

**Aspekte der peroxisomalen Dynamik:
Frühe *de novo* Synthese und Bewegung von
Peroxisomen durch Kinesine**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhardt Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Denise Dietrich
aus Singen (Hohentwiel)

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

10.12.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Gutachter:

Prof. Dr. Gabriele Dodt

2. Gutachter:

Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen

Für meine Familie,
die immer an mich glaubt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Peroxisomen.....	1
1.2	Peroxisomale Biogenese.....	2
1.2.1	Bildung der peroxisomalen Membran.....	3
1.2.2	Import peroxisomaler Membranproteine.....	5
1.2.3	Import peroxisomaler Matrixproteine.....	7
1.3	Intrazellulärer Transport.....	9
1.3.1	Kinesine.....	10
1.3.2	Dyneine.....	15
1.3.3	Peroxisomaler Transport.....	15
1.3.4	Bidirektionaler Transport.....	17
1.4	Ziel dieser Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Reagenzien, Lösungen, Puffer und Medien.....	21
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	23
2.2.2	Transformation von Plasmiden in elektrokompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	23
2.2.3	Plasmidpräparation.....	23
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	24
2.2.5	Agarose Gelelektrophorese.....	24
2.2.6	Klonierung von Plasmiden für den „knockdown“ von PEX19 mit shRNA....	24
2.2.7	Klonierung eines Vektors für die Expression von KifC3-NLS.....	26
2.2.8	RNA Isolierung aus Säugerzellen und cDNA Synthese.....	28
2.2.9	Quantitative real-time PCR.....	28
2.2.10	Analyse des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie.....	29
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.3.1	SDS-PAGE.....	30
2.3.2	Western Blotting.....	31
2.3.3	Coimmunopräzipitation.....	32
2.4	Zellbiochemische Methoden.....	33
2.4.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	33
2.4.2	Herstellung von Zellpellets.....	35

2.4.3	Transfektion von Plasmiden in Säugerzellen	36
2.4.4	Indirekte Immunfluoreszenz-Anfärbung und Mikroskopie	37
2.4.5	Lebendzellbeobachtung von Säugerzellen	38
2.4.6	Transfektion von siRNA in Säugerzellen.....	39
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Peroxisomenbiogenese	41
3.1.1	Komplementation von PEX16-defizienten humanen Fibroblasten	42
3.1.1.1	Kinetik der Komplementation von PEX16-defizienten Fibroblasten.....	43
3.1.1.2	Charakterisierung der Faktoren zur Bildung von Präperoxisomen	47
3.1.2	Import peroxisomaler Membranproteine	58
3.1.2.1	„Knockdown“ von PEX19 mit shRNA.....	58
3.1.2.2	PEX3 Import nach „knockdown“ von PEX19 mit siRNA	61
3.1.2.3	PEX3 Import nach „knockdown“ von PEX16 mit siRNA	65
3.2	Bewegung von Peroxisomen.....	69
3.2.1	Lebendzellbeobachtung nach Markierung von Peroxisomen.....	70
3.2.2	Bewegung von Peroxisomen in Abhängigkeit von Kinesinen	75
3.2.2.1	Nachweis und Überexpression von KifC3.....	76
3.2.2.2	„Knockdown“ von KifC3 mit siRNA	80
3.2.2.3	Interaktion von KifC3 mit peroxisomalen Proteinen	93
4	Diskussion	98
4.1	Peroxisomenbiogenese	100
4.1.1	Rolle des endoplasmatischen Reticulums bei der <i>de novo</i> Synthese von Peroxisomen	100
4.1.1.1	Abschnürung präperoxisomaler Vesikel vom endoplasmatischen Reticulum	101
4.1.1.2	Rolle der „frühen Peroxine“ PEX3, PEX16 und PEX19 bei der Bildung präperoxisomaler Vesikel.....	102
4.1.1.3	Import weiterer Membranproteine in die präperoxisomalen Vesikel ...	105
4.1.2	Rolle der peroxisomalen <i>de novo</i> Biogenese in Zelllinien mit bereits vorhandenen Peroxisomen	107
4.1.3	Importmechanismus für PEX3 in die peroxisomale Membran	108
4.1.4	Postulierung eines Modells für die semiautonome Biogenese von Peroxisomen	109
4.2	Bewegung von Peroxisomen.....	113

4.2.1	Peroxisomaler Transport in Abhängigkeit von Kinesin-1 und Dynein	113
4.2.2	Die Rolle von KifC3 beim Transport von Organellen.....	114
4.2.2.1	Beteiligung von KifC3 bei der Zellteilung	116
4.2.2.2	Einfluss der Mikrotubulorausrichtung auf den peroxisomalen KifC3 „knockdown“ Phänotyp	118
4.2.2.3	Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli	118
4.2.2.4	Entwicklung eines Modells für die Rolle von KifC3 beim peroxisomalen Transport	120
4.2.3	PEX1 als peroxisomaler Adaptor für KifC3	124
5	Zusammenfassung	126
6	Summary	128
7	Literatur	130
8	Anhang	154
8.1	Plasmide	154
8.2	Zeitreihen von Lebendzellbeobachtungen.....	158
8.2.1	Lebendzellbeobachtung von transfizierten Δ PEX16 Zellen	158
8.2.2	Δ PEX16-Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP im 3D Modell	159
8.2.3	Verfolgung der peroxisomalen Bewegung in COS7 Zellen	159
8.2.4	Verfolgung der Bewegung präperoxisomaler Strukturen	159
8.2.5	Verfolgung der peroxisomalen Bewegung nach Komplementation.....	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Kristalliner Einschluss von Uratoxidase in Peroxisomen	1
Abbildung 1.2: Modell der peroxisomalen Biogenese in Hefen.....	4
Abbildung 1.3: Import peroxisomaler Membranproteine der Klasse I	6
Abbildung 1.4: Import peroxisomaler Matrixproteine in Säugerzellen	8
Abbildung 1.5: Intrazellulärer Transport über Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine .	10
Abbildung 1.6: Domänenstruktur verschiedener Kinesine	11
Abbildung 1.7: Struktur des konventionellen Kinesins (Kif5).....	12
Abbildung 1.8: Bindung aufgereinigter Peroxisomen an Mikrotubuli <i>in vitro</i>	16
Abbildung 1.9: Modelle für den bidirektionalen Transport von Organellen	18
Abbildung 3.1: Peroxisomendefizienz in humanen Δ PEX16-Fibroblasten.....	43
Abbildung 3.2: Komplementation von humanen Δ PEX16 Fibroblasten	45
Abbildung 3.3: Charakterisierung der verschiedenen Phasen der peroxisomalen Biogenese	47
Abbildung 3.4: Präperoxisomale Strukturen kolokalisieren nicht mit „lipid rafts“	50
Abbildung 3.5: Lebendzellbeobachtung von transfizierten Δ PEX16 Zellen	52
Abbildung 3.6: Δ PEX16 Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP im 3D Modell	53
Abbildung 3.7: Depolymerisierung des Cytoskeletts in Δ PEX16 Fibroblasten.....	54
Abbildung 3.8: Peroxisomenbiogenese ist nicht abhängig vom Cytoskelett	55
Abbildung 3.9: Kinesine sind nicht notwendig zur Peroxisomenbiogenese	57
Abbildung 3.10: Proteinmenge an PEX19 nach Transfektion der „shPEX19- Vektoren“	60
Abbildung 3.11: Reduktion an PEX19- und PEX3-Protein nach „knockdown“ von PEX19	62
Abbildung 3.12: PEX19 unabhängiger Import von neu synthetisiertem PEX3.....	64
Abbildung 3.13: Reduktion der PEX16-Proteinmenge nach „knockdown“ von PEX16	66
Abbildung 3.14: Import von PEX3-myc und PMP70-myc in Abhängigkeit von PEX16	67
Abbildung 3.15: Aufnahme der peroxisomalen Bewegungsbahn in COS7 Zellen	70
Abbildung 3.16: Aufnahme der Bewegungsbahn von präperoxisomalen Strukturen	73
Abbildung 3.17: Aufnahme der peroxisomalen Bewegungsbahn nach Komplementation.....	74

Abbildung 3.18: KifC3 wurde in Säugerzelllinien unterschiedlich stark exprimiert.....	76
Abbildung 3.19: Zellphasen-abhängige Lokalisation von endogenem KifC3	78
Abbildung 3.20: Lokalisation von überexprimiertem KifC3 an Mikrotubuli	79
Abbildung 3.21: „Knockdown“ von KifC3 auf mRNA und Proteinebene.....	81
Abbildung 3.22: Clustering von Peroxisomen nach „knockdown“ von KifC3	82
Abbildung 3.23: KifC3 unabhängige Anlagerung der Peroxisomen an Mikrotubuli....	83
Abbildung 3.24: Depolymerisierung des Cytoskeletts in COS7 Zellen	84
Abbildung 3.25: Peroxisomaler Phänotyp ist abhängig von Mikrotubuli	85
Abbildung 3.26: Per Durchflusszytometrie ermittelte Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellphasen.....	87
Abbildung 3.27: Der peroxisomale Phänotyp ist nicht Zellphasen-abhängig	89
Abbildung 3.28: Positionierung von Organellen nach „knockdown“ von KifC3	90
Abbildung 3.29: Kernlokalisationsversuch mit KifC3 und verschiedenen Peroxinen .	94
Abbildung 3.30: Überexprimiertes PEX1 kolokalisiert mit KifC3 an den Mikrotubuli ..	95
Abbildung 3.31: Coimmunopräzipitation von KifC3 mit PEX1 aus Zelllysaten	97
Abbildung 4.1: Modell für die peroxisomale <i>de novo</i> Synthese in Säugerzellen.....	112
Abbildung 4.2: Modell zur Rolle von KifC3 beim peroxisomalen Transport	122
Abbildung 8.1: Plasmid pDD01 zur Expression von shPEX19.....	154
Abbildung 8.2: Plasmid pDD02 zur Expression von shPEX19.....	155
Abbildung 8.3: Plasmid pDD03 zur Expression von shPEX19.....	156
Abbildung 8.4: Plasmid pDD06	157
Abbildung 8.5: Plasmid pDD07 zur Expression von KifC3-NLS.....	158

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zur Klonierung und Proteinanalyse verwendete Lösungen, Puffer und Medien	21
Tabelle 2.2: Für molekurbioologische Methoden verwendeter <i>E. coli</i> Stamm	22
Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren	22
Tabelle 2.4: Oligonukleotide für die Expression von shRNA gegen PEX19	25
Tabelle 2.5: PCR-Primer für die Klonierung von KifC3-NLS	26
Tabelle 2.6: Primer für die quantitative real-time PCR	29
Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Gele	30
Tabelle 2.8: Zur Immunodetektion verwendete Antikörper beim Western Blotting ...	31
Tabelle 2.9: Verwendete Säugerzelllinien	33
Tabelle 2.10: Zelllinien von Patienten mit peroxisomalen Biogenese-Störungen	34
Tabelle 2.11: Verwendete Vektoren und Plasmide zur transienten Transfektion	36
Tabelle 2.12: Für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendete Antikörper	38
Tabelle 2.13: Verwendete siRNA	40
Tabelle 3.1: Charakterisierung der ungerichteten peroxisomalen Bewegung in COS7 Zellen	71
Tabelle 3.2: Charakterisierung der gerichteten peroxisomalen Bewegung in COS7 Zellen	72
Tabelle 3.3: Charakterisierung der Bewegung von Präperoxisomen	73
Tabelle 3.4: Charakterisierung der gerichteten Bewegung präperoxisomaler Vesikel	74
Tabelle 3.5: Verteilung der Peroxisomen bei Überexpression von KifC3	80

Abkürzungsverzeichnis

AAA-ATPase	ATPase associated with a variety of cellular activities
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	bovine serum albumin
Cav-1	Caveolin-1
CLIP	cytoplasmic linker protein
Colp	Coimmunopräzipitation
COP	coat protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
cDNA	(copy) deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dyn	Dynein
ECL	enhanced chemoluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	early endosome antigen 1
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Reticulum
FCS	fetal calf serum
Flot	Flotillin
GFP	green fluorescent protein
<i>gg</i>	<i>gallus gallus</i>
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
<i>hs</i>	<i>homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
KG	Komplementationsgruppe
Kif	kinesin-like protein family

Kin	Kinesin
LAMP-1	lysosome-associated membrane glycoprotein 1
LB	lysogeny broth
MAPK	mitogen-activated protein kinase
<i>mm</i>	<i>mus musculus</i>
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTOC	microtubule-organizing center
NLS	nuclear localization signal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBD	peroxisomal biogenesis disorder
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEX	Peroxin
<i>PEX</i>	Gen, das für ein Peroxin codiert
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMP	peroxisomales Membranprotein
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
(m)PTS	peroxisomale (Membran-) Targetingsequenz
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	really interesting new gene
<i>rn</i>	<i>rattus norvegicus</i>
RNA	ribonucleic acid
RNA _i	RNA interference
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SV40	Simian-Virus 40
TAC	tip attachment complex
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

X-ALD X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

YFP yellow fluorescent protein

Y. lipolytica *Yarrowia lipolytica*

1 Einleitung

1.1 Peroxisomen

Peroxisomen sind intrazelluläre ubiquitär vorkommende Organellen eukaryotischer Zellen mit einem Durchmesser von 0,1 bis 1 μm [1]. Sie wurden erstmals 1954 von Rhodin beschrieben [2] und zeichnen sich durch eine hohe Dynamik und Variabilität aus, was sich in der unterschiedlichen Größe, Form, Anzahl pro Zelle und enzymatischen Ausstattung abhängig vom Organismus, der Zellart und den metabolischen Ansprüchen äußert [3]. Unter die Gruppe der „microbodies“ fallen außer den Peroxisomen auch die Glyoxisomen, in denen in Pflanzen Teile des Glyoxylatzykluses ablaufen [4] und die Glycosomen, die in Trypanosomen die wichtigsten Enzyme für die Glycolyse enthalten [5].

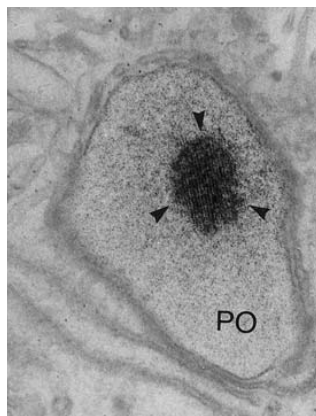


Abbildung 1.1: Kristalliner Einschluss von Uratoxidase in Peroxisomen

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Peroxisomen in Rattenleber durch Markierung von Uratoxidase mittels der Ceriummethode [6], Vergrößerung: 50400, PO: Peroxisom. Entnommen aus [7] mit Genehmigung des Springer Verlags.

Aufgrund hoher Konzentrationen an Enzymen in der peroxisomalen Matrix finden sich oft kristalline Einschlüsse, die elektronenmikroskopisch wie in Abbildung 1.1 identifiziert werden können [8, 9]. Peroxisomen spielen in vielen katabolischen und anabolischen Stoffwechselwegen wie zum Beispiel bei der α - und β -Oxidation von langkettigen und verzweigten Fettsäuren und bei der Synthese von Etherlipiden wie z.B. Plasmalogenen, Gallensäuren und Cholesterin eine wichtige Rolle [10-13]. Der Abbau des bei einigen dieser Reaktionen entstehenden Wasserstoffperoxids durch

das Enzym Katalase stellt einen fundamentalen Vorgang innerhalb der Peroxisomen dar und ist verantwortlich für deren Bezeichnung [1, 14].

Die essentielle Bedeutung des peroxisomalen Stoffwechsels zeigt sich in der Ausbildung schwerwiegender Krankheitsbilder beim Menschen bei defekter peroxisomaler Funktion [15]. Beispiele hierfür stellen die Rhizomelische Chondrodysplasia Punctata und die verschiedenen Formen des Zellweger-Spektrums dar, die sich durch gestörte peroxisomale Biogenese auszeichnen [16, 17]. Zudem können auch durch Mutationen, wie bei der Adrenoleukodystrophie, die Funktionen einzelner peroxisomaler Enzyme ausfallen [18].

1.2 Peroxisomale Biogenese

Zusätzlich zur Vermehrung durch Wachstum und Teilung bereits vorhandener Peroxisomen („growth-and-divison-model“) [19], können diese Organellen auch komplett neu gebildet werden.

Bisher sind 32 Proteine bekannt, die so genannten Peroxine (PEX), die an der Biogenese von Peroxisomen beteiligt sind. Dieser Prozess lässt sich einteilen in die Bildung der peroxisomalen Membran, die Insertion peroxisomaler Membranproteine und dem Import der Matrixproteine. Da Peroxisomen im Gegensatz zu Mitochondrien keine DNA besitzen, müssen die meisten peroxisomalen Membran- und Matrixproteine posttranslational importiert werden [20]. Mutationen in den Genen für *PEX3*, *PEX16* und *PEX19*, den „frühen Peroxinen“, führen zur kompletten Abwesenheit von detektierbaren peroxisomalen Strukturen, was eine Beteiligung dieser Proteine bei der Bildung peroxisomaler Vorläufer in der frühen Phase darlegt. Die Entdeckung, dass in diesen Zelllinien durch Wiedereinführung der entsprechenden cDNA voll funktionsfähige Peroxisomen gebildet werden können, zeigt die Unvollständigkeit der von Lazarow und Fujiki postulierten „growth-and-divison“-Theorie und wirft Fragen zur Herkunft der peroxisomalen Membran bei Neubildung der Organellen auf [21-25]. Im Folgenden wird der Vorgang der Neubildung von Peroxisomen im Gegensatz zum Wachstum und der Teilung bereits existierender Peroxisomen auch als *de novo* Synthese bezeichnet.

1.2.1 Bildung der peroxisomalen Membran

Der Transport von Phospholipiden vom endoplasmatischen Reticulum (ER) als Ort der Biosynthese zu den einzelnen Organellen kann entweder bei sehr geringem Abstand über unilateralen Transfer wie bereits für Mitochondrien beschrieben [26] oder aber durch vesikulären Transport erfolgen. Tatsächlich zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass Peroxisomen sich oft sehr nahe beim ER befinden [27, 28] und ein nicht-vesikulärer, COPI- und COPII-unabhängiger, bidirektionaler Transport von Phosphatidylserin zwischen ER und Peroxisomen konnte in Hefen beobachtet werden [29]. Verschiedenste Versuche legen eine Beteiligung des vesikulären Transports vom ER bei der *de novo* Entstehung von Peroxisomen nahe [30-41].

In einem Pex3p-defizienten (Δ Pex3p) Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* wurde neu synthetisiertes Pex3p zunächst im ER detektiert bevor Pex3p-haltige Vesikel in Abhängigkeit von Pex19p abgeschnürt wurden und Pex3p an den *de novo* gebildeten Peroxisomen zu sehen war [30-32]. Ähnliches wurde auch von Titorenko und Rachubinski für Pex2p und Pex16p in Wildtyp *Yarrowia lipolytica* beobachtet [33], dem einzigen Hefestamm der ein Gen für *Pex16p* besitzt. In „pulse-chase“ Experimenten waren diese Proteine zuerst am ER zu finden und gelangten nach posttranslationaler Glycosylierung anschließend in die Peroxisomen. Zudem wurde in zellfreien *in vitro* Versuchen mit ER-Membranen aus Hefezellen und exogen zugeführtem Cytosol die Bildung von Pex3p- und Pex11p- bzw. Pex15p-positiven vesikulären Strukturen aus dem ER gezeigt [34, 35]. Neuere Untersuchungen in Wildtyp *S. cerevisiae* von Van der Zand et al. schreiben der Neubildung von Peroxisomen in Abhängigkeit vom ER eine größere Rolle zu als bisher angenommen. Verschiedenste peroxisomale Membranproteine (PMPs) inserierten über die Importkomplexe Sec61p oder Get3p zunächst ins ER, bevor sie an Peroxisomen detektiert werden konnten [36]. Daher wurde für Hefen ein Modell entwickelt, das die Abschnürung von Vesikeln von der ER-Membran nach Insertion von Pex3p postuliert (Abbildung 1.2).

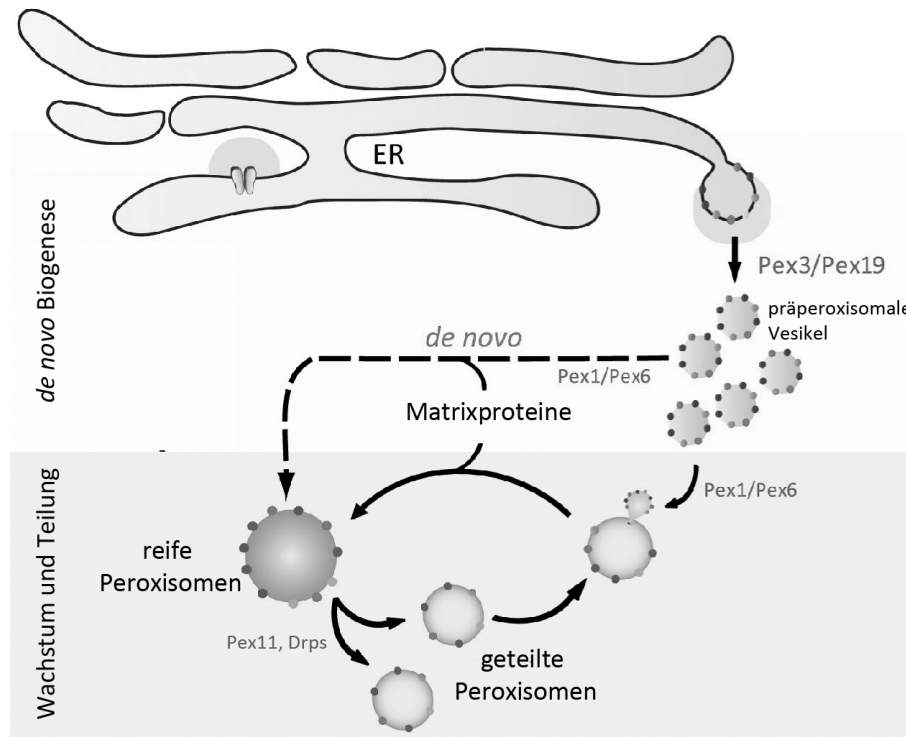


Abbildung 1.2: Modell der peroxisomalen Biogenese in Hefen

Zur Neubildung von Peroxisomen inserieren peroxisomale Membranproteine (PMPs), u.a. Pex3p, in das endoplasmatische Retikulum (ER), woraufhin ein präperoxisomales Kompartiment entsteht. In Abhängigkeit von Pex3p und Pex19p werden präperoxisomale Vesikel abgeschnürt, die mit Hilfe von Pex1p und Pex6p und durch Import peroxisomaler Matrixproteine zu Peroxisomen reifen. Anschließend werden diese Peroxisomen durch Pex11p und verschiedenen Drps (dynamamin-related protein) durch Teilung vermehren. Alternativ wird auch die Fusion präperoxisomaler Vesikel mit reifen Peroxisomen angenommen. Modifiziert aus [42].

Die Beobachtung, dass PEX3 mRNA in Hefen spezifisch am ER lokalisiert ist, stützt zumindest für PEX3 die Annahme eines Importweges in die Peroxisomen über das ER [37]. Außerdem wurde postuliert, dass die cotranslationale Insertion von Pex3p in das ER über den ER-Importkomplex Sec61p eine Voraussetzung für die Neubildung von Peroxisomen in *S.cerevisiae* darstellt [38]. Sec61-Mutanten zeigten einen starken Defekt der peroxisomalen *de novo* Synthese nach Induktion des unter dem GAL1_{prom} stehenden Pex3p.

Ob dieses Modell auch auf Zellen höherer eukaryotischer Organismen übertragen werden kann, ist aufgrund diverser Unterschiede bisher ungeklärt. Zum Beispiel besitzen Hefen bis auf *Y. lipolytica* kein Pex16p, wohingegen PEX16 in Säugerzellen absolut essentiell für die peroxisomale Biogenese ist [21, 25]. In murinen dendritischen Zellen wurde von Geuze et al. elektronenmikroskopisch die Anwesenheit von PEX13 und PMP70 in einem komplexen peroxisomalen Netzwerk

gezeigt, das durchgängig mit den Cisternen des ER verbunden war und frei von Ribosomen oder Komponenten des COPI- oder COPII-coats war [39]. Zudem konnte die Neubildung von Peroxisomen in PEX3-defizienten humanen Fibroblasten nach Lokalisation von exprimiertem PEX3 am ER und Entstehung PEX3 positiver Vesikel beobachtet werden [40]. Auch in COS7 Zellen wurde exogenes PEX16 zunächst am ER detektiert bevor es in den Peroxisomen zu sehen war [41]. Die peroxisomale Biogenese in Säugerzelllinien scheint nicht von den klassischen COPI- oder COPII-Wegen abhängig zu sein [43-45]. Allerdings wurde kürzlich die Beteiligung von Sec16B, das eine Rolle bei der Bildung des COPII-coats spielt, beim Export von PEX16 aus der ER-Membran gezeigt [46].

1.2.2 Import peroxisomaler Membranproteine

Die „frühen Peroxine“ PEX3, PEX16 und PEX19 sind sowohl bei der Bildung von präperoxisomalen Vesikeln während der *de novo* Synthese von Peroxisomen als auch beim Import von weiteren Membranproteinen in die peroxisomale Membran involviert.

Der Import von Membranproteinen und Matrixproteinen läuft in Peroxisomen über komplett unabhängige Mechanismen ab [47, 48]. In Zelllinien mit mutierten Genen, die für die Expression des peroxisomalen Matrixprotein-Importkomplexes kodieren, können keine Matrixproteine mehr in die Peroxisomen transportiert werden. Diese Zelllinien sind aber nach wie vor importkompetent für alle peroxisomalen Membranproteine. Dabei entstehen „leere“ mit peroxisomalen Membranproteinen versehene Membranhüllen, so genannte „ghosts“ [49-51].

Peroxisomale Membranproteine der Klasse I besitzen eine in Länge und Aminosäuresequenz sehr variable Membrantargetingsequenz (mPTS) [52] und werden nach Synthese an freien Ribosomen im Cytosol von PEX19, dem PMP-Rezeptor, gebunden [53, 54]. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Farnesylierung von Pex19p für eine effiziente Interaktion mit einigen PMPs benötigt wird [55, 56]. Da dies allerdings nicht für höhere Eukaryoten bestätigt werden konnte [57, 58], ist die Funktion der Farnesylierung von PEX19 in diesen Organismen nach wie vor ungeklärt. Nach Transport des Cargo-Rezeptor Komplexes zu den

Peroxisomen interagiert dort PEX19 mit dem Importrezeptor PEX3 und inseriert die Cargoproteine in die peroxisomale Membran [58-60]. Anschließend wird PEX19 für weiteren PMP-Import wieder ins Cytosol entlassen [61, 62]. Inwieweit diese Prozesse abhängig von ATP (Adenosintriphosphat) sind, ist bisher noch unklar [61, 63]. Ein Modell für den Import peroxisomaler Membranproteine in Säugerzellen ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

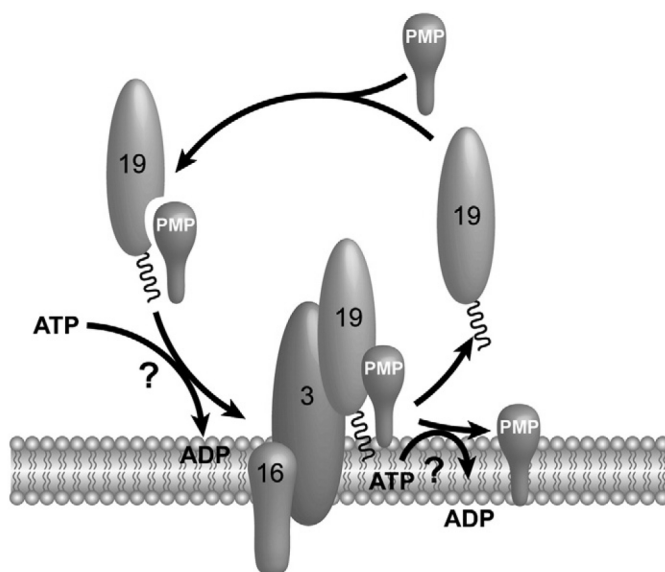


Abbildung 1.3: Import peroxisomaler Membranproteine der Klasse I

Peroxisomale Membranproteine (PMPs) der Klasse I werden anhand ihrer peroxisomalen Membrantargetingsequenz nach Translation im Cytosol von dem PMP-Rezeptor PEX19 erkannt und gebunden. Dabei ist die Funktion der Farnesylierung von PEX19 in höheren Eukaryoten nach wie vor unklar. Nach Transport an die peroxisomale Membran interagiert dort PEX19 mit dem Importrezeptor PEX3 und die PMPs werden in Abhängigkeit von PEX3 und PEX19 in die Membran eingebracht. Anschließend wird PEX19 für erneuten PMP-Import wieder ins Cytosol entlassen. Eine Funktion für PEX16 als PEX3-Membranrezeptor oder als Komponente des Membrantranslokationskomplexes wird vermutet. Die Rolle von ATP bei Import peroxisomaler Membranproteine wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Abbildung entnommen und modifiziert aus [64].

Ebenfalls essentiell für die Bildung peroxisomaler Membranstrukturen ist die Anwesenheit von PEX16 in der peroxisomalen Membran [21, 25]. Obwohl die Rolle von PEX16 noch weitestgehend unbekannt ist, wird eine Funktion für PEX16 als PEX3-Membrananker oder Komponente des Membrantranslokationskomplexes für PMPs diskutiert [41, 65].

Für PEX3 und PEX16 wurde ein Importweg über das ER postuliert [30-32, 41, 58, 60, 66], wobei für PEX16 auch die Möglichkeit des posttranslationalen Imports in Abhängigkeit von PEX19 und PEX3 besteht [21, 60].

1.2.3 Import peroxisomaler Matrixproteine

Im Gegensatz zum endoplasmatischen Reticulum und den Mitochondrien, die ungefaltete Polypeptide importieren [67], können komplett gefaltete und Cofaktor-gebundene Proteine und Oligomere durch die peroxisomale Membran eingeführt werden [68-71].

Peroxisomale Matrixproteine werden anhand ihrer peroxisomalen Targetingsignale (PTS) im Cytosol von löslichen Rezeptoren erkannt und gebunden, zu der peroxisomalen Membran transportiert und durch diese in die Matrix importiert. Die am häufigsten vorkommende Targetingsequenz PTS1 wurde als erstes in Luciferase entdeckt [72] und besteht aus drei Aminosäureresten mit der Konsensus-Sequenz SKL (**Ser**/Cys/Ala-**Lys**/Arg/His-**Leu**) am C-Terminus [73-75]. Der PTS1-Rezeptor PEX5 bindet Proteine mit einer PTS1 posttranslational im Cytosol [76, 77]. Alternativ besitzt ein geringer Anteil von Matrixproteinen, wie z.B. Thiolase, die Signalsequenz PTS2, die ein Nonapeptid (Arg/Lys-Leu-X₅-Gln/His-Leu) am N-Terminus darstellt [78, 79]. Diese Proteine werden nach Bindung an den PTS2-Rezeptor PEX7 mit Hilfe einer alternativen Spliceform von PEX5 (PEX5L) zu den Peroxisomen transportiert [80-83].

Der Rezeptor-Cargo Komplex wird anschließend an der peroxisomalen Membran über Interaktion der PTS-Rezeptoren mit dem „docking“-Komplex bestehend aus PEX14 und PEX13 (und in Hefen Pex17p) assoziiert [84, 85]. Der „docking“-Komplex interagiert mit dem RING-Finger Komplex (RING: really interesting new gene) aus PEX2, PEX10 und PEX12 zur Bildung des so genannten Importomers [86]. Wie die Translokation der vollständig gefalteten Matrixproteine durch die peroxisomale Membran abläuft und inwieweit PEX5 bei diesem Vorgang in die peroxisomale Membran inseriert ist bisher weitestgehend unbekannt. Ein Modell („transient pore hypothesis“), nach dem die PTS-Rezeptoren selbst zu der Bildung einer vorübergehenden Importpore beitragen, wurde bereits vorgeschlagen [87].

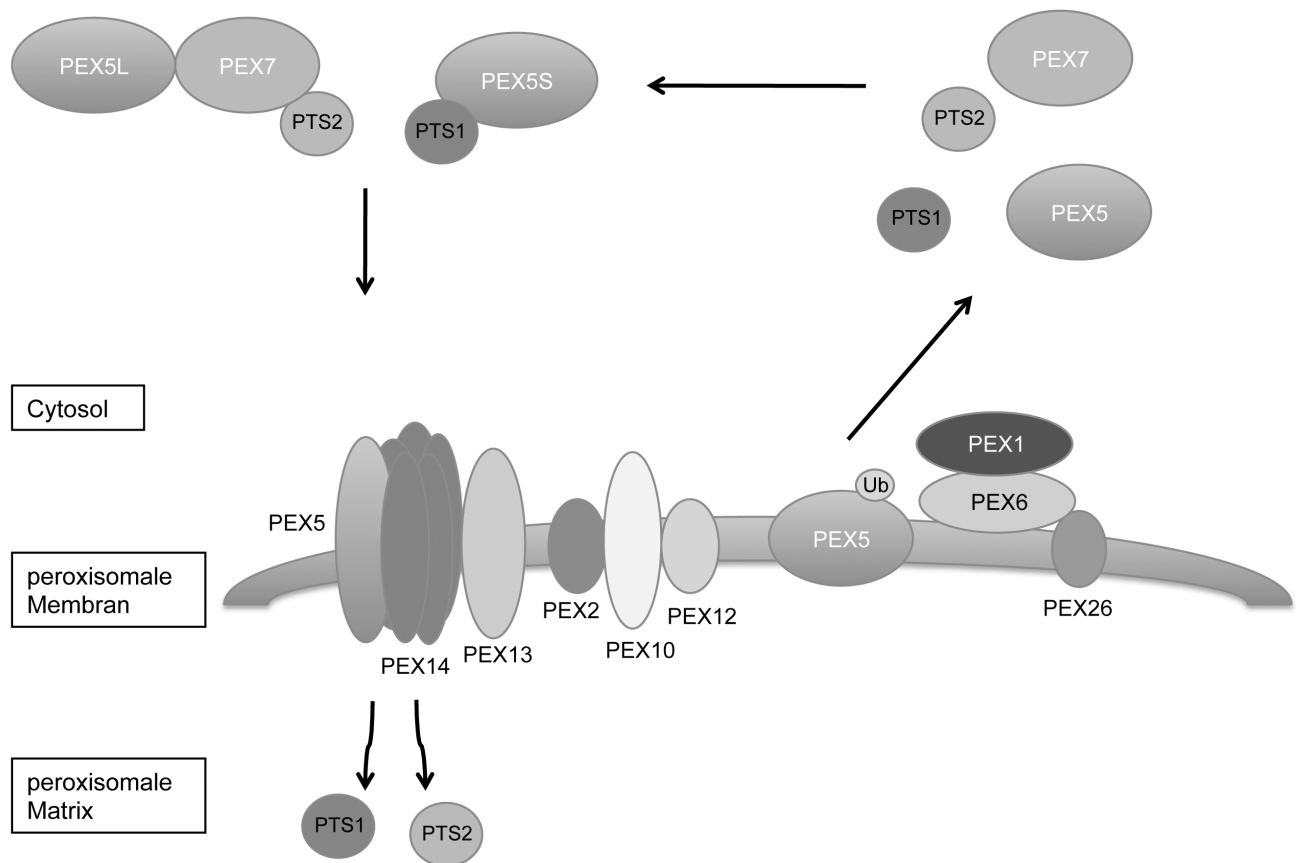


Abbildung 1.4: Import peroxisomaler Matrixproteine in Säugerzellen

Peroxisomale Matrixproteine mit einer peroxisomalen Targetingsequenz (PTS1 oder PTS2) werden nach Translation im Cytosol von den löslichen Rezeptoren PEX5 und PEX7 gebunden und zur peroxisomalen Membran transportiert. Dort assoziiert der Rezeptor-Cargo-Komplex mit dem „docking“-Komplex bestehend aus PEX13 und PEX14. Durch Interaktion des „docking“-Komplexes mit dem RING-Finger Komplex (RING: really interesting new gene) aus PEX2, PEX10 und PEX12 wird das Importomer gebildet und die Matrixproteine werden durch die Membran importiert. Um einen neuen Importzyklus zu starten werden die PTS-Rezeptoren über die AAA-ATPasen (AAA: ATPase associated with a variety of cellular activities) PEX1 und PEX6 und deren Membranrekrutierungsfaktor PEX26 unter ATP-Verbrauch erneut ins Cytosol entlassen. Dabei markiert Monoubiquitinierung (Ub) von PEX5 den Export aus der peroxisomalen Membran.

Nach dem Import der Matrixproteine werden die Rezeptoren PEX5 und PEX7 für einen neuen Importzyklus unter ATP-Verbrauch ins Cytosol abgegeben. Dabei spielen die AAA-ATPasen (AAA: ATPase associated with a variety of cellular activities) PEX1 und PEX6 und deren Membranrekrutierungsfaktor PEX26 eine Rolle für den Export von PEX5 ins Cytosol [88-90]. Monoubiquitinierung von PEX5 stellt eine Markierung für den Export des PTS-Rezeptors dar und ist eine Voraussetzung für diesen Vorgang [91-93], wohingegen Polyubiquitinierung zur Qualitätskontrolle und als Signal zur Abgabe von defekten PTS-Rezeptoren aus der peroxisomalen Membran dient [94]. In Hefen üben dabei alle drei RING-Finger Proteine PEX2, PEX10 und PEX12 eine Aktivität als Ubiquitin-Ligase auf PEX5 aus [95, 96], wobei

PEX2 und PEX10 eher für die Polyubiquitinierung und PEX12 für die Monoubiquitinierung von PEX5 zuständig zu sein scheinen. Abbildung 1.4 zeigt ein Modell für den Import peroxisomaler Matrixproteine in Säugerzellen.

1.3 Intrazellulärer Transport

Der Transport von Organellen, Vesikeln, Proteinkomplexen und mRNA ist essentiell für die zelluläre Morphologie und Funktion und erfolgt entlang des Cytoskeletts mit Hilfe von Motorproteinen unter ATP-Hydrolyse [97]. Das Cytoskelett setzt sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zusammen. Mikrofilamente oder Aktinfilamente bestehen aus Aktinuntereinheiten, die durch Aktin-bindende Proteine gebündelt und vernetzt werden und sind vor allem an der Plasmamembran lokalisiert, durchziehen aber auch das Cytoplasma und bilden Oberflächenstrukturen wie Mikrovilli aus. Myosine wandern entlang von Aktinfilamenten und dienen in Säugerzellen zum langsamen Transport über kurze Strecken.

Polymerisierung der Proteine Tubulin α und Tubulin β führt zur Bildung von röhrenförmigen Mikrotubuli, wobei sich am Minus-Ende der Filamente α -Tubulin befindet und am Plus-Ende β -Tubulin freigelegt ist. In den meisten Zelltypen sind die Mikrotubuli während der Interphase über das α -Tubulin am Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC: microtubule organizing center) verknüpft [98], das normalerweise perinukleär lokalisiert ist. Die Mikrotubuli werden am MTOC gebildet und breiten sich von dort strahlenförmig durch die ganze Zelle aus [99]. Dabei bleiben die Mikrotubuli Minus-Enden am MTOC verankert, während die wachsenden Plus-Enden in die Zellperipherie reichen [100]. Mikrotubuli dienen unter anderem als Transportwege für die Mikrotubuli-assoziierten Motorproteine der Kinesin- und Dyneinfamilie (Abbildung 1.5) [101, 102].

Intermediärfilamente, deren Zusammensetzung je nach Zelltyp und intrazellulärer Lokalisation variiert, umgeben den Zellkern und sind aber auch im kompletten Cytoplasma ausgebreitet. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Mikrotubuli und Aktinfilamenten [103], sondern sind auch beim Organellentransport z.B. von Melanosomen in *Xenopus* Pigmentzellen involviert [104].

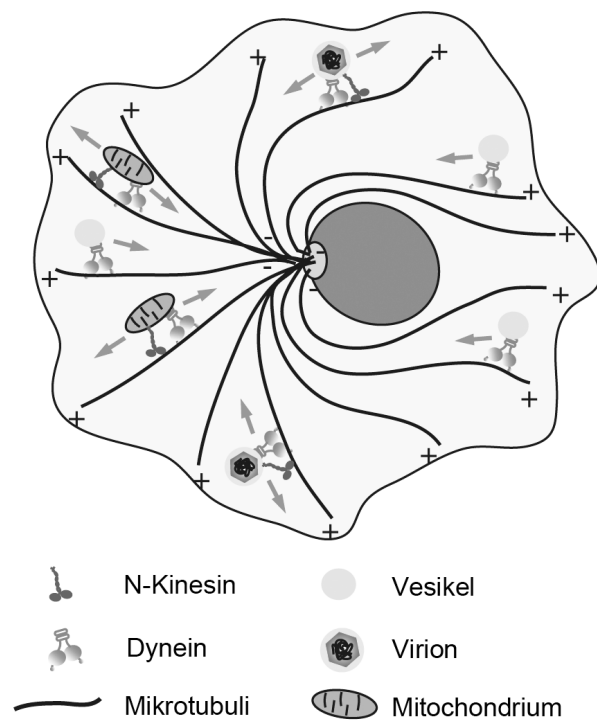


Abbildung 1.5: Intrazellulärer Transport über Mikrotubuli-assozierte Motorproteine

Die Motorproteine der Kinesin- und Dyneinfamilie dienen unter anderem zum Transport von Zellorganellen, Vesikeln und Proteinkomplexen entlang von Mikrotubuli. Dabei wandern die meisten Kinesine von den Minus-Enden der Mikrotubuli, die in den meisten Zelltypen am Mikrotubuli Organisationszentrum nahe des Zellkerns verankert sind, zu den Plus-Enden in der Zellperipherie. Dyneine sind verantwortlich für den Transport in Richtung der Mikrotubuli Minus-Enden. Entnommen und modifiziert aus [105].

1.3.1 Kinesine

Kinesine sind in Säugerzellen verantwortlich für den intrazellulären unidirektionalen Transport entlang von Mikrotubuli über längere Strecken und üben außerdem Funktionen während der Zellteilung aus. Sie besitzen alle eine hoch konservierte Motordomäne, die sowohl eine ATP-Bindungsstelle als auch die Mikrotubuli-Bindestelle enthält [106]. Dies lässt auf einen gemeinsamen Mechanismus zur Generierung von Energie aus der ATP-Hydrolyse schließen. Trotzdem üben die einzelnen Proteine der Kinesinfamilie unterschiedlichste zelluläre Funktionen aus, wie Transport von Organellen und Vesikeln, Verzweigung oder Depolymerisierung von Mikrotubuli, korrekte Assemblierung der Teilungsspindel und Trennung der Spindelpole während der Mitose und Meiose [107-110].

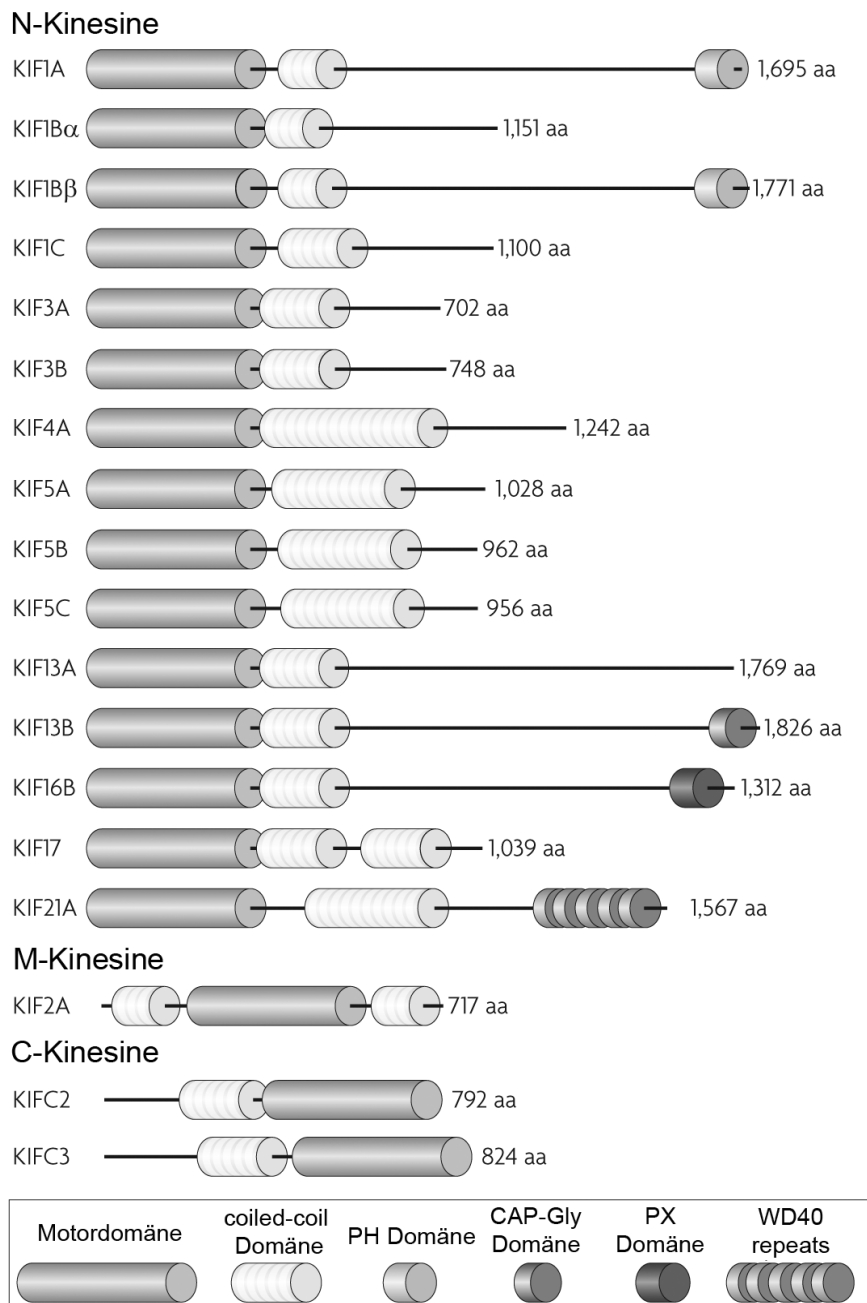


Abbildung 1.6: Domänenstruktur verschiedener Kinesine

Die Familie der Kinesine wird entsprechend der Lage der Motordomäne im Protein eingeteilt. N-Kinesine tragen die Motordomäne am N-Terminus, bei M-Kinesinen liegt diese in der Mitte des Proteins und bei C-Kinesinen ist die Motordomäne am C-Terminus lokalisiert. Zusätzlich enthalten Kinesine eine coiled-coil Domäne und weitere funktionelle Domänen. aa: Aminosäuren, PH: Pleckstrin Homologie, PX: Phox Homologie. Entnommen und modifiziert aus [108].

Die Familie der Kinesine lässt sich, wie in Abbildung 1.6 dargestellt, in verschiedene Gruppen einteilen, wobei die Lage der Motordomäne im Protein ausschlaggebend für deren Funktion und die Transportrichtung ist [108, 111]. N-Kinesine besitzen ihre Motordomäne am N-Terminus, bei M-Kinesinen liegt diese in der Mitte des Proteins

und C-Kinesine tragen ihre Motordomäne am C-Terminus. Während N- und C-Kinesine für den Transport entlang von Mikrotubuli in Richtung des Plus- bzw. Minus-Endes verantwortlich sind, tragen M-Kinesine meist durch Depolymerisierung zur Regulierung der Stabilität von Mikrotubuli bei [112].

Das in Abbildung 1.7 dargestellte konventionelle Kinesin bzw. Kif5 aus der Kinesin-1 Gruppe ist das als erstes entdeckte und bisher am besten charakterisierte Kinesin [106]. Das dimerisierte Protein besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, wobei die schweren Ketten die Motordomäne in der „head region“ enthalten, die an die Mikrotubuli bindet [113, 114]. Die „tail region“ befindet sich in den leichten Ketten und ist verantwortlich für die Interaktion mit der zu transportierenden Ladung [115]. Zwischen diesen beiden Regionen ist das Protein in einem langen α -helikalen coiled-coil Stiel angeordnet [116]. Der Transport erfolgt nach ATP-Hydrolyse an der Motordomäne über eine Konformationsänderung, die eine schrittweise Bewegung des Proteins von einer Tubulinuntereinheit zur nächsten entlang des Mikrotubulus bewirkt [117, 118]. Die Kristallstruktur dieses Kinesins in Komplex mit einem Mikrotubulus wurde kürzlich veröffentlicht [119].

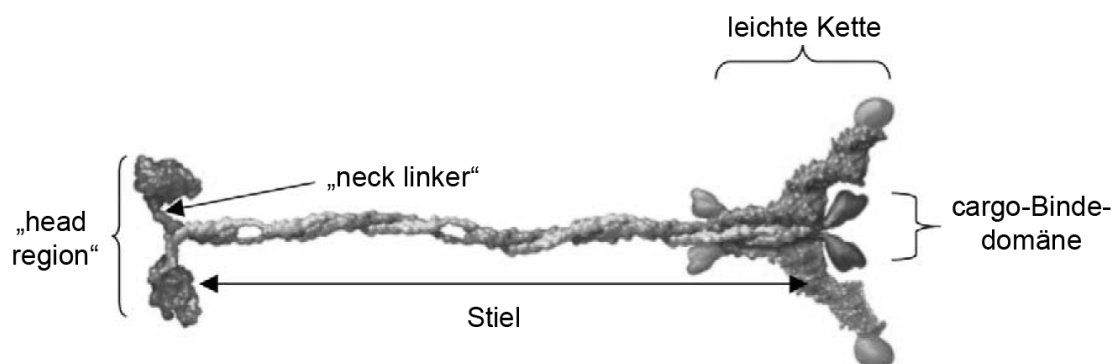


Abbildung 1.7: Struktur des konventionellen Kinesins (Kif5)

Konventionelles Kinesin (Kif5) ist ein Motorprotein der Gruppe Kinesin-1 und stellt ein Homodimer dar. Die „head region“ enthält die Mikrotubulibindedomäne und die Motordomäne, wo die ATP-Hydrolyse abläuft. Die beiden Kopfregionen sind über einen „neck linker“ verbunden, der die schrittweise Bewegung des Proteins ermöglicht. Die cargo-Bindedomäne ist verantwortlich für die Bindung des Kinesins an die zu transportierende Ladung. Zwischen den beiden Enden des Kinesins befindet sich ein langer spiralisierter coiled-coil Stiel. Entnommen und modifiziert aus [101].

Kinesin-1 (Kif5) bewegt verschiedenste Organellen wie Peroxisomen und Mitochondrien in die Zellperipherie in Richtung der Plus-Enden von Mikrotubuli [120-127]. Diese hohe Variabilität der zu transportierenden Ladung wird unter anderem über Bindung an Adaptorproteine wie Syntabulin und Kinectin oder Rezeptoren wie

Syntaxin ermöglicht [120, 128-130]. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass intrinsisch ungeordnete Bereiche in der cargo-Bindedomäne von Kif5 existieren [131], die zu einer hohen Flexibilität der Struktur führen, und somit in Kombination mit posttranslationalen Modifikationen [132] eine spezifische Bindung an verschiedene Organellen erlauben.

Im Gegensatz dazu existieren auch Kinesine, die C-Kinesine, die verschiedene intrazelluläre Strukturen in das Zellinnere in Richtung des MTOCs transportieren können [133, 134]. Beim Menschen kommen die drei verschiedenen C-Kinesine KifC1/HSET, KifC2 und KifC3 vor [135] und bei Mäusen zusätzlich KifC4 und KifC5, die alle der Struktur des Kif5 ähneln. Sie besitzen ebenfalls eine Motordomäne, einen langen Stiel und eine „tail region“ [136]. KifC1/HSET (human spleen, embryo, testes) spielt nicht nur eine Rolle beim Transport von frühen endocytotischen Vesikeln [137] sondern ist auch wie die C-Kinesine Ncd in *Drosophila melanogaster*, Kar3p in *S. cerevisiae* und XCTK2 in *Xenopus laevis* bei der korrekten Assemblierung der mitotischen Spindel involviert [134, 138-142]. Dagegen wird KifC2 hauptsächlich in Neuronen exprimiert und ist vor allem in den Dendriten lokalisiert [143]. Dieses Kinesin scheint nicht bei der Zellteilung involviert zu sein, sondern eine Rolle beim retrograden axonalen Transport von synaptischen Vesikeln zu spielen [144]. KifC4 und KifC5 kommen Funktionen in der murinen Spermatogenese zu [145, 146].

Das in dieser Arbeit untersuchte C-Kinesin KifC3, dem zunächst eine allgemeine Funktion beim intrazellulären Transport zugesprochen wurde, wird ubiquitär exprimiert [146, 147]. Beim Menschen befindet sich das entsprechende Gen auf dem Chromosom 16q13-q21, das einem beim Bardet-Biedl Syndrom betroffenen Bereich entspricht [148, 149]. Daher wird beim Menschen eine Rolle von KifC3 in dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheit vermutet, die sich durch retinale Dystrophie, Adipositas, Polydaktylie und Abnormalitäten der Niere auszeichnet [150]. KifC3^{-/-} „knockout“ Mäuse zeigten dagegen keinen krankhaften Phänotyp. Sie waren überlebensfähig und entwickelten und reproduzierten sich normal [151].

Die zum Minus-Ende von Mikrotubuli gerichtete Motoraktivität von KifC3 konnte *in vitro* verfolgt werden und zeigte eine Geschwindigkeit des Proteins von 75 nm/s (4,5 µm/s) [147]. Zudem ist KifC3 sowohl in polarisierten Epithelzellen aus Nierengewebe als auch in polarisierten MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen nahe der

apikalen Plasmamembran lokalisiert. Diese Zellen besitzen keine centrosomalen, sondern mit den Minus-Enden an der apikalen Plasmamembran verankerte Mikrotubuli. Der apikale Transport von Annexin XIIIb- und Hämagglutinin-positiven, Cholesterin-reichen Vesikeln aus dem Trans-Golgi-Netzwerk wurde durch Expression einer dominant negativen Mutante des KifC3 verlangsamt bzw. durch Überexpression von intaktem KifC3 beschleunigt [147]. Zudem wurde die Bewegung von KifC3 in Caco2-Zellen (menschliche Epithelzellen des Dickdarms) entlang der Mikrotubuli zu den Adhäsionsverbindungen mit einer Geschwindigkeit von 216 nm/s beobachtet. Da der „knockdown“ von KifC3 mit siRNA zu einer Auflösung der *Zonula adhaerens* führte, wird eine Rolle für KifC3 bei der Organisation dieser Kontaktverbindungen vermutet [152].

Die Beteiligung von KifC3 bei der Positionierung des Golgi-Apparates zusammen mit cytoplasmatischem Dynein wurde ebenfalls beschrieben [153]. Dabei war der Golgi-Apparat in adrenokortikalen Zellen aus KifC3^{-/-} „knockout“ Mäusen bei verringertem Cholesterin-Spiegel nicht mehr kompakt perinukleär lokalisiert sondern um den Zellkern ausgebreitet. Die korrekte Reassemblierung des Golgi-Apparates nach Fragmentierung durch Behandlung mit Nocodazol oder Brefeldin A war in KifC3^{-/-} „knockout“ Zellen bei verringertem Cholesterin-Spiegel ebenfalls durch eine reduzierte Bewegung der Golgi-Fragmente in Richtung der Mikrotubuli Minus-Enden gestört.

In Docetaxel- und Paclitaxel-resistenten Brustkrebszellen (MDA MB 231/468) wurde eine erhöhte mRNA- und Proteinmenge an KifC3 detektiert, die dem Mikrotubuli stabilisierenden Effekt der Zytostatika entgegen wirkte [154, 155]. Da die meisten C-Kinesine in Vorgänge während der Zellteilung involviert sind, kann vermutet werden, dass KifC3 durch Destabilisierung von Mikrotubuli zusätzlich zum intrazellulären Transport auch eine Funktion während der Mitose zukommt. Tatsächlich konnte die Interaktion von KifC3 mit ZWINT (ZW10 interacting protein), einer Komponente des Kinetochor-Komplexes, und CEP170 (centrosomal protein 170), das eine Rolle bei der Organisation von Mikrotubuli spielt, gezeigt werden [156].

1.3.2 Dyneine

Dyneine stellen die größten Motorproteine dar und bestehen aus mehreren Untereinheiten aus schweren und leichten Ketten, wobei alle Formen als größte Untereinheit eine schwere Kette mit einer Größe von 500 kDa besitzen, die für die ATPase und Motoraktivität verantwortlich ist [157-159]. Die Gruppe der Dyneine setzt sich zusammen aus cytoplasmatischem Dynein und axonemalem Dynein, wobei letzteres eine Rolle bei der Bewegung von Zilien und Flagellen spielt [160].

Cytoplasmatisches Dynein bildet beim intrazellulären Transport das direkte Gegenstück zu den N-Kinesinen und ist somit verantwortlich für den retrograden Transport in das Zellinnere in Richtung der Minus-Enden von Mikrotubuli [161-163]. Dabei werden diverse Membranstrukturen wie endocytotische Vesikel und Organellen wie Endosomen, Lysosomen, Mitochondrien und Peroxisomen durch Dynein transportiert [125, 127, 164-166]. Für diesen Vorgang wird Dynactin als zusätzlicher Faktor für die korrekte Motorfunktion und als Regulator für die Aktivität von Dynein benötigt [167, 168]. Außerdem spielt Dynein auch eine Rolle in der Zellteilung bei der Trennung der Chromosomen und bei der Bildung der Teilungsspindel [168, 169]. Die Kristallstruktur der Motordomäne von Dynein aus Hefen und aus *Dictyostelium* wurde kürzlich veröffentlicht [170, 171].

1.3.3 Peroxisomaler Transport

Im Gegensatz zu anderen Organellen, wie dem endoplasmatischen Reticulum oder dem Golgi-Apparat, sind Peroxisomen gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt [172]. Die große Nähe zwischen Peroxisomen und Cytoskelett konnte elektronenmikroskopisch schon früh gezeigt werden [173, 174] und die Bindung dieser Organellen an Mikrotubuli wurde schließlich bestätigt [172, 175, 176]. Abbildung 1.8 zeigt die Assoziation von Peroxisomen an Mikrotubuli *in vitro*.

Durch Lebendzellbeobachtungen nach Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen konnte die Bewegung der Peroxisomen entlang von Mikrotubuli beobachtet und charakterisiert werden [124, 177]. Dabei wird der bidirektionale peroxisomale Transport in Säuger- und *Drosophilazellen* überwiegend durch die Motorproteine

Dynein und Kinesin-1 (Kif5) ermöglicht [124-127]. Dagegen werden Peroxisomen in Hefen mit Hilfe des Motorproteins Myo2p aus der Myosin-Klasse V entlang des Aktinskeletts transportiert [178, 179]. Inp2p wirkt dabei als peroxisomaler Rezeptor für Myo2p [180], wobei neuere Ergebnisse ebenfalls eine Beteiligung von Pex19p bei der Assoziation von Myo2p an die Peroxisomen nahe legen [181].

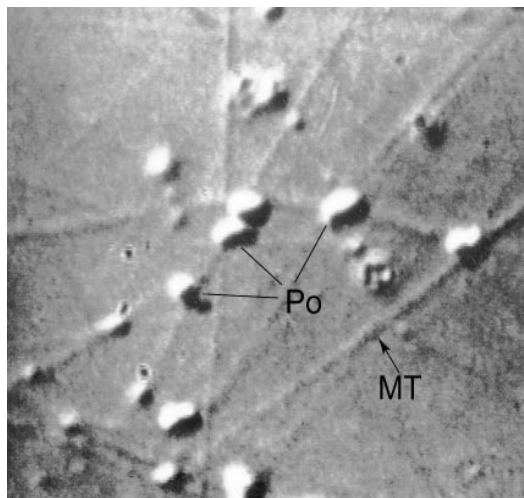


Abbildung 1.8: Bindung aufgereinigter Peroxisomen an Mikrotubuli *in vitro*

Isolierte und aufgereinigte Peroxisomen aus Rattenleber waren *in vitro* an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli aus Rinderhirn in Abhängigkeit von ATP assoziiert. Aufgenommen mittels DIC (differential interference contrast) Mikroskopie. Po: Peroxisomen, MT: Mikrotubuli, Abbildung entnommen aus [177] mit Genehmigung des Wiley Verlags.

Die Beweglichkeit von Peroxisomen stellt deren gleichmäßige Positionierung innerhalb der Zelle sicher, was unter anderem essentiell für die peroxisomale Funktion beim Abbau oxidativer Spezies ist [1, 14]. Zudem kann der Transport von Peroxisomen in einen bestimmten zellulären Bereich notwendig sein. Die Interaktion von Peroxisomen mit anderen zellulären Organellen wie dem ER oder Lipidtröpfchen [182-184], die ebenfalls an Mikrotubuli gebunden sind, scheint eine wichtige Rolle beim peroxisomalen Lipidmetabolismus zu spielen [185]. Es ist bekannt, dass Peroxisomen auch untereinander interagieren und sogar peroxisomale Netzwerke ausbilden können [124]. Kürzlich zeigten Lebendzellbeobachtungen lange gerichtete Bewegungen von Peroxisomen, die zu engen Kontakten mit anderen Peroxisomen führten [186]. Der Austausch von Proteinen oder Metaboliten zwischen Peroxisomen konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden [186-188].

1.3.4 Bidirektionaler Transport

Die Beobachtung der Bewegung verschiedenster Organellen *in vivo* an lebenden Zellen zeigte, dass der Transport entlang von Mikrotubuli bidirektional mit häufigen Richtungswechseln erfolgt und durch die gleichzeitige Bindung entgegen gesetzter Motorproteine an dieselbe zu transportierende Ladung verursacht wird [105, 189, 190]. Dabei werden unter anderem Mitochondrien [191], Peroxisomen [124-127], Endosomen [192], Phagosomen [193], sekretorische Vesikel [194] und Intermediärfilamentbausteine [195] bidirektional transportiert. Allerdings sind die Mechanismen, die die Aktivität der involvierten Motorproteine koordinieren und die daraus resultierende Transportrichtung regulieren, bisher kaum verstanden.

Verschiedenste Modelle wurden entwickelt um die teilweise kontroversen Ergebnisse hierzu zu erklären (Abbildung 1.9). Bei dem so genannten „tug-of-war“ Modell üben entgegen gerichtete Motorproteine, die gleichzeitig an dieselbe zu transportierende Ladung gebunden sind, gegensätzliche Kräfte aus und erzeugen dadurch eine Spannung an dieser Ladung, z.B. an einem Vesikel [196-198]. Die resultierende Transportrichtung ergibt sich aus der überwiegenden Kraft in eine Richtung durch erhöhte Anzahl der in die entsprechende Richtung transportierenden Motorproteine [105, 189, 199]. Dabei benötigen die Motoren immer ihre Gegenmotoren zur Ausführung der Motoraktivität. Der „knockdown“ von Kinesin-1 oder Dynein in *Drosophila* Zellen mittels siRNA resultierte in einem kompletten Verlust der peroxisomalen Bewegung [125, 126]. Ähnliche Phänomene wurden auch beim Transport anderer Organellen wie Mitochondrien oder Lysosomen beobachtet [123, 200]. Es konnte gezeigt werden, dass sich entgegengesetzte Motoren sogar gegenseitig aktivieren können [126]. Der Verlust der peroxisomalen Bewegung nach Kinesin-1 bzw. Dynein „knockdown“ konnte durch Expression anderer Minus- bzw. Plusmotoren wieder aufgehoben werden.

Allerdings scheinen aber *in vivo* Motorproteine nicht wahllos aktiv zu sein und daher wurden Mechanismen zur Koordination entgegengesetzter Motoren vorgeschlagen [125, 201], die z.B. die spezifische und unabhängige Bewegung unterschiedlicher Organellen erklären könnten. Möglichkeiten zur Regulation könnten unter anderem sterische Hinderungen oder posttranslationale Modifikationen darstellen [189]. Auch

die Existenz eines Koordinators, der als Schalter für die Motoraktivität wirken könnte, wurde postuliert [197, 202-204]. In Fischen ist z.B. der Transport von Melanophoren in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes abhängig vom cAMP-Spiegel (cyclisches Adenosinmonophosphat) und von der Aktivität der Proteinkinase A [205]. Der Transport von Mitochondrien [206, 207] und Lipidtröpfchen [197, 203] scheint ebenfalls reguliert zu sein. Einen Mechanismus zur Regulation der Organellenbewegung stellt die Phosphorylierung von Motorproteinen dar [208-210]. So konnte gezeigt werden, dass sowohl konventionelles Kinesin (Kif5) als auch cytoplasmatisches Dynein *in vivo* phosphoryliert werden [211-214], wobei die Phosphorylierung die Bindung der Motorproteine an die zu transportierende Ladung löste und somit den Pool der ungebundenen Proteine im Cytoplasma erhöhte.

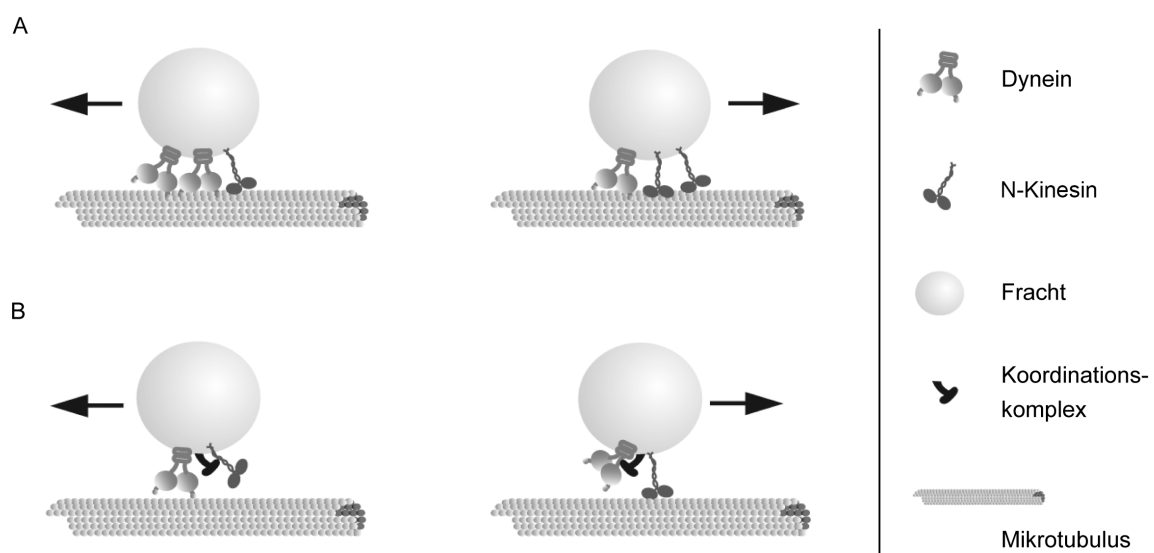


Abbildung 1.9: Modelle für den bidirektionalen Transport von Organellen

Für den bidirektionalen Organellentransport existieren verschiedene Modelle: Bei dem „tug-of-war“ Modell (A) sind entgegengesetzte Motorproteine gleichzeitig an die zu transportierende Ladung gebunden und erzeugen durch Ausübung gegensätzlicher Kräfte eine Spannung an dieser Ladung. Die resultierende Transportrichtung ergibt sich aus der überwiegenden Nettokraft, die durch die Anzahl und die Stärke der einzelnen Motoren bestimmt wird. Ein anderes Modell (B) dagegen postuliert die Koordination der Aktivität der einzelnen an die Fracht gebundenen Motorproteine. Entnommen und modifiziert aus [105].

1.4 Ziel dieser Arbeit

Mutationen in den Genen, die für die Peroxine PEX3, PEX16 und PEX19 kodieren, führen zur völligen Abwesenheit detektierbarer peroxisomaler Strukturen. Beim Menschen äußert sich dies in schweren Ausprägungen des Zellweger Syndroms, das bereits in den ersten Lebensjahren letal verläuft. In Zelllinien dieser Patienten können durch Wiedereinführung des betroffenen Gens vollständig funktionsfähige Peroxisomen *de novo* gebildet werden. Vor allem die frühen Phasen der peroxisomalen Biogenese sind bisher wenig verstanden und es bestehen z.B. Unklarheiten hinsichtlich des Ursprungs der peroxisomalen Membran und der Funktionen von PEX3, PEX16 und PEX19 während der Neubildung der Peroxisomen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die peroxisomale *de novo* Synthese am Beispiel der Komplementation PEX16-defizienter Zelllinien (Δ PEX16) untersucht werden und hinsichtlich der einzelnen Schritte der peroxisomalen Biogenese mittels Immunfluoreszenzmikroskopie charakterisiert werden. Auch die Fragestellung zum Herkunftsorts der peroxisomalen Membran sollte bearbeitet werden und sowohl die Plasmamembran als auch das endoplasmatische Reticulum diesbezüglich berücksichtigt werden. Der tatsächliche Vorgang der Vesikelabschnürung präperoxisomaler Vorläuferstrukturen konnte bisher nicht dargestellt werden und daher boten sich hierzu Beobachtungen an lebenden Zellen an. Präperoxisomale Vesikel und ER sollten durch Expression von PEX16-YFP und eines ER-Markers in Δ PEX16 Zellen markiert werden und die Position und Bewegung dieser beiden Organellen relativ zueinander untersucht werden.

Die Peroxine PEX3 und PEX19 sind zusätzlich essentiell für den Import peroxisomaler Membranproteine der Klasse I. Ob diese Proteine auch eine Rolle beim Import von PEX3 in die peroxisomale Membran spielen, wird kontrovers diskutiert. „Knockdown“ Experimente mit siRNA gegen PEX19 und PEX16 in humanen Fibroblasten sollten Aufschluss über den Importweg von PEX3 in die peroxisomale Membran geben.

Eine sehr häufige Ursache für das Zellweger-Syndrom stellen Mutationen im Gen für *PEX1* dar. Die Aufklärung der Funktion von *PEX1* und die damit verbundene Suche nach Interaktionspartnern für *PEX1* stellt daher eine wichtige Aufgabe der peroxisomalen Forschung dar. Bei einem „yeast-two-hybrid“ Screeningverfahren mit *PEX1* wurde zuvor das C-terminale Kinesin KifC3 detektiert. Daher sollte die Rolle von KifC3 beim peroxisomalen Transport anhand von „knockdown“ Experimenten mit siRNA gegen KifC3 untersucht werden. Ausbildung und Art des peroxisomalen Phänotyps sollten dabei Aufschluss über die eventuelle Beteiligung dieses Kinesins beim Prozess der peroxisomalen Bewegung entlang von Mikrotubuli geben. Außerdem sollte die Interaktion von *PEX1* mit KifC3 in Säugerzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mittels Coimmunopräzipitation überprüft werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zu einem tieferen Verständnis sowohl hinsichtlich der *de novo* Synthese und der darin involvierten Faktoren als auch der peroxisomalen Bewegung und der Regulation des Transports von Peroxisomen führen.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Lösungen, Puffer und Medien

Alle Chemikalien wurden entweder von Roth (Karlsruhe) oder von Sigma Aldrich (München) bezogen. Die Reagenzien für molekularbiologische Methoden waren soweit nicht anders angegeben von Fermentas (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, St. Leon-Roth). Alle Oligonukleotide und Primer für die PCR wurden von Biomers (Ulm) synthetisiert. Für alle Puffer, Lösungen und Reaktionsansätze wurde Reinstwasser verwendet, das über verschiedene Ionenaustauscher und Membranfilter mittels einer Milli-Q Apparatur von Millipore (Schwalbach) aufgereinigt wurde.

Tabelle 2.1: Zur Klonierung und Proteinanalyse verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Klonierung	
6x DNA Probenpuffer	10 mM Tris, 60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA, 0,43 mM Bromphenolblau, pH 7,6
5x TBE	450 mM Tris, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0
LB-Medium	1% (w/v) Peptone, 171 mM NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt
LB-Amp	LB-Medium, 100 µg/mL Ampicillin
LB-Kan	LB-Medium, 50 µg/mL Kanamycin
LB-Agar	LB-Medium, 1,5% (w/v) Agar
SOC-Medium	2% (w/v) Peptone, 0,5% (w/v) Hefextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 10 mM Glucose
Proteinanalyse	
SDS-PAGE	
2x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris pH 6,8 (HCl), 138 mM SDS, 10% (v/v) β-ME, 20% (v/v) Glycerin, 0,29 mM Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS
Western Blot	
Blotting Puffer (Semidry)	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 1,73 mM SDS, 20% (v/v) Methanol
Blotting Puffer (Tank-Blot)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,35 mM SDS, 20% (v/v) Methanol
Ponceau S Lösung	2,63 mM Ponceau S, 3% (v/v) HCl

TBS	1 M Tris, 1 M NaCl, pH 7,4 (HCl)
TBS-Tween	TBS, 0,1% (v/v) Tween-20
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl
PBS-Tween	PBS, 0,1% (v/v) Tween-20
PBS-T	PBS, 0,1% (v/v) Triton X-100
PBS-ST	PBS, 0,69 mM SDS, 0,1% (v/v) Triton X-100
Coimmunopräzipitation (CoIp)	
CoIp-Puffer	20 mM HEPES, 110 mM KAc, 5 mM NaAc, 2 mM MgAc, 1 mM EDTA, pH 7.3 (KOH)
Lysepuffer	CoIp-Puffer, 0,5% (v/v) Triton, 72,46 mM BSA, 10% (v/v) Glycerin, Protease-Inhibitor-Cocktail (1:200, Sigma Aldrich, P-8340)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für alle molekularbiologischen Experimente wurde der in Tabelle 2.2 beschriebene *E. coli* Stamm DH5 α verwendet. Die in dieser Arbeit benützten Vektoren sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Für molekularbiologische Methoden verwendeter *E. coli* Stamm

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F Φ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17 (r _K ⁻ ,m _K ⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA λ -	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektor	Ursprung
pLVTHM	Addgene, Cambridge, USA
psuper puro	Oligoengine, Washington, USA
pGem-T	Promega, Mannheim
pcDNA3.1zeo	Invitrogen, Darmstadt
pEYFPN1	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

2.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Zellen

500 mL LB-Medium wurden mit 1 mL einer Übernachtskultur von DH5 α angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Die Zellen wurden 15-30 Minuten auf Eis gekühlt und 40 min bei 3220 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach Waschen mit 100 mL eiskaltem autoklaviertem Reinstwasser und 5 mL eiskalter 10%iger (v/v) Glycerinlösung wurde das Sediment in 5 mL 10%iger (v/v) Glycerinlösung aufgenommen und die Zellen bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Transformation von Plasmiden in elektrokompetente *E. coli* Zellen

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurden 50 μ L elektrokompetente *E.coli* Zellen mit 0,5 μ g Plasmid-DNA gemischt und in 2 mm Elektroporationsküvetten bei 2500 V für 6 ms elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 500 μ L SOC Medium aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. 20 μ L dieser Vorkultur wurden auf Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte aus 50 mL LB-Selektionsmedium Kulturen, die am Abend zuvor mit Einzelklonen von Selektionsagarplatten oder aus Glycerinkulturen angeimpft wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3220 x g pelletiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoBond PC100 (Midi) Kits von Macherey-Nagel (Düren) nach Anweisung des Herstellers extrahiert (Plasmid DNA Purification User Manual, Nucleo Bond PC100, 09/2006, Rev.04, Macherey-Nagel). Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 100 μ L autoklaviertem Reinstwasser aufgenommen.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration isolierter Plasmid-DNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA-Proben wurde über den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm ermittelt, wobei ein Wert von 1,8 einer reinen DNA-Lösung entspricht. Verunreinigungen durch Proteine zeigen sich durch Abnahme dieses Quotienten.

2.2.5 Agarose Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten und zur Trennung von DNA-Gemischen mit unterschiedlicher Größe wurde eine Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde die Agarose in 50 mL 0,5 x TBE Puffer geschmolzen und Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 mg/mL zugegeben. Dabei wurde entweder Sea Kem LE Agarose oder NuSieve GTG low melting Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Nach Gießen und Erkalten des Gels wurde die Laufkammer mit 0,5 x TBE Puffer gefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarose-Gels überführt. Die Elektrophorese wurde für 1 Stunde bei 100 V durchgeführt.

2.2.6 Klonierung von Plasmiden für den „knockdown“ von PEX19 mit shRNA

Zur Herstellung eines Plasmids für den „knockdown“ von PEX19 wurden die verschiedenen Sequenzen, die für die Expression von shRNA gegen PEX19 kodierten (Tabelle 2.4), einschließlich des H1-Promotors aus dem Vektor pLVTHM (pAD104, 105 und 106, Diplomarbeit Anne Dueck [215], siehe Tabelle 2.3 und Tabelle 2.11) geschnitten und in den Vektor psuper kloniert (siehe Tabelle 2.3), der die DNA-Sequenz für eine Puromycin Resistenz enthielt. Soweit nicht anders angegeben wurden alle zur Klonierung verwendeten Enzyme, Puffer und Chemikalien von Fermentas (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, St. Leon-Roth) bezogen.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide für die Expression von shRNA gegen PEX19

Name	Sequenz	Funktion
GD360	5'-cgc gtc ccc gtg ctc ttg atg att tcg att caa gag atc gaa atc atc aag agc act ttt tgg aaa t-3'	shPEX19-85 forw
GD361	5'-cga ttt cca aaa agt gct ctt gat gat ttc gat ctc ttg aat cga aat cat caa gag cac ggg ga-3'	shPEX19-85 rev
GD362	5'-cgc gtc ccc gag atc gcc agg aga cac ttt caa gag aag tgt ctc ctg gcg atc tct ttt tgg aaa t-3'	shPEX19-170 forw
GD363	5'-cga ttt cca aaa aga gat cgc cag gag aca ctt ctc ttg aaa gtg tct cct ggc gat ctc ggg ga-3'	shPEX19-170 rev
GD364	5'-cgc gtc ccc tgc cac tga cct tca gaa ctt caa gag agt tct gaa ggt cag tgg cat ttt tgg aaa t-3'	shPEX19-431 forw
GD365	5'-cga ttt cca aaa atg cca ctg acc ttc aga act ctc ttg aag ttc tga agg tca gtg gca ggg ga-3'	shPEX19-431 rev

Die Ausgangsplasmide und der Zielvektor wurden präparativ mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ClaI* verdaut und die DNA Fragmente in einem 2% (w/v) Agarose (low melt, Biozym Hessisch Oldendorf) Gel bzw. 0,8% (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.5). Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Plasmid-DNA Fragmente unter Verwendung des Gelextraktionskits QiaexII von Qiagen (Hilden) aus dem Agarose Gel extrahiert. Dabei wurde die DNA in 20 µL sterilem Reinstwasser aufgenommen. Das einzuführende Fragment und der Vektor wurden in einem Verhältnis von 5:1 für 16 Stunden bei 16°C ligiert. Dafür wurde folgender Ligationsansatz hergestellt:

25 ng	Vektor (psuper)
43,05 ng	Insert (Oligonuklotide)
1 µL	T4 DNA Ligase
2 µL	T4 DNA Ligase Puffer
ad 20 µL	H ₂ O (Reinstwasser, autoklaviert)

Nach Ligation wurden die Ansätze für 20 Minuten gegen Reinstwasser dialysiert. Dafür wurden die Ansätze auf einen Nitrocellulose-Filter (0,25 µm VSWP, Merck/Millipore) gegeben, der auf 5 mL Reinstwasser in einer Zellkulturschale schwamm. Anschließend wurden die ligierten Plasmide in elektrokompetente *E.coli* transformiert, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

2.2.7 Klonierung eines Vektors für die Expression von KifC3-NLS

Zur Herstellung eines Plasmids, das murines (m) KifC3 mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) exprimiert, wurde zunächst mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR [216]) die DNA-Sequenz für KifC3 amplifiziert und über die verwendeten PCR-Primer (siehe Tabelle 2.5) Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* eingebaut. Soweit nicht anders angegeben wurden alle zur Klonierung verwendeten Enzyme, Puffer und Chemikalien von Fermentas (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, St. Leon-Roth) bezogen.

Tabelle 2.5: PCR-Primer für die Klonierung von KifC3-NLS

Name	Sequenz	Funktion
GD453	5'-gcaagcttcgagctgtacaagtcc-3' <i>HindIII</i>	PCR Primer KifC3 (m) forw
GD454	5'-ggatccggctgacggctg-3' <i>BamHI</i>	PCR Primer KifC3 (m) rev

Es wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt:

100 ng	KifC3(m)-pEGFPC1 (pDD04)[152]
5 µL	Primer GD453 (10 pmol/µL)
5 µL	Primer GD454 (10 pmol/µL)
1 µL	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2,5 U/µL)
1 µL	dNTPs (10 mM)
ad 50 µL	H ₂ O (Reinstwasser, autoklaviert)

und die PCR-Reaktion mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min	95°C	} 30 Zyklen
3 min	95°C	
1 min	60°C	
4,5 min	72°C	
15 min	72°C	
Pause	4°C	

Anschließend wurden die 3'A-Überhänge der PCR Produkte durch Zugabe von 1 µL *Taq*-Polymerase und Inkubation für 15 Minuten bei 72°C angehängt. Die PCR Produkte wurden unter Verwendung des mi-PCR Purificatio Kits (Metabion, Martinsried) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit 50 µL sterilem Reinstwasser eluiert. Zur Ligation der PCR-Produkte mit dem Klonierungsvektor

pGEM-T (siehe Tabelle 2.3) wurde folgender Reaktionsansatz (Vektor, Enzyme und Puffer von Promega, Mannheim) hergestellt und für 16 Stunden bei 16°C inkubiert:

5 µL	2x Ligationspuffer
1 µL	pGEM-T Vektor
1 µL	PCR Produkt
1 µL	T4 Ligase
ad 10 µL	H ₂ O (Reinstwasser, autoklaviert)

Die Ligationsansätze wurden für 10 Minuten gegen Reinstwasser dialysiert und in elektrokompetente *E.coli* transformiert, wie im vorherigen Kapitel (2.2.6) beschrieben. Die positiven Klone wurden durch Blau-Weiß-Selektion ermittelt. Dafür wurden die elektroporierten Bakterien auf LB_{Amp}/IPTG/X-Gal Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Klone zeichneten sich durch eine Weißfärbung gegen blau gefärbte negative Klone ab, da das *lacZ* Gen im pGEM-T Vektor so angeordnet ist, dass es durch das Insert unterbrochen wird. Aus positiven Klonen wurde eine Übernachtkultur angesetzt und das klonierte Plasmid aufgereinigt (Kapitel 2.2.3).

Die DNA-Sequenz für murines KifC3 wurde nun aus dem Vektor pGEM-T in die multiple cloning site des Plasmids pSE7 (siehe Tabelle 2.11) kloniert, das die Sequenz für PEX6 mit einem dreifachen Flag-Tag und dreifacher NLS enthielt. Dafür wurde ein präparativer Restriktionsverdau für 2 Stunden bei 37°C mit 5 µg KifC3-pGEM-T bzw. 5 µg pSE7 und den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* durchgeführt um die Sequenz für PEX6-Flag aus dem Plasmid zu schneiden.

Die DNA-Fragmente des Restriktionsansatzes wurden in einem 0,8%igen (w/v) bzw. 0,5%igen (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, die Plasmid-DNA Fragmente mit dem Gelextraktionskit QiaexII von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert und in 20 µL sterilem Reinstwasser aufgenommen. Zuletzt wurden das Insert und der Vektor in einem Verhältnis von 5:1 nach Herstellung des folgenden Reaktionsansatzes für 16 Stunden bei 16°C ligiert:

25 ng	Vektor (pcDNA3-NLS)
55,89 ng	Insert (KifC3)
1 µL	T4 DNA Ligase
2 µL	T4 DNA Ligase Puffer
ad 20 µL	H ₂ O (Reinstwasser, autoklaviert)

Die Ligationsansätze wurden für 10 Minuten gegen Reinstwasser dialysiert (siehe Kapitel 2.2.6) und das ligierte Plasmid in elektrokompetente *E. coli* transformiert, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

2.2.8 RNA Isolierung aus Säugerzellen und cDNA Synthese

Mit siRNA behandelte Zellen einer 75 cm² Kulturflasche wurden nach Trypsinierung mit 10 mL Hanks(-) Puffer (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und aus den Zellpellets unter RNase freien Bedingungen die RNA mit Hilfe des RNA spin Kit (PrepEase, Affymetrix/USB, High Wycombe, UK) nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Die RNA wurde mit 40 µL RNase freiem Wasser eluiert und 500 ng der extrahierten RNA wurden zu cDNA umgeschrieben. Dafür wurde die RNA-Lösung mit 1 µL einer Lösung der reversen Transkriptase aus MMLV (moloney murine leukemia virus) mit RNase H⁺ Aktivität und 4µL einer Reaktionsmischung, die Oligo(dT)-Primer und „random hexamer primer“ enthielt, nach Angaben des Herstellers versetzt (iScript cDNA-Synthese-Kit, BioRad, München). Die cDNA wurde mit folgendem Programm im PCR-Block synthetisiert:

5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C
Pause	4°C

2.2.9 Quantitative real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung der cDNA Mengen wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden mit 1µL der synthetisierten cDNA, 12,5 µL MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, St. Leon-Roth) und 0,75 µL (0,3 µM) der in Tabelle 2.6 aufgelisteten Primer (bezogen von Biomers, Ulm) nach Angaben des Herstellers in

einer 96 Well-Platte (MicroAmp, Applied Biosystems, Darmstadt) angesetzt. Die Reaktionen wurden in einem StepOne Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) mit folgendem Programm durchgeführt:

2 min	50°C	} 40 Zyklen
10 min	95°C	
15 s	85°C	
1 min	60°C	

Die Daten wurden während des 60°C-Schrittes gesammelt und im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse nach folgendem Programm durchgeführt:

15 sec	95°C
1 min	60°C
15 sec	95°C
15 sec	60°C

Die Reduzierung der mRNA Menge wurde nach der $2^{-\Delta\Delta ct}$ Methode [217] berechnet, wobei GAPDH als internes Kontrollgen [218] benutzt wurde.

Tabelle 2.6: Primer für die quantitative real-time PCR

Name	Sequenz	Funktion
GD234	5'-cat caa gaa ggt ggt gaa gca g-3'	GAPDH forw
GD235	5'-caa agt ggt cgt tga ggg gca atg-3'	GAPDH rev
GD456	5'-gag tgc tga gat tga ttc tga tg-3'	Kif5B forw
GD457	5'-cgg aga tct gca tta tca cg-3'	Kif5B rev
GD239	5'-cag caa ctg gga aga g-3'	PEX16 forw
GD278	5'-tga gtg aca ggc ctg a-3'	PEX16 rev
Hs_KifC3_1_SG	QuantiTect® Primer Assay, Qiagen	KifC3 primer mix

2.2.10 Analyse des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie

Um die Verteilung von COS7 Zellen in den verschiedenen Zellphasen nach „knockdown“ von KifC3 zu untersuchen, wurden die mit siRNA behandelten Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht. Dafür wurden COS7 Zellen einer 35 mm Schale 48 Stunden nach der zweiten Elektroporation abgeerntet und mit PBS-Puffer gewaschen. Die Pellets wurden in 0,5 mL PBS-Puffer resuspendiert und in 4,5 mL eiskaltes 70%iges (v/v) Ethanol überführt. Nach

zweistündiger Fixierung auf Eis wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Propidiumiodid-Färbelösung (PBS-Puffer mit 1% (v/v) Triton X-100, 0,2 mg/mL RNase A (AppliChem, Darmstadt) und 50 µg/mL Propidiumiodid) resuspendiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Mindestens 10^4 Zellen wurden mit dem LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) Durchflusszytometer analysiert und die Verteilung der Zellen in den entsprechenden Zellphasen anhand des DNA-Gehalts der Zellen mit der FACS Diva Software quantifiziert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-PAGE

Proteine aus Zellpellets (siehe Kapitel 2.4.2) bzw. Zelllysaten (siehe Colp Kapitel 2.3.3) wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE, modifiziert nach Lämmli, aufgetrennt [219]. Dafür wurden 20 µg (zur Detektion von PEX3 und PEX19) bzw. 40 µg Protein (zur Detektion von KifC3 und PEX1) je nach Größe des zu detektierenden Proteins auf ein 8%iges bzw 12%iges SDS-Gel (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.7) aufgetragen und die Elektrophorese in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Kammer bei einer Spannung von 150 V durchgeführt.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-Gele

	8% Trenngel	12% Trenngel	5% Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid*	26% (v/v)	40% (v/v)	16,5% (v/v)
1,5 M Tris (pH mit HCl eingestellt)	390 mM (pH 8,8)	390 mM (pH 8,8)	185 mM (pH 6,8)
350 mM SDS	3,47 mM	3,47 mM	3,43 mM
440 mM APS	4,38 mM	4,38 mM	4,38 mM
TEMED	5,16 mM	5,16 mM	8,51 mM

*Mischung aus 30%iger Acrylamid- und 0,8%iger Bisacrylamid-Lösung in einem Verhältnis von 37,5:1 (Rotiphorese Gel 30, Carl Roth, Karlsruhe)

2.3.2 Western Blotting

Zur Durchführung der Immunodetektion [220] bestimmter Proteine wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf PVDF- (zur Detektion von PEX3, PEX16 und PEX19) bzw. auf Nitrocellulose-Membranen (zur Detektion von KifC3 und PEX1) für 1 Stunde bei 20 V mit Hilfe eines Semidry-Blotting Systems (Bio-Rad, München) und Blotting Puffer übertragen.

Tabelle 2.8: Zur Immunodetektion verwendete Antikörper beim Western Blotting

Primäre Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
α -hsKifC3	Kaninchen	1:333	ProteinTech Group, Manchester, UK
α -hsMAPK	Maus	1:1000	QIAexpress Tag•100, MAP kinase 2 Epitop (EETARFQPGYRS), Qiagen, Hilden
α -hsPEX1	Kaninchen	1:10000	AG Kunau, Bochum
α -hsPEX3.1	Kaninchen	1:1000	Nora Treiber, AG Dodt
α -hsPEX16	Kaninchen	1:1000	ProteinTech Group, Manchester, UK
α -hsPEX19.1	Kaninchen	1:10000	Nora Treiber, AG Dodt
α -ggTub α	Maus	1:2000	Sigma Aldrich, München (T 6199)
α -hsTub β I+II	Maus	1:2000	Sigma Aldrich, München (T 8535)
Sekundäre Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
α -Maus-HRP	Ziege	1:15000	Sigma Aldrich, München
α -Kaninchen-HRP	Ziege	1:15000	Sigma Aldrich, München

PVDF Membranen (Roti-PVDF, 0,45 μ m, Roth, Karlsruhe) wurden nach Aktivierung in Methanol und anschließendem Waschen mit Puffer mit 10% (w/v) Milchpulver (blotting grade, fettarm, Roth, Karlsruhe) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt und Nitrocellulose Membranen (Roti-NC, 0,2 μ m, Roth, Karlsruhe) mit 5% (w/v) Milchpulver über Nacht bei 4°C. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur in TBS-Tween mit 5% (w/v) Milchpulver für α -KifC3, α -PEX16, α -Tub α und α -Tub β Antikörper und in PBS-ST mit 5% Milchpulver für α -PEX19 und α -PEX3 Antikörper. Die α -MAPK Antikörper wurden mit 5% (w/v) Milchpulver in TBS-Tween für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf den Membranen inkubiert und die Detektion von PEX1 erfolgte mit Hilfe von α -PEX1 Antikörpern in PBS-Triton mit 2% (w/v) Milchpulver, die über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Alle Antikörper wurden wie in Tabelle 2.8 angegeben verdünnt. Die Membranen wurden

mehrmals gewaschen und der Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proteinbanden unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“ (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn) nach Angaben des Herstellers markiert und mit Hilfe eines lichtempfindlichen Films (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, München) detektiert.

2.3.3 Coimmunopräzipitation

Die Coimmunopräzipitation (Colp) von KifC3 mit PEX1-myc wurde aus Zelllysaten durchgeführt. Dazu wurden COS7 Zellen einer 25 cm²-Kulturflasche transient mit 5 µg PEX1-myc und 2,5 µg pcDNA3.1zeo, 2,5 µg KifC3-pLPCX und 5 µg pcDNA 3.1zeo oder 5 µg PEX1-myc und 2,5 µg KifC3-pLPCX lipofiziert (siehe Kapitel 2.4.3, Plasmide siehe Tabelle 2.3 und Tabelle 2.11). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abgeerntet, zweimal mit 5 mL Hanks Puffer (mit Ca²⁺, Mg²⁺) gewaschen und nach Zugabe von 300 µL Lysepuffer (siehe Tabelle 2.1) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellmembranen wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 16100 x g und 4°C abgetrennt und die Überstände für die Colp verwendet.

Zunächst wurden die Magnetpartikel (Dynabeads® M-280, Invitrogen, Darmstadt), die mit α-Maus IgGs aus dem Schaf gekoppelt waren, wie vom Hersteller angegeben mit Colp-Puffer vorbereitet und über Nacht bei 4°C mit α-myc Antikörpern aus der Maus in einer 1:100 Verdünnung mit 14,5 mM BSA inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Partikel mit 1 mL Colp-Puffer, der 14,5 mM BSA und 0,5% (v/v) Triton X-100 enthielt, gewaschen und in 200 µL Zelllysaten resuspendiert. Das Gemisch wurde für 2 Stunden bei 4°C geschwenkt, die Partikel abgetrennt, und der Überstand mit SDS-Probenpuffer für 5 Minuten auf 80°C erhitzt. Die Magnetpartikel wurden mehrere Male mit 0,5 mL Colp-Puffer, der 1% (v/v) Triton X-100, 72,5 mM BSA, 4,8 mM Natriumdesoxycholsäure, 10% (v/v) Glycerin und Proteaseinhibitorcocktail (Sigma Aldrich, München, 1:200) enthielt, gewaschen und anschließend mit 25 µL 2x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 80°C erhitzt. Nach Abtrennen der Magnetpartikel wurden 10 µL der Eluate und 40 µL der Überstände in einem 8%igen SDS-Gel (siehe Kapitel 2.3.1) aufgetrennt und die Proteine durch Tank-Blotting für 5 Stunden bei 30

V auf eine Nitocellulosemembran übertragen. Die Detektion von KifC3 und PEX1 erfolgte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

2.4 Zellbiochemische Methoden

2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle Zellkulturmedien und Pufferlösungen wurden von PAA (Cölbe), Nunc (Fisher Scientific, Langenselbold) oder BD Biosciences (Heidelberg) erworben. Die verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10) wurden bei 37°C und 8,5% CO₂ in DMEM (4,5 g/L Glukose) kultiviert, das mit 10% (v/v) standardisiertem fötalem Kälberserum (FCS Gold), 2 mM L-Glutamin und 0,1 mM (50 mg/mL) Gentamicin versetzt worden war. Die verwendeten Patientenzelllinien (Tabelle 2.10) mit peroxisomalen Biogenese-Störungen sowie die Zelllinien GM5756T, COS7 und HEK293T waren zuvor mit dem großen T-Antigen des SV-40 Virus transformiert worden, wie bereits beschrieben [221].

Tabelle 2.9: Verwendete Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
A549	humane Epithelzellen eines Lungenadenokarzinoms	Probst, Tübingen (ATCC: CCL-185)
COS7	immortalisierte CV-1 (Fibroblasten aus Nierengewebe der grünen Meerkatze)	Probst, Tübingen (ATCC: CRL-1651)
GM5756T	immortalisierte humane Hautfibroblasten	Moser, Baltimore (USA)
HEK293T	immortalisierte humane embryonale Epithelzellen aus der Niere	Probst, Tübingen (ATCC: CRL-1573)
HELA	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	Rapaport, Tübingen (ATCC: CCL-2)
HepG2	humane Epithelzellen eines Leberzellkarzinoms	Probst, Tübingen (ATCC: HB 8065)

Tabelle 2.10: Zelllinien von Patienten mit peroxisomalen Biogenese-Störungen

PBD Nummer	KG	betroffenes Gen	Beschreibung	Bezeichnung	Herkunft
PBD061	9	<i>PEX16</i>	PEX16-defiziente immortalisierte humane Hautfibroblasten (GM6231T) [21]	Δ PEX16	Moser, Baltimore (USA)
PBD399	14	<i>PEX19</i>	PEX19-defiziente humane Hautfibroblasten	Δ PEX19	Wanders, Amsterdam (Niederlande)
PBD009	1	<i>PEX1</i>	PEX1-defiziente immortalisierte humane Hautfibroblasten [222]	Δ PEX1	Moser, Baltimore (USA)

In der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden schnell bei 37°C aufgetaut und in 5 mL Medium resuspendiert, das zusätzlich mit 10% FCS versetzt worden war (Auftaumedium). Nach Abzentrifugieren für 5 Minuten bei 200 x g wurden die Zellen in 5 mL Auftaumedium aufgenommen und in einer 25 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Nach 2 Passagen wurde mit normalem Medium weiter kultiviert.

Zur Passagierung wurden die adherenten Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 mL Hanks(-) Puffer (Hank's Balanced Salt Solution (BSS) ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gewaschen und mit 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 mg/mL Trypsin, 0,75 nM EDTA, PAA Pasching, Österreich) behandelt. Nachdem sich die Zellen durch die Trypsin-Behandlung abgelöst hatten, wurden sie in Medium aufgenommen und in einer geeigneten Verdünnung auf neue Kulturflaschen verteilt.

Die Lagerung der Säugerzellen erfolgte bei -196°C in der Gasphase von flüssigem Stickstoff. Um die Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche einzufrieren, wurden sie trypsiniert, in 10 mL Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 200 x g abzentrifugiert. Nach Resuspension in 3,8 mL kaltem Medium, das zusätzlich mit 10% (v/v) FCS und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt worden war (Einfrier-Medium), wurden die Zellen auf zwei Kryoröhrchen verteilt und zunächst für zwei Stunden bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C eingefroren, bevor sie in die Gasphase des Stickstofftanks überführt wurden.

Mikrotubuli in COS7 Zellen bzw. in Δ PEX16T Zellen wurden durch Zugabe von 5 μ M Nocodazol (AppliChem, Darmstadt) bei 37°C für zwei Stunden bzw. für 24 Stunden depolymerisiert. Zu siRNA-behandelten COS7 Zellen wurde direkt nach der zweiten Elektroporation Cytochalasin B (AppliChem, Darmstadt) in einer Konzentration von 4 μ M gegeben und für 48 Stunden bis zur Präparation auf den Zellen inkubiert. Δ PEX16T Zellen wurden mit 1 μ M und 2 μ M Cytochalasin B für 24 Stunden behandelt. Um Zellen mit KifC3 „knockdown“ in der S-Phase des Zellzyklusses zu synchronisieren, wurde Thymidin (Carl Roth, Karlsruhe) in einer Konzentration von 10 mM für 24 Stunden zugegeben.

Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, das die Sequenz für eine Puromycinresistenz enthielt (pDD01, pDD02, pDD03) wurden mit Puromycin (PAA, Pasching, Österreich) 2-3 Tage nach der Transfektion zunächst in einer Konzentration von 0,2 μ g/mL für 4-7 Tage selektiert und anschließend die Puromycin Konzentration auf 1,0 μ g/mL erhöht. Nach weiteren 7 Tagen war die Selektion abgeschlossen und die Zellen wurden mit einer Konzentration an Puromycin von 0,2 μ g/mL weiter kultiviert.

2.4.2 Herstellung von Zellpellets

Zur proteinbiochemischen Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.3.1) und Western Blotting (siehe Kapitel 2.3.2) wurden aus den Zellkulturen Proteinpellets hergestellt. Dafür wurden die Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben trypsiniert und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 x g pelletiert. Die Pellets wurden zweimal mit 10 mL Hanks(+) Puffer (Hanks BSS mit Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und die Zellen in 100 μ L autoklaviertem Reinstwasser aufgenommen. Die Proteinprobe wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten aufgeköcht und schließlich bei -20°C gelagert.

2.4.3 Transfektion von Plasmiden in Säugerzellen

Zellen einer 25 cm² Kulturflasche bzw. –schale wurden, soweit nicht anders angegeben, mit 5 µg Plasmid-DNA (Tabelle 2.11) lipofiziert.

Tabelle 2.11: Verwendete Vektoren und Plasmide zur transienten Transfektion

Name	Vektor	Insert	Ursprung
pDsRed2-ER	pDsRed2	ER-targeting-DsRed2 DsRed2-KDEL	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pDD05	pLPCX	KifC3(h)	De et al. [154]
pDD04	pEGFP-C1	KifC3(m)	Meng et al. [152]
pDD06	pGem-T	KifC3(m)	Denise Dietrich
pDD07	pcDNA3	KifC3(m)-3xNLS	Denise Dietrich
pHP57	pcDNA3.1zeo	PEX1-myc	Herma Portsteffen
pMS20	pcDNA3.1zeo	PEX3-myc	Monika Soukupova
PEX3-YFP	pEYFP-N1	PEX3	Anja Muntau
pGD152	pcDNA3	PEX5L-myc	Gabriele Dodt
pBM36	pcDNA3.1zeo	PEX6-myc	Britta Moellers
pSE7	pcDNA3	PEX6-3xFlag-3xNLS	Patrick Schulte-Euler
pHCP7	pcDNA3.1zeo	PEX11β-myc	Heike Pieper
pAD12	pEYFP-C1	PEX13	Alexandra Dieterle
pGKW48	pcDNA3	PEX14-myc	Garnet Will
pBG4.15	pEYFP-N1	PEX16	Birgit Gürke
pKB8.1	pcDNA3.1zeo	PEX16-myc	Katrin Bagner
PEX19-YFP	pcDNA3	PEX19-YFP	Anja Muntau
pAD104	pLVTHM	shPEX19, GD 360/361	Anne Dueck
pAD105	pLVTHM	shPEX19, GD362/363	Anne Dueck
pAD106	pLVTHM	shPEX19, GD364/365	Anne Dueck
pDD01	psuper puro	shPEX19, GD 360/361	Denise Dietrich
pDD02	psuper puro	shPEX19, GD362/363	Denise Dietrich
pDD03	psuper puro	shPEX19, GD364/365	Denise Dietrich
pJD10	pcDNA3.1zeo	PEX26-myc	Jan Diekmann
PMP70-myc	pcDNA3	PMP70-myc	Steve Gould
pEB22.11	pEGFP-C1	PTS1	Elisabeth Becker
pFL4	pEYFP-N1	PTS2	Florian Leese

Dafür wurde zunächst die DNA und 10 µL jetPEI (Polyethylenimin) von PeqLab (Erlangen) in 250 µL 150 mM NaCl separat gelöst. Anschließend wurde die jetPEI-Lösung zum DNA-Gemisch gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem das Medium auf den Zellen zu Antibiotika freiem Medium gewechselt worden war, wurde der jetPEI-DNA-Mix tropfenweise direkt in das Medium gegeben. Nach 3-4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium wieder zu Vollmedium gewechselt.

2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz-Anfärbung und Mikroskopie

Die am Vortag auf Deckgläser ausgesäten Zellen wurden mit Dulbeccos PBS (D-PBS, Gibco/Invitrogen, Darmstadt) gewaschen und 20 Minuten lang mit 3% (v/v) Formaldehyd (in D-PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellmembranen mit 1% (v/v) Triton X-100 (in D-PBS) für 5 Minuten permeabilisiert. Die Erstantikörper wurden so wie in Tabelle 2.12 angegeben in D-PBS verdünnt und pro Deckglas 30 µL Antikörperlösung auf Parafilm pipettiert. Die Deckgläser wurden mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf die Tropfen aufgelegt und die Zellen für 30 Minuten mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach zehnmalem Waschen mit D-PBS erfolgte die Inkubation der mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Zweitantikörper für 10 Minuten. Anschließend wurden die Zellen erneut zehnmal mit D-PBS Lösung gewaschen und mit 15 µL Mowiol-Einbettlösung pro Deckglas (9,6% (w/v) Mowiol 4-88, 24% (w/v) Glycerin, 11,8 mM n-Propylgallat, 0,1 M Tris-HCl, pH 8) auf Objektträgern fixiert.

Aktinfilamente wurden durch Bindung von Phalloidin, das mit Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat gekoppelt war (Sigma Aldrich, München), in einer Verdünnung von 1:500 analog zu den primären Antikörpern detektiert. Um Mitochondrien anzufärben wurden die Zellen mit einem mitochondrialen Marker (MitoTracker Red CMXRos, Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt) in einer Konzentration von 37,6 µM 30 Minuten vor der Fixierung bei 37°C inkubiert.

Die Präparate wurden am nächsten Tag mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200 M (Zeiss, Jena), ausgestattet mit einem AxioPlan Apochromat 1.4 63x Öbektiv, betrachtet. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe einer AxioCam MR Kamera in Kombination mit der AxioVision 4.7.2 Software (Zeiss, Jena) angefertigt.

Tabelle 2.12: Für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
α -AFP (3E6)	Maus	1:400	QBiogene/MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
α -hsCav-1	Maus	1:200	Acris Antibodies, Herford
α -hsEEA1	Maus	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
α -mmFlot I	Kaninchen	1:100	Sigma Aldrich, München
α -hsFlot II	Kaninchen	1:50	Sigma Aldrich, München
α -rnGM130	Maus	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
α -hsKifC3	Kaninchen	1:50	ProteinTech Group, Manchester, UK
α -myc (9B11)	Maus	1:200	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M. (Epitop: EQKLISEEDL)
α -hsPEX14	Kaninchen	1:400	Garnet Will, AG Kurnau, Bochum [223]
α -hsPMP70	Schaf	1:100	Stephen Gould, Baltimore, USA
α -ggTub α	Maus	1:100	Sigma Aldrich, München
α -hsTub β I+II	Maus	1:100	Sigma Aldrich, München
α -hsThiolase	Kaninchen	1:100	Stephen Gould, Baltimore, USA
Sekundäre Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
Alexa Fluor-488 α -Maus/Kaninchen	Ziege/Esel	1:300	Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor-594 α -Maus/Kaninchen	Ziege/Esel	1:200	Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor-488 α -Schaf	Esel	1:300	Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor-594 α -Schaf	Esel	1:200	Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt

2.4.5 Lebendzellbeobachtung von Säugerzellen

Um die Bewegung von Peroxisomen *in vivo* in Echtzeit zu verfolgen, wurden die zu beobachtenden Zellen auf 3,5 cm Zellkulturschalen mit Glasboden (MatTek, Ashland, USA) ausgesät und mit 0,5 μ g PEX16-YFP, 0,5 μ g ER-Marker bzw. 0,3 μ g YFP-PTS1 pro Schale transfiziert. Direkt vor der Lebendzellbeobachtung wurde das Medium über den Zellen entfernt und durch Hanks(+) Puffer (mit Ca^{2+} , Mg^{2+}) ersetzt. Die Aufnahme der Zeitreihen erfolgte soweit nicht anders angegeben 24 Stunden nach der Transfektion entweder mit einem Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200 M (Zeiss, Jena), ausgestattet mit einem AxioPlan Apochromat 1.4 63x Ölobjektiv und einer AxioCam MR in Kombination mit der AxioVision 4.7.2 Software oder mit dem Axio Observer.Z1, ausgestattet mit einem alpha Plan-Fluar 1.45 100x Ölobjektiv und

einer AxioCam MR3 in Kombination mit der AxioVision 4.8 Software. Während der Aufnahmen wurden die Zellen bei 37°C in einer Wärmekammer (Heating Insert P, PeCon GmbH, Erbach) inkubiert. Es wurden 40 bis 80 Bilder bei einer Belichtungszeit von 40 bis 200 ms bei maximaler Geschwindigkeit in einer z-Ebene aufgenommen. Die Bewegung der Peroxisomen wurde mit Hilfe der Tracking Software (AxioVision 4.8.2) von Zeiss manuell über die komplette Zeitreihe verfolgt.

2.4.6 Transfektion von siRNA in Säugerzellen

Um mittels RNAi gezielt mRNA herunter zu regulieren wurden GM5756T-Zellen (zum „knockdown“ von PEX16 und PEX19) bzw. COS7-Zellen und Δ PEX16T-Zellen (zum „knockdown“ von KifC3 und Kif5B) mit siRNA (bezogen von Qiagen, Hilden, Sequenzen siehe Tabelle 2.13) elektroporiert. Zellen einer 75 cm² Flasche wurden wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben trypsinisiert, in Medium aufgenommen und 3×10^6 Zellen pro Elektroporationsansatz für 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 0,5 mL 4°C kaltem DMEM ohne Zusätze resuspendiert. In Elektroporationsküvetten mit 4 mm Spaltbreite wurde 1 nmol (20 μ M) siRNA gegen PEX19, Kif5B und KifC3 bzw. 0,6 nmol (20 μ M) siRNA gegen PEX16 vorgelegt und mit der Zellsuspension gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem „time constant protocol“ des Elektroporators Gene Pulser XCell (BioRad, München) für 25 ms bei 230 V. Die elektroporierten Zellen wurden sofort in 1 mL vorgewärmten Vollmedium aufgenommen und für GM5756T und Δ PEX16T Zellen zwei Elektroporationsansätze in eine 75 cm² Kulturflasche überführt bzw. für COS7 Zellen ein Elektroporationsansatz in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde die siRNA Behandlung auf die gleiche Weise wiederholt. Die Zellen wurden zur Überprüfung der mRNA-Menge 24 Stunden nach der zweiten Elektroporation abgeerntet und die Kontrolle des „knockdowns“ auf Proteinebene sowie die Präparation für die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte, soweit nicht anders angegeben, 48 Stunden nach der zweiten siRNA Behandlung.

Tabelle 2.13: Verwendete siRNA

Name	Sequenz	Ursprung
siPEX19	5'-gag auc gcc agg aga cac utt-3'	Jones et al.[60]
siPEX16.2	5'-gga cca ucc ugc ugc ucu att-3'	Petra Krensel, AG Dodt[224]
siKifC3	5'-ggc ugu gca cga gaa ucu att-3'	Qiagen (Hs_KifC3_5), Hilden
siKif5B	5'-gcc uua ugc auu uga ucg gtt-3'	Splinter et al.[225]
siKontrolle	AllStars Neg. Control siRNA	Qiagen, Hilden

3 Ergebnisse

Peroxisomen zeichnen sich durch eine sehr hohe Dynamik aus, die sich in verschiedensten Aspekten äußert. Dabei stellt nicht nur die Variabilität ihrer Anzahl pro Zelle je nach metabolischen Ansprüchen [3] sondern auch die gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle eine wichtige Eigenschaft dieser Organellen dar. Die Vermehrung von Peroxisomen kann außer über Wachstum und Teilung [19] auch über deren komplette Neubildung in Abhängigkeit der Peroxine PEX3, PEX16 und PEX19 erfolgen [21-23, 226].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedenen Bereiche bearbeitet, die die hohe peroxisomale Dynamik verdeutlichen. Zum einen wurden die einzelnen Schritte der *de novo* Synthese von Peroxisomen in einer Peroxisomen-defizienten Zelllinie genauer charakterisiert und verschiedene mögliche Faktoren, die in diesen Prozess involviert sein könnten, analysiert. Zum anderen wurde der Transport und die Positionierung von Peroxisomen in Abhängigkeit zwei verschiedener Kinesine, Kinesin-1 (Kif5) und KifC3, untersucht. Dafür wurde zunächst die Art der Bewegung von Fluoreszenz-markierten Peroxisomen mittels Lebendzellbeobachtung verfolgt und beschrieben. Anschließend wurde durch „knockdown“ der beiden Kinesine mittels siRNA die Beteiligung dieser Motorproteine beim Prozess der peroxisomalen Verteilung innerhalb der Zelle gezeigt.

3.1 Peroxisomenbiogenese

Patientenzelllinien des Zellweger Syndroms mit Mutationen in den Genen für *PEX3*, *PEX16* und *PEX19* zeichnen sich durch völlige Abwesenheit detektierbarer peroxisomaler Strukturen aus. Einführung des entsprechenden Gens durch Plasmidtransfektion der Peroxisomen-defizienten Zelllinien führt zur Neubildung von Peroxisomen [21-24]. Diese *de novo* Biogenese lässt sich in drei Schritte einteilen: Zunächst wird die peroxisomale Membran gebildet (1), in die die Membranproteine importiert werden (2) und anschließend den Import der Matrixproteine ermöglichen (3).

Verschiedenste bereits veröffentlichte Studien legen zwar die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums (ER) bei der Neubildung von Peroxisomen nahe [30-32, 39-41], allerdings ist der Mechanismus nach wie vor weder für niedere noch für höhere Organismen geklärt. Daher wurde in dieser Arbeit die zeitliche Abfolge der einzelnen Schritte während der Komplementation PEX16-defizienter Zelllinien (Δ PEX16) analysiert und auf die Herkunft der peroxisomalen Membran eingegangen, wobei sowohl das ER als auch andere Membransysteme als Ursprungsort berücksichtigt wurden. Zudem wurde der Einfluss des Cytoskeletts und Mikrotubuli-assoziiierter Motorproteine auf die peroxisomale *de novo* Synthese in den frühen Schritten untersucht.

Auch der zweite Schritt des Imports von Membranproteinen in die peroxisomale Membran wird kontrovers diskutiert [66, 227-229]. Der bisher angenommene Mechanismus eines posttranslationalen Imports der peroxisomalen Membranproteine aus dem Cytosol in Abhängigkeit der Peroxine PEX19 und PEX3 [19] wird durch neuere Erkenntnisse in Frage gestellt. In Hefen wurde gezeigt, dass ein Großteil der Membranproteine nach Insertion in das ER über vesikulären Transport vom ER zu den Peroxisomen gelangt [36]. Dabei ist vor allem der Importweg für PEX3, ein peroxisomales Membranprotein der Klasse II [60, 65], noch relativ unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden „knockdown“ Experimente mit siRNA durchgeführt, die die Rolle von PEX19 und PEX16 beim Import von PEX3 in die peroxisomale Membran klären sollten.

3.1.1 Komplementation von PEX16-defizienten humanen Fibroblasten

Humane Fibroblasten der Linie GM6231T enthalten aufgrund einer *PEX16*-Punktmutation im Codon für Arginin 176, was zu einem Nonsense-Codon führt, kein PEX16-Protein und können somit keine peroxisomalen Strukturen ausbilden. Nach Transfektion mit Konstrukten, die für die Expression von PEX16 kodieren, bilden sich in verschiedenen Schritten erneut voll funktionsfähige Peroxisomen aus [21, 25].

In den folgenden Kapiteln wurde die Kinetik der peroxisomalen Biogenese PEX16-defizienter humaner Fibroblasten charakterisiert und die Herkunft der Membran präperoxisomaler Vesikel in den frühen Stadien untersucht sowie der Einfluss des

Cytoskeletts und zwei verschiedener Motorproteine auf die Bildung dieser Vesikel analysiert.

3.1.1.1 Kinetik der Komplementation von PEX16-defizienten Fibroblasten

Bevor die Kinetik der peroxisomalen Biogenese untersucht werden konnte, wurde zunächst die Abwesenheit von Peroxisomen in PEX16-defizienten humanen Fibroblasten (Δ PEX16) überprüft. Dafür wurden Δ PEX16-Zellen mit einem Plasmid transient transfiziert, das für die Expression des mit YFP gekoppelten peroxisomalen Targetingsignals 1 (PTS1) kodierte. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion fixiert und GFP, PEX14, ein peroxisomales Membranprotein, und Thiolase, ein peroxisomales Matrixprotein mit PTS2, mit spezifischen Erstantikörpern und Alexa 488 bzw. Alexa 594 markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht.

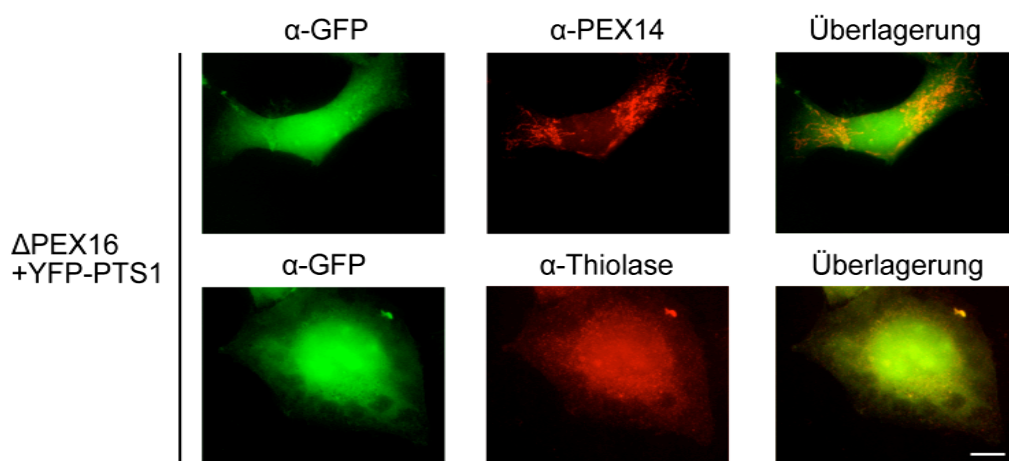


Abbildung 3.1: Peroxisomendefizienz in humanen Δ PEX16-Fibroblasten

Humane PEX16-defiziente Fibroblasten wurden mit YFP-PTS1 transient transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mit Erstantikörpern gegen GFP und Alexa 488 gekoppelten Zweitantikörpern bzw. mit Erstantikörpern gegen PEX14 und Thiolase und Alexa 594 markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Durch PEX16-Defizienz wurden keine peroxisomalen Strukturen ausgebildet. Daher waren peroxisomale Matrixproteine wie YFP-PTS1 und Thiolase cytosolisch lokalisiert, wohingegen PEX14, ein peroxisomales Membranprotein, an den Mitochondrien mislokalisiert war. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Bei der Analyse der Präparate mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich, dass in Δ PEX16-Zellen keine peroxisomalen Strukturen detektierbar waren. Dies äußerte sich in der cytosolischen Lokalisation der beiden Matrixproteine YFP-PTS1 (Abbildung 3.1) und Thiolase, da Peroxisomen zum Import dieser Proteine fehlten.

Aufgrund der Abwesenheit peroxisomaler Membranen wurde PEX14, wie in Abbildung 3.1 ersichtlich, in die Mitochondrien mislokalisiert.

Um die Peroxisomenbiogenese und somit die Komplementation auszulösen, wurden Δ PEX16-Zellen mit Konstrukten transfiziert, die für die Expression von PEX16-YFP oder PEX16-myc kodierten. Zur Kontrolle wurden der Leervektor und ein Plasmid transfiziert, das für die Expression von YFP-PTS1 kodierte. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion fixiert und myc, PEX14 und Thiolase durch Verwendung spezifischer Erstantikörper und Alexa 488 bzw. Alexa 594 markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht. In Abbildung 3.2 ist exemplarisch die Komplementation von Δ PEX16 Zellen mit PEX16-myc dargestellt. Einen Tag nach der Transfektion waren die ersten präperoxisomalen Strukturen zu sehen, die bereits PEX16-myc enthielten. Kotransfektion mit PEX3-YFP zeigte, dass PEX3 ebenfalls nach 24 Stunden in die Vesikel importiert wurde. Peroxisomale Membranproteine wie PEX14 waren allerdings noch in den Mitochondrien mislokalisiert, was zu einem fehlenden Import der peroxisomalen Matrixproteine wie Thiolase führte. Doch einen Tag später waren die peroxisomalen Vesikel auch positiv für die Membranproteine PEX14 (Abbildung 3.2) sowie PEX13 (Diplomarbeit Mathias Stotz [45]) und weitere 24 Stunden später wurden auch Matrixproteine wie Thiolase (Abbildung 3.2) und Katalase (Diplomarbeit Mathias Stotz [45]) erfolgreich in die Peroxisomen importiert, womit die Biogenese der Peroxisomen drei Tage nach der Transfektion abgeschlossen war.

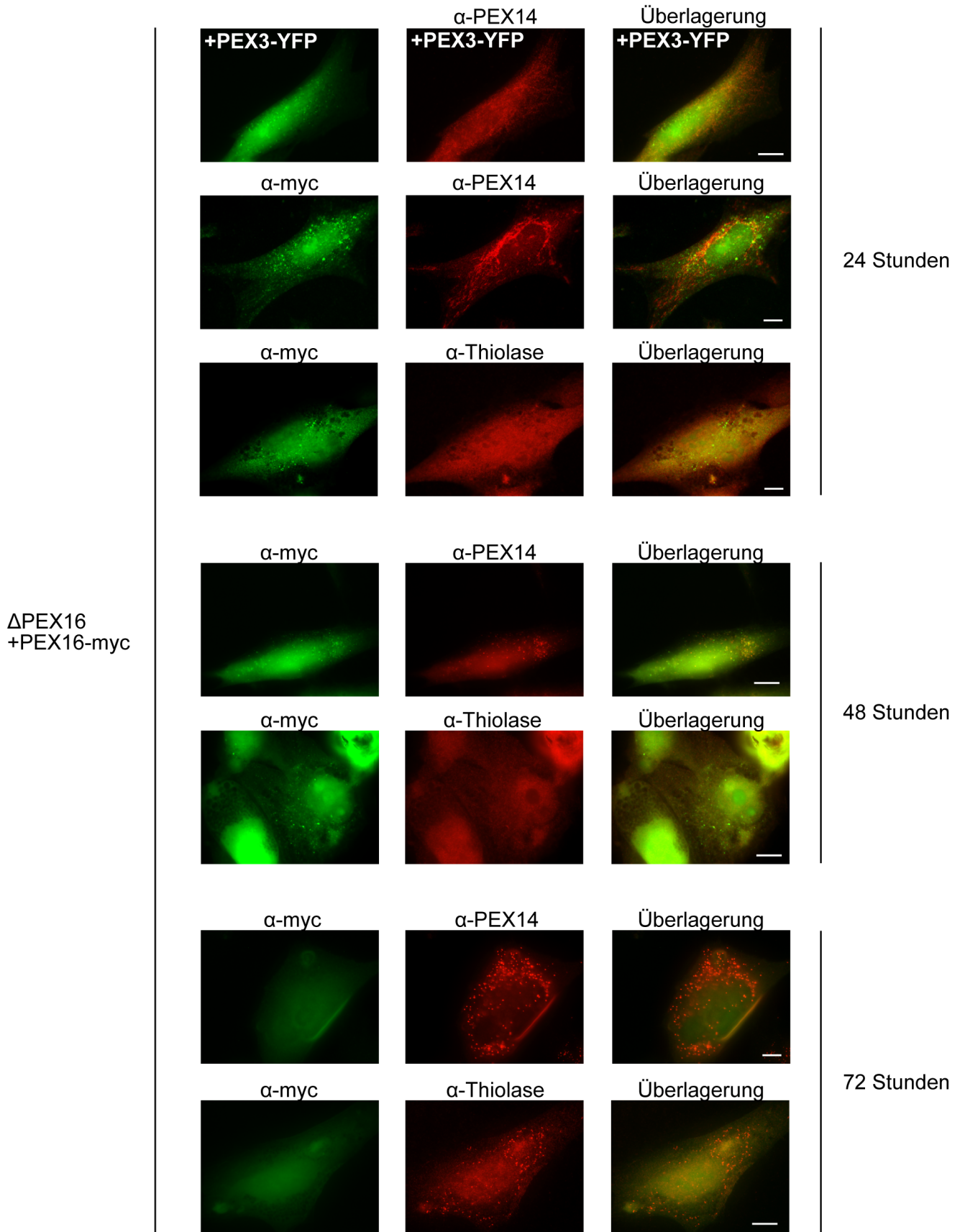


Abbildung 3.2: Komplementation von humanen ΔPEX16 Fibroblasten

Humane PEX16-defiziente Fibroblasten wurden mit PEX16-myc transient transfiziert und 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach der Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. PEX14 und Thiolase wurden durch Verwendung von spezifischen Erstantikörpern und Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern markiert. Der myc-Tag wurde durch Verwendung von α -myc Erstantikörpern und Alexa 488 gekoppelten Zweitantikörpern detektiert. In der obersten Zeile wurde zusätzlich PEX3-YFP transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion waren präperoxisomale Strukturen sichtbar, die hier durch punktierte Färbung von PEX16-myc und PEX3-YFP angezeigt wurden. Der Import von PEX14 als peroxisomales Membranprotein erfolgte nach 48 Stunden, wohingegen peroxisomale Matrixproteine wie Thiolase erst 72 Stunden nach der Transfektion in die Peroxisomen transportiert wurden. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Quantifizierung der Δ PEX16-Zellen mit PEX16-positiven Vesikeln (Abbildung 3.3A), PEX14-positiven Vesikeln (B) und Thiolase-positiven Vesikeln (C) 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach der Transfektion mit PEX16-myc oder PEX16-YFP (D) bestätigte diese Ergebnisse. Bereits nach 24 Stunden war das Maximum an Zellen mit PEX16-positiven präperoxisomalen Vesikeln erreicht. Dagegen waren zwar schon nach 24 Stunden Vesikel mit importiertem PEX14 vorhanden, aber die Zahl der Zellen mit PEX14-positiven Präperoxisomen erhöhte sich in den weiteren 24 Stunden noch um den Faktor 1,5 bis 2, so dass erst 48 Stunden nach der Transfektion der Import dieses Membranproteins abgeschlossen war. Eine vollständige Komplementation der Δ PEX16-Zellen mit reifen Thiolase-positiven Peroxisomen zeigte sich erst 3 Tage nach der Transfektion.

Bei Vergleich der Komplementationsfähigkeit der beiden verwendeten PEX16 Konstrukte war ein deutlicher Unterschied zu erkennen: Trotz sinkender Expressionsraten des PEX16-myc Proteins (Abbildung 3.3D) über die beobachteten 3 Tage, waren nach Transfektion dieses Konstrukts 1,5 bis 2 mal mehr Zellen mit PEX16- und PEX14-positiven Vesikeln vorhanden verglichen mit PEX16-YFP transfizierten Zellen (A und B). Zudem waren nach Transfektion mit PEX16-myc bereits nach 48 Stunden Thiolase-positive Vesikel sichtbar, was nach Transfektion mit PEX16-YFP nicht der Fall war (C). Diese schlechtere Komplementationseffizienz des PEX16-YFP Konstrukts lässt sich auf die Toxizität des Proteins bei sehr hohen Expressionsmengen zurück führen. Die Zellen, die sehr viel PEX16-YFP exprimierten starben ab, bevor eine Komplementation eintreten konnte.

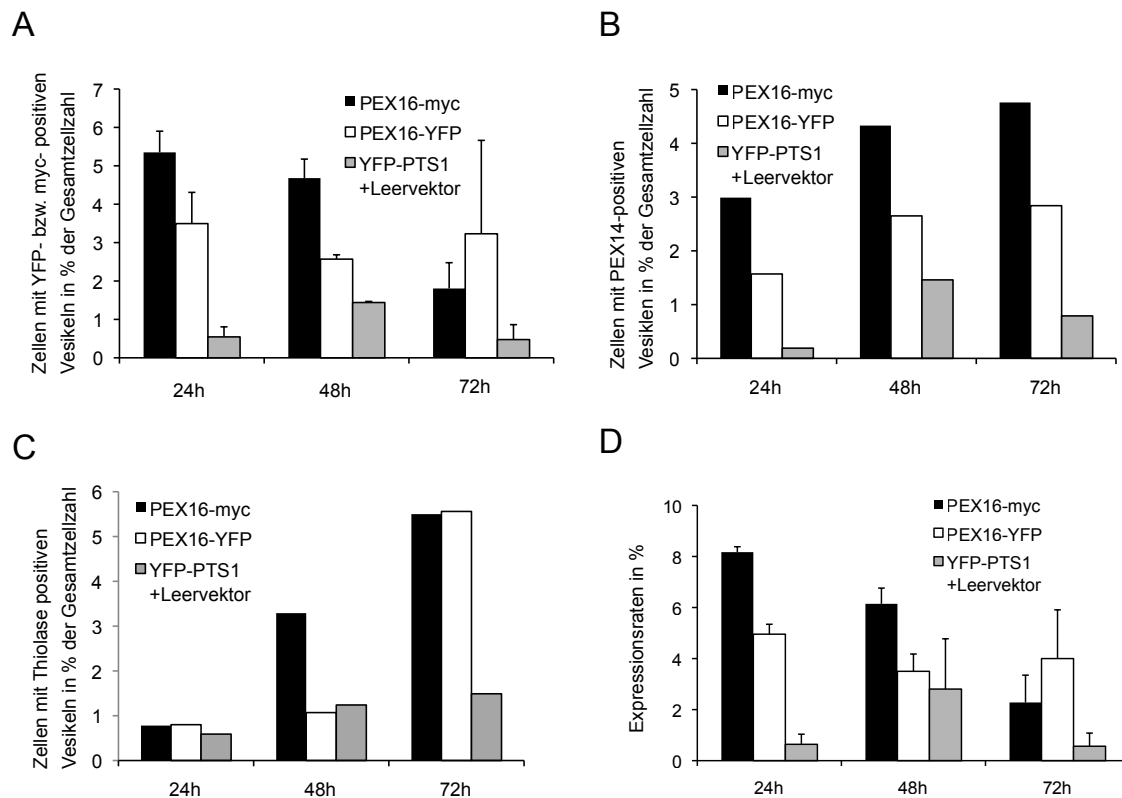


Abbildung 3.3: Charakterisierung der verschiedenen Phasen der peroxisomalen Biogenese

Die peroxisomale Lokalisation verschiedener Proteine wurde 24 Stunden (h), 48 Stunden und 72 Stunden nach Transfektion PEX16-defizienter Fibroblasten mit PEX16-YFP oder PEX16-myc quantifiziert. Zur Kontrolle wurden der Leervektor und YFP-PTS1 kotransfiziert. Es ist exemplarisch jeweils ein Versuch dargestellt, wobei A und D den Mittelwert und die Streuung innerhalb eines Versuches durch Auszählen zwei verschiedener Objektträger anzeigen. Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt.

3.1.1.2 Charakterisierung der Faktoren zur Bildung von Präperoxisomen

Die Herkunft der peroxisomalen Membran bei der peroxisomalen Biogenese nach Komplementation Peroxisomen-defizienter Zelllinien wird kontrovers diskutiert und ist bisher noch nicht geklärt (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.1). Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein Modell postuliert, das die Abschnürung von Vesikeln vom endoplasmatischen Reticulum nach Insertion von PEX3 annimmt [30, 31]. Ob dieses Modell auch auf Zellen höherer eukaryotischer Organismen übertragen werden kann, ist bisher nicht geklärt. Mit Hilfe von „pulse-chase“ Versuchen mit photoaktivierbarem PEX16-GFP konnte gezeigt werden, dass PEX16 in COS7 Zellen nach Insertion in das ER zu den Peroxisomen transportiert wurde [41].

Allerdings konnte in Säugerzelllinien keine Abhängigkeit der peroxisomalen Biogenese von COPI- oder COPII-Wegen bestätigt werden [43-45]. Sowohl der peroxisomale Import von neu synthetisiertem PEX3-myc und GFP-getaggten PMPs (PEX2-GFP, PEX3-GFP, PEX16-GFP, GFP-PMP70) in humanen Fibroblasten als auch die Neubildung von Peroxisomen nach Komplementation von Δ PEX3-Zellen war weder beeinflusst durch die Inkubation mit Brefeldin A, einem Inhibitor für die Bildung des COPI-coats, noch durch die Überexpression einer dominant negativen Mutante von SAR1, der GTPase für die Bildung des COPII-coats. Zudem war auch die Komplementation von Δ PEX16-Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP nicht durch Zugabe von Brefeldin A gestört und die präperoxisomalen Vesikel zeigten keine Kolokalisation mit der COPII-coat Komponente Sec31A.

Des Weiteren zeigten aber die entstehenden präperoxisomalen Vesikel nach Transfektion von Δ PEX16 Zellen mit PEX16 auch keine Kolokalisation mit anderen zellulären Membranstrukturen wie z.B. frühen Endosomen oder Lysosomen (unveröffentlichte Daten, AG Dodt), was einen Hinweis auf die Herkunft der peroxisomalen Membran geben würde.

Präperoxisomen kolokalisieren nicht mit Markern für „lipid rafts“

Bisher wurde nicht überprüft, ob die Membran der präperoxisomalen Vesikel aus der Plasmamembran stammen könnte. Abgesehen von endocytotischen Vesikeln mit Clathrin-coat haben auch Vesikel, die von „lipid rafts“ herrühren ihren Ursprung u.a. in der Plasmamembran [230]. „Lipid rafts“ sind Cholestrin- und Sphingolipid-reiche Domänen innerhalb von Membranen, die resistent gegenüber der Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien sind [231] und eine Rolle beim Proteintransport, bei der Signaltransduktion und bei der Organisation des Cytoskeletts spielen. Typischerweise enthalten die Vesikel, die von „lipid rafts“ aus der Plasmamembran abstammen, Caveolin-1 (Cav-1) als Gerüstprotein in so genannten Caveolae [232]. Davon lassen sich die nicht-caveolaren „lipid rafts“ unterscheiden, bei denen die Funktion von Cav-1 u.a. durch Flotilline (Flot) ersetzt wird [233, 234].

Die Ergebnisse von Woudenberg et al. geben Hinweise, dass „lipid rafts“ in der peroxisomalen Membran eine Rolle bei der peroxisomalen Biogenese spielen könnten. Mittels Flotationsgradientenzentrifugation wurde gezeigt, dass die peroxisomalen Membranproteine PMP70 und PEX14 nach Extraktion aus HepG2 Zellen mit Triton X-100 oder Lubrol WX teilweise an „lipid rafts“ der peroxisomalen Membran assoziiert sind. Die Reduzierung zellulärer Cholesterin-Mengen und die damit ausgelöste Zerstörung der „lipid rafts“ bewirkte eine starke Beeinträchtigung des korrekten peroxisomalen Imports von Katalase und ALDP, was in einem diffusen zellulären Staining dieser Proteine resultierte [235]. Außerdem wurde Caveolin-1 an der peroxisomalen Membran in Hepatozyten der Ratte detektiert. Der „knockdown“ von Caveolin-1 beeinflusste die Lokalisation peroxisomaler Membranproteine und die Anzahl und Form der Peroxisomen aber nicht [236].

Um zu überprüfen, ob präperoxisomale Vesikel in der frühen Phase typische Marker für „lipid rafts“ enthalten, wurden PEX16-defiziente humane Fibroblasten (Δ PEX16) transient mit PEX16-YFP transfiziert und die Zellen 24 Stunden nach Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. „Lipid rafts“ wurden mit spezifischen Erstantikörpern gegen Caveolin-1 (Cav-1), Flotillin-1 (Flot-1) und Flotillin-2 (Flot-2) und Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern markiert (Abbildung 3.4). Die durch Transfektion entstandenen PEX16-YFP positiven Vesikel kolokalisierten mit keinem der verwendeten Marker für „lipid rafts“. Cav-1 war hauptsächlich in der Plasmamembran und in kleinen Vesikeln zu sehen, die die Caveolae markierten, aber zu keinem Zeitpunkt PEX16-YFP enthielten. Im Gegensatz dazu sind Flotillin-1 und Flotillin-2 als Marker für nicht-caveolare „lipid rafts“ wie bereits beschrieben [237, 238] u.a. an Membranen der Endosomen und des trans-Golgi-Netzwerks vorhanden, was in Abbildung 3.4 durch die Lokalisation dieser Proteine an intrazellulären Membranen bestätigt wurde. Wie im Falle von Cav-1 waren auch Flotillin-1 und Flotillin-2 markierte Vesikel nicht positiv für PEX16-YFP.

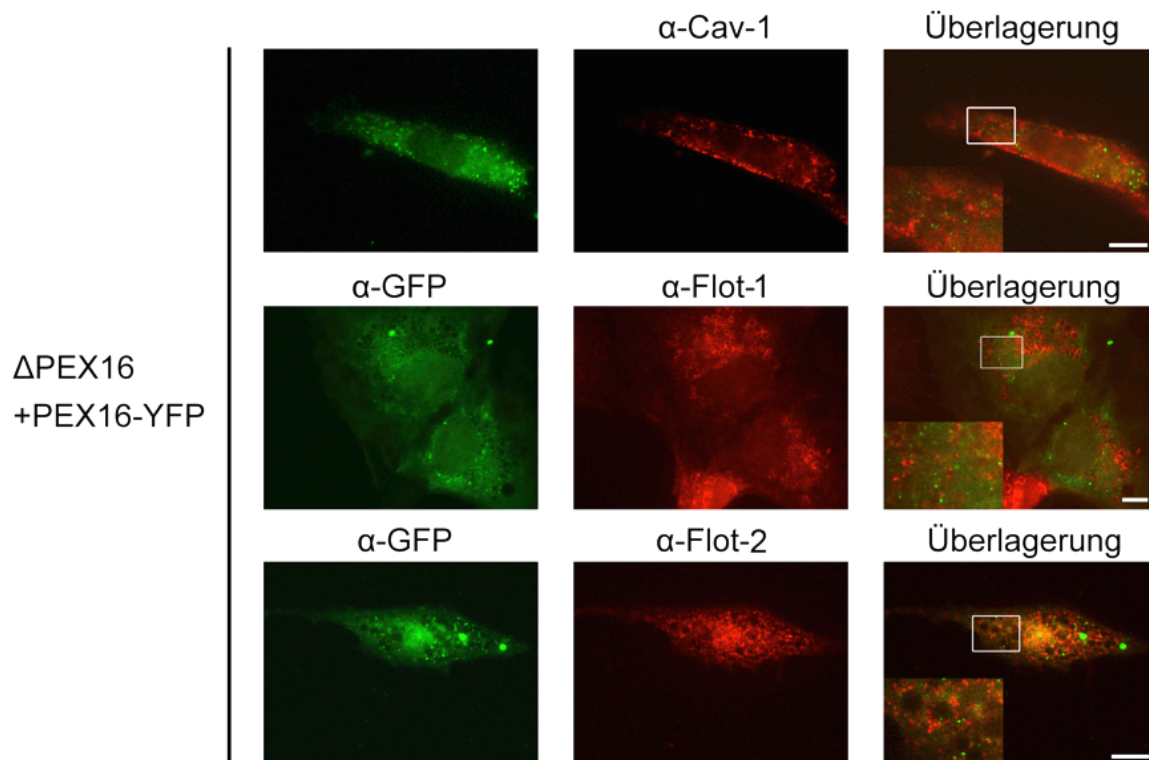


Abbildung 3.4: Präperoxisomale Strukturen kolokalisieren nicht mit „lipid rafts“

24 Stunden nach transienter Transfektion von PEX16-defizienten Fibroblasten mit PEX16-YFP wurden präperoxisomale Vesikel durch Markierung von GFP bzw. „lipid rafts“ durch Verwendung von spezifischen Erstantikörpern gegen Caveolin-1 (Cav-1), Flotillin-1 (Flot-1) und Flotillin-2 (Flot-2) und Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. PEX16-positive präperoxisomale Vesikel kolokalisierten nicht mit „lipid rafts“. Die Größenmarkierung entspricht 10 μm .

Somit scheinen „lipid rafts“ und die davon abstammenden Vesikel bei der Bildung von Präperoxisomen zumindest in der frühen Phase keine Rolle zu spielen. Die beobachteten „lipid rafts“ in der peroxisomalen Membran [236] könnten allerdings zu einem späteren Zeitpunkt der Biogenese entstehen. Der in der peroxisomalen Biogenese später folgende Schritt des Imports von Matrixproteinen wie Katalase könnte daher, wie von Woudenberg et al [235] beschrieben, abhängig von „lipid rafts“ und den damit verbundenen Gerüstproteinen wie Caveolin-1 in der peroxisomalen Membran sein.

Position und Bewegung der Präperoxisomen relativ zum endoplasmatischen Reticulum

Da andere zelluläre Membransysteme wie Plasmamembran (Abbildung 3.4), frühe Endosomen oder Lysosomen (unveröffentlichte Daten, AG Dodt) als Ursprung für die peroxisomale Membran unwahrscheinlich sind, scheint nach wie vor am ehesten das endoplasmatische Reticulum als Membranlieferant für die Peroxisomen über einen COPI- und COPII-unabhängigen Weg in Frage zu kommen. Geuze et al. konnten in dendritischen Zellen der Maus durch elektronenmikroskopische Untersuchungen die Anwesenheit von PEX13 und PMP70 in einem komplexen peroxisomalen Netzwerk zeigen, das durchgängig mit den Cisternen des ER verbunden war und frei von Ribosomen oder Komponenten des COPI- oder COP-coats war [39].

Daher wurde im Folgenden die Position und Bewegung präperoxisomaler Vesikel relativ zu den Lamellen des ER an lebenden Zellen hinsichtlich eventueller Anhaftung oder Verbindung zwischen Präperoxisomen und ER oder Abschnürung von Vesikeln vom ER untersucht.

In Abbildung 3.5 sind Δ PEX16 Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit PEX16-YFP und dem ER-Marker pDsRed2-ER dargestellt, der für die Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRed2, gekoppelt an die ER-targeting Sequenz (ER-targeting-DsRed2) von Calreticulin und die ER-Retentionssequenz KDEL (DsRed2-KDEL), kodierte. Die entstandenen PEX16-YFP positiven präperoxisomalen Vesikel schienen entlang der einzelnen Lamellen des endoplasmatischen Reticulums angeordnet zu sein. Die Zeitreihe der Abbildung 3.5 (siehe Anhang 8.2.1) zeigte eine teilweise parallele Bewegung der präperoxisomalen Vesikel (Charakterisierung der Bewegung siehe Kapitel 3.2.1) und den Lamellen des ER. Die Präperoxisomen schienen sich teilweise mit dem ER zu bewegen, was ein Hinweis auf eine Anhaftung der Vesikel an das ER sein könnte.

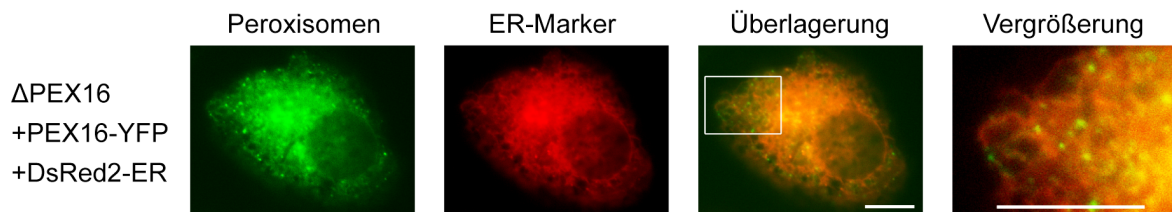


Abbildung 3.5: Lebendzellbeobachtung von transfizierten Δ PEX16 Zellen

Transfektion von Δ PEX16-Zellen mit PEX16-YFP und dem ER-Marker pDsRed2-ER resultierte nach 24 Stunden in der Bildung von präperoxisomalen Vesikeln, die teilweise mit einzelnen Lamellen des endoplasmatischen Reticulums überlagerten und sich parallel mit dem ER bewegten (Lebendzellbeobachtung, Zeitreihe, Anhang 8.2.1). Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Außerdem wurde die Position der präperoxisomalen Vesikel relativ zu den Lamellen des ER im Raum dargestellt. Dazu wurden Δ PEX16-Zellen mit PEX16-YFP und ER-Marker transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion die entstandenen Präperoxisomen lebend beobachtet. Ein Bilderstapel mit Schnitten in der z-Ebene einer Zelle wurde aufgenommen, aus diesem z-Stapel nach Dekonvolvierung der Daten ein 3D Modell erzeugt (Abbildung 3.6 B und C, Anhang 8.2.2) und Schnitte in verschiedenen Ebenen des Modells erstellt (Abbildung 3.6 D-F). Die AxioVision-Software (Zeiss) errechnete im „Oberflächenmodus“ solide Oberflächen aus den Grauwerten, wodurch die Innenseite der Oberflächen dargestellt werden konnte (pink in Abbildung 3.6 D-F). Die längliche Form der Vesikel ergab sich zum einen aus der Bewegungsunschärfe der Präperoxisomen, da die Zellen lebend analysiert wurden und zum anderen aus der schlechteren Auflösung entlang der z-Achse.

Das 3D Modell in Abbildung 3.6 zeigte, dass die PEX16-YFP positiven Vesikel zwischen den einzelnen Lamellen des ER lokalisiert waren. Mit dieser Methode konnte allerdings weder eine Anlagerung der Vesikel an das ER beobachtet werden noch konnten Verbindungselemente zwischen Präperoxisomen und ER dargestellt werden. Zudem konnte aufgrund der Auflösungsgrenze der verwendeten Methode kein Abschnürungsvorgang von präperoxisomalen Vesikeln vom ER aufgenommen werden.

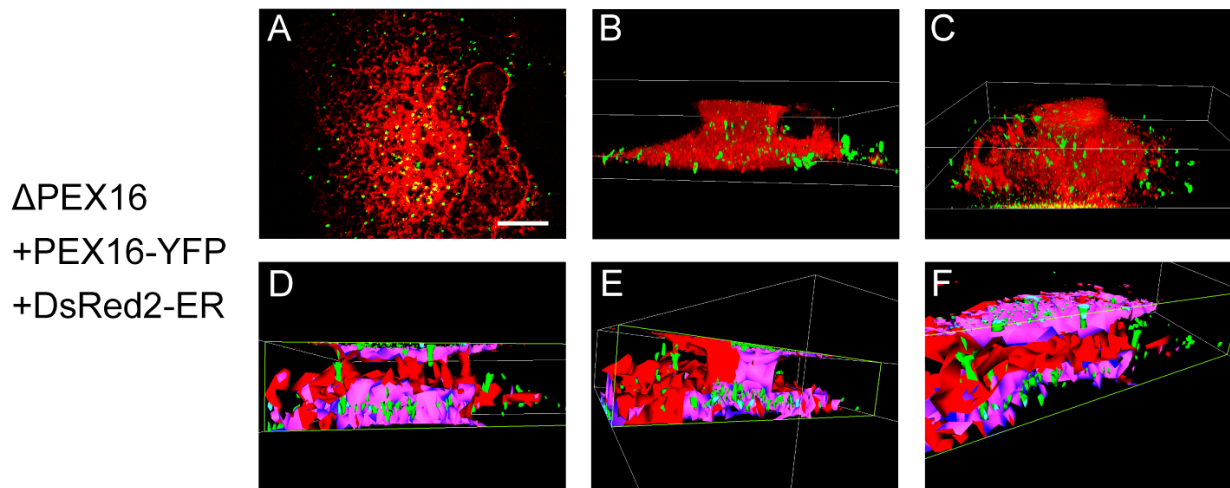


Abbildung 3.6: Δ PEX16 Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP im 3D Modell

Δ PEX16-Zellen wurden mit PEX16-YFP und dem ER-Marker pDsRed2-ER transient transfiziert. Nach Ausbildung der präperoxisomalen Vesikel 24 Stunden nach Transfektion wurde ein Bilderstapel von 46 Schnitten in der z-Ebene im Abstand von 0,24 μ m aufgenommen (A: Überlagerung der z-Stapel). Nach iterativer Dekonvolierung wurde mit Hilfe der AxioVision Software von Zeiss ein 3D Modell erstellt (B, C) um die Lokalisation der Präperoxisomen relativ zum endoplasmatischen Retikulum darzustellen. D-F zeigt das 3D Modell nach Schnitten durch unterschiedliche Ebenen im „Oberflächenmodus“. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Einfluss des Cytoskeletts und der Motorproteine auf die frühen Phasen der Komplementation

Wenn von einer Abschnürung präperoxisomaler Vesikel von existierenden Membranen ausgegangen wird, stellt sich die Frage nach der Rolle des Cytoskeletts und der Motorproteine bei diesem Vorgang. Ältere Ergebnisse von Brocard et al. zeigten die Abwesenheit von präperoxisomalen Vesikeln in Δ PEX16 Zellen 48 Stunden nach Mikroinjektion von PEX16 nach Depolymerisierung der Mikrotubuli durch Inkubation mit Nocodazol. Auch die Überexpression von p150^{Glued}, einer Untereinheit des Dynein-Motorkomplexes mit dominant negativem Einfluss auf den retrograden Transport vom ER zum Golgi-Komplex, übte einen inhibierenden Einfluss auf die Bildung der Präperoxisomen aus [239].

Um diese Fragestellung weiter zu bearbeiten wurde die Bildung von Präperoxisomen in der frühen Phase nach transients Transfektion von Δ PEX16-Zellen mit PEX16-YFP in Abhängigkeit vom Cytoskelett und von den Motorproteinen Kinesin-1 (Kif5) und KifC3, einem Minusmotor aus der Familie der Kinesine, untersucht.

Zunächst wurden in Δ PEX16-Zellen die Mikrotubuli durch Zugabe von Nocodazol in einer Konzentration von 5 μ M und das Aktinskelett durch Inkubation mit Cytochalasin B in einer Konzentration von 1 μ M depolymerisiert. Abbildung 3.7 zeigt, dass die verwendeten Konzentrationen der Reagenzien über den Zeitraum von 24 Stunden ausreichend waren, um die beiden Komponenten des Cytoskeletts vollständig abzubauen.

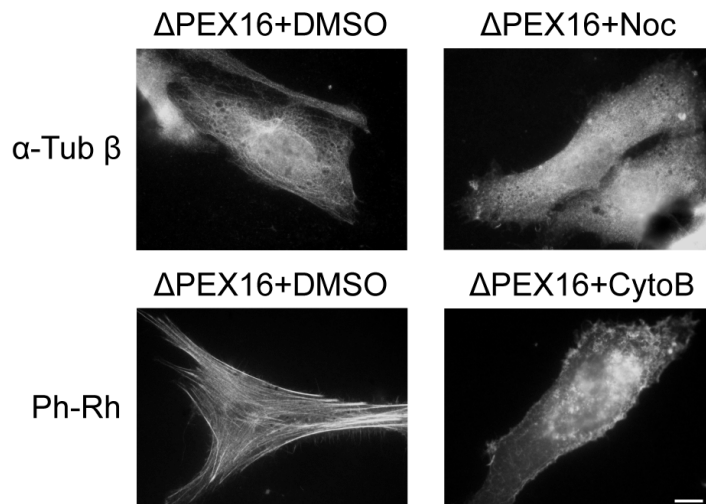


Abbildung 3.7: Depolymerisierung des Cytoskeletts in Δ PEX16 Fibroblasten

Mikrotubuli bzw. Aktinfilamente PEX16-defizienter Fibroblasten (Δ PEX16) wurden durch Inkubation mit 5 μ M Nocodazol (Noc) bzw. 1 μ M Cytochalasin B (Cyto B) für 24 Stunden zerstört. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem jeweils gleichen Volumen an DMSO, das als Lösungsmittel für die Reagenzien diente, behandelt. Die Markierung von Mikrotubuli erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Tubulin β (Tub β) und mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zweitantikörpern. Die obere Reihe zeigt intakte Mikrotubuli (links) bzw. diffuse cytosolische Lokalisation von Tubulin (rechts) nach Zugabe von Nocodazol. In der unteren Reihe wurden Aktinfilamente durch Bindung von Rhodamin getagtem Phalloidin (Ph-Rh) markiert. Links sind intakte Aktinfilamente zu sehen während rechts nach Behandlung mit Cytochalasin B die Filamente abgebaut sind. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Daher wurden Δ PEX16-Zellen 4 Stunden vor bzw. 4 Stunden nach der Transfektion mit PEX16-YFP mit Nocodazol oder Cytochalasin B versetzt und für 24 Stunden bis zur Präparation für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit den Reagenzien inkubiert. Als Leerkontrolle wurden die Zellen mit jeweils dem gleichen Volumen an DMSO versetzt, das als Lösungsmittel diente. Die hier bereits beschriebene (Kapitel 3.1.1.1) Bildung PEX16-YFP positiver Vesikel 24 Stunden nach Transfektion wurde durch die Anwesenheit von DMSO nicht beeinflusst (Abbildung 3.8). Zudem waren auch vor bzw. nach Zugabe von Nocodazol oder Cytochalasin B im gleichen Zeitraum Präperoxisomen sichtbar.

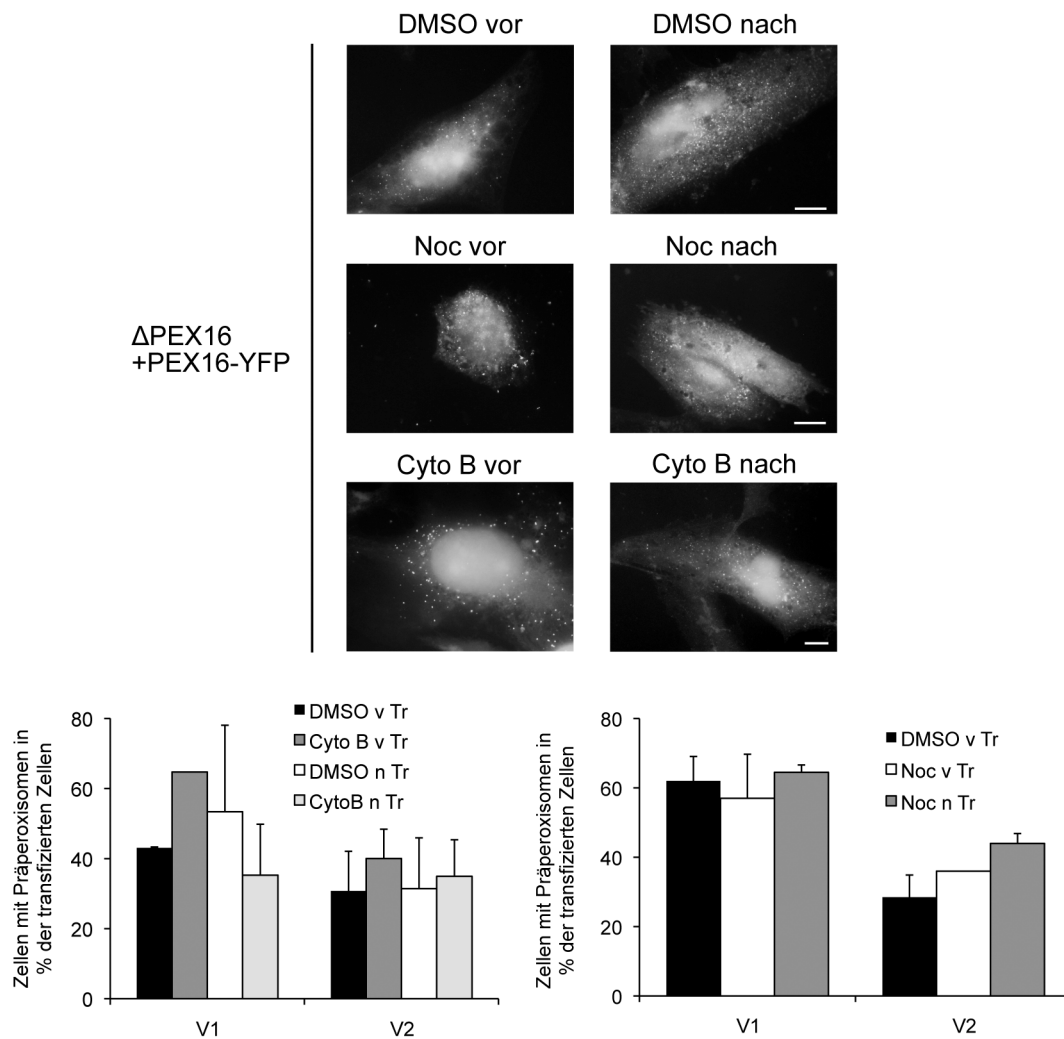


Abbildung 3.8: Peroxisomenbiogenese ist nicht abhängig vom Cytoskelett

PEX16-defiziente Fibroblasten (Δ PEX16) wurden 4 Stunden vor bzw. nach der Transfektion (v Tr bzw. n Tr) mit PEX16-YFP mit den Reagenzien Nocodazol (Noc, 5 μ M) und Cytochalasin B (Cyto B, 1 μ M für Versuch 1 (V1), 2 μ M für Versuch 2 (V2)) zum Abbau des Cytoskelettes bzw. mit DMSO als Kontrolle behandelt und 24 Stunden nach der Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. Präperoxisomen wurden auch in Abwesenheit von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten ausgebildet. Quantifizierung der Zellen mit PEX16-YFP positiven Vesikeln nach Behandlung mit den Reagenzien zeigte keine wesentliche Beeinflussung in der frühen Phase der Peroxisomenbiogenese durch Depolymerisierung der Mikrotubuli oder durch Abbau des Aktinskeletts. In den Grafiken sind zwei unabhängige Versuche (V1 und V2) dargestellt, wobei die Balken die Mittelwerte und die Streuung innerhalb eines Versuches durch Auszählen zwei verschiedener Objektträger anzeigen (Ausnahme: V1, Cyto B v Tr nur eine Zählung). Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Die Quantifizierung der Zellen mit PEX16-YFP positiven Vesikeln vor bzw. nach Zugabe der Reagenzien in zwei unabhängigen Versuchen zeigte keine wesentliche Beeinflussung der Peroxisomenbiogenese in der frühen Phase durch Abwesenheit der Mikrotubuli oder des Aktinskeletts (Abbildung 3.8). Die Bildung erster präperoxisomaler Strukturen 24 Stunden nach Transfektion von Δ PEX16-Zellen mit

PEX16-YFP war daher unabhängig von Mikrotubuli oder dem Aktinskelett. Im Gegensatz zu der veröffentlichten Studie von Brocard et al. [239] zeigten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Dodt, dass die Bildung von präperoxisomalen Strukturen unabhängig von den Mikrotubuli erfolgt (siehe diese Arbeit, Abbildung 3.8 und Diplomarbeit Mathias Stotz [45]).

Zusätzlich wurde die Rolle von Kinesin-1 (Kif5) als Plusmotor und von KifC3, einem Minusmotor aus der Familie der Kinesine, bei der Entstehung von Präperoxisomen untersucht. Da KifC3 bei einem „yeast-two-hybrid“ Screeningverfahren mit PEX1 detektiert wurde und, wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt, eine Funktion bei der Positionierung der Peroxisomen ausübt, könnte dieses Kinesin auch eine Rolle bei der peroxisomalen Biogenese spielen.

Daher wurden Δ PEX16-Zellen zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA gegen Kif5B (schwere Kette des Kinesin-1) oder gegen KifC3 bzw. mit Kontroll-siRNA elektroporiert und der „knockdown“ auf RNA-Ebene 24 Stunden nach der zweiten Elektroporation überprüft. Um die Bildung präperoxisomaler Vesikel zu induzieren wurden die Δ PEX16-Zellen 24 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ transient mit PEX16-YFP transfiziert und nach weiteren 24 Stunden für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert.

Sowohl nach der Behandlung der Zellen mit Kontroll-siRNA als auch nach „knockdown“ der Motorproteine Kinesin-1 (Kif5) oder KifC3 bildeten sich 24 Stunden nach Transfektion Präperoxisomen aus (Abbildung 3.9). Quantifizierung der Zellen mit PEX16-YFP positiven Vesikeln zeigte bei „knockdown“ der mRNA um 78% für Kif5B bzw. um 76% für KifC3 keine Beeinflussung der peroxisomalen Biogenese in der frühen Phase. Sowohl Plusmotor-Kinesine als auch Minusmotor-Kinesine scheinen somit keine große Rolle bei der Entstehung präperoxisomaler Vesikel in Δ PEX16 Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP zu spielen.

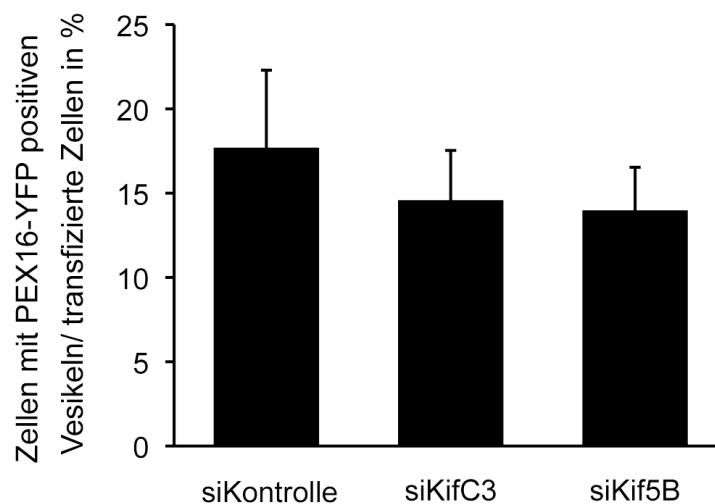
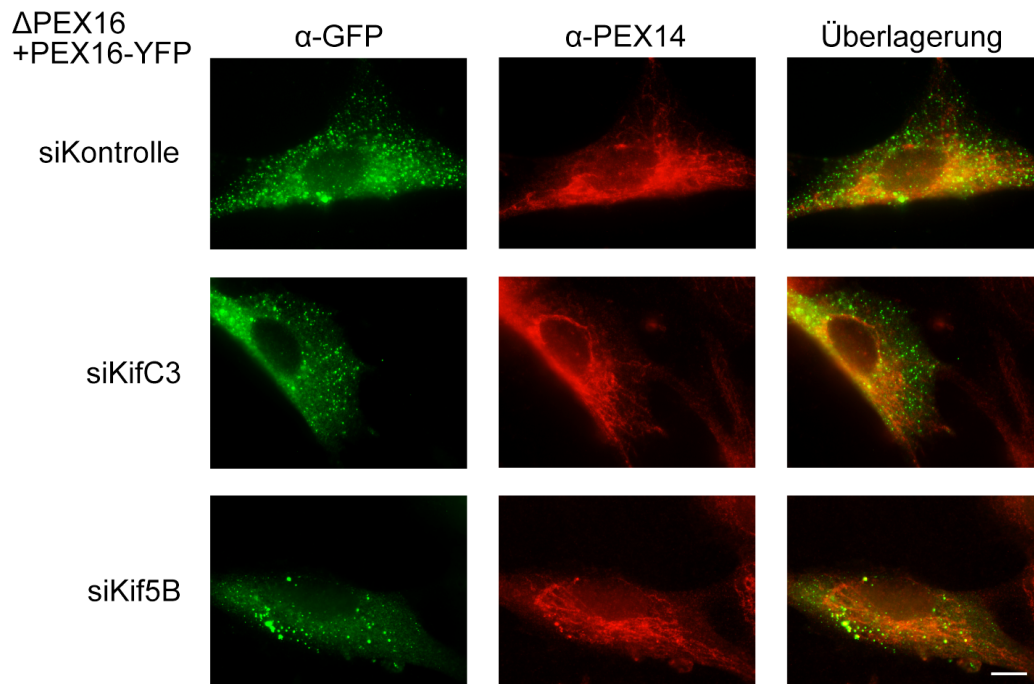


Abbildung 3.9: Kinesine sind nicht notwendig zur Peroxisomenbiogenese

PEX16-defiziente Fibroblasten (Δ PEX16) wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA gegen KifC3 oder Kif5B (schwere Kette des Kinesin-1) bzw. mit Kontroll-siRNA elektroporiert (siehe auch Kapitel 3.2.2.2). Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ mit PEX16-YFP transfiziert und nach weiteren 24 Stunden mit spezifischen Erstantikörpern gegen PEX14 und GFP und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern behandelt. Trotz Reduzierung der mRNA Menge an KifC3 um 76% bzw. an Kif5B um 78% wurden PEX16-YFP positive präperoxisomale Vesikel ausgebildet. Die Quantifizierung der Zellen mit präperoxisomalen Vesikeln zeigte keinen Defekt der Peroxisomenbiogenese in der frühen Phase nach „knockdown“ von KifC3 oder Kif5B im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Diagramm sind die Werte eines Versuches dargestellt, wobei die Mittelwerte und die Streuung innerhalb dieses Versuches durch Auszählen zwei verschiedener Präparate angezeigt ist. Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

3.1.2 Import peroxisomaler Membranproteine

Der Import peroxisomaler Membranproteine kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen (siehe auch Kapitel 1.2.2): Die meisten Membranproteine werden über ihre peroxisomale Membrantargeting Sequenz (mPTS) nach Translation im Cytosol von dem Transport- und Chaperonmolekül PEX19 erkannt, gebunden und zu den Peroxisomen transportiert. In einem nachfolgenden Schritt werden dann in Abhängigkeit von PEX3, das als Membranrezeptor für PEX19 dient, die Membranproteine in die peroxisomale Membran importiert. Ein PEX19-unabhängiger Import peroxisomaler Membranproteinen wurde für PEX3 postuliert [60, 61, 66].

Neuere Ergebnisse von Matsuzaki et al, die einen PEX19- und PEX16-abhängigen Import von PEX3 in die peroxisomale Membran beschreiben [65], werfen erneut Fragen zum Import peroxisomaler Membranproteine und der Rolle von PEX19 und PEX16 bei diesem Prozess auf. Daher wurde zunächst der Einfluss eines langfristigen „knockdowns“ von PEX19 mittels shRNA auf die Morphologie und Anzahl der Peroxisomen untersucht. Außerdem wurde die Rolle von PEX19 und PEX16 beim Import des Membranproteins PEX3 analysiert.

3.1.2.1 „Knockdown“ von PEX19 mit shRNA

Ein wiederholter „knockdown“ von PEX19 über mehrere Tage wurde bereits mit siRNA in der Arbeitsgruppe Dodt durchgeführt [224] und bewirkte teilweise eine Abnahme der Peroxisomenanzahl pro Zelle und vereinzelt auch Peroxisomen-defiziente Zellen. Allerdings war die Prozedur der wiederholten siRNA-Transfektion extrem schädigend für die verwendeten Zellen und der peroxisomale Phänotyp konnte nur über 9 Tage verfolgt werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit shRNA zum „knockdown“ von PEX19 verwendet werden mit dem Ziel einen schonenderen und zusätzlich längerfristigen „knockdown“ von PEX19 zu erreichen. Dadurch sollte eine Zelllinie mit einem ausgeprägteren peroxisomalen Phänotyp hergestellt werden, die eventuell sogar komplett Peroxisomen-defizient ist. Bei Verwendung eines induzierbaren Vektors könnte mit dieser Zelllinie eine kontrolliertere Untersuchung der peroxisomalen Biogenese erfolgen als mit Peroxisomen-defizienten Patientenzelllinien.

Im Rahmen einer Diplomarbeit [215] wurde bereits versucht eine Zelllinie mit stabil integriertem und induzierbarem Vektor für den „knockdown“ von PEX19 mit drei verschiedenen shRNA-Sequenzen herzustellen. Die Induktion des Vektors mit Doxycyclin zeigte sich durch Expression von EGFP als erfolgreich. Allerdings konnte mit maximal 60% „knockdown“ keine ausreichende Reduzierung der PEX19 Proteinmenge erreicht werden, um einen peroxisomalen Phänotyp zu beobachten.

Daher sollte hier zunächst untersucht werden, ob die verwendeten shRNA-Sequenzen einen ausreichenden „knockdown“ von PEX19 mit peroxisomalem Phänotyp erzielen können. Der in der Diplomarbeit verwendete Vektor pLVTHM war sehr groß und kompliziert aufgebaut. Daher wurden die Sequenzen, die für die Expression der drei verschiedenen shRNAs kodierten (siehe Kapitel 2.2.6), einschließlich des H1-Promotors (pAD 104, 105, 106), in einen kleineren, nicht-induzierbaren Vektor kloniert, der die Sequenz für eine Puromycinresistenz enthielt (psuper puro).

Die so hergestellten Plasmide (pDD01, pDD02, pDD03, siehe Anhang 8.1) wurden dann in verschiedenen Ansätzen transient in HELA-Zellen und transformierte humane Hautfibroblasten (GM5756T) mit PTS2-YFP kotransfiziert und die Zellen mittels Puromycin selektiert (siehe Kapitel 2.4.1). Zwei Wochen nach Transfektion war die Selektion abgeschlossen und die Zellen wurden hinsichtlich des PEX19-Proteingehalts überprüft. Abbildung 3.10 zeigt die Quantifizierung der PEX19-Bandenintensität eines Western Blots bezogen auf die mit Leervektor transfizierten Zellen.

In drei Zelllinien (Abbildung 3.10, A: HELA-1, B: GM5756T-1, C: GM5756T-2) konnte mit dem Plasmid pDD02 eine Reduzierung der Proteinmenge an PEX19 um 67%, 44% und 96% erreicht werden. Die beiden anderen Konstrukte erzielten nur in den Zelllinien GM5756T-2 (Abbildung 3.10C) einen moderaten „knockdown“ von 59% und 64%. Bei Reduzierung von Proteinen mittels RNAi wird ein „knockdown“ um etwa 80% als notwendig angesehen um die Auswirkungen und die Rolle dieses Proteins in einem resultierenden Phänotyp zu analysieren. Folglich konnte nur eine Zelllinie mit ausreichender Reduzierung an PEX19 durch Expression von shRNA hergestellt werden (Abbildung 3.10C, GM5756T-2+pDD02).

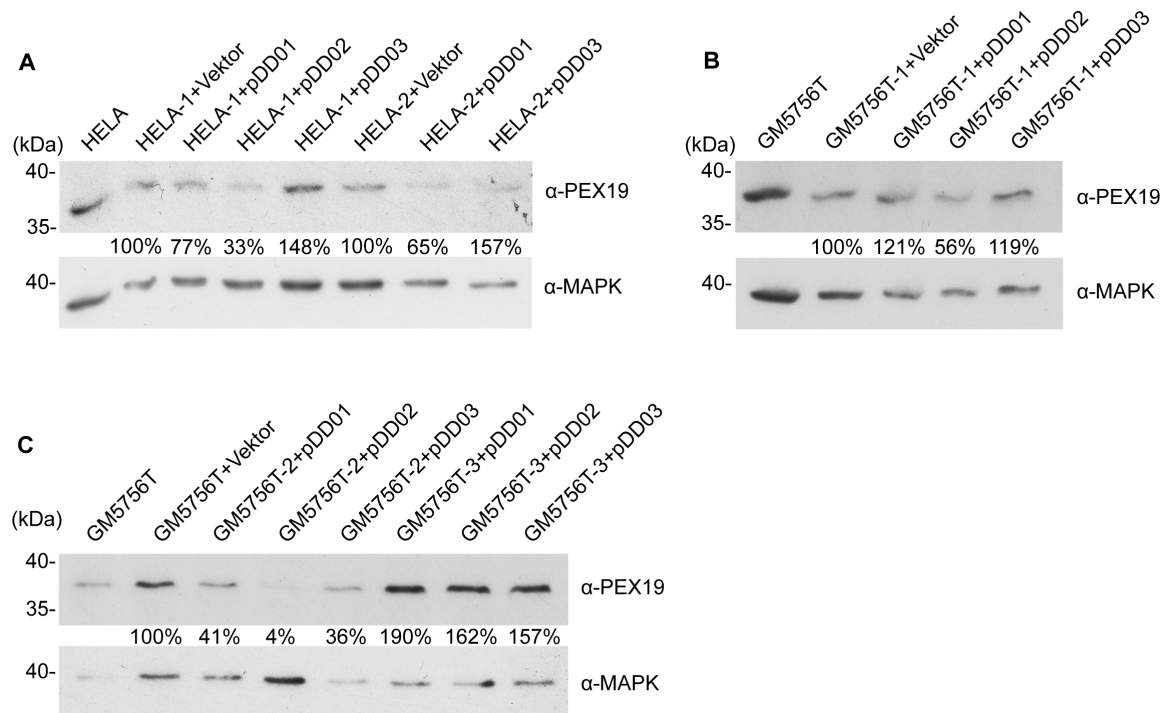


Abbildung 3.10: Proteinmenge an PEX19 nach Transfektion der „shPEX19-Vektoren“

Verschiedene Ansätze von HELA Zellen (HELA-1 und HELA-2) und von immortalisierten humanen Hautfibroblasten (GM5756T-1 bis -3) einer 25 cm² Zellkulturflasche wurden mit 4 µg Plasmid zur Expression von shRNA gegen PEX19 (pDD01, pDD02, pDD03, Plasmidkarten siehe Anhang 8.1) transient transfiziert und 2-3 Tage nach der Transfektion mit Puromycin selektiert (siehe Kapitel 2.4.1). Zur Transfektionskontrolle wurde jeweils 1 µg PTS2-YFP kotransfiziert. 2 Wochen nach der Transfektion wurden die Zellen abgeerntet und jeweils 20 µg Protein in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Nach Blotting auf eine PVDF Membran wurden PEX19 und MAPK (mitogen-activated protein kinase) als Ladekontrolle mit spezifischen Erstantikörpern (Verdünnung 1:10000 bzw. 1:1000) und HRP-markierten Zweitantikörpern (Verdünnung 1:15000) detektiert. Die Intensität der PEX19 Banden in Bezug auf die jeweilige Kontrolle mit Leervektor wurde mit Hilfe der AIDA Software (Image Analyzer v.4.19) nach Normalisierung mit MAPK quantifiziert (Werte unterhalb der jeweiligen PEX19-Bande).

Durch Kotransfektion der Plasmide mit PTS2-YFP und Markierung der Peroxisomen mit spezifischen Erstantikörpern gegen PEX14 und Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern konnten die Auswirkungen des PEX19 „knockdowns“ auf die Morphologie und Anzahl der Peroxisomen untersucht werden. Selbst die Zelllinie mit 96% Reduktion an PEX19-Protein (GM5756T-2+pDD02) zeigte nur eine geringe Ausprägung eines peroxisomalen Phänotyps. Es waren teilweise Zellen mit verringerter Anzahl an Peroxisomen zu sehen. Alle anderen Zelllinien wiesen keine peroxisomalen Veränderungen auf.

Auch der bereits von Fang et al. durchgeführte „knockdown“ von PEX3 mit siRNA in humanen Fibroblasten (GM5756) resultierte 2 Tage nach der siRNA Behandlung nicht in Peroxisomen-defizienten Zellen. Trotz fehlender Peroxisomenlokalisation des PMP-Rezeptors PEX19 und Importdefekt der Membranproteine der Klasse I nach Reduzierung der PEX3 Proteinmenge um 90% waren noch peroxisomale Strukturen vorhanden, die Membran- und Matrixproteine enthielten [59].

Aufgrund des geringen Erfolges hinsichtlich des „knockdowns“ der PEX19-Proteinmenge und des peroxisomalen Phänotyps nach Expression von shRNA wurden die folgenden „knockdown“ Experimente mit siRNA durchgeführt.

3.1.2.2 PEX3 Import nach „knockdown“ von PEX19 mit siRNA

PEX3 wurde zuvor als peroxisomales Membranprotein der Klasse II beschrieben, dessen Import in die peroxisomale Membran unabhängig von PEX19 erfolgt [60]. Das kürzlich postulierte Modell von Matsuzaki et al., das von einem PEX19- und PEX16-abhängigen Import von PEX3 ausgeht, gibt Anlass diese Fragestellung erneut zu bearbeiten [65].

Um die Rolle des PMP-Rezeptors PEX19 beim Import von PEX3 in die peroxisomale Membran zu untersuchen, wurden transformierte humane Hautfibroblasten (GM5756T) zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA gegen PEX19 (Sequenz siehe Kapitel 2.4.6 und [60]) bzw. Kontroll-siRNA elektroporiert. Der „knockdown“ wurde auf Proteinebene 48 Stunden nach der zweiten Elektroporation mittels Immunoblotting gegen PEX19 überprüft. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch die Reduktion der PEX19-Proteinmenge um 83% nach siRNA-Behandlung verglichen mit den Kontrollzellen. Gleichzeitig wurde eine Reduktion an PEX3 in Zellen mit PEX19 „knockdown“ und in Δ PEX19-Zellen beobachtet. Dies spricht dafür, dass PEX19 nicht nur auf Klasse I PMPs [60] sondern, wie bereits *in vivo* beobachtet [65], auch auf PEX3 eine stabilisierende Wirkung als Chaperon ausübt. Diese Tatsache konnte in der Arbeitsgruppe Dodt bestätigt werden. Isothermische Titrationskalorimetrie mit dem cytosolischen Teil von PEX3 (PEX3⁴¹⁻³⁷³) zeigte eine erhöhte Stabilität für diese PEX3-Mutante *in vitro* nach Bindung an PEX19. Zudem

fürten Mutationen in der PEX19-Bindedomäne des kompletten PEX3 zu reduzierter PEX3 Expression *in vivo* [240].

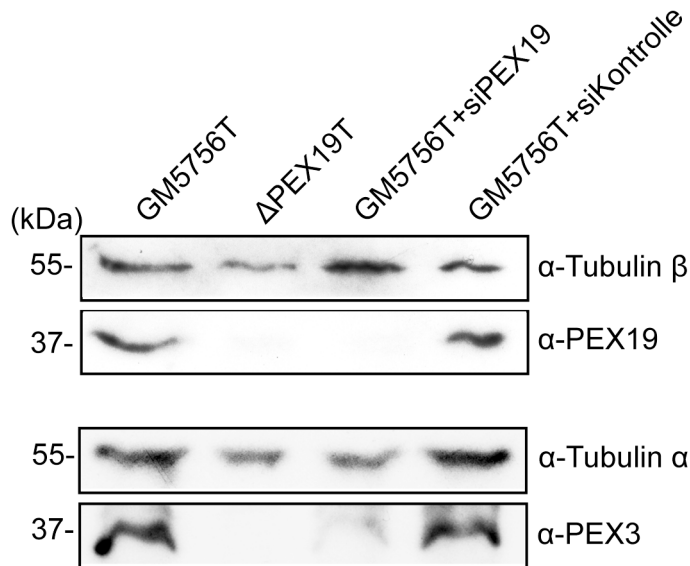


Abbildung 3.11: Reduktion an PEX19- und PEX3-Protein nach „knockdown“ von PEX19

Humane transformierte Hautfibroblasten (GM5756T) wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA gegen PEX19 oder Kontroll-siRNA elektroporiert. Zur Überprüfung des „knockdowns“ auf Proteinebene wurden die Zellen 48 Stunden nach der zweiten siRNA-Behandlung abgeerntet und jeweils 20 µg Protein in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Nach Blotting auf eine PVDF-Membran wurden PEX3 und PEX19 bzw. Tubulin α und Tubulin β als Ladekontrolle mit Hilfe von spezifischen Erstantikörpern und HRP-markierten Zweitantikörpern (Verdünnungen siehe Kapitel 2.3.2) detektiert. Quantifizierung der Bandenintensität mit Hilfe der AIDA Software (Image Analyzer v.4.19) nach Normalisierung mit Tubulin β zeigte eine Reduzierung der Proteinmenge an PEX19 um 83% nach „knockdown“ von PEX19 bei gleichzeitiger Abnahme an PEX3 im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden.

Nach erfolgreichem „knockdown“ von PEX19 wurden die Zellen 24 Stunden nach der zweiten Elektroporation transient mit Plasmiden transfiziert, die für die Expression von myc-getagtem PEX3 oder PMP70 kodierten. So sollte der Einfluss der reduzierten PEX19-Menge auf den Import neu synthetisierter Membranproteine untersucht werden. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde in beiden Fällen YFP-PTS1 kotransfiziert und die Zellen 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach der Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert.

Beide peroxisomalen Membranproteine PMP70-myc und PEX3-myc wurden in den Kontrollzellen erfolgreich in die Peroxisomen importiert, was durch eine Kolokalisation mit dem Peroxisomenmarker YFP-PTS1 nachgewiesen wurde (Abbildung 3.12). Auch der „knockdown“ von PEX19 änderte die Lokalisation dieser

Proteine nicht. Daher wurden die Zellen mit exprimiertem PEX3-myc bzw. PMP70-myc quantifiziert und diese Raten mit den Expressionsraten für YFP-PTS1 normalisiert. Entsprechend der beschriebenen Rolle von PEX19 als Importrezeptor für peroxisomale Membranproteine (Kapitel 1.2.2) bewirkte die Reduzierung der PEX19-Proteinmenge zu allen drei Zeitpunkten nach der Plasmidtransfektion einen Importdefekt für PMP70-myc in die peroxisomale Membran. Es wurde 1,5 mal weniger PMP70-myc in PEX19 „knockdown“-Zellen detektiert als in den Kontrollzellen (Abbildung 3.12), was auf einen Abbau des PMP70-myc im Cytosol aufgrund des gestörten Imports zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigte der „knockdown“ von PEX19 zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf den Import von PEX3-myc. PEX3-myc wurde sowohl in den „knockdown“-Zellen als auch in den Kontrollzellen in gleichem Maße exprimiert und in die peroxisomale Membran importiert.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Jones et al. [60] bei Verwendung der gleichen siRNA Sequenz und der gleichen Zelllinie überein. Diese Arbeitsgruppe beschreibt zwar nach „knockdown“ von PEX19 mit siRNA eine vierfache Reduktion des Imports von PMP34-myc in die peroxisomale Membran, konnte aber keinen Importdefekt für die verkürzte Form PEX3-mPTS (PEX3aa1-50) detektieren. Dieses Modell wird zusätzlich von der Tatsache gestützt, dass verschiedene PEX3-Varianten mit Mutationen in der PEX19-Binderegion erfolgreich in die peroxisomale Membran importiert wurden [240]. Somit konnte hier im Gegensatz zu der postulierten These von Matsuzaki et al. ein PEX19-unabhängiger peroxisomaler Import von PEX3 gezeigt werden [65].

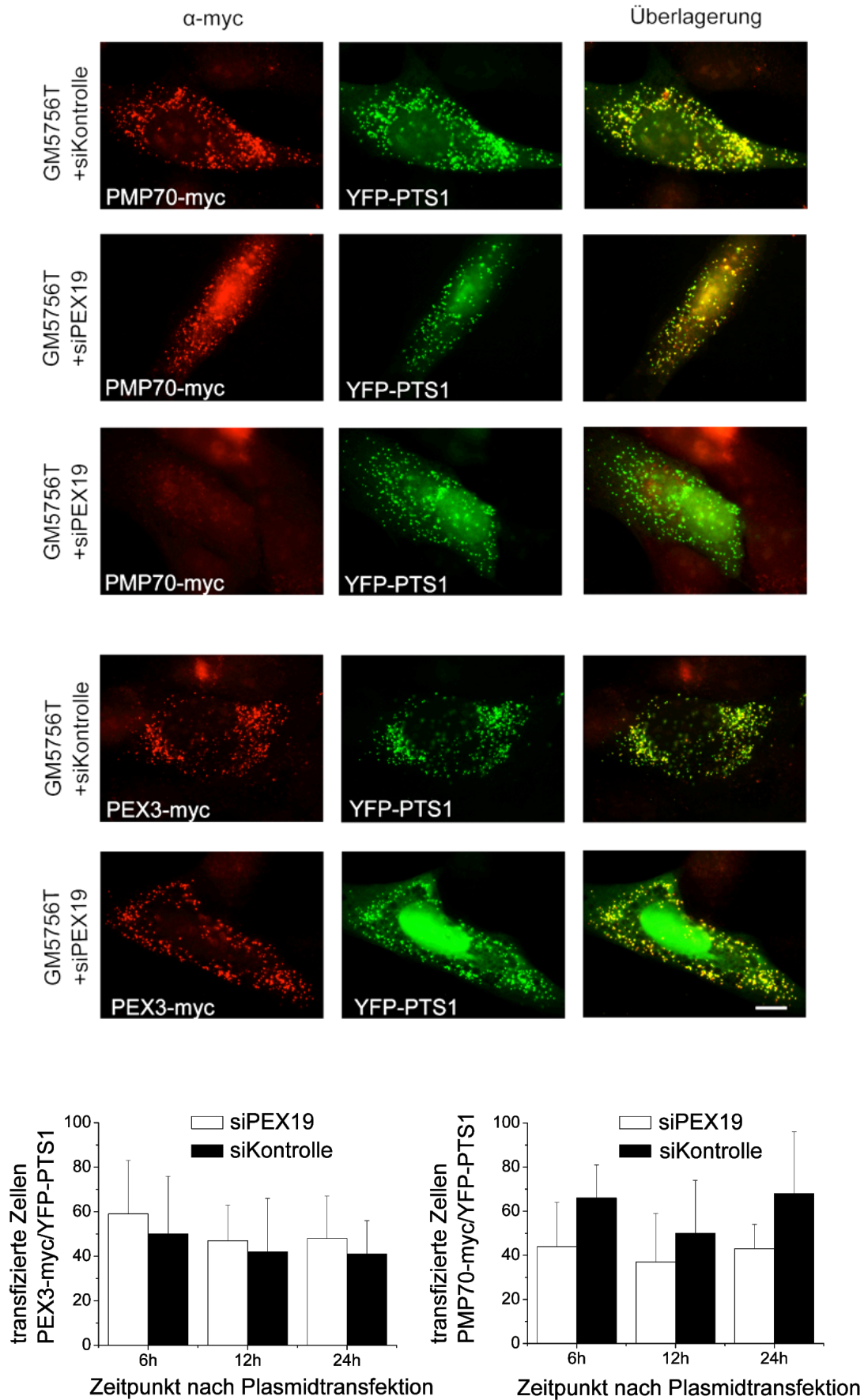


Abbildung 3.12: PEX19 unabhängiger Import von neu synthetisiertem PEX3

Mit siPEX19 bzw. Kontroll-siRNA behandelte transformierte humane Hautfibroblasten (GM5756T) wurden 24 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ mit Plasmiden, die für die Expression von PMP70-myc oder PEX3-myc kodierten, transient transfiziert. In beiden Fällen wurde zur Normalisierung der Transfektionsraten YFP-PTS1 kotransfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach der Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert durch Markierung mit spezifischen Erstantikörpern gegen myc und mit Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern. PMP70-myc und PEX3-myc waren sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Zellen mit PEX19 „knockdown“ ausschließlich peroxisomal lokalisiert, was durch Kolo-kalisation mit YFP-PTS1 nachgewiesen wurde. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen (N=3) der Transfektionsraten von PEX3-myc und PMP70-myc, die jeweils mit den Transfektionsraten von YFP-PTS1 normalisiert wurden. Der peroxisomale Import von PMP70-myc wurde durch „knockdown“ von PEX19 um den Faktor 1,5 reduziert, wohingegen der PEX19 „knockdown“ keinen Einfluss auf den PEX3-myc Import ausübte. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen ausgezählt. Die Größenmarkierung entspricht 10 µm.

3.1.2.3 PEX3 Import nach „knockdown“ von PEX16 mit siRNA

PEX16 wurde als peroxisomales Membranprotein der Klasse I beschrieben, das abhängig von PEX19 und PEX3 in die Membran importiert wird [53, 54]. PEX16-defiziente Zellen enthalten keine detektierbaren peroxisomalen Strukturen, können aber durch die Transfektion mit dem entsprechenden Gen wieder vollständig komplementiert werden [21], was eine essentielle Rolle von PEX16 in der Biogenese darlegt. Ob PEX16 zusätzlich eine Rolle beim Import peroxisomaler Membranproteine zukommt ist nicht geklärt. Bei Matsuzaki et al. störte der „knockdown“ von PEX16 mit siRNA den Import von PEX11 α , einem weiteren peroxisomalen Membranprotein, nicht. Allerdings führte die reduzierte PEX16-Menge zu einem Importdefekt von PEX3-myc, der sich in der Mislokalisierung von PEX3-myc an den Mitochondrien äußerte [65].

Aufgrund der abweichende Ergebnisse dieser Gruppe von den eigenen Ergebnissen beim „knockdown“ von PEX19 (siehe Kapitel 3.1.2.2) wurde überprüft, ob der Import von PEX3 bzw. PMP70, einem Membranprotein der Klasse I, in humanen transformierten Hautfibroblasten (GM5756T) ebenfalls unabhängig von PEX16 ist.

Dafür wurden humane Hautfibroblasten (GM5756T) zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA gegen PEX16 bzw. mit Kontroll-siRNA elektroporiert. Der „knockdown“ auf RNA-Ebene wurde nach RNA Extraktion und cDNA-Synthese mittels quantitativer real-time PCR 24 Stunden nach der zweiten Elektroporation überprüft. Die Reduktion der PEX16-Proteinmenge wurde 48 Stunden nach der zweiten siRNA-Behandlung mittels Western Blotting gezeigt. In Abbildung 3.13 ist

exemplarisch der „knockdown“ der PEX16-Proteinmenge um 89% nach Behandlung mit siRNA gegen PEX16 verglichen mit den Kontrollzellen dargestellt. Die Menge an PEX16 mRNA konnte in vier Versuchen durchschnittlich um $84,31 \pm 7,27\%$ reduziert werden.

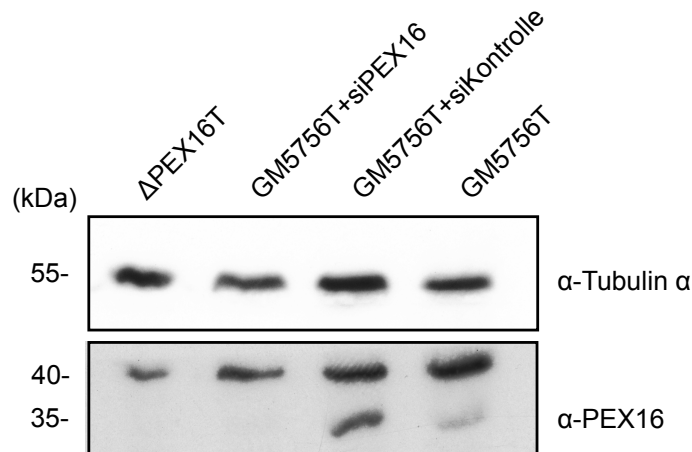


Abbildung 3.13: Reduktion der PEX16-Proteinmenge nach „knockdown“ von PEX16

Mit siPEX16 bzw. Kontroll-siRNA behandelte transformierte humane Hautfibroblasten (GM5756T) wurden 48 Stunden nach der zweiten Elektroporation pelletiert. Gleiche Mengen an Protein (20 μ g) wurden mittels SDS-PAGE in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach Semidry-Blotting auf eine PVDF Membran wurden PEX16 und Tubulin α als Ladekontrolle mit spezifischen Erstantikörpern (Verdünnungen 1:1000 bzw. 1:2000) und HRP-markierten Zweitantikörpern (Verdünnung 1:15000) detektiert. Der abgebildete repräsentative Western Blot zeigt einen „knockdown“ der PEX16 Proteinmenge um 89% nach Behandlung mit siRNA gegen PEX16 verglichen mit den Kontrollzellen, die mit Kontroll-siRNA elektroporiert wurden. Die Intensität der PEX16 Banden wurde mit Hilfe der AIDA Software (Image Analyzer v.4.19) nach Normalisierung mit Tubulin α quantifiziert.

Nach erfolgreichem „knockdown“ von PEX16 wurden die Zellen 16 Stunden nach der zweiten Elektroporation mit Plasmiden transfiziert, die für die Expression von myc-markiertem PMP70 bzw. PEX3 kodierten. Zur Normalisierung der Transfektionsraten wurde in beiden Fällen YFP-PTS1 kotransfiziert und die Zellen 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden später für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert.

Beide Membranproteine waren sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Zellen mit reduzierter PEX16 Proteinmenge ausschließlich an den Peroxisomen zu sehen und in keine anderen Organellen mislokalisiert, was in Abbildung 3.14 durch Überlagerung mit dem Peroxisomenmarker YFP-PTS1 dargestellt ist. Daher wurden die Zellen mit exprimiertem PEX3-myc bzw. PMP70-myc quantifiziert und die Raten mit den Expressionsraten für YFP-PTS1 normalisiert.

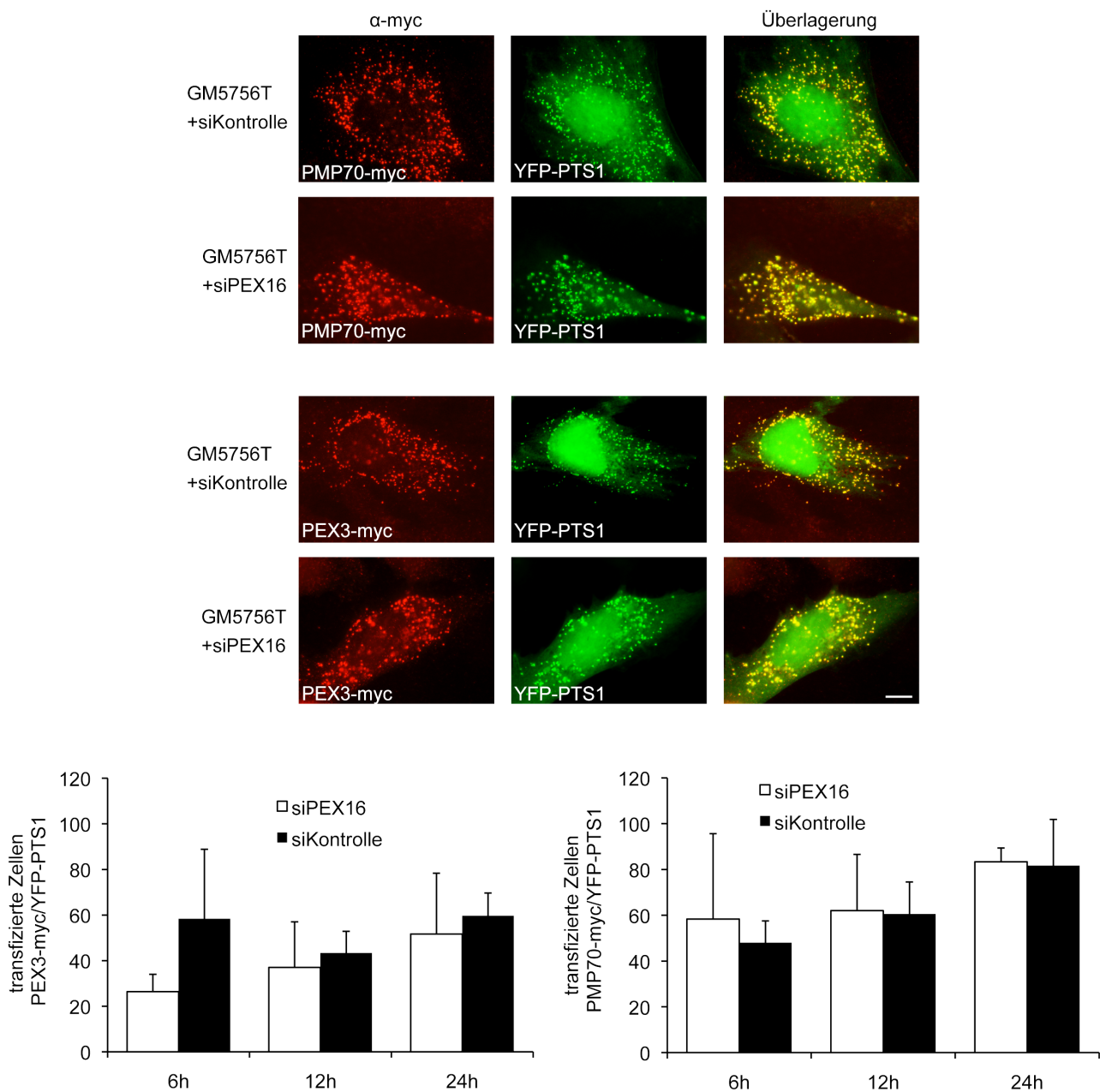


Abbildung 3.14: Import von PEX3-myc und PMP70-myc in Abhängigkeit von PEX16

Nach „knockdown“ von PEX16 wurden transformierte humane Hautfibroblasten (GM5756T) 16 Stunden nach der zweiten siRNA-Behandlung mit Plasmiden, die für die Expression von PMP70-myc oder PEX3-myc kodierten, transient transfiziert. In beiden Fällen wurde YFP-PTS1 kotransfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach der Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert und mit Erstantikörpern gegen myc und Fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern behandelt. PEX3-myc und PMP70-myc waren ausschließlich peroxisomal lokalisiert, was hier durch Überlagerung mit YFP-PTS1 gezeigt ist. Die mit den Transfektionsraten von YFP-PTS1 normalisierten Transfektionsraten von PMP70-myc und PEX3-myc zeigten, dass der „knockdown“ von PEX16 keinen Einfluss auf den peroxisomalen Import von PMP70-myc hatte. Der Import von PEX3-myc war nur in den frühen Phasen nach der Plasmidtransfektion durch PEX16 „knockdown“ beeinflusst. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen bei N=3 dar. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen ausgezählt. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Die Grafiken in Abbildung 3.14 zeigen, dass der „knockdown“ von PEX16 keinen Einfluss auf den Import von neu synthetisiertem PMP70-myc hatte. Das Membranprotein wurde sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Zellen mit reduziertem PEX16 in gleichem Maße exprimiert. Im Falle von PEX3-myc konnte ein Importdefekt sechs Stunden nach der Plasmidtransfektion festgestellt werden, der aber über den Zeitraum von 12 und 24 Stunden nach der Transfektion wieder ausgeglichen wurde. In der frühen Phase nach der Plasmidtransfektion wurde in den PEX16 „knockdown“-Zellen nur halb so viel PEX3-myc im Vergleich zu Kontrollzellen importiert, was für eine Rolle von PEX16 beim Import von PEX3-myc bei endogenen Mengen an PEX3 in der peroxisomalen Membran spricht.

Daher lässt sich vermuten, dass PEX16 beim peroxisomalen Import geringer Mengen an PEX3 durchaus eine Rolle spielt, dieser Effekt aber über die Zeit (12 und 24 Stunden nach Transfektion) durch hohe exprimierte Mengen an PEX3 ausgeglichen werden kann und dann PEX3 nach Sättigung des Importweges über endogenes PEX16 auch unabhängig von PEX16 in die peroxisomale Membran inseriert. Da es sich hier nur um eine Reduzierung an PEX16 und keinen vollständigen „knockout“ handelt, lässt sich allerdings nicht vollständig ausschließen, dass die geringe verbleibende Proteinmenge an PEX16 das PEX3 in der Membran trotzdem langsam über die Zeit erhöht, so dass der Effekt des PEX16 „knockdowns“ nur in den frühen Phasen zu erkennen war.

Es konnte hier dargelegt werden, dass ein längerfristiger „knockdown“ von PEX19 durch shRNA zu einem eher moderaten Phänotyp und nicht zur Peroxisomendefizienz führte (Kapitel 3.1.2.1). Der „knockdown“ von PEX19 mittels siRNA in humanen Fibroblasten resultierte bei einem beobachteten Importdefekt für PMP70-myc nicht in einer Abnahme des peroxisomalen Imports von neu synthetisiertem PEX3-myc (Kapitel 3.1.2.2). Auch die Reduktion der PEX16 Proteinmenge durch Behandlung mit siRNA zeigte nur in den frühen Phasen nach der Plasmidtransfektion einen Einfluss auf den PEX3-Import in die peroxisomale Membran (Kapitel 3.1.2.3).

3.2 Bewegung von Peroxisomen

Die Bindung von Organellen an Mikrotubuli ist essentiell für deren Verteilung innerhalb der Zelle, für deren Beweglichkeit und für die Aufrechterhaltung ihrer Form. Im Gegensatz zu anderen zellulären Organellen wie dem Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Reticulum sind Peroxisomen gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt. Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wurde bereits *in vitro* [177] als auch elektronenmikroskopisch *in vivo* [175] gezeigt.

Durch Lebendzellbeobachtungen nach spezifischer Markierung der Peroxisomen konnte die peroxisomale Dynamik charakterisiert werden. Der Großteil der Peroxisomen ist relativ statisch und übt nur sehr kurze vibrationsartige Bewegungen aus, die von der Brown'schen Molekularbewegung herrühren. Ein geringer Anteil der Peroxisomen führt allerdings schnelle, lange und gerichtete Bewegungen entlang von Mikrotubuli aus, die sowohl unidirektional als auch bidirektionaler Natur sein können [175, 176]. Diese langen Bewegungen sind ATP-abhängig und Dynein und Kinesin-1 (Kif5) wurden als verantwortliche Motorproteine beschrieben [124-127].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Bewegung von Peroxisomen in normalen menschlichen Fibroblasten und die Dynamik von präperoxisomalen Vesikeln nach Transfektion PEX16-defizienter humaner Fibroblasten mit PEX16 mittels Lebendzellbetrachtung *in vivo* charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss des C-terminalen Kinesins KifC3, dessen Rolle in der peroxisomale Bewegung bisher noch nicht beschrieben wurde, und des N-terminalen Kinesin-1 (Kif5) auf die Positionierung und Bewegung von Peroxisomen untersucht. Zuletzt wurde nach Interaktionen von KifC3 mit peroxisomalen Proteinen und möglichen Bindungspartner von KifC3 an Peroxisomen gesucht.

3.2.1 Lebendzellbeobachtung nach Markierung von Peroxisomen

Um die Bewegung von Peroxisomen *in vivo* in Echtzeit zu verfolgen, wurden zunächst COS7 Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für die Expression von PEX16-YFP kodierte. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops lebend beobachtet und Zeitreihen aufgenommen (siehe auch Anhang 8.2.3). Durch Verwendung der Tracking-Software (AxioVision 4.8.2) von Zeiss konnten anschließend einzelne Peroxisomen markiert und deren Bewegung über die Zeit verfolgt werden. Dabei wurden die Bewegungsbahnen der markierten Peroxisomen aufgezeichnet, wie in Abbildung 3.15 durch eine Linie dargestellt.

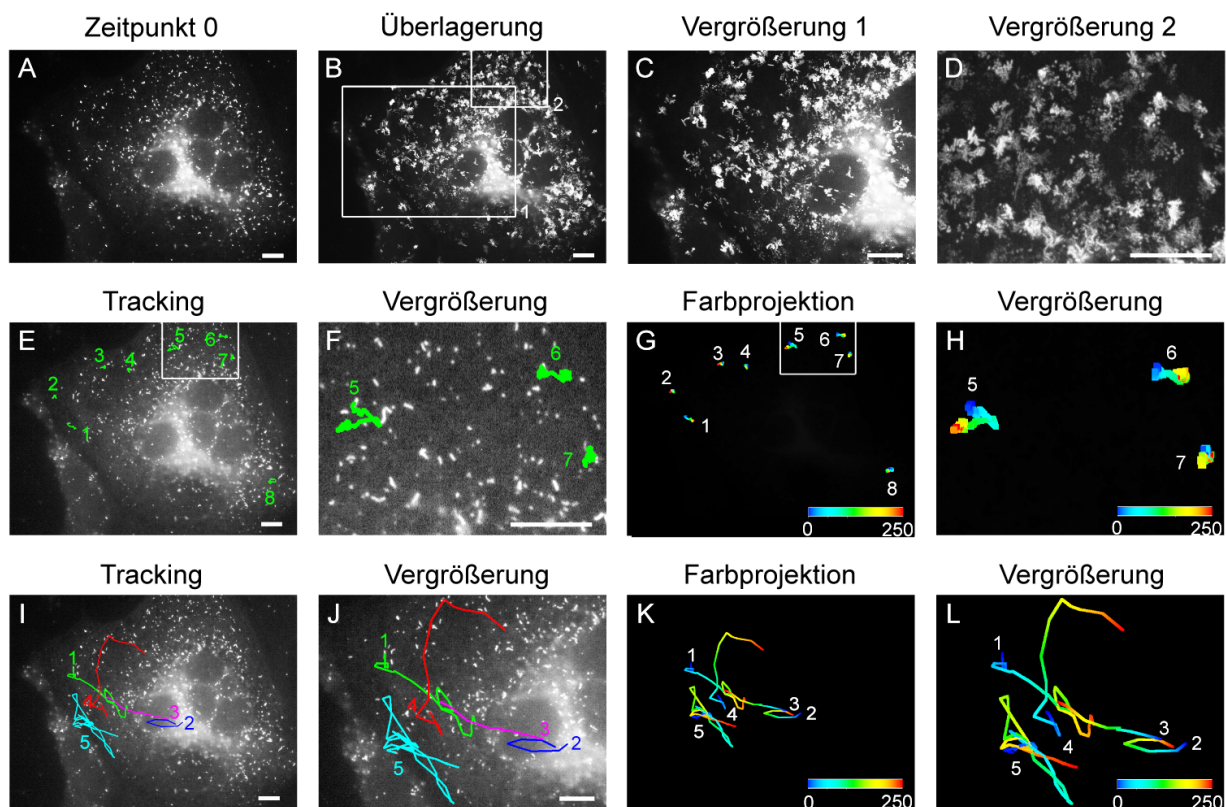


Abbildung 3.15: Aufnahme der peroxisomalen Bewegungsbahn in COS7 Zellen

Die Bewegung von Peroxisomen in COS7 Zellen wurde 24 Stunden nach transienter Transfektion mit PEX16-YFP durch die Eigenfluoreszenz des YFP in Echtzeit verfolgt. Im Abstand von 4,2 Sekunden wurden 60 Bilder über 250 Sekunden aufgenommen. Es ist die Zelle zum Zeitpunkt 0 dargestellt (A) sowie die Überlagerung aller Bilder der Zeitreihe (B) und zwei vergrößerte Ausschnitte der Überlagerung (C und D). Die Bewegung von acht (E-H) bzw. fünf (I-L) verschiedenen Peroxisomen wurde aufgenommen. In der Farbprojektion sind die unterschiedlichen Wege in Abhängigkeit der Zeit von 0 (blau) bis 250 Sekunden (rot) dargestellt (G, H, K, L). Der Großteil der Peroxisomen bewegte sich in einem kleinen Radius mit sehr kurzen schnellen Bewegungen in variierende Richtungen (E-H), wohingegen ein kleiner Teil sich gerichtet über eine längere Distanz hinweg fortbewegte (I-L). Im Anhang 8.2.3 ist die entsprechende Zeitreihe dargestellt. Die Mikroskopeinstellungen wurden wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben übernommen. Die Größenmarkierung entspricht 10 µm.

In normalen COS7 Zellen übte der Großteil der Peroxisomen kurze vibrationsartige Bewegungen in unterschiedliche Richtungen aus (Abbildung 3.15, E-H), die in der Überlagerung aller Bilder der Zeitreihe (Abbildung 3.15 B und Vergrößerung in D) als kleine „Wolken“ zu sehen waren. Der gesamte zurück gelegte Weg der acht markierten Peroxisomen in Abbildung 3.15 E-H variierte von 8 bis 27 μm und die Strecke zwischen Start- und Endpunkt des aufgezeichneten Weges betrug im Mittel 1,9 μm bei mittleren Geschwindigkeiten von 0,04 bis 0,12 $\mu\text{m/s}$ und maximalen Geschwindigkeiten bis 0,68 $\mu\text{m/s}$ (siehe Tabelle 3.1). Diese Art der peroxisomalen Bewegung kommt durch die Brown'sche Molekularbewegung zustande und ist unabhängig von Motorproteinen [175, 176].

Tabelle 3.1: Charakterisierung der ungerichteten peroxisomalen Bewegung in COS7 Zellen

Die in Abbildung 3.15 (E-H) dargestellten ungerichteten Bewegungen von Peroxisomen in COS7 Zellen wurden hinsichtlich des zurück gelegten Weges (Track), der Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Bewegungsbahn, der mittleren Geschwindigkeit über den beobachteten Zeitraum und der Maximalgeschwindigkeit mit Hilfe der Tracking Software (AxioVision 4.8.2) von Zeiss charakterisiert.

Track	zurück gelegter Weg (μm)	Strecke von Start zu Ende (μm)	Mittlere Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Maximale Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
1	9	4	0,04	0,09
2	8	0	0,04	0,07
3	9	2	0,04	0,17
4	18	1	0,08	0,17
5	27	4	0,12	0,68
6	23	2	0,10	0,45
7	19	0	0,08	0,23
8	22	2	0,10	0,27

Zusätzlich zeigten sich aber schon in der Überlagerung der Zeitreihen (Abbildung 3.15, B und C) lange gerichtete Bewegungen eines kleinen Teils der Peroxisomen in derselben Zelle. Die Aufzeichnung der Bewegungsbahnen dieser Peroxisomen (I-L) verdeutlichte den Unterschied zur ersten Population: Die zurückgelegten Wege waren mit 34-154 μm etwa viermal so lang bei zehnmal höheren mittleren Geschwindigkeiten von 0,33-0,91 $\mu\text{m/s}$ und maximalen Geschwindigkeiten bis zu 2,57 $\mu\text{m/s}$ (Tabelle 3.2). Zudem zeichnete sich diese Art der Bewegung durch geringe Richtungswechsel aus, was in einer großen zurück gelegten Strecke über die Zeit resultierte und sich in einem großen Abstand zwischen Start- und Endpunkt der Bewegungsbahn äußerte (Tabelle 3.2). Dies spricht für eine gerichtete

Bewegung der Peroxisomen ausgelöst durch den Transport entlang von Mikrotubuli mit Hilfe von Motorproteinen. Die bisher für die peroxisomale Bewegung beschriebenen Motorproteine sind Kinesin-1 (Kif5) und Dynein [124-127].

Tabelle 3.2: Charakterisierung der gerichteten peroxisomalen Bewegung in COS7 Zellen

Die in Abbildung 3.15 (I-L) dargestellten langen, gerichteten Bewegungen von Peroxisomen in COS7 Zellen wurden hinsichtlich des zurück gelegten Gesamtweges (Track), der Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Bewegungsbahn, der mittleren Geschwindigkeit über den beobachteten Zeitraum und der Maximalgeschwindigkeit mit Hilfe der Tracking Software (AxioVision 4.8.2) von Zeiss charakterisiert.

Track	zurück gelegter Weg (μm)	Strecke von Start zu Ende (μm)	Mittlere Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Maximale Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
1	75	33	0,33	1,34
2	33	4	0,88	1,92
3	34	31	0,91	1,60
4	74	32	0,85	2,57
5	154	19	0,67	2,13

Nachdem die Bewegung von Peroxisomen in normalen Zellen charakterisiert worden war, sollte diese mit der Bewegung präperoxisomaler Vesikel nach Transfektion von PEX16-defizienten humanen Fibroblasten mit PEX16-YFP verglichen werden. Nachdem 16 Stunden nach Transfektion die ersten präperoxisomalen Vesikel sichtbar waren (Abbildung 3.16, A und B), wurden Zeitreihen einzelner Zellen aufgenommen (siehe Anhang 8.2.4). Die Überlagerung aller Bilder der Zeitreihe (Abbildung 3.16 C und D) zeigte wie in Abbildung 3.15 B und D ausschließlich die „wolkenartigen“ Strukturen, die durch vibrationsartigen Bewegungen der präperoxisomalen Vesikel zustande kamen. Es wurden keine langen gerichteten peroxisomalen Bewegungen gefunden. Beispielhaft wurden die Bewegungsbahnen fünf verschiedener Präperoxisomen aufgezeichnet (Abbildung 3.16 E-H), die denen der Peroxisomen ausgelöst durch die Brownsche Molekularbewegung (Abbildung 3.15 E-H) glich.

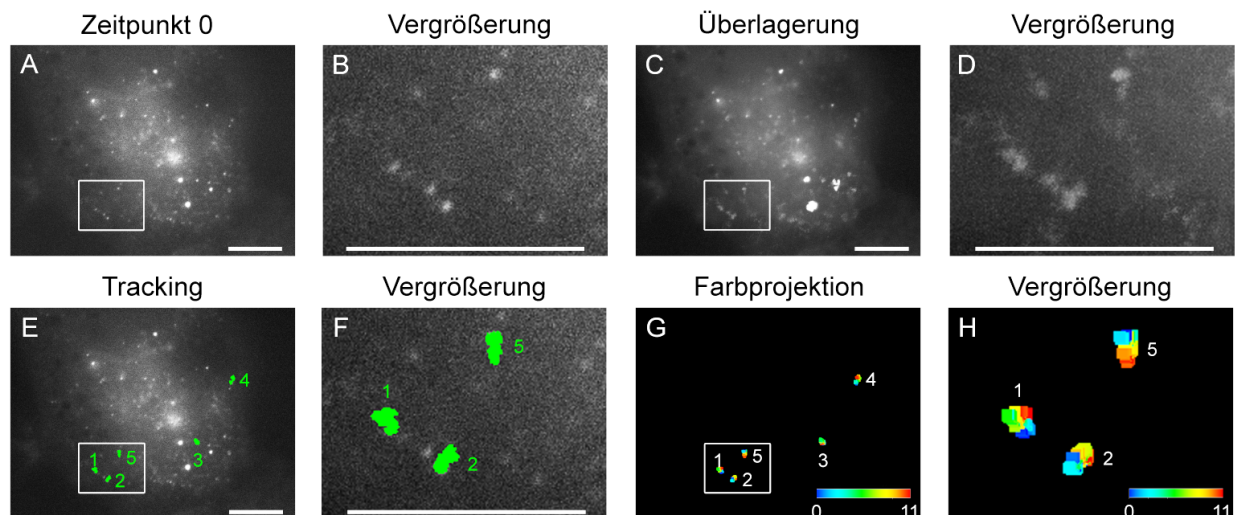


Abbildung 3.16: Aufnahme der Bewegungsbahn von präperoxisomalen Strukturen

PEX16-defiziente humane Fibroblasten wurden transient mit PEX16-YFP transfiziert und 16 Stunden später die Bewegung der präperoxisomalen Strukturen durch die Fluoreszenz des YFP in Echtzeit verfolgt. Im Abstand von 140 ms wurden 80 Bilder über 11 Sekunden aufgenommen. Es ist die erfolgreiche Bildung präperoxisomaler Strukturen zum Zeitpunkt 0 (A) und ein vergrößerter Ausschnitt (B) sowie die Überlagerung aller 80 Bilder der Zeitreihe (C) und derselbe vergrößerte Ausschnitt (D) gezeigt. Fünf verschiedene Präperoxisomen wurden verfolgt und deren Bewegung aufgenommen (E, F). Die Farbprojektion (G, H) reflektiert die unterschiedlichen Wege in Abhängigkeit der Zeit von 0 (blau) bis 11 (rot) Sekunden. Die verfolgten Präperoxisomen bewegten sich auf die für die Brownsche Molekularbewegung typische Weise in einem kleinen Radius in variierende Richtungen. Die entsprechende Zeitreihe ist im Anhang 8.2.4 dargestellt. Die Mikroskopeinstellungen wurden wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben übernommen. Die Größenmarkierung entspricht 10 μm .

Tabelle 3.3: Charakterisierung der Bewegung von Präperoxisomen

Die in Abbildung 3.16 (E-H) dargestellten ungerichteten Bewegungen von Präperoxisomen nach Transfektion von ΔPEX16 Zellen mit PEX16-YFP wurden hinsichtlich des zurück gelegten Gesamtweges (Track), der Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Bewegungsbahn, der mittleren Geschwindigkeit über den beobachteten Zeitraum und der Maximalgeschwindigkeit mit Hilfe der Tracking Software (AxioVision 4.8.2) von Zeiss charakterisiert.

Track	zurück gelegter Weg (μm)	Strecke von Start zu Ende (μm)	Mittlere Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)	Maximale Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)
1	11	0,6	0,97	2,59
2	12	0,7	1,06	2,55
3	15	0,2	1,32	3,67
4	14	1,1	1,24	3,51
5	12	0,9	1,09	2,3

Doch schon 8 bis 14 Stunden später zeigten die präperoxisomalen Vesikel ebenfalls lange gerichtete Bewegungen, wie in Abbildung 3.17 beispielhaft für zwei transfizierte Zellen dargestellt. Die aufgezeichneten Bewegungsbahnen (Abbildung 3.17 C, D, G, H) glichen denen für gerichteten peroxisomalen Transport in normalen COS7 Zellen (Abbildung 3.15 I-L) bei vergleichbaren mittleren und maximalen

Geschwindigkeiten (Tabelle 3.4). Die Tatsache, dass die zurück gelegten Wege der Präperoxisomen (Tabelle 3.4) im Vergleich zu reifen Peroxisomen (Tabelle 3.2) verringert waren, kann entweder durch veränderte metabolische Bedingungen und Ansprüche der Zellen erklärt werden oder lässt sich auf die noch nicht vollständige Komplementation der peroxisomalen Vorläufer 24 bzw. 30 Stunden nach Transfektion mit PEX16-YFP zurück führen. Wie in Kapitel 3.1.1.1 gezeigt, waren die Peroxisomen erst 72 Stunden nach der Transfektion vollständig komplementiert.

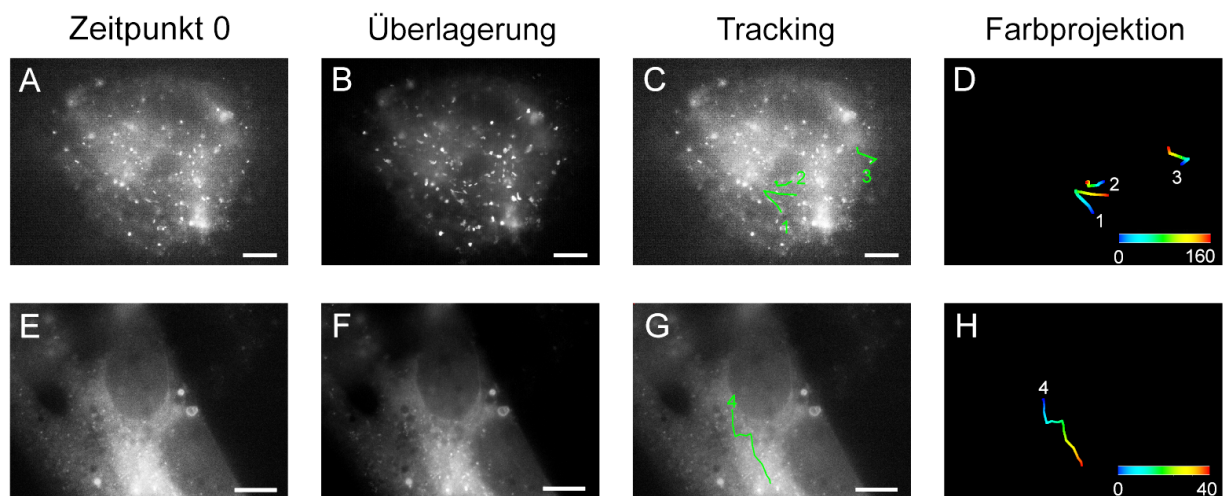


Abbildung 3.17: Aufnahme der peroxisomalen Bewegungsbahn nach Komplementation

24 Stunden (A-D) und 30 Stunden (E-H) nach Transfektion von PEX16-defizienten Fibroblasten mit PEX16-YFP wurden die Peroxisomen durch die Fluoreszenz des YFP verfolgt, die lange gerichtete Bewegungen ausführten. Es wurden 40 (A-D) bzw. 80 Bilder (E-H) im Abstand von 4,1 Sekunden über 160 Sekunden (A-D) bzw. im Abstand von 500 ms über 40 Sekunden (E-H) aufgenommen. Es sind die Zellen zum Zeitpunkt 0 (A, E), die Überlagerung aller Bilder der Zeitreihe (B, F), die aufgenommene peroxisomale Bewegung (C, G) und die zurückgelegten Wege in Abhängigkeit der Zeit (D, H) zum Startzeitpunkt (blau) bis zum Endzeitpunkt (rot) dargestellt. Die entsprechenden Zeitreihen sind im Anhang 8.2.5 zu finden. Die Mikroskopeinstellungen wurden wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben übernommen. Die Größenmarkierung entspricht 10 µm.

Tabelle 3.4: Charakterisierung der gerichteten Bewegung präperoxisomaler Vesikel

Die in Abbildung 3.17 (C, D, G, H) dargestellten langen, gerichteten Bewegungen von Präperoxisomen nach Transfektion von Δ PEX16 Zellen mit PEX16-YFP wurden hinsichtlich des zurück gelegten Gesamtweges (Track), der Strecke zwischen Start- und Endpunkt der Bewegungsbahn, der mittleren Geschwindigkeit über den beobachteten Zeitraum und der Maximalgeschwindigkeit mit Hilfe der Tracking Software (AxioVision 4.8.2) von Zeiss charakterisiert.

Track	zurück gelegter Weg (µm)	Strecke von Start zu Ende (µm)	Mittlere Geschwindigkeit (µm/s)	Maximale Geschwindigkeit (µm/s)
1	21,2	6,9	0,316	1,160
2	11,3	5,1	0,100	0,38
3	10,2	6,3	0,603	1,30
4	23,7	19,9	2,360	3,61

Die entstandenen präperoxisomalen Vesikel nach Transfektion von Δ PEX16 Zellen mit PEX16-YFP schienen also zunächst nur in einem geringen Radius beweglich zu sein, eventuell durch Verbindung mit dem endoplasmatischen Reticulum (siehe dazu Kapitel 3.1.1.2) und bewegten sich nur vibrationsartig durch die Brown'sche Molekularbewegung. Doch 8 bis 14 Stunden später zeigten sich die ersten gerichteten Bewegungen der Präperoxisomen, die durch den Transport entlang von Mikrotubuli, wahrscheinlich mit den gleichen Motorproteinen wie beim peroxisomalen Transport in normalen Zellen, zustande kamen. Das bedeutet, dass zwar die Bildung präperoxisomaler Vesikel unabhängig von Kinesinen ist (Ergebnisse siehe Kapitel 3.1.1.2, Abbildung 3.9), aber der Transport der Präperoxisomen entlang von Mikrotubuli durch Motorproteine erfolgt.

In den nachfolgenden Kapiteln wird nun der Einfluss von Kinesin-1 (Kif5) und dem C-terminalen Kinesin KifC3, dessen Rolle in der peroxisomalen Bewegung bislang unbekannt ist, auf den Transport von Peroxisomen gezeigt und charakterisiert.

3.2.2 Bewegung von Peroxisomen in Abhängigkeit von Kinesinen

Die überwiegenden Motorproteine für den peroxisomalen Transport entlang von Mikrotubuli sind Kinesin-1 (Kif5) und Dynein [124-127]. Zusätzlich wurde aber die Interaktion von PEX1, einer peroxisomalen AAA-ATPase, mit dem C-terminalen Kinesin KifC3 bereits mit Hilfe eines „yeast-two-hybrid“-Systems gezeigt [241]. Die beiden Proteine wurden N-terminal mit Domänen markiert, die DNA-bindende und Transkriptions-aktivierende Eigenschaften für GAL4 besaßen. Bei Interaktion der beiden Proteine wurde GAL4 als Reporter gen exprimiert. Mit PEX1 als „prey-Protein“ wurde eine cDNA-Bibliothek aus HELA Zellen gescreent und viermal C-terminale Reste (160 AS) des „bait-Proteins“ KifC3 detektiert.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von KifC3 und zusätzlich die Rolle von Kinesin-1 (Kif5) auf die peroxisomale Bewegung innerhalb der Zelle analysiert. Hierfür wurde zum einen KifC3 in COS7 Zellen überexprimiert und zum anderen die Menge an KifC3 und Kinesin-1 (Kif5) mit Hilfe von siRNA drastisch reduziert. In beiden Fällen wurden die Zellen hinsichtlich der peroxisomalen Verteilung innerhalb der Zelle untersucht. Die Wechselwirkung von KifC3 mit

peroxisomalen Proteinen wurde *in vivo* mit Hilfe eines Kernlokalisationsversuches überprüft und die Interaktion von KifC3 und PEX1 konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch eine Coimmunopräzipitation bestätigt werden.

3.2.2.1 Nachweis und Überexpression von KifC3

Zunächst wurde endogenes KifC3 in verschiedenen Zelllinien detektiert und die Lokalisation des Proteins *in vivo* untersucht, um daraus eventuell erste Rückschlüsse auf die Funktion des Kinesins ziehen zu können. KifC3 wurde in verschiedenen Zelllinien mittels Immunoblotting mit unterschiedlich starker Expression nachgewiesen (Abbildung 3.18). Der verwendete Antikörper detektierte eine Doppelbande bei 70 kDa, wie bereits zuvor beschrieben [153, 154], die durch Überexpression von KifC3 in COS7 Zellen als KifC3 spezifisch verifiziert wurde. Bei COS7 Zellen und bei geringerer Belichtungszeit auch bei A549 Zellen zeigte sich knapp oberhalb der Doppelbande noch eine dritte Bande, bei der es sich um phosphoryliertes Protein handeln könnte.

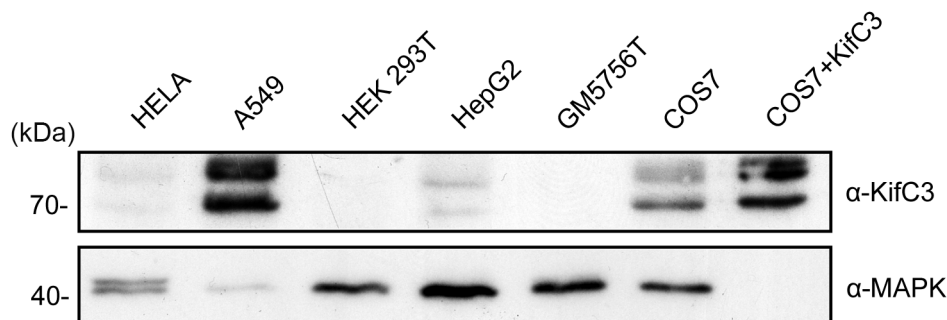


Abbildung 3.18: KifC3 wurde in Säugerzelllinien unterschiedlich stark exprimiert

Proteine aus Zellpellets verschiedener Säugerzelllinien wurden mittels SDS-PAGE in einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde auseinander geschnitten und KifC3 und MAPK als Ladekontrolle mit spezifischen Erstantikörpern (Verdünnungen 1:333 bzw. 1:1000) und HRP-markierten Zweitantikörpern (Verdünnung 1:15000) detektiert. Es wurden unterschiedliche Proteinmengen der verschiedenen Zellpellets aufgetragen (HELA: 40 µg, A549: 10 µg, HEK 293T: 40 µg, HepG2: 40 µg, GM5756T: 40 µg, COS7: 13 µg, COS7+KifC3: 83 ng).

Da KifC3 in A549 und COS7 Zellen am höchsten exprimiert war und daher gut detektiert werden konnte, wurden für die weiteren Versuche diese beiden Zelllinien verwendet. Auffällig ist zudem, dass es sich bei diesen beiden Zelllinien um stark proliferierende und schnell wachsende Zellen handelt. Die hohe Expression von KifC3 in diesen beiden Zelllinien könnte eventuell ein Hinweis auf eine mögliche

Rolle von KifC3 in der Zellteilung sein. Andererseits könnte sich hier aber auch der erhöhte Bedarf an Motorproteinen in diesen Zelllinien bedingt durch das schnelle Wachstum und der damit verbundenen Bewegung und Umordnung der Zelle äußern.

Anschließend wurde die Lokalisation von endogenem KifC3 in COS7 Zellen untersucht. Hierfür wurden COS7 Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung KifC3, das peroxisomale Membranprotein PMP70 und Tubulin α spezifisch markiert (siehe Abbildung 3.19). KifC3 war innerhalb der Zelle Zellphasen-abhängig unterschiedlich lokalisiert. Bei Zellen in der Interphase wurde KifC3 vermehrt nahe dem Zellkern detektiert (obere Reihe), wobei eine sehr starke Konzentrierung des Proteins am Centrosom auftrat. Durch Überlagerung mit Tubulin α zeigte sich, dass es sich hierbei um das Organisationszentrum der Mikrotubuli (MTOC) handelte.

Die Lokalisation von KifC3 sowohl am Centrosom als auch an der *Zonula adhaerens* (Adhäsionsgürtel) wurde bereits für menschliche Epithelzellen des Dickdarms (Caco2) beschrieben [152]. Die Autoren postulieren, dass KifC3 über Mikrotubuli zu den Adhäsionsverbindungen gelangt, deren Minus-Enden nicht am Centrosom sondern apikal an der *Zonula adhaerens* verankert sind. Da es sich bei COS7 Zellen nicht um Epithelzellen sondern um Fibroblasten handelt und diese somit hauptsächlich radiale, am Centrosom verankerte Mikrotubuli besitzen, wurde hier KifC3 nur am Centrosom detektiert.

Zellen in der Metaphase der Mitose zeigten ein verstärktes Vorkommen von KifC3 an den Spindelpolen und an den Spindelfasern (Abbildung 3.19, untere Reihe). Auch andere C-terminale Kinesine wurden bereits in verschiedenen Organismen an den Spindelpolen und an der Spindel selber detektiert [138, 140-142]. Für alle diese Kinesine wurde eine Rolle in der Mitose oder Meiose beschrieben u.a. bei der Anordnung der Teilungsspindel und der Trennung der Spindelpole und somit der korrekten Verteilung der Chromatiden. Daher ist es wahrscheinlich dass KifC3 ebenfalls eine Rolle in der Zellteilung einnimmt.

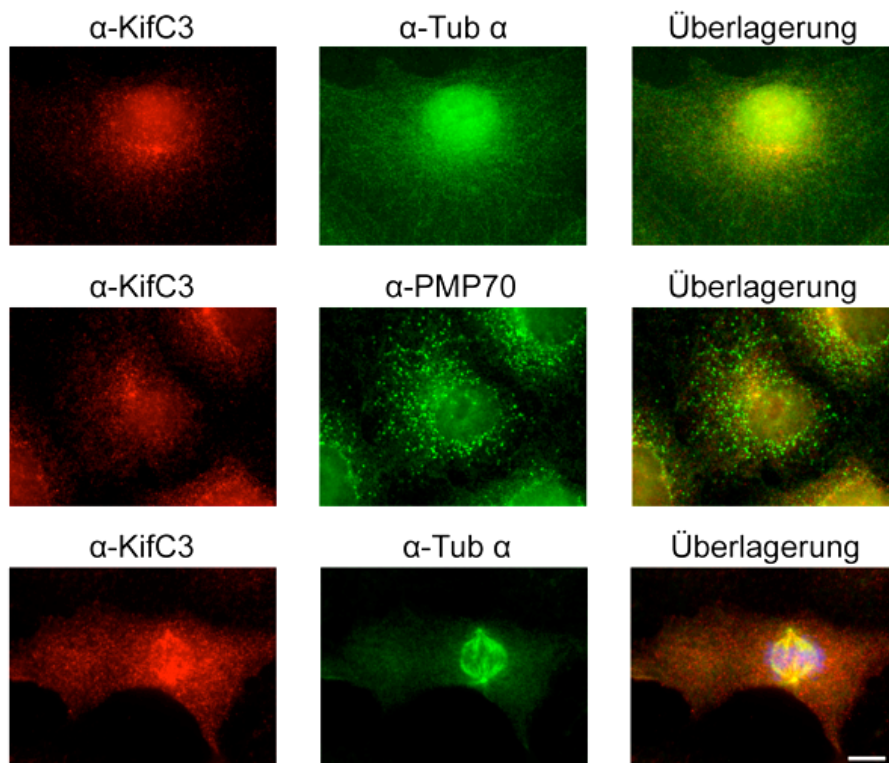


Abbildung 3.19: Zellphasen-abhängige Lokalisation von endogenem KifC3

COS7 Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und nach 24 Stunden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Erstantikörpern gegen KifC3 und Alexa 594 markierten Zweitantikörpern bzw. mit Erstantikörpern gegen PMP70 und Tubulin α und Alexa 488 markierten Zweitantikörpern behandelt. Die oberste Zeile zeigt eine Lokalisation von KifC3 am MTOC einer Zelle in der Interphase, was durch Überlagerung mit der Tubulin α Färbung dargestellt wird. Die Markierung von KifC3 überlagerte zu keinem Zeitpunkt mit der PMP70-Färbung (mittlere Reihe). In der untersten Zeile ist eine Zelle in der Metaphase dargestellt, in der KifC3 an den Spindelpolen und Spindelfasern zu sehen ist. KifC3 kolokalisierte hier mit Tubulin α . Die Größenmarkierung entspricht 10 μm .

KifC3 konnte zu keinem Zeitpunkt an den Peroxisomen, die durch Färbung von PMP70 sichtbar gemacht wurden, nachgewiesen werden (Abbildung 3.19, mittlere Reihe). Das bedeutete aber nicht, dass KifC3 nicht an Peroxisomen lokalisiert. Nur 5-10% der Peroxisomen führen lange Bewegungen entlang von Mikrotubuli aus [175, 176], was impliziert, dass nur ein sehr geringer Teil an Peroxisomen mit Motorproteinen beladen ist. Zudem werden Motorproteine nur transient und in sehr geringen Mengen (1-10 Moleküle pro Peroxisom [125]) gebunden, so dass hier die Nachweisgrenze der Immunfluoreszenzmikroskopie weit überschritten wird.

Als nächstes wurden COS7 Zellen transient mit einem Plasmid, das für die Expression von menschlichem KifC3 codiert, transfiziert um über Lokalisation von KifC3 und phänotypische Veränderungen auf die Rolle von KifC3 innerhalb der Zelle

zu schließen. Überexprimiert konnte KifC3 an den Mikrotubuli detektiert werden, was durch Überlagerung mit Tubulin α in Abbildung 3.20 dargestellt ist (obere Reihe). Dies zeigt, dass das Protein an Mikrotubuli bindet und eventuell auch als Motor für den Transport entlang von Mikrotubuli dient. Tatsächlich wurde eine Rolle für KifC3 beim apikalen Transport von Vesikeln aus dem Trans-Golgi-Netzwerk in Epithelzellen bereits beschrieben [147]. Die postulierte Beteiligung von KifC3 bei der Positionierung und Integration des Golgi-Apparates [153] konnte in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.28).

So wie im Fall von endogenem KifC3 war KifC3 auch im überexprimierten Zustand nicht an den Peroxisomen lokalisiert. Allerdings zeigt die Vergrößerung der Überlagerung in Abbildung 3.20 (untere Reihe) eine Anlagerung der Peroxisomen an die Mikrotubuli (hier durch Anfärbung des überexprimierten KifC3 sichtbar gemacht).

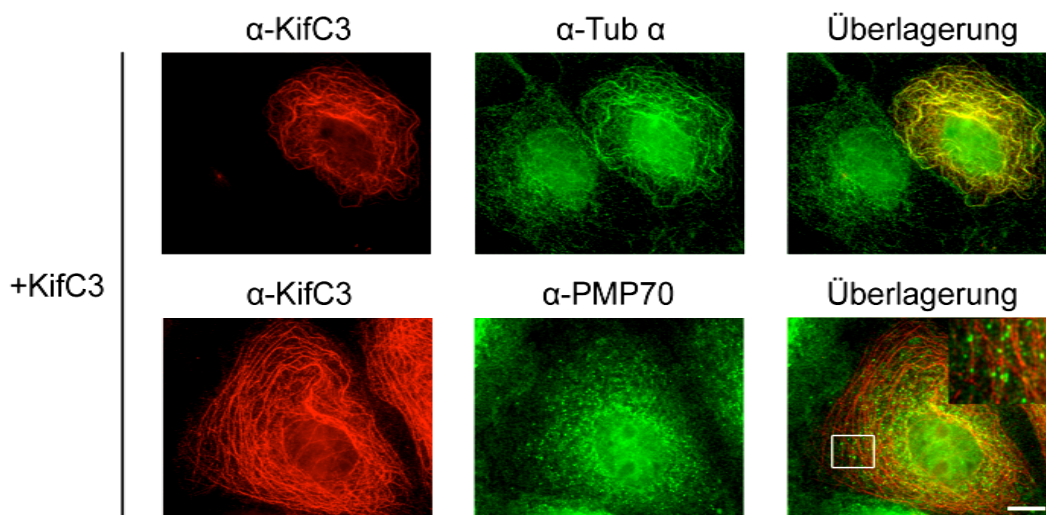


Abbildung 3.20: Lokalisation von überexprimiertem KifC3 an Mikrotubuli

24 Stunden nach transients Transfektion mit humanem KifC3 (KifC3(h)-pLPCX) wurden COS7 Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. Überexprimiertes KifC3 konnte durch Inkubation mit Erstantikörpern gegen KifC3 und Alexa 594 markierten Zweitantikörpern an den Mikrotubuli detektiert werden (obere Zeile). Mikrotubuli bzw. Peroxisomen wurden mit Erstantikörpern gegen Tubulin α (Tub α) bzw. gegen PMP70 und Alexa 488 markierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. KifC3 zeigte keine Kolo-kalisation mit PMP70 (untere Zeile). Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Bei Überexpression sowohl von humanem (h) als auch murinem (m) KifC3 konnte keine phänotypische Veränderung hinsichtlich der peroxisomalen Verteilung bestimmt werden (Tabelle 3.5). Im Großteil der Zellen waren die Peroxisomen gleichmäßig im Cytosol angeordnet. Ein geringer Anteil der Zellen wies geclusterte Peroxisomen auf, die allerdings sowohl in den Zellen mit überexprimiertem KifC3 als

auch in den Zellen mit transfiziertem Leervektor in der gleichen Größenordnung zu finden waren. Peroxisomen sind sehr flexible Organellen, die auf verschiedene Weise auf metabolische Veränderungen innerhalb der Zelle reagieren können. Das Clustering der Peroxisomen in einigen Zellen kann z.B. Ursache von bestimmten metabolischen Bedingungen oder aber auch Ergebnis von Stress durch die Überexpression von Plasmid sein.

Auch andere Organellen wie der Golgi-Apparat zeigten keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Positionierung innerhalb der Zelle und die Überexpression von KifC3 hatte keinen Einfluss auf die Morphologie und das Vorkommen der Mikrotubuli.

Tabelle 3.5: Verteilung der Peroxisomen bei Überexpression von KifC3

COS7 Zellen wurden transient mit Plasmiden transfiziert, die murines (m) GFP-getagtes KifC3 oder humanes (h) KifC3 ohne Tag exprimierten bzw. mit den entsprechenden Leervektoren. Die Zellen wurden hinsichtlich der peroxisomalen Verteilung analysiert, wobei nur die Zellen berücksichtigt wurden, die offensichtlich transfiziert waren. Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt.

transfiziertes Plasmid	Anteil der Zellen mit geclusterten Peroxisomen
KifC3(m)-pEGFP-C1	2,99%
pEGFP-N1	2,59%
KifC3(h)-pLPCX	1,20%
pcDNA3.1zeo	1,41%

3.2.2.2 „Knockdown“ von KifC3 mit siRNA

Da die Überexpression von KifC3 keinen zellulären Phänotyp zeigte und somit keine Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins hinsichtlich der Bewegung von Peroxisomen gezogen werden konnte, wurde die Proteinmenge an KifC3 mit Hilfe von RNAi drastisch reduziert. Hierfür wurden COS7 Zellen mit siRNA gegen KifC3 und Kif5B (schwere Kette des Kinesin-1) als Plus-Motorprotein bzw. mit Kontroll-siRNA zweimalig elektroporiert. Die Effizienz des „knockdowns“ wurde 24 Stunden nach der zweiten Elektroporation auf mRNA-Ebene überprüft und 48 Stunden nach der zweiten siRNA-Behandlung auf Proteinebene. Die quantitative real-time PCR zeigte eine Reduktion der mRNA-Menge von KifC3 auf $22,3 \pm 0,08\%$ (N=14) im Vergleich zur Kontrolle nach KifC3 „knockdown“. Gleichzeitig änderte sich bei diesen Proben der mRNA Gehalt von Kif5B (schwere Kette des Kinesin-1) nicht (siehe Abbildung 3.21), was eine spezifische Reduzierung der KifC3-mRNA Menge anzeigt. Auf Proteinebene konnte KifC3 durch siRNA-Behandlung durchschnittlich um $86,4 \pm$

11,99% (N=11) verringert werden. In Abbildung 3.21 ist ein beispielhafter Western Blot dargestellt, der einen „knockdown“ der KifC3 Proteinmenge um 90% anzeigt.

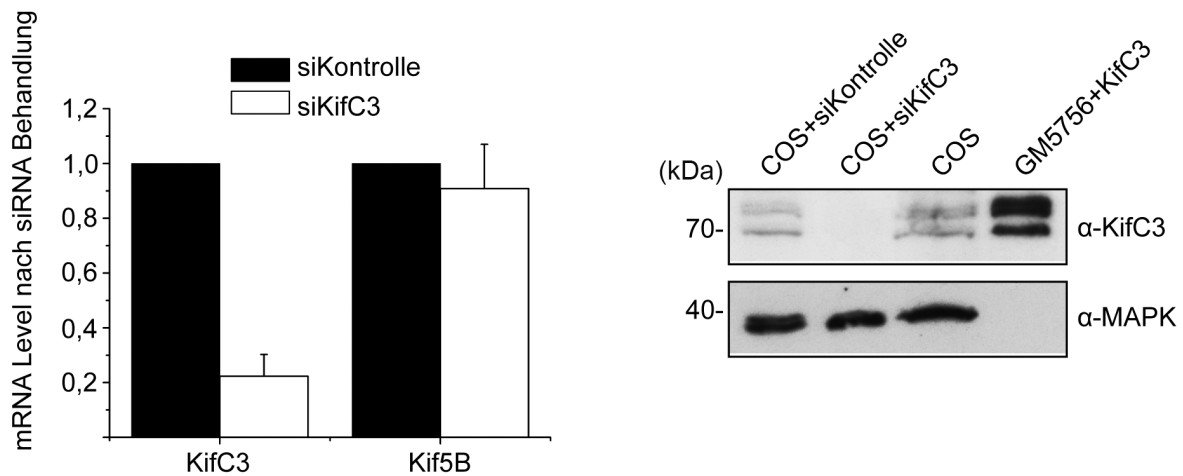


Abbildung 3.21: „Knockdown“ von KifC3 auf mRNA und Proteinebene

COS7 Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA gegen KifC3 oder mit Kontroll-siRNA elektroporiert. Die Reduzierung der mRNA wurde 24 Stunden nach der zweiten siRNA Behandlung mittels quantitativer real-time PCR überprüft (Mittelwerte und Standardabweichung bei KifC3: N=14 und Kif5B: N=6) und der „knockdown“ auf Proteinebene 48 Stunden nach der zweiten siRNA-Behandlung nachgewiesen. Dafür wurden 40 µg Protein in einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran gebロットet. Die Proteinbanden wurden nach Inkubation mit spezifischen Erstantikörpern (α-KifC3 1:333, α-MAPK 1:1000) und HRP-gekoppelten Zweitantikörpern (1:15000) unter Verwendung des „ECL Western Blotting Substrates“ (Pierce) markiert. Der repräsentative Western Blot zeigt eine Reduzierung der KifC3 Proteinmenge um 90%, wobei die MAPK Färbung als Ladekontrolle diente. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mit Hilfe der AIDA Software (Image Analyzer v.4.19).

Peroxisomaler Phänotyp nach „knockdown von KifC3 und Kif5B

Dem Zeitpunkt der Bestimmung der Proteinmenge entsprechend wurden die Zellen 48 Stunden nach der zweiten siRNA-Behandlung für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert und auf phänotypische Veränderungen hinsichtlich der peroxisomalen Verteilung untersucht (siehe Abbildung 3.22). Zellproben, die mit siRNA gegen KifC3 behandelt worden waren, wiesen doppelt so viele Zellen mit geclusterten Peroxisomen auf im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu konnte bei Reduktion der Kif5B-Menge durch siRNA eine Abnahme der Zellen mit geclusterten Peroxisomen um 70% festgestellt werden und die Anzahl der Zellen mit gleichmäßig verteilten Peroxisomen nahm zu.

Der „knockdown“ von KifC3 scheint also die Bewegung der Peroxisomen in Richtung des Zellkerns und somit in Richtung des Minus-Endes der Mikrotubuli zu begünstigen, was für eine überwiegende Aktivität des Minus-Motors Dynein spricht. Diese Theorie und ein Modell für den Einfluss von KifC3 auf den peroxisomalen Transport wird in der Diskussion (Kapitel 4.2.2) ausführlich behandelt.

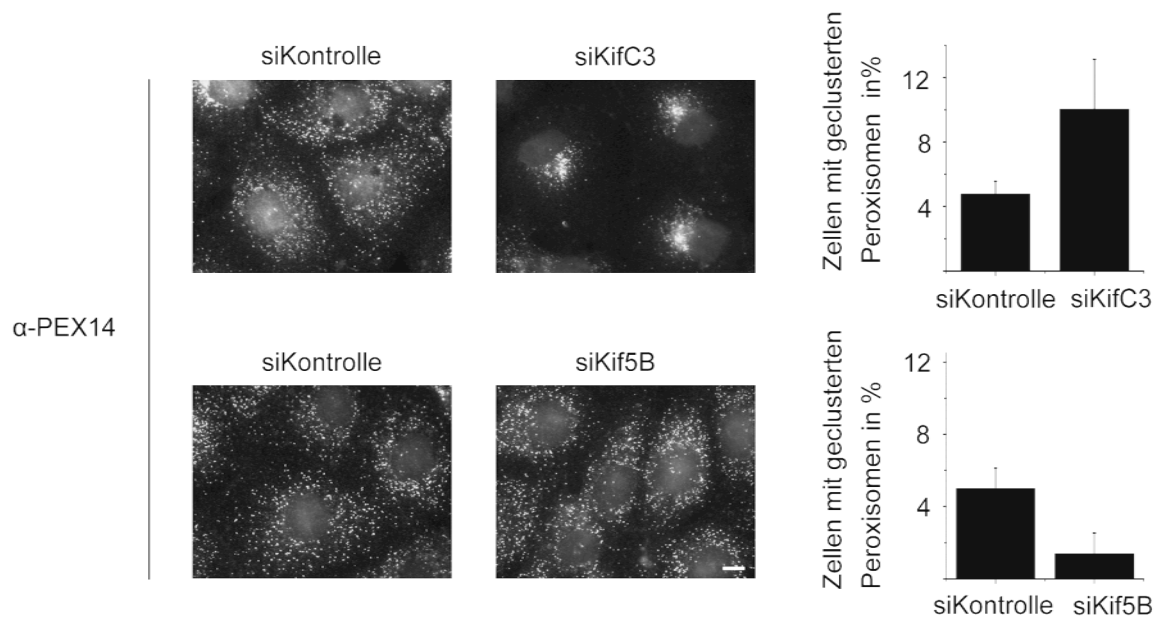


Abbildung 3.22: Clustering von Peroxisomen nach „knockdown“ von KifC3

siRNA-behandelte COS7 Zellen wurden 48 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ fixiert und die Peroxisomen mit Hilfe von α -PEX14 Erstantikörpern und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. Durch die Reduzierung der KifC3 Proteinmenge zeigten sich doppelt so viele Zellen mit geclusterten Peroxisomen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Mit siKif5B (schwere Kette des Kinesin-1) behandelte Zellen („knockdown“ der mRNA um $78,6 \pm 3,34\%$ bei $N=2$) wiesen dagegen weniger Clustering der Peroxisomen auf. Die Balkendiagramme zeigen den jeweiligen Mittelwert und die Standardabweichung (für KifC3 bei $N=4$) bzw. die Streuung (für Kif5B bei $N=2$). Es wurden mindestens 500 Zellen ausgezählt. Die Größenmarkierung entspricht $10 \mu\text{m}$.

Im Gegensatz dazu trat bei Reduktion der Kif5B-Menge weniger Clustering der Peroxisomen auf, was für eine Abschwächung der Peroxisomenbewegung in Richtung des Minus-Endes spricht. Tatsächlich wurde bereits eine reduzierte peroxisomale Bewegung bei Inaktivierung oder „knockdown“ von Kinesin-1 (Kif5) oder Dynein beobachtet [124-126].

Drosophila S2 oder COS7 Zellen wurden mit siRNA gegen Kin-1 oder Dynein behandelt bzw. Dynamitin, das einen dominant negativen Effekt auf die Dyneinaktivität ausübt, wurde überexprimiert. Dadurch wurde nicht nur der peroxisomale Transport in die Richtung des betroffenen Motorproteins inhibiert, was

sich in peroxisomalem Clustering geäußert hätte, sondern die komplette peroxisomale Bewegung in beide Richtungen war gestört. Die Peroxisomen waren bei Ausfall eines der beiden Motorproteine trotzdem gleichmäßig in der Zelle verteilt. Dieses Phänomen kann durch das so genannte „tug-of-war“ Modell (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.3.4) beschrieben werden. Demnach binden gegensätzliche Motorproteine gleichzeitig an eine zu transportierende Ladung und üben entgegengerichtete Kräfte auf diese aus bis eine Kraft in eine Richtung überwiegt und der Transport in diese Richtung erfolgen kann. Diese Spannung an einer zu transportierenden Ladung ist essentiell für deren Bewegung entlang von Mikrotubuli und sobald der Gegenpart eines Motorproteins fehlt, kommt der Transport komplett zum Erliegen. Wenn also wie in Abbildung 3.22 die Menge an Kinesin-1 (Kif5) stark reduziert wird, kann keine Spannung mehr an den Peroxisomen aufgebaut werden und Dynein ist ebenfalls inaktiv, so dass der peroxisomale Transport komplett ausfällt.

Die Mikrotubuli wiesen hinsichtlich Verteilung und Anzahl weder bei Behandlung mit siKifC3 noch mit siKif5B eine Veränderung im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Das Clustering der Peroxisomen nach KifC3 „knockdown“ kam somit nicht durch Fehlen von Mikrotubuli in der Zellperipherie zustande. Markierung von Peroxisomen und Mikrotubuli nach siRNA-Behandlung in Abbildung 3.23 zeigte zudem, dass die Reduzierung der KifC3-Menge nicht in einer Ablösung der Peroxisomen von den Mikrotubuli resultierte, sondern die Peroxisomen auch nach „knockdown“ von KifC3 an die Mikrotubuli angelagert waren.

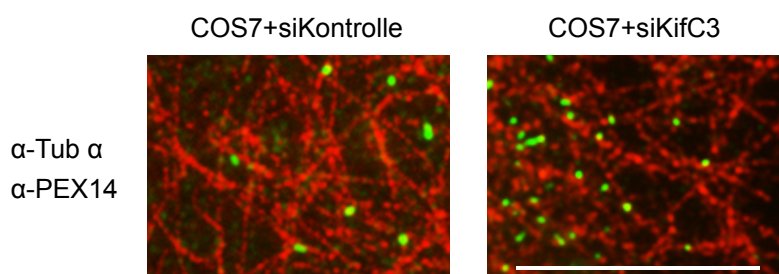


Abbildung 3.23: KifC3 unabhängige Anlagerung der Peroxisomen an Mikrotubuli

48 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ von KifC3 bzw. Behandlung mit Kontroll-siRNA wurden die COS7 Zellen fixiert und Peroxisomen mit spezifischen Erstantikörpern gegen PEX14 und Alexa 488 gekoppelten Zweitantikörpern und Mikrotubuli mit Erstantikörpern gegen Tubulin α und Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern markiert. Die Peroxisomen waren nach Reduzierung der KifC3-Menge nach wie vor an die Mikrotubuli angelagert (rechts). Die Größenmarkierung entspricht 10 μm .

Die Rolle des Cytoskeletts bei der Ausbildung des peroxisomalen Phänotyps

Um zu überprüfen inwieweit das Clustering der Peroxisomen bei „knockdown“ von KifC3 abhängig vom Cytoskelett ist, wurden siRNA-behandelte Zellen mit Nocodazol und Cytochalasin B versetzt. Die Depolymerisierung der Mikrotubuli durch Nocodazol erfolgte für 4 Stunden direkt vor der Präparation der Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie. Zur Zerstörung des Aktinskeletts wurden die Zellen 48 Stunden lang mit Cytochalasin B bis zur Fixierung inkubiert. Abbildung 3.24 zeigt COS7 Zellen nach Zugabe von Nocodazol (obere Reihe) und Cytochalasin B (untere Reihe) bzw. DMSO, das als Lösungsmittel diente. Sowohl die Mikrotubuli als auch das Aktinskelett konnten durch die Behandlung mit den Reagenzien erfolgreich abgebaut werden.

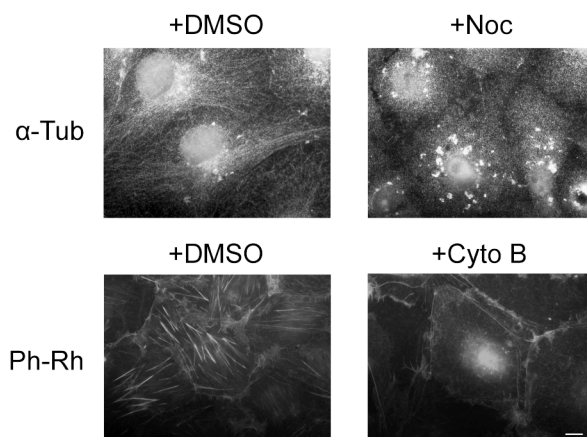


Abbildung 3.24: Depolymerisierung des Cytoskeletts in COS7 Zellen

Mikrotubuli in COS7 Zellen wurden durch Inkubation mit Nocodazol in einer Konzentration von 5 μM für 4 Stunden depolymerisiert. Zugabe von Cytochalasin B in einer Konzentration von 4 μM für 48 Stunden bis zur Fixierung der Zellen zerstörte das Aktinskelett. Als Kontrolle dienten jeweils mit den gleichen Volumina an DMSO als Lösungsmittel inkubierte Zellen. Durch Behandlung mit α -Tubulin α Erstantikörpern und Alexa 488 markierten Zweitantikörpern wurden Mikrotubuli sichtbar gemacht und das Aktinskelett über Bindung von Rhodamin markiertem Phalloidin (Ph-Rh) angefärbt. Die Größenmarkierung entspricht 10 μm .

Nachdem gesichert war, dass sowohl die Mikrotubuli als auch das Aktinskelett durch die verwendeten Reagenzien abgebaut werden konnten und die Konzentration an Nocodazol von 5 μM bzw. an Cytochalasin B von 4 μM ausreichend und zugleich nicht toxisch für die verwendeten Zellen waren, wurden die Auswirkungen der fehlenden Cytoskelett-Komponenten auf die Ausbildung des peroxisomalen Phänotyps nach „knockdown“ von KifC3 untersucht. Dafür wurden die Zellen wie

bereits beschrieben mit siRNA gegen KifC3 bzw. Kontroll-siRNA behandelt und direkt nach dem zweiten „knockdown“ für 48 Stunden mit Cytochalasin B versetzt bzw. für 4 Stunden vor der Fixierung mit Nocodazol inkubiert. Abbildung 3.25 zeigt die durch α -PEX14 Antikörper markierten Peroxisomen nach der jeweiligen Behandlung mit den Reagenzien.

Die mit Lösungsmittel behandelten Zellen zeigten nach „knockdown“ von KifC3 den bereits beschriebenen Phänotyp (obere Reihe) des Peroxisomenclustering. Auch nach Zugabe von Cytochalasin B zur Zerstörung des Aktinskeletts nahm das peroxisomale Clustering wie bei der Leerprobe (mit DMSO) beobachtet nach Behandlung mit siKifC3 im Vergleich zu den Kontrollzellen zu. Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 3.25 im Säulendiagramm dargestellt. Die Tatsache, dass die Peroxisomen nach „knockdown“ von KifC3 trotz Fehlen des Aktinskeletts am Centrosom clustern, zeigt, dass die Peroxisomen nicht entlang des Aktinskeletts in Richtung Kern transportiert werden und dass der peroxisomale Phänotyp somit unabhängig von Aktinfilamenten ist.

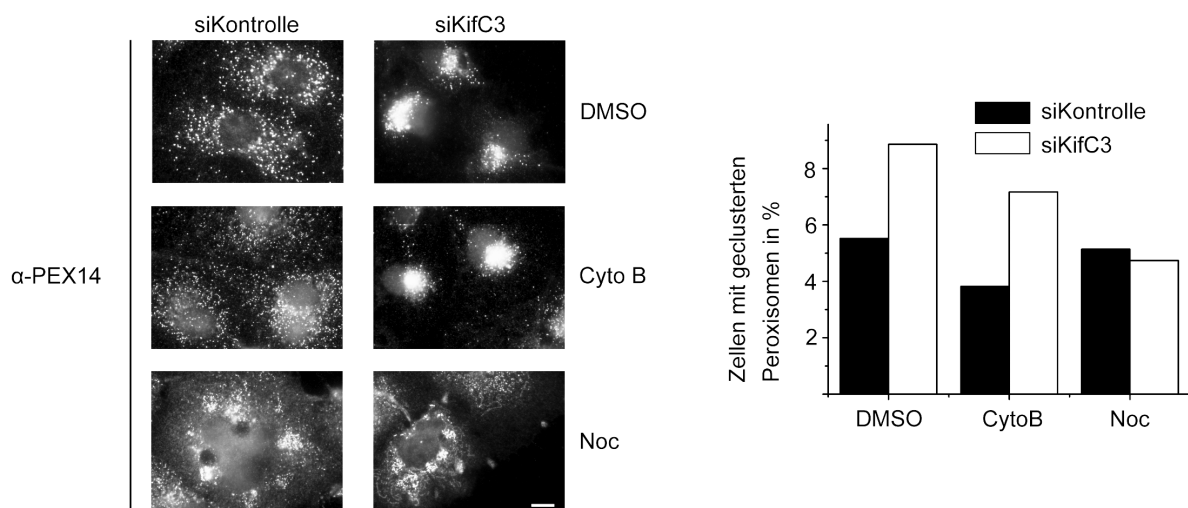


Abbildung 3.25: Peroxisomaler Phänotyp ist abhängig von Mikrotubuli

Mit siRNA behandelte COS7 Zellen wurden direkt nach dem zweiten „knockdown“ für 48 Stunden mit Cytochalasin B in einer Konzentration von 4 μ M inkubiert bzw. 4 Stunden vor der Fixierung mit Nocodazol in einer Konzentration von 5 μ M versetzt. Zur Leerkontrolle wurden jeweils gleiche Volumina an DMSO, das als Lösungsmittel diente, hinzugegeben. Die Peroxisomen wurden unter Verwendung von α -PEX14 Erstantikörpern und Alexa 594 markierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. Die Ausbildung des peroxisomalen Phänotyps nach „knockdown“ von KifC3 war abhängig von den Mikrotubuli und unabhängig von Aktinfilamenten. Das Balkendiagramm zeigt die Auszählung von Zellen mit geclusterten Peroxisomen eines Versuches. Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Nach Depolymerisierung der Mikrotubuli allerdings waren die Peroxisomen nicht auf die beschriebene Weise am Kern geclustert, sondern entweder gleichmäßig verteilt oder in mehreren „Haufen“ im Cytosol angeordnet. Dieser Phänotyp der „Haufenbildung“ der Peroxisomen ist bekannt [124, 176, 242] und typisch nach Behandlung der Zellen mit Nocodazol, da Mikrotubuli zur gleichmäßigen Verteilung der Peroxisomen in der Zelle benötigt werden. Um auszuschließen, dass die beobachteten Haufen nicht aus zuvor gebildeten Peroxisomenclustern entstanden sind, wurden die Zellen ausgezählt, die Peroxisomen in Haufen aufwiesen. Sowohl die Proben mit reduziertem KifC3 als auch die Kontrollproben enthielten gleich viele Zellen mit angehäuften Peroxisomen wie im Balkendiagramm in Abbildung 3.25 dargestellt. Somit ist die Ausbildung des peroxisomalen Phänotyps bei „knockdown“ von KifC3 nach Depolymerisierung der Mikrotubuli nicht mehr möglich. Die Mikrotubuli sind notwendig um die Peroxisomen zum Minus-Ende zu transportieren. Diese Ergebnisse konnten mehrere Male unter variierenden Versuchsbedingungen reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Der peroxisomale KifC3 „knockdown“ Phänotyp ist nicht abhängig von der Zellphase

Da vielen Motorproteinen und vor allem C-terminalen Kinesinen eine Rolle bei der Zellteilung und bei der Organisation von Mikrotubuli zukommt, ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch KifC3 in diese Prozesse involviert ist. In Docetaxel- und Paclitaxel-resistenten Brustkrebszellen (MDA MB 231/468) wurde eine erhöhte Menge sowohl an KifC3 mRNA als auch an KifC3 Protein detektiert, das dem Mikrotubuli stabilisierenden Effekt der Zytostatika entgegen wirkte [154, 155].

Daher stellte sich die Frage, ob der beobachtete Phänotyp des Peroxisomenclustering durch Akkumulierung der Zellen in einer bestimmten Zellphase z.B. durch Stabilisierung oder Destabilisierung der Mikrotubuli durch reduzierte KifC3-Menge entsteht. Um dies zu überprüfen wurden mit siKifC3 und Kontroll-siRNA behandelte COS7 Zellen 48 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ mit Propidiumjodid behandelt und per Durchflusszytometrie der Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellphasen bestimmt. Abbildung 3.26 zeigt die Histogramme der

Fluoreszenzintensitäten, die dem DNA-Gehalt der Zellen entsprechen, für die Kontrollzellen und für die Zellen mit reduzierter KifC3 Menge.

Nachdem die Peaks den jeweiligen Zellphasen zugeordnet worden waren, zeigte die Quantifizierung der Histogramme (Balkendiagramm, Abbildung 3.26) keine veränderte Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellphasen nach „knockdown“ von KifC3.

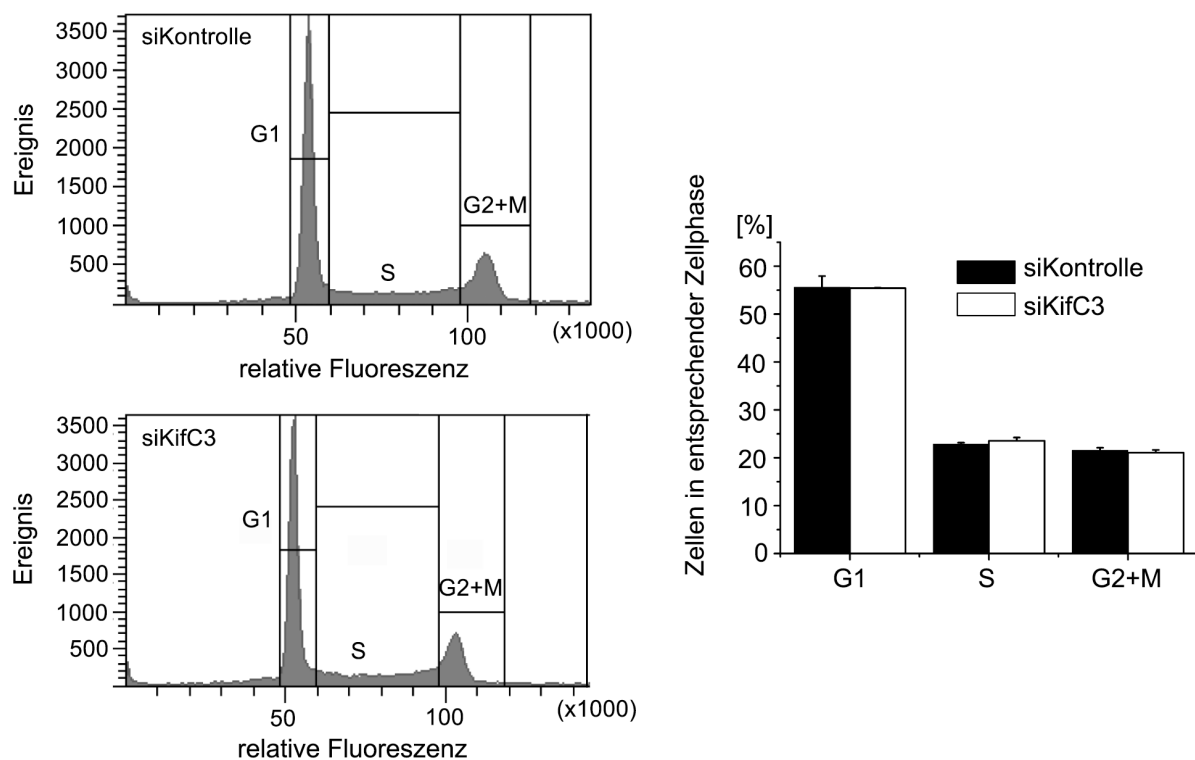


Abbildung 3.26: Per Durchflusszytometrie ermittelte Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellphasen

Die DNA von COS7 Zellen, die mit siRNA behandelt worden waren, wurde 48 Stunden nach dem zweiten „knockdown“ mit Propidiumiodid markiert und per Durchflusszytometrie ein Histogramm der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung der Zellen in den verschiedenen Zellphasen aus den Histogrammen als Mittelwerte und Streuung (N=2). Die Reduzierung der KifC3-Menge zog keine Akkumulation der Zellen in einer bestimmten Zellphase nach sich.

Die Reduzierung der KifC3-Menge zog somit keine Akkumulation der Zellen in einer bestimmten Zellphase nach sich. Das bedeutet, dass die Zunahme der Zellen mit geclusterten Peroxisomen nach Behandlung mit siRNA gegen KifC3 nicht aus einem sekundären Effekt auf die Zellteilung oder die Stabilität der Mikrotubuli resultierte. Trotzdem schließen diese Ergebnisse nicht aus, dass KifC3 eine Rolle bei der Zellteilung und Organisation von Mikrotubuli einnimmt. An der Zellteilung und vor

allem am Aufbau der mitotischen Spindel sind sehr viele verschiedene Motorproteine beteiligt deren Funktionen sich oft überschneiden oder komplementär sind. Daher kann der Einfluss eines einzelnen Motorproteins auf die Zellteilung bei einfachem „knockdown“ oft nicht bestimmt werden, da sich nur bei „knockdown“ von mehreren Motorproteinen gleichzeitig ein zellulärer Phänotyp zeigt. Beispiele hierfür werden in *S.cerevisiae* bei Hoyt et al. und Roof et al. gezeigt [243, 244].

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden COS7 Zellen und A549 Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen KifC3 bzw. mit Kontroll-siRNA durch Zugabe von Thymidin in der S-Phase des Zellzykluses geblockt und hinsichtlich der peroxisomalen Verteilung betrachtet. Abbildung 3.27A zeigt die Fluoreszenzhistogramme von A549 Zellen mit und ohne Behandlung von Thymidin.

Durch den Thymidin-Block fand eine Verschiebung der Zellverteilung aus der G1- in die S-Phase um 30% statt und der Anteil der Zellen in der S-Phase konnte mehr als verdoppelt werden. Die quantitative Auswertung des peroxisomalen Phänotyps nach siRNA-Behandlung von COS7 und A549 Zellen mit und ohne Thymidin-Block ist in Abbildung 3.27B als Balkendiagramm dargestellt. Sowohl in COS7 als auch in A549 Zellen verdoppelte sich die Anzahl der Zellen mit geclusterten Peroxisomen nach Behandlung mit siRNA gegen KifC3. Auch nach Akkumulierung der Zellen in der S-Phase durch einen Thymidin-Block war die Anzahl der Zellen mit geclusterten Peroxisomen in beiden Zelllinien nach KifC3 „knockdown“ stark erhöht im Vergleich zu den Kontrollzellen. Somit hatte die Änderung der Zellverteilung in den Zellphasen keinen Einfluss auf die Ausprägung des peroxisomalen Phänotyps nach „knockdown“ von KifC3, was nahe legt, dass der Phänotyp nicht Zellphasen-abhängig ist. Allerdings war insgesamt die Anzahl der Zellen mit geclusterten Peroxisomen nach Behandlung mit Thymidin sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den Zellen mit reduzierter KifC3-Menge leicht erhöht, was durch veränderte metabolische Bedingungen der Zellen verursacht durch die Thymidin-Inkubation bedingt sein kann.

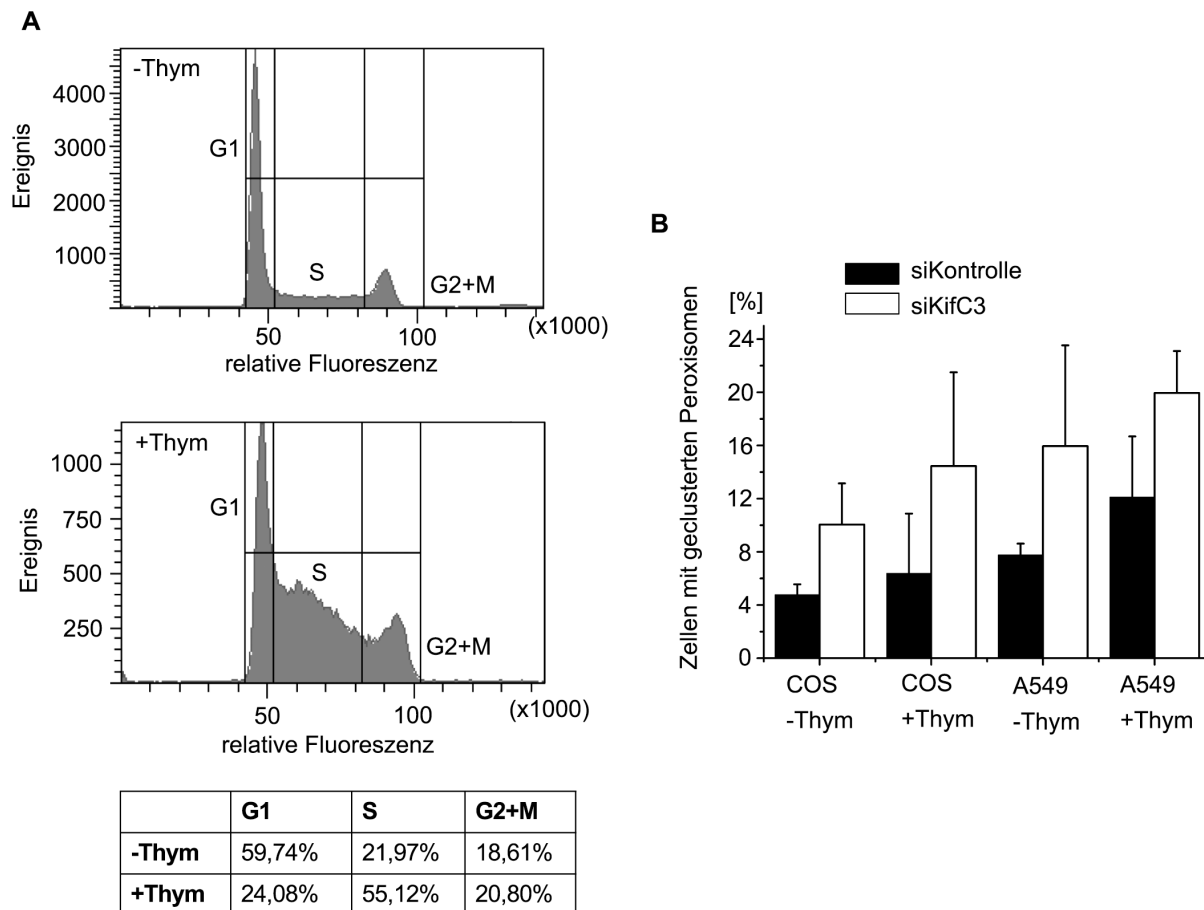


Abbildung 3.27: Der peroxisomale Phänotyp ist nicht Zellphasen-abhängig

(A) A549 Zellen wurden durch 24 stündige Inkubation mit Thymidin in der S-Phase akkumuliert. Nach Markierung der DNA mit Propidiumiodid per Durchflusszytometrie wurden Fluoreszenzhistogramme von Zellen mit und ohne Thymidin-Behandlung aufgenommen. Die Tabelle zeigt den Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellphase nach Quantifizierung der Histogramme. (B) 24 Stunden nach der zweiten Behandlung mit siKifC3 bzw. Kontroll-siRNA wurden COS7 und A549 Zellen wie in (A) mit Thymidin geblockt und 24 Stunden später für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. Das Balkendiagramm zeigt die Auszählungen von Zellen mit geclusterten Peroxisomen als Mittelwerte und Standardabweichungen (COS -Thym, N=4) bzw. Streuungen (Cos +Thym, A549 ±Thym, N=2). Es wurden jeweils mindestens 500 Zellen ausgezählt.

Einfluss des KifC3 „knockdowns“ auf andere Organellen

Nachdem der Einfluss von KifC3 auf die Verteilung der Peroxisomen innerhalb der Zelle gezeigt werden konnte, wurden auch andere Organellen nach „knockdown“ von KifC3 betrachtet. COS7 Zellen wurden 48 Stunden nach der zweiten siRNA Behandlung fixiert und die Mitochondrien, das endoplasmatische Reticulum, frühe Endosomen und der Golgi-Apparat mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht (siehe Abbildung 3.28).

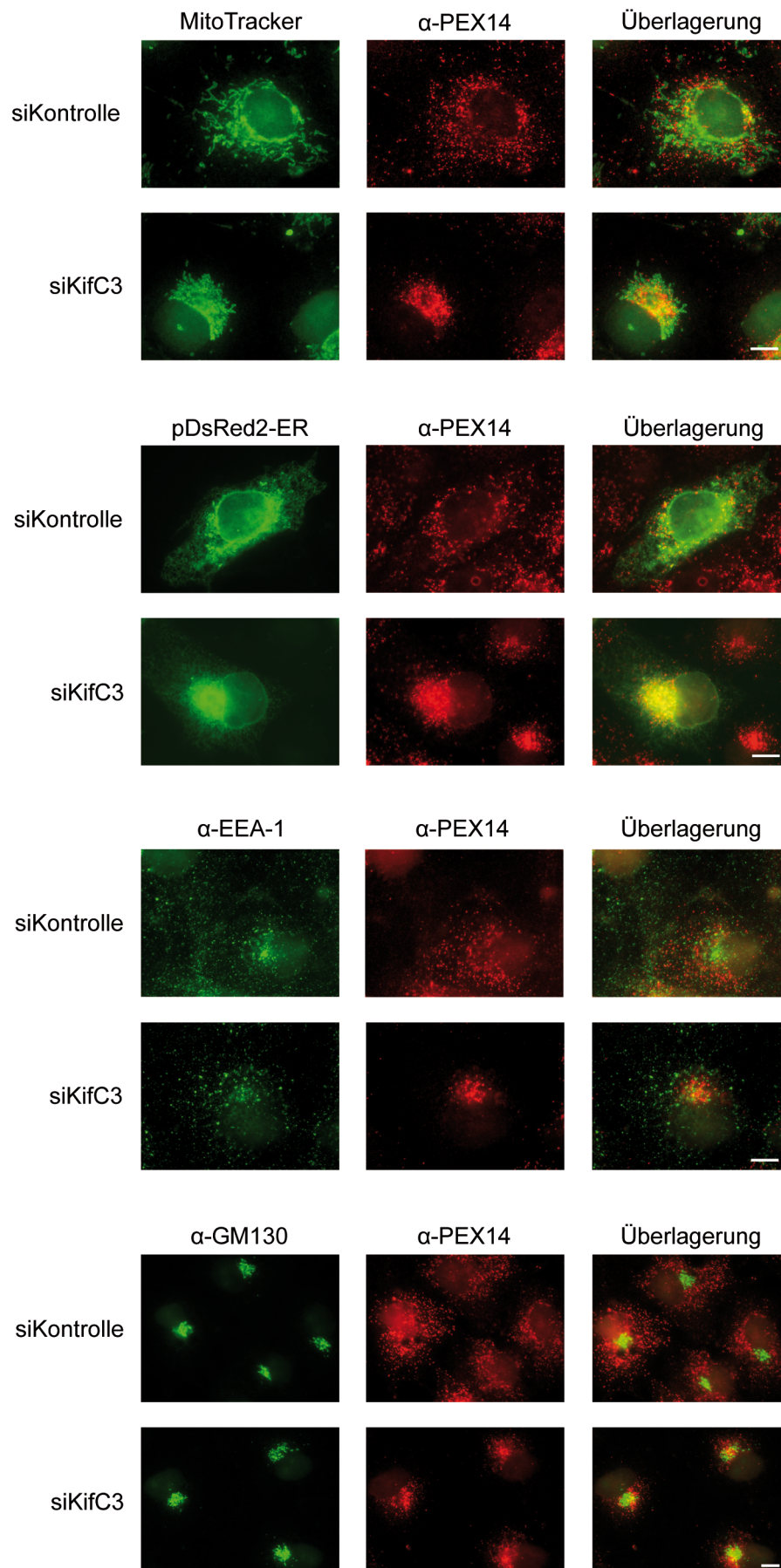


Abbildung 3.28: Positionierung von Organellen nach „knockdown“ von KifC3

Nach zweimaliger Elektroporation von COS7 Zellen mit siRNA gegen KifC3 bzw. mit Kontroll-siRNA wurden die Zellen 48 Stunden nach der zweiten Behandlung für die Immunfluoreszenzmikroskopie präpariert. Frühe Endosomen und der Golgi-Apparat wurden unter Verwendung von Erstantikörpern gegen EEA-1 bzw. GM130 als Markerproteine und Alexa 488 gekoppelten Zweitantikörpern markiert. Peroxisomen wurden mit Erstantikörpern gegen PEX14 und Alexa 594 gekoppelten Zweitantikörpern detektiert. Um die Mitochondrien anzufärben wurden die Zellen 30 Minuten vor der Fixierung mit einem MitoTracker inkubiert und das endoplasmatische Reticulum wurde durch transiente Transfektion mit dem pDsRed2-ER Vektor 24 Stunden vor der Fixierung sichtbar gemacht. Die Abbildungen für die Mitochondrien und das endoplasmatische Reticulum sind hier mit Falschfarben in grün dargestellt. Die Größenmarkierung entspricht 10 µm.

Die Mitochondrien zeigten nach „knockdown“ von KifC3 einen deutlichen Phänotyp. In Zellen, in denen ein Peroxisomenclustering vorlag, waren auch die Mitochondrien nicht mehr gleichmäßig in der Zelle aufgehängt, sondern konzentrierten sich an der gleichen Stelle am Zellkern wie die Peroxisomen. Mitochondrien sind wie Peroxisomen sehr dynamische Organellen deren Morphologie und intrazelluläre Organisation z.B. durch Teilung und Verschmelzung stark reguliert ist [245]. Die Bindung von Mitochondrien an das Cytoskelett ist notwendig für deren Funktion [246, 247] und der mitochondriale Transport entlang von Mikrotubuli dient u.a. dazu, diese zu Regionen mit hohem ATP Bedarf in der Zelle zu rekrutieren [248].

Schnelle mitochondriale Bewegungen über längere Distanzen wurden bereits beobachtet [249, 250] und genau wie beim peroxisomalen Transport wurden Kinesin-1 (Kif5) und Dynein als die primären Motorproteine beschrieben [122, 123, 251]. Trotzdem scheinen auch andere Kinesine wie z.B. Kinesin-3 (Kif1B) in Neuronen [252] einen Einfluss auf den mitochondrialen Transport zu haben, der abhängig vom Organismus, Zelltyp und metabolischen Ansprüchen der Zelle variiert [253].

Der „knockdown“ von KifC3 wirkte sich ebenfalls auf die Morphologie des endoplasmatischen Reticulums (ER) aus: Die einzelnen tubulären Strukturen waren zwar noch komplett in der Zelle aufgehängt, aber es fand eine deutliche Konzentrierung von ER-Strukturen nahe dem Zellkern ebenfalls an der gleichen Stelle wie das Peroxisomenclustering statt. Genauso wie für den peroxisomalen und mitochondrialen Transport sind Kinesin-1 (Kif5) und Dynein die Hauptmotoren für den anterograden und retrograden Transport von ER-Strukturen [254, 255]. Bei Inhibierung dieser Motorproteine wurde bereits zuvor eine Änderung der ER-Morphologie beobachtet, die sich in der Zunahme und Akkumulation lamellenförmiger Strukturen äußerte [256, 257].

Bei der hier beobachteten perinukleären Konzentrierung von ER-Strukturen nach „knockdown“ von KifC3 in Abbildung 3.28 könnte es sich ebenfalls um ein Clustering der lamellenförmigen Strukturen des ERs handeln. Zudem können ER-Strukturen aber auch durch Bindung an Plus-Enden von wachsenden Mikrotubuli über TACs (tip attachment complex) in die Zellperipherie transportiert werden [254]. Somit existiert für den Transport von ER-Strukturen ein zusätzlicher Mechanismus, der unabhängig von Motorproteinen ist, was die weniger starke Ausprägung des ER-Phänotyps nach „knockdown“ von KifC3 erklären könnte.

Für frühe Endosomen und den Golgi-Apparat resultierte dagegen keine sichtbare phänotypische Veränderung aus der Reduktion der KifC3-Menge. Diese Organellen waren sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Zellen mit KifC3 „knockdown“ überwiegend perinukleär lokalisiert.

Eine andere Arbeitsgruppe zeigte die Beteiligung von KifC3 bei der Integration und der Positionierung des Golgi-Apparates bei verringertem Cholesterin-Spiegel in der Zelle [153]. In adrenokortikalen Zellen aus KifC3^{-/-} „knockout“ Mäusen wies der Golgi-Apparat eine kompakte perinukleäre Lokalisation auf vergleichbar mit der aus normalen Zelllinien. Erst bei verringertem Cholesterin-Spiegel änderte sich in den KifC3^{-/-} „knockout“ Zellen diese kompakte Morphologie und der Golgi-Apparat fragmentierte um den Zellkern. Die Behandlung dieser Zellen mit Nocodazol oder Brefeldin A resultierte ebenfalls in einer Fragmentierung des Golgi-Apparates und die Reassemblierung des Golgi-Apparates nach Entfernen der Reagenzien war in den KifC3^{-/-} „knockout“ Zellen gestört durch reduzierte Bewegung der Golgi-Fragmente in Richtung des Zellkerns bei verringertem Cholesterin-Spiegel. Die Autoren schließen daraus, dass KifC3 zusammen mit Dynein bei der Positionierung des Golgi-Apparates kooperiert. Unter normalen Bedingungen ist hauptsächlich Dynein für den Transport des Golgi-Apparates in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes verantwortlich. Daher resultiert der „knockout“ von KifC3 nicht in einer Änderung der Morphologie des Golgi-Apparates. Es wurde postuliert, dass Dynein bei verringertem Cholesterin-Spiegel aus den zu transportierenden Vesikeln gelöst wird und KifC3 dann die Rolle von Dynein übernimmt, so dass sich ein KifC3 „knockout“ Phänotyp hinsichtlich der Golgi-Morphologie nur bei verringertem Cholesterin-Spiegel zeigt.

Wie in Abbildung 3.22 dargestellt scheint die starke Reduzierung der KifC3-Menge nach Behandlung mit siRNA nicht nur die Positionierung von Peroxisomen zu beeinflussen sondern auch die Morphologie der Mitochondrien und des endoplasmatischen Reticulums zu verändern (Abbildung 3.28). Das Clustering der Organellen nahe dem Zellkern spricht für eine Begünstigung des retrograden Transports in Richtung der Minus-Enden von Mikrotubuli, der bei allen drei Organellen hauptsächlich durch Dynein zustande kommt. Der „knockdown“ von KifC3 scheint also in einer erhöhten Aktivität von Dynein zu resultieren. Diese Theorie und ein Modell für den Einfluss von KifC3 auf den Organellentransport wird in Kapitel 4.2.2 ausführlich behandelt.

3.2.2.3 Interaktion von KifC3 mit peroxisomalen Proteinen

Nachdem ein Einfluss von KifC3 auf die Positionierung von Peroxisomen innerhalb der Zelle gezeigt werden konnte, wurde nun mit Hilfe eines Kernlokalisationsversuches nach Interaktionen peroxisomaler Proteine mit KifC3 gesucht. Dafür wurden COS7 Zellen mit einem Plasmid transient transfiziert, das für die Expression von murinem KifC3 kodierte, das mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) versehen war. Gleichzeitig wurden verschiedene peroxisomale Matrix- und Membranproteine koexprimiert. Bei Bindung an KifC3-NLS sollten diese peroxisomalen Proteine zusammen mit KifC3 in den Zellkern transportiert werden. Die Funktionalität dieses Versuches wurde schon zuvor in der Dissertation von Patrick Schulte-Euler gezeigt [258]. Hier konnte die Interaktion von PEX1 und PEX6-NLS über deren Kernlokalisierung nachgewiesen werden.

Immunostaining gegen KifC3 zeigte, dass KifC3-NLS aufgrund des Kernlokalisierungssignals wie erwartet in den Zellkern transportiert wurde (Abbildung 3.29). Koexprimierte peroxisomale Membranproteine wie PEX3-myc, PEX16-myc, PEX14-myc, PEX13-YFP, PEX26-myc und PEX11 β -myc waren ausschließlich an den Peroxisomen zu finden (Abbildung 3.29). Es besteht die Möglichkeit, dass trotz existierender Interaktion von peroxisomalen Membranproteinen mit KifC3-NLS das peroxisomale Membrantargeting Signal überwiegt. Allerdings konnte zuvor eine Interaktion von PEX26-myc mit PEX6-NLS über die Relokalisation von PEX6-NLS aus dem Zellkern zu den Peroxisomen nachgewiesen werden [258]. Koexpression

von KifC3-NLS mit verschiedenen peroxisomalen Membranproteinen resultierte dagegen in der ausschließlichen Lokalisation von KifC3-NLS im Zellkern und nicht an den Peroxisomen. Daher konnte mit dieser Versuchsanordnung keine Interaktion von KifC3 mit peroxisomalen Membranproteinen gezeigt werden.

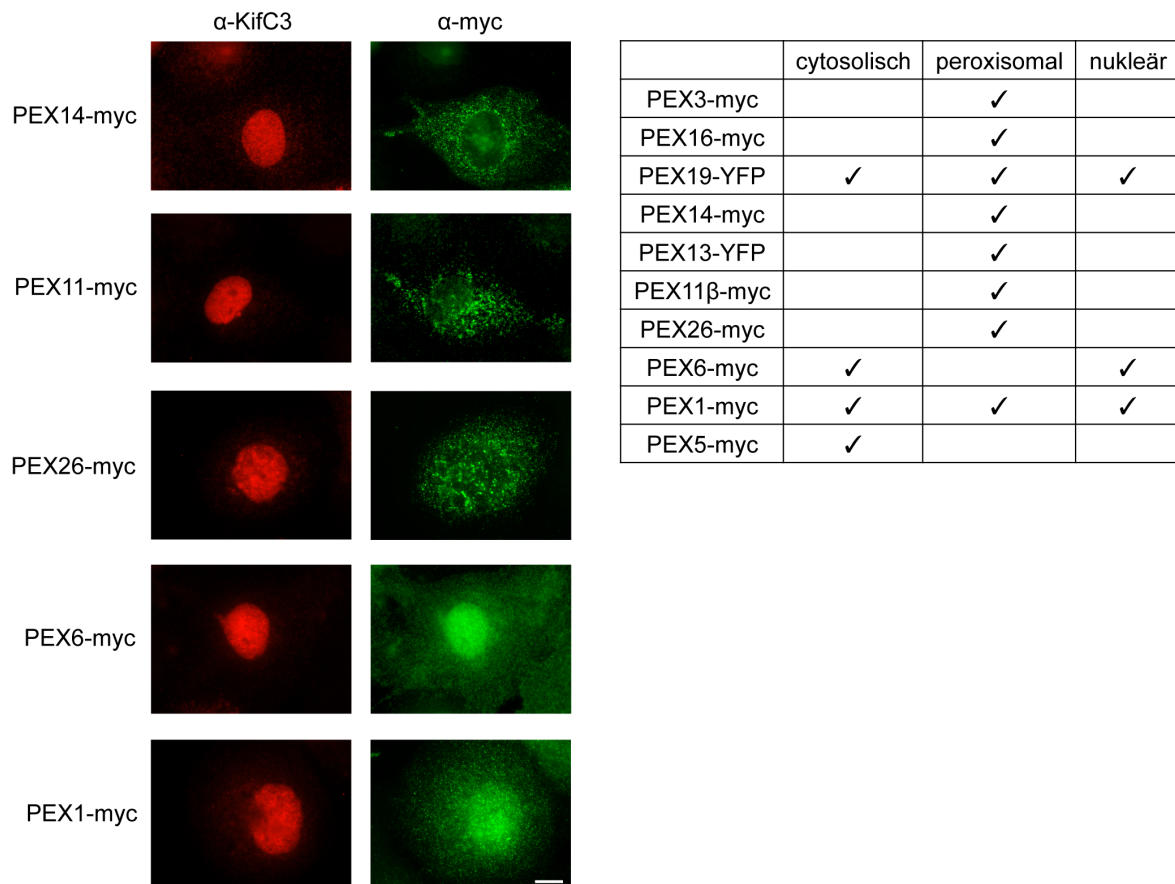


Abbildung 3.29: Kernlokalisationsversuch mit KifC3 und verschiedenen Peroxinen

COS7 Zellen wurden transient mit Plasmiden transfiziert, die für die Expression von murinem KifC3 kodierten, das mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) versehen war. Gleichzeitig wurden verschiedene peroxisomale Proteine, die mit myc oder YFP getagt waren, koexprimiert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion für die Immunfluoreszenzmikroskopie durch Inkubation mit Erstantikörpern gegen KifC3 und myc und Alexa 594 bzw. Alexa 488 markierten Zweitantikörpern präpariert. Die Tabelle zeigt die Kategorisierung der exprimierten Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation. Mit dem Kernlokalisationsversuch konnte keine Interaktion zwischen KifC3-NLS und den untersuchten Peroxinen nachgewiesen werden. Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Der Importrezeptor PEX5-myc und die AAA-ATPase PEX6-myc waren cytosolisch lokalisiert während das Peroxin PEX19-YFP und die AAA-ATPase PEX1-myc sowohl im Cytosol als auch an den Peroxisomen zu finden waren (Abbildung 3.29). Bei gleichzeitiger Expression mit KifC3-NLS zeigte sich teilweise eine Kernlokalisierung von PEX19-YFP, PEX6-myc und PEX1-myc, die aber auch in den Kontrollen ohne KifC3-NLS Expression zu sehen war. Daher konnte die Interaktion von KifC3 mit

diesen Peroxinen in dieser Versuchsanordnung nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Aufgrund der erwähnten Schwierigkeiten Interaktionen von KifC3 mit Peroxinen im Kernlokalisationsversuch zu zeigen, wurde die Wechselwirkung zwischen KifC3 und PEX1 mit einer anderen Methode untersucht. Bei Durchführung eines „yeast-two-hybrid“ Screeningverfahrens mit PEX1 als „bait-Protein“ wurden bereits zuvor Reste der C-terminale Domäne aus etwas 160 Aminosäuren des „prey-Proteins“ KifC3 gefunden [241]. Diese Interaktion sollte im Folgenden sowohl *in vivo* (Abbildung 3.30) als auch *in vitro* mittels Coimmunopräzipitation (Abbildung 3.31) bestätigt werden.

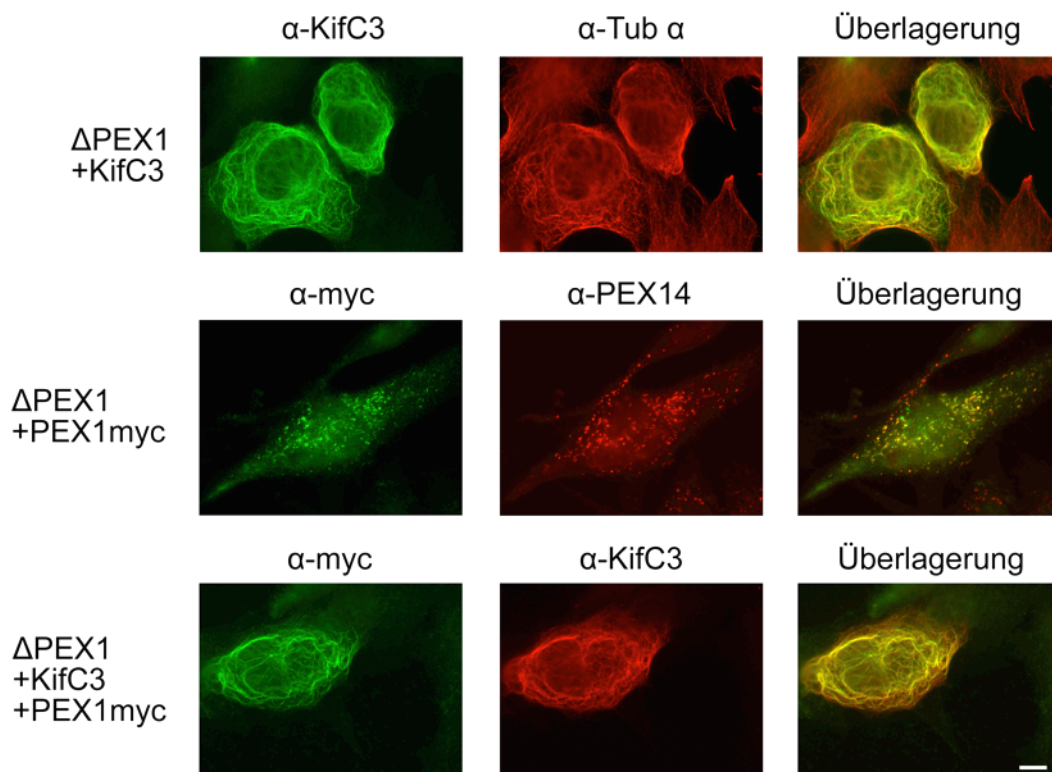


Abbildung 3.30: Überexprimiertes PEX1 kolokalisiert mit KifC3 an den Mikrotubuli

PEX1-defiziente menschliche Fibroblasten wurden mit KifC3, PEX1-myc oder beiden Konstrukten gleichzeitig transient transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion mit Erstantikörpern gegen KifC3, Tubulin α , myc und PEX14 und mit Alexa 488 bzw. Alexa 594 markierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. Überexprimiertes KifC3 war an den Mikrotubuli lokalisiert (obere Reihe), wohingegen PEX1-myc zu den Peroxisomen transportiert wurde (mittlere Reihe). Bei gleichzeitiger Überexpression von PEX1-myc und KifC3 kolokalisierten beide Proteine an den Mikrotubuli (untere Reihe). Die Größenmarkierung entspricht 10 μ m.

Zunächst wurden PEX1-defiziente humane Fibroblasten (Δ PEX1) transient mit PEX1-myc oder humanem KifC3 oder beiden Konstrukten gleichzeitig transfiziert. Wie schon für COS7 Zellen gezeigt (Abbildung 3.20, Kapitel 3.2.2.1), war überexprimiertes KifC3 auch in Δ PEX1-Zellen an den Mikrotubuli lokalisiert, was in Abbildung 3.30 durch Überlagerung mit einer Tubulin α Färbung gezeigt ist. PEX1-myc hingegen war zusammen mit PEX14 an den Peroxisomen zu finden. Bei Koexpression von KifC3 und PEX1-myc allerdings wurde PEX1-myc zu den Mikrotubuli transportiert, wo es mit KifC3 kolokalisierte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass PEX1 über Interaktion mit KifC3 zu den Mikrotubuli rekrutiert werden kann.

Um die Interaktion von KifC3 mit PEX1 zu bestätigen, wurde eine Coimmunopräzipitation (CoIP) mit Zelllysaten aus COS7 Zellen durchgeführt, die entweder PEX1-myc oder KifC3 oder beide Proteine gleichzeitig überexprimierten. PEX1-myc wurde über α -myc Antikörper an magnetische Partikel gebunden und KifC3 nach Bindung an PEX1 eluiert. In Abbildung 3.31 sind sowohl die Überstände vor Elution (links) als auch die Eluate der Coimmunopräzipitation (rechts) dargestellt nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit Antikörpern gegen KifC3 und PEX1. Die Anwesenheit von KifC3 in den Überständen vor Elution zeigt, dass KifC3 im Überschuss exprimiert wurde und die Bindungsstellen für KifC3 vollständig besetzt waren (Abbildung 3.31, links). Die Verschiebung der KifC3-Bande in diesen Proben zu höheren Molekulargewichten lässt sich dadurch erklären, dass zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen sehr viel Rinderserumalbumin während der CoIP zugegeben wurde, das auf der gleichen Höhe wie KifC3 im SDS-Gel läuft und somit die KifC3 Bande verzerrte.

PEX1-myc konnte erfolgreich an die Magnetpartikel gebunden werden und wurde nach Elution (Abbildung 3.31 rechts, erste und zweite Spur) detektiert, wobei ein sehr geringer Anteil an endogenem PEX1 unspezifisch gebunden hatte (letzte Spur). Bei Proben, die PEX1-myc und KifC3 koexprimierten, konnte KifC3 mit PEX1-myc interagieren und wurde nach Elution detektiert (Abbildung 3.31 rechts, zweite Spur). Allerdings trat eine unspezifische Bindung von KifC3 an die Partikel auf, da KifC3 auch in Eluaten detektiert wurde, die kein PEX1-myc enthielten (letzte Spur). Quantifizierung der Bandenintensitäten zeigte, dass bei Koexpression von KifC3 mit PEX1-myc doppelt so viel KifC3 eluiert wurde. Somit erbrachte die

Coimmunopräzipitation von KifC3 mit PEX1-myc einen weiteren Beweis für die Interaktion dieser beiden Proteine.

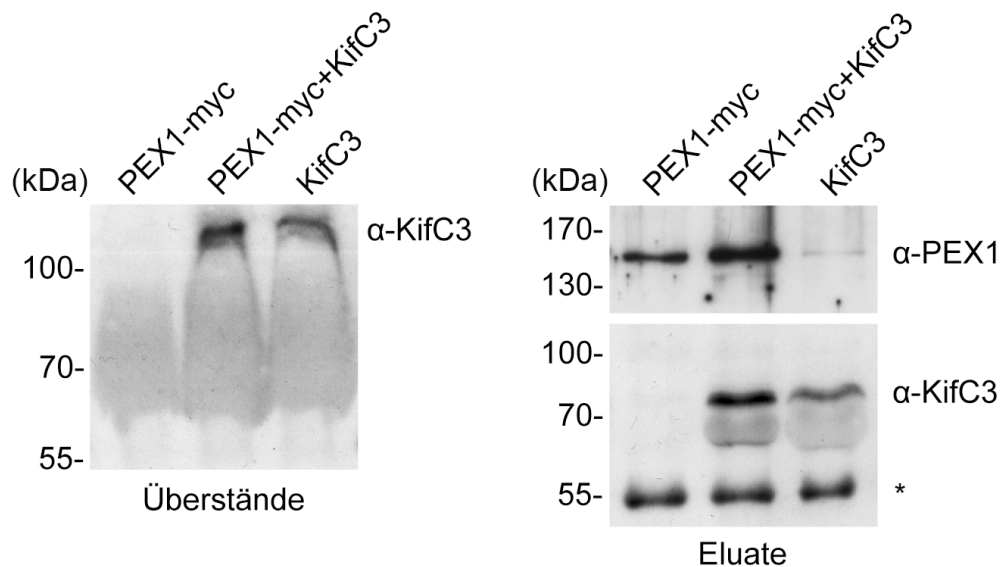


Abbildung 3.31: Coimmunopräzipitation von KifC3 mit PEX1 aus Zelllysaten

COS7 Zellen, die transient entweder PEX1-myc oder humanes KifC3 oder beide Proteine gleichzeitig exprimierten, wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert. Aus den Zelllysaten wurde KifC3 über Bindung an PEX1-myc, das über Antikörper an magnetische Partikel gekoppelt worden war, präzipitiert und im Eluat nachgewiesen. Die Proben wurden in einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Tank-Blotting auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Die Proteinbanden wurden durch spezifische Erstantikörper (α -KifC3 1:333, α -PEX1 1:10000) und HRP-markierten Zweitantikörper (Verdünnung 1:15000) sichtbar gemacht. Links sind die Überstände vor Elution (40 μ L aufgetragen) und rechts die Eluate (10 μ L aufgetragen) der Colp dargestellt. Die Detektion von KifC3 im Eluat bei gleichzeitiger Anwesenheit von PEX1 bestätigt die Interaktion von KifC3 und PEX1 *in vivo*. Die Bande bei 55kDa im rechten Blot (*) kommt durch die verwendeten IgGs zustande und kann als Ladekontrolle betrachtet werden.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die hohe Dynamik von Peroxisomen in den zwei bearbeiteten Teilaspekten der peroxisomalen *de novo* Synthese und Bewegung.

Die Entdeckung der *de novo* Synthese von voll funktionsfähigen Peroxisomen in Zelllinien, die aufgrund von Mutationen keine nachweisbaren peroxisomalen Strukturen enthalten (Δ PEX3, Δ PEX16, Δ PEX19), nach Einführung der entsprechenden cDNA [21-23, 226] stellte das bisher verbreitete Modell in Frage, nach dem sich Peroxisomen ausschließlich durch Wachstum und Teilung bereits existierender Peroxisomen vermehren [19]. Auch wenn verschiedenste Experimente die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums bei der peroxisomalen Biogenese nahe legen, ist der genaue Mechanismus weder für niedere noch für höhere eukaryotische Organismen geklärt [31, 34, 35, 39-41].

Hier wurde die Kinetik der peroxisomalen Biogenese in humanen PEX16-defizienten Fibroblasten (Δ PEX16) nach Wiedereinführung von PEX16 charakterisiert und in drei verschiedene Phasen eingeteilt (Kapitel 3.1.1.1). In der frühen Phase bildeten sich präperoxisomale Vesikel, die die Peroxine PEX3 und PEX16 enthielten, aber noch nicht kompetent für den Import von peroxisomalen Membran- und Matrixproteinen waren. Diese Präperoxisomen schienen nicht von „lipid rafts“ der Plasmamembran oder anderen Membranen abzustammen, sondern erweckten eher den Eindruck einer Anlagerung an die einzelnen Lamellen des endoplasmatischen Reticulums (ER). Weder das Cytoskelett noch die Motorproteine Kinesin-1 (Kif5) und KifC3 wurden für die Ausbildung peroxisomaler Vorläuferstrukturen benötigt (Kapitel 3.1.1.2).

Der Import peroxisomaler Membranproteine (PMPs) kann in zwei Klassen eingeteilt werden. PMPs der Klasse I werden von PEX19 im Cytosol gebunden und zu den Peroxisomen transportiert [53, 54], wo sie in Abhängigkeit von PEX3 und PEX19 importiert werden [58-60]. Als Vertreter der Klasse II PMPs, die unabhängig von PEX19 und PEX16 in die peroxisomale Membran inserieren, wurde bisher nur PEX3

angenommen [60, 66]. Die hier durchgeführten „knockdown“ Experimente mit siRNA zeigten die von PEX19 unabhängige peroxisomale Lokalisation von neu synthetisiertem PEX3. PEX16 schien nur in den frühen Phasen nach der Transfektion zum Import von PEX3 benötigt zu werden (Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3).

Als zweiter Teilaspekt wurde die Mobilität von präperoxisomalen Vesikeln bei der *de novo* Synthese und von reifen Peroxisomen in normalen Zellen in Abhängigkeit der Motorproteine Kinesin-1 (Kif5) und KifC3 untersucht (Kapitel 3.2). Die Beweglichkeit von Peroxisomen stellt deren Positionierung innerhalb der Zelle sicher. Im Gegensatz zu anderen Organellen wie dem endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat sind Peroxisomen gleichmäßig in der Zelle verteilt, was unter anderem für deren Funktion beim Abbau von ROS, reaktiven oxidativen Spezies, essentiell ist [1, 14]. Der Verlust von Peroxisomen in einem Bereich der Zelle kann zu regionalem oxidativen Schaden führen [259]. Zudem kann die vermehrte Anwesenheit von Peroxisomen in einer bestimmten Umgebung wie z.B. in großer Nähe zum ER oder zu Lipidtröpfchen bei besonderen metabolischen Bedingungen notwendig sein [185, 260, 261]. Diese Interaktionen scheinen eine wichtige Rolle im peroxisomalen Lipidmetabolismus zu spielen [182-184]. Lebendbeobachtungen zeigten lange gerichtete Bewegungen von Peroxisomen, die in engen Kontakten und Interaktionen mit anderen Peroxisomen resultierten [186]. Allerdings konnte der Austausch von Proteinen oder Metaboliten zwischen einzelnen Peroxisomen bisher nicht nachgewiesen werden [186-188].

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse werden nun in den folgenden Kapiteln getrennt für die beiden Teilaspekte der peroxisomalen Biogenese und der peroxisomalen Bewegung diskutiert.

4.1 Peroxisomenbiogenese

4.1.1 Rolle des endoplasmatischen Reticulums bei der *de novo* Synthese von Peroxisomen

Die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums (ER) bei der Biogenese von Peroxisomen wird mittlerweile weitestgehend angenommen. Allerdings ist die Rolle, die das ER bei der *de novo* Synthese in Peroxisomen-defizienten Zelllinien spielt, stark umstritten [42, 64, 227, 228, 262]. Die postulierten Modelle reichen von der Annahme, dass Peroxisomen als semiautonome Organellen fungieren [61, 187] bis zur Vorstellung, dass Peroxisomen fast vollständig vom ER abhängig sind [36].

Bei der Ansicht, dass Peroxisomen als semiautonome Organellen fungieren, wird der Import sämtlicher peroxisomaler Matrix- und Membranproteine, unter anderem auch PEX3, aus dem Cytosol über die Rezeptoren PEX19 und PEX5/PEX7 postuliert [65] und das ER wird nur als Lieferant für Lipide über unilateralen Transport angesehen [29]. Vesikulärer Transport zwischen ER und Peroxisomen spielt hier keine Rolle. Diese Theorie wird zusätzlich durch die Beobachtungen gestützt, dass die peroxisomale Biogenese in einer *S. cerevisiae* Sec61p-Mutante, die einen Importdefekt in das ER über den ER-Translocon Sec61-Komplex aufwies, nicht gestört war [263]. Zudem konnte bisher keine Abhängigkeit der peroxisomalen Biogenese von COPI- oder COPII-Wegen in Säugerzelllinien bestätigt werden [43, 44].

Im Gegensatz dazu steht das Modell der Abschnürung präperoxisomaler Vesikel vom ER über einen anderen als den bereits bekannten COPI- und COPII-Weg in Abhängigkeit von PEX19 nach Insertion von PEX3 und PEX16 ins ER [31, 40, 41]. *In vitro* Experimente, die eine ER abhängige Bildung von Peroxisomen zeigen [34, 35], sprechen ebenfalls für dieses Modell. Kürzlich wurde in *S. cerevisiae* sogar beobachtet, dass alle untersuchten PMPs vor peroxisomalem Import über Sec61p und Get3p in das ER inserierten [36].

In dieser Arbeit wurde die Biogenese von Peroxisomen in PEX16-defizienten humanen Fibroblasten nach Transfektion mit PEX16-YFP über die Zeit verfolgt (Kapitel 3.1.1.1). Zunächst entstanden präperoxisomale PEX16- und PEX3-positive Vesikel, deren Bildung schon 24 Stunden nach der Transfektion ihr Maximum erreicht hatte. In dieser Phase enthielten einige Vesikel schon Membranproteine wie PEX14, allerdings nahm die Anzahl der Zellen mit PEX14-positiven Präperoxisomen über die nächsten 24 Stunden weiter zu, so dass diese Phase erst 48 Stunden nach der Transfektion abgeschlossen war. Zuletzt nach Assemblierung des Translocons wurden peroxisomale Matrixproteine importiert, wie in diesem Fall für Thiolase beobachtet, womit die Komplementation der Peroxisomen 72 Stunden nach der Transfektion abgeschlossen war. Dieser zeitliche Verlauf der Komplementation von PEX16-defizienten Fibroblasten stimmt mit vorherigen Ergebnissen überein. South et al. beschreiben ebenfalls eine Komplementation PEX16-defizienter Fibroblasten nach Mikroinjektion mit *PEX16* cDNA in drei Schritten, die erst nach 72 Stunden abgeschlossen war [21, 25].

4.1.1.1 Abschnürung präperoxisomaler Vesikel vom endoplasmatischen Reticulum

Gleichzeitige Markierung von Präperoxisomen in der frühen Phase und den einzelnen ER-Lamellen durch Expression von PEX16-YFP und eines ER-Markers ermöglichte die Beobachtung dieser beiden Strukturen in lebenden Zellen (Kapitel 3.1.1.2). Die Positionierung der PEX16-positiven Präperoxisomen entlang der einzelnen ER-Lamellen und die teilweise parallele Bewegung der beiden Strukturen könnte für eine Anhaftung der Vesikel an das ER sprechen. Sowohl der meist geringe Abstand zwischen Peroxisomen und ER [27, 28] als auch die Lokalisation peroxisomaler Membranproteine in retikulären Strukturen, die durchgängig mit dem ER verbunden waren, wurden bereits beobachtet [39]. Zudem wurde in zellfreien *in vitro* Versuchen mit ER-Membranen aus Hefezellen und exogen zugeführtem Cytosol über die Verfolgung von Pex11p-HA und Pex3p-GFP bzw. Pex15p-GFP die Bildung von vesikulären Strukturen aus dem ER in Abhängigkeit von Pex19p und anderen cytosolischen Faktoren gezeigt [34, 35]. Aus der Coelution von Pex3p-GFP und Pex11p-HA in der durchgeführten Affinitätschromatographie bzw. Pex3p und GST-Pex15p nach Bindung an eine Glutathion-Agarose-Matrix schlossen die Autoren,

dass Pex11p und Pex3p bzw. Pex15p und Pex3p in denselben Vesikeln lokalisiert waren.

Bei dem in dieser Arbeit angefertigten 3D Modell konnten wie bereits zuvor mit aufwendigen Rekonstruktionstechniken [28] weder Verbindungselemente zwischen Präperoxisomen und einzelnen ER-Lamellen noch „budding“ von Vesikeln aus dem ER dargestellt werden. Da die präperoxisomalen Vesikel von Anfang an gleichmäßig in der Zelle verteilt waren, scheinen die „exit sites“ für diese Vesikel nicht auf eine Region beschränkt zu sein, sondern vielmehr gleichmäßig verteilt an zahlreichen Stellen entlang der ER-Lamellen zu existieren.

Trotz aller bisher erbrachter Hinweise auf die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums bei der *de novo* Synthese von Peroxisomen, zeigt die Möglichkeit der Neubildung von Peroxisomen aus den Mitochondrien in Δ Pex3p *S. cerevisiae* bei Expression einer mit einem mitochondrialen Targetingsignal versehenen Pex3p-Mutante [264], dass eventuell jedes endogene Membransystem, das Pex3 enthält, als Ursprung für die peroxisomale Membran dienen kann.

4.1.1.2 Rolle der „frühen Peroxine“ PEX3, PEX16 und PEX19 bei der Bildung präperoxisomaler Vesikel

Ein weiterer Hinweis auf die Herkunft der Präperoxisomen ergibt sich aus der teilweisen Lokalisation von PEX16 im ER bei Überexpression von hohen Mengen dieses Proteins zusätzlich zur cytosolischen bzw. peroxisomalen Lokalisation sowohl in humanen Δ PEX16 Fibroblasten und anderen Peroxisomen-defizienten Fibroblasten-Zelllinien (Δ PEX3 und Δ PEX19) als auch in normalen humanen Fibroblasten (Daten nicht gezeigt) [40, 41]. Ob dies einen Effekt der Überexpression oder einen Transportweg von PEX16 über das ER mit nachfolgender Vesikelabschnürung darstellt, konnte aufgrund der sehr geringen endogenen Mengen an PEX16, vor allem in Peroxisomen-defizienten Zelllinien (Δ PEX3 und Δ PEX19 [224]), und der dafür fehlenden Detektionsmethode bisher nicht geklärt werden.

Mit Hilfe von „pulse-chase“ Versuchen mit photoaktivierbarem (PA) PEX16-GFP wurde im ER lokalisiertes PEX16-PAGFP selektiv angeregt und anhand derselben Zelle die Bildung PEX16-positiver Vesikel über die Zeit verfolgt [41]. Dabei beruhte die Versuchsanordnung auf der Beobachtung, dass das in COS7 Zellen exprimierte PEX16-GFP ausschließlich im ER und den Peroxisomen lokalisiert war und sich nicht, wie z.B. in humanen Hautfibroblasten, auch ein Teil des Proteins im Cytosol befand. Allerdings impliziert die Tatsache, dass im Cytosol keine YFP-Fluoreszenz zu sehen war nicht, dass dort auch kein PEX16-YFP vorhanden war. Eine *in vitro* Transkriptions-Translations-Reaktion, bei der in Anwesenheit von ER-Mikrosomen mehr PEX16 in die Membranen gelangte als bei Zugabe der Mikrosomen nach Abschluss der Reaktion, sollte den cotranslationalen Import von PEX16 in das ER zeigen [41]. Allerdings schließt die Versuchsanordnung dieser Studie nicht aus, dass bei Photoaktivierung auch im Cytosol befindliche PEX16-PAGFP Moleküle angeregt wurden, die aus dem Cytosol in die Peroxisomen transportiert wurden und stellt somit keinen endgültigen Beweis für die Neubildung von Peroxisomen aus dem ER dar.

Bei Toro et al. lokalisierte PEX16-GFP auch in PEX16-defizienten Zelllinien (Δ PEX16) zunächst im ER bevor es später an PEX16-positiven präperoxisomalen Strukturen zu sehen war [40]. Lebendzellbeobachtungen von Δ PEX16 Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP über 16 Stunden zeigten in eigenen Versuchen, dass die Zellen, die anfangs so hohe Mengen an PEX16-YFP exprimierten, dass eine Lokalisation im ER sichtbar war, aufgrund der hohen exprimierten Mengen des Proteins über den beobachteten Zeitraum in Apoptose gingen (Daten nicht gezeigt). Eine sehr geringe, zu Anfang nicht detektierbare Expression an PEX16-YFP führte dagegen eher zur erfolgreichen Komplementation bei hohen Überlebensraten der Zellen. In der erwähnten Studie wurde die Bildung präperoxisomaler Vesikel nicht in einzelnen Zellen verfolgt, sondern zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert. Daher kann nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass die Zellen, die zu Anfang PEX16-GFP im ER lokalisierten auch die Zellen waren, die zu späteren Zeitpunkten PEX16-YFP positive Vesikel ausbildeten und komplementierten.

Sowohl in PEX3-defizienten Hefen als auch in humanen Δ PEX3 Fibroblasten wurde neu synthetisiertes PEX3 nach Wiedereinbringung der entsprechenden cDNA zunächst am ER beobachtet bevor sich PEX3-positive Vesikel bildeten [30-32, 40]. Zudem belegt die Glycosylierung von PEX3 in humanen Fibroblasten nach künstlicher Einführung einer N-Glycosylierungsstelle das Vorhandensein von glycosyliertem PEX3 in den Peroxisomen [40].

In dieser und anderen Arbeitsgruppen konnte PEX3 allerdings nur bei gleichzeitiger Überexpression von PEX16 am ER detektiert werden [41], wobei hierfür die ersten 33 Aminosäuren des PEX3 N-Terminus (PEX3¹⁻³³) zur Bindung von PEX3 an PEX16 ausreichend waren [240]. In Peroxisomen-defizienten Δ PEX19 Zellen wurde PEX3 bei endogenen Mengen an PEX16 in die Mitochondrien mislokalisiert [240]. Somit scheint eine ausreichend hohe Menge an PEX16 nötig zu sein, um PEX3 in das ER zu inserieren. Die ER-Lokalisation von PEX16 scheint dagegen unabhängig von PEX3 zu sein, da PEX16-GFP auch in Δ PEX3 Zellen am ER detektiert wurde [40]. Bei der Annahme einer Abschnürung von präperoxisomalen Vesikeln vom ER lassen diese Beobachtungen die Spekulation zu, dass PEX16 in frühere Schritte der peroxisomalen Biogenese involviert sein könnte und die Anwesenheit von PEX16 in der ER-Membran essentiell für die nachfolgende Insertion von PEX3 in das ER und Ausbildung von Präperoxisomen in Abhängigkeit von PEX19 sein könnte.

Der Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Komplementation von Δ PEX16 und Δ PEX3 Zellen zeigt ebenfalls einen Unterschied. In PEX16-defizienten Fibroblasten wurden schon 48 Stunden nach Transfektion mit PEX16 Matrixproteine, in diesem Fall Thiolase, in die neu gebildeten Peroxisomen importiert und spätestens 72 Stunden nach Transfektion war die Komplementation abgeschlossen, wohingegen die vollständige Komplementation von Δ PEX3 Fibroblasten 3-7 Tage benötigte [23, 240]. Ob sich diese längere Zeitspanne bei der Komplementation von Δ PEX3-Fibroblasten im Gegensatz zu Δ PEX16-Fibroblasten auf die Beteiligung der beiden Peroxine in zeitlich unterschiedlichen Schritten bei der peroxisomalen *de novo* Synthese begründet oder eventuell durch eine sehr niedrige Proteinmenge an PEX16 in Δ PEX3 Zellen begründet ist [224], lässt sich anhand der bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig klären. Die Effizienz der Komplementation und somit der zeitliche Rahmen,

in dem diese abläuft, sind auch immer abhängig von den verwendeten Plasmiden und deren Transfektionseffizienz.

Gleichzeitige Verfolgung von neu synthetisiertem PEX3 und PEX16 mit Hilfe von „pulse-chase“ Versuchen in Peroxisomen-defizienten Δ PEX3 und Δ PEX16 Zellen könnte eventuell anhand der Lokalisation beider Proteine Aufschluss geben, ob eine zeitliche Reihenfolge für diese beiden Peroxine bei der *de novo* Synthese von Peroxisomen existiert.

4.1.1.3 Import weiterer Membranproteine in die präperoxisomalen Vesikel

Die Rolle des ERs beim Import peroxisomaler Membranproteine ist sowohl bei der *de novo* Synthese von Peroxisomen in Peroxisomen-defizienten Zelllinien als auch in normalen Zelllinien mit bereits vorhandenen Peroxisomen umstritten. Das 1985 von Lazarow und Fujiki postulierte Modell des posttranslationalen Imports für peroxisomale Membran- und Matrixproteine [19], wird durch neuere Ergebnisse, die die peroxisomale Lokalisation verschiedener PMPs nach Insertion in das ER zeigen, immer mehr hinterfragt [36, 40]. Van der Zand et al. beschreiben in Wildtyp und Δ Pex3p *S. cerevisiae* die Insertion mehrerer beobachteter PMPs (Pex2p, Pex8p, Pex10p, Pex11p, Pex13p, Pex14p, Pex15p, Ant1p) in das ER, bevor diese in punktierten Bereichen am ER und schließlich in Abhängigkeit von Pex3p und Pex19p in vom ER unabhängigen Peroxisomen zu sehen waren. Die Autoren schließen daraus, dass PMPs zumindest in *S. cerevisiae* grundsätzlich immer über vesikulären Transport vom ER zu den Peroxisomen gelangen und der Import von Matrixproteinen anschließend aus dem Cytosol in diese Präperoxisomen erfolgt.

Aufgrund diverser Unterschiede hinsichtlich der peroxisomalen Biogenese und der peroxisomalen Proteinausstattung zwischen Hefen und Säugerzellen können die für Hefen entwickelten Modelle nicht immer automatisch für Säugerzellen übernommen werden. Bei der hier durchgeführten Komplementation der Peroxisomenbiogenese in PEX16-defizienten humanen Fibroblasten bildeten sich in einer frühen Phase PEX16- und PEX3-positive präperoxisomale Vesikel aus, die größtenteils noch nicht importkompetent für Membranproteine waren (siehe Kapitel 3.1.1.1). PEX14 war in dieser Phase in den Mitochondrien mislokalisiert und wurde zu keinem Zeitpunkt am

ER detektiert. Erst 24 Stunden später wurden PEX14 (Kapitel 3.1.1.1, Abbildung 3.3) und PEX13 [45] in die Präperoxisomen importiert. Diese Ergebnisse sprechen für einen ER unabhängigen posttranslationalen Transportweg der peroxisomalen Membranproteine (hier für PEX14 gezeigt, für PEX13 siehe [45]) aus dem Cytosol zu den Peroxisomen in Säugerzellen.

Dieselbe Arbeitsgruppe, die den Import aller PMPs über vesikulären Transport vom ER postulierte [36], zeigte kürzlich in *S. cerevisiae* die Abschnürung verschiedenartiger präperoxisomaler Vesikel vom ER und die Ausbildung reifer Peroxisomen nach Fusion dieser Vesikel und Import von Matrixproteinen [265]. Haploide Hefezellen mit unterschiedlichem „mating type“, die verschiedene Peroxine jeweils mit einer anderen Hälfte des fluoreszierenden Venus-Proteins exprimierten, wurden gepaart und Interaktionen zwischen den getagten Proteinen durch erscheinende Fluoreszenz angezeigt. Die einzelnen Komponenten des „docking“ Komplexes (Pex13p und Pex14p) und des RING-Finger Komplexes (Pex2p, Pex10p) interagierten bereits im ER und wurden als separate Vesikel abgeschnürt, so dass das Translocon aus „docking“ Komplex und RING-Finger Komplex zum Import peroxisomaler Matrixproteine in diesen Vesikeln noch nicht ausgebildet war. Erst durch Fusion dieser Vesikel in Abhängigkeit von Pex1p und Pex6p konnten nach Ausbildung des Translocons Matrixproteine importiert werden. Die Tatsache, dass Pex1p und Pex6p ebenfalls in unterschiedlichen Vesikeln vorhanden waren, nämlich Pex1p in Pex13p-haltigen Vesikeln und Pex6p in Pex10p-haltigen Vesikeln, wurde bereits zuvor von Titorenko et al. *in vitro* gezeigt [266]. Pex1p und Pex6p waren nach Dichtegradientenzentrifugation von *Y. lipolytica* Extrakten in verschiedenen Fraktionen zu sehen, die unterschiedliche peroxisomale Vorläufer darstellten und in Abhängigkeit von Pex1p und Pex6p und ATP zu größeren Vesikeln fusionierten.

Im Falle von Säugerzellen wurde bisher nicht von verschiedenartigen präperoxisomalen Vesikeln berichtet. Verschiedene Experimente in normalen Säugerzellen mit bereits vorhandenen Peroxisomen lassen die Fusion zumindest von reifen Peroxisomen aufgrund von nicht detektierbarem Austausch von Membran- und Matrixproteinen zwischen Peroxisomen unwahrscheinlich erscheinen [186, 188]. Die Fusion von Zellen mit unterschiedlich markierten peroxisomalen Matrix- bzw. Membranproteinen nach Behandlung mit Cycloheximid zeigte keine Überlagerung

der beiden Signale [188]. Lebendzellbeobachtungen bestätigten diese Ergebnisse. Nach Fusion von Zellen mit unterschiedlich markierten peroxisomalen Matrixproteinen konnten zwar Interaktionen und Kolokalisationen von Peroxisomen detektiert werden, allerdings trennten sich diese nach einiger Zeit wieder ohne sichtbaren Austausch von Matrixproteinen [186].

Anhand dieser und in den folgenden Kapiteln erhaltener Erkenntnisse wird in Kapitel 4.1.4 ein Modell für die peroxisomale *de novo* Synthese in Säugerzellen vorgestellt.

4.1.2 Rolle der peroxisomalen *de novo* Biogenese in Zelllinien mit bereits vorhandenen Peroxisomen

Die Anzahl der Peroxisomen innerhalb einer Zelle vergrößert sich während des Zellzyklus und bei Teilung werden die Peroxisomen zwischen den beiden entstehenden Zellen aufgeteilt. Auf welche Art die Vermehrung der Peroxisomen abläuft, ist ebenfalls ein sehr stark diskutiertes Thema [267-269]. Zusätzlich zu Wachstum und Teilung existierender reifer Peroxisomen [19] zeigten neuere Ergebnisse die Möglichkeit der *de novo* Synthese von Peroxisomen auch in Zellen mit bereits vorhandenen Peroxisomen [36, 41]. Allerdings ist bisher ungeklärt, welchen Anteil die Neubildung im Gegensatz zu Wachstum und Teilung bei der Vermehrung von Peroxisomen spielt.

Die im vorherigen Kapitel 4.1.1 beschriebene Studie von Van der Zand et al. [36] geht von der Insertion aller peroxisomaler Membranproteine (PMPs) in das ER und Ausbildung präperoxisomaler Vesikel als grundsätzlichen Importweg für PMPs in *S. cerevisiae* aus. Im Gegensatz dazu existieren Daten und daraus entwickelte Modelle, die Wachstum und Teilung als einzigen Mechanismus zur Vermehrung von Peroxisomen bei bereits vorhandenen reifen Peroxisomen annehmen [187].

Die Beobachtung, dass ein Großteil markierter reifer Peroxisomen importkompetent für neu synthetisierte Membran- und Matrixproteine bei gleichzeitig nicht detektierbarem Austausch von Proteinen zwischen Peroxisomen war, spricht gegen einen ausschließlichen Importweg über das ER und für eine posttranslationale Insertion in bereits vorhandene reife Peroxisomen [188]. Dagegen zeigten „pulse-

chase“ Experimente mit photoaktivierbarem GFP-SKL in NRK (normal rat kidney) Zellen nach zweimaliger Aktivierung eine heterogene Verteilung von „altem“ und „neuem“ Fluoreszenzsignal [41]. Die Autoren schließen daraus, dass die erst nach dem zweiten pulse sichtbaren Peroxisomen, die 20% der kompletten Population ausmachten, *de novo* gebildet wurden. Dies basiert auf der Voraussetzung, dass bei Teilung reifer Peroxisomen alle Komponenten gleichmäßig auf die beiden entstehenden Kompartimente verteilt werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass nach Verlängerung eines Peroxisoms vor dessen Teilung die enthaltenen PMPs asymmetrisch verteilt waren. Nach Einschnürung der Struktur wurden die noch fehlenden PMPs und Matrixproteine in den „neuen“ Teil importiert und die so entstandenen Peroxisomen geteilt [270].

Diese Studien schließen zwar die Möglichkeit der *de novo* Synthese als zusätzlichen Weg zur Vermehrung von Peroxisomen nicht aus, zeigen aber, dass Wachstum und Teilung bereits vorhandener Peroxisomen mit nachfolgendem posttranslationalem Import, so wie zuvor schon angenommen [19], einen erheblichen Anteil bei der Aufrechterhaltung der peroxisomalen Population darstellen.

4.1.3 Importmechanismus für PEX3 in die peroxisomale Membran

Trotz neuerer Erkenntnisse, dass in Hefezellen ein Großteil der peroxisomalen Membranproteine über vesikulären Transport zwischen ER und Peroxisomen importiert wird [36], wird für Säugerzellen nach wie vor der posttranslationale Import der Membranproteine aus dem Cytosol in Abhängigkeit von PEX19 und PEX3 [53, 54, 58, 59] als überwiegender Importweg angenommen. Das einzige bisher beschriebene peroxisomale Membranprotein, das in Säugerzellen unabhängig von PEX19 importiert wird, stellt PEX3 dar [60].

Der „knockdown“ von PEX19 mit siRNA in humanen Fibroblasten resultierte zwar in einem peroxisomalen Importdefekt für PMP70-myc, übte aber keinen Effekt auf den Import von PEX3-myc aus. Behandlung der gleichen Zelllinie mit siRNA gegen PEX16 beeinflusste den Import von PEX3-myc nur in den frühen Phasen nach der Plasmidtransfektion (Ergebnisse siehe Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Daher lässt sich vermuten, dass PEX16 beim peroxisomalen Import geringer Mengen an PEX3

durchaus eine Rolle spielt, dieser Effekt aber über die Zeit durch hohe exprimierte Mengen an PEX3 ausgeglichen werden kann und dann PEX3 nach Sättigung des Importweges über endogenes PEX16 auch unabhängig von PEX16 in die peroxisomale Membran inseriert.

Daraus kann geschlossen werden, dass PEX3 zumindest in normalen Zellen mit bereits vorhandenen Peroxisomen unabhängig von PEX19 und nur bei geringen Mengen abhängig von PEX16 in die peroxisomale Membran eingebracht wird. Dies schließt somit zumindest in normalen Zelllinien mit vorhandenen reifen Peroxisomen einen alleinigen Importweg für PEX3 über das ER aus, da der Vorgang der Vesikelbildung aus dem ER abhängig von allen drei „frühen Peroxinen“ PEX3, PEX16 und PEX19 abläuft. Daher scheint ein posttranslatonaler Import von PEX3 aus dem Cytosol unabhängig von PEX19 als sehr wahrscheinlich. Dabei könnte PEX16, wie auch schon zuvor postuliert, bei endogenen Mengen als Ankerprotein für PEX3 dienen [41, 65].

4.1.4 Postulierung eines Modells für die semiautonome Biogenese von Peroxisomen

Aufgrund der in den vorigen Kapiteln erläuterten Erkenntnisse wird im Folgenden ein Modell der peroxisomalen *de novo* Synthese in Peroxisomen-defizienten Zelllinien nach Wiedereinführung der entsprechenden cDNA vorgeschlagen (Abbildung 4.1). Das Modell basiert auf den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen und Beobachtungen aus anderen veröffentlichten Studien [31, 39-41, 45, 224] und bezieht sich aufgrund der bereits beschriebenen Unterschiede zwischen Hefen und Säugerzellen nur auf die peroxisomale Biogenese in Säugerzellen.

Da in dieser Arbeit kein anderes Membransystem als Ursprung für die Neubildung von Peroxisomen detektiert werden konnte (siehe Kapitel 3.1.1.2), wird weiterhin das ER als Herkunftsort der beobachteten präperoxisomalen Vesikel angenommen. PEX16 wurde in überexprimierten Mengen als PEX16-YFP oder PEX16-myc teilweise im ER beobachtet (Daten nicht gezeigt) [41]. Endogenes PEX16 konnte allerdings aufgrund der geringen exprimierten Mengen und fehlenden ausreichend sensitiven Nachweismethoden nicht detektiert werden. Trotzdem soll in diesem

Modell von einer Insertion von PEX16 in das ER ausgegangen werden. Der Beweis, ob dieser Vorgang, wie bereits in Hefen für PEX3 gezeigt, abhängig von den ER-Importkomplexen Sec61p bzw. Get3p ist [36, 38], muss für Säugerzellen noch erbracht werden.

Die Bildung PEX16- und PEX3-positiver Vesikel wurde in einem ersten Schritt der peroxisomalen Biogenese beobachtet. Die Abwesenheit detektierbarer peroxisomaler Strukturen in Δ PEX3 Zellen [23, 24] zeigt, dass PEX3 in den frühesten Phasen der *de novo* Synthese bei der Ausbildung präperoxisomaler Vesikel eine Rolle spielt. Die Lokalisation von PEX3-YFP mit PEX16-myc im ER statt in den Mitochondrien bei gleichzeitiger Expression in Δ PEX19 Zellen [41, 240], legt die Vermutung nahe, dass PEX3 in einem späteren Schritt als PEX16 bei der Vesikelbildung wirkt.

Die Peroxisomendefizienz in Zellen, die aufgrund von Mutationen im *PEX19*-Gen kein PEX19 enthalten, zeigt die Beteiligung dieses Peroxins bei der Ausbildung präperoxisomaler Vesikel [22]. Einige Arbeitsgruppen berichteten bereits, dass PEX19 für den Export von peroxisomalen Membranproteinen aus dem ER benötigt wird [34-36]. Die Bindung zwischen PEX3 und PEX19 wurde als essentiell für die peroxisomale *de novo* Synthese festgestellt [240]. Mutationen in der PEX19-Bindedomäne von PEX3 (L93N und A323Q) beeinträchtigten die Komplementation PEX3-defizienter Zellen. Die Bildung PEX16-positiver präperoxisomaler Vesikel war in Δ PEX3 Zellen nach Transfektion von PEX3(L93N) oder PEX3(A323Q) im Gegensatz zu unmutiertem PEX3 sehr stark reduziert.

Die Bildung präperoxisomaler Vesikel könnte an anderen Stellen als den typischen „ER-exit-sites“ erfolgen. Eine Rolle der weniger gut charakterisierten Isoform Sec16B des COPII-coat bildenden Proteins Sec16 beim Export von PEX16 aus dem ER wurde für Säugerzellen kürzlich postuliert [46]. In Hefen markiert Sec16p die „ER-exit-sites“ (ERES) und vereinfacht durch Interaktion mit COPII die Bildung des Vesikelcoats [271-273]. Der Isoform Sec16B dagegen scheint in Säugern eine abgewandelte Rolle zuzukommen. Die für die peroxisomale Biogenese als essentiell detektierten C-terminalen 348 Aminosäuren des Sec16B sind in Sec16A nicht konserviert [46]. Somit könnte Sec16B an speziellen ER-Domänen lokalisieren und

dadurch die „exit-sites“ für die Bildung der präperoxisomalen Vesikel aus dem ER markieren. Durch Interaktion mit bisher nicht bekannten coat-Proteinen könnte dann die Vesikelbildung erfolgen.

Nach Bildung erster PEX3- und PEX16-positiver präperoxisomaler Strukturen, erfolgt der Import der peroxisomalen Membranproteine aus dem Cytosol über PEX19 und PEX3, wobei weiteres PEX3 wahrscheinlich unabhängig von PEX19 in die präperoxisomale Membran gelangt. Nach Assemblierung des Importkomplexes für peroxisomale Matrixproteine können diese eingebracht werden. Ob die Reifung der Peroxisomen in Säugerzellen durch Fusion verschiedenartiger Vesikel erreicht wird, wie bereits für Hefezellen beobachtet [265], muss in weiteren Experimenten noch gezeigt werden.

Gleichzeitige Markierung von z.B. PEX14 und PEX12 während der *de novo* Synthese von Peroxisomen in Peroxisomen-defizienten Zelllinien nach Einführung der entsprechenden cDNA könnte Aufschluss darüber geben, ob auch in menschlichen Zellen während der peroxisomalen Biogenese der „docking“ Komplex und der RING-Finger Komplex zunächst in getrennten Vesikeln vorhanden sind. Außerdem könnten Säugerzellen, die Peroxine des „docking“ Komplexes (PEX13 und PEX14) oder des RING-Finger Komplexes (PEX2, PEX10 und PEX12) mit jeweils einer anderen Hälfte eines fluoreszierenden Proteins (z.B. Venus) exprimieren, mit Polyethylenglycol (PEG) fusioniert werden, wie schon in *S. cerevisiae* durchgeführt [265]. Das Auftreten von Fluoreszenz nach Fusion würde dann die Interaktionen dieser Peroxine anzeigen.

Translation von PEX3 und PEX16 am ER

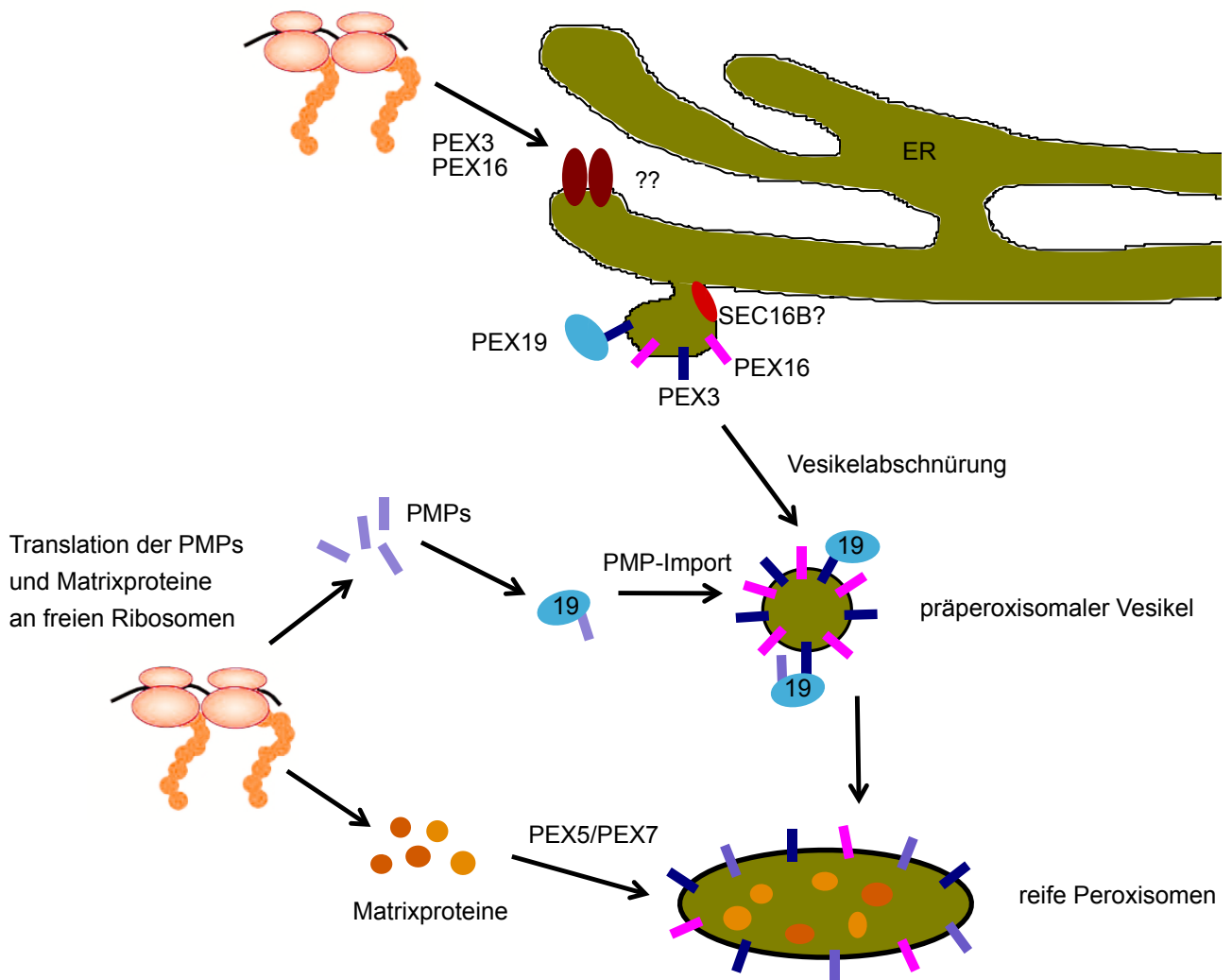


Abbildung 4.1: Modell für die peroxisomale *de novo* Synthese in Säugerzellen

Zur Neubildung von Peroxisomen in Peroxisomen-defizienten Zelllinien nach Einführung der entsprechenden cDNA werden in einem ersten Schritt PEX3 und PEX16 in das endoplasmatische Reticulum (ER) inseriert. Ob dieser Prozess co- oder posttranslational abläuft und ob diese Proteine, wie in Hefen bereits gezeigt, über den Importkomplex Sec61 transportiert werden, muss noch gezeigt werden. PEX3- und PEX16-haltige präperoxisomale Vesikel werden in Abhängigkeit von PEX19 abgeschnürt, wobei Sec16B eine Rolle für die Markierung der „exit sites“ spielen könnte. Anschließend erfolgt der Import peroxisomaler Membranproteine (PMPs) über PEX19 und PEX3 und peroxisomaler Matrixproteine mit Hilfe von PEX5 bzw. PEX7 nach deren Translation an freien Ribosomen im Cytosol.

4.2 Bewegung von Peroxisomen

4.2.1 Peroxisomaler Transport in Abhängigkeit von Kinesin-1 und Dynein

Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli konnte bereits *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden [172, 175-177, 274]. Die Markierung von Peroxisomen durch Expression fluoreszierender Markerproteine ermöglichte die Verfolgung und Charakterisierung der peroxisomalen Bewegung innerhalb der Zelle in Echtzeit [124, 177]. Die Motorproteine Kinesin-1 (Kif5) und cytoplasmatisches Dynein konnten als die verantwortlichen Motoren für den Transport von Peroxisomen identifiziert werden [124-127].

In dieser Arbeit wurde die Bewegung von Peroxisomen in PEX16-YFP exprimierenden COS7 Zellen mit Hilfe der Tracking Software AxioVision von Zeiss aufgezeichnet. Der Großteil der Peroxisomen übte sehr kurze vibrationsartige Bewegungen mit häufigen Richtungswechseln aus, die an die Brown'sche Molekularbewegung erinnerten. Allerdings vollzog ein kleiner Teil der Peroxisomen lange gerichtete Bewegungen, die sich durch sehr geringe Richtungswechsel auszeichneten (Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.15) und wie bereits beschrieben durch den Transport entlang von Mikrotubuli mit Hilfe der Motorproteine Kinesin-1 (Kif5) und Dynein ausgelöst werden [124-127]. Diese langen Bewegungen erfolgten mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,7 \pm 0,2 \mu\text{m/s}$ ($N = 5$) über 33 bis 154 μm bei resultierenden zurück gelegten Distanzen zwischen Start- und Endpunkt der aufgezeichneten Bewegung von 4 bis 33 μm (Kapitel 3.2.1, Tabelle 3.2.).

Der „knockdown“ von Kif5B (schwere Kette des Kinesin-1) mittels siRNA bewirkte keine Änderung der peroxisomalen Verteilung innerhalb der Zelle. Die Peroxisomen waren wie in den Kontrollzellen nach wie vor gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt (Kapitel 3.2.2.1, Abbildung 3.22). Allerdings schien aus der reduzierten Kif5B-Menge eine Gesamtabnahme der peroxisomalen langen gerichteten Bewegungen unabhängig von der Bewegungsrichtung zu resultieren (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen in *Drosophila* S2 Zellen sowohl nach „knockdown“ von Kinesin-1 als auch von Dynein beobachtet [125, 126]

und lässt sich mit Hilfe des „tug-of-war“ Modells erklären (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.3.4).

Nach diesem Modell sind gegensätzliche Motorproteine gleichzeitig an die zu transportierende Ladung gebunden und üben dadurch in entgegengesetzte Richtungen wirkende Kräfte aus. Dabei entsteht eine Art Spannung an der zu transportierenden Ladung, die essentiell für die Aktivität der Motorproteine und den Organellentransport ist [196-198]. Bei „knockdown“ eines der Motorproteine kann diese Spannung nicht mehr aufgebaut werden und das andere noch vorhandene Motorprotein kann ebenfalls keine Motoraktivität ausüben, was sich in einem kompletten Verlust des Transports äußert.

4.2.2 Die Rolle von KifC3 beim Transport von Organellen

In dieser Arbeit wurde das C-Kinesin KifC3 als zusätzlicher Faktor für die peroxisomale Positionierung und Bewegung identifiziert. Die Interaktion der peroxisomalen AAA-ATPase (ATPase associated with a variety of cellular activities) PEX1 mit KifC3 wurde bereits mit Hilfe eines „yeast-two-hybrid“-Systems gezeigt [241].

Die Minusmotoraktivität von KifC3 konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Beteiligung beim apikalen Transport in polarisierten Epithelzellen nachgewiesen werden, deren Mikrotubuli Minus-Enden nicht am Centrosom, sondern apikal an der Plasmamembran verankert sind. KifC3 war in diesen Zellen am Minus-Ende der Mikrotubuli direkt an der apikalen Plasmamembran an kleinen Cholesterin-reichen Vesikeln lokalisiert [147]. Diese Lokalisation von KifC3 wurde sowohl durch Erniedrigung der Temperatur als auch durch Inkubation mit Brefeldin A reduziert, einem Inhibitor für die Bildung des COPI-coats, woraus die Autoren auf eine Beteiligung von KifC3 beim Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur apikalen Plasmamembran schlossen. „Pulldown“ Experimente zeigten die Assemblierung von KifC3 in Annexin XIIIb-positiven Vesikeln, die apikal transportierte Vesikel darstellen [275]. Die Expression einer dominant negativen KifC3-Mutante mit fehlender Motordomäne resultierte in reduziertem Vorkommen von KifC3, Annexin XIIIb und Hämagglutinin (HA), einem Marker für die apikale Plasmamembran, an den

Mikrotubuli Minus-Enden. Die Überexpression von intaktem KifC3 dagegen erzeugte eine vermehrte apikale Lokalisation dieser Proteine. Außerdem konnte die zum Minus-Ende der Mikrotubuli gerichtete Bewegung von EGFP-markiertem KifC3 in lebenden Caco2-Zellen (menschliche Epithelzellen des Dickdarms) verfolgt werden [152].

Bei den in dieser Arbeit verwendeten COS7 Zellen lokalisierte KifC3 in Zellen in der Interphase ebenfalls am Minus-Ende der Mikrotubuli nahe dem Zellkern, was durch Markierung der Mikrotubuli als Centrosom verifiziert werden konnte (Kapitel 3.2.2.1, Abbildung 3.19). Überexpression von KifC3 zeigte keine phänotypische Veränderung hinsichtlich der intrazellulären Verteilung der Peroxisomen. Wie in Kapitel 3.2.2.2 dargestellt, resultierte allerdings der „knockdown“ von KifC3 in COS7 Zellen mittels siRNA in einer Verdopplung der Zellzahl mit perinukleär geclusterten Peroxisomen (Abbildung 3.22). Depolymerisierung des Cytoskeletts mit Nocodazol bzw. Cytochalasin B bestätigte die Notwendigkeit der Mikrotubuli zur Ausbildung des peroxisomalen Phänotyps nach „knockdown“ von KifC3, wohingegen das Aktinskelett hierfür nicht benötigt wurde (Abbildung 3.25).

Bei einer Minus-Motoraktivität von KifC3 an den Peroxisomen wäre nach „knockdown“ dieses Kinesins eine Beeinträchtigung des Transports zu Mikrotubuli Minus-Enden mit daraus resultierender erhöhter Plus-Motoraktivität zu erwarten, was sich in einem Clustering der Peroxisomen an den Mikrotubuli Plus-Enden in der Zellperipherie äußern würde. Tatsächlich wurde bereits in adrenokortikalen Zellen aus KifC3^{-/-} „knockout“ Mäusen bei verringertem Cholesterin-Spiegel eine erhöhte Fragmentierung des Golgi-Apparates beobachtet, die durch eine reduzierte Bewegung von Golgi-Fragmenten zu den Mikrotubuli Minus-Enden in Richtung des Zellkerns verursacht wurde [153].

Bei einer Beteiligung von KifC3 in einem „tug-of-war“ (siehe vorheriges Kapitel und Einleitung Kapitel 1.3.4) würde der „knockdown“ von KifC3 durch das „tug-of-war“ Phänomen, wie bereits schon für Kinesin-1 und Dynein beschrieben, keinen Phänotyp hinsichtlich der Verteilung der Peroxisomen zeigen. Die Reduzierung der KifC3-Menge mittels siRNA würde in einer Inaktivierung des entgegengesetzten

Plus-Motors resultieren, was sich in einer Abnahme der peroxisomalen Gesamtbewegung äußern würde.

Der hier beobachtete KifC3 „knockdown“ Phänotyp des perinukleären Clusterings der Peroxisomen deckt sich allerdings mit keinem der erwarteten Phänotypen. Vielmehr scheint die Reduzierung an KifC3 nach Behandlung mit siRNA eine zum Minus-Ende der Mikrotubuli gerichtete Bewegung der Peroxisomen zum Zellkern zu begünstigen (siehe Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.22). Daher kann hier nicht von einer typischen Funktion von KifC3 als Minusmotor beim peroxisomalen Transport ausgegangen werden. Es stellte sich nun die Frage, wie der beobachtete Phänotyp hinsichtlich der Funktion von KifC3 beim peroxisomalen Transport bzw. bei der Positionierung der Peroxisomen erklärt werden kann.

4.2.2.1 Beteiligung von KifC3 bei der Zellteilung

Eine Ursache für das vermehrte Clustering der Peroxisomen nach „knockdown“ von KifC3 könnten sekundäre Effekte durch Funktionen von KifC3 während der Zellteilung darstellen. Die Lokalisation von KifC3 an den Spindelpolen und der Teilungsspindel während der Mitose (Kapitel 3.2.2.1, Abbildung 3.19) spricht für eine Beteiligung von KifC3 bei diesem Prozess. Viele Kinesine, vor allem C-terminale Kinesine, spielen eine Rolle bei der Organisation der Mikrotubuli z.B. durch Destabilisierung oder Aufbau und Anordnung der Teilungsspindel während der Mitose/Meiose [107, 134, 138-142]. Tatsächlich wurde in Docetaxel- und Paclitaxel-resistenten Brustkrebszellen (MDA MB 231/468) eine erhöhte Expression an KifC3 auf mRNA- und Proteinebene detektiert, die dem Mikrotubuli stabilisierenden Effekt der Zytostatika entgegenwirkte [154, 155]. Daher könnte der „knockdown“ von KifC3 die Zellen durch Stabilisierung der Mikrotubuli in einer bestimmten Zellphase akkumulieren. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach Markierung der DNA mit Propidiumiodid der Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellphasen sowohl bei KifC3 „knockdown“ Zellen als auch bei den Kontrollzellen bestimmt (Kapitel 3.2.2.2., Abbildung 3.26). Die Zellphasenverteilung der Zellen mit reduzierter KifC3-Menge glich der der Kontrollzellen, so dass der „knockdown“ von KifC3 keinen sichtbaren Einfluss auf den Zellzyklus hinsichtlich der Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellphasen ausübte.

Zudem wurden COS7 und A549 Zellen durch Inkubation mit Thymidin in der S-Phase des Zellzyklusses nach Behandlung mit siRNA geblockt (Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.27). Die Verschiebung der Zellphasenverteilung hatte in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Ausprägung des peroxisomalen Phänotyps nach „knockdown“ von KifC3, so dass von einem Zellphasen-unabhängigen Phänotyp ausgegangen werden kann. Insgesamt war die Anzahl der Zellen mit geclusterten Peroxisomen nach Behandlung mit Thymidin sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den Zellen mit reduzierter KifC3 Menge leicht erhöht, was durch veränderte metabolische Bedingungen verursacht durch die Thymidin-Inkubation bedingt sein kann.

In *S. cerevisiae*, die sich asymmetrisch durch Knospung teilen, wird ein Teil der Peroxisomen gezielt mit Hilfe des Myosins Myo2p entlang des Aktinskeletts in die entstehende Knospe transportiert [179, 180, 276]. Wie sich Peroxisomen in Säugerzellen während der Mitose hinsichtlich ihrer Verteilung verhalten ist bisher nicht geklärt. Wiemer et al. beschreiben eine zufällige, ungeordnete Vererbung von Peroxisomen in CV-1 Zellen (nicht immortalisierte COS Zellen), die GFP-PTS1 exprimierten [176]. Während der Mitose waren die Peroxisomen gleichmäßig in diesen Zellen verteilt und größtenteils nicht mit den Mikrotubuli der mitotischen Spindel assoziiert. Dagegen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe während der Zellteilung ein peroxisomales Clustering an den mitotischen Spindelpolen sowohl in HEK293 als auch in HELA und NIH3T3 Zellen (Fibroblasten aus murinen Embryonen) durch Markierung der Peroxisomen mit PTS-mRuby beobachtet [277]. Ob zelltypenspezifisch unterschiedliche Mechanismen zur Vererbung der Peroxisomen existieren oder ob das Clustering der Peroxisomen an den Spindelpolen einen sekundären Effekt der Überexpression darstellt, muss noch gezeigt werden. Ein perinukleäres Clustering der Peroxisomen, wie nach dem „knockdown“ von KifC3 beobachtet, wurde bisher im Rahmen der Zellteilung nicht beschrieben.

4.2.2.2 Einfluss der Mikrotubulieusrichtung auf den peroxisomalen KifC3 „knockdown“ Phänotyp

In polarisierten Zelllinien wie z.B. Epithelzellen existieren außer centrosomalen Mikrotubuli, deren Minus-Enden am MTOC gebunden sind, zusätzliche Mikrotubuli, die mit den Minus-Enden an der apikalen Plasmamembran verankert sind. Fibroblasten wie COS7 Zellen hingegen besitzen hauptsächlich centrosomale Mikrotubuli [278]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit A549 und COS7 Zellen sowohl polarisierte als auch nicht-polarisierte Zelllinien auf die peroxisomale Verteilung nach „knockdown“ von KifC3 untersucht (Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.27). Da kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Ausprägung des peroxisomalen Phänotyps zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden konnte, scheinen den nicht-centrosomalen Mikrotubuli bei dem hier beschriebenen Clustering der Peroxisomen nach Reduktion der KifC3-Menge keine Bedeutung zu zukommen. Um die Ausrichtung der Mikrotubuli in den hier verwendeten Zelllinien zu überprüfen, könnten die Plus-Enden der Mikrotubuli mit spezifischen Antikörpern z.B. gegen EB1 markiert werden, das hauptsächlich an den wachsenden Plus-Enden von Mikrotubuli lokalisiert ist [279, 280].

4.2.2.3 Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli

Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist bereits *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt worden und die Bindungskapazität war *in vitro* abhängig von pH, Temperatur und ATP [175, 177, 274]. Durch Vorbehandlung der Peroxisomen mit KCl oder Proteasen konnte die Bindung inhibiert werden, wobei dieser Effekt im Falle der KCl Behandlung durch Zugabe von Cytosol reversibel war. Daher wird die Beteiligung von peroxisomalen Membranproteinen und cytosolischen Proteinen bei der Assoziation der Peroxisomen an die Mikrotubuli angenommen. Es wurde vermutet, dass ein CLIP-Protein (cytoplasmic linker protein) als Verbindungselement zwischen Peroxisomen und Mikrotubuli dienen könnte, da Fraktionen eines Eluats nach Behandlung der Peroxisomen mit KCl mit einem Antikörper gegen CLIP-115 reagierten [177].

Diese Proteine vermitteln die Bindung von Organellen an Mikrotubuli, bevor der Transport durch Motorproteine erfolgen kann. Das am besten charakterisierte CLIP stellt CLIP-170 dar, das endocytotische Vesikel und frühe Endosomen mit den Mikrotubuli verbindet [281, 282]. Die Struktur des CLIP-170 ähnelt der von Motorproteinen: Es besitzt eine globuläre Kopfreion, die mit dem C-Terminus über eine lange coiled coil Region verbunden ist. Die Bindung von CLIP-170 an Mikrotubuli ist ATP-unabhängig, wird allerdings durch Phosphorylierung reguliert [283]. Aufgrund der Koloaliation von CLIP-170 und Dynein an Mikrotubuli Plus-Enden wurde ein spezifisches Zusammenspiel beim Organellentransport mit dem Motorprotein Dynein postuliert [284, 285].

Da KifC3 beim peroxisomalen Transport scheinbar keine typische Motorfunktion ausübt, kann spekuliert werden, ob KifC3 eventuell eine ähnliche Funktion als statisches Verbindungselement zwischen Peroxisomen und Mikrotubuli zukommt. Nur ein kleiner Teil der Peroxisomenpopulation (ca. 5-10%) innerhalb einer Zelle führt lange gerichtete Bewegungen entlang von Mikrotubuli aus, wohingegen ein Großteil der Peroxisomen an die Mikrotubuli gebunden zu sein scheint [175, 176]. Die beobachtete Retraktion des Mitochondrien-Netzwerkes und des endoplasmatischen Reticulums nach „knockdown“ von KifC3 (siehe Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.28) würde ebenfalls eine Funktion von KifC3 als Linker für diese Organellen an die Mikrotubuli erklären. Beide Zellorganellen sind stark vernetzt und die Aufhängung am Cytoskelett ist essentiell für ihre Funktionen [246, 247, 254, 286, 287]. Die Depolymerisierung von Mikrotubuli mit Nocodazol resultierte ebenfalls in einer Retraktion der Mitochondrien und des ER-Netzwerkes (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass sowohl ein intaktes Cytoskelett als auch die Assoziation dieser Organellen an die Mikrotubuli maßgeblich deren Morphologie bestimmt.

Im Gegensatz dazu entsprach die Verteilung der Peroxisomen nach Behandlung der Zellen mit Nocodazol nicht dem peroxisomalen Phänotyp nach KifC3 „knockdown“. Die Peroxisomen waren nach Depolymerisierung der Mikrotubuli nach wie vor gleichmäßig in der Zelle verteilt bzw. bildeten unterschiedlich große „Haufen“ im Cytoplasma (Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.25), wohingegen die Reduzierung der KifC3-Menge durch siRNA das peroxisomale Clustering nahe dem Zellkern begünstigte (Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.22). Zudem schienen die Peroxisomen in

fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen auch nach „knockdown“ von KifC3 an die Mikrotubuli assoziiert zu sein (Kapitel 3.2.2.2, Abbildung 3.23). Allerdings kann mit dieser Methode keine genaue Koloalisation dieser Elemente bestimmt werden und Betrachtungen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop bzw. elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten hierüber Gewissheit geben.

4.2.2.4 Entwicklung eines Modells für die Rolle von KifC3 beim peroxisomalen Transport

KifC3 scheint also eher einen direkten und selektiven Einfluss auf die peroxisomale Bewegung in Richtung des Minus-Endes der Mikrotubuli auszuüben und damit direkt in den Kinesin-1 (Kif5) und Dynein abhängigen peroxisomalen Transport involviert zu sein, da „knockdown“ von KifC3 die Minus-Motoraktivität an den Peroxisomen erhöhte. Die verwendete siRNA gegen KifC3 bewirkte keine Reduzierung der mRNA Menge an Kif5B (Kinesin-1, Abbildung 3.21) und auch die Menge an Dynein mRNA schien nach KifC3 „knockdown“ nicht konstant hoch reguliert zu sein (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob KifC3 tatsächlich keine Motorfunktion auf die Peroxisomen ausübt, könnte nach „knockdown“ von KifC3 eine KifC3-Variante transfiziert werden, die Mutationen spezifisch in der ATP-Bindestelle der Motordomäne enthält. Die Revertierung des peroxisomalen „knockdown“ Phänotyps durch diese KifC3-Mutante wäre ein Hinweis, dass KifC3 keine Motorfunktion beim peroxisomalen Transport ausübt. Allerdings war es bisher nicht möglich eine Plasmidtransfektion der Zellen bei gleichzeitigem KifC3 „knockdown“ zu erreichen, da diese Prozedur zu schädigend für die verwendeten Zellen war. Daher müsste entweder eine schonendere Methode der siRNA Transfektion oder eine effizientere Art der Plasmidtransfektion angewendet werden.

Da KifC3, wie zuvor erläutert, nicht als typisches Motorprotein auf die Peroxisomen zu wirken scheint, könnte KifC3 eine regulatorische Funktion beim Transport von Peroxisomen in Richtung des Minus-Endes von Mikrotubuli ausüben. Verschiedenste Arten zur Regulierung des Organellentransports sind bereits bekannt wie z.B. über Rab Proteine [288], durch Phosphorylierung [208-210] oder durch Mikrotubuli-

assoziierte Proteine [289, 290]. Für den peroxisomalen Transport wurde die Regulation durch ein GTP-bindendes Protein über einen Peroxisomen-spezifischen G_i/G_o -Phospholipase A_2 Signalweg postuliert [291], der so bisher noch nicht für den Transport anderer Organellen beschrieben wurde. Dies stützte sich unter anderem auf der Beobachtung, dass Mikroinjektion von GTP γ S (Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)) die peroxisomale Bewegung inhibierte. Die gleichen Autoren zeigten später, dass die extrazelluläre Costimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit ATP und Lysophosphatidsäure (LPA) die Beweglichkeit der Peroxisomen reduzierte [292]. Der LPA-Signalweg aktiviert die kleine GTPase RhoA über die G-Proteine $G_{12/13}$ [293, 294]. Tatsächlich scheint die Assoziation der Peroxisomen an die Mikrotubuli über einen RhoA-abhängigen Signalweg reguliert zu sein [295], da zum Beispiel die Inaktivierung von RhoA zu einer Zunahme der peroxisomalen Bewegungen führte. Daraus schlossen die Autoren, dass aktiviertes RhoA durch Bindung an die Peroxisomen diese von den Mikrotubuli löst.

Das einzige bisher detektierte Minus-Motorprotein, das auf Peroxisomen wirkt, stellt cytoplasmatisches Dynein dar [124-126]. Somit könnte die Bindung von KifC3 an Peroxisomen Dynein behindern oder die Dynein Funktion z.B. durch einfache räumliche Hinderung einschränken. Über die Existenz solcher Mechanismen zur Regulierung des Organellentransports wurde bereits spekuliert [190, 296]. KifC3 könnte eventuell den Transportweg in Richtung des Minus-Endes an den Mikrotubuli blockieren und so als „Bremse“ wirken bis der peroxisomale Transport in Richtung des Centrosoms über einen noch unbekanntem Signalweg aktiviert wird (Abbildung 4.2B).

Dieser Vorgang könnte eventuell über Phosphorylierung von KifC3 reguliert sein. Western Blotting verschiedener Zelllinien mit Antikörpern gegen KifC3 zeigte teilweise eine zusätzliche Bande, bei der es sich um phosphoryliertes Protein handeln könnte (Kapitel 3.2.2.1, Abbildung 3.18). Tatsächlich wurde im Rahmen einer Phosphoproteom-Studie aufgereinigter mitotischer Spindelproteine aus menschlichen HELA-Zellen eine Phosphorylierungsstelle für KifC3 detektiert [297]. Auch andere Motorproteine wie Kinesin-1 (Kif5) und Dynein werden *in vivo* phosphoryliert [211-214].

Nachdem der peroxisomale Transport in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes aktiviert wurde, könnte KifC3 ins Cytosol entlassen werden und das entsprechende Peroxisom mit Hilfe von Dynein in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes transportiert werden (Abbildung 4.2A). Wenn nun aufgrund von „knockdown“ mittels siRNA die Menge an KifC3 reduziert ist, würde zumindest dieser Teil für die Regulierung des peroxisomalen Transports fehlen. Dies würde dann eine verstärkte Bewegung der Peroxisomen in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes hervorrufen und sich schließlich im Clustering der Peroxisomen am Centrosom äußern (Abbildung 4.2C).

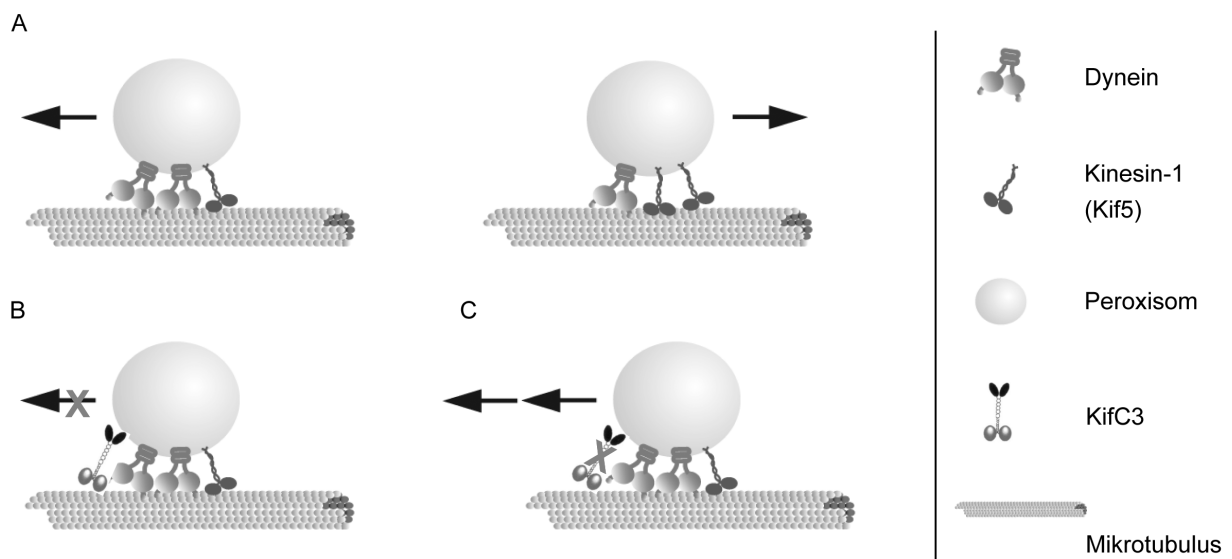


Abbildung 4.2: Modell zur Rolle von KifC3 beim peroxisomalen Transport

(A) Nach dem „tug-of-war“ Modell sind Kinesin (hier Kinesin-1/Kif5) und Dynein gleichzeitig an das zu transportierende Peroxisom gebunden und erzeugen durch Ausübung entgegengesetzter Kräfte eine Spannung. Die resultierende Transportrichtung ergibt sich aus der überwiegenden Nettokraft, die durch die Anzahl und die Stärke der einzelnen gebundenen Motoren bestimmt wird. (B) KifC3 könnte den peroxisomalen Transport in Richtung des Minus-Endes der Mikrotubuli regulieren, indem es durch sterische Hinderung als „Bremsen“ für Dynein wirkt. (C) Bei Reduzierung der Menge an KifC3 durch „knockdown“ mittels siRNA würde diese Art der Regulierung des peroxisomalen Transports fehlen und sich in einer verstärkten Bewegung der Peroxisomen in Richtung des Minus-Endes von Mikrotubuli äußern. Entnommen und modifiziert aus [105, 298].

Eine ähnliche Funktion wurde für GMAP-210 postuliert, das das cis-Golgi-Netzwerk (CGN) an den Mikrotubuli verankert [299]. Überexpression von GMAP-210 resultierte in einer Vergrößerung des Golgi-Komplexes, wohingegen die Expression einer dominant negativen Mutante den Golgi-Komplex verkleinerte [300]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Größe des Golgi Komplexes durch GMAP-210 reguliert wird, indem die Bindung des CGN an die Mikrotubuli über GMAP-210 den anterograden Vesikeltransport vom CGN zum medialen Golgi hemmt [300].

Im Gegensatz dazu wirkt das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau inhibierend auf die Motoraktivität von Kinesin-1 (Kif5) [289]. Die Überexpression von Tau in Zellen aus murinen Neuroblastomen (N2a) reduzierte die Bewegung der Peroxisomen in Richtung des Mikrotubuli Plus-Endes und bewirkte ein Clustering der Peroxisomen am MTOC [301].

Ob das peroxisomale Clustering nach „knockdown“ von KifC3 tatsächlich durch Zunahme des Transports der Peroxisomen in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes verursacht wird, sollte durch Lebendzellbeobachtungen überprüft werden. Dafür wurden die Peroxisomen nach „knockdown“ von KifC3 mit siRNA durch Expression von PEX16-YFP markiert. Mehrere Zeitreihen von COS7 Zellen, die mit siRNA gegen KifC3 bzw. mit Kontroll-siRNA behandelt worden waren, wurden aufgenommen (wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben). Die peroxisomale Bewegung sollte anhand dieser Zeitreihen, wie in Kapitel 3.2.1 durchgeführt, verfolgt und hinsichtlich der Transportrichtung kategorisiert werden. Hierfür wurde eine Tracking-Software benötigt, die automatisch die sich bewegenden Peroxisomen erkennt, die gerichtete von der ungerichteten Bewegung unterscheidet und die teilweise sehr schnelle Bewegung der Peroxisomen in der Zelle über die einzelnen aufgenommenen Bilder verfolgt, um ausreichende Datenmenge für eine statistisch relevante Aussage zu erlangen. Weder die in dieser Arbeit verwendete Tracking-Software (AxioVision von Zeiss) noch eine Testversion einer komplexer aufgebauten Software (Imaris Tracking von Bitplane Scientific Software) erfüllte diese Anforderungen. Eine automatische Markierung der einzelnen Peroxisomen war zwar mit Hilfe der Imaris-Software möglich, allerdings wurden aufgrund der hohen Anzahl der Peroxisomen pro Zelle die langen gerichteten Bewegungen nicht automatisch erkannt und verfolgt. Dies war unter anderem durch die schnellen Bewegungen und der daraus resultierenden großen zurück gelegten Distanzen der Peroxisomen zwischen den einzelnen Bildern der Zeitreihe bedingt. Daher war die Auswertung dieser Lebendzellaufnahmen hinsichtlich der Gesamtbewegung der Peroxisomen pro Zelle und der Bewegungsrichtung bisher nicht möglich.

4.2.3 PEX1 als peroxisomaler Adaptor für KifC3

Die Bindung von Motorproteinen an die zu transportierende Ladung über Adaptoren ermöglicht die Assoziation eines Motorproteins an unterschiedlichste Organellen. Außerdem ergeben sich dadurch zusätzliche Mechanismen zur spezifischen Regulierung des Organellentransports. Kinesin-1 (Kif5) bindet z.B. über Kinectin an Organellen wie das endoplasmatische Reticulum [129, 130] oder über Syntabulin an Mitochondrien [120]. Kif13 assoziiert über die β 1-adaptin Untereinheit des AP-1 Komplexes an Vesikel mit Clathrin-coat [302, 303], wohingegen Spectrin als Adaptor für Kif3 dient [304]. Auch Dynein kann sowohl über Spectrin als auch über Bicaudal-D an zu transportierende Ladungen binden [305-308]. In Hefen dient Inp2p als Rezeptor für das Myosin Myo2p an den Peroxisomen [180], wobei neuere Ergebnisse ebenfalls eine Beteiligung von Pex19p bei diesem Prozess nahe legen [181].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion von KifC3 mit der AAA-ATPase PEX1 in Säugerzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit Hilfe einer Coimmunopräzipitation (Colp) gezeigt werden (siehe Kapitel 3.2.2.3). *In vivo* konnte KifC3 zwar nicht an den Peroxisomen detektiert werden, allerdings kolokalisierte PEX1-myc bei Überexpression mit überexprimiertem KifC3 an den Mikrotubuli. Die Colp wurde aus Zelllysaten von COS7 Zellen durchgeführt, die PEX1-myc und humanes KifC3 überexprimierten. Daher kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht auf eine direkte Interaktion geschlossen werden. Allerdings spricht die Tatsache, dass KifC3 auch bei einem „yeast-two-hybrid“ Screeningverfahren mit PEX1 detektiert wurde, eher für eine direkte Bindung von KifC3 an PEX1. Somit könnte PEX1 über PEX6 und PEX26 als peroxisomaler Adaptor für KifC3 dienen.

Der Import peroxisomaler Matrixproteine in PEX1-defizienten Zelllinien (Δ PEX1) ist defekt, so dass in diesen Zellen nur leere Membranhüllen, so genannte „ghosts“, vorkommen. Außerdem ist sowohl die Anzahl dieser „ghosts“ als auch deren Verteilung innerhalb der Zelle gestört, was sich durch unterschiedlich starkes Clustering an verschiedenen Stellen im Cytoplasma äußert. Es wurde beschrieben, dass in humanen PEX1-defizienten Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten eine geringere Anzahl an Peroxisomen an die Mikrotubuli gebunden war

[242]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nach Markierung der peroxisomalen „ghosts“ durch Expression von PEX16-YFP in Δ PEX1 Zellen nach wie vor lange gerichtete peroxisomale Bewegungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ob diese Bewegungen im Vergleich zu normalen Fibroblasten verringert waren, wurde nicht quantifiziert. Eine andere Arbeitsgruppe konnte allerdings keine Abnahme der gerichteten peroxisomalen Bewegung in Δ PEX1 Zellen im Vergleich zu normalen Fibroblasten feststellen [309].

Aufgrund des gestörten Imports peroxisomaler Matrixproteine herrschen in PEX1-defizienten Zelllinien andere metabolische Voraussetzungen als in normalen Zelllinien mit intakten Peroxisomen. Daher könnte die peroxisomale Bewegung in Δ PEX1 Zellen auch über einen anderen als den KifC3-abhängigen Weg reguliert sein, so dass hier KifC3 keinen Einfluss auf den Transport von Peroxisomen ausübt. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Expression von PEX11 β in humanen Δ PEX1 Zellen nicht nur durch Proliferation der Organellen eine Zunahme peroxisomaler Membranstrukturen bewirkte [310-312], sondern auch die Verteilung der peroxisomalen „ghosts“ beeinflusste [242, 313]. Δ PEX1 Zellen, die mit PEX11 β transfiziert worden waren, wiesen gleichmäßig in der Zelle verteilte peroxisomale Reststrukturen auf, wohingegen die „ghosts“ in untransfizierten Δ PEX1 Zellen eher zentral um den Zellkern herum angeordnet und teilweise geclustert waren [242]. Diese Anordnung entsprach allerdings nicht dem spezifischen Clustering am MTOC, wie nach „knockdown von KifC3 in dieser Arbeit beobachtet. Somit könnte die beschriebene Verteilung der peroxisomalen Membranstrukturen nach Expression von PEX11 β in Δ PEX1 Zellen einen Proliferations-abhängigen Regulationsweg für den peroxisomalen Transport darstellen.

Somit scheinen zusätzlich zu den verschiedenen im vorherigen Kapitel beschriebenen Regulationswegen für den peroxisomalen Transport auch mehrere mögliche Bindungsstellen an den Peroxisomen für deren Transport zu existieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer veröffentlichter Studien zeigen, dass der peroxisomale Transport entlang von Mikrotubuli weitaus komplexer aufgebaut und reguliert ist als bisher angenommen und außer den Motorproteinen Kinesin-1 (Kif5) und Dynein zahlreiche weitere Faktoren in diesen Prozess involviert sind.

5 Zusammenfassung

Peroxisomen sind sehr dynamische, ubiquitäre Zellorganellen, denen wichtige Funktionen beim Lipidstoffwechsel und beim Metabolismus oxidativer Spezies zukommen. Diese Organellen können zum einen durch Wachstum und Teilung vermehrt werden und zum anderen auch *de novo* gebildet werden. Bisher sind beim Menschen 14 Proteine bekannt, die so genannten Peroxine (PEX), die für die peroxisomale Biogenese essentiell sind. Fehlen PEX3, PEX16 oder PEX19, können in den Zellen keine peroxisomalen Membranstrukturen detektiert werden. Nach Transfektion der entsprechenden cDNA werden allerdings wieder voll funktionsfähige Peroxisomen ausgebildet. Vor allem die frühen Phasen der peroxisomalen Neubildung sind bisher wenig verstanden und die Herkunft der peroxisomalen Membran ist umstritten. Zusätzlich sind die Peroxine PEX3, PEX16 und PEX19 auch für den Import peroxisomaler Membranproteine (PMPs) verantwortlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen Phasen der peroxisomalen Neubildung durch Komplementation PEX16-defizienter humaner Fibroblasten (Δ PEX16) charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass zunächst PEX16- und PEX3-positive präperoxisomale Vesikel gebildet wurden, die in einem weiteren Schritt peroxisomale Membranproteine wie PEX14 importierten. Die Biogenese reifer Peroxisomen war nach 72 Stunden mit dem Import der Matrixproteine abgeschlossen. Dabei wurden weder Mikrotubuli und Aktinskelett noch die untersuchten Kinesine Kif5 (Kinesin-1) und KifC3 für die Entstehung dieser präperoxisomalen Vesikel benötigt. Die frühen PEX16-positiven Vesikel kolokalisierten nicht mit spezifischen Markern für „lipid rafts“ wie Caveolin-1 und Flotillin-1 und -2, so dass diese Membranstrukturen als Ursprung für die Vesikel weniger in Frage kamen. Vielmehr schienen die peroxisomalen Vorläufer an die einzelnen Lamellen des endoplasmatischen Reticulums (ER) angelagert zu sein, was hier durch Lebendzellbeobachtungen nach Expression von PEX16-YFP und eines ER-Markers in Δ PEX16 Zellen sichtbar gemacht wurde. Frühere Studien zeigten allerdings, dass die peroxisomale Biogenese in Säugerzellen unabhängig von COPI- oder COPII-Wegen abläuft.

„Knockdown“ von PEX19 und PEX16 mittels siRNA in humanen Fibroblasten zeigte einen PEX19-unabhängigen Importweg für PEX3 in die peroxisomale Membran und auch PEX16 wurde nur bei geringen Mengen an PEX3 für dessen Import benötigt. Daher ist ein posttranslatonaler Import von PEX3 aus dem Cytosol in die peroxisomale Membran sehr wahrscheinlich.

Im Gegensatz zu anderen Organellen, wie dem endoplasmatischen Reticulum (ER) oder dem Golgi-Apparat, sind Peroxisomen gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt. Diese peroxisomale Lokalisation wird zum einen durch Bindung der Organellen an die Mikrotubuli und zum anderen durch den Transport von Peroxisomen entlang der Mikrotubuli mit Hilfe der Motorproteine Kinesin-1 (Kif5) und Dynein aufrecht erhalten. Mit Hilfe eines „yeast-two-hybrid“ Versuches mit der AAA-ATPase PEX1 wurde zuvor ein weiteres Motorprotein, das C-terminale Kinesin KifC3, detektiert. Die Beteiligung von KifC3 beim peroxisomalen Transport entlang der Mikrotubuli konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Lebendzellbeobachtungen ermöglichten die Verfolgung und Charakterisierung der gerichteten peroxisomalen Bewegung *in vivo* durch Expression von PEX16-YFP. „Knockdown“ von KifC3 mittels siRNA bewirkte nicht nur eine Zunahme der Zellen mit geclusterten Peroxisomen am Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), sondern veränderte auch die Morphologie der Mitochondrien und des ERs. Die Ausprägung dieses peroxisomalen Phänotyps war unabhängig von der Zellphase, wohingegen intakte Mikrotubuli sich als essentiell für das perinukleäre Clustering der Peroxisomen heraus stellten. Die Interaktion von KifC3 mit PEX1 konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch Coimmunopräzipitation nachgewiesen werden.

Es wurde eine regulatorische Rolle für KifC3 beim peroxisomalen Transport in Richtung des Mikrotubuli Minus-Endes postuliert, die sich durch Hemmung der Motorfunktion von Dynein an den Peroxisomen äußern könnte. „Knockdown“ von KifC3 würde somit zu einer Zunahme des peroxisomalen Transports in Richtung der Mikrotubuli-Minus Enden führen und ein Clustering der Peroxisomen am MTOC bewirken.

6 Summary

Peroxisomes are highly dynamic, ubiquitous cell organelles that play fundamental roles in the metabolism of lipids and oxidative species. These organelles multiply principally by growth and division but can also be synthesized *de novo*. Until now, 14 different proteins, the so called peroxins (PEX), are known to be essential for peroxisome biogenesis in humans. If PEX3, PEX16 or PEX19 are missing, the cells lack any detectable peroxisomal membrane structures. Fully functional peroxisomes are formed *de novo* upon transfection of the corresponding cDNA. The process of peroxisomal biogenesis especially the early steps is not well understood, and the origin of the peroxisomal membrane is currently under debate. The peroxins PEX3, PEX16 and PEX19 are also responsible for import of peroxisomal membrane proteins.

In this work the different steps of peroxisomal *de novo* synthesis were characterized by performing complementation studies of PEX16-deficient human fibroblasts. First PEX3- and PEX16-positive preperoxisomal vesicles were detected that imported peroxisomal membrane proteins like PEX14 in the next step. Biogenesis of mature peroxisomes was completed 72 hours after transfection by import of peroxisomal matrix proteins. Neither microtubules or the actin skeleton nor the analyzed kinesins Kif5 (Kinesin-1) or KifC3 were essential for formation of these preperoxisomal vesicles. As no colocalization of the early PEX16-positive vesicles with specific markers for „lipid rafts“ like Caveolin-1 and Flotillin-1 and -2 could be detected, these preperoxisomal structures are unlikely to originate from „lipid rafts“. These early vesicles rather seemed to be attached to the single lamellae of the endoplasmic reticulum (ER), which was visualized by live cell imaging after expression of PEX16-YFP and an ER-Marker in Δ PEX16 cells. However, earlier studies showed that the peroxisomal biogenesis was independent of COPI and COPII in mammalian cells.

Knockdown of PEX19 and PEX16 by siRNA in human fibroblasts revealed that PEX3 is imported into the peroxisomal membrane independently of PEX19, and PEX16 was only needed for import of PEX3 when small amounts of PEX3 were present. These data suggest a posttranslational import pathway for PEX3.

In contrast to other organelles like the ER or the golgi apparatus, peroxisomes are evenly distributed in the cell. This peroxisomal localisation is maintained first by binding of the organelles to microtubules and second by transport of peroxisomes along microtubules with help of the motor proteins kinesin-1 (Kif5) and dynein. Another motor protein, the C-terminal Kinesin KifC3, was detected before in a yeast-two-hybrid assay with the AAA-ATPase PEX1.

The results of this work show that KifC3 is also involved in peroxisomal transport along microtubules. The directed long-range movements of peroxisomes were tracked and characterized *in vivo* by means of live cell imaging after expression of PEX16-YFP. Knockdown of KifC3 by siRNA not only increased the number of cells with clustered peroxisomes at the microtubule organizing center (MTOC), but also affected the morphology of mitochondria and the ER. The occurrence of this peroxisomal phenotype was independent of the cell phase, while intact microtubules were essential for perinuclear clustering of the peroxisomes. Interaction of KifC3 with PEX1 was verified *in vivo* and *in vitro* by coimmunoprecipitation.

Therefore it was postulated that KifC3 plays a regulatory role in peroxisomal transport towards the microtubule minus-ends for example by blocking the motor function of dynein at the peroxisomes. „Knockdown“ of KifC3 would then lead to increased minus end-directed peroxisomal transport and cause the observed peroxisomal clustering at the MTOC.

7 Literatur

1. De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-357.
2. Rhodin, J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Karolinska Institute University of Stockholm, Dissertation.
3. Hruban, Z., and Rechcigl, M., Jr. (1969). Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry, and physiology. *Int Rev Cytol, Suppl* 1:1-296.
4. Breidenbach, R.W., and Beevers, H. (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 462-469.
5. Opperdoes, F.R., and Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 80, 360-364.
6. Angermuller, S., and Fahimi, H.D. (1986). Ultrastructural cytochemical localization of uricase in peroxisomes of rat liver. *J Histochem Cytochem* 34, 159-165.
7. Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2008). The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* 129, 421-440.
8. Fahimi, H.D. (1968). Cytochemical localization of peroxidase activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Histochem Cytochem* 16, 547-550.
9. Fahimi, H.D. (1969). Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol* 43, 275-288.
10. Wanders, R.J., van Grunsven, E.G., and Jansen, G.A. (2000). Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem Soc Trans* 28, 141-149.
11. Krisans, S.K., Thompson, S.L., Pena, L.A., Kok, E., and Javitt, N.B. (1985). Bile acid synthesis in rat liver peroxisomes: metabolism of 26-hydroxycholesterol to 3 beta-hydroxy-5-cholenoic acid. *J Lipid Res* 26, 1324-1332.
12. Brites, P., Waterham, H.R., and Wanders, R.J. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1636, 219-231.
13. Krisans, S.K. (1992). The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 358-364.

14. Baudhuin, P., Beaufay, H., and De Duve, C. (1965). Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. Analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *J Cell Biol* 26, 219-243.
15. Goldfischer, S., Moore, C.L., Johnson, A.B., Spiro, A.J., Valsamis, M.P., Wisniewski, H.K., Ritch, R.H., Norton, W.T., Rapin, I., and Gartner, L.M. (1973). Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 182, 62-64.
16. Bowen, P., Lee, C.S., Zellweger, H., and Lindenberg, R. (1964). A Familial Syndrome of Multiple Congenital Defects. *Bull Johns Hopkins Hosp* 114, 402-414.
17. Heymans, H.S., Oorthuys, J.W., Nelck, G., Wanders, R.J., and Schutgens, R.B. (1985). Rhizomelic chondrodysplasia punctata: another peroxisomal disorder. *N Engl J Med* 313, 187-188.
18. Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L., and Aubourg, P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726-730.
19. Lazarow, P.B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530.
20. Fujiki, Y., Rachubinski, R.A., and Lazarow, P.B. (1984). Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7127-7131.
21. South, S.T., and Gould, S.J. (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol* 144, 255-266.
22. Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimosawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R.J., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y. (1999). Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2116-2121.
23. Muntau, A.C., Mayerhofer, P.U., Paton, B.C., Kammerer, S., and Roscher, A.A. (2000). Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G. *Am J Hum Genet* 67, 967-975.
24. Ghaedi, K., Honsho, M., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y. (2000). PEX3 is the causal gene responsible for peroxisome membrane assembly-defective Zellweger syndrome of complementation group G. *Am J Hum Genet* 67, 976-981.
25. Honsho, M., Hiroshige, T., and Fujiki, Y. (2002). The membrane biogenesis peroxin Pex16p. Topogenesis and functional roles in peroxisomal membrane assembly. *J Biol Chem* 277, 44513-44524.

26. Choi, J.Y., Wu, W.I., and Voelker, D.R. (2005). Phosphatidylserine decarboxylases as genetic and biochemical tools for studying phospholipid traffic. *Anal Biochem* **347**, 165-175.
27. Novikoff, P.M., and Novikoff, A.B. (1972). Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *J Cell Biol* **53**, 532-560.
28. Just, W.W., Gorgas, K., Hartl, F.U., Heinemann, P., Salzer, M., and Schimassek, H. (1989). Biochemical effects and zonal heterogeneity of peroxisome proliferation induced by perfluorocarboxylic acids in rat liver. *Hepatology* **9**, 570-581.
29. Raychaudhuri, S., and Prinz, W.A. (2008). Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15785-15790.
30. Tam, Y.Y., Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., and Rachubinski, R.A. (2005). Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 34933-34939.
31. Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P., and Tabak, H.F. (2005). Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**, 85-95.
32. Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., and Distel, B. (2005). Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a *Saccharomyces cerevisiae* pex3Delta strain. *J Biol Chem* **280**, 34350-34357.
33. Titorenko, V.I., and Rachubinski, R.A. (1998). Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 2789-2803.
34. Agrawal, G., Joshi, S., and Subramani, S. (2011). Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9113-9118.
35. Lam, S.K., Yoda, N., and Schekman, R. (2010). A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21523-21528.
36. van der Zand, A., Braakman, I., and Tabak, H.F. (2010). Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **21**, 2057-2065.
37. Haim, L., Zipor, G., Aronov, S., and Gerst, J.E. (2007). A genomic integration method to visualize localization of endogenous mRNAs in living yeast. *Nat Methods* **4**, 409-412.
38. Thoms, S., Harms, I., Kalies, K.U., and Gartner, J. (2011). Peroxisome Formation Requires the Endoplasmic Reticulum Channel Protein Sec61. *Traffic*.

39. Geuze, H.J., Murk, J.L., Stroobants, A.K., Griffith, J.M., Kleijmeer, M.J., Koster, A.J., Verkleij, A.J., Distel, B., and Tabak, H.F. (2003). Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* *14*, 2900-2907.
40. Toro, A.A., Araya, C.A., Cordova, G.J., Arredondo, C.A., Cardenas, H.G., Moreno, R.E., Venegas, A., Koenig, C.S., Cancino, J., Gonzalez, A., and Santos, M.J. (2009). Pex3p-dependent peroxisomal biogenesis initiates in the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *J Cell Biochem* *107*, 1083-1096.
41. Kim, P.K., Mullen, R.T., Schumann, U., and Lippincott-Schwartz, J. (2006). The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol* *173*, 521-532.
42. Ma, C., Agrawal, G., and Subramani, S. (2011). Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J Cell Biol* *193*, 7-16.
43. South, S.T., Sacksteder, K.A., Li, X., Liu, Y., and Gould, S.J. (2000). Inhibitors of COPI and COPII do not block PEX3-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* *149*, 1345-1360.
44. Voorn-Brouwer, T., Kragt, A., Tabak, H.F., and Distel, B. (2001). Peroxisomal membrane proteins are properly targeted to peroxisomes in the absence of COPI- and COPII-mediated vesicular transport. *J Cell Sci* *114*, 2199-2204.
45. Stotz, M. (2008). Funktion und Lokalisation von PEX16 in der de novo Biogenese von Peroxisomen. Interfakultäres Institut für Biochemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Diplomarbeit.
46. Yonekawa, S., Furuno, A., Baba, T., Fujiki, Y., Ogasawara, Y., Yamamoto, A., Tagaya, M., and Tani, K. (2011). Sec16B is involved in the endoplasmic reticulum export of the peroxisomal membrane biogenesis factor peroxin 16 (Pex16) in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 12746-12751.
47. Erdmann, R., and Blobel, G. (1996). Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J Cell Biol* *135*, 111-121.
48. Gould, S.J., Kalish, J.E., Morrell, J.C., Bjorkman, J., Urquhart, A.J., and Crane, D.I. (1996). Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTS1 receptor. *J Cell Biol* *135*, 85-95.
49. Santos, M.J., Imanaka, T., Shio, H., and Lazarow, P.B. (1988). Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem* *263*, 10502-10509.
50. Santos, M.J., Imanaka, T., Shio, H., Small, G.M., and Lazarow, P.B. (1988). Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome--aberrant organelle assembly. *Science* *239*, 1536-1538.
51. Faust, P.L., and Hatten, M.E. (1997). Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J Cell Biol* *139*, 1293-1305.

52. Rottensteiner, H., Kramer, A., Lorenzen, S., Stein, K., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., and Erdmann, R. (2004). Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol Biol Cell* 15, 3406-3417.
53. Snyder, W.B., Koller, A., Choy, A.J., and Subramani, S. (2000). The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol* 149, 1171-1178.
54. Sacksteder, K.A., Jones, J.M., South, S.T., Li, X., Liu, Y., and Gould, S.J. (2000). PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* 148, 931-944.
55. Rucktäschel, R., Thoms, S., Sidorovitch, V., Halbach, A., Pechlivanis, M., Volkmer, R., Alexandrov, K., Kuhlmann, J., Rottensteiner, H., and Erdmann, R. (2009). Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* 284, 20885-20896.
56. Fransen, M., Wylin, T., Brees, C., Mannaerts, G.P., and Van Veldhoven, P.P. (2001). Human pex19p binds peroxisomal integral membrane proteins at regions distinct from their sorting sequences. *Mol Cell Biol* 21, 4413-4424.
57. Vastiau, I.M., Anthonio, E.A., Brams, M., Brees, C., Young, S.G., Van de Velde, S., Wanders, R.J., Mannaerts, G.P., Baes, M., Van Veldhoven, P.P., and Fransen, M. (2006). Farnesylation of Pex19p is not essential for peroxisome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 63, 1686-1699.
58. Fujiki, Y., Matsuzono, Y., Matsuzaki, T., and Fransen, M. (2006). Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1639-1646.
59. Fang, Y., Morrell, J.C., Jones, J.M., and Gould, S.J. (2004). PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 863-875.
60. Jones, J.M., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2004). PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 57-67.
61. Matsuzono, Y., and Fujiki, Y. (2006). In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p. *J Biol Chem* 281, 36-42.
62. Shibata, H., Kashiwayama, Y., Imanaka, T., and Kato, H. (2004). Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins. *J Biol Chem* 279, 38486-38494.
63. Diestelkötter, P., and Just, W.W. (1993). In vitro insertion of the 22-kD peroxisomal membrane protein into isolated rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* 123, 1717-1725.

64. Rucktäschel, R., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2011). Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 1808, 892-900.
65. Matsuzaki, T., and Fujiki, Y. (2008). The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. *J Cell Biol* 183, 1275-1286.
66. Heiland, I., and Erdmann, R. (2005). Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J* 272, 2362-2372.
67. Schnell, D.J., and Hebert, D.N. (2003). Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112, 491-505.
68. Leon, S., Goodman, J.M., and Subramani, S. (2006). Uniqueness of the mechanism of protein import into the peroxisome matrix: transport of folded, co-factor-bound and oligomeric proteins by shuttling receptors. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1552-1564.
69. Walton, P.A., Hill, P.E., and Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* 6, 675-683.
70. McNew, J.A., and Goodman, J.M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* 127, 1245-1257.
71. Glover, J.R., Andrews, D.W., and Rachubinski, R.A. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10541-10545.
72. Gould, S.G., Keller, G.A., and Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* 105, 2923-2931.
73. Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J., and Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108, 1657-1664.
74. Brocard, C., and Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochim Biophys Acta* 1763, 1565-1573.
75. Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J., and Hartig, A. (1998). The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* 273, 33635-33643.
76. Stanley, W.A., Filipp, F.V., Kursula, P., Schuller, N., Erdmann, R., Schliebs, W., Sattler, M., and Wilmanns, M. (2006). Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p. *Mol Cell* 24, 653-663.
77. Terlecky, S.R., Nuttley, W.M., McCollum, D., Sock, E., and Subramani, S. (1995). The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *EMBO J* 14, 3627-3634.

78. Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., and Hashimoto, T. (1991). Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 947-954.
79. Rachubinski, R.A., and Subramani, S. (1995). How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* 83, 525-528.
80. Mukai, S., and Fujiki, Y. (2006). Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *J Biol Chem* 281, 37311-37320.
81. Dodt, G., Warren, D., Becker, E., Rehling, P., and Gould, S.J. (2001). Domain mapping of human PEX5 reveals functional and structural similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p. *J Biol Chem* 276, 41769-41781.
82. Lazarow, P.B. (2006). The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1599-1604.
83. Schliebs, W., and Kunau, W.H. (2006). PTS2 co-receptors: diverse proteins with common features. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1605-1612.
84. Kerksen, D., Hambruch, E., Klaas, W., Platta, H.W., de Kruijff, B., Erdmann, R., Kunau, W.H., and Schliebs, W. (2006). Membrane association of the cycling peroxisome import receptor Pex5p. *J Biol Chem* 281, 27003-27015.
85. Brown, L.A., and Baker, A. (2008). Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Mol Membr Biol* 25, 363-375.
86. Rayapuram, N., and Subramani, S. (2006). The importomer--a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1613-1619.
87. Erdmann, R., and Schliebs, W. (2005). Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 738-742.
88. Miyata, N., and Fujiki, Y. (2005). Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Mol Cell Biol* 25, 10822-10832.
89. Platta, H.W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2005). Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* 7, 817-822.
90. Matsumoto, N., Tamura, S., and Fujiki, Y. (2003). The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* 5, 454-460.
91. Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., and Distel, B. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells. *J Biol Chem* 280, 7867-7874.

92. Platta, H.W., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2004). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem J* 384, 37-45.
93. Kiel, J.A., Emmrich, K., Meyer, H.E., and Kunau, W.H. (2005). Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import. *J Biol Chem* 280, 1921-1930.
94. Platta, H.W., El Magraoui, F., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2007). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J Cell Biol* 177, 197-204.
95. Platta, H.W., El Magraoui, F., Baumer, B.E., Schlee, D., Girzalsky, W., and Erdmann, R. (2009). Pex2 and pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Mol Cell Biol* 29, 5505-5516.
96. Williams, C., van den Berg, M., Geers, E., and Distel, B. (2008). Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 620-624.
97. Luby-Phelps, K. (1994). Physical properties of cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 6, 3-9.
98. Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 14, 25-34.
99. Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.
100. Bergen, L.G., and Borisy, G.G. (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J Cell Biol* 84, 141-150.
101. Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.
102. Schliwa, M., and Woehlke, G. (2003). Molecular motors. *Nature* 422, 759-765.
103. Chang, L., and Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 601-613.
104. Chang, L., Barlan, K., Chou, Y.H., Grin, B., Lakonishok, M., Serpinskaya, A.S., Shumaker, D.K., Herrmann, H., Gelfand, V.I., and Goldman, R.D. (2009). The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. *J Cell Sci* 122, 2914-2923.
105. Gross, S.P. (2004). Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport. *Phys Biol* 1, R1-11.
106. Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.

107. Ovechkina, Y., and Wordeman, L. (2003). Unconventional motoring: an overview of the Kin C and Kin I kinesins. *Traffic* *4*, 367-375.
108. Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 682-696.
109. Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 60-73.
110. Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* *407*, 41-47.
111. Miki, H., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* *15*, 467-476.
112. Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* *96*, 69-78.
113. Kikkawa, M., Sablin, E.P., Okada, Y., Yajima, H., Fletterick, R.J., and Hirokawa, N. (2001). Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* *411*, 439-445.
114. Scholey, J.M., Heuser, J., Yang, J.T., and Goldstein, L.S. (1989). Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. *Nature* *338*, 355-357.
115. Hirokawa, N., Pfister, K.K., Yorifuji, H., Wagner, M.C., Brady, S.T., and Bloom, G.S. (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* *56*, 867-878.
116. Diefenbach, R.J., Mackay, J.P., Armati, P.J., and Cunningham, A.L. (1998). The C-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry* *37*, 16663-16670.
117. Nitta, R., Kikkawa, M., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2004). KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules. *Science* *305*, 678-683.
118. Yildiz, A., and Selvin, P.R. (2005). Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol* *15*, 112-120.
119. Li, M., and Zheng, W. (2012). All-atom structural investigation of kinesin-microtubule complex constrained by high-quality cryo-electron-microscopy maps. *Biochemistry* *51*, 5022-5032.
120. Cai, Q., Gerwin, C., and Sheng, Z.H. (2005). Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *J Cell Biol* *170*, 959-969.
121. Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., and Schwarz, T.L. (2006). Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* *173*, 545-557.
122. Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy

- chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* **93**, 1147-1158.
123. Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M., and Saxton, W.M. (2006). Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* **17**, 2057-2068.
 124. Schrader, M., King, S.J., Stroh, T.A., and Schroer, T.A. (2000). Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3663-3671.
 125. Kural, C., Kim, H., Syed, S., Goshima, G., Gelfand, V.I., and Selvin, P.R. (2005). Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science* **308**, 1469-1472.
 126. Ally, S., Larson, A.G., Barlan, K., Rice, S.E., and Gelfand, V.I. (2009). Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells. *J Cell Biol* **187**, 1071-1082.
 127. Kapitein, L.C., Schlager, M.A., van der Zwan, W.A., Wulf, P.S., Keijzer, N., and Hoogenraad, C.C. (2010). Probing intracellular motor protein activity using an inducible cargo trafficking assay. *Biophys J* **99**, 2143-2152.
 128. Cai, Q., Pan, P.Y., and Sheng, Z.H. (2007). Syntabulin-kinesin-1 family member 5B-mediated axonal transport contributes to activity-dependent presynaptic assembly. *J Neurosci* **27**, 7284-7296.
 129. Ong, L.L., Lim, A.P., Er, C.P., Kuznetsov, S.A., and Yu, H. (2000). Kinectin-kinesin binding domains and their effects on organelle motility. *J Biol Chem* **275**, 32854-32860.
 130. Toyoshima, I., Yu, H., Steuer, E.R., and Sheetz, M.P. (1992). Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J Cell Biol* **118**, 1121-1131.
 131. Seeger, M.A., Zhang, Y., and Rice, S.E. (2012). Kinesin tail domains are intrinsically disordered. *Proteins* **80**, 2437-2446.
 132. Guillaud, L., Wong, R., and Hirokawa, N. (2008). Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat Cell Biol* **10**, 19-29.
 133. McDonald, H.B., and Goldstein, L.S. (1990). Identification and characterization of a gene encoding a kinesin-like protein in *Drosophila*. *Cell* **61**, 991-1000.
 134. Kuriyama, R., Kofron, M., Essner, R., Kato, T., Dragas-Granoic, S., Omoto, C.K., and Khodjakov, A. (1995). Characterization of a minus end-directed kinesin-like motor protein from cultured mammalian cells. *J Cell Biol* **129**, 1049-1059.
 135. Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7004-7011.

136. Hirokawa, N. (2011). From electron microscopy to molecular cell biology, molecular genetics and structural biology: intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: genes, structure, dynamics and functions. *J Electron Microsc (Tokyo)* *60 Suppl 1*, S63-92.
137. Nath, S., Bananis, E., Sarkar, S., Stockert, R.J., Sperry, A.O., Murray, J.W., and Wolkoff, A.W. (2007). Kif5B and Kifc1 interact and are required for motility and fission of early endocytic vesicles in mouse liver. *Mol Biol Cell* *18*, 1839-1849.
138. Mountain, V., Simerly, C., Howard, L., Ando, A., Schatten, G., and Compton, D.A. (1999). The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol* *147*, 351-366.
139. Cai, S., Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2009). Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. *Mol Biol Cell* *20*, 1348-1359.
140. Hatsumi, M., and Endow, S.A. (1992). Mutants of the microtubule motor protein, nonclaret disjunctional, affect spindle structure and chromosome movement in meiosis and mitosis. *J Cell Sci* *101 (Pt 3)*, 547-559.
141. Saunders, W., Hornack, D., Lengyel, V., and Deng, C. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related motor Kar3p acts at preanaphase spindle poles to limit the number and length of cytoplasmic microtubules. *J Cell Biol* *137*, 417-431.
142. Walczak, C.E., Verma, S., and Mitchison, T.J. (1997). XCTK2: a kinesin-related protein that promotes mitotic spindle assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol* *136*, 859-870.
143. Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S., and Hirokawa, N. (1997). KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* *18*, 425-438.
144. Hanlon, D.W., Yang, Z., and Goldstein, L.S. (1997). Characterization of KIFC2, a neuronal kinesin superfamily member in mouse. *Neuron* *18*, 439-451.
145. Navolanic, P.M., and Sperry, A.O. (2000). Identification of isoforms of a mitotic motor in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod* *62*, 1360-1369.
146. Yang, Z., Hanlon, D.W., Marszalek, J.R., and Goldstein, L.S. (1997). Identification, partial characterization, and genetic mapping of kinesin-like protein genes in mouse. *Genomics* *45*, 123-131.
147. Noda, Y., Okada, Y., Saito, N., Setou, M., Xu, Y., Zhang, Z., and Hirokawa, N. (2001). KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *J Cell Biol* *155*, 77-88.

148. Hoang, E.H., Whitehead, J.L., Dose, A.C., and Burnside, B. (1998). Cloning of a novel C-terminal kinesin (KIFC3) that maps to human chromosome 16q13-q21 and thus is a candidate gene for Bardet-Biedl syndrome. *Genomics* 52, 219-222.
149. Bruford, E.A., Riise, R., Teague, P.W., Porter, K., Thomson, K.L., Moore, A.T., Jay, M., Warburg, M., Schinzel, A., Tommerup, N., Tornqvist, K., Rosenberg, T., Patton, M., Mansfield, D.C., and Wright, A.F. (1997). Linkage mapping in 29 Bardet-Biedl syndrome families confirms loci in chromosomal regions 11q13, 15q22.3-q23, and 16q21. *Genomics* 41, 93-99.
150. Green, J.S., Parfrey, P.S., Harnett, J.D., Farid, N.R., Cramer, B.C., Johnson, G., Heath, O., McManamon, P.J., O'Leary, E., and Pryse-Phillips, W. (1989). The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321, 1002-1009.
151. Yang, Z., Xia, C., Roberts, E.A., Bush, K., Nigam, S.K., and Goldstein, L.S. (2001). Molecular cloning and functional analysis of mouse C-terminal kinesin motor KifC3. *Mol Cell Biol* 21, 765-770.
152. Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., and Takeichi, M. (2008). Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell* 135, 948-959.
153. Xu, Y., Takeda, S., Nakata, T., Noda, Y., Tanaka, Y., and Hirokawa, N. (2002). Role of KIFC3 motor protein in Golgi positioning and integration. *J Cell Biol* 158, 293-303.
154. De, S., Cipriano, R., Jackson, M.W., and Stark, G.R. (2009). Overexpression of kinesins mediates docetaxel resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 69, 8035-8042.
155. Tan, M.H., De, S., Bebek, G., Orloff, M.S., Wesolowski, R., Downs-Kelly, E., Budd, G.T., Stark, G.R., and Eng, C. (2012). Specific kinesin expression profiles associated with taxane resistance in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 131, 849-858.
156. Hutchins, J.R., Toyoda, Y., Hegemann, B., Poser, I., Heriche, J.K., Sykora, M.M., Augsburg, M., Hudecz, O., Buschhorn, B.A., Bulkescher, J., Conrad, C., Comartin, D., Schleiffer, A., Sarov, M., Pozniakovsky, A., Slabicki, M.M., Schloissnig, S., Steinmacher, I., Leuschner, M., Ssykor, A., Lawo, S., Pelletier, L., Stark, H., Nasmyth, K., Ellenberg, J., Durbin, R., Buchholz, F., Mechtler, K., Hyman, A.A., and Peters, J.M. (2010). Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* 328, 593-599.
157. Gibbons, I.R., Gibbons, B.H., Mocz, G., and Asai, D.J. (1991). Multiple nucleotide-binding sites in the sequence of dynein beta heavy chain. *Nature* 352, 640-643.
158. Mikami, A., Paschal, B.M., Mazumdar, M., and Vallee, R.B. (1993). Molecular cloning of the retrograde transport motor cytoplasmic dynein (MAP 1C). *Neuron* 10, 787-796.

159. Tynan, S.H., Gee, M.A., and Vallee, R.B. (2000). Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *J Biol Chem* 275, 32769-32774.
160. Gibbons, I.R., and Rowe, A.J. (1965). Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 149, 424-426.
161. Sale, W.S., and Satir, P. (1977). Direction of active sliding of microtubules in *Tetrahymena* cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2045-2049.
162. Paschal, B.M., and Vallee, R.B. (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330, 181-183.
163. Schnapp, B.J., and Reese, T.S. (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1548-1552.
164. Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-85.
165. Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 141, 51-59.
166. Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J., and Rutter, G.A. (2004). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117, 4389-4400.
167. King, S.J., and Schroer, T.A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2, 20-24.
168. Helfand, B.T., Mikami, A., Vallee, R.B., and Goldman, R.D. (2002). A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol* 157, 795-806.
169. Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 2, 922-930.
170. Carter, A.P., Cho, C., Jin, L., and Vale, R.D. (2011). Crystal structure of the dynein motor domain. *Science* 331, 1159-1165.
171. Kon, T., Sutoh, K., and Kurisu, G. (2011). X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain. *Nat Struct Mol Biol* 18, 638-642.
172. Schrader, M., Burkhardt, J.K., Baumgart, E., Luers, G., Spring, H., Volkl, A., and Fahimi, H.D. (1996). Interaction of microtubules with peroxisomes. Tubular and spherical peroxisomes in HepG2 cells and their alterations induced by microtubule-active drugs. *Eur J Cell Biol* 69, 24-35.

173. Gorgas, K. (1985). Serial section analysis of mouse hepatic peroxisomes. *Anat Embryol (Berl)* 172, 21-32.
174. Yamamoto, K., and Fahimi, H.D. (1987). Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogeneous segments. *J Cell Biol* 105, 713-722.
175. Rapp, S., Saffrich, R., Anton, M., Jakle, U., Ansorge, W., Gorgas, K., and Just, W.W. (1996). Microtubule-based peroxisome movement. *J Cell Sci* 109 (Pt 4), 837-849.
176. Wiemer, E.A., Wenzel, T., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., and Subramani, S. (1997). Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol* 136, 71-80.
177. Thiemann, M., Schrader, M., Volkl, A., Baumgart, E., and Fahimi, H.D. (2000). Interaction of peroxisomes with microtubules. In vitro studies using a novel peroxisome-microtubule binding assay. *Eur J Biochem* 267, 6264-6275.
178. Fagarasanu, A., Mast, F.D., Knoblach, B., Jin, Y., Brunner, M.J., Logan, M.R., Glover, J.N., Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., Weisman, L.S., and Rachubinski, R.A. (2009). Myosin-driven peroxisome partitioning in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* 186, 541-554.
179. Hoepfner, D., van den Berg, M., Philippsen, P., Tabak, H.F., and Hettema, E.H. (2001). A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 155, 979-990.
180. Fagarasanu, A., Fagarasanu, M., Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., and Rachubinski, R.A. (2006). The peroxisomal membrane protein Inp2p is the peroxisome-specific receptor for the myosin V motor Myo2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Cell* 10, 587-600.
181. Otzen, M., Rucktäschel, R., Thoms, S., Emmrich, K., Krikken, A.M., Erdmann, R., and van der Klei, I.J. (2012). Pex19p contributes to peroxisome inheritance in the association of peroxisomes to Myo2p. *Traffic* 13, 947-959.
182. Gorgas, K. (1987). Morphogenesis of peroxisomes in lipid synthesizing epithelia. *Peroxisomes in biology and medicine*. H.D. Fahimi and H. Sies, Springer Verlag(Heidelberg), 3-17.
183. Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Rosen, O.M., and Rubin, C.S. (1980). Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol* 87, 180-196.
184. Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S., and Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36, 1211-1226.

185. Schrader, M. (2001). Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. *J Histochem Cytochem* *49*, 1421-1429.
186. Bonekamp, N.A., Sampaio, P., de Abreu, F.V., Luers, G.H., and Schrader, M. (2012). Transient complex interactions of Mammalian peroxisomes without exchange of matrix or membrane marker proteins. *Traffic* *13*, 960-978.
187. Motley, A.M., and Hettema, E.H. (2007). Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J Cell Biol* *178*, 399-410.
188. Huybrechts, S.J., Van Veldhoven, P.P., Brees, C., Mannaerts, G.P., Los, G.V., and Fransen, M. (2009). Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. *Traffic* *10*, 1722-1733.
189. Welte, M.A. (2004). Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol* *14*, R525-537.
190. Gross, S.P., Vershinin, M., and Shubeita, G.T. (2007). Cargo transport: two motors are sometimes better than one. *Curr Biol* *17*, R478-486.
191. Hollenbeck, P.J. (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* *1*, d91-102.
192. Murray, J.W., Bananis, E., and Wolkoff, A.W. (2000). Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process. *Mol Biol Cell* *11*, 419-433.
193. Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A., and Griffiths, G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* *137*, 113-129.
194. Wacker, I., Kaether, C., Kromer, A., Migala, A., Almers, W., and Gerdes, H.H. (1997). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* *110* (Pt 13), 1453-1463.
195. Shah, J.V., Flanagan, L.A., Janmey, P.A., and Leterrier, J.F. (2000). Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell* *11*, 3495-3508.
196. Shubeita, G.T., Tran, S.L., Xu, J., Vershinin, M., Cermelli, S., Cotton, S.L., Welte, M.A., and Gross, S.P. (2008). Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets. *Cell* *135*, 1098-1107.
197. Welte, M.A., Gross, S.P., Postner, M., Block, S.M., and Wieschaus, E.F. (1998). Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell* *92*, 547-557.
198. Sims, P.A., and Xie, X.S. (2009). Probing dynein and kinesin stepping with mechanical manipulation in a living cell. *Chemphyschem* *10*, 1511-1516.

199. Müller, M.J., Klumpp, S., and Lipowsky, R. (2008). Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 4609-4614.
200. Kim, H., Ling, S.C., Rogers, G.C., Kural, C., Selvin, P.R., Rogers, S.L., and Gelfand, V.I. (2007). Microtubule binding by dynactin is required for microtubule organization but not cargo transport. *J Cell Biol* *176*, 641-651.
201. Gross, S.P., Welte, M.A., Block, S.M., and Wieschaus, E.F. (2002). Coordination of opposite-polarity microtubule motors. *J Cell Biol* *156*, 715-724.
202. Gross, S.P., Welte, M.A., Block, S.M., and Wieschaus, E.F. (2000). Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance. *J Cell Biol* *148*, 945-956.
203. Gross, S.P. (2003). Dynactin: coordinating motors with opposite inclinations. *Curr Biol* *13*, R320-322.
204. Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Vaughan, P.S., Lopez Fanarraga, M., Vernos, I., Vaughan, K.T., and Gelfand, V.I. (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol* *160*, 297-301.
205. Rodionov, V., Yi, J., Kashina, A., Oladipo, A., and Gross, S.P. (2003). Switching between microtubule- and actin-based transport systems in melanophores is controlled by cAMP levels. *Curr Biol* *13*, 1837-1847.
206. De Vos, K.J., Sable, J., Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2003). Expression of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate-specific pleckstrin homology domains alters direction but not the level of axonal transport of mitochondria. *Mol Biol Cell* *14*, 3636-3649.
207. Chada, S.R., and Hollenbeck, P.J. (2003). Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *J Exp Biol* *206*, 1985-1992.
208. Hamm-Alvarez, S.F., Kim, P.Y., and Sheetz, M.P. (1993). Regulation of vesicle transport in CV-1 cells and extracts. *J Cell Sci* *106* (Pt 3), 955-966.
209. Azhderian, E.M., Hefner, D., Lin, C.H., Kaczmarek, L.K., and Forscher, P. (1994). Cyclic AMP modulates fast axonal transport in *Aplysia* bag cell neurons by increasing the probability of single organelle movement. *Neuron* *12*, 1223-1233.
210. Thaler, C.D., and Haimo, L.T. (1990). Regulation of organelle transport in melanophores by calcineurin. *J Cell Biol* *111*, 1939-1948.
211. Lin, S.X., Ferro, K.L., and Collins, C.A. (1994). Cytoplasmic dynein undergoes intracellular redistribution concomitant with phosphorylation of the heavy chain in response to serum starvation and okadaic acid. *J Cell Biol* *127*, 1009-1019.
212. Dillman, J.F., 3rd, and Pfister, K.K. (1994). Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles. *J Cell Biol* *127*, 1671-1681.

213. Hollenbeck, P.J. (1993). Phosphorylation of neuronal kinesin heavy and light chains in vivo. *J Neurochem* *60*, 2265-2275.
214. Matthies, H.J., Miller, R.J., and Palfrey, H.C. (1993). Calmodulin binding to and cAMP-dependent phosphorylation of kinesin light chains modulate kinesin ATPase activity. *J Biol Chem* *268*, 11176-11187.
215. Dueck, A. (2008). Etablierung der regulierbaren Expression von shRNAs zur Analyse der peroxisomalen Biogenese. Interfakultäres Institut für Biochemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Diplomarbeit.
216. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
217. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.
218. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* *3*, RESEARCH0034.
219. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
220. Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 3116-3120.
221. Dodt, G., Braverman, N., Wong, C., Moser, A., Moser, H.W., Watkins, P., Valle, D., and Gould, S.J. (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet* *9*, 115-125.
222. Collins, C.S., and Gould, S.J. (1999). Identification of a common PEX1 mutation in Zellweger syndrome. *Hum Mutat* *14*, 45-53.
223. Will, G.K., Soukupova, M., Hong, X., Erdmann, K.S., Kiel, J.A., Dodt, G., Kunau, W.H., and Erdmann, R. (1999). Identification and characterization of the human orthologue of yeast Pex14p. *Mol Cell Biol* *19*, 2265-2277.
224. Krensel, P. (2008). Untersuchungen zur Funktion von PEX16 in frühen Phasen der peroxisomalen Biogenese. Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen.
225. Splinter, D., Tanenbaum, M.E., Lindqvist, A., Jaarsma, D., Flotho, A., Yu, K.L., Grigoriev, I., Engelsma, D., Haasdijk, E.D., Keijzer, N., Demmers, J., Fornerod, M., Melchior, F., Hoogenraad, C.C., Medema, R.H., and Akhmanova, A. (2010). Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with

- nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* 8, e1000350.
226. Ghaedi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Matsuzono, Y., and Fujiki, Y. (2000). The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11, 2085-2102.
 227. Titorenko, V.I., and Mullen, R.T. (2006). Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J Cell Biol* 174, 11-17.
 228. Nagotu, S., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2010). Divide et impera: the dictum of peroxisomes. *Traffic* 11, 175-184.
 229. Girzalsky, W., Saffian, D., and Erdmann, R. (2010). Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta* 1803, 724-731.
 230. Severs, N.J. (1988). Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci* 90 (Pt 3), 341-348.
 231. Brown, D.A. (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* 21, 430-439.
 232. Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
 233. Stuermer, C.A., Lang, D.M., Kirsch, F., Wiechers, M., Deininger, S.O., and Plattner, H. (2001). Glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins and fyn kinase assemble in noncaveolar plasma membrane microdomains defined by reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell* 12, 3031-3045.
 234. Langhorst, M.F., Reuter, A., and Stuermer, C.A. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* 62, 2228-2240.
 235. Woudenberg, J., Rembacz, K.P., Hoekstra, M., Pellicoro, A., van den Heuvel, F.A., Heegsma, J., van Ijzendoorn, S.C., Holzinger, A., Imanaka, T., Moshage, H., and Faber, K.N. (2010). Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis in HepG2 cells. *Hepatology* 52, 623-633.
 236. Woudenberg, J., Rembacz, K.P., van den Heuvel, F.A., Woudenberg-Vrenken, T.E., Buist-Homan, M., Geuken, M., Hoekstra, M., Deelman, L.E., Enrich, C., Henning, R.H., Moshage, H., and Faber, K.N. (2010). Caveolin-1 is enriched in the peroxisomal membrane of rat hepatocytes. *Hepatology* 51, 1744-1753.
 237. Glebov, O.O., Bright, N.A., and Nichols, B.J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8, 46-54.
 238. Browman, D.T., Hoegg, M.B., and Robbins, S.M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* 17, 394-402.

239. Brocard, C.B., Boucher, K.K., Jedeszko, C., Kim, P.K., and Walton, P.A. (2005). Requirement for microtubules and dynein motors in the earliest stages of peroxisome biogenesis. *Traffic* **6**, 386-395.
240. Schmidt, F., Dietrich, D., Eylenein, R., Groemping, Y., Stehle, T., and Dodt, G. (2012). The Role of Conserved PEX3 Regions in PEX19-Binding and Peroxisome Biogenesis. *Traffic* **13**, 1244-1260.
241. Seiler, F. (2006). Yeast two hybrid screen zur Identifikation neuer Interaktionspartner des peroxisomalen AAA-Proteins hsPEX1. Interfakultäres Institut für Biochemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Diplomarbeit.
242. Nguyen, T., Bjorkman, J., Paton, B.C., and Crane, D.I. (2006). Failure of microtubule-mediated peroxisome division and trafficking in disorders with reduced peroxisome abundance. *J Cell Sci* **119**, 636-645.
243. Hoyt, M.A., He, L., Loo, K.K., and Saunders, W.S. (1992). Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J Cell Biol* **118**, 109-120.
244. Roof, D.M., Meluh, P.B., and Rose, M.D. (1992). Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **118**, 95-108.
245. Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189-200.
246. Milner, D.J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000). Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* **150**, 1283-1298.
247. Appaix, F., Kuznetsov, A.V., Usson, Y., Kay, L., Andrienko, T., Olivares, J., Kaambre, T., Sikk, P., Margreiter, R., and Saks, V. (2003). Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp Physiol* **88**, 175-190.
248. Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1993). The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* **104** (Pt 3), 917-927.
249. Anesti, V., and Scorrano, L. (2006). The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 692-699.
250. Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* **118**, 5411-5419.
251. Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* **117**, 2791-2804.
252. Hirokawa, N., and Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* **6**, 201-214.

253. Kuznetsov, A.V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., and Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1928-1939.
254. Waterman-Storer, C.M., and Salmon, E.D. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol* 8, 798-806.
255. Wozniak, M.J., and Allan, V.J. (2006). Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J* 25, 5457-5468.
256. Feiguin, F., Ferreira, A., Kosik, K.S., and Caceres, A. (1994). Kinesin-mediated organelle translocation revealed by specific cellular manipulations. *J Cell Biol* 127, 1021-1039.
257. Wozniak, M.J., Bola, B., Brownhill, K., Yang, Y.C., Levakova, V., and Allan, V.J. (2009). Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J Cell Sci* 122, 1979-1989.
258. Schulte-Euler, P. (2009). Charakterisierung der peroxisomalen AAA-Proteine PEX1 und PEX6 sowie Analysen zur zellulären Funktion von PEX6. Interfakultäres Institut für Biochemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Dissertation.
259. Bonekamp, N.A., Volkl, A., Fahimi, H.D., and Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors* 35, 346-355.
260. Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122, 383-393.
261. Yamamoto, K., and Fahimi, H.D. (1987). Biogenesis of peroxisomes in regenerating rat liver. I. Sequential changes of catalase and urate oxidase detected by ultrastructural cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 43, 293-300.
262. Tabak, H.F., van der Zand, A., and Braakman, I. (2008). Peroxisomes: minted by the ER. *Curr Opin Cell Biol* 20, 393-400.
263. South, S.T., Baumgart, E., and Gould, S.J. (2001). Inactivation of the endoplasmic reticulum protein translocation factor, Sec61p, or its homolog, Ssh1p, does not affect peroxisome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12027-12031.
264. Rucktäschel, R., Halbach, A., Girzalsky, W., Rottensteiner, H., and Erdmann, R. (2010). De novo synthesis of peroxisomes upon mitochondrial targeting of Pex3p. *Eur J Cell Biol* 89, 947-954.
265. van der Zand, A., Gent, J., Braakman, I., and Tabak, H.F. (2012). Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* 149, 397-409.

-
266. Titorenko, V.I., Chan, H., and Rachubinski, R.A. (2000). Fusion of small peroxisomal vesicles in vitro reconstructs an early step in the in vivo multistep peroxisome assembly pathway of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol* *148*, 29-44.
267. Hettema, E.H., and Motley, A.M. (2009). How peroxisomes multiply. *J Cell Sci* *122*, 2331-2336.
268. Lazarow, P.B. (2003). Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 489-497.
269. Tabak, H.F., Hoepfner, D., Zand, A., Geuze, H.J., Braakman, I., and Huynen, M.A. (2006). Formation of peroxisomes: present and past. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1647-1654.
270. Delille, H.K., Agricola, B., Guimaraes, S.C., Borta, H., Luers, G.H., Fransen, M., and Schrader, M. (2010). Pex11p β -mediated growth and division of mammalian peroxisomes follows a maturation pathway. *J Cell Sci* *123*, 2750-2762.
271. Connerly, P.L., Esaki, M., Montegna, E.A., Strongin, D.E., Levi, S., Soderholm, J., and Glick, B.S. (2005). Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Curr Biol* *15*, 1439-1447.
272. Supek, F., Madden, D.T., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2002). Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *J Cell Biol* *158*, 1029-1038.
273. Espenshade, P., Gimeno, R.E., Holzmacher, E., Teung, P., and Kaiser, C.A. (1995). Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J Cell Biol* *131*, 311-324.
274. Schrader, M., Thiemann, M., and Fahimi, H.D. (2003). Peroxisomal motility and interaction with microtubules. *Microsc Res Tech* *61*, 171-178.
275. Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery. *J Cell Biol* *142*, 1413-1427.
276. Fagarasanu, A., and Rachubinski, R.A. (2007). Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* *10*, 528-538.
277. Kredel, S., Oswald, F., Nienhaus, K., Deuschle, K., Rocker, C., Wolff, M., Heilker, R., Nienhaus, G.U., and Wiedenmann, J. (2009). mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. *PLoS One* *4*, e4391.
278. Bartolini, F., and Gundersen, G.G. (2006). Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci* *119*, 4155-4163.
279. Akhmanova, A., and Hoogenraad, C.C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 47-54.

-
280. Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.
281. Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* 70, 887-900.
282. Rickard, J.E. (1999). CLIP-170. Guidebook to the cytoskeleton and motor proteins. T.E. Kreis and R.D. Vale, Oxford University Press(Oxford), 199-202.
283. Rickard, J.E., and Kreis, T.E. (1991). Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 266, 17597-17605.
284. Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E., and Schroer, T.A. (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* 10, 4107-4120.
285. Vaughan, K.T., Tynan, S.H., Faulkner, N.E., Echeverri, C.J., and Vallee, R.B. (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1437-1447.
286. Klopfenstein, D.R., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J* 17, 6168-6177.
287. Terasaki, M., Chen, L.B., and Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 103, 1557-1568.
288. Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C., and Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* 6, 1070-1077.
289. Vershinin, M., Carter, B.C., Razafsky, D.S., King, S.J., and Gross, S.P. (2007). Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 87-92.
290. Lopez, L.A., and Sheetz, M.P. (1993). Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP2. *Cell Motil Cytoskeleton* 24, 1-16.
291. Huber, C., Saffrich, R., Anton, M., Passreiter, M., Ansorge, W., Gorgas, K., and Just, W. (1997). A heterotrimeric G protein-phospholipase A2 signaling cascade is involved in the regulation of peroxisomal motility in CHO cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 23), 2955-2968.
292. Huber, C.M., Saffrich, R., Ansorge, W., and Just, W.W. (1999). Receptor-mediated regulation of peroxisomal motility in CHO and endothelial cells. *EMBO J* 18, 5476-5485.
293. Moolenaar, W.H., van Meeteren, L.A., and Giepmans, B.N. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26, 870-881.

294. Rumenapp, U., Blomquist, A., Schworer, G., Schablowski, H., Psoma, A., and Jakobs, K.H. (1999). Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a dbl family member. *FEBS Lett* **459**, 313-318.
295. Schollenberger, L., Gronemeyer, T., Huber, C.M., Lay, D., Wiese, S., Meyer, H.E., Warscheid, B., Saffrich, R., Peranen, J., Gorgas, K., and Just, W.W. (2010). RhoA regulates peroxisome association to microtubules and the actin cytoskeleton. *PLoS One* **5**, e13886.
296. Allan, V.J., and Schroer, T.A. (1999). Membrane motors. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 476-482.
297. Wang, B., Malik, R., Nigg, E.A., and Korner, R. (2008). Evaluation of the low-specificity protease elastase for large-scale phosphoproteome analysis. *Anal Chem* **80**, 9526-9533.
298. Hirokawa, N., and Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* **88**, 1089-1118.
299. Rios, R.M., Tassin, A.M., Celati, C., Antony, C., Boissier, M.C., Homberg, J.C., and Bornens, M. (1994). A peripheral protein associated with the cis-Golgi network redistributes in the intermediate compartment upon brefeldin A treatment. *J Cell Biol* **125**, 997-1013.
300. Infante, C., Ramos-Morales, F., Fedriani, C., Bornens, M., and Rios, R.M. (1999). GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol* **145**, 83-98.
301. Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* **156**, 1051-1063.
302. Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K., and Hirokawa, N. (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* **103**, 569-581.
303. Delevoeye, C., Hurbain, I., Tenza, D., Sibarita, J.B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W.J., Verkleij, A.J., Salamero, J., Marks, M.S., and Raposo, G. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J Cell Biol* **187**, 247-264.
304. Takeda, S., Yamazaki, H., Seog, D.H., Kanai, Y., Terada, S., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associated vesicles important for neurite building. *J Cell Biol* **148**, 1255-1265.
305. Muresan, V., Stankewich, M.C., Steffen, W., Morrow, J.S., Holzbaur, E.L., and Schnapp, B.J. (2001). Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol Cell* **7**, 173-183.

-
306. Holleran, E.A., Ligon, L.A., Tokito, M., Stankewich, M.C., Morrow, J.S., and Holzbaur, E.L. (2001). beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem* 276, 36598-36605.
 307. Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Howell, S.A., Dortland, B.R., De Zeeuw, C.I., Willemsen, R., Visser, P., Grosveld, F., and Galjart, N. (2001). Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J* 20, 4041-4054.
 308. Splinter, D., Razafsky, D.S., Schlager, M.A., Serra-Marques, A., Grigoriev, I., Demmers, J., Keijzer, N., Jiang, K., Poser, I., Hyman, A.A., Hoogenraad, C.C., King, S.J., and Akhmanova, A. (2012). BICD2, dynactin and LIS1 cooperate in regulating dynein recruitment to cellular structures. *Mol Biol Cell*.
 309. Bharti, P., Schliebs, W., Schievelbusch, T., Neuhaus, A., David, C., Kock, K., Herrmann, C., Meyer, H.E., Wiese, S., Warscheid, B., Theiss, C., and Erdmann, R. (2011). PEX14 is required for microtubule-based peroxisome motility in human cells. *J Cell Sci* 124, 1759-1768.
 310. Schrader, M., Reuber, B.E., Morrell, J.C., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Stroh, T.A., Valle, D., Schroer, T.A., and Gould, S.J. (1998). Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* 273, 29607-29614.
 311. Chang, C.C., South, S., Warren, D., Jones, J., Moser, A.B., Moser, H.W., and Gould, S.J. (1999). Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci* 112 (Pt 10), 1579-1590.
 312. Li, X., and Gould, S.J. (2002). PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol* 156, 643-651.
 313. Pieper, H.C. (2003). Biogenese von Peroxisomen. Funktionelle Untersuchungen zum PEX11 β -Protein des Menschen. Physiologisch-chemisches Institut, Ruhr-Universität Bochum, Dissertation.

8 Anhang

8.1 Plasmide

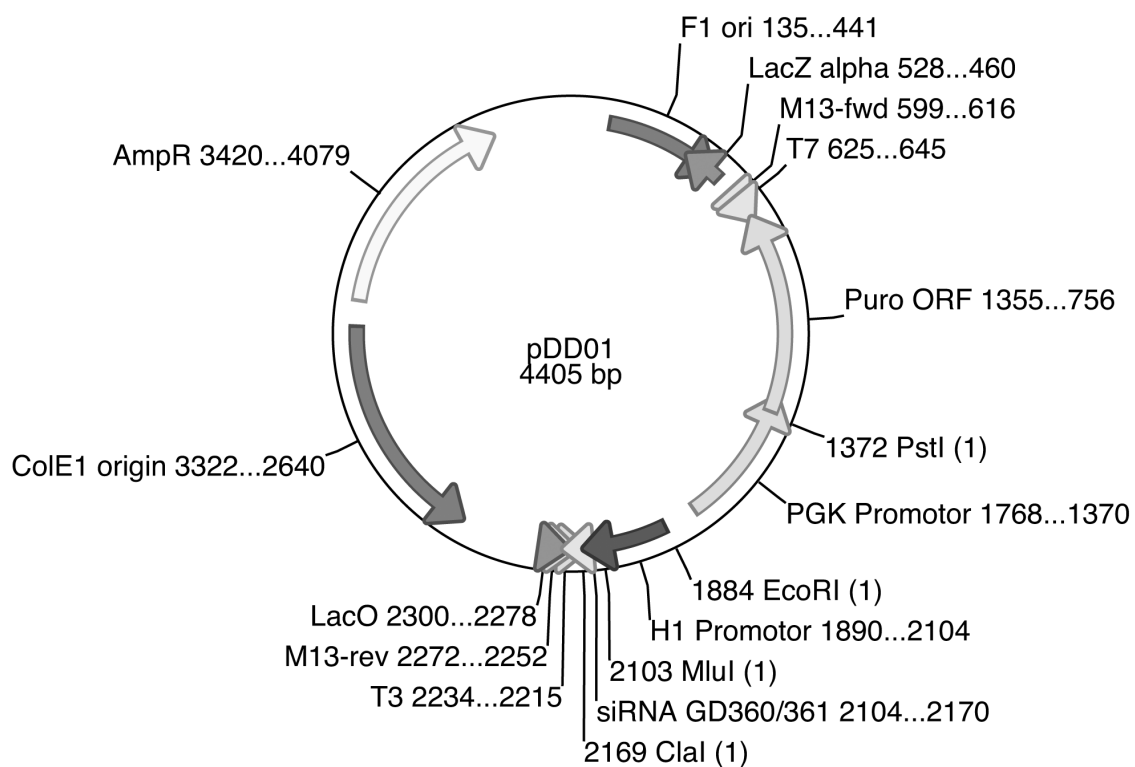


Abbildung 8.1: Plasmid pDD01 zur Expression von shPEX19

Verwendetes Plasmid zur Expression der shRNA-Sequenz gegen PEX19 mit den Oligonukleotiden GD360/361 in psuper mit Puromycin-Resistenz.

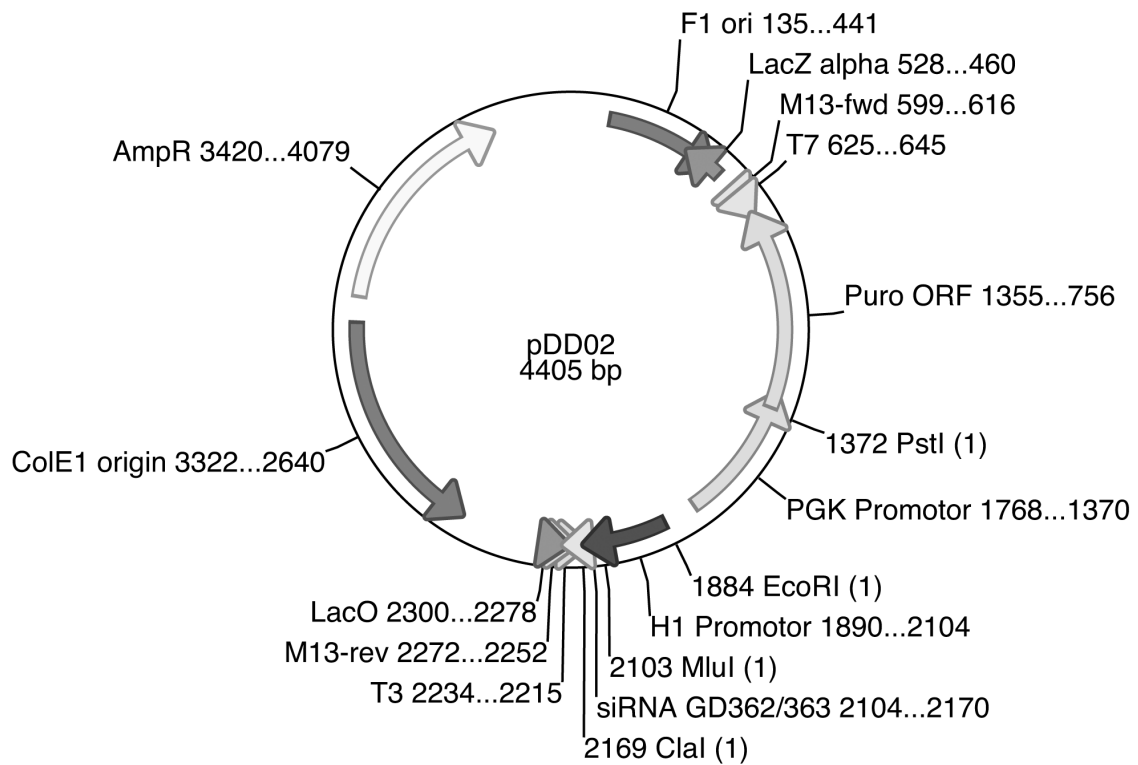


Abbildung 8.2: Plasmid pDD02 zur Expression von shPEX19

Verwendetes Plasmid zur Expression der shRNA-Sequenz gegen PEX19 mit den Oligonukleotiden GD362/363 in psuper mit Puromycin-Resistenz.

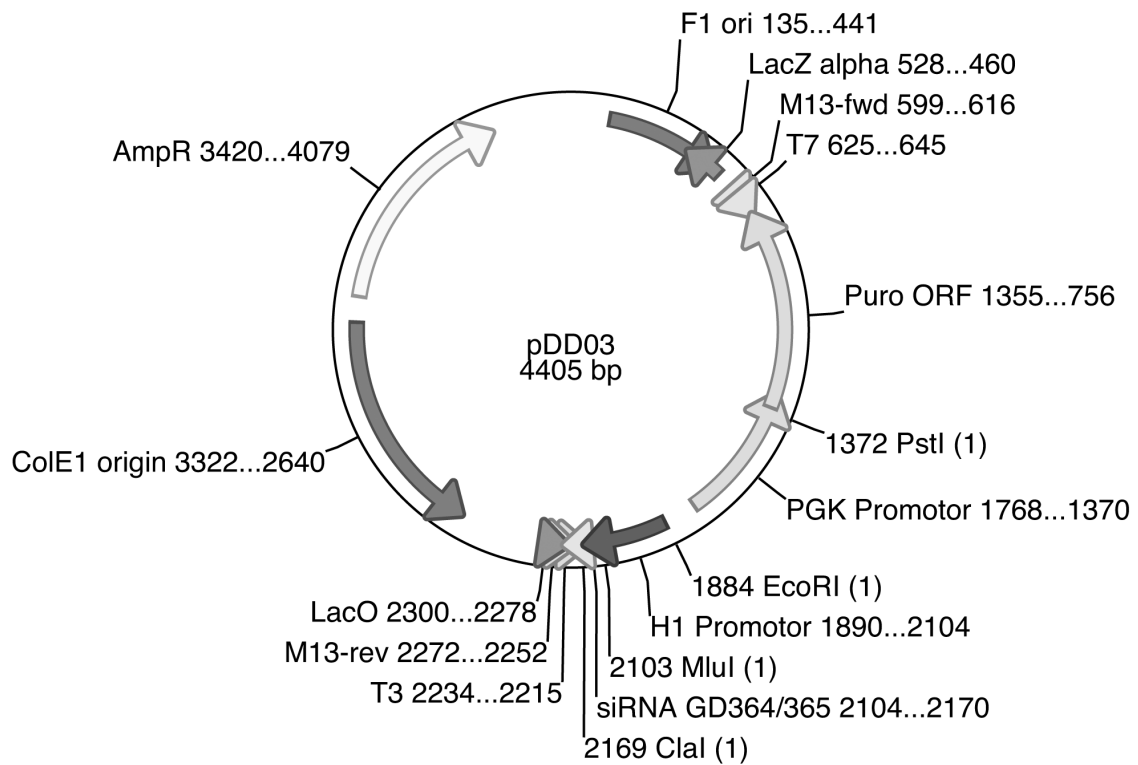


Abbildung 8.3: Plasmid pDD03 zur Expression von shPEX19

Verwendetes Plasmid zur Expression der shRNA-Sequenz gegen PEX19 mit den Oligonukleotiden GD364/365 in psuper mit Puromycin-Resistenz.

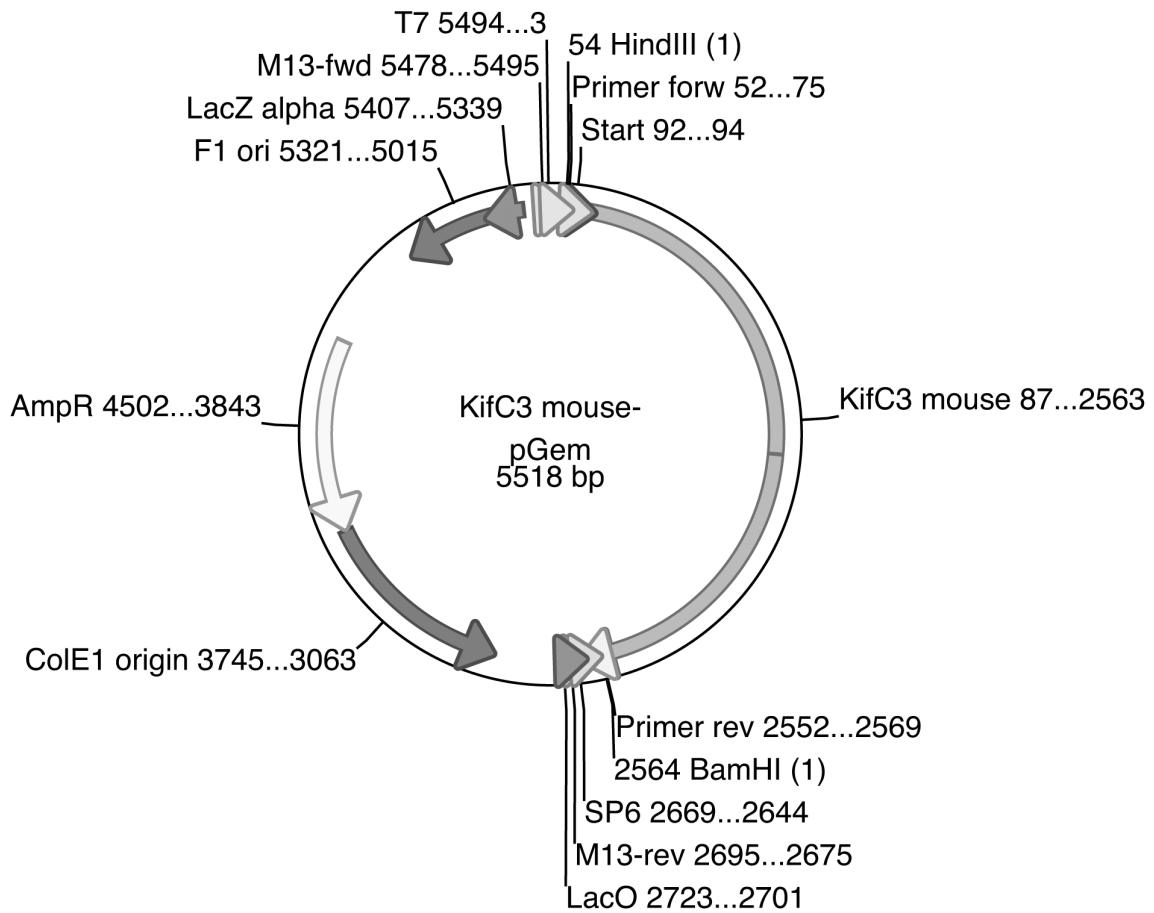


Abbildung 8.4: Plasmid pDD06

Kloniertes Plasmid zur Expression von murinem KifC3 im Vektor pGem mit Schnittstellen für HindIII und BamHI.

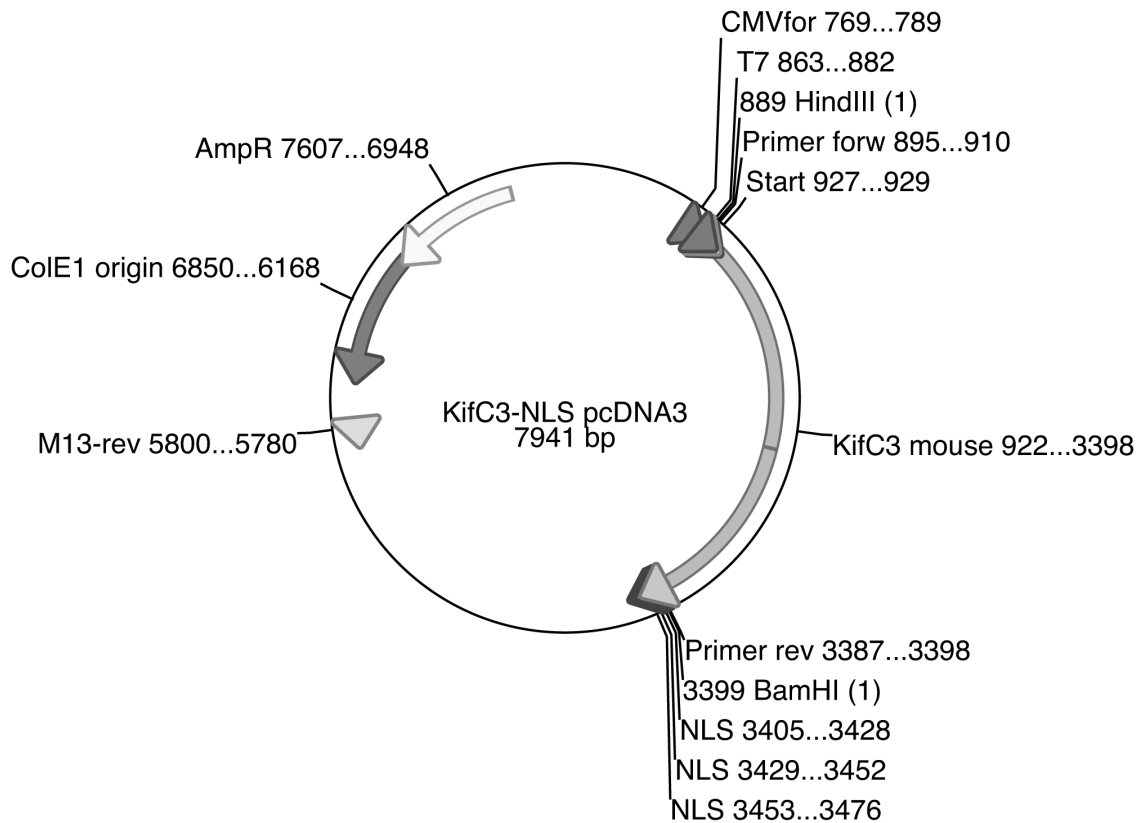


Abbildung 8.5: Plasmid pDD07 zur Expression von KifC3-NLS

Verwendetes Plasmid zur Expression von murinem KifC3 mit dreifachem Kernlokalisationsignal (NLS) in pcDNA3.

8.2 Zeitreihen von Lebendzellbeobachtungen

Verschiedene Zeitreihen lebender Zellen, die die Beobachtung von Peroxisomen durch Expression von PEX16-YFP ermöglichten, sind in 8.2.1 bis 8.2.5 auf der beigelegten DVD enthalten.

8.2.1 Lebendzellbeobachtung von transfizierten Δ PEX16 Zellen

Zeitreihe der Abbildung 3.5: Transfektion von Δ PEX16-Zellen mit PEX16-YFP und dem ER-Marker pDsRed2-ER resultierte nach 24 Stunden in der Bildung von präperoxisomalen Vesikeln, die teilweise mit einzelnen Lamellen des endoplasmatischen Retikulum überlagerten und sich eventuell durch Anhaftung mit dem ER parallel bewegten.

8.2.2 Δ PEX16-Zellen nach Transfektion mit PEX16-YFP im 3D Modell

3D Modell aus Abbildung 3.6: Δ PEX16-Zellen wurden mit PEX16-YFP und ER-Marker transient transfiziert. Nach Ausbildung der präperoxisomalen Vesikel 24 Stunden nach Transfektion wurde ein Bilderstapel von 46 Schnitten in der z-Ebene im Abstand von 0,24 μ m aufgenommen. Nach iterativer Dekonvolvierung wurde ein 3D Modell erstellt um die Lokalisation der Präperoxisomen relativ zum endoplasmatischen Reticulum darzustellen.

8.2.3 Verfolgung der peroxisomalen Bewegung in COS7 Zellen

Zeitreihe der Abbildung 3.15: Die Bewegung von Peroxisomen in COS7 Zellen wurde 24 Stunden nach transients Transfektion mit PEX16-YFP durch die Fluoreszenz des YFP in Echtzeit verfolgt. Im Abstand von 4,2 Sekunden wurden 60 Bilder über 250 Sekunden aufgenommen. Der Großteil der Peroxisomen bewegte sich in einem kleinen Radius mit sehr kurzen schnellen Bewegungen in variierende Richtungen, wohingegen ein kleiner Teil sich gerichtet über eine längere Distanz hinweg fortbewegte. Die Mikroskopeinstellungen wurden wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben übernommen.

8.2.4 Verfolgung der Bewegung präperoxisomaler Strukturen

Zeitreihe der Abbildung 3.16: PEX16-defiziente humane Fibroblasten wurden transient mit PEX16-YFP transfiziert und 16 Stunden später die Bewegung der präperoxisomalen Strukturen durch die Fluoreszenz des YFP in Echtzeit verfolgt. Im Abstand von 140 ms wurden 80 Bilder über 11 Sekunden aufgenommen. Die Präperoxisomen bewegten sich auf die für die Brownsche Molekularbewegung typische Weise in einem kleinen Radius in variierende Richtungen. Die Mikroskopeinstellungen wurden wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben übernommen.

8.2.5 Verfolgung der peroxisomalen Bewegung nach Komplementation

Zeitreihen der Abbildung 3.17: 24 Stunden (A) und 30 Stunden (B) nach Transfektion von PEX16-defizienten Fibroblasten mit PEX16-YFP wurden die Peroxisomen durch die Fluoreszenz des YFP verfolgt, die lange gerichtete Bewegungen ausführten. Es wurden 40 bzw. 80 Bilder im Abstand von 4,1 Sekunden über 160 Sekunden (A) bzw. im Abstand von 500 ms über 40 Sekunden (B) aufgenommen. Die Mikroskopeinstellungen wurden wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben übernommen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Schmidt, F., Dietrich, D., Eylenstein, R., Groemping, Y., Stehle, T., Dodt, G. (2012): The role of conserved PEX3 regions in PEX19 binding and peroxisome biogenesis. *Traffic* 13(9): 1244-60.

Weitere Teile der Arbeit führten zu folgenden Kongressbeiträgen:

Poster

- Dietrich, D., Dodt, G. (2009): Biogenesis and motility of peroxisomes. Doktorandenpostersession, IFIB, Tübingen, 06/2009.
- Dietrich, D., Dodt, G. (2009): Biogenesis and motility of peroxisomes. The EMBO Meeting, Amsterdam, Niederlande, 10/2009.
- Dietrich, D., Dodt, G. (2010): Influence of KifC3 on intracellular positioning of peroxisomes. Open European Peroxisome Meeting, Lunteren, Niederlande, 10/2010.
- Dietrich, D., Dodt, G. (2011): Influence of KifC3 on intracellular positioning of peroxisomes. Doktorandenpostersession, IFIB, Tübingen, 07/2011.

Vorträge

- Dietrich, D., Dodt, G. (2009): Live cell imaging of peroxisomal biogenesis. Doktorandenseminar, IFIB, Tübingen, 06/2009.
- Dietrich, D., Dodt, G. (2010): Influence of KifC3 on intracellular positioning of peroxisomes and the golgi apparatus. 1st Young Scientist Symposium of the IFIB, Blaubeuren, 06/2010.
- Dietrich, D., Dodt, G. (2012): Influence of KifC3 on intracellular positioning of peroxisomes. Doktorandenseminar, IFIB, Tübingen, 06/2012
- Dietrich, D., Dodt, G. (2012): Influence of KifC3 on intracellular positioning of peroxisomes. Open European Peroxisome Meeting, Dijon, Frankreich, 07/2012.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei Gabi Dodt bedanken für die Möglichkeit dieses Thema zu bearbeiten und meine Ergebnisse auf verschiedensten Konferenzen zu präsentieren und mich sowohl fachlich als auch persönlich weiter zu entwickeln und zu entfalten, sowie für die Unterstützung und Betreuung während meiner Zeit in ihrer Arbeitsgruppe und bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Jansen danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit RT-PCR Messungen in seinem Labor durchzuführen.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schulze-Osthoff für fachliche Ratschläge und verschiedene Materialien. Hier möchte ich mich besonders bei Frank Essmann für die Unterstützung bei den Messungen mittels Durchflusszyometrie und bei Eva für Tipps jeglicher Art und für entspannende Pläuschchen mit tollem Milchschaum und die immer wieder aufbauenden Gespräche bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank geht an die drei Ladies unserer Arbeitsgruppe Vera, Yvonne und Ricki! Ich danke euch für die tolle Zeit mit Kuchen, Sektfrühstück, Cocktailabenden, unvergesslichen BC-Festen, Spieleabenden, „Ladies nights“, diversen dienstlichen, halbdienstlichen und außerdienstlichen Unternehmungen wie die Reisen nach Holland und Dijon, in die Pfalz und zum Kanu fahren und für die stets hilfsbereite, motivierende und aufbauende Atmosphäre. Zusätzlich auch einen ganz lieben Dank an unseren Sonnenschein Dhaarsi für die entspannenden Kaffeepäuschen, After-Work-Drinks, fürs Korrekturlesen und ihre nie endende gute Laune.

Vielen Dank an Karin Steiger für die technische Unterstützung und verschiedenste fachliche und außerfachliche Ratschläge, an Patrick Schulte-Euler für die Einführung in die Labormethoden am Anfang meiner Zeit als Doktorandin und an Marie Lechler und Andrea Barna für die Hilfe bei der Durchführung von Experimenten und für die zahlreichen Midis.

Ich danke auch der gesamten Arbeitsgruppe Stehle und vor allem JoBa, Luisa und Kerstin für schöne Grillabende, Feiern mit Feuerzangenbowle und Stuhlnennen und weitere tolle Unternehmungen außerhalb des Instituts.

Ich möchte mich auch bei allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des IFIB für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft und ein offenes Ohr für jegliche Art von Problemen bedanken.

Außerdem danke ich besonders meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung und die immer wieder aufbauenden und motivierenden Worte, vor allem Maxi für die tollen Pfannkuchen und der Capoeira und allen Quilombolas de Luz, die mir vor allem in anstrengenden Zeiten einen tollen Ausgleich und immer wieder neue Kraft gaben. Ein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle an meine Eltern für ihre persönliche und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung in jeglichen Lebenssituationen und vor allem während meines Studiums, die mir erst ermöglichte diese akademische Laufbahn zu verfolgen.