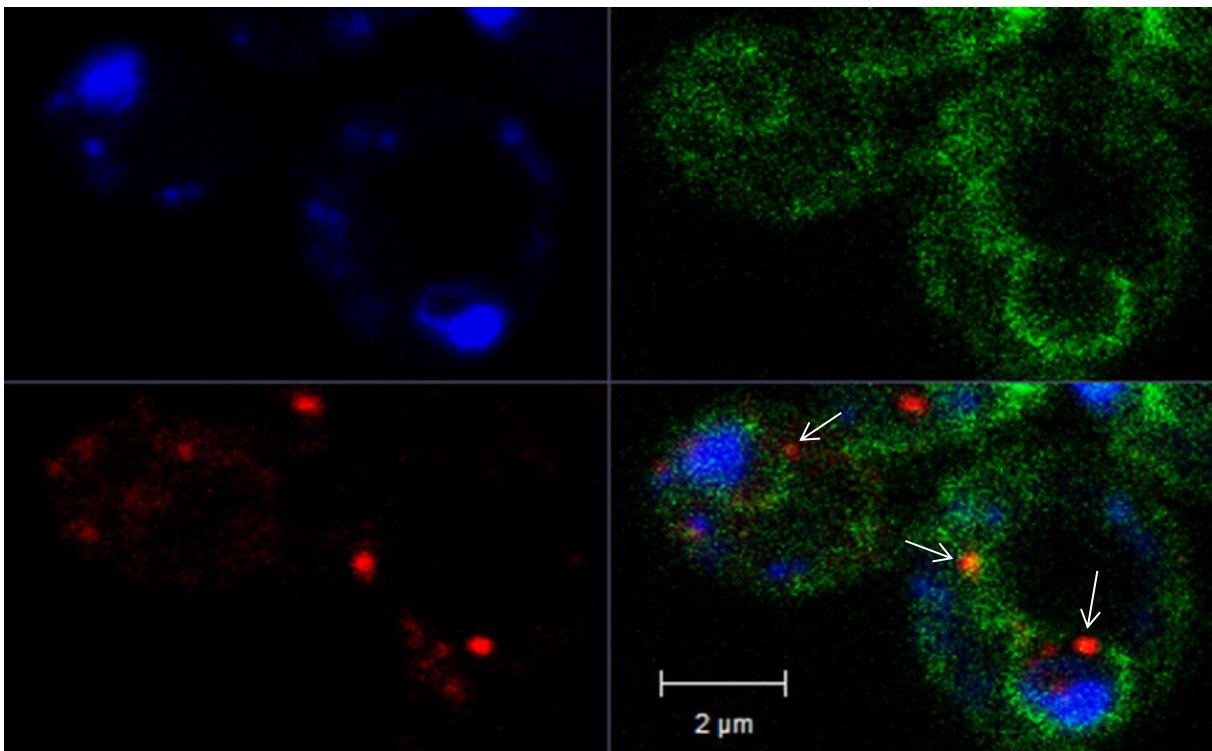


e-h)

**Abb. 3.23 a-h: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie 1 – Assoziation von Peroxisomen und ER**

DAPI-blau: DNS (Zellkern und Mitochondrien), Alexa488-grün: Sec63 (ER), Cy3-rot: Pex3p (Peroxisomen)  
 Dargestellt sind jeweils die Einzelkanäle (a-c bzw. e-g) und die zusammengesetzten Mischbilder (d und h).

Bei den Bildern handelt es sich um zwei verschiedene Ebenen derselben Zelle. Zu beachten ist die enge Assoziation von Peroxisomen mit dem ER (Pfeile).



a-d)

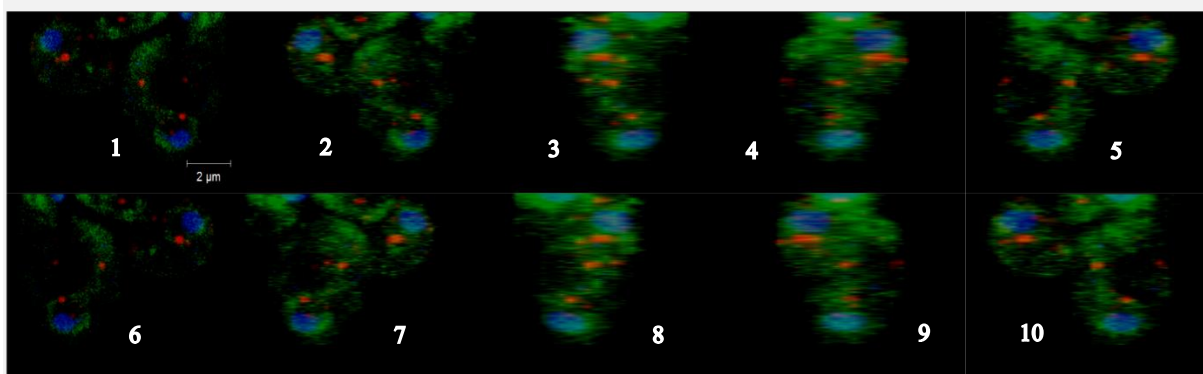
**Abb. 3.24 a-d: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie 2 – Assoziation von Peroxisomen und ER**

DAPI-blau: DNS (Zellkern und Mitochondrien), Alexa488-grün: Sec63 (ER), Cy3-rot: Pex3p (Peroxisomen)  
 Besonders zu beachten ist auch hier die enge Assoziation von Peroxisomen mit dem ER (Pfeile).

Auch bei der Darstellung von *S. cerevisiae* mittels Konfokalmikroskopie wird deutlich, dass Peroxisomen und ER zu jedem Zeitpunkt eng assoziiert sind. In den Abbildungen 3.23 und 3.24 deuten die Pfeile jeweils Beispielhaft die Nähe der beiden Organellen an. Sowohl die perinukleären als auch die peripher gelegenen Peroxisomen sind jeweils in das ER-Netzwerk eingebettet. In Abbildung 3.23 scheint eines der Peroxisomen ganz ohne ER-Verbindung in der Zelle zu liegen. Wenn man das gleiche Peroxisomen allerdings in der anderen Ebene betrachtet, wird deutlich, dass auch dieses Kontakt zu einem „ER-Steg“ hat, der durch die Zelle verläuft.

### 3.3.5.2 Dreidimensionale Darstellung von *S. cerevisiae*

Die höhere Auflösungsfähigkeit in der z-Ebene bei der Konfokalmikroskopie kann dazu genutzt werden, dreidimensionale Bilder zu erstellen. Zu diesem Zweck wurde ein Bildstapel aufgenommen und zu einem 3D-Konstrukt verarbeitet. Um dieses hier darstellen und die Zellen von mehreren Perspektiven aus betrachten zu können, wurden von dem 3D-Konstrukt mehrere Abbildungen erstellt, während es um die y-Achse gedreht wurde. Die entstandenen Bilder sind in der Abbildung 3.25 zu finden.



**Abb. 3.25: Konfokale Mikroskopie – Dreidimensionale Darstellung**

DAPI-blau: DNS (Zellkern und Mitochondrien), Alexa488-grün: Sec63 (ER), Cy3-rot: Pex3p (Peroxisomen). Die dargestellten Zellen wurden im Uhrzeigersinn um die y-Achse gedreht und in jeder 10. Ebene eine Abbildung erstellt.

Bei dem verwendeten Bildstapel handelt es sich um dieselben Zellen, die in Abbildung 3.24 dargestellt wurden. Man kann erkennen, dass die Peroxisomen, auf die schon in dieser Abbildung hingewiesen wurde, von jedem Blickwinkel aus mit dem ER in Verbindung

stehen. Folglich unterstützt auch die dreidimensionale Darstellung die Hypothese, dass Peroxisomen und ER permanent eng assoziiert vorliegen.

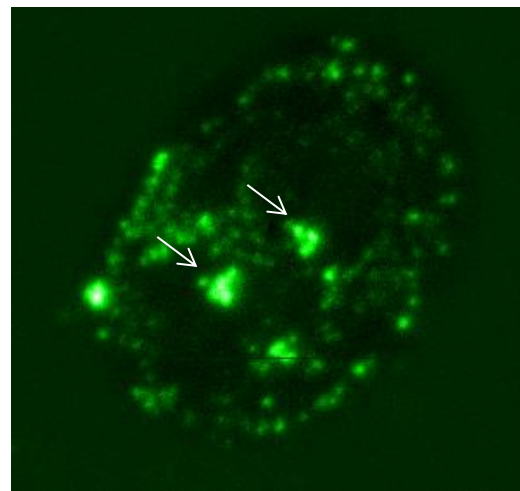
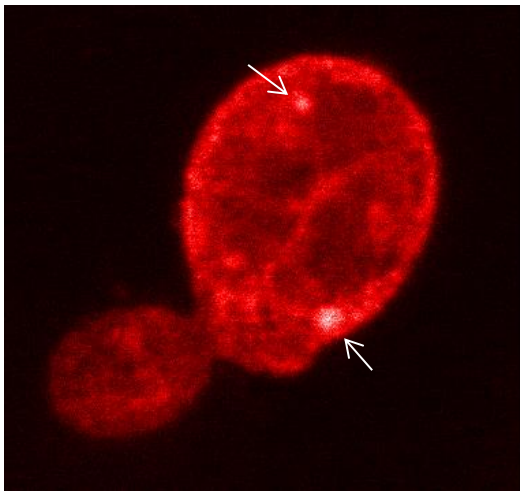
### ***3.3.6 Immunfluoreszenz mit Atto590r- und Atto647m-Antikörpern für die STED-Mikroskopie***

Das für die IF etablierte Versuchsprotokoll soll dazu dienen, die Zellen von *S. cerevisiae* mit hochauflösender STED-Mikroskopie zu untersuchen. Nachdem die Kombination der oben angegebenen Primär- und Sekundär-Antikörper zu erfolgsversprechenden Aufnahmen geführt hat, wurde der Versuch mit STED-geeigneten Antikörpern erneut durchgeführt. Die Antikörper wurden uns von der Arbeitsgruppe des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen zur Verfügung gestellt. Da bei den vorherigen Versuchen die Kombination von zwei Sekundär-Antikörpern ohne Probleme möglich war, sollte diese Doppelfärbung von Pex3 und ER für die STED-Mikroskopie mit den entsprechenden Antikörpern Atto590r und Atto647m direkt umgesetzt werden.

Hierbei zeigte sich allerdings eine uneinheitliche Fluoreszenz, die weder direkt den Peroxisomen, noch dem ER zugeordnet werden konnte. Daher wurde zunächst erneut die Einzelfärbung der beiden Organellen durchgeführt. Beispielhafte Aufnahmen dieser Zellen sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

Wie in den Abbildungen deutlich zu erkennen ist, fielen bei diesen Einzelfärbungen mit Atto647m, die eigentlich die Peroxisomen darstellen sollten, neben den Peroxisomen fluoreszierende Strukturen auf, die wie das ER imponieren. Bei der Verwendung von Atto590r, gerichtet gegen das ER, zeigten sich neben einer schwachen Darstellung des ERs hingegen unspezifische Fluoreszenzen, die weder den Peroxisomen noch dem ER direkt zugeordnet werden konnten.

Vermutlich kam es hier zu einer Interaktion der Antikörper mit zelleigenen Strukturen. Abschließend ist eine Untersuchung der Zellen mittels STED-Mikroskopie bisher nicht zufriedenstellend möglich gewesen.



**a)**  
**Abb. 3.26 a-b: STED-mikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae* unter Verwendung von Atto647 (a) und Atto590 (b) in Einzelfärbungen**

Abbildung a) stellt eine STED-mikroskopische Aufnahme nach Färbung mit Hilfe des Sekundär-Antikörpers Atto647 dar. Der Antikörper ist in diesem Fall über den Primär-Antikörper gegen Pex3 gerichtet und soll folglich die Peroxisomen darstellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass neben peroxisomalen Strukturen (mit Pfeil markiert) ein retikuläres Netz dargestellt wird, welches vermutlich dem ER entspricht. In Abbildung b) hingegen erfolgte die Verwendung von Atto647 als Sekundär-Antikörper, der in diesem Fall eigentlich Strukturen des ER darstellen sollte. Bei diesen Zellen kam es aber neben einer geringen Darstellung des perinukleären und peripheren ERs zu einer Fluoreszenz von Strukturen, die weder Peroxisomen noch dem ER zugeordnet werden können (beispielhaft mit Pfeil markiert) und auch nicht durch häufigere Waschschriffe eliminiert werden konnten.

## 4 Diskussion

Die Experimente dieser Arbeit sollen zum Verständnis der Peroxisomenbiogenese am endoplasmatischen Retikulum beitragen. Zunächst wurde auf die Rolle des Dynamin-ähnlichen Proteins Vps1p im Rahmen der frühen peroxisomalen Entstehung eingegangen. In weiteren Versuchen wurde der räumliche Zusammenhang von Peroxisomen und dem ER aufgegriffen. Komplettierend wurde ein Versuchsprotokoll etabliert, welches ermöglichen soll, die Peroxisomenforschung der hochauflösenden Mikroskopie (Nanoskopie, STED-Mikroskopie) zugänglich zu machen.

### 4.1 Vps1p in der peroxisomalen Entstehung

Die Experimente im ersten Teil dienten der Klärung der Frage, welche Rolle das Dynamin-ähnliche Protein Vps1p in der peroxisomalen Entstehung spielt. In der Literatur wird die Meinung vertreten, dass Vps1p lediglich an der Teilung von bereits bestehenden Peroxisomen beteiligt und demnach nicht für die Bereitstellung peroxisomaler Proteine aus dem ER verantwortlich zu machen ist (Motley and Hettema 2007).

Meine Experimente zu diesem Themenkomplex gehen der Frage nach, ob Vps1p an der Neuentstehung von Peroxisomen beteiligt ist.

#### 4.1.1 Versuchsmethodik

Die für dieses Experiment verwendeten Zellstämme wurden so konstruiert, dass zu Beginn in den Zellen keine Peroxisomen vorhanden waren. Dies wurde dadurch erreicht, dass Pex3p unter den Einfluss eines Galaktose-induzierbaren Promotors gestellt wurde. Die Bildung neuer Peroxisomen setzte somit erst durch einen Galaktose-Puls ein. Sämtliche Peroxisomen in diesem Experiment wurden also *de novo* gebildet. Dies ist für den Versuchsaufbau insofern wichtig, als dass hier der Effekt von Vps1p an dem Prozess der Neubildung in drei unterschiedlichen Hefezell-Stämmen beobachtet werden sollte. Bei diesen Hefestämmen handelt es sich um Wildtypzellen, Zellen mit einem Vps1p-Knock-out und solchen mit einer Überexpression von Vps1p.



Um neben der Peroxisomenbeurteilung das Verhältnis von Peroxisomen und ER besser beurteilen zu können, wurden für das Experiment die Zellen so verändert, dass beide Organellen fluoreszierten. Somit konnten durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen die Anzahl der Peroxisomen und ihre Lokalisation im Verhältnis zum ER bestimmt werden.

Der gewählte Versuchsaufbau eignet sich besonders für die Quantifizierung der Peroxisomenanzahl pro Zelle, da sich der Versuch bei geringem Materialaufwand und gleichen Bedingungen gut reproduzieren lässt. Die Auswertung erfolgte pro Zellstamm von 60 Zellen je Versuchszeitpunkt und Tag. Um tatsächlich sämtliche Peroxisomen in einer Zelle zu sehen, ist es notwendig, dass die Aufnahme und Auswertung der Zellen in verschiedenen Fokusebenen erfolgt. Es zeigte sich, dass eine Schichtzahl von 7 Ebenen am besten geeignet ist, um die jeweiligen Zellen vollständig aufzunehmen und bei der Auszählung sämtliche Peroxisomen erfassen zu können.

Um Sicherheit über die Qualität der Auszählung zu erhalten, wurden einige Ausschnitte mehrfach gezählt. Dabei war es essentiell, dass die zu untersuchenden Bildausschnitte eine übersichtliche Anzahl an Zellen aufwiesen und darüber hinaus die Zellen nicht übereinander zu liegen kamen, da dies eine Auswertung unmöglich gemacht hätte.

Die Anzahl an Peroxisomen pro Zelle zu jedem Versuchszeitpunkt wurde im Anschluss an die Auszählung in einem Balkendiagramm aufgetragen. Da bei den Auszählungen auch elongiert erscheinende Peroxisomen auftraten, wurden diese zur besseren Übersicht farblich verändert in das Balkendiagramm mitaufgenommen. Aus den Balkendiagrammen der drei verschiedenen Zellstämme wurden zur Gesamtübersicht der Ergebnisse des Versuchs letztendlich zwei Graphiken (Abbildung 3.11 und 3.12) erstellt. Diese stellen die Zunahme von Peroxisomen im Zeitverlauf und die Häufigkeit von elongierten peroxisomalen Strukturen in einer übersichtlichen Weise dar.

---

### 4.1.2 *Vps1p und Peroxisomen*

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl ein Knock-out als auch eine Überexpression von Vps1p zu signifikant unterschiedlichen Phänotypen in der frühen Peroxisomenneuentstehung im Vergleich zum Wildtyp führen.

Daher geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass Dynamamin-ähnliche Proteine wie Vps1p nicht erst an dem im Zeitverlauf späten Prozess der peroxisomalen Teilung involviert sind, sondern sich schon an frühen Abläufen der Peroxisomenentstehung beteiligen.

Bei den Zelllinien mit einem Knock-out von Vps1p waren die Unterschiede zu Wildtyp-Zellen zum einen in Form von elongierten peroxisomalen Strukturen und zum anderen in einer verminderten Anzahl von Peroxisomen pro Zelle zu sehen.

Es wird derzeit davon ausgegangen, dass die peroxisomale Teilung in drei Schritten abläuft. Zunächst kommt es zu einer Elongation, im Anschluss finden Einschnürungen statt und schlussendlich erfolgt dann die Abspaltung von einzelnen reifen Organellen (Koch et al. 2003; Schrader et al. 1998).

Wenn also elongierte Peroxisomen auftreten, ist dies ein Zeichen dafür, dass die Aufteilung in einzelne Peroxisomen verlangsamt oder komplett eingestellt ist.

Damit unterstützt das vermehrte Auftreten von elongierten Peroxisomen in Zellen mit einem Vps1p-Knock-out, welches in dieser Arbeit beobachtet werden konnte, die These, dass Vps1p an der Teilung von Peroxisomen beteiligt ist (Motley und Hettema 2007).

Bemerkenswert ist, dass bei einer Überexpression von Vps1p solch elongierte Strukturen zu keinem Zeitpunkt vorliegen, während sie im Wildtyp – wenn auch zu einem sehr geringen Anteil – zu finden sind. Durch die erhöhte Aktivität des Vps1p scheint die Aufteilung in einzelne Peroxisomen dementsprechend schneller vonstatten zu gehen.

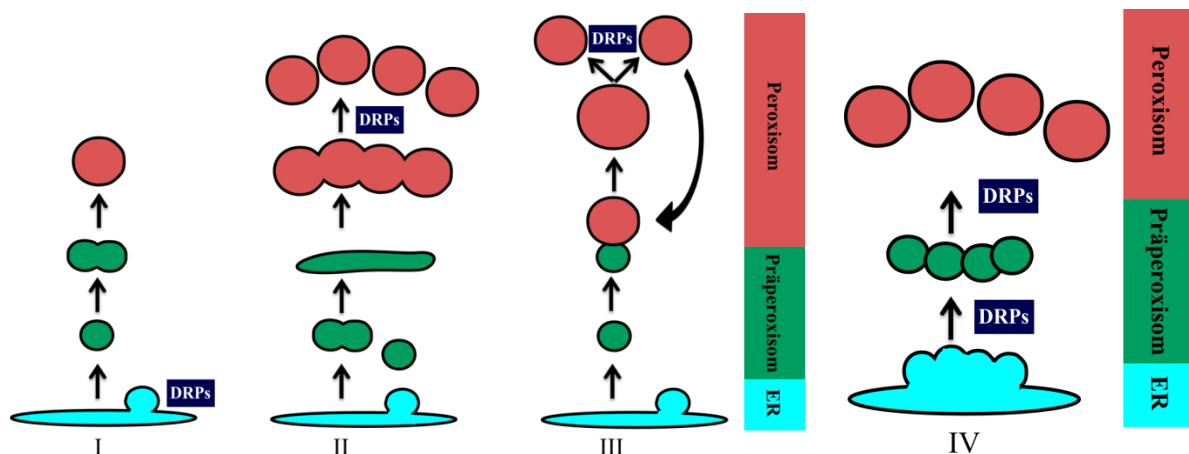
Ein neuer Aspekt dieser Arbeit ist, dass bei den vorliegenden Versuchen das Verhältnis von Peroxisomen zum ER im Vergleich zu Wildtyp-Zellen und Zellen mit Vps1p-Überexpression verändert zu sein scheint.

Bei Wildtypzellen und bei solchen mit einer Überexpression von Vps1p liegt zu frühen Zeitpunkten jeweils ein auch in der Literatur beschriebener Pex3-Pool im ER vor (Hoepfner et al. 2005; Knoblach et al. 2013).

Bei Vps1p-Knock-out-Zellen konnte diese endoplasmatische Speicherung des Pex3p hingegen nicht beobachtet werden. Diese Tatsache lässt vermuten, dass Vps1p eine Rolle in der Interaktion von Peroxisomen und ER spielt. Wenn Vps1p nicht vorhanden ist, kann das Pex3p nicht seinen gewohnten Gang über das ER hin zu neuen Peroxisomen nehmen.

Daraus lässt sich auch schließen, dass im Vps1p-Wildtyp zu einem gewissen Grad eine ER-abhängige Neuentstehung von Peroxisomen stattfindet, an der Vps1p eine Funktion zu einem im Zeitverlauf frühen Zeitpunkt innehat.

Letztlich lässt sich nicht eindeutig klären, ob die aufgetretenen Effekte nun Effekte an vollständig neugebildeten Peroxisomen oder Effekte an im Versuchsablauf durch Teilung neuentstandenen Peroxisomen sind. Allerdings konnte in Versuch 3.2.3.1 mit Hilfe einer Kolokalisation von Pex3p-Spots und HcRed-SKL gezeigt werden, dass es sich bei den Pex3p-Spots um reife Peroxisomen handeln muss.



**Abbildung 4.1 I-IV: Beteiligung des Dynamin-ähnlichen Proteins Vps1p an der peroxisomalen Entstehung**  
Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass eine Beteiligung des Vps1p an der Neuentstehung von Peroxisomen – neben der bisher bekannten Rolle in der peroxisomalen Teilung – sehr wahrscheinlich ist, dieses Ergebnis ist im Teilungsmodell IV im rechten Bereich dieser Abbildung dargestellt. Demgegenüber stehen die Teilungsmodelle, die derzeit in der Literatur diskutiert werden und bereits in der Einleitung besprochen wurden. Modell III postuliert hierbei eine Entstehung von neuen Peroxisomen lediglich durch DRP-abhängige Teilung aus bereits bestehenden Peroxisomen (Modell modifiziert nach Motley und Hettema 2007, S. 400). Während die Modelle I und II ähnlich wie das Modell IV eher die kontinuierliche Neubildung von Peroxisomen aus dem ER favorisiert (Thoms und Erdmann 2005a). Neu an Modell IV ist der Wirkort der Dynamin-ähnlichen Proteine, der in dieser Arbeit sowohl bei der Neuentstehung und Interaktion am ER als auch bei der späteren Teilung diskutiert wird.

Sowohl der verwendete Versuchsaufbau als auch das zeitlich frühe Auftreten der Effekte lassen eine Beteiligung von Vps1p an der Neuentstehung der Peroxisomen vermuten.

---

Das in Abbildung 4.1 dargestellte Modell IV fasst die Ergebnisse über die Beteiligung Dynamin-ähnlicher Proteine an der peroxisomalen Entstehung in Anlehnung an das Modell nach Motley und Hettema von 2007 zusammen. Es soll verdeutlichen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die Beteiligung von Dynamin-ähnlichen Proteinen, speziell des Vps1p, an einem frühen Entwicklungspunkt verknüpft mit dem ER, wahrscheinlich machen. Diese Beteiligung findet zusätzlich zu der bereits anerkannten Teilung von Vorstufen in einzelne Peroxisomen statt.

## 4.2 Peroxisomenbildung

Mit Hilfe der Versuche dieses Kapitels sollte untersucht werden, inwieweit Unterschiede im Pex3p-Transport in der peroxisomalen Neogenese bei Zellen ohne Peroxisomen, im Vergleich zum Pex3p-Transport in Peroxisomen bei Zellen mit bereits vorhandenen Peroxisomen zu erkennen sind.

Bisher wurde vermutet, dass die *de novo*-Bildung von Peroxisomen nur dann stattfindet, wenn eine Zelle zuvor frei von Peroxisomen ist. Dabei sei der Prozess der Neubildung im Vergleich zum Wachstums- und Teilungsprozess deutlich langsamer (Motley und Hettema 2007).

Bei der Durchführung der Experimente konnte zunächst kein grundsätzlicher Unterschied im Pex3p-Transport in Zellen, in denen nur Neogenese stattfindet und in Zellen, in denen bereits Peroxisomen vorhanden waren, festgestellt werden. Lediglich die Menge an neugebildeten Peroxisomen bei  $\Delta$ pex3p-Zellen war höher als bei den Wildtypzellen. Darüber hinaus wurde das im ER gespeicherte Pex3p deutlich schneller aufgebraucht, als dies bei den Zellen, die bereits Peroxisomen vorliegen hatten, der Fall war. Dieses Verhalten kann dadurch erklärt werden, dass die Zelle über Mechanismen verfügt, die die Regulation der Gesamt-Peroxisomenzahl reguliert (Knoblach et al. 2013).

Daher müssen in Zellen, in denen zuvor keine Peroxisomen vorhanden waren, mehr Peroxisomen gebildet werden. Somit wird auch das gebildete Pex3p schneller verbraucht und verschwindet demnach aus dem ER.

In einem Folgeexperiment wurde darüber hinaus die Frage geklärt, welche Bedeutung die punktförmige Fluoreszenz von Pex3p in Neogenese durchführenden Zellen hat. Durch die

Kolokalisation der beiden Fluoreszenzen von Pex3p und SKL konnte bewiesen werden, dass es sich bei sämtlichen Pex3p-Spots in den vorangegangenen Experimenten um reife Peroxisomen handeln muss. Diese Spots treten zum einen in Neogenese durchführenden Zellen auf. Sie sind aber auch in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* zu finden. Lediglich die Anzahl der Pex3p-Spots war in den Wildtypzellen etwas geringer. Die Bedeutung von Pex3p-Spots ist also zusammengefasst als das Vorliegen von mittels *de novo* gebildeten reifen Peroxisomen zu sehen. Dass diese Pex3p-Spots auch in Wildtypzellen auftreten, spricht dafür, dass auch in diesen Zellen zu einem gewissen Grad Peroxisomen mittels Neogenese gebildet werden. Dabei macht es wiederum Sinn, dass die Anzahl der neugebildeten Peroxisomen in solchen Zellen, in denen zu Versuchsbeginn bereits Peroxisomen vorlagen, geringer ausfällt, da die Gesamtzahl der Peroxisomen wie bereits beschrieben durch die Zelle limitiert wird.

Ein nächster Schritt sollte Aufschluss über die Lokalisation der Peroxisomen in den Zellen geben und darüber hinaus mögliche Unterschiede in Wildtyp- und Pex3p-defizienten Zellen aufdecken. Dazu wurden Zelllinien mit Hilfe der Live-Zell-Mikroskopie untersucht. In den Zellen, die für diese Experimente genutzt wurden, war neben den Peroxisomen auch das ER fluoreszent markiert, da eine enge räumliche Nähe von Peroxisomen und ER aus der Literatur bereits bekannt ist (Knoblach et al. 2013; Novikoff und Novikoff 1972) und so die Lokalisation in der Zelle und im Zusammenhang zum ER beurteilt werden konnte. Die Untersuchung von Zellen mittels Live-Mikroskopie wurde sowohl in Wildtypzellen als auch in Zellen mit sicher stattfindender Neogenese durchgeführt. Auch hierbei konnte kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Zelllinien erkannt werden. In beiden Zellen befinden sich auch reife Peroxisomen in enger räumlicher Lokalisation zum ER.

Beide Organellen bewegen sich in den Versuchssequenzen simultan, die Peroxisomen scheinen am ER anzuhaften. Dieser Sachverhalt wird in Kapitel 4.3 noch einmal genauer aufgegriffen.

Da in den untersuchten Zelllinien bis auf die Anzahl an im Versuch neugebildeten Peroxisomen keine weiteren Unterschiede beobachtet werden konnten, wird die Hypothese wahrscheinlicher, dass auch unter normalen Bedingungen in *S. cerevisiae* eine Neuentstehung von Peroxisomen mittels Neogenese stattfindet.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das zunächst alleinig favorisierte Wachstums- und Teilungsmodell immer unwahrscheinlicher wird. Stattdessen sieht es so aus, als wenn

---

zumindest zu einem gewissen Anteil in Wildtyp-Zellen eine *de novo*-Entstehung von Peroxisomen stattfindet. Dabei ist es möglich, dass beide Prozesse, also die Neubildung von Peroxisomen und der Weg von Wachstum und anschließender Teilung in einer Zelle parallel ablaufen. Diese Möglichkeit wurde bereits zu früheren Zeitpunkten in der Literatur in Erwägung gezogen (Huber et al. 2012; Kim et al. 2006).

### 4.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie – Beziehung zwischen Peroxisomen und ER

Fast 20 Jahre nach der Entdeckung der Peroxisomen mittels Elektronenmikroskopie (Rhodin 1954) konnte erstmals ein räumlicher Zusammenhang von Peroxisomen und ER beobachtet werden (Novikoff und Novikoff 1972). Zunächst wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass es sich bei Peroxisomen um autonome Zellbestandteile handelt (de Duve 1982). Mittlerweile wird allerdings neben dem beschriebenen engen räumlichen Zusammenhang zwischen Peroxisomen und ER auch eine funktionelle Verbindung diskutiert (Agrawal et al. 2011; Barton et al. 2013; van der Zand und Tabak 2013).

Es bleibt die Frage, ob der Zusammenhang zwischen den beiden Organellen ein Bündnis auf Zeit ist, welches sich nach erfolgreichem Austausch von bestimmten Proteinen wieder löst, oder es sich um eine permanente, also quasi lebenslange Verbindung der beiden Organellen untereinander handelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, speziell der Teil über die Immunfluoreszenz-Mikroskopie, sollen zur Klärung dieser Fragen genutzt werden. Darum wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von *S. cerevisiae*-Zellen ein Versuchsprotokoll etabliert, welches die Darstellung von Peroxisomen mittels IF-Mikroskopie ermöglicht. Die IF-Technik ist zwar ein aufwändigeres Verfahren, bietet aber mit Hilfe von Konfokal- und STED-Mikroskopie die Möglichkeit einer hochauflösenden Darstellung von Zellbestandteilen.

Darüber hinaus werden im Folgenden auch aktuelle Meinungen der Literatur in Hinblick auf diese Fragestellung durchleuchtet.

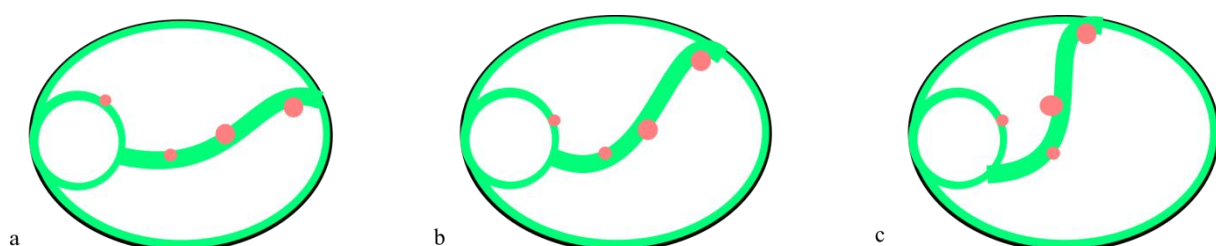
Nach vollständiger Ausarbeitung des Versuchsprotokolls konnten, wie den Bildern des Ergebnis-Teils zu entnehmen ist (Abb. 3.22), neben den peroxisomalen Strukturen auch Kernstrukturen und das ER dargestellt werden. Bereits bei den initialen Aufnahmen der IF-

Mikroskopie zeigte sich der räumliche Zusammenhang zwischen den Peroxisomen und dem ER. Schon hier erschien der Eindruck, dass sich Peroxisomen eng in das bestehende ER-Netz einpassen. Um allerdings ein Vortäuschen von bestehenden Zusammenhängen durch eine geringe Auflösung ausschließen zu können, wurden die Proben mit Hilfe der Konfokal-Mikroskopie, die eine deutlich bessere Auflösung speziell in der z-Ebene bietet, untersucht. Hierzu mussten als Sekundär-Antikörper solche gewählt werden, die bei einer längeren Belichtungszeit nicht ausbleichen.

Die entstandenen hochauflösenden Bilder verschaffen als Ergänzung zu den übrigen Experimenten dieser Arbeit einen Eindruck über den Zusammenhang von Peroxisomen und ER. Wie erwartet zeigte sich auch hier deutlich, dass Peroxisomen und ER im Zellinneren permanent miteinander verbunden sind.

Mit Hilfe der Konfokal-Mikroskopie war es darüber hinaus möglich neben einer genaueren Darstellung in der Ebene (Abb. 3.23 und 3.24) eine dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen und ihrer intrazellulären Bestandteile anzufertigen. Gerade durch diese Rekonstruktion (Abb. 3.25) wird die Hypothese einer permanent vorliegenden Verbindung von Peroxisomen und ER weiter unterstützt. In Abbildung 4.2 ist dieses Verhalten schematisch dargestellt.

Die Abbildung soll darüber hinaus verdeutlichen, dass es bei jeglichen Bewegungen des ER auch zu simultanen Bewegungen der Peroxisomen kommt. Dieses Verhalten von Peroxisomen und ER konnte mit Hilfe von Live-Zell-Mikroskopie-Experimenten in Wildtyp-Zellen und in zu Versuchsbeginn Pex3p-defizienten Zellen dargestellt werden (siehe Kapitel 3.2.3.2 und 3.2.3.3).



**Abb. 4.2 a-c: Verknüpfung von Peroxisomen und ER**

In der Abbildung ist schematisch die Verbindung von Peroxisomen und dem ER dargestellt, die sich während sämtlicher Versuche dieser Arbeit immer wieder zeigte. Vom ER isoliert vorliegende Peroxisomen waren praktisch nicht zu finden. Hier soll gezeigt werden, dass Peroxisomen sowohl Zellkern-nah als auch in der Peripherie intrazellulär vorliegen. Dabei sind sie ständig mit dem ER verbunden und bewegen sich im Zeitverlauf (a-c) mit diesem simultan mit.

Sämtliche Abbildungen dieser Arbeit zeigen lediglich miteinander in Verbindung stehende Peroxisomen-ER-Gebilde. Vom ER isoliert vorliegende Peroxisomen wurden zu keinem Zeitpunkt der Aufnahmen beobachtet, die Peroxisomen waren stets entweder mit dem perinukleären ER oder aber ER-Stegen, die vom perinukleären ER in die Peripherie der Zelle zogen, verbunden.

In Versuch 3.2.3.1 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es sich bei den peroxisomalen Strukturen, die in dieser Arbeit betrachtet wurden, um reife Peroxisomen handelt. Das bedeutet, dass auch reife Peroxisomen eine Verbindung zum ER aufweisen. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit deuten also eher auf die Hypothese eines lebenslangen Bündnisses zwischen Peroxisomen und dem ER hin.

Auch wenn zu Beginn der Peroxisomen-Geschichte aufgrund ihrer wichtigen metabolischen Funktionen, beispielsweise in der  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren, vermutet wurde, dass Peroxisomen – genau wie Mitochondrien – autonome Zellbestandteile sein könnten (de Duve 1982), weisen mittlerweile auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen darauf hin, dass Verbindungen zwischen Peroxisomen und ER bestehen.

So wird schon seit geraumer Zeit diskutiert, dass das ER eine wichtige Rolle in der peroxisomalen Biogenese spielt und sich Peroxisomen möglicherweise kontinuierlich *de novo* aus dem ER entwickeln (Kunau 2005; Thoms und Erdmann 2005a; 2005b; van der Zand et al. 2006).

In Hefen konnte gezeigt werden, dass viele PMPs erst über das ER in die Peroxisomen gelangen (Agrawal et al. 2011; Hoepfner et al. 2005; van der Zand et al. 2010; van der Zand et al. 2012). Es wurde weiterhin herausgefunden, dass Pex3p sowohl in ER-gebundener Form als auch in peroxisomaler Form vorliegt und darüber hinaus eine Art Halterung existiert, die die Peroxisomen an das kortikale ER bindet. Dieser Halterungskomplex besteht aus Proteinen, die sowohl im Inneren als auch zwischen den beiden Zellkompartimenten liegen (Knoblach et al. 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Peroxisomen in ihrem Lebenszyklus auf das ER angewiesen zu sein scheinen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine langfristige Bindung zwischen beiden Organellen besteht.



#### 4.4 *S. cerevisiae* und STED-Mikroskopie

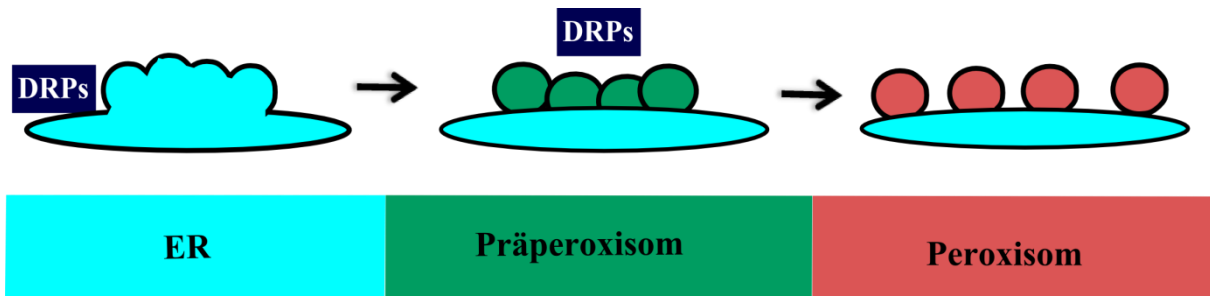
Um sich die Zellen für die STED-Mikroskopie nutzbar machen zu können, müssen spezielle Antikörper verwendet werden. Bei der Durchführung dieser Experimente zeigte sich allerdings die Problematik der Arbeit mit Hefezell-Stämmen. Sämtliche verwendeten, sekundären STED-geeigneten Antikörper wiesen neben den erwarteten peroxisomalen und endoplasmatischen Strukturen Nebenfluoreszenzen auf.

Bei der Verwendung von Atto647 zur Darstellung von Peroxisomen kam es zusätzlich zu einer Färbung endoplasmatischer Strukturen. Dies ist vermutlich auf eine Reaktion der Antikörper mit zelleigenen, beispielsweise lipophilen Strukturen zurückzuführen und kann dadurch erklärt werden, dass die für die STED-Mikroskopie verwendeten Antikörper nicht für die Arbeit mit Hefe-Stämmen vorgesehen und dementsprechend nicht für diese Art von Zellen aufgereinigt sind.

Um das Versuchsprotokoll in der Forschung mit Stämmen von *S. cerevisiae* dennoch für die STED-Mikroskopie nutzbar machen zu können, müssen geeignete Antikörper selbst hergestellt werden. Darüber hinaus kann das Versuchsprotokoll aber auch gut für die Arbeit mit menschlichen Zellen zur Darstellung von peroxisomalen Strukturen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in diesen Zellen genutzt werden, da für diese Zellen geeignete Antikörper bereits zur Verfügung stehen.

#### 4.5 Modell zur peroxisomalen Biogenese

Die Versuche dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die derzeitigen Modelle zur Peroxisomentstehung erweitert werden müssen. Es konnte gezeigt werden, dass Peroxisomen und ER zu jedem Zeitpunkt miteinander in Verbindung stehen und das Dynamin-ähnliche Protein Vps1p eine wichtige Rolle in der Interaktion der beiden Organellen bereits in frühen Stadien der Peroxisomenbiogenese spielt. Eine mögliche Erweiterung des Modells von Motley und Hettema von 2007 ist in Abbildung 4.3 dargestellt.



**Abbildung 4.3: Modifiziertes Teilungsmodell**

Das Modell fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen. Dynamin-ähnliche Proteine wie Vps1p sind demnach an der kontinuierlichen Bildung von Peroxisomen mit Weg über das ER beteiligt. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle an der Aufteilung von bereits bestehenden Peroxisomen. Das Modell zeigt außerdem, dass sich Peroxisomen nie ganz vom ER lösen.

Dieses Modell wurde unter Berücksichtigung aller neugewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit angefertigt und zeigt die permanente, enge räumliche Verbindung von Peroxisomen und dem ER. Außerdem wird deutlich, dass das Dynamin-ähnliche Protein Vps1p seinen Wirkort nicht nur bei der Teilung von bereits bestehenden Peroxisomen hat, sondern auch an einer frühen Interaktion von Peroxisomen und ER beteiligt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten außerdem darauf hin, dass eine Interaktion bzw. Verbindung zwischen Peroxisomen und dem ER zeitlebens stattfindet und sich die beiden Organellen nach der vollständigen Entwicklung der Peroxisomen nicht voneinander trennen.

### 5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der peroxisomalen Biogenese und soll zu ihrem Verständnis beitragen.

Die Arbeit konzentriert sich auf die Beteiligung des Dynamin-ähnlichen Proteins Vps1p an der peroxisomalen Biogenese. Es konnte gezeigt werden, dass Vps1p neben der bereits anerkannten Teilung von peroxisomalen Vorstufen in einzelne Peroxisomen zusätzlich an einem frühen Zeitpunkt der peroxisomalen Neogenese beteiligt ist.

Die Ergebnisse des Versuchs gaben außerdem Hinweise darauf, dass die Beteiligung von Vps1p an der Neuentstehung von Peroxisomen ER-abhängig abläuft. Da ein Zusammenhang von Peroxisomen und ER auch schon im Vorfeld beobachtet wurde, befasst sich ein weiterer Teil dieser Arbeit mit der räumlichen und funktionellen Verbindung von Peroxisomen und ER.

Hierzu wurde neben aufwändigen Live-Zell-Mikroskopie-Experimenten auch ein Protokoll zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie etabliert. Beide Experimente zeigten in sämtlichen Aufnahmen eindeutig die Verbindung beider Organellen, so dass eine lebenslange Bindung zwischen Peroxisomen und ER sehr wahrscheinlich erscheint.

Ein weiterer Aspekt befasste sich mit der Fragestellung, ob Peroxisomen in Wildtypzellen, wie derzeit in der Literatur postuliert wird, lediglich über den Weg von Wachstum und anschließender Teilung entstehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass in Wildtypzellen eine *de novo*-Peroxisomenbildung stattfindet. Es ist somit möglich, dass beide Systeme in Wildtypzellen parallel ablaufen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- Agrawal G, Joshi S, Subramani S (2011): Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(22), 9113-8
- Barton K, Mathur N, Mathur J (2013): Simultaneous live-imaging of peroxisomes and the ER in plant cells suggests contiguity but no luminal continuity between the two organelles. *Front Physiol* 4, 196
- de Duve C (1982): Peroxisomes and related particles in historical perspective. *Ann N Y Acad Sci* 386, 1-4
- De Duve C, Baudhuin P (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46(2), 323-57
- Doenecke D: Peroxisomen. In: Doenecke D, Koolmann J, Fuchs G, Gerok W (Hrsg.): *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 396-397
- Ebberink MS, Csanyi B, Chong WK, Denis S, Sharp P, Mooijer PA, Dekker CJ, Spooner C, Ngu LH, De Sousa C, Wanders RJ, Fietz MJ, Clayton PT, Waterham HR, Ferdinandusse S (2010): Identification of an unusual variant peroxisome biogenesis disorder caused by mutations in the PEX16 gene. *J Med Genet* 47(9), 608-15
- Goldman BM, Blobel G (1978): Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(10), 5066-70
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989): A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108(5), 1657-64
- Gärtner J (2000): Organelle disease: peroxisomal disorders. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3, S236-9
- Gärtner J: Erkrankungen des Nervensystems. In: Koletzko B (Hrsg.): *Kinder- und Jugendmedizin*. 13. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2007, 576-577
- Heiland I, Erdmann R (2005): Biogenesis of peroxisomes topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J* 272(10), 2362-2372
- 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(2), 223-33
- Hoepfner D, van den Berg M, Philippsen P, Tabak HF, Hettema EH (2001): A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 155(6), 979-90

- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF (2005): Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122(1), 85-95
- Huber A, Koch J, Kragler F, Brocard C, Hartig A (2012): A subtle interplay between three Pex11 proteins shapes de novo formation and fission of peroxisomes. *Traffic* 13(1), 157-67
- Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M (2004): A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21(11), 947-62
- 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(1), 57-67
- 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(4), 521-32
- Knoblach B, Sun X, Coquelle N, Fagarasanu A, Poirier RL, Rachubinski RA (2013): An ER-peroxisome tether exerts peroxisome population control in yeast. *EMBO J* 32(18), 2439-53
- Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M (2003): Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem*. 278(10), 8597-605
- Kunau WH (2005): Peroxisome biogenesis: end of the debate. *Curr Biol* 15(18), R774-6
- Kuravi K, Nagotu S, Krikken AM, Sjollem K, Deckers M, Erdmann R, Veenhuis M, van der Klei IJ (2006): Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. 119(Pt 19), 3994-4001
- Lazarow PB, Fujiki Y (1985): Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530
- Ma C, Agrawal G, Subramani S (2011): Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* 193(1), 7-16
- 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(7), 1275-86
- Moser HW (2000): Molecular genetics of peroxisomal disorders. *Front Biosci* 5, D298-306
- Motley AM, Hettema EH (2007): Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J Cell Biol*. 178(3), 399-410
- Novikoff PM, Novikoff AB (1972): Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *J Cell Biol* 53(2), 532-60

- Praefcke GJ, McMahon HT (2004): The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2), 133-47
- Pringle JR, Preston RA, Adams AE, Stearns T, Drubin DG, Haarer BK, Jones EW (1989): Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* 31, 357-435
- Rassow J: beta-Oxidation in Peroxisomen. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie. 2. Auflage*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008, 135
- Rayapuram N, Subramani S (2006): The importomer--a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim Biophys Acta* 1763(12), 1613-9
- Raymond GV(2001): Peroxisomal disorders. *Curr Opin Neurol* 14(6), 783-7
- Regal L, Ebberink MS, Goemans N, Wanders RJ, De Meirleir L, Jaeken J, Schrooten M, Van Coster R, Waterham HR (2010): Mutations in PEX10 are a cause of autosomal recessive ataxia. *Ann Neurol* 68(2), 259-63
- Rhodin J: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Stockholm University Aktiefbolaget Godvil; Stockholm 1954
- Sacksteder KA, Gould SJ (2000): The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet* 34, 623-652
- 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(5), 931-44
- Santos MJ, Imanaka T, Shio H, Small GM, Lazarow PB (1988): Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome--aberrant organelle assembly. *Science* 239(4847), 1536-8
- Schiestl RH, Gietz RD (1989): High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16(5-6), 339-46
- Schrader M, Fahimi HD (2008): The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* 129(4), 421-40
- 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(45), 29607-14
- Sevin C, Ferdinandusse S, Waterham HR, Wanders RJ, Aubourg P (2012): Autosomal recessive cerebellar ataxia caused by mutations in the PEX2 gene. *Orphanet J Rare Dis* 6(8)

- Smirnova E, Shurland DL, Newman-Smith ED, Pishvae B, van der Blik AM (1999): A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J Biol Chem* 274(21), 14942-7
- Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S (1991): A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 10(11), 3255-62
- Thoms S, Erdmann R (2005a): Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J* 272(20), 5169-81
- Thoms S, Erdmann R (2005b): Import of proteins into peroxisomes. *Eurekah Biosci* 1, 324-328
- Thoms S, Erdmann R (2006): Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling. *Biochim Biophys Acta* 1763(12),1620-8
- van der Zand A, Tabak HF (2013): Peroxisomes: offshoots of the ER. *Curr Opin Cell Biol* 25(4), 449-54
- van der Zand A, Braakman I, Geuze HJ, Tabak HF (2006): The return of the peroxisome. *J Cell Sci* 119(Pt 6), 989-94
- van der Zand A, Braakman I, Tabak HF (2010): Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 21(12), 2057-65
- van der Zand A, Gent J, Braakman I, Tabak HF (2012): Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* 149(2), 397-409
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV (2007): A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 356(17), 1736-41
- Weller S, Gärtner J (2002): Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 150, 226-237
- Weller S, Gould SJ, Valle D (2003): Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4, 165-211
- Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA (2001): Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12(9); 2894-905
- Zhang P, Hinshaw JE (2001): Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol* 3(10), 922-6

### **Danksagung**

Ich danke der Direktorin der Abteilung Frau Prof. Dr. med. J. Gärtner sowie Herrn PD Dr. rer. nat. S. Thoms für die Bereitstellung des Themas und die kollegiale Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. S. Thoms für die intensive Betreuung im Rahmen meiner Laborzeit, hier insbesondere für die freundliche Einführung in den Laboralltag und die Labormethoden. Darüber hinaus danke ich ihm aber auch besonders für die zuverlässige Unterstützung, die konstruktive Kritik und die anregenden Diskussionen im Rahmen der Erstellung meiner Arbeit.

Dem Laborteam auf der Ebene 1 der Universitätsmedizin Göttingen – insbesondere Jens Kaiser – danke ich für die Unterstützung im Laboralltag sowie die aufmunternden Gespräche.