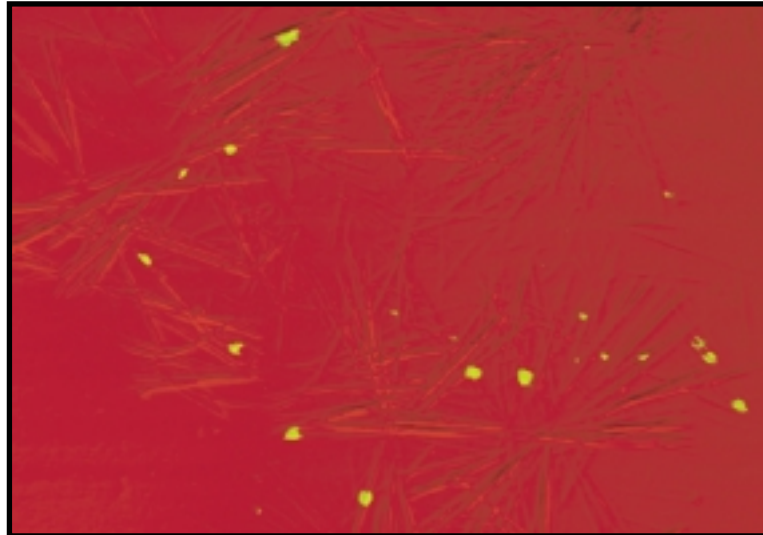


**Untersuchungen zur
in vitro Interaktion von Peroxisomen mit Mikrotubuli
und der daran beteiligten Bindungsproteine**



Dissertation

Meinolf Thiemann

Heidelberg, im April 2001

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Meinolf Thiemann

aus Welper

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Thema

Untersuchungen zur *in vitro* Interaktion von Peroxisomen mit Mikrotubuli
und der daran beteiligten Bindungsproteine

Gutachter: Prof. Dr. Christine Clayton

Prof. Dr. H. Dariush Fahimi

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
I. Zusammenfassung	6
II. Einleitung	7
1. Peroxisomen	7
1.1. Peroxisomaler Stoffwechsel	7
1.2. Biogenese der Peroxisomen	10
1.3. Proliferation der Peroxisomen und ihre transkriptionelle Regulation	11
1.4. Peroxisomale Erkrankungen	12
2. Das Cytoskelett und dessen Assoziation mit Zellorganellen	13
2.1. Mikrotubuli	13
2.2. Interaktion von Mikrotubuli mit Zellorganellen	14
2.3. Proteine, die an der Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli beteiligt sind	15
2.3.1. Mikrotubuli-assoziierte Proteine, Motorproteine und Motorprotein- assoziierte Proteine	15
2.3.2. Cytoplasmatische Linkerproteine (CLIPs)	15
2.3.3. Weitere für die Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli wichtige Proteine	18
2.4. <i>In vitro</i> Studien zur Bindung von Zellorganellen an Mikrotubuli	19
2.5. Interaktion von Peroxisomen mit Mikrotubuli	19
3. Ziele dieser Arbeit	21
III. Material und Methoden	22
1. Versuchstiere, Geräte und Materialien	22
1.1. Versuchstiere	22
1.2. Laborgeräte	22
1.3. Allgemeine Materialien, Chromatographiesäulen und Kits	23
1.4. Chemikalien und Proteine	24
1.5. Antikörper	26
1.5.1. Herkunft der Antikörper	26
1.5.2. Verwendung der Antikörper	27
2. Morphologische Methoden	28
2.1. Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten	28
2.1.1. Transfer von Peroxisomen auf Filter	28
2.1.2. DAB-Reaktion und Epon-Einbettung	28
2.1.3. LR-White Einbettung	29
2.1.4. Herstellung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung	29
2.1.5. Immunocytochemie mit der Protein A-Gold Methode	29
2.1.6. Elektronenmikroskopie	29
2.2. Negativkontrast-Elektronenmikroskopie	30
2.3. Indirekte Immunfluoreszenz und differentieller Interferenzkontrast (DIK) am konfokalen Laserscanningmikroskop	30
2.3.1. Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten	30
2.3.2. Konfokale Laserscanningmikroskopie	31

3. Biochemische Methoden	31
3.1. Isolierung von Peroxisomen und Cytosol aus Rattenleber	31
3.1.1. Peroxisomenisolierung	31
3.1.2. Cytosol-Isolierung	32
3.2. Vorbehandlung von Peroxisomen	32
3.3. Vorbehandlung von Cytosol	33
3.4. Vorbehandlung von Proteinproben	33
3.4.1. Dialyse	33
3.4.2. Aufkonzentrieren	33
3.4.3. Immundepletion	34
3.4.4. Cosedimentation mit Mikrotubuli	34
3.4.5. Phosphorylierung mit radioaktivem ATP	34
3.5. Proteinbestimmung	35
3.6. Polymerisation von Tubulin	35
3.7. Der <i>in vitro</i> Bindungsassay	35
3.7.1. Der standardisierte <i>in vitro</i> Bindungsassay	35
3.7.2. Optimierung der Assaybedingungen	37
3.8. Modifikationen des <i>in vitro</i> Bindungsassays	37
3.8.1. Zugabe von freien Mikrotubuli und von PMP-26-Antikörpern	37
3.8.2. Zugabe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)	37
3.8.3. Zugabe von Motorproteinen	38
3.8.4. Zugabe von CLIP-115	38
3.8.5. Zugabe von ATP, ADP und ATP-Analoga sowie ATP-Depletion	38
3.8.6. Zugabe einer Kinase, eines Kinaseinhibitors und eines Phosphataseinhibitors in Verbindung mit ATP bzw. ohne ATP	38
3.8.7. Einsatz vorbehandelter Peroxisomen	38
3.8.8. Zugabe von Cytosol und vorbehandeltem Cytosol	38
3.8.9. Vorinkubation mit Cytosol	39
3.8.10. Zugabe von KCl-Eluat	39
3.8.11. Zugabe von fraktioniertem KCl-Eluat	39
3.8.12. Zugabe von Antikörpern	39
3.8.13. Zugabe von immundepletiertem KCl-Eluat und fraktioniertem KCl-Eluat	39
3.9. Gelelektrophorese	40
3.10. Western-Blotting, Dot-Blots, Immuninkubation und Detektion der Immunkomplexe	41
3.10.1. Western-Blotting und Immuninkubation	41
3.10.2. Dot-Blots	41
3.10.3. Tubulin-Overlay-Blots	42
3.10.4. Detektion der Immunkomplexe mittels Chemilumineszenz	42
3.10.5. „Strippen“ von Blotmembranen	42
3.11. Chromatographische Methoden	43
3.11.1. Chromatographiesysteme	43
3.11.2. Gelfiltration	43
3.11.3. Affinitätschromatographie	43
3.11.3.a Herstellung von Affinitätssäulen	43
3.11.3.b Bestimmung der Kopplungseffizienz	44
3.11.3.c Durchführung der Affinitätschromatographie	44
3.11.3.d Generieren von Antikörpern für die Affinitätschromatographie	45
3.11.3.e Affinitätschromatographie von Antiseren	45

3.11.3.f Affinitätschromatographie von KCl-Eluat	46
3.11.4. Entsalzung	46
3.11.5. Aufreinigung von CLIP-115-Fusionsprotein	46
3.12. Färben und Trocknen von Gelen	47
3.12.1. Coomassie-Färbung	47
3.12.2. Für IEF-Gele modifizierte Silberfärbung	47
3.12.3. Silberfärbung nach Shevchenko	47
3.12.4. Färbung mit dem „Colloidal Blue Staining Kit“	48
3.12.5. Trocknen von Gelen	48
4. Datenverarbeitung und Statistik	48
4.1. Digitalisieren von Gelen, Blots und Negativen sowie Quantifizierung von Blots	48
4.2. Digitale Bildbearbeitung	48
4.3. Statistik	48
4.4. Recherche von Proteindatenbanken	48
4.5. Verwendete Computersoftware	49
IV. Ergebnisse	50
1. Isolierung von Peroxisomen	50
2. Mikroskopische Darstellung der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	52
2.1. Video-verstärkte Kontrastmikroskopie (VECM)	52
2.2. Indirekte Immunfluoreszenz und differentieller Interferenzkontrast am konfokalen Laserscanningmikroskop	53
2.3. Negativkontrast-Elektronenmikroskopie	54
3. Validierung des Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays	56
3.1. Quantifizierung der Uratoxidase	56
3.2. Unspezifische Bindung	57
3.3. Der optimierte Bindungsassay	58
3.4. Abhängigkeit von der Konzentration an Tubulin und Peroxisomen	58
3.5. Abhängigkeit von Inkubationsdauer, Temperatur und pH-Wert	58
3.6. Zugabe von freien Mikrotubuli und PMP-26-Antikörpern	61
4. Biochemische Charakterisierung der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	62
4.1. Einfluß von Proteinen, die mit Mikrotubuli interagieren, auf die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	62
4.1.1. Zugabe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)	62
4.1.2. Zugabe von Motorproteinen	63
4.1.3. Zugabe von CLIP-115	63
4.2. Einfluß von Phosphorylierung auf die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	64
4.2.1. Zugabe von ATP, ADP und ATP-Analoga	64
4.2.2. Zugabe einer Kinase und eines Kinase-Inhibitors	65
4.2.3. Zugabe eines Phosphatase-Inhibitors	66
4.2.4. <i>In vitro</i> Phosphorylierung von Proteinproben	66
4.3. Einfluß der Vorbehandlung von Peroxisomen auf deren <i>in vitro</i> Bindung an Mikrotubuli	68
4.3.1. Vorbehandlung von Peroxisomen mit Proteasen und NEM	68
4.3.2. Vorbehandlung von Peroxisomen mit KCl	68
4.4. Einfluß von Cytosol auf die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	69
4.4.1. Zugabe von Cytosol zu vorbehandelten Peroxisomen	69
4.4.2. Cytosol-Konzentrationsreihe	69

4.4.3. Vorinkubation mit Cytosol	71
4.4.4. Zugabe von vorbehandeltem Cytosol	71
5. Identifizierung und Isolierung von Proteinen, die an der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli beteiligt sind	72
5.1. Fraktionierung von KCl-Eluat	72
5.1.1. Fraktionierung von KCl-Eluat mittels Gelfiltration	73
5.1.2. Fraktioniertes KCl-Eluat im Bindungsassay	73
5.1.3. Kreuzreaktionen mit CLIP-Antikörpern	75
5.1.4. Einfluß von Konkurrenz mit Antikörpern und Immundepletion auf den Effekt von fraktioniertem KCl-Eluat im Bindungsassay	76
5.2. Proteine, die mit Mikrotubuli interagieren	78
5.2.1. Tubulin-Overlay-Blot	78
5.2.2. Mikrotubuli-Sedimentationsassay	80
5.3. Affinitätsreinigung von fraktioniertem KCl-Eluat	80
V. Diskussion	82
1. Die Morphologie der <i>in vitro</i> Assoziation von Peroxisomen an Mikrotubuli	82
2. Der <i>in vitro</i> Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay	82
2.1. Validierung des <i>in vitro</i> Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays	83
2.2. Eigenschaften der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	83
2.3. Vergleich mit anderen <i>in vitro</i> Organellen-Mikrotubuli Bindungsassays	84
2.3.1. Die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli ist Protease- und NEM-sensitiv	84
2.3.2. Die KCl-Behandlung von Peroxisomen vermindert ihre Bindungsfähigkeit an Mikrotubuli und Zugabe von Cytosol stellt sie wieder her	85
2.3.3. Nukleotide können die Mikrotubuli-Bindungs Kapazität von Peroxisomen steigern	86
2.3.4. MAPs hemmen die Peroxisomen-Mikrotubuli Bindung und Motorproteine steigern sie	87
3. Proteine zur Vermittlung der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	88
3.1. Proteine, die für die Bindung von Organellen an Mikrotubuli wichtig sind	88
3.2. Das mutmaßliche peroxisomale Bindungsprotein	88
3.2.1. Ein 70 kDa Polypeptid aus dem Eluat KCl-behandelter Peroxisomen kreuzreagiert mit Antikörpern gegen CLIPs	89
3.2.2. Das 70 kDa Polypeptid vermittelt die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	90
3.2.3. Das potentielle peroxisomale CLIP könnte als Homodimer vorliegen	90
3.2.4. Rekombinantes CLIP-115 steigert die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	90
3.2.5. Affinitätsgereinigte Fraktionen mit dem potentiellen peroxisomalen CLIP steigern die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	91
4. Modelle zur Regulation der Bindung von Organellen an Mikrotubuli	91
4.1. Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	91
4.2. Die Bindung von Organellen an Mikrotubuli und ihre Bedeutung für die Organisation der Zelle	92
5. Die Bedeutung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli	93
5.1. Fazit	95
VI. Literaturverzeichnis	96
Publikationsliste	108
Danksagung	109

Abbildungsverzeichnis

Titelseite: Ausschnitt aus Abbildung 7 D.

1	Stoffwechselwege in Peroxisomen.	8
2	Modell der Regulation der Interaktion von Organellen mit Mikrotubuli durch CLIP-170.	17
3	Schematische Zusammenfassung des Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays unter den optimierten Standardbedingungen.	36
4	Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit Zellhomogenat und isolierten Peroxisomen aus Rattenleber.	50
5	Ultrastrukturelle Darstellung isolierter Peroxisomen aus Rattenleber.	51
6	Darstellung der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mittels Videoverstärkter Kontrastmikroskopie.	52
7	Darstellung der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop.	53
8	Darstellung der <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mittels Negativkontrast-Elektronenmikroskopie.	55
9	Ultrastrukturelle Darstellung der Cores von isolierten Peroxisomen aus der Rattenleber.	56
10	Proportionalität des Uratoxidase-Signals im Immunoblot.	57
11	Peroxisomen benötigen Mikrotubuli zur Bindung im Bindungsassay und isolierte Cores binden nicht an Mikrotubuli.	58
12	Die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist abhängig von der Tubulin-Konzentration.	59
13	Die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist sättigbar.	59
14	Die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist abhängig von der Inkubationsdauer der Peroxisomen.	60
15	Die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli steigt mit zunehmender Inkubationstemperatur.	60
16	Die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist abhängig vom pH-Wert.	60
17	Zugabe von freien Mikrotubuli und von PMP-26-Antikörpern vermindern die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	61
18	Verschiedene MAPs reduzieren die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	62
19	Motorproteine erhöhen die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	63
20	Rekombinantes CLIP-115 steigert die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	64
21	Einfluß von ATP, ADP, ATP-Analoga und ATP-Depletion auf die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	65
22	Einfluß einer Kinase und eines Kinase-Inhibitors auf die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	66
23	Der Phosphatase-Inhibitor Okadarsäure erhöht die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	67
24	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsassay mit [γ - ³² P]-ATP.	67

25	Die Vorbehandlung von Peroxisomen mit Proteasen und NEM reduziert ihre <i>in vitro</i> Bindung an Mikrotubuli.	68
26	Die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wird durch die Vorbehandlung der Peroxisomen mit KCl reduziert.	69
27	Die Zugabe von Cytosol kann die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen wiederherstellen, nicht aber die von Protease-behandelten Peroxisomen.	70
28	Die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen hängt von der Konzentration des zugefügten Cytosols ab.	70
29	Der bindungssteigernde Effekt von Cytosol beruht auf cytosolischen Proteinen, die an Mikrotubuli binden.	71
30	Die Steigerung der Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen durch Cytosol ist Protease- und NEM-sensitiv.	72
31	Dialysiertes KCl-Eluat erhöht die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen.	73
32	Gelfiltration von KCl-Eluat.	74
33	Bestimmte Superdex-200 Fraktionen, die mit einem Antikörper gegen CLIP-115 kreuzreagieren, erhöhen die Bindung von KCl-behandelten Peroxisomen an Mikrotubuli.	74
34	CLIP-170-Antikörper kreuzreagieren in Immunoblots mit einem 70 kDa Protein aus Superdex-200 Fraktionen des KCl-Eluates, die im Bindungsassay die Bindungskapazität KCl-behandelter Peroxisomen erhöhen.	75
35	Ein 70 kDa Protein peroxisomaler Präparationen kreuzreagiert mit einem Antikörper gegen CLIP-115.	76
36	Antikörper gegen CLIPs und Immundepletion heben den stimulierenden Einfluß von KCl-Eluat und fraktioniertem KCl-Eluat auf die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli auf.	77
37	Im Tubulin-Overlay-Blot wird bei fraktioniertem KCl-Eluat u.a. ein 70 kDa Protein markiert.	78
38	Ein Antikörper gegen CLIP-115 markiert in Immunoblots ein 70 kDa Polypeptid, das mit Mikrotubuli cosedimentiert.	79
39	Affinitätschromatographie von fraktioniertem KCl-Eluat.	79
40	Affinitätsgereinigtes fraktioniertes KCl-Eluat erhöht die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen.	80
41	Modell für die <i>in vitro</i> Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.	92

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über die verwendeten Antikörper.	27
2	Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen.	40
3	Zusammensetzung der Molekulargewichtsstandards.	40
4	Antikörper für die Affinitätschromatographie.	45
5	Übersicht über verwendete Computersoftware.	49
6	<i>In vitro</i> Bindungsstudien zur Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli.	85
7	Proteine, denen eine Vermittlerrolle für die Bindung von Zellorganellen an Mikrotubuli zugeschrieben wird.	89

Abkürzungsverzeichnis

ABC	–	ATP-Bindungskassette
ADP	–	Adenosin 5'-diphosphat
ALDP	–	Adrenoleukodystrophie-Protein
AMP-PNP	–	5'-Adenylyl- β,γ -imidodiphosphat
APF	–	Affinitätsgereinigte Proteinfraction
APS	–	Ammoniumpersulfat
ATP	–	Adenosin 5'-triphosphat
ATP- γ -S	–	Adenosin 5'-o-(γ -thio)triphosphat
[γ - ³² P]-ATP	–	ATP mit radioaktivem Phosphor [³² P] des γ -Phosphats
BSA	–	Rinderserumalbumin
BSA-c	–	Acetyliertes Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	–	Calciumion
cAMP	–	Zyklisches Adenosin 3':5'-monophosphat
Ci	–	Curie
CLASP	–	CLIP-assoziierendes Protein
CLIP	–	Cytoplasmatisches Linkerprotein
CLIMP	–	Cytoskelett-Linker Membranprotein
CoA	–	Coenzym A
CuZn	–	Kupfer-Zink
2D	–	zweidimensional
DAB	–	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEAE	–	Diethylaminoethyl
dest.	–	destilliert
DIK	–	Differentieller Interferenzkontrast
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
DTT	–	Dithiothreitol
ECL	–	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	–	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	–	Ethylenglykoltetraessigsäure
EM	–	Elektronenmikroskopie
ER	–	endoplasmatisches Retikulum
FPLC	–	Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie
g	–	Erdbeschleunigung
GaM	–	Ziege-anti-Maus
GaR	–	Ziege-anti-Kaninchen
GST	–	Glutathion-S Transferase
GTP	–	Guanosin 5'-triphosphat
HCl	–	Salzsäure
H ₂ O ₂	–	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	–	Wasser
HRP	–	Meerrettichperoxidase
IEF	–	Isoelektrische Fokussierung
IF	–	Indirekte Immunfluoreszenz
IgG	–	Immunglobulin G
KCl	–	Kaliumchlorid

kDa	–	kilo-Dalton
KLH	–	Keyhole Limpet Hemocyanin
mA	–	milli-Ampere
MAP	–	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MgSO ₄	–	Magnesiumsulfat
MOPS	–	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mPTS	–	Targetingsequenz für peroxisomale Membranproteine
MT	–	Mikrotubulus
MW	–	Molekulargewicht
NaCl	–	Natriumchlorid
NaHCO ₃	–	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	–	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	–	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	–	Natriumazid
NaOH	–	Natronlauge
NEM	–	N-Ethylmaleimid
NHS	–	N-Hydroxysuccinimid
PAG	–	Protein-A Gold
PAGE	–	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	–	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
Pexp	–	Peroxin
P/G/T	–	PMEE-, GTP-, Taxol-haltiger Puffer
PIPES	–	Piperazin-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure
PMEE	–	PIPES-, MgSO ₄ -, EDTA-, EGTA-haltiger Puffer
PMP	–	Peroxisomales Membranprotein
PMSF	–	Phenylmethylsulfonylfluorid
Po	–	Peroxisom
PPAR	–	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTS	–	Peroxisomale Targetingsequenz
RaM	–	Kaninchen-anti-Maus
RITC	–	Rhodaminisothiocyanat
RNA	–	Ribonukleinsäure
rpm	–	Umdrehungen pro Minute
RXR	–	Retinoid-X-Rezeptor
SD	–	Sprague-Dawley
SDS	–	Natriumdodecylsulfat
TBS	–	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBSA	–	TBS-Puffer mit 0,1 % BSA
TEMED	–	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPCK	–	L-1-Tosylamido-2-phenylethylchloromethylketon
Tris	–	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TVBE	–	Triton-, EDTA-, Bicarbonat-, Ethanol-haltiger Puffer
U	–	Unit
UOx	–	Uratoxidase
UV	–	Ultraviolett
VECM	–	Video-verstärkte Kontrastmikroskopie
#	–	Superdex-200 Fraktion des KCl-Eluates

I. Zusammenfassung

Die Organisation der eukaryotischen Zellen hängt von der Interaktion der Zellorganellen mit Elementen des Cytoskeletts ab. Auch für Peroxisomen ist die Assoziation mit Mikrotubuli vor kurzem beschrieben worden.

Das Ziel dieser Dissertation war es, die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu charakterisieren. Dazu wurde die Assoziation von isolierten Rattenleberperoxisomen an Mikrotubuli morphologisch dargestellt und ein semiquantitativer Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay entwickelt, mit dem die molekularen Grundlagen der Bindung und der daran beteiligten Proteine untersucht wurden.

Sehr reine Peroxisomenfraktionen wurden aus der Rattenleber mittels differentieller Zellfraktionierung und Zentrifugation durch Nycodenz-Kissen verschiedener Dichte isoliert. Die spezifische Assoziation dieser Peroxisomen an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli, die aus Rinderhirn-Tubulin rekonstituiert wurden, konnte mit konfokaler Laserscanningmikroskopie und Negativkontrast-Elektronenmikroskopie gezeigt werden. Hierbei banden die Peroxisomen an Mikrotubuli entlang deren gesamter Länge.

Ein *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay, basierend auf der Bindung isolierter Peroxisomen an Mikrotubuli, die an Mikrotiterplatten gekoppelt waren, wurde validiert und die Assaybedingungen wurden optimiert. Die Bindung in diesem Assay war abhängig von der Konzentration der Peroxisomen und Mikrotubuli und zeigte eine Sättigungskinetik. Die Inkubationsdauer, die Temperatur und der pH-Wert beeinflussten die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Eine erhöhte Bindung war nach Zugabe von ATP, Kinasen, Phosphatase-Inhibitor oder Motorproteinen festzustellen, während ATP-Depletion oder die Zugabe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) die Bindung reduzierte. Eine KCl-Behandlung der Peroxisomen reduzierte deren Bindung an Mikrotubuli, was durch die Zugabe von dialysiertem KCl-Eluat sowie von Rattenlebercytosol wieder aufgehoben werden konnte. Dieser rekonstituierende Effekt von Cytosol wurde durch dessen Vorbehandlung mit Proteasen oder NEM aufgehoben. Weiterhin verringerte die Behandlung der Peroxisomen mit Proteasen oder NEM ihre Bindungsfähigkeit an Mikrotubuli, was auch nicht durch die Zugabe von Rattenlebercytosol rückgängig gemacht werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen die Beteiligung eines peroxisomalen Membranproteins und eines cytosolischen Faktors an der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli vermuten. Bestätigt wurde dies durch die Beobachtung, daß bestimmte Proteinfractionen des dialysierten KCl-Eluates, die durch Gelfiltration erhalten wurden, die Bindung steigerten. Diese Proteinfractionen, sowie die isolierten Peroxisomenfraktionen, zeigten eine starke Immunreaktivität einer Polypeptidbande von ca. 70 kDa mit einem Antikörper gegen das cytoplasmatische Linckerprotein (CLIP)-115. Cosedimentationsexperimente mit Mikrotubuli zeigten die Assoziation dieses 70 kDa Polypeptides an Mikrotubuli. Weiterhin vermochte die Immundepletion des KCl-Eluates und dessen Proteinfractionen mit einem Antikörper gegen die konservierte Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIPs den stimulierenden Effekt auf die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli aufzuheben. Somit scheint ein CLIP-ähnliches Protein von 70 kDa eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu spielen.

Der hier vorgestellte Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay erwies sich als nützliches Hilfsmittel für die Charakterisierung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli und führte zur Identifizierung eines daran beteiligten Polypeptides.

II. Einleitung

1. Peroxisomen

Peroxisomen sind von einer einfachen Membran umgebene Zellorganellen, die ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommen. Ihre Größe, Gestalt, Häufigkeit und enzymatische Ausstattung variiert stark und ist abhängig von der jeweiligen Spezies und dem Zelltyp (HRUBAN und RECHCIGL 1969). So wurden u.a. unterschiedlich große Peroxisomen (SMALL et al. 1980), polyederförmige Peroxisomen (ZAAR et al. 1991) und peroxisomale Retikulae (GORGAS 1985, YAMAMOTO und FAHIMI 1987, SCHRADER et al. 2000) beschrieben. Ausdruck der metabolischen Diversität sind die verschiedenen Namen dieser Organelle: Peroxisomen, Glyoxysomen, Glykosomen und Mikrobodies. Jedoch ist aufgrund der konservierten Merkmale ihrer Stoffwechselwege und der Biogenese die Kategorisierung der genannten Organellen in die Gruppe der Mikrobodies eindeutig (DISTEL et al. 2000). Erstmals beschrieben wurden Mikrobodies von RHODIN (1954) in Zellen der Mäuseniere. Der Name „Peroxisom“ wurde von De Duve geprägt aufgrund der Bedeutung dieser Organelle für den Wasserstoffperoxid-Metabolismus (DE DUVE und BAUDHUIN 1966). Die erste selektive cytochemische Anfärbung der Peroxisomen für die Elektronenmikroskopie und Lichtmikroskopie gelang durch die von FAHIMI (1969) entwickelte Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin. Besonders groß und häufig sind die ansonsten mit 0,1 bis 0,25 µm Durchmesser recht kleinen Peroxisomen in der Niere (bis zu 2 µm Durchmesser) und in der Leber (bis zu 1 µm Durchmesser), wo die Peroxisomen etwa 1,5 bis 2 % des Zellvolumens ausmachen (HRUBAN und RECHCIGL 1969).

1.1. Peroxisomaler Stoffwechsel

Inzwischen sind über 50 verschiedene peroxisomale Enzyme bei Säugetieren nachgewiesen worden, von denen die Mehrzahl am Lipidstoffwechsel beteiligt ist (für Übersichtsartikel siehe VAN DEN BOSCH et al. 1992, WANDERS et al. 2000, MANNAERTS et al. 2000). Eine Übersicht über wichtige peroxisomale Stoffwechselwege gibt Abbildung 1 (siehe auch BAUMGART 1998). Folgende metabolische Reaktionen sind in den Peroxisomen von Säugetieren lokalisiert:

- β -Oxidation langkettiger Fettsäuren ($> C_{14}$; LAZAROW und DE DUVE 1976)
- β -Oxidation der Seitenketten des Cholesterols bei der Gallensäure-Synthese (PEDERSEN et al. 1987)
- α -Oxidation von Phytansäure (POULOS et al. 1993, CROES et al. 1996)
- Synthese von Cholesterol (KRISANS 1996)
- Synthese von Etherlipiden (HAJRA et al. 1979, LEE 1998)
- Synthese von Prostaglandinen (SCHEPERS et al. 1988)
- Abbau von Leukotrienen (JEDLITSCHKY et al. 1991)
- Metabolismus von Aminosäuren (MASTERS 1997)

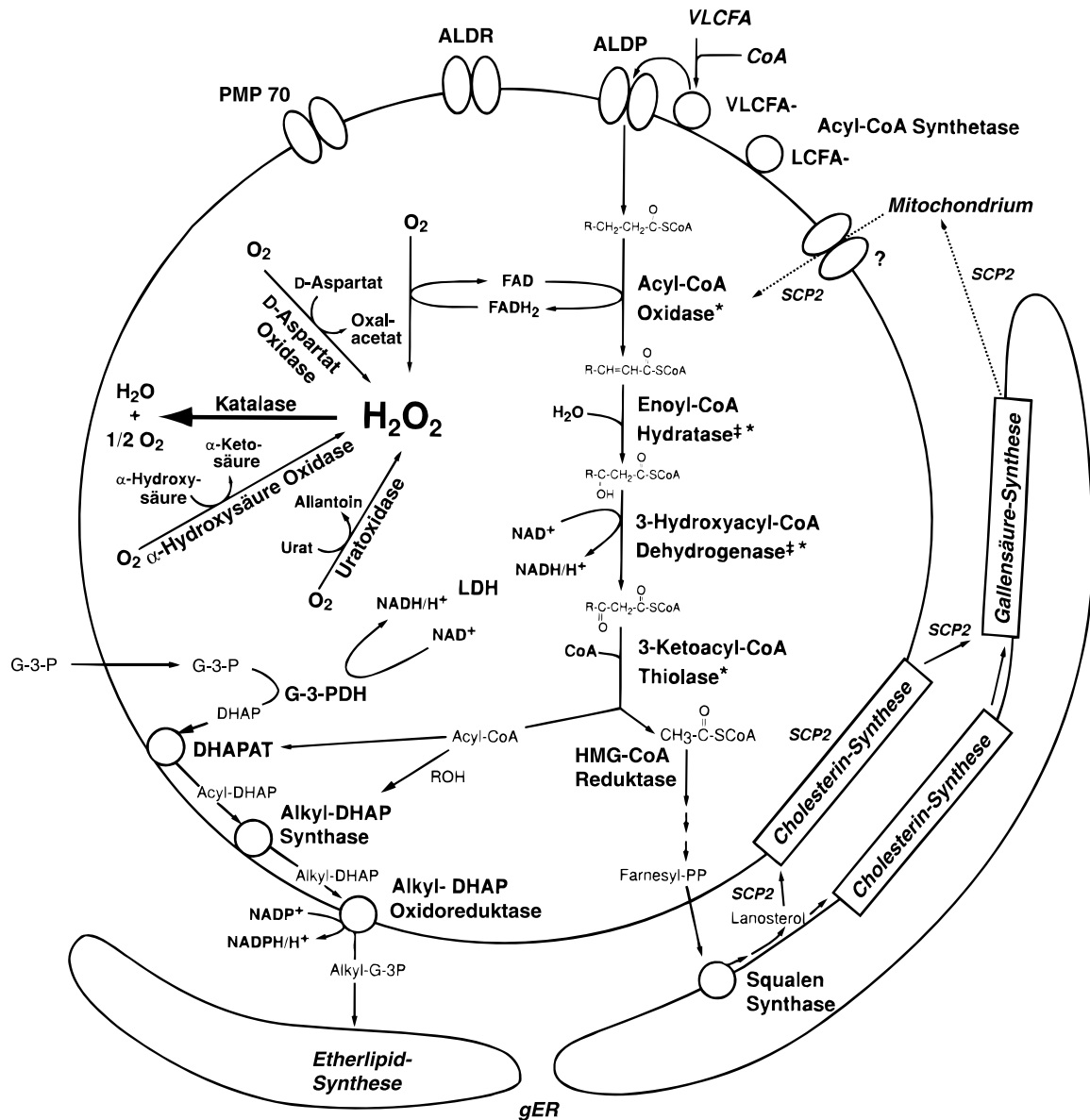


Abbildung 1: Stoffwechselwege in Peroxisomen. Das Schema wurde modifiziert nach BAUMGART (1998). Wichtige peroxisomale Stoffwechselwege, wie sie z.B. in den Peroxisomen der Säugetierleber vorkommen, sind schematisch dargestellt.

* es gibt einen separaten β -Oxidationsweg für Gallensäureintermediate; ‡ multifunktionelles Enzym 1; gER (glattes endoplasmatisches Retikulum)

Substrate: DHAP (Dihydroxyacetonphosphat), Farnesyl-PP (Farnesylpyrophosphat), G-3-P (Glycerin-3-Phosphat), LCFA (langkettige Fettsäure), ROH (langkettiger Alkohol), VLCFA (sehr langkettige Fettsäure)

Enzyme: DHAPAT (Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase), G-3-PDH (Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase), HMG-CoA Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reduktase), LDH (Laktat Dehydrogenase), SCP2 (Sterol Carrier Protein 2)

ABC-Transporter: ALDP (Adrenoleukodystrophie Protein), ALDR (Adrenoleukodystrophie verwandtes Protein), PMP 70 (peroxisomales Membranprotein von 70 kDa), ? (bisher nicht identifiziertes Membrantransport protein)

- Metabolismus von Purinen, z.B. durch Xanthinoxidase (ANGERMÜLLER et al. 1987) und Urat-oxidase (VÖLKL et al. 1988)
- Abbau reaktiver Sauerstoffspezies, z.B. von Wasserstoffperoxid durch Katalase (DE DUVE und BAUDHUIN 1966) und von Superoxidanionen durch die CuZn-Superoxiddismutase (CHANG et al. 1988, KELLER et al. 1991)

Weitere Stoffwechselwege von Peroxisomen/Mikrobodies bei anderen Organismen umfassen:

- Penicillinbiosynthese bei Pilzen (MÜLLER et al. 1991)
- Glyoxylatzyklus bei Pflanzen (BREIDENBACH und BEEVERS 1967)
- mehrere Schritte der Glykolyse in den Glykosomen der Trypanosomen (OPPERDOES und BORST 1977, CLAYTON und MICHELS 1996)
- Beteiligung an der Photorespiration von Pflanzen (HEUPEL und HELDT 1994)

Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, werden einige der aufgeführten Stoffwechselwege nicht komplett in den Peroxisomen durchgeführt. So sind z.B. einige Schritte der Etherlipidsynthese und der Cholesterolsynthese im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (siehe VAN DEN BOSCH et al. 1992).

Neben der peroxisomalen β -Oxidation ist die mitochondriale β -Oxidation von herausragender Bedeutung. Die Enzyme dieser beiden β -Oxidationswege sind unterschiedlich (OSUMI und HASHIMOTO 1978). Während in Mitochondrien nur kurzkettige Fettsäuren unter Speicherung der Energie in Form von ATP abgebaut werden, sind die Substrate der peroxisomalen β -Oxidation überwiegend lang- und verzweigt-kettige Fettsäuren, wobei die Energie als Wärme freigesetzt und nicht gespeichert wird (LAZAROW und DE DUVE 1976). Am Lipidstoffwechsel sind mehrere Oxidasen beteiligt (z.B. Acyl-CoA-Oxidase), die, ebenso wie die an anderen enzymatischen Wegen beteiligten Oxidasen (z.B. D-Aminosäureoxidase, Uratoxidase, Xanthinoxidase), Wasserstoffperoxid produzieren (für einen Übersichtsartikel siehe MANNAERTS et al. 2000). Dieses Wasserstoffperoxid wird von der Katalase, die fast ausschließlich in den Peroxisomen lokalisiert ist, auf zwei unterschiedlichen Wegen abgebaut. Im peroxidativen Modus dienen Metabolite wie Ethanol, Methanol, Ameisensäure und Nitrit als Wasserstoffdonor für die Reduktion des Wasserstoffperoxides. Dagegen erfolgt im katalatischen Modus, der *in vivo* eine untergeordnete Rolle bei der Entgiftung des Wasserstoffperoxides spielt, die direkte Aufspaltung in Wasser und molekularem Sauerstoff (DE DUVE und BAUDHUIN 1966, SINGH 1996). Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Peroxisomen – sowohl für den Lipidstoffwechsel, als auch für den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies – kommt den Peroxisomen eine zentrale Rolle beim Altern und bei Alters-bedingten Erkrankungen zu (BEIER et al. 1993, SINGH 1996, PERICHON et al. 1998).

1.2. Biogenese der Peroxisomen

Das klassische Peroxisomen-Biogenese Modell von LAZAROW und FUJIKI (1985) postuliert eine strukturell und funktionell identische Peroxisomenpopulation, die durch posttranslationalen Import von Membran- und Matrixproteinen wächst und dann durch Knospung und Teilung neue Peroxisomen bildet. Die sich autonom replizierende Gesamtheit der Peroxisomen könnte – in Analogie zu Mitochondrien und Plastiden – endosymbiotischen Ursprungs sein (CAVALIER-SMITH 1987). Dieses Modell löste ältere Vorstellungen ab, nach denen Peroxisomen durch Abschnürungen aus dem endoplasmatischen Retikulum entstehen würden. Mehrere Studien, die die Heterogenität der Peroxisomen nachwiesen (HEINEMANN und JUST 1992, LÜERS et al. 1993, VAN ROERMUND et al. 1995, WILCKE et al. 1995, VAN DER KLEI und VEENHUIS 1996), ließen Zweifel an der Uniformität der Peroxisomenpopulation aufkommen und führten zu Modellen, die die Existenz eines mehrstufigen Peroxisomen-Biogenese-Weges forderten (SUBRAMANI 1996, ERDMANN et al. 1997). Neuere Studien von SOUTH und GOULD (1999) und TITORENKO et al. (2000) belegen den sequentiellen Import von Membran- und Matrixproteinen in definierte peroxisomale Vorläufervesikel. Inzwischen wird wieder die Abschnürung von peroxisomalen Vorläufervesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum als erster Schritt der Peroxisomen-Biogenese – zusätzlich zur Teilung vorhandener Peroxisomen – diskutiert (KUNAU und ERDMANN 1998, TITORENKO und RACHUBINSKI 2001).

Allgemein akzeptiert hingegen ist, daß peroxisomale Membran- und Matrixproteine von nukleären Genen codiert werden und nach Translation an freien Ribosomen in die Peroxisomen bzw. deren Vorläufervesikel importiert werden (LAZAROW und FUJIKI 1985). Inzwischen wurden mehr als 20 Proteine identifiziert, die am Import peroxisomaler Proteine beteiligt sind (für Übersichtsartikel siehe SUBRAMANI et al. 2000, SACKSTEDER und GOULD 2000). Es scheint, daß allein bei Säugetieren mehr als 15 dieser sogenannten Peroxine (abgekürzt: Pexp) am Import beteiligt sind. Defekte dieser Importmaschinerie haben fatale Folgen, wie z.B. das Zellweger-Syndrom verdeutlicht (siehe Abschnitt 1.4.). Für peroxisomale Matrixproteine existieren zwei Importwege: Proteine mit dem PTS (Peroxisomale Targetingsequenz)-1-Signal werden vom cytosolischen Rezeptor Pex5p erkannt und zum Peroxisom transportiert. Das C-terminale PTS-1-Signal besteht aus dem Tripeptid Serin-Lysin-Leucin (SKL) oder einer Variante davon (GOULD et al. 1988 und 1989). Andere peroxisomale Matrixproteine sind mit dem PTS-2-Signal ausgestattet und werden vom cytosolischen Rezeptor Pex7p erkannt und zum Peroxisom transportiert. Das N-terminale PTS-2-Signal wird beim Import zumeist abgespalten und zeichnet sich durch das $RL_{xxxx}HL$ -Motiv aus (OSUMI et al. 1991, DE HOOP und AB 1992). Als peroxisomale Membranrezeptoren für den PTS-1- und PTS-2 Importweg fungieren Pex13p und Pex14p (für eine Übersicht siehe FUJIKI 2000, TERLECKY und FRANSEN 2000). Wie genau die Peroxisomenmembran überquert wird und ob der PTS-Rezeptor am zu importierenden Protein gebunden bleibt, ist noch unklar. Der Import peroxisomaler Membranproteine erfolgt unabhängig vom Importmechanismus der Matrixproteine. Bisher wurden mehrere Targetingsignale für peroxisomale Membranproteine (mPTS) gefunden, die sich voneinander und von den PTS-1- und PTS-2-Signalen deutlich unterscheiden (DYER et al. 1996, IMANAKA et al. 1996, WIEMER et al. 1996, ELGERSMA et al. 1997, KAMMERER et al. 1998). Cytosolische Rezeptoren und Rezeptoren auf der Peroxisomenmembran für diese mPTS-Signale sind bislang nicht bekannt (BAERENDS et al. 2000).

1.3. Proliferation der Peroxisomen und ihre transkriptionelle Regulation

Fetteiche Nahrung, Fastenzeiten und Peroxisomen-Proliferatoren induzieren die Peroxisomen-Proliferation bei Nagetieren (HAWKINS et al. 1987). Zu den Peroxisomen-Proliferatoren zählen, neben den hypolipidämisch wirkenden Fibraten, so unterschiedliche Substanzen wie Phthalate, Herbizide, Leukotrien-Antagonisten, Acetylsalicylsäure und perfluorierte Fettsäuren. Die Peroxisomen-Proliferation ist eine pleiotrope zelluläre Antwort, die zu drastischen Änderungen der Morphologie, Anzahl und Enzymaktivität von Peroxisomen (LOCK et al. 1989), sowie zur Änderung nicht peroxisomaler Enzymaktivitäten, führt. Damit verbunden ist die Hepatozyten-Proliferation und das Wachstum der Leber. Die Wirksamkeit von Peroxisomen-Proliferatoren ist speziesabhängig sehr unterschiedlich. Während Ratten und Mäuse ihnen gegenüber sehr sensitiv sind, reagieren Meerschweinchen, Affen und Menschen nur schwach (MASTERS und CRANE 1995). ISSEMANN und GREEN (1990) fanden mit dem Transkriptionsfaktor PPAR (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor) die zentrale Schaltstelle der Peroxisomen-Proliferation und der Regulation des Lipidstoffwechsels.

Der molekulare Mechanismus der Funktionsweise von PPARs ist dem der Steroidhormonrezeptoren ähnlich (für Übersichtsartikel siehe CORTON et al. 2000, ESCHER und WAHLI 2000, KELLER et al. 2000, KERSTEN et al. 2000). Der PPAR bildet im Cytosol ein Heterodimer mit dem RXR (Retinoid-X-Rezeptor). Nach Aktivierung des PPAR-RXR-Komplexes durch Liganden und Translokation in den Nukleus bindet der Komplex an PPRE (PPAR Response Element)-Stellen in der Promotorregion der Zielgene. Für die Aktivierung des PPAR-RXR-Komplexes genügt die Ligandenbindung an eine Komponente, die simultane Bindung an PPAR und RXR ist jedoch wirksamer. Neben den oben genannten Peroxisomen-Proliferatoren aktivieren endogene Liganden, wie Eicosanoide, gesättigte Fettsäuren, sowie einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die PPARs (siehe auch CORTON et al. 2000). Die exogenen und endogenen PPAR-Liganden können, in Abhängigkeit vom jeweiligen Liganden, die verschiedenen PPAR-Isotypen entweder unterschiedlich stark oder gleichmäßig aktivieren.

Bisher wurden drei PPAR-Isotypen identifiziert: α , β (auch δ und NUC1 genannt) und γ . PPAR α reguliert den Abbau von Fettsäuren und wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in der Niere, im braunen Fettgewebe, im Herz und im Skelettmuskel exprimiert. Die Zielgene des PPAR α sind an verschiedenen Aspekten des Lipidkatabolismus beteiligt, wie Fettsäureaufnahme über Membranen, Fettsäurebindung in Zellen, Fettsäureoxidation in Mikrosomen, Peroxisomen und Mitochondrien, sowie dem Lipoproteintransport. PPAR γ , von dem durch Verwenden alternativer Promotoren und durch differentielles Splicing die Isoformen $\gamma 1$ und $\gamma 2$ gebildet werden, beeinflusst die Lagerung von Fettsäuren im Fettgewebe und ist an der Reifung von Präadipozyten zu Fettzellen beteiligt (ROSEN et al. 1999). Die meisten Zielgene des PPAR γ sind an lipogenen Stoffwechselwegen beteiligt, wie die Lipoprotein-Lipase, das Adipocyt-Fettsäure-bindende Protein, die Acyl-CoA-Synthase und das Fettsäure-Transportprotein. Weniger Aufmerksamkeit hat bisher PPAR β erhalten, da er klinisch weniger relevant zu sein scheint. PPAR β hat verschiedene Funktionen, z.B. die Regulation der Acyl-CoA-Synthase im Gehirn (BASU-MODAK et al. 1999) und scheint an der Implantation des Embryos beteiligt zu sein (LIM et al. 1999). Entsprechend ihrer zentralen Funktion im Lipidmetabolismus, haben PPARs eine wichtige Rolle bei Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ II und Atherosklerose, aber auch bei Entzündungsreaktionen und der Dickdarm-Karzinogenese (für Übersichtsartikel siehe CHINETTI et al. 2000, EVERETT et al. 2000, NEVE et al. 2000).

1.4. Peroxisomale Erkrankungen

Die essentielle Rolle der Peroxisomen für den Organismus wurde deutlich angesichts der schweren Folgen peroxisomaler Defekte. So sterben Kinder mit Zellweger-Syndrom, der schwersten peroxisomalen Erkrankung, zumeist im ersten Lebensjahr (BOWEN et al. 1964). Bei den derzeit bekannten 25 peroxisomalen Erkrankungen handelt es sich um verschiedene – genetisch heterogene – rezessiv vererbte Defekte der Peroxisomen. Man unterscheidet beim Menschen drei verschiedene Gruppen (für Übersichtsartikel siehe POWERS und MOSER 1998, GOULD und VALLE 2000, MOSER 2000):

- Die erste Gruppe ist gekennzeichnet durch den Defekt der Peroxisomen-Biogenese, bei dem beide Importwege (PTS1 und PTS2) blockiert sind und somit keine Peroxisomen gebildet werden. Hierzu zählen das Zellweger-Syndrom (BOWEN et al. 1964), die neonatale Adrenoleukodystrophie (ULRICH et al. 1978) und das infantile Refsum-Syndrom (SCOTTO et al. 1982). Neben der fehlenden Synthese von Plasmalogenen kommt es zur Akkumulation von Phytansäure und sehr langkettigen Fettsäuren. Charakteristisch sind schwere neurologische und hepatische Dysfunktionen, craniofacialer Dysmorphismus und Hypotonie, was in der Regel zum Tod des Patienten im frühen Kindesalter führt.
- Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um einen Peroxisomen-Biogenesedefekt des PTS2-Importweges (BRAVERMAN et al. 1997, MOTLEY et al. 1997, PURDUE et al. 1997). Zwar werden hier Peroxisomen gebildet, jedoch werden mehrere Enzyme nicht in die Peroxisomen importiert. Die Erkrankung, rhizomelische Chondrodysplasia punctata genannt, ist gekennzeichnet durch schwere Wachstumsstörungen, rhizomele Skelettdeformitäten, Katarakt, Calciumablagerung in den Epiphysen und Ichthyose. Auch diese Patienten können keine Plasmalogene synthetisieren und akkumulieren Phytansäure, weisen jedoch normale Spiegel an sehr langkettigen Fettsäuren auf (SPRANGER et al. 1971).
- In der dritten Gruppe sind Erkrankungen mit weitaus mildereren Symptomen zusammengefaßt. Hierbei handelt es sich um Einzelenzymdefekte, die auf der Mutation einzelner Gene beruhen. Die häufigste Erkrankung in dieser Gruppe stellt die X-gebundene Adrenoleukodystrophie dar, die auf einen Defekt des ALDP, einem peroxisomalen Membranprotein aus der Gruppe der ABC-Transporter, zurückzuführen ist (MOSSER et al. 1993 und 1994). Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch die Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren und führt zur fortschreitenden Demyelinisierung im Zentralnervensystem. Weitere Krankheiten mit peroxisomalen Einzelenzymdefekten sind u.a. das klassische Refsum-Syndrom (Störung der α -Oxidation durch die Mutation des Gens für die Phytanoyl-CoA-Hydroxylase, JANSEN et al. 1997) und die pseudo-neonatale Adrenoleukodystrophie (Störung der β -Oxidation durch die Mutation des Gens für die Palmitoyl-CoA-Oxidase, POLL-THE et al. 1988).

2. Das Cytoskelett und dessen Assoziation mit Zellorganellen

Schon früh vermuteten Naturforscher die Existenz strukturgebender Elemente als essentielle Grundlage für die Organismen. So folgte BAGLIVI (1703) aus der mikroskopischen Beobachtung eines dichten Netzwerkes fibröser Elemente, die er in homogenisierten und gekochten pflanzlichen und tierischen Extrakten fand, daß Fasern verschiedener Größe, die sich auf verschiedene Weise zusammenlagern, die grundlegenden strukturellen Einheiten allen organischen Materials seien. Geprägt wurde der Name Cytoskelett von WINTREBERT (1931), der solche Strukturen aufgrund der physischen Notwendigkeit für die interne Organisation von Zellen postulierte. Es dauerte noch knapp 2 Jahrzehnte bis mit der Elektronenmikroskopie eine Methode zur Verfügung stand, mit der dann der erste Nachweis für Elemente des Cytoskeletts gelang. DE ROBERTIS und SCHMITT (1948) fanden in Nervensträngen lange tubuläre Fasern, die sie „Neurotubuli“ nannten und die später in Mikrotubuli umbenannt wurden. PORTER (1957) vermutete, daß diese Strukturen eine Cytoskelett-Funktion übernehmen würden.

Inzwischen ist klar, daß das Cytoskelett keineswegs starr, sondern hoch dynamisch und sehr flexibel ist (für Übersichtsartikel siehe FRIXIONE 2000, FUCHS und KARAKESISOGLOU 2001). Es wird von einem komplexen Geflecht aus Proteinfilamenten gebildet und läßt sich morphologisch und molekularbiologisch in drei Familien einteilen. Neben den Mikrotubuli (20 – 25 nm Durchmesser) unterscheidet man Mikrofilamente (5 – 7 nm Durchmesser) und Intermediärfilamente (8 – 12 nm Durchmesser). Ihr Zusammenwirken hat Einfluß auf die Zellbewegung, die Zellteilung, Transportvorgänge im Cytoplasma und auf die Form und Gestalt von Zellen und Zellorganellen. Für den Transport von Zellorganellen über größere Entfernungen in der Zelle kommt den Mikrotubuli die zentrale Rolle zu, auch wenn dabei die Intermediärfilamente, die Mikrofilamente und die Kooperation der einzelnen Cytoskelettkomponenten von Bedeutung sind (für Übersichtsartikel siehe DEPINA und LANGFORD 1999, HERRMANN und AEBI 2000, GOODE et al. 2000, ROGERS und GELFAND 2000, FUCHS und KARAKESISOGLOU 2001).

2.1. Mikrotubuli

Mikrotubuli bestehen in der Regel aus 13 linearen Protofilamenten, die sich über die gesamte Länge des Mikrotubulus erstrecken und die einen Hohlzylinder bilden (für Übersichtsartikel siehe DOWNING 2000, OAKLEY 2000). Die Protofilamente wiederum setzen sich aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren zusammen. Die α - und β -Tubulin-Monomere sind hochkonservierte globuläre Proteine von 55 kDa, die sich voneinander nur wenig unterscheiden. Mikrotubuli sind polare Strukturen: am Plusende des Mikrotubulus befinden sich ausschließlich β -Tubulin-Moleküle, während am Minusende nur α -Tubuline zu finden sind. Die Plusenden der Mikrotubuli zeichnen sich durch schnelles Wachstum in Folge der Anlagerung von Tubulin-Dimeren aus, während die Minusenden stabil sind bzw. langsam depolymerisieren. *In vitro* polymerisieren Tubulin-Dimere in Anwesenheit von GTP spontan zu Mikrotubuli. Dieser Prozeß wird bei höheren Temperaturen beschleunigt, während die Mikrotubuli bei Temperaturen unter 15°C depolymerisieren. Durch Substanzen, wie Nocodazol, Colcemid und Vinblastin können Mikrotubuli depolymerisiert werden, wohingegen sie durch Taxol stabilisiert werden.

In vitro und *in vivo* unterliegen Mikrotubuli einer ausgeprägten Dynamik. Ihr stetes Wachsen und Schrumpfen wird als „*dynamische Instabilität*“ bezeichnet. Besonders deutlich wird dies beim Eintritt der Zelle in die Mitose, wo die Interphasenmikrotubuli komplett depolymerisieren

und sich zur Bildung der Kernspindel neu formieren. In der Interphase sind die Minusenden der Mikrotubuli im Mikrotubuli-organisierenden Zentrum in Zellkernnähe gebündelt und die Plusenden weisen in die Zellperipherie. Die dadurch definierte Zellpolarität ist essentiell für den Transport und die Lokalisierung von Proteinen und Zellorganellen.

In den letzten Jahren wurden mehrere neue Mitglieder der Tubulin-Proteinfamilie entdeckt. Während die konstitutive Rolle von γ -Tubulin für die Initiation der Anlagerung von $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren unbestritten ist, sind die Funktionen von δ -, ϵ -, ζ - und η -Tubulin noch weitgehend unklar (siehe SCHIEBEL 2000, DUTCHER 2001).

2.2. Interaktion von Mikrotubuli mit Zellorganellen

Das Cytoskelett spielt – wie bereits angedeutet wurde – eine wesentliche Rolle für die Zellpolarisierung, für den intrazellulären Transport von Organellen, für deren Verteilung innerhalb der Zelle und für die Formgebung. Insbesondere Mikrotubuli sind für die Herstellung und die Aufrechterhaltung dieser Organisation wichtig. Die Bedeutung der Interaktionen mit Mikrotubuli wurde für zahlreiche Organellen gezeigt:

- Sekretgranula (SEVERIN et al. 1991, WACKER et al. 1997, BLOOM und GOLDSTEIN 1998, KRAEMER et al. 1999)
- Exocytose- (VAN DER SLUIJS et al. 1990) und Endocytose-Vesikel (PIERRE et al. 1992, D'ARRIGO et al. 1997, NIELSEN et al. 1999, BANANIS et al. 2000, MURRAY et al. 2000)
- RNA-beinhaltende Vesikel (KÖHRMANN et al. 1999)
- Zellkerne (FISCHER 1999)
- Melanosomen (ROGERS et al. 1997, TUMA und GELFAND 1999)
- Autophagosomen (Lang et al. 1998)
- Phagosomen (BLOCKER et al. 1996, 1997 und 1998)
- Lysosomen (SWANSON et al. 1992, RAJAS et al. 1996)
- endoplasmatisches Retikulum (TERASAKI und REESE 1994, WATERMAN-STORER und SALMON 1998, LANE und ALLAN 1999, TERASAKI 2000)
- Golgi Komplex (BURKHARDT 1998, THYBERG und MOSKALEWSKI 1999, TOOMRE et al. 1999, TERASAKI 2000)
- Mitochondrien (BAUMANN und MURPHY 1995, YAFFE et al. 1996, STEBBINGS 1997, SVOBODA und SLANINOVÁ 1997, YAFFE 1999, LIGON und STEWART 2000).

Bei Peroxisomen wurde ebenfalls die Assoziation mit Mikrotubuli gezeigt (siehe Abschnitt 2.5.), jedoch ist nur wenig über den Mechanismus der Bindung und der daran beteiligten Proteine bekannt.

2.3. Proteine, die an der Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli beteiligt sind

Die Interaktionen von Zellorganellen mit Mikrotubuli werden von zahlreichen Proteinen vermittelt, die hier kurz vorgestellt werden sollen.

2.3.1. Mikrotubuli-assoziierte Proteine, Motorproteine und Motorprotein-assoziierte Proteine

Die Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) ist für die Bildung und Aufrechterhaltung der Mikrotubuli von großer Bedeutung. So stabilisiert z.B. TAU Mikrotubuli und vermindert dadurch deren Dynamik (GARCIA und CLEVELAND 2001). Es wird diskutiert, ob die MAPs als Abstandhalter zwischen den Mikrotubuli oder als deren Bindeglieder fungieren. Neuere Versuche deuten eher auf die Rolle als Abstandhalter hin (MARX et al. 2000). Auch für die Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli sind MAPs von Bedeutung. Durch Überexpression von MAP4 und TAU wurde die Motilität von Organellen inhibiert (BULINSKI et al. 1997, EBNETH et al. 1998). TAU behindert dabei nicht den Transport selbst, sondern die Anlagerung des Motorproteines Kinesin (TRINCZEK et al. 1999). Einen möglichen Regulationsmechanismus des Organellentransportes stellt die Phosphorylierung dar, da diese die Interaktion mit Mikrotubuli verringert (SATO-HARADA et al. 1996, SANCHEZ et al. 2000). Des Weiteren wurde mit Mapmodulin ein Protein gefunden, das freie MAPs bindet und durch deren Entfernen von den Mikrotubuli den Organellentransport stimuliert (ULITZUR et al. 1997).

Wie bereits angedeutet, erfolgt der energieabhängige Transport der Organellen durch Motorproteine. Die Motorproteine der Mikrotubuli teilen sich in zwei Proteinfamilien auf: Mitglieder der Dynein-Proteinfamilie sind in der Regel für den Transport zu den Minusenden der Mikrotubuli zuständig und Kinesine transportieren ihre Ladung zumeist in Richtung Plusende (für Übersichtsartikel siehe HIROKAWA 1998, ALLAN und SCHROER 1999, SACK et al. 1999, SHEETZ 1999, KING 2000). Kinesin und Kinesin-verwandte Proteine binden mittels des mutmaßlichen Membranrezeptors Kinectin an die Organellenmembran (TOYOSHIMA et al. 1992, KUMAR et al. 1995, ONG et al. 2000). Dynein bindet an Dynactin (VAUGHAN und VALLEE 1995, BURKHARDT et al. 1997, KING und SCHROER 2000), das seinerseits vermutlich mit dem Ankyrin-Spektrin-Netzwerk interagiert (HIROKAWA 1998, DE MATTEIS und MORROW 2000). Während Motorproteine Organellen unter Hydrolyse von ATP transportieren, können sie die Organellen in Abwesenheit von ATP fest binden (VALE 1996). Die Regulation des Organellentransportes scheint neben den MAPs auch durch G-Proteine zu erfolgen. So wird z.B. das Kinesin-ähnliche Protein Rabkinesin durch das kleine G-Protein Rab6 reguliert (ECHARD et al. 1998). Motorproteine transportieren nicht nur Zellorganellen, sondern auch nicht-vesikuläre Ladungen, wie z.B. mRNA (CARSON et al. 1997) und Vimentin (LIAO und GUNDERSEN 1998).

2.3.2. Cytoplasmatische Linkerproteine (CLIPs)

Im Gegensatz zu den Motorproteinen fungieren die cytoplasmatischen Linkerproteine (CLIPs) als stabile Bindeglieder zwischen Organellen und Mikrotubuli (RICKARD und KREIS 1996). Das am besten untersuchte Mitglied dieser Proteinfamilie ist CLIP-170, ein Homolog des an Intermediärfilamente assoziierenden Proteines Restin (BILBE et al. 1992). CLIP-170 vermittelt die Bindung von Endosomen an Mikrotubuli (PIERRE et al. 1992, RICKARD 1999), bindet aber

nicht an Intermediärfilamente (PIERRE et al. 1994). Die Bindung an Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung gelöst, wobei *in vitro* kein direkter Einfluß von ATP-Gabe feststellbar ist (RICKARD und KREIS 1990 und 1991). CLIP-170 ist ein 135 nm messendes längliches Molekül von 170 kDa und bildet Homodimere. Der globuläre N-Terminus beinhaltet zwei hochkonservierte Mikrotubuli-Bindungsdomänen und die C-terminale Domäne besitzt zwei Metall-bindende Motive, die wahrscheinlich mit Organellen interagieren können. Dazwischen liegt der die Dimerisierung vermittelnde Hals, der 950 Aminosäuren lang ist, in Form einer α -Helix vorliegt und zwei flexible Knicke aufweist (PIERRE et al. 1994, DIAMANTOPOULOS et al. 1998, SCHEEL et al. 1999). CLIP-170 ist an den Plusenden der Mikrotubuli lokalisiert (PEREZ et al. 1999), wo es möglicherweise die Anlagerung von Tubulin-Dimeren reguliert (DIAMANTOPOULOS et al. 1999, SAWIN 2000, SCHROER 2001). An den Mikrotubuli-Plusenden colokalisiert CLIP-170 mit cytoplasmatischem Dynein und Dynactin (VALETTI et al. 1999, VAUGHAN et al. 1999). Die Affinität zur Bindung an Mikrotubuli scheint bei CLIP-170 größer als bei Dynactin zu sein (SCHROER 2000). Zusammen mit Dynamitin-Überexpressionsversuchen legt dies den Schluß nahe, daß CLIP-170 zuerst an die Mikrotubuli bindet und dann – mittels Interaktion seines C-terminalen Metall-bindenden Motivs – Dynactin an die Mikrotubuli-Plusenden rekrutiert (VALETTI et al. 1999). Entsprechend des Modelles von RICKARD und KREIS (1996, siehe auch Abbildung 2), könnte dieser Komplex die Assoziation mit Organellen herbeiführen und dann gegebenenfalls Dynein aktivieren. Dabei würde CLIP-170 vor Beginn des zum Minusende der Mikrotubuli gerichteten Transportes phosphoryliert und somit von den Mikrotubuli abgelöst. Ferner wurde kürzlich eine Interaktion von CLIP-170 mit Presenilin gezeigt (JOHNSINGH et al. 2000), und eine maßgebliche Rolle von CLIP-170 bei der Ausrichtung der Chromosomen während der Metaphase wurde vorgeschlagen (DUJARDIN et al. 1998).

Weitere bis heute identifizierte Mitglieder der CLIP-Familie sind:

- CLIP-115, ein Gehirn-spezifisches Protein, das an DLBs („dendritic lamellar bodies“) und Mikrotubuli assoziiert (DE ZEEUW et al. 1997, HOOGENRAAD et al. 1998 und 2000).
- D-CLIP-190, ein *Drosophila*-CLIP, das auch mit Myosin VI interagiert und von dem daher eine Binfunktion zwischen den Mikrotubuli und dem Aktin-Cytoskelett vermutet wird (LANTZ und MILLER 1998, SISSON et al. 2000).
- Hühner CLIP-170, ein Homolog zum menschlichen CLIP-170 und Restin (GRIPARIC et al. 1998, GRIPARIC und KELLER 1998 und 1999).

Zusätzlich wurden mehrere Proteine mit Homologien zu CLIPs, besonders im Bereich der Mikrotubuli-Bindungsdomäne, identifiziert. Darunter sind:

- p150^{Glucd}, die Mikrotubuli-bindende Untereinheit des Dynactin-Komplexes (HOLZBAUR et al. 1991, PIERRE et al. 1992).
- Bik1 (BERLIN et al. 1990), das potentielle CLIP-170-Homolog der Hefen.
- Alf1p und Alp11, die bei Hefen für die Faltung von Tubulin wichtig sind (FEIERBACH et al. 1999, RADCLIFFE et al. 1999, RADCLIFFE und TODA 2000).
- tip1p, ein Regulator der Mikrotubuli-Dynamik bei Hefen (BRUNNER und NURSE 2000).

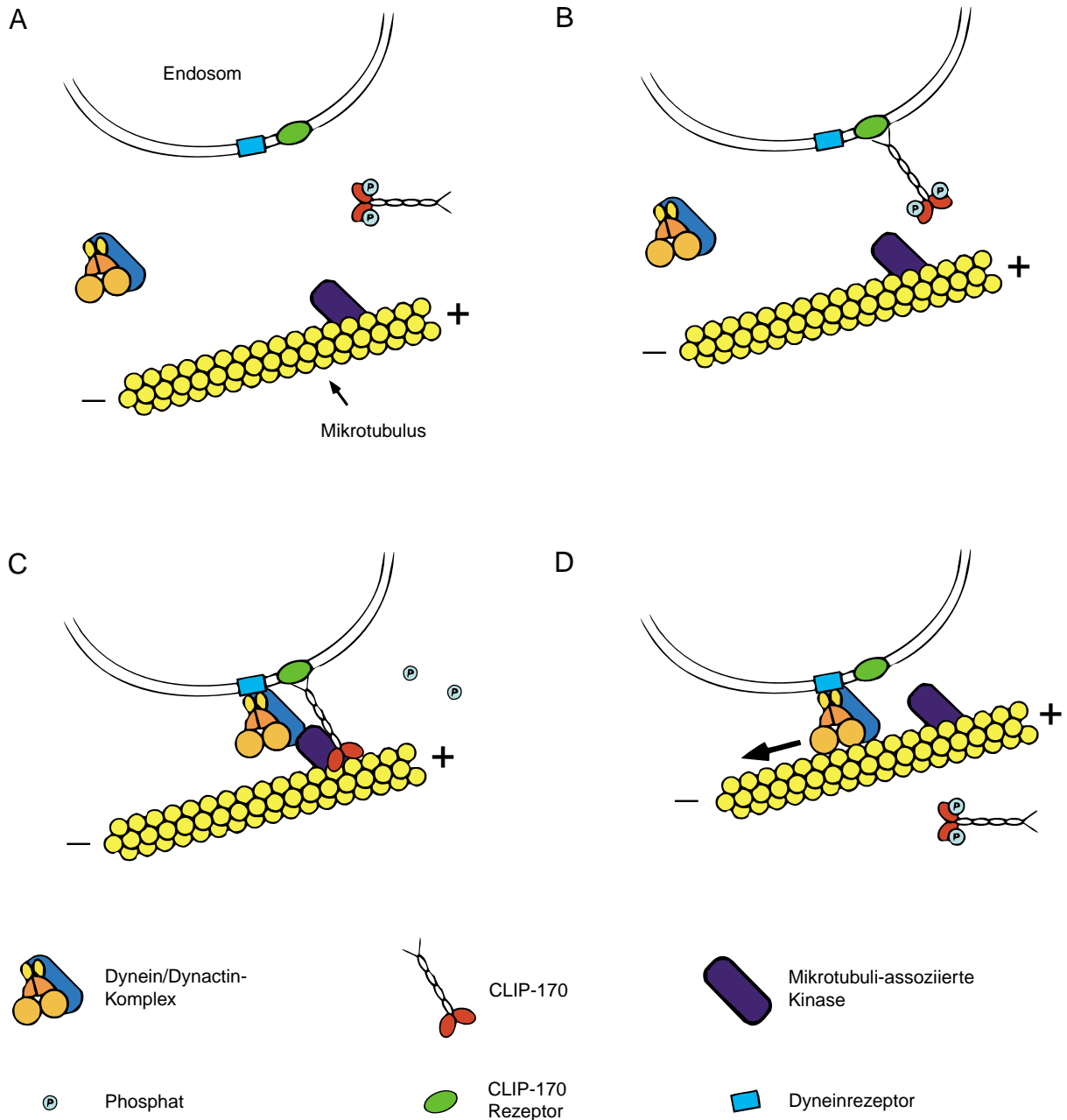


Abbildung 2: Modell der Regulation der Interaktion von Organellen mit Mikrotubuli durch CLIP-170. Das Schema, das eine Möglichkeit der Regulation illustriert, wurde modifiziert nach RICKARD und KREIS (1996). **A** CLIP-170 und möglicherweise auch der Motorkomplex liegen in löslicher Form vor, bevor sie mit den membrangebundenen Rezeptoren beider Proteine interagieren (**B**). **C** Die nachfolgende Dephosphorylierung von CLIP-170, die anscheinend durch Mikrotubuli reguliert wird, führt zur Anlagerung des Endosoms an den Mikrotubulus und zur Bindung des Motorkomplexes an die Membran. **D** Der Motorkomplex ist inaktiv, bis durch die Phosphorylierung des CLIP-170 die feste Verbindung des Vesikels mit dem Mikrotubulus gelöst wird. Die Ablösung von CLIP-170 könnte für die Initiation der Bewegung ausreichend sein; denkbar ist auch eine gleichzeitige Aktivierung des Motors.

Die meisten dieser Proteine besitzen wie CLIP-170 eine lange zentrale „coiled-coil“ Domäne, die als Platzhalter für einen bestimmten Abstand zwischen der gebundenen Organelle und dem Mikrotubulus dienen könnte (SCHROER 2000).

Die zentrale Bedeutung der CLIPs für die Stabilisierung und Dynamik der Plusenden der Mikrotubuli (siehe oben) zeichnet sich immer deutlicher ab. Mit den CLASPs (CLIP-assoziierten Proteinen) wurden kürzlich Proteine gefunden, die vermutlich die CLIP-115- und CLIP-170-vermittelte Stabilisierung der Mikrotubuli-Plusenden regulieren (AKHMANOVA et al. 2001).

Während die Assoziation der verschiedenen CLIPs an Mikrotubuli eindeutig nachgewiesen ist, ist der molekulare Mechanismus der Interaktionen mit anderen Proteinen und Organellen weitgehend unbekannt.

2.3.3. Weitere für die Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli wichtige Proteine

Zusätzlich zu den CLIPs, für die eine Funktion beim Andocken der Organellen an Mikrotubuli vor ihrem Transport vorgeschlagen wurde (RICKARD und KREIS 1996), gibt es weitere Proteine, die eine statische Verbindung zu Organellen aufbauen (siehe Tabelle 7, Seite 89) und so möglicherweise als Bremsen nach dem Transport fungieren können (ALLAN und SCHROER 1999). Zu diesen Proteinen gehört ein 63 kDa integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, CLIMP-63 (für „cytoskeleton-linking membrane protein“), das direkt über eine zentrale cytosolische Mikrotubuli-Bindungsdomäne mit Mikrotubuli interagiert und dessen Überexpression zur Aggregation von Mikrotubuli um das veränderte endoplasmatische Retikulum herum führt (KLOPFENSTEIN et al. 1998). Für ein weiteres integrales Membranprotein, p24, das in neuronalen Lysosomen lokalisiert ist und das eine den MAPs homologe Mikrotubuli-Bindungsdomäne besitzt, wurde eine Rolle für den neuronalen Organellentransport vorgeschlagen (KADOTA et al. 1997). In Lysosomenmembranen wurde eine membrangebundene Isoform der Glutamat-Dehydrogenase mit einem Molekulargewicht von 50 kDa gefunden, die über ihre Mikrotubuli-Bindungseigenschaften als Ankerprotein der Lysosomen an Mikrotubuli dienen könnte (MITHIEUX und ROUSSET 1989, RAJAS et al. 1996). Das cis-Golgi-Netzwerk-assoziierte Protein GMAP-210, das – wie die anderen in diesem Abschnitt vorgestellten Proteine – keine Homologien zu den CLIPs aufweist, stellt eine Verbindung zwischen dem cis-Golgi-Netzwerk und den Minusenden der Mikrotubuli her (INFANTE et al. 1999). Die vorhergesagte Struktur dieses Proteins ähnelt der von CLIP-170, mit dem Unterschied, daß die Mikrotubuli-bindende Domäne im C-Terminus und die Organellen-bindende Domäne im N-Terminus lokalisiert ist. Mit Aut7 und Aut2 wurden zwei Mikrotubuli-bindende Proteine gefunden, die für den Transport von autophagischen Vesikeln zur Vakuole essentiell sind (Lang et al. 1998, KIRISAKO et al. 2000). Die Funktion dieser beiden Proteine ist vielfältig. So deutet z.B. die Interaktion von Aut7 mit verschiedenen v-SNAREs auf eine Beteiligung an Docking- und Fusionsprozessen von Vesikeln hin (LEGESSE-MILLER et al. 2000).

Weitere Proteine, die eine Rolle für die Interaktion von Organellen mit Mikrotubuli spielen, sind die 58 kDa Formiminotransferase-Cyclodeaminase des Golgi-Komplexes (HENNIG et al. 1998, BASHOUR und BLOOM 1998) und Dynamin, einem für die Endocytose wichtigen Protein (SHPETNER und VALLEE 1989, VAN DER BLIEK und MEYEROWITZ 1991).

Kürzlich wurde mit den Hook-Proteinen eine weitere Proteinfamilie gefunden, die eine Linkefunktion von Zellorganellen und Mikrotubuli besitzt (WALENTA et al. 2001). Die Mikrotubuli-Bindungsdomäne der Hook-Proteine ist hochkonserviert und weist keine Ähnlichkeit zu

den Mikrotubuli-Bindungsdomänen der CLIPs, Motorproteine und anderer Mikrotubuli-bindender Proteine auf. Bisher sind vier Vertreter dieser neuen Proteinfamilie bekannt. *Drosophila* besitzt ein einzelnes Mitglied dieser Proteinfamilie, das an Endosomen und Mikrotubuli assoziiert und für den Endocytoseweg eine wichtige Rolle spielt (KRÄMER und PHISTRY 1996 und 1999). Beim Menschen wurden drei Hook-Proteine gefunden, von denen eines (Hook3) an Golgi-Membranen assoziiert; die Zielorganellen der beiden anderen Proteine (Hook1, Hook2) sind bisher nicht identifiziert. Die Überexpression von Hook3 führt zur Zerstörung des Mikrotubuli-Netzwerkes und des Golgi-Komplexes (WALENTA et al. 2001).

Sowohl die Bedeutung des Spektrin-Skeletts für die Form und Stabilität vieler Zellorganellen, als auch die direkte und indirekte Interaktion mit Motorproteinen und allen Cytoskelettelementen – über Adaptermoleküle wie Ankyrin – konnte nachgewiesen werden (HIROKAWA 1998, DE MATTEIS und MORROW 2000). Abgesehen von der Bindung an Dynactin ist wenig über die molekularen Mechanismen der Verbindung von Spectrin mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett bekannt.

2.4. *In vitro* Studien zur Bindung von Zellorganellen an Mikrotubuli

Interaktionen von Organellen mit Mikrotubuli wurden mit Hilfe verschiedener Assaysysteme ausführlich untersucht. Das Hauptinteresse galt dabei der Untersuchung von Motilität, doch es wurden auch Assays entwickelt, die die spezifische Bindung von Organellen an Mikrotubuli quantitativ erfassen (siehe Tabelle 6, Seite 85). Cosedimentationsassays wurden für die Untersuchung der Bindung von Mikrotubuli an axoplasmatische Vesikel (PRATT 1986), Lysosomen (MITHIEUX et al. 1988, MITHIEUX und ROUSSET 1988), Exocytose-Vesikel (VAN DER SLUIJS et al. 1990), sekretorische Granula (SHERLINE et al. 1977, SEVERIN et al. 1991), Golgi-Vesikel (MURATA et al. 1992) und Mitochondrien (JUNG et al. 1993) eingesetzt. Andere Studien nutzten magnetische Kügelchen für die Auswertung der Bindung von Endocytose-Vesikeln (SCHEEL und KREIS 1991) und Golgi-Vesikeln (KARECLA und KREIS 1992) an Mikrotubuli oder wendeten eine Refloatations-Technik für die Untersuchung von trans-Golgi-Vesikeln an (COFFE und RAYMOND 1990). In einem Phagosomenassay (BLOCKER et al. 1996) und einem Assay mit sekretorischen Granula (SUPRENANT und DENTLER 1982) wurde deren Bindung an Mikrotubuli durch direktes lichtmikroskopisches Auszählen ermittelt. Weiterhin wurde die Interaktion von cytoplasmatischen Granula mit Mikrotubuli mit Hilfe von Video-verstärkter Kontrastmikroskopie und Negativkontrast-Elektronenmikroskopie ausgewertet (ROTHWELL et al. 1989).

2.5. Interaktion von Peroxisomen mit Mikrotubuli

Nach anfänglichen elektronenmikroskopischen Beschreibungen (GORGAS 1985, YAMAMOTO und FAHIMI 1987) wurde die Assoziation von Peroxisomen mit Mikrotubuli in HepG2-Zellen mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie und ihre *in vitro* Interaktion mittels Video-verstärkter Kontrastmikroskopie gezeigt (SCHRADER et al. 1996a und 1996b). In dem gleichen Assaysystem, in dem lytische Granula und Phagosomen eine ATP-abhängige Bewegung entlang der Mikrotubuli ausführten (BLOCKER et al. 1996), banden isolierte Peroxisomen nahezu vollständig an Mikrotubuli – entlang deren gesamter Länge – bewegten sich allerdings nicht (SCHRADER et al. 1996a). Die Vorbehandlung der Peroxisomen mit Proteasen und KCl verhinderte die Bindung an Mikrotubuli. In einem anderen *in vitro* Assaysystem konnte die Bewegung von Peroxisomen entlang Mikrotubuli rekonstituiert werden (SCHRADER et al. 2000). Die Motilität

war dabei abhängig von einer angereicherten Motorproteinfraktion. Da zugefügtes Dynein und Dynactin keine Bewegung auslösen konnten, scheinen weitere Komponenten aus der Motorproteinfraktion für die Motilität von essentieller Bedeutung zu sein. Die Bedeutung der Dyneinvermittelten Motilität *in vivo* konnte durch Inhibierung von peroxisomalen Bewegungen nach Überexpression einer Dynactin-Untereinheit nachgewiesen werden (SCHRADER et al. 2000). Insgesamt verdeutlicht diese Studie die hohe Dynamik der Peroxisomen, mit der Ausbildung eines peroxisomalen Retikulums, der Motilität und den vorübergehenden Kontakten einzelner Peroxisomen.

Der Einfluß der Depolymerisierung von Mikrotubuli auf die intrazelluläre Verteilung und Form der Peroxisomen in HepG2-Zellen konnte von SCHRADER et al. (1996a und 1998) gezeigt werden. Nach Behandlung der Zellen mit den Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanzen Nocodazol, Vinblastin und Colcemid bildeten sich größere peroxisomale Aggregate, während Kontrollzellen eine gleichmäßige Verteilung der Peroxisomen aufwiesen (SCHRADER et al. 1996a). Im Gegensatz zu tubulären Lysosomen und Mitochondrien, die in Abwesenheit von Mikrotubuli kollabierten und sich abrundeten (JOHNSON et al. 1980, SWANSON et al. 1987), beeinflusste die Mikrotubuli-Depolymerisation die Form tubulärer Peroxisomen nicht (SCHRADER et al. 1996a). Es wurden sogar Hinweise gefunden, daß die Dissoziation der Peroxisomen von den Mikrotubuli deren Tubulation induzieren kann (SCHRADER et al. 1998).

Mittels Elektronenmikroskopie konnten RAPP et al. (1996) die Assoziation von Peroxisomen an Mikrotubuli bestätigen und fanden einen Abstand von ungefähr 10 nm zwischen Peroxisom und Mikrotubulus. Eine ähnliche Distanz zu den Mikrotubuli wurde bei Mitochondrien und axoplasmatischen Vesikeln gefunden (SMITH et al. 1975, LETERRIER et al. 1994). Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten ebenfalls die Assoziation von Peroxisomen an Mikrotubuli und deuteten auf eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Organisation retikulärer peroxisomaler Strukturen in der mit Peroxisomen-Proliferatoren behandelten Rattenleber hin (HÄYRINEN et al. 1997).

In vivo Motilitätsstudien mit CHO-Zellen ergaben eine sehr langsame ATP-unabhängige Bewegung bei der Mehrzahl der Peroxisomen und eine schnelle sprunghafte ATP-abhängige Bewegung bei 10 bis 15 % der Peroxisomen (RAPP et al. 1996). Mikrotubuli-Depolymerisierung verhinderte die schnelle Bewegung komplett, während eine Reduktion dieser Bewegung um 25 % durch die Zerstörung der Aktinfilamente erreicht wurde. Diese Studien wurden von WIEMER et al. (1997) mit CV1-Zellen bestätigt. Diese Gruppe schreibt die langsame ungerichtete ATP-unabhängige Bewegung, die bei etwa 95 % der Peroxisomen beobachtet wurde, der Brown'schen Molekularbewegung zu. Die schnelle gerichtete ATP-abhängige Bewegung der restlichen 5 % der Peroxisomen wurde durch die Depolymerisierung der Mikrotubuli verhindert, was zur Aggregation der Peroxisomen in der perinukleären Region führte. Weiterhin wurde die Assoziation von zahlreichen Peroxisomen mit Mikrotubuli mit konfokaler Laserscanningmikroskopie nachgewiesen. Weitere Peroxisomen-Motilitätsstudien mit CHO- und HUE-Zellen (HUBER et al. 1997, 1999 und 2000) bestätigten die ATP-Abhängigkeit der Peroxisomenbewegung und fanden – neben der Notwendigkeit von Ca^{2+} für die Anlagerung von Peroxisomen an Mikrotubuli – Hinweise auf die Regulation der Peroxisomen-Motilität durch heterotrimere G-Proteine über einen Peroxisomen-spezifischen G_i/G_o -Phospholipase A_2 -Signalweg. Es konnte gezeigt werden, daß eine Blockierung der Peroxisomen-Motilität durch hohe intrazelluläre Calciumspiegel, durch Mikroinjektion von GTP- γ -S und durch gleichzeitige extrazelluläre Gabe von ATP und Lysophosphatidylsäure erreicht werden kann.

3. Ziele dieser Arbeit

Der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli kommt eine wichtige zellbiologische Bedeutung zu. Daher liegt der Schwerpunkt der hier vorliegenden Studie auf der Untersuchung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli unter besonderer Berücksichtigung der folgenden Fragen:

- Kann auf morphologischer und biochemischer Ebene gezeigt werden, ob die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli spezifisch ist?
- Ist die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli quantifizierbar?
- Welche molekularen Faktoren beeinflussen die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli?
- Lassen sich Proteine, die für die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wichtig sind, identifizieren und isolieren?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden folgende experimentelle Ansätze gewählt:

- Darstellung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mittels Negativkontrast-Elektronenmikroskopie und konfokaler Laserscanningmikroskopie unter simultaner Detektion von indirekter Immunfluoreszenz und differentiellem Interferenzkontrast.
- Etablierung eines semiquantitativen Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays und Optimierung der einzelnen Assayparameter.
- Biochemische Charakterisierung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mit Hilfe des Bindungsassays unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Phosphorylierung, von mit Mikrotubuli interagierenden Proteinen, der Zugabe von Cytosol und der Vorbehandlung von Peroxisomen und Cytosol mit Proteasen, NEM und KCl.
- Nachweis von Proteinen, die mit Mikrotubuli und Peroxisomen interagieren und Überprüfung auf Ähnlichkeiten zu cytoplasmatischen Linkerproteinen.
- Isolierung von Proteinen, die für die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wichtig sind, mittels Gelfiltration und Affinitätschromatographie.

Ein wesentlicher Teil der Ergebnisse dieser Studie wurde publiziert (THIEMANN et al. 2000).

III. Material und Methoden

1. Versuchstiere, Geräte und Materialien

1.1. Versuchstiere

Die für diese Studie verwendeten Peroxisomen sowie das Cytosol wurden aus Rattenlebern isoliert. Die Lebern stammten von etwa 6 Wochen alten weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g. Die Tiere wurden von der Zentralen Versuchstieranlage der Universität Heidelberg bezogen, wo sie unter Standardlaborbedingungen ernährt und gehalten wurden. Eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Karlsruhe für den Einsatz der Versuchstiere für wissenschaftliche Untersuchungen lag vor.

1.2. Laborgeräte

Auflistung der benutzten Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge unter Angabe der Bezugsquelle:

Analysenwaage R 180 D	Sartorius, Göttingen
Beglimmer CTA 010	Balzers Union, Balzers, Liechtenstein
Diamantmesser	Diatome, Bienne, Schweiz
Elektrophoresekammern	LMS, Dossenheim
Elektrophorese-Netzgerät 3000Xi	Bio-Rad, München
Elektronenmikroskop EM 301 G	Philips, Eindhoven, Niederlande
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Glasgefäße	neoLab Migge, Heidelberg
Hybridisierungsöfen HB-1D	Techne, Princeton, NJ, USA
Konfokales Laserscanningmikroskop, Leica TCS MP	Leica Microsystems, Mannheim
Magnetrührer Heidolph	neoLab Migge, Heidelberg
Niederdruckanlage BioLogic LP	Bio-Rad, München
pH-Meter E500	Metrohm, Herisau, Schweiz
Photometer Uvikon 810	Kontron, Neufahrn
Potter S Homogenisator	Braun, Melsungen
Probenkocher Dri-Block DB-1	neoLab Migge, Heidelberg
Refraktometer	Zeiss, Oberkochen
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Bedford, MA, USA
Semi-Dry Blotgerät Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Scanner Arcus II	Agfa-Gevaert, Mortsels, Belgien
Schüttler ST 5	Zipperer, Staufen
Sterile Werkbank Lamin Air HBB 2472	Heraeus, Osterode
Ultramikrotom Reichert-Jung Ultracut S	Leica, Wien
Vakuum Konzentrierer	Bachhofer, Reutlingen
Vortex MS 1 Minishaker	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Waage LC821	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel

Wasserbad RMS 6 Lauda	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen:	
- Beckman J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
- Beckman L5-65B Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
- Beckman TJ-6 Zentrifuge	Beckman Instruments, München
- Biofuge 28 RS	Heraeus, Osterode
- Eppendorf-Tischzentrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg
- Mikrozentrifuge	Tomy Seiko, Tokio, Japan

1.3. Allgemeine Materialien, Chromatographiesäulen und Kits

Auflistung der benutzten allgemeinen Materialien, Chromatographiesäulen und Kits in alphabetischer Reihenfolge unter Angabe der Bezugsquelle:

Affinitätssäulen NHS-aktiviert	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Allfix	Fesago, Sandhausen
Baryt-Fotopapier Brovira	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Beem-Plastikkapseln	Polysciences, Eppelheim
Colloidal Blue Staining Kit	NOVEX, Frankfurt/Main
D-19 Entwickler	Kodak-Pathé, Paris, Frankreich
Dialyseschläuche SERVAPOR	Serva, Heidelberg
ECL-System	NEN, Boston, MA, USA
Einmachhaut	Ostmann, Bielefeld
Elektronenmikroskopiefilm 4489	Kodak, Rochester, NY, USA
Entsalzungssäule HiTrap	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filter 0,05 µm (Ø 13 mm)	Millipore, Bedford, MA, USA
Gel-Botting Papier GB 003	Schleicher & Schuell, Dassel
Glutathion-Sepharose 4B Säule	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford, MA, USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Microsep Konzentratoren 10 K	Pall Filtron Northborough, MA, USA
Mikrotiterplatten E.I.A./R.I.A.	Costar, Cambridge, MA, USA
Molekulargewichtsstandards	Bio-Rad, München
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich, CT, USA
Protein A-Gold	Polysciences, Eppelheim
Protein A-Sepharose CL4B	Sigma, Taufkirchen
Protein Assay	Bio-Rad, München
Röntgenfilm BioMax MR-1	Kodak, Rochester, NY, USA
Sterilfilter Millex-GS (0,22 µm)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Superdex-200 Säule	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Trägernetze (Grids)	Polysciences, Eppelheim
Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA

1.4. Chemikalien und Proteine

Auflistung der eingesetzten Chemikalien und Proteine in alphabetischer Reihenfolge unter Angabe der Bezugsquelle:

Acetonitril	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
ADP	Sigma, Taufkirchen
Agar	Merck, Darmstadt
6-Aminocapronsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Sigma, Taufkirchen
Ammoniummolybdat	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
AMP-PNP	Sigma, Taufkirchen
ATP	Sigma, Taufkirchen
[γ - ³² P]-ATP	ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA
ATP- γ -S	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin	Serva, Heidelberg
Bleinitrat	Fluka, Neu-Ulm
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
BSA-c (Aurion)	Biotrend, Köln
Casein	Sigma, Taufkirchen
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva, Heidelberg
DAB (3,3' Diaminobenzidin)	Sigma, Taufkirchen
DEAE-Dextran	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Serva, Heidelberg
Dynactin	Prof. T. Schroer, Johns Hopkins University, Baltimore, USA
Dynein	Prof. T. Schroer, Johns Hopkins University, Baltimore, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Epon 812	Fluka, Neu-Ulm
Epon Härter DDSA	Fluka, Neu-Ulm
Epon Härter MNA	Fluka, Neu-Ulm
Epon Beschleuniger DMP 30	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanolamin	Fluka, Neu-Ulm
Formaldehyd	Fluka, Neu-Ulm
Formvar 1595 E (Polyvinylformal)	Serva, Heidelberg

Glucose	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd	Serva, Heidelberg
Glutathion	Sigma, Taufkirchen
Glutathion S-Transferase	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
GTP	Serva, Heidelberg
Hexokinase	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Isotone Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
Jodacetamid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck, Darmstadt
Kinesin	Tebu, Frankfurt/Main
Kreatinphosphat	Sigma, Taufkirchen
Kreatinkinase	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
MAP2	Tebu, Frankfurt/Main
MAP-Fraktion	Tebu, Frankfurt/Main
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg
Mowiol 4.88	Polysciences, Eppelheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumcarbonat	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumcitrat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdihydrogenphosphat	Applichem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydrogenphosphat	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Acros Organics, New Jersey, USA
Natronlauge	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma, Taufkirchen
Nycodenz	Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen
Okadarsäure	Sigma, Taufkirchen
Osmiumtetroxid	Polysciences, Eppelheim
Paraformaldehyd	Riedel-de-Haën, Seelze
ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Phosphorwolframsäure	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Serva, Heidelberg
PIPES	Sigma, Taufkirchen

1,2 Propylenoxid	Merck, Darmstadt
n-Propylgallat	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Serva, Heidelberg
Proteinkinase (katalytische Untereinheit)	Sigma, Taufkirchen
Richardson Blau (Komponenten)	Merck, Darmstadt
Saccharose	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
SDS	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	Biochrom, Berlin
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
TAU	Tebu, Frankfurt/Main
Taxol (=Paclitaxel)	Sigma, Taufkirchen
TEMED	Serva, Heidelberg
Tubulin, MAP-frei	Tebu, Frankfurt/Main
Trichloressigsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Triethylamin	Riedel-de-Haën, Seelze
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, TPCK-behandelt	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

1.5. Antikörper

1.5.1. Herkunft der Antikörper

Auflistung der eingesetzten Antikörper in alphabetischer Reihenfolge unter Angabe der Bezugsquelle:

CLIP-170 (2D6 und 4D3)	Prof. Dr. T.E. Kreis (†), Genf, Schweiz
GaM-IgG-RITC	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, UK
GaR-IgG-HRP	Sigma, Taufkirchen
MTCLIP-1	Eurogentec, Seraing, Belgien
MTCLIP-2	Eurogentec, Seraing, Belgien
MTCLIP-3	Dr. J. Pineda, Antikörper-Service, Berlin
NCLIP-115	Dr. N. Galjart, Rotterdam, Niederlande
PMP-26	Prof. Dr. T. Hashimoto, Matsumoto, Japan
RaM-IgG-HRP	Sigma, Taufkirchen
β-Tubulin	Sigma, Taufkirchen
UOx	Prof. Dr. Dr. A. Völkl, Anatomie II, Heidelberg

1.5.2. Verwendung der Antikörper

Die in dieser Studie eingesetzten Antikörper und deren Anwendungen für verschiedene Methoden sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Antigen	Tier	Reinheit	Verwendung	Verdünnung
CLIP-170 (2D6, 4D3)	CLIP-170 (HeLa-Zellen)	Maus	Serum	Western-Blot	1:500
GaR-IgG-HRP	IgG (Kan.)	Ziege	Serum	Western-Blot	1:10000
GaR-IgG-RITC	IgG (Kan.)	Ziege	Affin.	Immunfluoreszenz	1:400
MTCLIP-1	Synthetisches Peptid	Maus	Serum	Dot-Blot	1:500
				Western-Blot	1:500
				Immundepletion	1:35
				Bindungsassay	1:25
			Affin.	Chromatographie	-
MTCLIP-2	Synthetisches Peptid	Maus	Serum	Dot-Blot	1:500
				Western-Blot	1:500
				Affin.	Chromatographie
MTCLIP-3	Synthetisches Peptid	Kan.	Serum	Dot-Blot	1:500
				Western-Blot	1:500
				Affin.	Chromatographie
NCLIP-115	NCLIP-115 (Ratte)	Kan.	Serum	Western-Blot	1:1000
				Bindungsassay	1:90
PMP-26	PMP-26 (Ratte)	Kan.	IgG	Bindungsassay	1:100
RaM-IgG-HRP	IgG (Maus)	Kan.	Serum	Western-Blot	1:10000
β -Tubulin	β -Tubulin (Rattenhirn)	Maus	Ascites	Tubulin-Overlay-Blot	1:2000
UOx	UOx (Rattenleber)	Kan.	IgG	Western-Blot	1:20000
				Elektronenmikroskopie	1:2000
				Immunfluoreszenz	1:200

Affin.: affinitätsgereinigter Antikörper; IgG: IgG-Fraktion des Antiserums; Kan.: Kaninchen

2. Morphologische Methoden

2.1. Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten

Zur morphologischen Überprüfung des Erhaltungszustandes und der Reinheit der mittels differentieller Zellfraktionierung isolierten Peroxisomen (siehe Abschnitt 3.1.1.), wurden die Peroxisomen für die Elektronenmikroskopie aufbereitet (modifiziert nach VÖLKL und FAHIMI 1985). Diese elektronenmikroskopischen Präparate wurden freundlicherweise von Frau Gabie Krämer hergestellt.

2.1.1. Transfer von Peroxisomen auf Filter

Zunächst wurden frisch isolierte Peroxisomen mit Homogenisationspuffer (250 mM Saccharose, 5 mM MOPS, 0,1 % Ethanol, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1 mM 6-Aminocapronsäure, 5 mM Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM DTT, pH 7,4) auf eine Endkonzentration von 0,2 mg Protein/ml verdünnt und mit Glutardialdehyd (Endkonzentration 0,25 %) über Nacht bei 4°C fixiert. Mit einem von BAUDHUIN et al. (1967) entwickelten Filtersystem wurden 0,8 ml der fixierten peroxisomalen Präparationen, überschichtet mit 1 ml Homogenisationspuffer, durch einen Millipore Filter mit 0,05 µm Porengröße und einem Durchmesser von 13 mm bei 1 bar Stickstoff filtriert. Die Filtrationen dauerten 15 bis 60 Minuten.

2.1.2. DAB-Reaktion und Epon-Einbettung

Zum spezifischen Nachweis der Katalase in den Peroxisomen wurde die DAB-Reaktion durchgeführt (FAHIMI 1969, ANGERMÜLLER und FAHIMI 1981). Nach der Postfixierung der Peroxisomenfilter mit 2 % Glutardialdehyd (in Homogenisationspuffer) für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur, folgte die alkalische DAB-Reaktion. Dazu wurden die Filter zunächst mit DAB-Lösung (2 mg/ml 3,3' Diaminobenzidin, pH 10,5, in Teorell-Stenhagen Puffer: 10 mM Phosphorsäure, 15 mM Borsäure, 7 mM Citronensäure, 69 mM NaOH) für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert und dann die eigentliche DAB-Reaktion durch Zugabe von frischer DAB-Lösung mit 0,15 % H₂O₂ für 30 Minuten bei 37°C gestartet. Im Anschluß an das Abpipettieren der DAB-Lösung und das Waschen der Filter mit Homogenisationspuffer wurde mit reduziertem Osmium (2 % wässriges Osmiumtetroxid; zur Reduzierung des Osmiums nach 10 Minuten Zugabe von 3 % Kaliumhexacyanoferrat (II)) für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Um den Verlust von Organellen zu verhindern, wurden die Filter in 5 % Agar eingebettet. Danach erfolgte die Entwässerung und Einbettung:

- 85 % Ethanol für 3 × Minuten
- 96 % Ethanol für 3 × 5 Minuten
- 100 % Ethanol für 3 × 5 Minuten
- 1,2 Propylenoxid für 3 × 5 Minuten
- 1,2 Propylenoxid-Epon-Gemisch (1:1) für 30 Minuten
- Infiltrieren mit Epon 812 für 24 Stunden bei Raumtemperatur
- Einbettung in frisches Epon 812 in Beem-Plastikkapseln
- Polymerisation für 24 Stunden bei 60°C.

2.1.3. LR-White Einbettung

Für die Durchführung der Immunelektronenmikroskopie (FAHIMI et al. 1996), die zum spezifischen Nachweis der peroxisomalen Uratoxidase eingesetzt wurde, erfolgte zunächst die Entwässerung und LR-White Einbettung der abfiltrierten Peroxisomen (siehe Abschnitt 2.1.1.) nach NEWMAN et al. (1983):

- kurzes Spülen der Peroxisomenfilter mit 70 % Ethanol (-20°C)
- 70 % Ethanol für 2 × 60 Minuten bei -20°C
- 1:2 Gemisch aus 70 % Ethanol und LR-White Harz für 30 Minuten bei -20°C
- LR-White Harz für 60 Minuten bei 4°C (langsames Rotieren)
- frisches LR-White Harz über Nacht bei 4°C (langsames Rotieren)
- frisches LR-White Harz für 2 × 60 Minuten bei Raumtemperatur (langsames Rotieren)
- Einbettung in Gelatinekapseln mit frischem LR-White Harz, Polymerisation für 24 Stunden bei 50°C.

2.1.4. Herstellung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung

Zunächst wurden mit selbstgefertigten Glasmessern am Ultramikrotom Semidünnschnitte angefertigt, mit Richardson Blau angefärbt und lichtmikroskopisch untersucht, um geeignete Stellen für die anschließende Herstellung von Ultradünnschnitten auszuwählen. Die mit einem Diamantmesser am Ultramikrotom angefertigten Schnitte mit einer Schnittdicke von 30-60 nm wurden auf Formvar-befilmte 200 Mesh Kupfer-Trägernetze überführt, 1 bis 4 Minuten mit 1 % Uranylacetat oder für 15 Sekunden bis 1 Minute mit Bleicitrat (REYNOLDS 1963) kontrastiert: 0,665 g Bleinitrat und 0,88 g Natriumcitrat × 2 H₂O in H₂O dest. lösen, mit 1 M NaOH abpuffern bis die Lösung klar wird, mit H₂O dest. auf 25 ml auffüllen und vor Gebrauch zentrifugieren), Netzchen danach mehrmals mit destilliertem Wasser spülen.

2.1.5. Immuncytochemie mit der Protein A-Gold Methode

Für das für die Immunelektronenmikroskopie erforderliche Post-Embedding (siehe FAHIMI und BAUMGART 1999) wurden ultradünne Schnitte der in LR-White eingebetteten isolierten Peroxisomen auf Formvar-befilmte 200 Mesh Nickel-Trägernetze überführt. Nach dem Absättigen mit 4 % BSA-Lösung (in TBS: 20 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 7,4) für 30 Minuten, wurden die Trägernetze über Nacht in einer feuchten Kammer mit 50 µl Antikörperlösung (UOx, 1:2000 verdünnt in TBS mit 0,1 % BSA) inkubiert. Danach wurden die Trägernetze in einer Tropfenreihe (TBS, 0,1 % BSA) gewaschen und für eine Stunde auf einem Tropfen Protein A-Gold Lösung (15 nm Polygold, 1:50 bis 1:100 in TBS, 0,1 % BSA) inkubiert. Vor dem Kontrastieren mit Uranylacetat und Bleicitrat (siehe oben) wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

2.1.6. Elektronenmikroskopie

Die Auswertung der so hergestellten Präparate erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Bei Vergrößerungen von 3900- bis 125000-fach wurden mit einer Plattenkamera Negative (Größe 83 × 102 mm) belichtet. Abzüge der Bilder auf Baryt-Papier erfolgten mit einem Vergrößerungsfaktor von 1,6. Ein Teil der Negative wurde eingescannt und digital bearbeitet (Abschnitt 4.1. und 4.2.).

2.2. Negativkontrast-Elektronenmikroskopie

Mit der Negativkontrast-Elektronenmikroskopie wurde die Assoziation von Peroxisomen mit Mikrotubuli dargestellt. Zunächst erfolgte die Polymerisation von Tubulin (siehe Abschnitt 3.6.), dann wurden die Mikrotubuli (Endkonzentration 0,5 mg Protein/ml) für 60 Minuten bei 37°C mit isolierten Rattenleberperoxisomen (Endkonzentration 0,1 mg/ml; für die Isolierung siehe Abschnitt 3.1.1.) inkubiert. Anschließend wurde mit 0,25 % Glutardialdehyd für 5 Minuten fixiert. Als Trägernetze wurden mit Formvar beschichtete 200 Mesh Kupfer-Grids verwendet. Diese wurden kurz vor ihrem Einsatz für 10 Sekunden mit einer Spannung von 160 V bei 0,078 mbar beglimmt. Dadurch wurde die Oberfläche der Grids negativ aufgeladen, was ein gleichmäßiges Anlagern der fixierten Peroxisomen-Mikrotubuli-Komplexe erleichterte.

Die Inkubation der beglimmten Grids mit der Peroxisomen-Mikrotubuli-Lösung erfolgte für 2 Minuten. Nach dem Abnehmen der Lösung mit Filterpapier wurde für 3 Minuten mit Kontrastmittel inkubiert. Als Kontrastmittel wurden 2 % Ammoniummolybdat, 2 % Phosphorwolframsäure und 1 % Uranylacetat ausgetestet, wobei mit der Phosphorwolframsäure der beste Kontrast erzielt wurde. Dem 3-maligen Spülen mit Kontrastmittel folgte das Absaugen der Flüssigkeit mit Filterpapier. Das verbleibende Kontrastmittel wurde eingetrocknet. Die so behandelten Grids wurden mit dem Elektronenmikroskop untersucht (siehe Abschnitt 2.1.6.).

2.3. Indirekte Immunfluoreszenz und differentieller Interferenzkontrast (DIK) am konfokalen Laserscanningmikroskop

Das konfokale Laserscanningmikroskop wurde eingesetzt, um den Nachweis zu erbringen, daß es sich bei den Mikrotubuli-bindenden Organellen in der Tat um Peroxisomen handelt. Dabei diente die Immunfluoreszenz zur Visualisierung der mit einem Uratoxidase-Antikörper markierten Peroxisomen und differentieller Interferenzkontrast zur Darstellung der Mikrotubuli.

2.3.1. Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten

Für die indirekte Immunfluoreszenz (IF) wurde der Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay auf SuperFrost Plus-Glasobjektträgern durchgeführt. Zum Benetzen der Oberfläche der Objektträger wurden diese für 15 Minuten in 2 mg/ml DEAE-Dextran inkubiert und anschließend 3 × mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Das gleiche Protokoll wie für den Mikrotiterplattenassay (siehe Abbildung 3) wurde benutzt, bis auf die Reduktion der eingesetzten Volumina auf 25 µl für jede Lösung. Die Fixierung der an den Objektträger gebundenen Mikrotubuli und Peroxisomen erfolgte mit 4 % frisch angesetztem Paraformaldehyd in TBS (20 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 7,4) für 20 Minuten. Nach 3 × Waschen mit TBSA (20 mM Tris, 0,9 % NaCl, 0,1 % BSA, 0,01 % Tween 20, pH 7,4) wurden die Objektträger zur Permeabilisierung der Peroxisomen für 10 Minuten mit 0,2 % Triton X-100 in TBSA behandelt und erneut 3 × mit TBSA gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit 1 % Glycin in TBSA zur Absättigung freier Aldehydgruppen und 3 × Waschen mit TBSA. Nach Überführen der Objektträger in eine feuchte Kammer wurde 1 Stunde mit dem 1:200 verdünnten Primärantikörper Kaninchen-anti-Ratte Uratoxidase (UOX) (charakterisiert von VÖLKL et al. 1988) inkubiert. Nach 3 × Waschen mit TBSA folgte eine 40-minütige Inkubation mit dem 1:400 verdünnten RITC-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG-Antikörper (GaR-IgG-RITC). Schließlich wurden nach erneutem 3-maligem Waschen mit TBSA ein Tropfen des Einbettmediums Mowiol 4.88 mit Bleichschutz (11 % Mowiol, 39 % Glycerin, 0,8 % n-Propylgallat, in PBS: 137 mM NaCl,

1,68 mM KCl, 1,66 mM NaH₂PO₄, 9,58 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) auf die Objektträger gegeben und ein zuvor mit destilliertem Wasser gespültes Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt. Der Bindungsassay erfolgte bei 25°C, die Inkubationen mit Primär- und Sekundäntikörper wurden bei 37°C und die übrigen Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.2. Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die Proben wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht, wobei differentieller Interferenzkontrast (DIK) für die Darstellung der Mikrotubuli und indirekte Immunfluoreszenz (IF) zur Visualisierung der RITC-markierten Peroxisomen eingesetzt wurde. Die Anregung erfolgte mit einem 544 nm Laser. DIK und IF wurden simultan in zwei verschiedenen Kanälen detektiert. Die Detektion der Fluoreszenz der RITC-markierten Peroxisomen erfolgte zwischen 553 und 642 nm, während für die Detektion des DIK der Transmissionsdetektor eingesetzt wurde. Zur Erhöhung des Kontrastes wurde für die Darstellung der IF und des DIK ein Falschfarben-Overlay gewählt.

3. Biochemische Methoden

3.1. Isolierung von Peroxisomen und Cytosol aus Rattenleber

3.1.1. Peroxisomenisolierung

Isolierte Peroxisomen wurden für den Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay und für die morphologische Darstellung der *in vitro* Bindung an Mikrotubuli benötigt. Die Peroxisomenisolierung erfolgte gemäß zweier Protokolle von VÖLKL und FAHIMI (1985) und VÖLKL et al. (1996) mit einigen Modifikationen. Lebern weiblicher Sprague-Dawley Ratten, die etwa 220 g wogen und die über Nacht gefastet wurden, wurden unter Chloralhydrat-Anaesthesie entnommen und sofort mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gespült. Das entnommene Lebergewebe wurde mit Zellstoff trockengetupft, gewogen, in kleine Stücke geschnitten und dann mit einem Potter S Homogenisator (1 Stroke, 2 Minuten, 1000 rpm) mit 5 ml/g Leber eiskaltem Homogenisationspuffer (250 mM Saccharose, 5 mM MOPS, 0,1 % Ethanol, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1 mM 6-Aminocapronsäure, 5 mM Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM DTT, pH 7,4) homogenisiert.

Die Subfraktionierung des Homogenats durch differentielles Pelletieren erfolgte mittels mehrerer Zentrifugationsschritte. Zunächst wurde das Ausgangshomogenat für 10 Minuten bei 4°C in einer Beckman TJ-6 Zentrifuge bei 50 g zentrifugiert, um Bindegewebe, Zelltrümmer und ganze Zellen abzutrennen. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Pellet mit Homogenisationspuffer resuspendiert, erneut mit dem Potter S Homogenisator (1 Stroke, 1 Minute, 1000 rpm) homogenisiert und für 10 Minuten bei 4°C in der Beckman TJ-6 Zentrifuge bei 50 g zentrifugiert. Die vereinigten Überstände der 1. und 2. Zentrifugation wurden dann für 10 Minuten bei 4°C in einer Beckman J2-HS Zentrifuge mit dem JA-12 Rotor bei 2860 g zentrifugiert. Diese Zentrifugation wurde mit dem mit 5-facher Menge Homogenisationspuffer resuspendiertem Pellet wiederholt. Die vereinigten Überstände der beiden Zentrifugationen mit dem JA-12 Rotor wurden auf zwei Nycodenz-Kissen aufgetragen, von denen das untere Kissen 65 % Nycodenz ($\rho=1,346$ g/ml) und das obere Kissen 32,5 % Nycodenz ($\rho=1,172$ g/ml)

– jeweils gelöst in Homogenisationspuffer ohne Saccharose – enthält. Der Brechungsindex der Nycodenzlösungen, aus dem sich die Dichte der Lösung berechnen läßt, wurde mit einem Refraktometer überprüft und gegebenenfalls mit Homogenisationspuffer auf den gewünschten Wert korrigiert. Die Peroxisomenfraktion, die sich nach der anschließenden Zentrifugation bei 37500 g in einer Beckman L5-65B Ultrazentrifuge als Bande an der Phasengrenze zwischen den beiden Nycodenzkissen ablagerte, wurde mit einer Pipette entnommen und für weitere Behandlungen (siehe Abschnitt 3.2.) verwendet. Der verbleibende Überstand über dem weniger dichten Nycodenzkissen wurde zur Gewinnung des Cytosols weiter verwendet (siehe Abschnitt 3.1.2.). Die so erhaltenen hoch gereinigten Peroxisomen in Nycodenzlösung wurden mit Homogenisationspuffer auf eine Endkonzentration von 0,2 mg Protein/ml verdünnt, pelletiert (37500 g, 4°C, 30 Minuten, Beckman L5-65B Ultrazentrifuge, SW 40 Rotor) und vorsichtig unter Reiben mit einem Glasstab nach und nach tropfenweise mit Homogenisationspuffer resuspendiert. Schließlich wurden peroxisomale Aggregate durch Zentrifugation für 10 Sekunden bei 2000 g in einer Mikrozentrifuge entfernt. Der resultierende Überstand mit den vereinzelt Peroxisomen wurde routinemäßig bei -80°C gelagert, bis die Peroxisomen weiter verwendet wurden. Bindungsstudien mit diesen tiefgefrorenen und wieder aufgetauten Peroxisomen zeigten vergleichbare Ergebnisse wie Bindungsassays mit frisch isolierten Peroxisomen.

3.1.2. Cytosol-Isolierung

Zur Isolierung von Cytosol wurde der Überstand über den beiden Nycodenzkissen nach der Peroxisomenisolierung (siehe oben) bei 125000 g in einer Beckman L5-65B Ultrazentrifuge (45 Ti Rotor, 4°C, 30 Minuten) zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation stellte die Cytosolfraction dar.

3.2. Vorbehandlung von Peroxisomen

Um Hinweise auf die Spezifität der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu erhalten, wurden frisch isolierte Peroxisomen (Endkonzentration 0,2 mg Protein/ml) folgendermaßen vorbehandelt:

- a) Inkubation mit TPCK-behandeltem Trypsin (0,1 mg Protein/ml) für 45 Minuten bei 37°C; Stopreaktion mit PMSF (4 mM) und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (0,18 mg Protein/ml);
- b) Inkubation mit Proteinase K (1 mg Protein/ml) für 45 Minuten bei 37°C; Stopreaktion mit PMSF (4 mM);
- c) Inkubation mit NEM (4 mM) für 15 Minuten auf Eis; Stopreaktion mit DTT (8 mM);
- d) Inkubation mit verschiedenen KCl-Konzentrationen (0,01 M, 0,033 M, 0,1 M, 0,33 M) für 30 Minuten auf Eis.

Nach der Vorbehandlung wurden die Peroxisomen zur Entfernung der zugegebenen Chemikalien pelletiert (37500 g, 4°C, 30 Minuten, Beckman L5-65B Ultrazentrifuge, SW 40 Rotor), mit einem Glasstab verrieben, resuspendiert, die Peroxisomenaggregate entfernt und bei -80°C gelagert (siehe Abschnitt 3.1.1.).

3.3. Vorbehandlung von Cytosol

Um den Einfluß cytosolischer Komponenten auf die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu testen, wurde Rattenlebercytosol (17,6 mg Protein/ml, Gewinnung siehe Abschnitt 3.1.2.) in folgender Weise vorbehandelt: Zugabe von

- a) TPCK-behandeltem Trypsin (0,1 mg Protein/ml) für 45 min bei 37°C; Stopreaktion mit PMSF (4 mM) und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (0,18 mg Protein/ml);
- b) Proteinase K (1 mg Protein/ml) für 45 min bei 37°C; Stopreaktion mit PMSF (4 mM)
- c) NEM (4 mM) für 15 min auf Eis; Stopreaktion mit DTT (8 mM).

Nachfolgend wurde das unterschiedlich vorbehandelte Cytosol (13,2 mg Protein/ml) und das unbehandelte Cytosol auf eine Endkonzentration von 5 mg Protein/ml verdünnt und in den Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt.

3.4. Vorbehandlung von Proteinproben

3.4.1. Dialyse

Um Probenpuffer auszutauschen, wurden die Proteinproben auf eine Entsalzungssäule aufgetragen (siehe Abschnitt 3.11.4.) oder dialysiert. Nach dem Einweichen und Waschen der Dialyseschläuche (Durchmesser 16 mm) mit destilliertem Wasser wurden 1 bis 2 ml Probe eingefüllt und mit 1 bis 2 l des gewünschten Puffers dialysiert. Nach jeweils 1 bis 2 Stunden wurde der Puffer erneuert. Insgesamt wurde der Puffer dreimal gewechselt. Die Dialysen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4.2. Aufkonzentrieren

Durch die Dialyse und die im Abschnitt 3.11. dargestellten Säulenchromatographien von Proteinproben wurde deren Proteingehalt z.T. sehr deutlich abgesenkt. Damit von diesen Proben größere Proteinmengen auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen werden konnten, bzw. größere Proteinmengen in den Bindungsassay (siehe Abschnitt 3.7.) eingesetzt werden konnten, wurden die Proteinproben aufkonzentriert. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bis zum völligen Flüssigkeitsverlust im Vakuum-Konzentrierer eingengt. Für weitere Untersuchungen wurden die Proben mit den entsprechenden Puffern resuspendiert. Gemäß der gewünschten Verwendung mußten die Proteinproben vor dem Einengen dialysiert oder entsalzt werden. So wurden Proben für die SDS-PAGE mit einem Puffer geringer Ionenstärke dialysiert (siehe Abschnitt 3.4.1.), damit die Elektrophorese mit den aufkonzentrierten Proteinproben nicht durch eine hohe Salzkonzentration in der Probe beeinträchtigt wurde. Proben für den Bindungsassay wurden vor dem Einengen mit Homogenisationspuffer dialysiert, der um genau den Faktor verdünnt wurde, um den die Probe aufkonzentriert wurde. So wurde eine gleichbleibende Pufferzusammensetzung im Bindungsassay sichergestellt.

Das Einengen der Proteinproben mit 10 K Microsep Konzentratoren mittels Zentrifugation erwies sich als ungeeignet, da bei dieser Methode ein großer Teil der Proteine an der Membran der Konzentratoren haften blieb.

3.4.3. Immundepletion

Zum Entfernen von bestimmten Proteinen aus Proteingemischen wurde die Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose und den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden 50 mg Protein A-Sepharose in 10 ml 50 mM Natriumphosphat-Puffer (9,8 mM NaH_2PO_4 , 40,2 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) suspendiert. Nach dem Absinken der Protein A-Sepharose wurde der Überstand verworfen und erneut 10 ml 50 mM Natriumphosphat-Puffer zugefügt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das letzte Protein A-Sepharose-Sediment wurde in 1 ml 50 mM Natriumphosphat-Puffer aufgenommen, was einer Konzentration von 50 mg Protein A-Sepharose/ml entspricht. Für die Immundepletion wurden 70 μl je Ansatz dieser Protein A-Sepharose-Präparation zentrifugiert (5 Minuten bei 4°C und 10000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge), das Pellet mit 66 μl Proteinlösung (z.B. KCl-Eluat, fraktioniertes KCl-Eluat) resuspendiert, 4 μl Antiserum (MTCLIP-1, siehe auch Tabelle 1) oder Präimmenserum zugegeben und dann für 1,5 Stunden bei 4°C unter langsamen Rotieren der Proben inkubiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 10000 g mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand abgenommen und in den Bindungsassay eingesetzt (siehe Abschnitt 3.8.13.).

3.4.4. Cosedimentation mit Mikrotubuli

Zur Identifizierung von Proteinen, die an Mikrotubuli binden, wurde ein Mikrotubuli-Sedimentationsassay durchgeführt. Zunächst erfolgte die Polymerisation von Tubulin (siehe Abschnitt 3.6.), dann die Verdünnung auf 0,1 mg Protein/ml und das Zentrifugieren (50 μl Mikrotubuli-Lösung pro Ansatz) für 30 Minuten bei 50000 g und 20°C mit einer Heraeus Biofuge 28 RS Zentrifuge (# 3740 Rotor). Mit dem Überstand wurde nicht polymerisiertes Tubulin verworfen. Das Pellet wurde dann vorsichtig mit 240 μl Proteinprobe (KCl-Eluat oder fraktioniertes KCl-Eluat) und 60 μl 5-fach P/G/T-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 50000 g und 20°C mit der Heraeus Biofuge 28 RS Zentrifuge wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 100 μl P/G/T-Puffer (35 mM PIPES, 5 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM GTP, 20 μM Taxol, pH 7,4) gewaschen und danach mit Elutionspuffer (0,5 M NaCl) resuspendiert. Der Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur schloß sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an (30 Minuten bei 50000 g und 20°C, siehe oben). Der Analyse des Überstandes mit den Mikrotubuli-bindenden Proteinen, die durch Zugabe von 0,5 M NaCl von den Mikrotubuli abgelöst wurden, erfolgte mittels silbergefärbter SDS-Gele und Immunoblots.

3.4.5. Phosphorylierung mit radioaktivem ATP

Um zu überprüfen, welche Proteine in einem Proteingemisch *in vitro* phosphoryliert werden, wurde ein Phosphorylierungsassay mit radioaktivem ATP durchgeführt. Dazu wurden 16 μl Proteinprobe (z.B. KCl-Eluat, fraktioniertes KCl-Eluat, verdünntes Cytosol oder verdünnte Peroxisomenlösung) mit 1 μl [γ - ^{32}P]-ATP mit 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (ATP-Endkonzentration: 0,4 mM) und ein Teil der Proben zusätzlich mit 2 μl Proteinkinase (1 U/ μl , katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Schweineherz) vermischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde zu jeder Probe 8 μl Probenpuffer (60 mM Tris, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol, pH 6,8) zugefügt, die Proben gekocht, eine SDS-PAGE durchgeführt und die Gele nach der Silberfärbung getrocknet. Schließlich wurde in einer Kassette ein Röntgenfilm auf die Gele gelegt, dieser bei -80°C für 8 bis 80 Stunden exponiert und in der Dunkelkammer entwickelt.

3.5. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes verschiedener Proteinproben erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay, der auf der Methode von BRADFORD (1976) basiert. Je 100 µl der mit TVBE-Puffer (1 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA, 0,1 % Ethanol, 0,1 % Triton X-100, pH 7,2) verdünnten Proben wurden mit 1 ml der Bio-Rad Färbelösung (mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt) vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die optische Dichte bei 595 nm gegen den TVBE-Nullwert gemessen. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin mit einer Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml.

3.6. Polymerisierung von Tubulin

Auspolymerisierte Mikrotubuli wurden für den Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay, den Mikrotubuli-Sedimentationsassay und für die morphologische Darstellung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli benötigt. Die Polymerisierung von Tubulin erfolgte durch Inkubation von Glycerin-stabilisiertem MAP-freiem Tubulin mit P/G/T-Puffer (35 mM PIPES, 5 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM GTP, 20 µM Taxol, pH 7,4) bei 37°C für 15 Minuten. Die Konzentration von Tubulin in diesem Ansatz betrug 3,4 mg Protein/ml. Zum weiteren Einsatz der Mikrotubuli für die morphologische Darstellung, den Mikrotubuli-Sedimentationsassay und den biochemischen Bindungsassay wurde die gewünschte Verdünnung durch Zugabe von P/G/T-Puffer erhalten.

3.7. Der *in vitro* Bindungsassay

Der *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay diente der Charakterisierung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli und der Untersuchung der an der Bindung beteiligten Faktoren.

3.7.1. Der standardisierte *in vitro* Bindungsassay

Der Bindungsassay (Abbildung 3) wurde bei einer gleichbleibenden Temperatur von 25°C in 96 Well-Mikrotiterplatten von Costar (flacher Boden, hohe Bindungseigenschaft) durchgeführt. Die Wells wurden mit 50 µl der Mikrotubulilösung mit einer Endkonzentration von 0,25 mg Protein/ml (für die Polymerisierung von Tubulin siehe Abschnitt 3.6.) 45 Minuten lang inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit P/G/T-Puffer ohne Mikrotubuli. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen der Mikrotiterplatten wurde 0,3 ml Caseinlösung (25 mg Protein/ml in P/G/T-Puffer) in jedes Well gegeben und 45 Minuten lang inkubiert. Da höhere Konzentrationen an Casein schwer löslich sind, wurden beim Ansetzen der Caseinlösung 4 g Casein mit 100 ml PMEE-Puffer (35 mM PIPES, 5 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, pH 7,4) 1 Stunde lang bei 56°C gerührt und anschließend mit Hilfe eines Büchner-Trichters filtriert. Nach der Proteinbestimmung, die eine Casein-Konzentration von 2,5 % ergab, wurden Aliquots bei -20°C gelagert und dann zum Einsatz im Bindungsassay aufgetaut sowie die entsprechenden Mengen an DTT, Taxol und GTP (gleiche Endkonzentrationen wie beim P/G/T-Puffer) zugefügt. Dem einmaligen Waschen mit 0,3 ml P/G/T-Puffer folgte die Zugabe von 40 µl der Peroxisomenpräparationen (mit Homogenisationspuffer auf eine Endkonzentration von 0,1 mg Protein/ml verdünnt) für 30 Minuten zum Well. Nach 3 Waschschritten mit 50 µl P/G/T-Puffer pro Well wurden die an die Mikrotiterplatte (bzw. an die Mikrotiterplatten-assoziierten Mikrotubuli) gebundenen Proteine und Organellen mit 20 µl SDS-Probenpuffer (60 mM

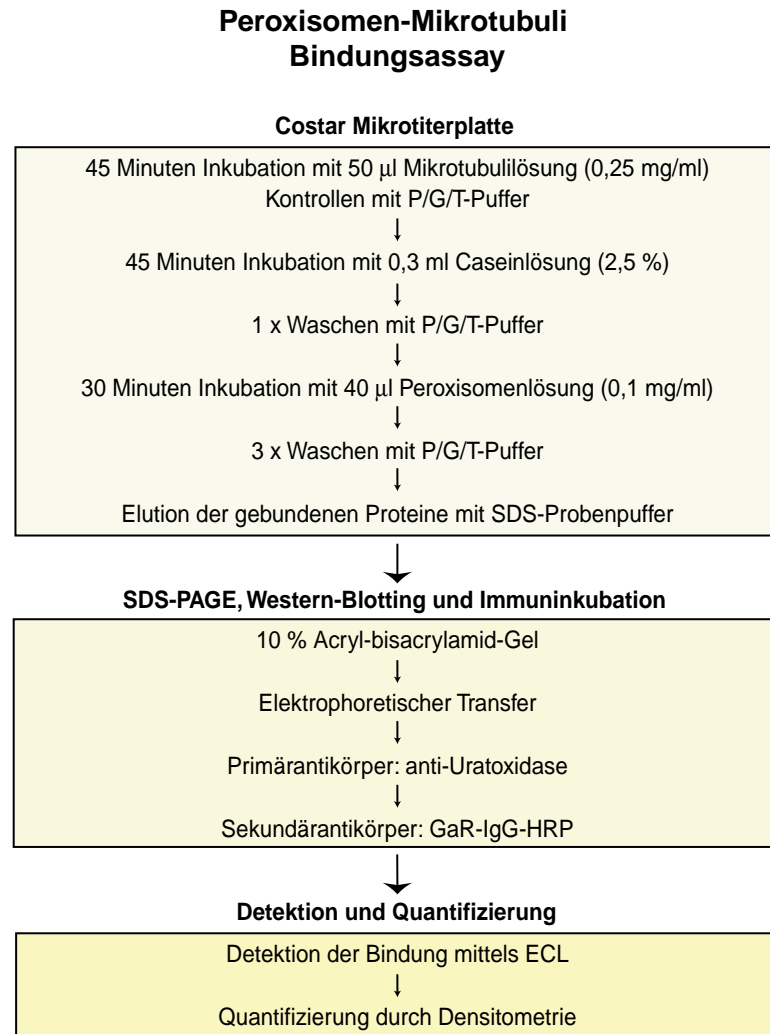


Abbildung 3: Schematische Zusammenfassung des Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays unter den optimierten Standardbedingungen. Dem Mikrotiterplattenassay folgt die Elution der gebundenen Substanzen, SDS-PAGE, Western-Blotting, Immuninkubation, die Detektion des peroxisomalen Markers Uratoxidase mittels ECL und die Quantifizierung der Uratoxidase-Banden.

Tris, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol, pH 6,8) durch sechsmaliges auf-und-ab-Pipettieren eluiert und nach 10-minütigem Kochen auf ein 10 % Polyacrylamidgel aufgetragen.

Nach der SDS-PAGE wurden die Polypeptide vom Gel elektrophoretisch im „Semi-Dry“-Verfahren auf eine Membran übertragen (zur Durchführung von SDS-PAGE, Western-Blotting, Immuninkubation und der darauf folgenden Schritte siehe Abschnitte 3.9. und 3.10.). Als Primärantikörper der Immuninkubation diente ein Kaninchen-anti-Ratte Uratoxidase-Antikörper, der von VÖLKL et al. (1988) charakterisiert wurde. Nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper (GaR-IgG-HRP) erfolgte die Detektion der Immunkomplexe mit Hilfe des ECL-Systems und abschließend die Quantifizierung der Intensität der immunreaktiven Banden (siehe Abschnitt 4.1.). Uratoxidase, die sich in den kristallinen Cores von Peroxisomen der Rattenleber befindet und durch Waschschrte nicht aus den Peroxisomen entfernt wird (VÖLKL et al. 1988), diente als Marker für die Identifikation von an Mikrotubuli gebundenen Peroxisomen. Als Kontrolle diente die Bestimmung der Bindung von Peroxisomen in Versuchsansätzen ohne Mikrotubuli. Zudem wurde die Bindung an nicht polymerisiertes Tubulin (Verzicht auf Taxol

und GTP, Inkubation bei Raumtemperatur) ermittelt und überprüft, ob isolierte peroxisomale Cores (0,1 mg Protein/ml) an Mikrotubuli binden.

Von den Werten, die für die Bindung der Peroxisomen in Wells mit Mikrotubuli erhalten wurden, wurde die unspezifische Bindung (Bindung in Wells ohne Mikrotubuli) subtrahiert. Daraus errechnet sich die spezifische Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.

In weiteren Versuchen wurden verschiedene Mengen isolierter Uratoxidase auf SDS-Gele aufgetragen (0; 3,3; 10; 33; 100 ng/Tasche). Nach SDS-PAGE, Western-Blotting, Immuninkubation mit Antikörpern gegen Uratoxidase, ECL-Reaktion, Exposition von Röntgenfilmen und densitometrischer Quantifizierung der immunreaktiven Banden wurde überprüft, ob die Intensität der Banden proportional zur Uratoxidase-Konzentration war.

3.7.2. Optimierung der Assaybedingungen

Der in Abschnitt 3.7.1. beschriebene standardisierte *in vitro* Bindungsassay ist das Resultat der Optimierung der Assaybedingungen. Das Ziel der Optimierung der Assayparameter war es, eine hohe spezifische Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mit möglichst niedriger Streuung von parallelen Ansätzen zu erreichen, sowie unspezifischen Bindungen (z.B. an die Oberfläche der Mikrotiterplatten) so gering wie möglich zu halten. Jedoch sollte unter Standardbedingungen die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli nicht nahe der Sättigung sein, da sonst der Effekt von zum Assay zugegebenen Substanzen, die die Bindung stimulieren, nicht oder nur schwer erfaßt werden kann. Neben der Anzahl der Waschschritte und der Caseinkonzentration wurden insbesondere folgende Parameter variiert: die Konzentration der eingesetzten Peroxisomen (0; 0,01; 0,033; 0,1; 0,25 und 0,5 mg Protein/ml), die Tubulinkonzentration (0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 0,75 mg Protein/ml), die Dauer der Inkubation (0; 5; 15; 30; 60 und 90 Minuten), die Temperatur, bei der der Assay durchgeführt wurde (15; 25; 35; 45 und 55°C) und der pH-Wert des Assaypuffers (pH 6,4; pH 6,9; pH 7,4 und pH 7,9).

3.8. Modifikationen des *in vitro* Bindungsassays

Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu untersuchen, wurde das Standardprotokoll des Bindungsassays modifiziert.

3.8.1. Zugabe von freien Mikrotubuli und von PMP-26-Antikörpern

Der Bindungsassay wurde dem Standardprotokoll (siehe Abschnitt 3.7.1.) entsprechend ausgeführt, abgesehen von folgenden Änderungen: die Peroxisomenpräparationen wurden mit frisch polymerisierten Mikrotubuli (1 mg Protein/ml) bzw. mit PMP-26-Antikörpern (0,1 mg Protein/ml; siehe LÜERS et al. 1990) 10 Minuten lang vorinkubiert.

3.8.2. Zugabe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)

Den Peroxisomenansätzen wurden a) MAP2 (50 µg/ml), b) TAU (50 µg/ml), c) MAP-Fraktion (50 µg/ml) und d) ATP-Release-Fraktion (50 µg/ml) zugefügt, unmittelbar bevor sie im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt wurden. Bei der ATP-Release-Fraktion handelt es sich um cytosolische Proteine, die mit Mikrotubuli cosedimentieren und anschließend durch ATP-Zugabe von den Mikrotubuli abgelöst werden. Die ATP-Release-Fraktion, die freundlicherweise von Prof. Dr. T.A. Schroer (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt wurde, ist eine Mischung aus MAPs und Motorproteinen.

3.8.3. Zugabe von Motorproteinen

Den Peroxisomenansätzen wurden a) Kinesin (50 µg/ml), b) Dynein (50 µg/ml) und c) Dynactin (50 µg/ml) zugefügt, unmittelbar bevor sie im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt wurden.

3.8.4. Zugabe von CLIP-115

Den Peroxisomenansätzen wurden verschiedene Konzentrationen von GST-CLIP-115 (0,5; 2; 5; 10 und 20 µg Protein/ml) zugefügt, unmittelbar bevor sie im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt wurden. GST-CLIP-115 ist ein Fusionsprotein bestehend aus Glutathion-S-Transferase und dem N-Terminus von CLIP-115 (Aminosäuren 1 – 333, siehe auch HOOGENRAAD et al. 2000), der die beiden Mikrotubuli-Bindungsdomänen beinhaltet. Zur Aufreinigung von GST-CLIP-115 aus bakteriellem Zellysat, das freundlicherweise von Dr. N. Galjart (Universität Rotterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde, siehe Abschnitt 3.11.5.. Als Kontrollen dienten Peroxisomenansätze, denen GST (5 µg Protein/ml) und bakterielles Zellysat (5 µg Protein/ml) zugefügt wurden.

3.8.5. Zugabe von ATP, ADP und ATP-Analoga sowie ATP-Depletion

Den Peroxisomenansätzen wurden a) ATP (2 mM), b) ATP (2 mM) + Kreatinphosphat (13,3 mM) + Kreatinkinase (13,3 U/ml), c) ADP (2 mM), d) ATP-γ-S (2 mM), e) AMP-PNP (2 mM) und f) das ATP-depletierende System Glucose (10 mM) + Hexokinase (15 U/ml) zugefügt, unmittelbar bevor sie im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt wurden.

3.8.6. Zugabe einer Kinase, eines Kinaseinhibitors und eines Phosphataseinhibitors in Verbindung mit ATP bzw. ohne ATP

Den Peroxisomenansätzen wurden a) ATP (2 mM), b) ATP (2 mM) + Proteinkinase (katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Schweineherz; 125 U/ml), c) ATP (2 mM) + Proteinkinase (125 U/ml) + Staurosporin (100 nM), d) ATP (2 mM) + Staurosporin (100 nM), e) Proteinkinase (125 U/ml) + Staurosporin (100 nM), f) Staurosporin (100 nM), g) Proteinkinase (125 U/ml), h) Okadarsäure (1 µM) und i) Okadarsäure (1µM) + ATP (2 mM) zugefügt, unmittelbar bevor sie im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt wurden.

3.8.7. Einsatz vorbehandelter Peroxisomen

Im Bindungsassay wurden neben unbehandelten Kontrollperoxisomen auch Peroxisomen eingesetzt, die mit Trypsin, mit Proteinase K, mit NEM oder mit verschiedenen KCl-Konzentrationen behandelt wurden. Die Endkonzentration aller Peroxisomenpräparationen im Assay betrug jeweils 0,1 mg Protein/ml. Die Vorbehandlung der Peroxisomen ist im Abschnitt 3.2. beschrieben.

3.8.8. Zugabe von Cytosol und vorbehandeltem Cytosol

Den Peroxisomenansätzen wurden unbehandeltes Cytosol, mit Trypsin behandeltes Cytosol, mit Proteinase K behandeltes Cytosol und mit NEM behandeltes Cytosol zugefügt, unmittelbar bevor sie im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay eingesetzt wurden. Die Endkonzentration der Cytosolansätze im Assay betrug jeweils 5 mg Protein/ml mit Ausnahme der Cytosol-

Konzentrationsreihe, bei der zusätzlich Konzentrationen von 1, 2,5 und 10 mg Protein/ml ausgetestet wurden. Die Vorbehandlung des Cytosols ist in Abschnitt 3.3. beschrieben.

3.8.9. Vorinkubation mit Cytosol

Abweichend vom Standard-Bindungsassay wurde für diesen Versuch ein zusätzlicher Inkubationsschritt eingeschoben. Nach dem Waschschrift, der auf das Blocken mit Casein folgt, wurden die Wells für 40 Minuten mit 40 µl Cytosol (5 mg Protein/ml) inkubiert. Dann wurde einmal mit 50 µl pro Well P/G/T-Puffer gewaschen, um nicht an die Mikrotubuli gebundene cytosolische Komponenten zu entfernen. Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation mit den Peroxisomen-Präparationen.

3.8.10. Zugabe von KCl-Eluat

Zu den Peroxisomenansätzen wurde unmittelbar vor deren Einsatz im Bindungsassay dialysiertes KCl-Eluat (jeweils 30 µl pro Well) zugegeben. Als Kontrolle diente das Eluat von Peroxisomen, die statt mit 0,1 M KCl mit Homogenisationspuffer inkubiert wurden.

3.8.11. Zugabe von fraktioniertem KCl-Eluat

Der Einfluß von fraktioniertem KCl-Eluat (für die Fraktionierung siehe Abschnitt 3.11.2.) auf die Peroxisomen-Mikrotubuli Bindung wurde durch Zugabe der Superdex-200 Fraktionen des KCl-Eluates (jeweils 30 µl pro Well) zu den Peroxisomenansätzen unmittelbar vor deren Einsatz im Bindungsassay getestet.

3.8.12. Zugabe von Antikörpern

Der stimulierende Einfluß von fraktioniertem KCl-Eluat auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wurde weiter untersucht. Dazu erfolgte die 30-minütige Vorinkubation der Superdex-200 Fraktion 38 des KCl-Eluates mit CLIP-spezifischen Antikörpern, bevor dieses Gemisch zum Peroxisomenansatz, unmittelbar vor dessen Einsatz im Bindungsassay, gegeben wurde. Folgende CLIP-Antikörper wurden eingesetzt:

- a) 0,5 µl pro Well NCLIP-115, ein Antikörper gegen den N-Terminus von CLIP-115 (DE ZEEUW et al. 1997).
- b) 2 µl pro Well MTCLIP-1, ein Mausantiserum gegen das synthetische Peptid GVLEDEPLG-KNDG, ein hochkonservierter Abschnitt der Mikrotubuli-Bindungsdomäne von CLIPs.

Als Kontrolle für das MTCLIP-1 Mausantiserum wurden 2 µl pro Well des entsprechenden Präimmunsersums eingesetzt.

3.8.13. Zugabe von immundepletiertem KCl-Eluat und fraktioniertem KCl-Eluat

Weiterhin wurden das dialysierte KCl-Eluat und eine Superdex-200 Fraktion des KCl-Eluates mittels Protein A-Sepharose Immunpräzipitation depletiert (siehe Abschnitt 3.4.3.). Hierfür wurde das MTCLIP-1-Immunsersum (siehe Abschnitt 3.8.12.) verwendet und das entsprechende Präimmunsersum diente als Depletionskontrolle. 20 µl pro Well des so depletierten KCl-Eluates und 30 µl pro Well der so depletierten Fraktion 38 des KCl-Eluates wurden den Peroxisomen-Präparationen zugefügt, unmittelbar bevor sie in den Bindungsassay eingesetzt wurden.

3.9. Gelelektrophorese

Zur Untersuchung von verschiedenen Proteinproben, u.a. aus der Zellfraktionierung, vom biochemischen Bindungsassay und von der chromatographischen Auftrennung von Proteinen, wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes der Proben wurden diese mit Probenpuffer (60 mM Tris, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol, pH 6,8) im Verhältnis 1:1 (bzw. 1:2 bei Proben mit geringem Proteingehalt) gemischt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Minigele (85 × 55 × 1 mm) und verlängerte Minigele (85 × 75 × 1 mm) wurden selbst gegossen (für die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen.

	Trenngele			Sammelgel
% Polyacrylamid	7,5 %	10 %	12,5 %	5 %
Destilliertes Wasser	2,575 ml	2,1 ml	1,65 ml	1,95 ml
30 % Acrylamid /				
0,8 % Bisacrylamid	1,375 ml	1,85 ml	2,3 ml	0,555 ml
2 M Tris, pH 8,8	1,45 ml	1,45 ml	1,45 ml	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	-	-	0,75 ml
10 % APS	40 μ l	40 μ l	40 μ l	30 μ l
10 % SDS	60 μ l	60 μ l	60 μ l	30 μ l
TEMED	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l

Zusätzlich zum Auftragen von 2 – 25 μ l der mit Probenpuffer gekochten Proteinproben, wurde zur späteren Bestimmung des Molekulargewichtes der Polypeptidbanden bei jedem Gel mindestens ein Molekulargewichtsstandard (siehe Tabelle 3) aufgetragen. Nach dem Auftragen wurden die Proteine unter Verwendung von Tris-Glycin-SDS-Puffer (0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde eine Stromstärke von 15 mA für das Sammeln der Polypeptide im Sammelgel und von 25 mA für deren Trennung im Trenngel appliziert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des „high range“ und des „low range“ Molekulargewichtsstandards von Bio-Rad.

Molekulargewicht	Protein	„high range“	„low range“
200 kDa	Myosin	×	
116,3 kDa	β -Galaktosidase	×	
97,4 kDa	Phosphorylase B	×	×
66,2 kDa	Rinderserumalbumin	×	×
45 kDa	Ovalbumin	×	×
31 kDa	Karboanhydrase		×
21,5 kDa	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor		×
14,4 kDa	Lysozym		×

3.10. Western-Blotting, Dot-Blots, Immuninkubation und Detektion der Immunkomplexe

Zum spezifischen Nachweis von bestimmten Proteinen (z.B. Uratoxidase), erfolgte nach der Gelelektrophorese der zu untersuchenden Proteinproben zunächst das Blotten des Gels zum Transfer der Proteine auf eine Membran. Den Immuninkubationen der Membran mit den jeweiligen Antikörpern schloß sich die Detektion der Immunkomplexe mittels Chemilumineszenz an.

3.10.1. Western-Blotting und Immuninkubation

Nach der SDS-PAGE wurden die Polypeptide vom Gel elektrophoretisch im „Semi-dry“-Verfahren auf eine Immobilon-P Membran übertragen. Das 30-minütige Blotten wurde bei einer Stromstärke von 150 mA unter Verwendung des kurz zuvor entgasteten Blotpuffers (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) durchgeführt. Danach wurde die Membran mit PBS-Tween Puffer (137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,66 mM NaH₂PO₄, 9,58 mM Na₂HPO₄, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) gewaschen (2 × 5 Minuten, 3 × 10 Minuten) und anschließend die unspezifischen Bindungstellen der Membran mit 0,2 % BSA-c für 1 Stunde abgesättigt. Nach Waschen mit PBS-Tween Puffer (3 × 5 Minuten) folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2,5 Stunden bzw. über Nacht und erneutes Waschen mit PBS-Tween Puffer (2 × 5 Minuten, 3 × 10 Minuten). Danach schloß sich die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde und, nach dem Waschen mit PBS-Tween Puffer (2 × 5 Minuten, 3 × 10 Minuten), die Detektion der Banden mittels Chemilumineszenz (siehe Abschnitt 3.10.4.) an. Folgende Antikörper wurden eingesetzt (siehe auch Tabelle 1, Seite 27):

Primärantikörper:

- UOx
- β -Tubulin
- NCLIP-115
- CLIP-170
- MTCLIP-1
- MTCLIP-2
- MTCLIP-3

Sekundärantikörper:

- GaR-IgG-HRP
- RaM-IgG-HRP

3.10.2. Dot-Blots

Zur Überprüfung der Antigenizität von Antiseren aus verschiedenen Blutungen von Mäusen und Kaninchen, die mit an KLH-gekoppelten Peptiden immunisiert wurden (MTCLIP-1, MTCLIP-2 und MTCLIP-3, siehe auch Tabelle 4), wurden Dot-Blots durchgeführt. Dazu wurden auf nicht gewässerte Nitrozellulosemembranen jeweils 10 μ l verschiedener Verdünnungen des freien Peptids und des an KLH-gekoppelten Peptids direkt aufgetropft. Die Lösungen wurden komplett eingetrocknet und die folgenden Immuninkubationen wurden nach dem gleichen Protokoll, wie es auch für Western-Blots angewendet wurde (siehe oben), durchgeführt. Als Kontrollen für die Inkubation mit den Immunsereen dienten Inkubationen mit den entsprechenden Präimmunsereen.

3.10.3. Tubulin-Overlay-Blots

Um festzustellen, welche Proteine mit Tubulin interagieren, wurden Tubulin-Overlay-Blots durchgeführt. Verschiedene Proteinproben (peroxisomale Präparationen, KCl-Eluat, fraktioniertes KCl-Eluat) wurden auf SDS-Gele aufgetragen. Nach der SDS-PAGE, Western-Blotting und dem Absättigen der Blotmembranen mit BSA-c, wurden diese für 2 Stunden mit 0,66 mg/ml Tubulin inkubiert. Anschließend folgte – analog zur Immuninkubation nach Western-Blotting (siehe Abschnitt 3.10.1.) – die Inkubation mit einem Maus-anti- β -Tubulin-Antikörper für 1,5 Stunden, danach die Inkubation mit dem Meerettichperoxidase-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper (RaM-IgG-HRP) für 1 Stunde und nach der ECL-Reaktion die Detektion der immunreaktiven Banden.

3.10.4. Detektion der Immunkomplexe mittels Chemilumineszenz

Die Immunkomplexe wurden mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Dazu wurden je 2 ml der beiden ECL-Reagenzien gemischt und die Blotmembran darin für 1 Minute inkubiert. In der Dunkelkammer wurde der feuchte Blot in eine Folie gelegt, in einer Kassette ein Röntgenfilm aufgelegt und – entsprechend der Intensität der Chemilumineszenz – für 10 Sekunden bis 30 Minuten exponiert. Die exponierten Filme wurden 2 Minuten gewässert, für 4 Minuten in den Entwickler (D-19 Entwickler, 1:2 mit Wasser verdünnt) gegeben, kurz gewässert, 10 Minuten in der Fixierlösung (Allfix, 1:8 mit Wasser verdünnt) inkubiert und nach 10-minütigem Wässern getrocknet.

3.10.5. „Strippen“ von Blotmembranen

Blotmembranen, die bereits für eine Immuninkubation mit anschließender Detektion der Immunkomplexe mittels der ECL-Technik benutzt wurden, konnten für weitere Immuninkubation mit anderen Primäantikörpern benutzt werden. Dazu wurden die Antikörperkomplexe mit Stripping-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, in 62,5 mM Tris, pH 6,7) von den Blotmembranen entfernt. Die Membranen wurden 3×20 Minuten bei 52°C unter Schwenken im Hybridisierungssofen mit Stripping-Puffer und dann 3×15 Minuten mit PBS/Tween Puffer (137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 1,66 mM NaH_2PO_4 , 9,58 mM Na_2HPO_4 , 0,05 % Tween 20, pH 7,4), ebenfalls bei 52°C , inkubiert. Anschließend wurde eine neue Immuninkubation mit den gewünschten Primäantikörpern durchgeführt, gefolgt von den in Abschnitt 3.10.1. beschriebenen Inkubationsschritten und der Detektion mit Hilfe des ECL-Systems. Dieses sogenannte „Strippen“ der Blotmembranen konnte mehrfach (bis zu 8 mal) wiederholt werden. Nach Abschluß der Detektion wurden die Blotmembranen bei -20°C gelagert und konnten zum gewünschten Zeitpunkt wieder aufgetaut, gestriipt und für weitere Immuninkubationen verwendet werden.

3.11. Chromatographische Methoden

Verschiedene chromatographische Methoden wurden durchgeführt, um die Proteine des Eluates KCl-behandelter Peroxisomen zu identifizieren, die die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli steigern. Weitere Chromatographien dienten der Entsalzung von Proteinproben und der Aufreinigung eines Fusionsproteines aus bakteriellem Zellysat.

3.11.1. Chromatographiesysteme

Die hier beschriebenen Chromatographien wurden entweder mit der BioLogic LP Niederdruckanlage von Bio-Rad oder dem FPLC-System von Pharmacia durchgeführt. Die Bio-Rad Anlage umfaßt, neben der Kontrolleinheit mit Pumpe, eine optische Meßzelle, eine Leitfähigkeitsmeßzelle, das SV-5 Ventil zum automatischen Probenauftrag und zur Kontrolle von bis zu 5 Puffern, einen Gradientenmischer und den Fraktionssammler Modell 2128. Die Überwachung und Auswertung der Chromatographien erfolgte am Computer mittels der LP Data View Software. Das System von Pharmacia beinhaltet die Steuerungseinheit LCC-500, zwei P-500 Pumpen, die peristaltische Pumpe P-1, zwei MV 8 Ventile, ein MV 7 Ventil, den Monitor UV-1 (optische Meßzelle für die Wellenlängen 254 nm, 280 nm und 405 nm) und den Fraktionssammler FRAC-100. Das vom UV-1 Monitor bei 254 nm detektierte Proteinsignal wird vom Zweikanalschreiber REC 112 aufgezeichnet.

Beide Systeme wurden unter vergleichbaren Bedingungen (z.B. gleiche Flußrate, gleiche Puffer und der Einsatz der gleichen Säulen) betrieben und lieferten vergleichbare Ergebnisse. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Chromatographien bei 6°C durchgeführt.

3.11.2. Gelfiltration

Das KCl-Eluat, das dem Überstand nach der Zentrifugation der mit 0,1 M KCl behandelten Peroxisomen entspricht (siehe Abschnitt 3.2.), enthält Proteine, die für die *in vitro* Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli eine Rolle spielen. Um diese Proteine zu identifizieren, wurde zunächst das KCl-Eluat mit einer Superdex-200 Säule aufgetrennt. Dazu wurden 5 ml KCl-Eluat auf die Säule aufgetragen und 50 mM Natriumphosphat-Puffer (9,8 mM NaH_2PO_4 , 40,2 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) als Laufpuffer bei einer Flußrate von 1 ml/min verwendet. Fraktionen von 1 ml wurden gesammelt und bei -20°C gelagert. Diese Fraktionen wurden in den Bindungsassay eingesetzt (siehe Abschnitt 3.8.10.) und mittels Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt. Das Bandenmuster der Fraktionen wurde mit silbergefärbten SDS-Gelen dargestellt.

3.11.3. Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurden 1 ml HiTrap NHS-aktivierte Säulen von Pharmacia verwendet. Alle Schritte wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min ausgeführt.

3.11.3.a Herstellung von Affinitätssäulen

Zunächst wurde das Isopropanol, mit dem die neuen NHS-aktivierten Säulen geliefert wurden, mit 6 ml eiskalter 1 mM HCl ausgewaschen. Zur Kopplung von Peptiden oder Antikörpern an die Säulen wurde der gewünschte Ligand in Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,3) gelöst und dann 1 ml davon auf die Säulen aufgetragen, die Säulen versiegelt und für 30 Minuten stehen gelassen. In den Fällen, wo das auf die Säulen aufzutragende Volumen 1 ml

überstieg, wurden die Ligandenlösungen für 30 bis 60 Minuten bei einer Flußrate von 1 ml/min zirkulierend über die Säulen gepumpt. Anschließend wurden zur Deaktivierung von überschüssigen aktiven Gruppen, an denen kein Ligand gebunden wurde, folgende Schritte durchgeführt: Auftragen von 6 ml Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3), Auftragen von 6 ml Puffer B (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl, pH 4), Auftragen von 6 ml Puffer A, Säule ruhen lassen für 30 Minuten, Auftragen von 6 ml Puffer B, Auftragen von 6 ml Puffer A und Auftragen von 6 ml Puffer B. Nach dem Auftragen von 2 ml neutralem Laufpuffer (10 mM Tris, pH 7,5) waren die Affinitätssäulen einsatzbereit. Gelagert wurden die Säulen mit Lagerungspuffer (Laufpuffer + 0,05 % NaN₃) bei 4°C. Alle Schritte der Herstellung von Affinitätssäulen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.11.3.b Bestimmung der Kopplungseffizienz

Die Effizienz der Kopplung von Peptiden bzw. Antikörpern an die Säulen wurde errechnet. Dazu wurde zunächst eine Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 3.5.) von den aufgetragenen Peptid-/Antikörperlösungen und den Wascheluat nach Inkubation der Säule mit den Peptid-/Antikörperlösungen durchgeführt. Aus den so ermittelten Proteinmengen für die aufgetragene Menge an Peptiden/Antikörpern und dem Verlust von Peptiden/Antikörpern durch das anschließende Waschen lassen sich mit folgender Gleichung die Kopplungseffizienzen berechnen:

$$\text{Kopplungseffizienz [\%]} = \frac{(\text{aufgetragene Proteinmenge} - \text{Proteinverlust im Wascheluat})}{\text{aufgetragene Proteinmenge}} \times 100$$

Die Kopplungseffizienz lag bei allen hergestellten Peptid- und Antikörpersäulen (siehe unten) über 90 %.

3.11.3.c Durchführung der Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurden folgende Puffer benötigt:

- Puffer A: 10 mM Tris, pH 7,5
- Puffer B: 10 mM Tris, pH 8,8
- Puffer C: 100 mM Glycin, pH 2,5
- Puffer D: 100 mM Triethylamin, pH 11,5
- Puffer E: 10 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5

Zur Äquilibrierung der mit Peptiden bzw. mit Antikörpern gekoppelten Säulen (siehe oben), wurden nacheinander folgende Puffer über die Säule gepumpt: 10 ml Puffer A, 10 ml Puffer C, 10 ml Puffer B, 10 ml Puffer D und 10 ml Puffer A. Danach folgte die Inkubation der Säulen mit den Antiseren bzw. dem KCl-Eluat oder dem fraktionierten KCl-Eluat. Dazu wurden die Antiseren, die vorher zur Entfernung von Zelltrümmern 10 Minuten bei 4°C und 10000 g mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert wurden, 1:10 mit Puffer A verdünnt und das KCl-Eluat wurde 1:5 mit Puffer A verdünnt. 10 bis 30 ml der verdünnten Lösungen wurden für 30 bis 90 Minuten bei einer Flußrate von 1 ml/min zirkulierend über die Säulen gepumpt (die Lösungen sollten die Säulen dreimal passieren). Anschließend wurden die Säulen mit 20 ml Puffer A und 20 ml Puffer E gewaschen, um Proteine, die sich unspezifisch an die Säulenmatrix bzw. an die daran gekoppelten Peptide oder Antikörper anlagerten, zu entfernen. Die Elution

der spezifisch gebundenen Proteine bzw. Antikörper erfolgte zunächst bei saurem pH-Wert mit 10 ml Puffer C (pH 2,5) und dann, nach Äquilibrieren der Säule mit 10 ml Puffer B, bei alkalischem pH-Wert mit 10 ml Puffer D (pH 11,5). Die eluierenden Proteine bzw. Antikörper wurden in Fraktionen von 1,8 ml gesammelt und zum Neutralisieren des pH-Wertes mit jeweils 0,2 ml 1 M Tris, pH 8 gemischt. Die so erhaltenen affinitätsgereinigten Antikörper- und Proteinfraktionen wurden nach dem Vereinigen der sauren und basischen Elutionen für weitere Untersuchungen verwendet (siehe unten). Die Säulen wurden abschließend mit 10 ml Puffer A gewaschen und dann erneut benutzt oder mit Puffer A + 0,05 % NaN_3 gespült und bei 4°C gelagert. Alle Schritte der Affinitätschromatographie wurden bei 6°C durchgeführt.

3.11.3.d Generieren von Antikörpern für die Affinitätschromatographie

Bei den Proteinen des KCl-Eluates, die für die *in vitro* Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli eine Rolle spielen, könnte es sich um Mitglieder der CLIP-Proteinfamilie handeln (siehe Kapitel V. Abschnitt 3.2.). Daher sollte überprüft werden, ob sich aus dem fraktionierten KCl-Eluat mit Hilfe von Affinitätssäulen, an denen Antikörper gegen CLIP-Sequenzen gebunden sind, die bindungswirksamen Proteine isolieren lassen. Zunächst wurden geeignete Peptidsequenzen mit Hilfe des BlastP-Programmes (siehe Abschnitt 4.4.) ausgewählt. Die Wahl fiel auf zwei Peptidsequenzen aus den Mikrotubuli-Bindungsdomänen, die bei den bisher bekannten CLIPs (u.a. CLIP-170, CLIP-115, D-CLIP-190) hochkonserviert sind. Die Peptidantikörper gegen diese beiden Peptidsequenzen wurden von den Firmen Eurogentec und Pineda generiert. Dabei wurden die Peptide an das Trägerprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt und zur Immunisierung in die Tiere injiziert (siehe Tabelle 4). Die Überprüfung der Antigenizität der Antiseren aus verschiedenen Blutungen erfolgte mittels Peptid-Dot-Blots, und die Markierung von Proteinen des KCl-Eluates und von fraktioniertem KCl-Eluat wurde mit Immunoblots nachgewiesen. Die Antiseren aus den Blutungen mit der besten Antigenizität wurden für die Herstellung der Affinitätssäulen verwendet.

Tabelle 4: Antikörper für die Affinitätschromatographie. Übersicht über die für die Affinitätschromatographie von KCl-Eluat eingesetzten affinitätsgereinigten Peptidantikörper unter Angabe der Peptidsequenz, gegen die die Antikörper gerichtet sind, der immunisierten Tiere und der beauftragten Firmen.

Antikörper	Peptidsequenz	Tier	Hersteller
MTCLIP-1	GVELDEPLGKNDGC	Maus	Eurogentec, Belgien
MTCLIP-2	ETDFAKGEWC	Maus	Eurogentec, Belgien
MTCLIP-3	GVELDEPLGKNDGC	Kaninchen	Pineda, Berlin

3.11.3.e Affinitätschromatographie von Antiseren

Für die Affinitätsreinigung der 3 Antiseren (siehe Abschnitt 3.11.3.d) wurden 2 verschiedene Peptid-Affinitätssäulen hergestellt (für die Durchführung siehe Abschnitt 3.11.3.a). Eine Säule wurde mit dem Peptid mit der Sequenz ETDFAKGEWC gekoppelt und eine zweite Säule wurde mit dem Peptid mit der Sequenz GVELDEPLGKNDGC gekoppelt. Diese Peptidsequenzen sind identisch mit den Peptiden, die an ein Trägerprotein gekoppelt und zur Immunisierung in Mäuse und Kaninchen injiziert wurden (siehe Tabelle 4). Die Affinitätsreinigung wurde entsprechend dem in Abschnitt 3.11.3.c beschriebenen Protokoll durchgeführt, und die so erhal-

tenen affinitätsgereinigten Antikörper wurden für die Herstellung weiterer Affinitätssäulen verwendet (siehe unten).

3.11.3.f Affinitätschromatographie von KCl-Eluat

Für die Affinitätsreinigung von KCl-Eluat wurden 3 verschiedene Affinitätssäulen hergestellt. Die Kopplung der 3 in Tabelle 4 aufgeführten affinitätsgereinigten Antikörper an jeweils eine Säule erfolgte gemäß dem in Abschnitt 3.11.3.a beschriebenen Protokoll. Für die Affinitätsreinigung von KCl-Eluat bzw. von fraktioniertem KCl-Eluat mit diesen Antikörpersäulen wurde das in Abschnitt 3.11.3.c aufgeführte Protokoll angewendet. Die so erhaltenen Proben wurden umgepuffert, eingeengt und dann in den Bindungsassay eingesetzt, sowie für SDS-PAGE-Gele mit anschließender Silberfärbung verwendet.

3.11.4. Entsalzung

Zum Umpuffern von Proteinproben wurden 5 ml HiTrap Entsalzungssäulen von Pharmacia unter Verwendung der Niederdruckanlage von Bio-Rad benutzt. Dabei diente der Puffer, in den die Proteinprobe umgepuffert werden sollte, als Laufpuffer. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Laufpuffer äquilibriert, danach wurden 1,5 ml Probe, bzw. mit Laufpuffer verdünnte Probe, aufgetragen und die Proteinprobe mit 10 ml Laufpuffer eluiert. Die Elution der Proteine wurde mit dem UV-Monitor überwacht, während die Änderung der Leitfähigkeit die Elution des Ausgangspuffers der Proteinprobe markierte. Die eluierende Proteinprobe wurde gesammelt und für weitere Untersuchungen (z.B. für den Bindungsassay) verwendet.

3.11.5. Aufreinigung von CLIP-115-Fusionsprotein

Konzentriertes bakterielles Zellysats mit überexprimiertem GST-CLIP-115-Fusionsprotein wurde freundlicherweise von Dr. N. Galjart (Erasmus Universität Rotterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Zur Aufreinigung von GST-CLIP-115 wurde eine Glutathion-Sepharose 4B-Säule von Pharmacia mit einem Bettvolumen von 1 ml verwendet und die einzelnen Schritte entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach dem Waschen der Säule mit 20 ml PBS-Puffer (150 mM NaCl, 4 mM NaH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, pH 7,3), wurde die Säule mit 6 ml PBS-Puffer + 1 % Triton X-100 äquilibriert. Anschließend wurden 0,75 ml des bakteriellen Zellysates zentrifugiert, um größere Zellfragmente zu entfernen, das Zellysats mit 0,75 ml PBS-Puffer + 1 % Triton X-100 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nachdem 1 ml Lösung aus der Säule ausgetreten war, wurde die Säule verschlossen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wurde mit 2 × 10 ml PBS-Puffer gewaschen und dann das an die Säule gebundene Fusionsprotein mit 10 ml Elutionspuffer (5 mM Glutathion in 50 mM Tris, pH 8,0) eluiert. Das eluierende GST-CLIP-115 wurde gesammelt und dessen Reinheit mittels eines Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Geles überprüft. Mit einer Entsalzungssäule (siehe oben) wurde das GST-CLIP-115 in Homogenisationspuffer (250 mM Saccharose, 5 mM MOPS, 0,1 % Ethanol, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 1 mM 6-Aminocapronsäure, 5 mM Benzamidin, 10 µg/ml Leupeptin, 0,2 mM DTT, pH 7,4) umgepuffert und nach der Proteinbestimmung in den Bindungsassay eingesetzt (siehe Abschnitt 3.8.4.).

3.12. Färben und Trocknen von Gelen

Zur Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Polypeptidbanden wurden die Gele nach Durchführung der SDS-PAGE angefärbt. Die nachfolgend beschriebenen Färbeprotokolle zeichnen sich durch ihre unterschiedliche Sensitivität aus. So wurde die Coomassie-Färbung für Gele eingesetzt, bei denen größere Proteinmengen ($\geq 1 \mu\text{g}$ Protein pro Geltasche) aufgetragen wurden, während Silberfärbungen bei Gelen mit geringeren Proteinmengen und bei bereits geblohteten Gelen durchgeführt wurden.

3.12.1. Coomassie-Färbung

Für die Coomassie-Färbung wurden die Gele nach der Elektrophorese für 30 Minuten mit Färbelösung (0,5 % Coomassie Brilliant Blau G-250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert. Das Entfärben mit 40 % Methanol / 10 % Essigsäure unter mehrfachem Wechseln des Entfärbers wurde solange durchgeführt, bis der Hintergrund der Gele klar war. Anschließend wurden die Gele mehrere Stunden gewässert.

3.12.2. Für IEF-Gele modifizierte Silberfärbung

Diese Silberfärbung (aus dem Boehringer Ingelheim Elektrophoresehandbuch) zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Der ersten Fixierung für 20 Minuten mit 20 % Trichloressigsäure und nachfolgendem Waschen für 10 Minuten mit 30 % Ethanol folgte eine zweite Fixierung mit 10 % Glutardialdehyd für 10 Minuten. Anschließend wurden die Gele zweimal für je 10 Minuten mit 30 % Ethanol gewaschen und danach für 1 Minute mit 0,02 % Natriumthiosulfat inkubiert. Dem dreimaligen Spülen der Gele mit destilliertem Wasser für jeweils 20 Sekunden folgte die 20-minütige Inkubation mit Färbelösung (0,2 % Silbernitrat, 0,028 % Formaldehyd) und zweimaliges Spülen mit destilliertem Wasser für jeweils 20 Sekunden. Danach wurde der Entwickler (6 % Natriumcarbonat, 0,01 % Natriumthiosulfat, 0,019 % Formaldehyd) so lange auf den Gelen belassen, bis die gewünschte Anfärbung der Banden erreicht wurde. Der Inkubation mit 10 % Essigsäure für 5 Minuten schloß sich das mehrfache Waschen mit destilliertem Wasser an. Die Gele wurden bis zum Trocknen in destilliertem Wasser gelagert.

3.12.3. Silberfärbung nach Shevchenko

Die Silberfärbung nach SHEVCHENKO et al. (1996) ist zwar nicht so sensitiv wie die oben aufgeführte Silberfärbung, hat aber den Vorteil, deutlich weniger gelbliche Hintergrundfärbung zu verursachen. Zunächst erfolgte die Fixierung der Gele für 1 Stunde mit 45 % Methanol / 5 % Essigsäure. Zum Auswaschen von SDS und Essigsäure wurde mit destilliertem Wasser über Nacht gewaschen und das Wasser mehrmals gewechselt. Der Sensitivierung mit 0,02 % Natriumthiosulfat für 2 Minuten und anschließendem zweimaligen Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 1 Minute folgte die Silberimprägnierung mit kalter 0,1 % Silbernitratlösung bei 4°C für 40 Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 1 Minute, wurden die Gele zur Entwicklung der Banden mit einer 2 % Natriumcarbonat- / 0,04 % Formaldehydlösung inkubiert. Nach dem eventuellen Auftreten von braunen Schlieren in der Lösung, wurde gegebenenfalls der Entwickler durch frischen Entwickler ersetzt. Bei Erreichen der gewünschten Färbungsintensität der Banden, wurde die Entwicklung mit 5 % Essigsäure gestoppt. Nach 10 Minuten wurde diese Lösung durch 1 % Essigsäure ersetzt und die Gele nach 1 Stunde Inkubationszeit mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gele wurden bis zum Trocknen in destilliertem Wasser gelagert.

3.12.4. Färbung mit dem „Colloidal Blue Staining Kit“

Eine im Vergleich zur Coomassie-Färbung 5-fach sensitivere Methode ist die Färbung mit dem „Colloidal Blue Staining Kit“. Die Gele wurden nach der Elektrophorese über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung besteht aus 55 ml destilliertem Wasser, 20 ml Methanol, 5 ml „Stainer B“ und 20 ml „Stainer A“. Das Entfärben der Gele erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 7 Stunden unter mehrfachem Wechseln von destilliertem Wasser. Gelagert wurden die Gele bis zum Trocknen in destilliertem Wasser.

3.12.5. Trocknen von Gelen

Nach ausführlichem Wässern der Gele wurden diese luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser eingeweichten Bögen Einmachhaut auf eine Glasplatte gespannt. Das Trocknen erfolgte über Nacht.

4. Datenverarbeitung und Statistik

4.1. Digitalisieren von Gelen, Blots und Negativen sowie Quantifizierung von Blots

Getrocknete und gefärbte Polyacrylamidgele, entwickelte Röntgenfilme von Immunoblots und radioaktiven Assays sowie Negative von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden unter Verwendung der Adobe-Photoshop Software digitalisiert. Die Intensität der immunreaktiven Banden der Immunoblots wurde mit der NIH-Image Software (Version 1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) densitometrisch quantifiziert.

4.2. Digitale Bildbearbeitung

Die eingescannten Gele, Röntgenfilme und Negative wurden mit dem Programm Adobe-Photoshop bearbeitet. Beschriftungen und das Layout der in dieser Arbeit enthaltenen Abbildungen wurden mit dem Programm Adobe-Illustrator angefertigt.

4.3. Statistik

Signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen wurden mittels Varianzanalyse für ungepaarte Meßwerte mit dem Programm SigmaStat für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) untersucht. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt. Dabei werden p-Werte $< 0,05$ als signifikant und p-Werte $< 0,01$ als hochsignifikant betrachtet.

4.4. Recherche von Proteindatenbanken

Zur Ermittlung von Peptidsequenzen, die für das Generieren von Peptidantikörpern in Frage kommen (siehe Abschnitt 3.11.3.d), wurden Homologievergleiche in mehreren Proteindatenbanken (u.a. SWISSPROT, PIR) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene BLAST-Algorithmen des HUSAR-Programmes (DKFZ, Heidelberg) und des PubMed-Programmes (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) verwendet.

4.5. Verwendete Computersoftware

Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit benutzte Computersoftware gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Computersoftware.

Programm	Hersteller	Anwendung
Excel 2001	Microsoft	Erstellen von Graphiken, Tabellenkalkulation
Illustrator 9.02	Adobe	Layout von Bildern und Graphiken
InDesign 1.5	Adobe	Layout der vorliegenden Arbeit
LP Data View 1.0	Bio-Rad	Auswertung der Säulenchromatographie
NIH-Image 1.62	NIH	Quantifizierung von Proteinbanden
Photoshop 6.0	Adobe	Einscannen und digitale Bildbearbeitung
SigmaStat	SPSS Inc.	Statistik
Word 2001	Microsoft	Textverarbeitung

IV. Ergebnisse

1. Isolierung von Peroxisomen

Peroxisomen wurden mittels differentieller Zellfraktionierung aus den Lebern weiblicher SD-Ratten isoliert. Um hochreine Peroxisomen zu gewinnen, wurde eine mit Peroxisomen angereicherte Zellfraktion, bei der schwere Organellen (z.B. Zellkerne) und Zelltrümmer abgetrennt waren, auf zwei verschieden dichte Nycodenz-Kissen (spezifische Dichte: 1,346 bzw. 1,172 g/ml) aufgetragen und zentrifugiert. Dabei setzten sich an der Phasengrenze der beiden Nycodenz-Kissen hochreine Peroxisomen ab, die elektrophoretisch (SDS-PAGE) untersucht wurden. Das Muster der Polypeptidbanden im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abbildung 4) demonstriert die sehr starke Anreicherung von Peroxisomen in der isolierten Peroxisomenfraktion. Die mit Abstand deutlichsten Banden sind die peroxisomalen Enzyme Katalase und Uratoxidase. Eine leichte Verunreinigung der Peroxisomen-Fraktion durch Mitochondrien lässt sich von der unbekanntem Bande bei ungefähr 140 kDa, die vermutlich mitochondrialen Ursprungs ist (Prof. Dr. Dr. A. Völkl, persönliche Mitteilung), ableiten. Im Vergleich dazu weist das mit Peroxisomen angereicherte Zellhomogenat ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster auf, obwohl auch hier die Katalase- und Uratoxidase-Bande erkennbar ist.

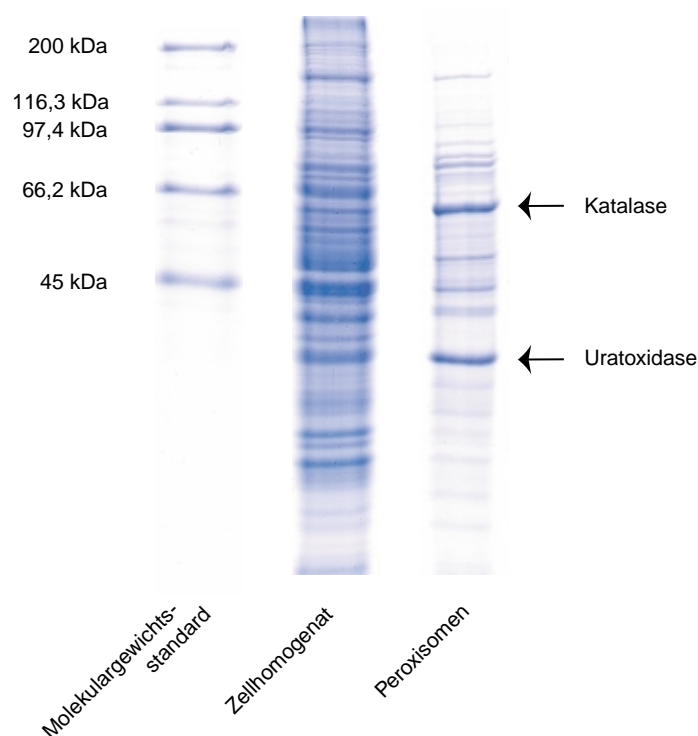


Abbildung 4: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit Zellhomogenat und isolierten Peroxisomen aus Rattenleber. Mit Peroxisomen angereichertes Zellhomogenat und isolierte Peroxisomen wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen und nach SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde zusätzlich der „high range“ Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die am stärksten angefärbten Proteinbanden der isolierten Peroxisomen sind Katalase und Uratoxidase (Pfeile), was die sehr starke Anreicherung von Peroxisomen in dieser Fraktion demonstriert.

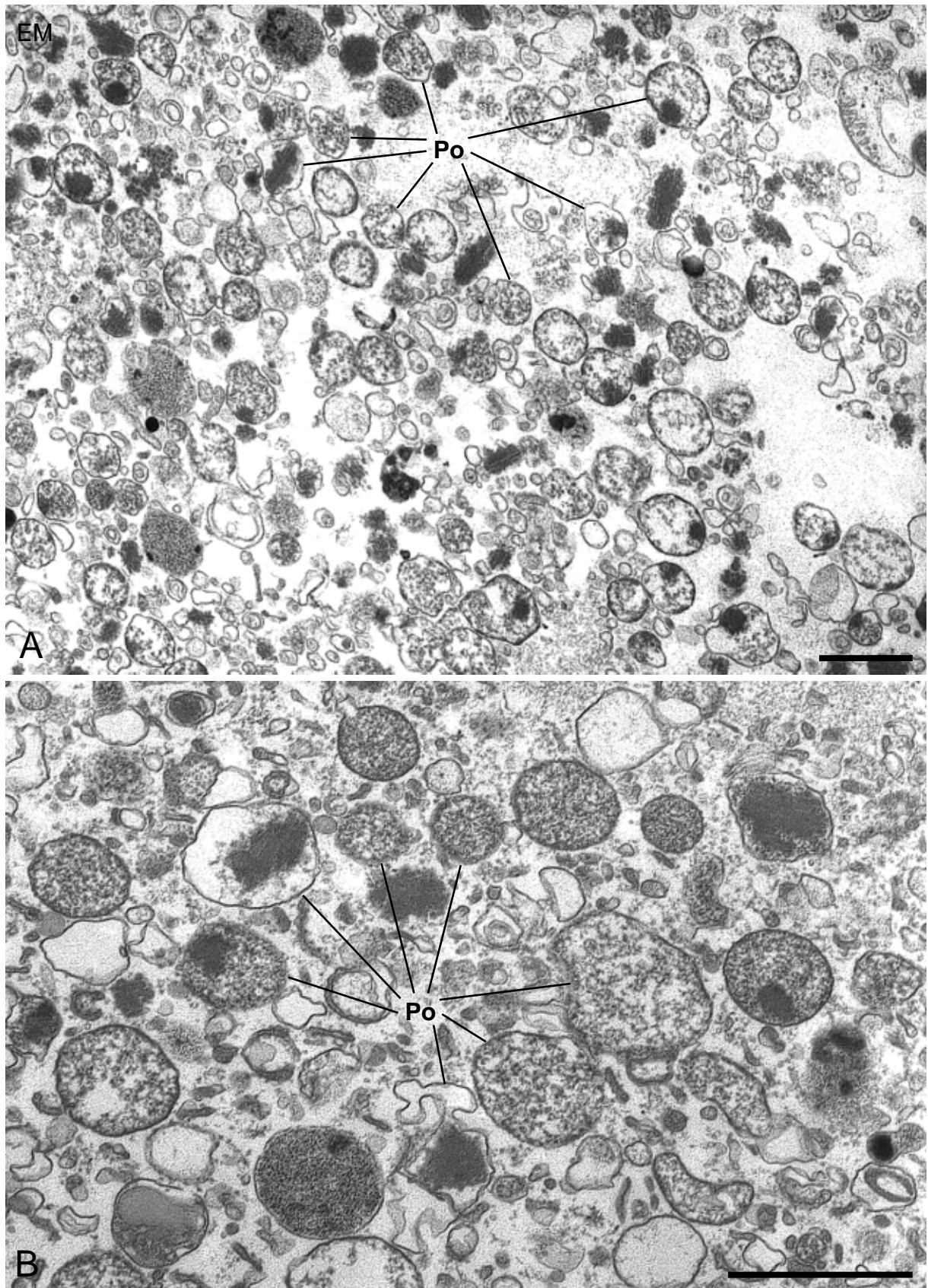


Abbildung 5: Ultrastrukturelle Darstellung isolierter Peroxisomen aus Rattenleber. A, B Elektronenmikroskopische Darstellung isolierter Peroxisomen (Po) nach DAB-Reaktion anhand von Ultradünnschnitten filtrierter und in Epon eingebetteter Peroxisomen. Die mittels differentieller Zellfraktionierung gewonnene Organellenfraktion besteht zum größten Teil aus Peroxisomen. Maßstab jeweils 1 µm.

Zur morphologischen Überprüfung der Reinheit der isolierten Peroxisomen wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an DAB-gefärbten Ultradünnschnitten von eingebetteten Peroxisomenfiltern durchgeführt (Abbildung 5). Es zeigt sich, daß die isolierte Fraktion zum größten Teil aus Peroxisomen besteht. Leichte Kontaminationen mit Mikrosomen, Mitochondrien und Lysosomen sind erkennbar. Weiterhin zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen die gute Strukturhaltung der Peroxisomen. Verklumpete und aggregierende Peroxisomen sind selten zu finden. Der größte Teil der Peroxisomen weist eine sphärische Form auf und ihre Organellenmembran erscheint intakt. Bei einigen Peroxisomen ist die Matrix extrahiert, was sich am Fehlen des elektronendichten DAB-Präzipitates erkennen läßt. Deutlich erkennbar ist bei einigen Peroxisomen das dunkel erscheinende Core, das aus Uratoxidase besteht (siehe auch Abbildung 9). Der Durchmesser der isolierten Peroxisomen bewegt sich zwischen 100 und 900 nm.

2. Mikroskopische Darstellung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

2.1. Video-verstärkte Kontrastmikroskopie (VECM)

Mit Video-verstärkter Kontrastmikroskopie wurde erstmalig von SCHRADER et al. (1996a) die *in vitro* Assoziation von Peroxisomen aus Rattenleber und Mikrotubuli aus Rinderhirn gezeigt (Abbildung 6; siehe auch THIEMANN et al. 2000). Peroxisomen binden an die Mikrotubuli entlang ihrer gesamten Länge.

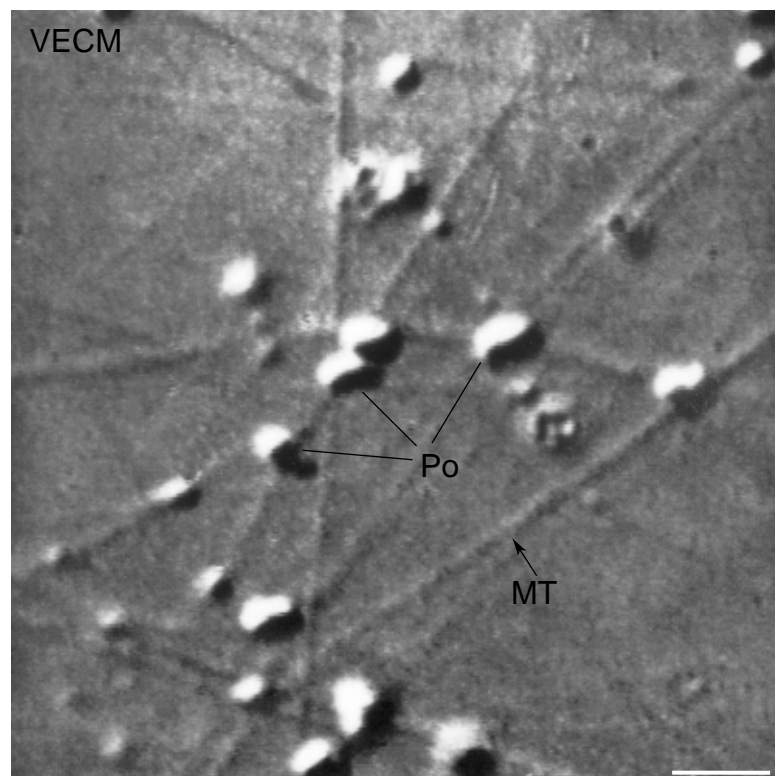


Abbildung 6: Darstellung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mittels Video-verstärkter Kontrastmikroskopie. Nach der Inkubation der isolierten Peroxisomen (Po) aus Rattenleber mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli (MT) aus Rinderhirn folgte die Video-verstärkte Kontrastmikroskopie (VECM). Die Peroxisomen binden an die Mikrotubuli entlang ihrer gesamten Länge. Maßstab 1 μ m. Das mikroskopische Bild wurde freundlicherweise von Dr. Michael Schrader zur Verfügung gestellt (siehe auch THIEMANN et al. 2000).

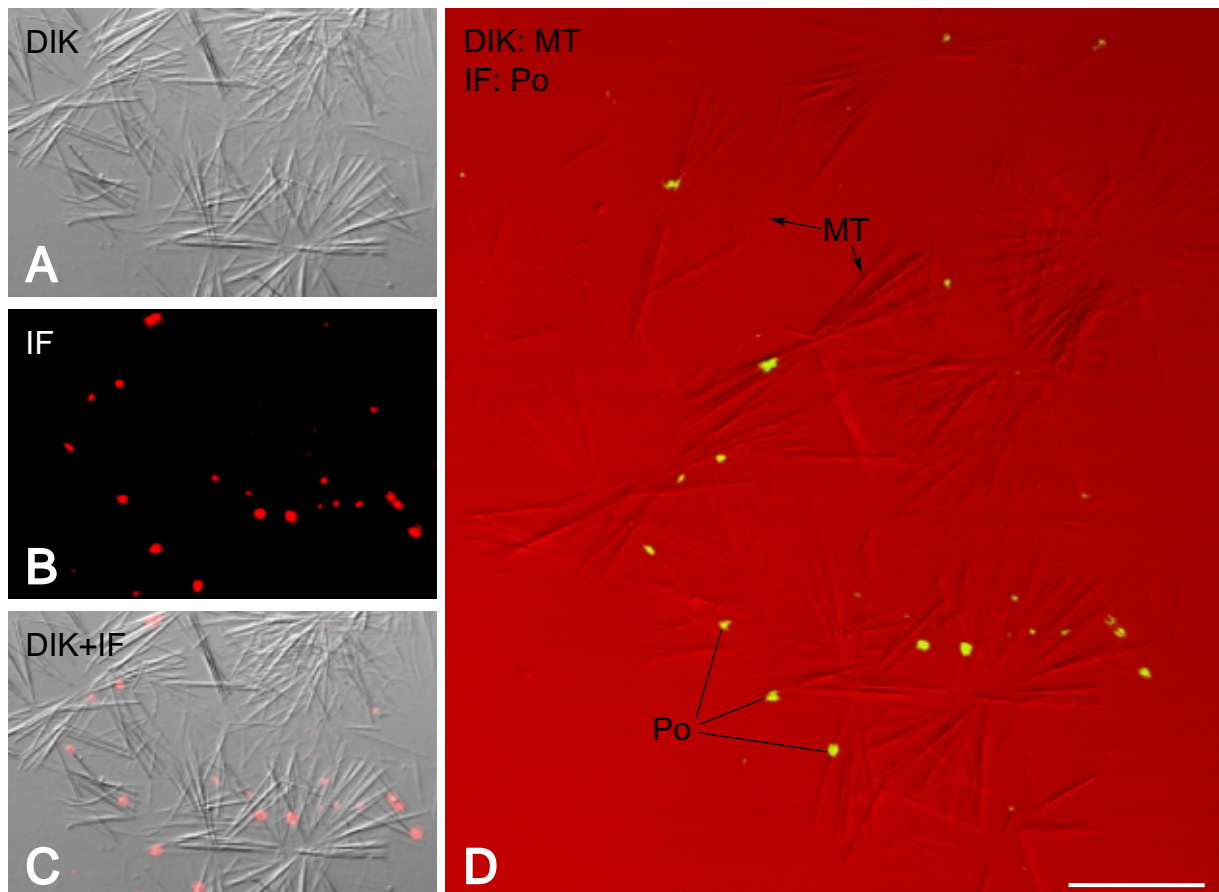


Abbildung 7: Darstellung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop. Nach der Durchführung des Bindungsassays wurden die Peroxisomen-Mikrotubuli-Komplexe mit einem anti-Uratoxidase-Primärantikörper und anschließend mit einem RITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Rattenleber-Peroxisomen (Po) sind durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) und die Taxol-stabilisierten Mikrotubuli (MT) aus Rinderhirn sind durch differentiellen Interferenzkontrast (DIK) dargestellt. **A** Differentieller Interferenzkontrast. **B** Indirekte Immunfluoreszenz. **C** Overlay von differentiellem Interferenzkontrast und indirekter Immunfluoreszenz. **D** Der Falschfarben-Overlay von differentiellem Interferenzkontrast und indirekter Immunfluoreszenz erhöht den Kontrast und verdeutlicht die spezifische Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli. Maßstab 5 µm.

2.2. Indirekte Immunfluoreszenz und differentieller Interferenzkontrast am konfokalen Laserscanningmikroskop

Wie beschrieben konnte durch Video-verstärkte Kontrastmikroskopie (VECM) die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli gezeigt werden. Jedoch läßt sich nicht mit absoluter Gewißheit behaupten, daß es sich bei einem betrachteten Organell um ein Peroxisom handelt, da Peroxisomen-Fractionen immer zu einem kleinen Teil mit anderen Organellen (z.B. Mitochondrien und Mikrosomen) kontaminiert sind. Um den Beweis anzutreten, daß es sich bei den an die Mikrotubuli bindenden Organellen in der Tat um Peroxisomen handelt, wurde zusätzlich zum differentiellen Interferenzkontrast indirekte Immunfluoreszenz mittels eines konfokalen Laserscanningmikroskopes eingesetzt. Dazu wurde der Bindungsassay mit isolierten Rattenleber-Peroxisomen und Mikrotubuli aus Rinderhirn auf Objektträgern durchgeführt. In Abbildung 7 ist die Darstellung der Mikrotubuli mit differentiellem Interferenzkontrast und der Peroxisomen mittels indirekter Immunfluoreszenz zu sehen. Zur Markierung der Peroxisomen wurde ein Antikörper gegen Uratoxidase, ein Enzym, das bei Ratten ausschließlich in den Per-

oxisomen zu finden ist, verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein RITC-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Die Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz und des differentiellen Interferenzkontrastes ist als Falschfarben-Overlay präsentiert, um den Kontrast zu erhöhen und die Bindung der Peroxisomen exklusiv an Mikrotubuli zu unterstreichen (Abbildung 7 D). Die Peroxisomen binden auch hier entlang der gesamten Länge der Mikrotubuli. Die im Vergleich zur VECM beobachtete niedrige Anzahl der an die Mikrotubuli gebundenen Peroxisomen ist wahrscheinlich auf die weiteren Schritte nach dem Bindungsassay zurückzuführen. Aufgrund der zusätzlichen Inkubation mit Antikörpern und zahlreicher Waschschrte dürfte ein Teil der Peroxisomen von den Mikrotubuli abgelöst worden sein. Dies könnte auch der Grund für die unterschiedliche Morphologie der Mikrotubuli sein. Die Mikrotubuli sind – verglichen mit ihrer Morphologie bei Negativkontrastelektronenmikroskopie- und VECM-Präparaten – deutlich kürzer und liegen nicht vereinzelt sondern in Ansammlungen gebündelt vor.

2.3. Negativkontrast-Elektronenmikroskopie

Als weitere mikroskopische Methode zur morphologischen Darstellung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wurde die Negativkontrast-Elektronenmikroskopie eingesetzt. Dazu wurden isolierte Rattenleber-Peroxisomen mit Mikrotubuli aus Rinderhirn inkubiert und dann für die Negativkontrast-Elektronenmikroskopie aufbereitet. Auch mit dieser Methode konnte die Assoziation der Peroxisomen mit Mikrotubuli gezeigt werden. Peroxisomen, die nicht an Mikrotubuli gebunden waren, konnten nur vereinzelt beobachtet werden. In Abbildung 8 A ist zu sehen, daß die Peroxisomen entlang der gesamten Länge der Mikrotubuli binden. In diesem Bild sind drei Mikrotubuli sichtbar, die parallel zueinander verlaufen, so daß teilweise nicht erkennbar ist, ob die Peroxisomen an einem Mikrotubulus oder an mehreren Mikrotubuli binden. Die Kontaktstellen zwischen Peroxisom und Mikrotubulus sind in Abbildung 8 B zu erahnen. Es scheint zwei Kontaktstellen zu geben. Die Auflösung des Bildes ist jedoch nicht ausreichend, um weitere Aussagen über die Natur dieser Kontakte zu treffen. Die Struktur der Mikrotubuli ist in Abbildung 8 C herausgehoben. Deutlich sichtbar sind die Protofilamente des Mikrotubulus und sogar einzelne Tubulin-Monomere können erkannt werden.

Die mit dieser Methode dargestellten Peroxisomen sind relativ klein. Sie haben einen Durchmesser von zumeist unter 200 nm, z.T. auch unter 100 nm. Das Peroxisom in Abbildung 8 B mißt etwa 70 nm. Die geringere Größe im Vergleich zur Ausgangsfraktion (siehe Abbildung 5) ist wahrscheinlich auf die Inkubationsbedingungen zurückzuführen. Durch die zahlreichen Waschschrte werden möglicherweise die großen Peroxisomen abgewaschen, während kleinere Peroxisomen an die Mikrotubuli assoziiert bleiben.

Natürlich liefert diese Methode keinen eindeutigen Nachweis, daß es sich bei den an die Mikrotubuli bindenden Strukturen um Peroxisomen handelt. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt wurde, befinden sich in den Peroxisomenfraktionen Kontaminationen mit anderen Organellen. Da die Peroxisomen aber den weitaus größten Teil der Organellen stellen und angesichts des klaren Nachweises der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mittels Immunfluoreszenz, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den meisten der hier mit Negativkontrast-Elektronenmikroskopie dargestellten Organellen um Peroxisomen handelt. Zudem könnte die dunkle Struktur im in Abbildung 8 B dargestellten Organell auf das Vorhandensein eines peroxisomalen Cores deuten.

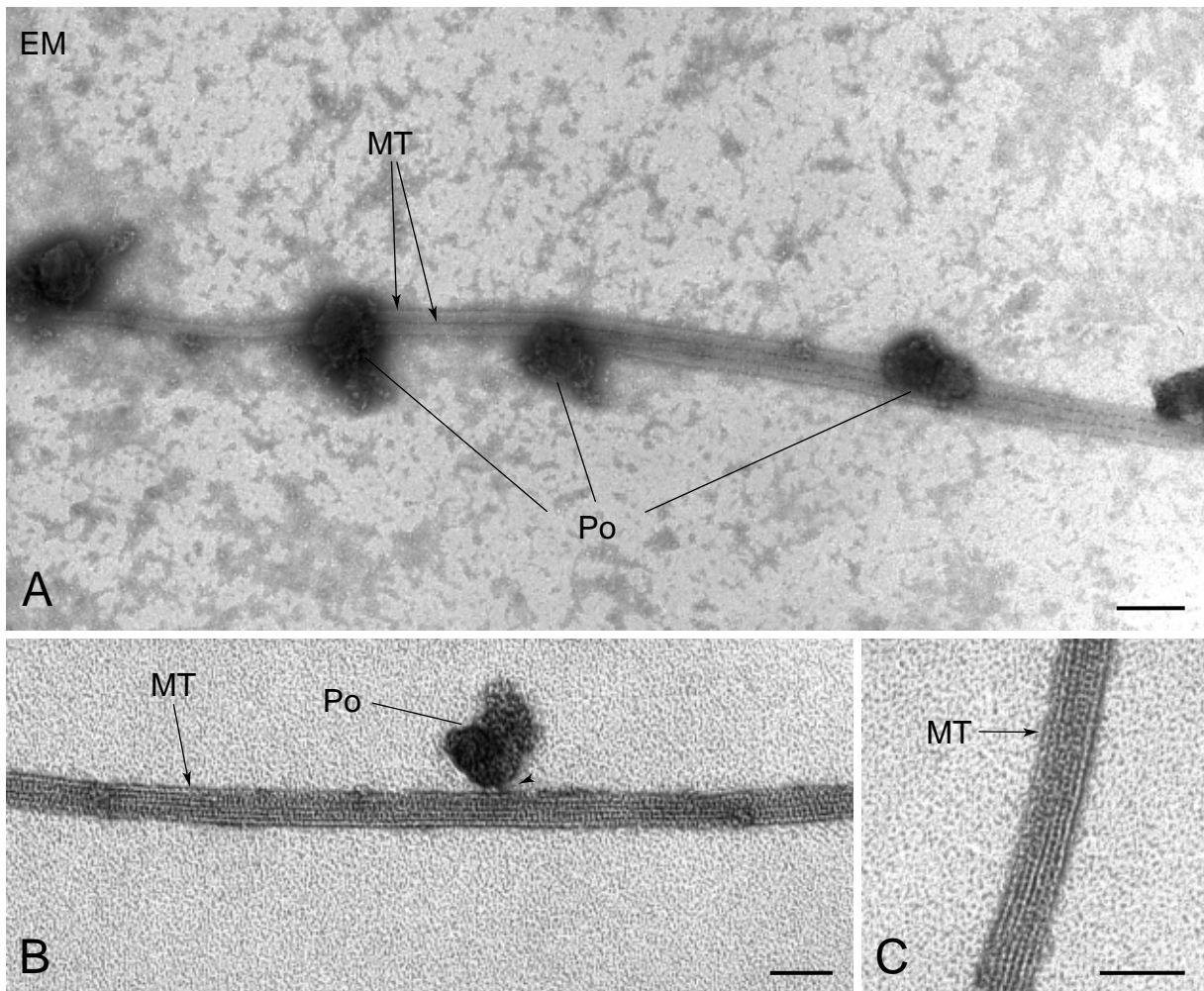


Abbildung 8: Darstellung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mittels Negativkontrast-Elektronenmikroskopie. Nach der Inkubation der isolierten Peroxisomen (Po) aus Rattenleber mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli (MT) aus Rinderhirn folgte die Aufarbeitung des Präparates für die Negativkontrast-Elektronenmikroskopie (EM) unter Verwendung des Kontrastmittels Phosphorwolframsäure. **A** Peroxisomen assoziieren spezifisch an ein oder mehrere Mikrotubuli. Maßstab 200 nm. **B** Zwischen Peroxisom und Mikrotubulus lassen sich zwei Kontaktstellen erkennen (Pfeilspitze). Maßstab 50 nm. **C** Detailvergrößerung eines Mikrotubulus. Die Protofilamente und die Tubulin-Monomere sind deutlich sichtbar. Maßstab 50 nm.

3. Validierung des Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays

Der semiquantitative *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay (für eine Übersicht siehe Abbildung 3) wurde entwickelt, um die molekularen Grundlagen der Peroxisomen-Mikrotubuli Interaktionen und der daran beteiligten Komponenten zu charakterisieren. Zunächst wurde überprüft, ob dieser Assay ein geeignetes Hilfsmittel zur Bestimmung der spezifischen Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist, und danach wurden die einzelnen Parameter des Bindungsassays optimiert.

3.1. Quantifizierung der Uratoxidase

Uratoxidase, die sich in der Rattenleber ausschließlich in den kristallinen Cores von Peroxisomen befindet (ANGERMÜLLER und FAHIMI 1986, VÖLKL et al. 1988), diente als stabiler und spezifischer Marker für die Identifikation von an Mikrotubuli gebundenen Peroxisomen im Bindungsassay. Im Gegensatz zu anderen Matrixproteinen, wie z.B. Katalase, wird die Uratoxidase nicht durch Waschschritte aus den Peroxisomen entfernt. Die elektronenmikroskopischen Bilder von Abbildung 9 heben die Lokalisierung der Uratoxidase in den Cores isolierter Rattenleber-Peroxisomen hervor. In Abbildung 9 A sind die elektronendichten Cores der mit DAB inkubierten Peroxisomen deutlich sichtbar. Auch der immunelektronenmikroskopische Nachweis der Uratoxidase mit der Protein-A-Gold Methode (Abbildung 9 B) zeigt eine hochspezifische Markierung der Cores und deutet auf deren Struktur und die Größe.

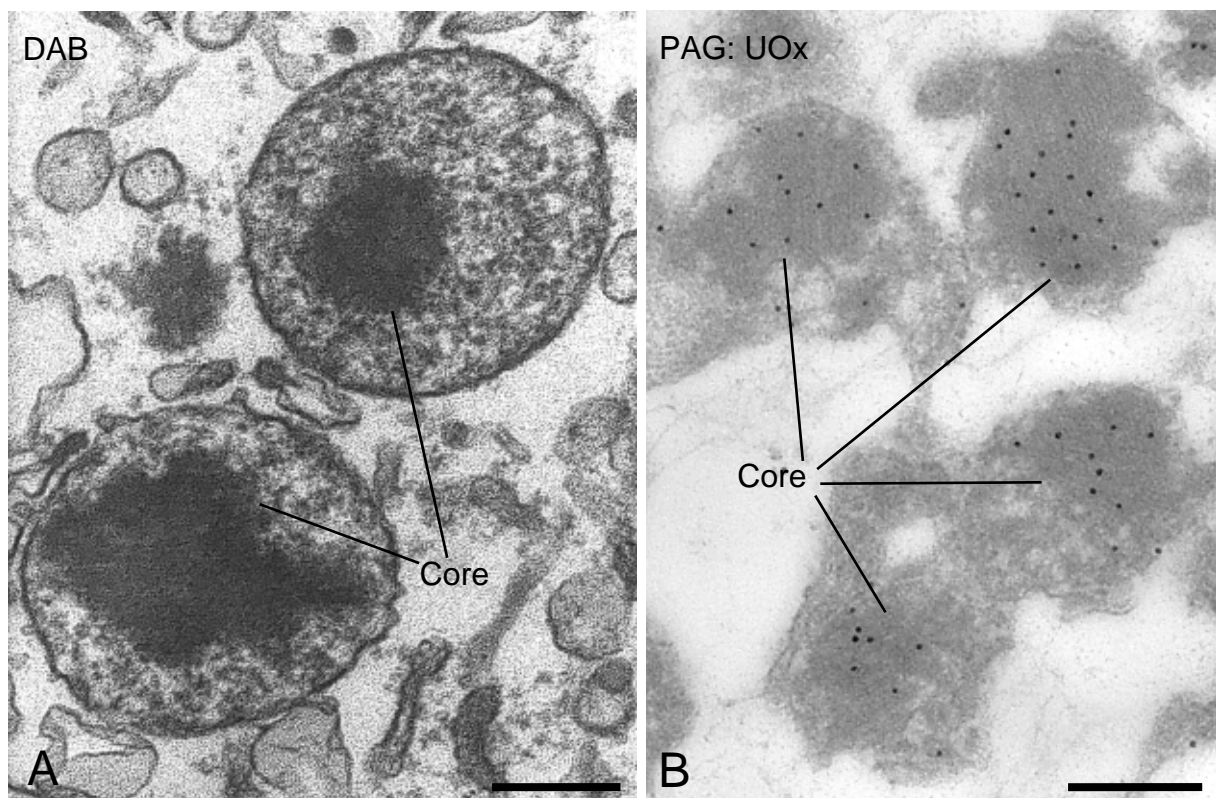


Abbildung 9: Ultrastrukturelle Darstellung der Cores von isolierten Peroxisomen aus der Rattenleber. Elektronenmikroskopische Darstellung isolierter Peroxisomen (Po) mit Core von Ultradünnschnitten filtrierter und in Epon (A) bzw. in LR-White (B) eingebetteter Peroxisomen. **A** Diaminobenzidin (DAB)-Inkubation. **B** Immunocytochemische Lokalisierung der Uratoxidase (UOx) mit der Protein-A-Gold (PAG) Methode. Die Uratoxidase ist ausschließlich im Core lokalisiert. **A, B** Maßstab jeweils 200 nm.

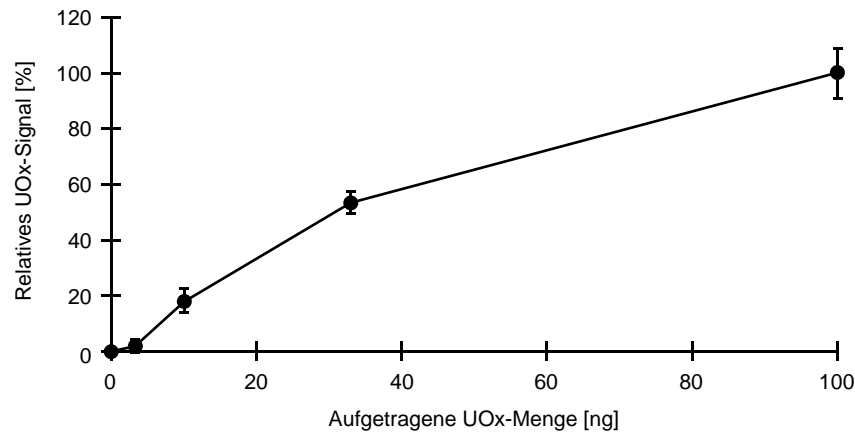


Abbildung 10: Proportionalität des Uratoxidase-Signals im Immunoblot. Zur Überprüfung der Beziehung von Uratoxidase (UOx)-Konzentration und Intensität der Uratoxidase-Banden in Immunoblots wurden verschiedene Konzentrationen an Uratoxidase aufgetragen. Nach SDS-PAGE, Western-Blotting, Immuninkubation mit anti-Uratoxidase-Primärantikörper und dem entsprechenden Sekundärantikörper, Chemilumineszenz-Reaktion und der Belichtung der Negativfilme erfolgte die Quantifizierung der Uratoxidase-Bande. Das Uratoxidase-Signal nimmt mit steigender Uratoxidase-Konzentration zu, aber das Verhältnis ist nicht linear. Bei höheren Uratoxidase-Konzentrationen flacht die Kurve ab.

In Vorversuchen sollte zuerst geklärt werden, ob der Nachweis der Uratoxidase-Signale nach SDS-PAGE, Western-Blotting, Immuninkubation mit einem Primärantikörper gegen Uratoxidase und ECL-Reaktion quantitativ auszuwerten ist. In Abbildung 10 ist die Uratoxidase-Konzentration gegen das quantifizierte UOx-Signal aufgetragen. Zwar ist das Verhältnis nicht linear, da bei höheren Uratoxidase-Konzentrationen die Kurve leicht abflacht, aber das Uratoxidase-Signal nimmt auch bei steigenden Uratoxidase-Konzentrationen noch deutlich zu. Das bedeutet, daß höheren Peroxisomen-Konzentrationen bei der Quantifizierung zu niedrige Werte zugeordnet werden, d.h. gefundene Unterschiede sind in Wirklichkeit noch größer. Insgesamt wird jedoch klar, daß diese Methode zur Quantifizierung der Peroxisomen geeignet ist, besonders angesichts der sehr geringen Streuung der parallelen Meßwerte.

3.2. Unspezifische Bindung

Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli im hier vorgestellten Assaysystem wurde der Bindungsassay (siehe Abbildung 3) mit mehreren Modifikationen durchgeführt (Abbildung 11). In Ansätzen ohne Mikrotubuli konnten keine Peroxisomen detektiert werden. Dagegen war in Wells mit nicht polymerisiertem Tubulin eine geringe Bindung von Peroxisomen zu messen, die jedoch deutlich niedriger war, als die Bindung in Wells mit Mikrotubuli (Abbildung 11 A). Somit sind auspolymerisierte Mikrotubuli für die *in vitro* Bindung von Peroxisomen wichtig. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß isolierte peroxisomale Cores nicht an Mikrotubuli binden (Abbildung 11 B).

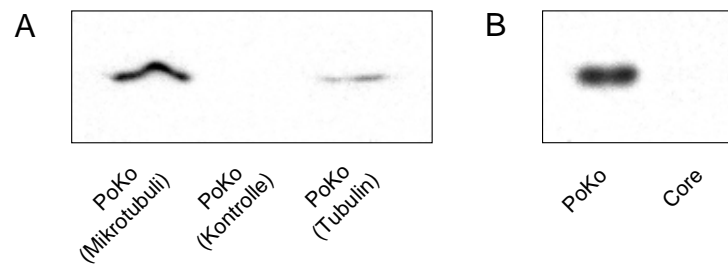


Abbildung 11: Peroxisomen benötigen Mikrotubuli zur Bindung im Bindungsassay und isolierte Cores binden nicht an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde mit den nachfolgend beschriebenen Modifikationen durchgeführt. Hier dargestellt sind die Uratoxidase-Signale nach der ECL-Reaktion. PoKo = Kontrollperoxisomen. **A** Beim linken Ansatz wurde der Bindungsassay unter Standardbedingungen durchgeführt (auspolymerisierte Mikrotubuli mit einer Tubulin-Konzentration von 0,25 mg Protein/ml). Während bei der Kontrolle ohne Mikrotubuli (mittlerer Ansatz) keine Uratoxidase (und somit keine Peroxisomen) nachgewiesen werden konnten, war beim Ansatz mit nicht polymerisiertem Tubulin (0,25 mg Protein/ml; rechter Ansatz) ein schwaches Uratoxidase-Signal festzustellen. **B** Eine isolierte Core-Fraktion (0,1 mg Protein/ml), die anstelle der Peroxisomen im Bindungsassay eingesetzt wurde, band nicht an Mikrotubuli.

3.3. Der optimierte Bindungsassay

Abbildung 3 (Seite 36) zeigt eine Übersicht über die einzelnen Schritte des optimierten Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays. Die genaue Durchführung des Assays und dessen Auswertung ist im Kapitel III. Abschnitt 3.7. dargestellt. Das hier aufgeführte Protokoll des Bindungsassays ist das Ergebnis der Optimierung der einzelnen Parameter, von denen die wichtigsten in den beiden folgenden Abschnitten beschrieben sind.

3.4. Abhängigkeit von der Konzentration an Tubulin und Peroxisomen

Der Einfluß von unterschiedlichen Konzentrationen an Tubulin und Peroxisomen auf den Bindungsassay wurde ausgetestet. Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli war bei Konzentrationen von $\geq 0,25$ mg Protein/ml Tubulin (Abbildung 12 B) bzw. von $\geq 0,1$ mg Protein/ml Peroxisomen (Abbildung 13) gesättigt. Optimale Bindungsbedingungen mit einer hohen Bindungskapazität, guter Reproduzierbarkeit und hoher Spezifität wurden bei einer Konzentration von 0,25 mg Protein/ml Tubulin und 0,1 mg Protein/ml Peroxisomen erreicht. Eine unspezifische Bindung von Peroxisomen in Ansätzen ohne Tubulin konnte nicht detektiert werden (Abbildung 12 B). Beispielhaft ist ein entwickelter Röntgenfilm dargestellt (Abbildung 12 A), der als Grundlage für die Quantifizierung von im Bindungsassay gebundenen Peroxisomen dient. Bemerkenswert ist die hohe Spezifität des Uratoxidase-Antikörpers, der ausschließlich die Uratoxidase markierte und keinerlei Hintergrundfärbung verursachte.

3.5. Abhängigkeit von Inkubationsdauer, Temperatur und pH-Wert

Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli stieg nahezu linear mit zunehmender Zeit der Peroxisomen-Inkubation an, bis nach 60 Minuten ein gleichbleibendes Plateau erreicht wurde (Abbildung 14). Für den optimierten Bindungsassay wurde eine Peroxisomen-Inkubationsdauer von 30 Minuten gewählt, da bei längeren Inkubationszeiten die Streuung der Parallelwerte deutlich höher lag.

Weiterhin war die Bindung temperaturabhängig mit der geringsten Bindung beim niedrigsten Meßpunkt 15°C und einem mäßigen Anstieg bis 35°C. Über 35°C war ein exponentieller Anstieg der Bindung zu messen (Abbildung 15).

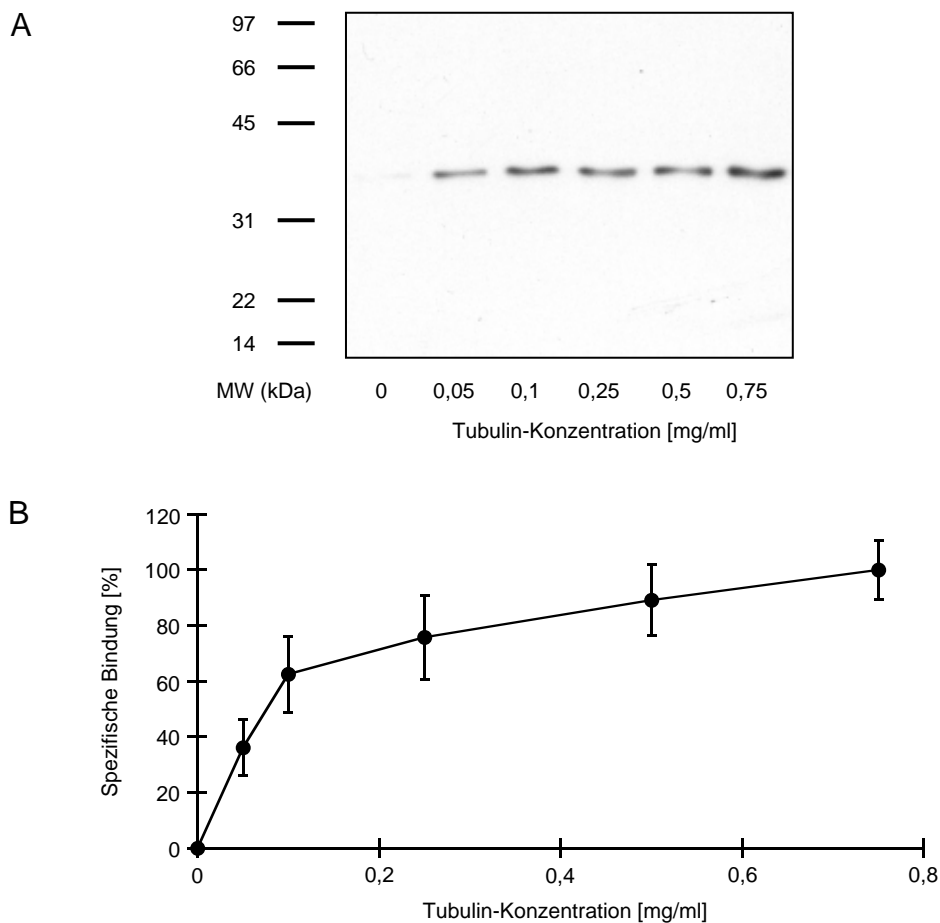


Abbildung 12: Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist abhängig von der Tubulin-Konzentration. Zur Bestimmung der optimalen Tubulin-Konzentration im *in vitro* Bindungsassay wurde diese variiert. **A** Als Beispiel für die Spezifität des Uratoxidase-Antikörpers ist ein durch die ECL-Reaktion belichteter Röntgenfilm dargestellt. **B** Die Quantifizierung der UOx-Signale, durch die die Menge der im Versuchsansatz gebundenen Peroxisomen ermittelt wird, ergab für die Konzentration des eingesetzten Tubulins eine Sättigungskurve. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 6 Experimenten.

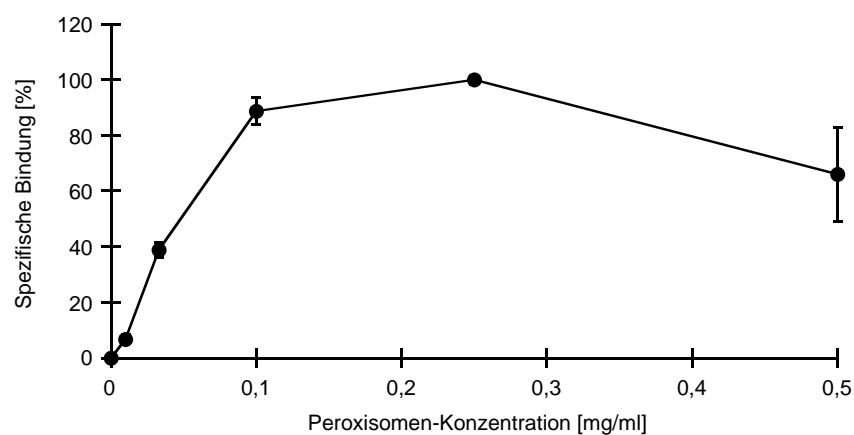


Abbildung 13: Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist sättigbar. Zur Bestimmung der optimalen Peroxisomen-Konzentration im *in vitro* Bindungsassay wurde diese variiert. Die Quantifizierung der UOx-Signale ergab für die Konzentration der eingesetzten Peroxisomen eine Sättigungskurve. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 6 Experimenten.

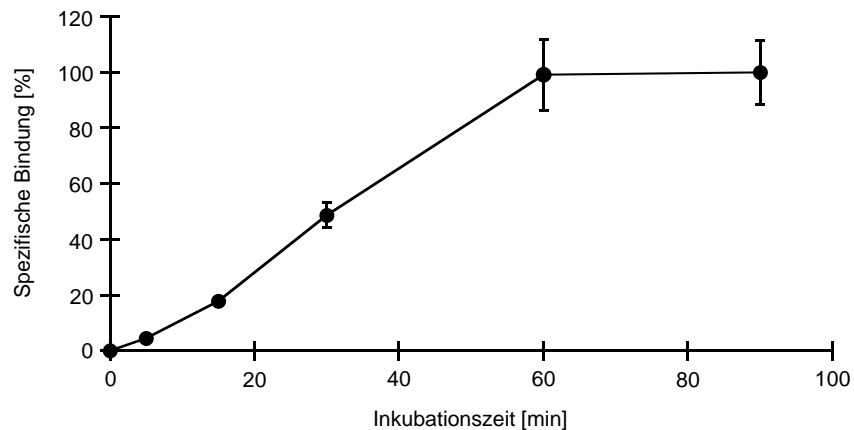


Abbildung 14: Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist abhängig von der Inkubationsdauer der Peroxisomen. Der *in vitro* Bindungsassay wurde mit verschiedenen Peroxisomen-Inkubationszeiten ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Nach einer Stunde Inkubationsdauer steigt die Bindungskapazität der Peroxisomen nicht weiter an. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 5 Experimenten.

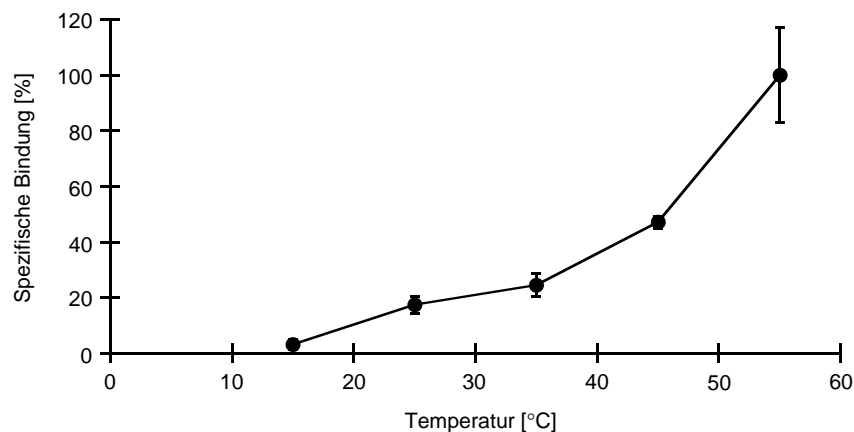


Abbildung 15: Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli steigt mit zunehmender Inkubationstemperatur. Der *in vitro* Bindungsassay wurde bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 5 Experimenten.

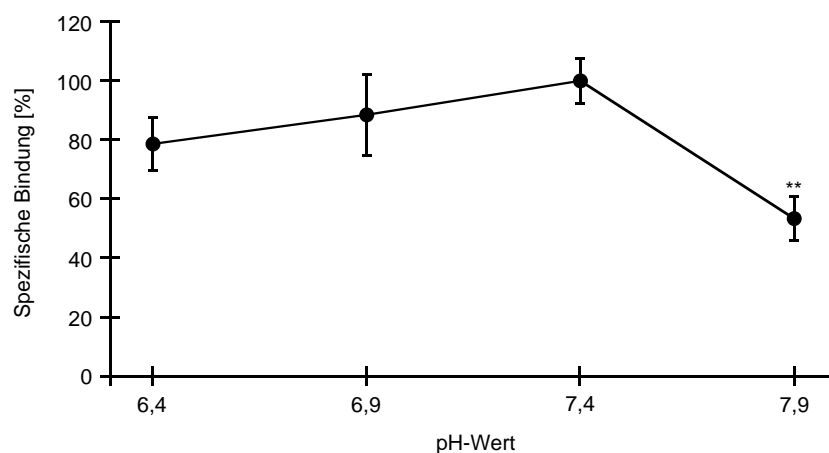


Abbildung 16: Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ist abhängig vom pH-Wert. Der *in vitro* Bindungsassay wurde mit verschiedenen pH-Werten ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 5 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber pH 7,4 wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$).

Die Bindung erwies sich auch als pH-abhängig (Abbildung 16). Daß die höchste Bindungskapazität bei einem pH-Wert von 7,4 beobachtet wurde, weist auf die mögliche physiologische Relevanz dieses *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays hin. Eine hohe Bindung wurde auch beim leicht sauren pH-Wert von 6,4 festgestellt, wohingegen beim alkalischen pH von 7,9 die Bindung signifikant reduziert war.

3.6. Zugabe von freien Mikrotubuli und PMP-26-Antikörpern

Die Spezifität des Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays wurde weiter untermauert durch die Zugabe von freien Mikrotubuli (1 mg Protein/ml) zur Peroxisomenlösung vor deren Einsatz im Bindungsassay. Die spezifische Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wurde hoch signifikant auf 23 % des Kontrollwertes gesenkt (Abbildung 17), was darauf hindeutet, daß freie Mikrotubuli mit an den Wells gebundenen Mikrotubuli um die Bindung der Peroxisomen konkurrieren. Ebenfalls hoch signifikant gesenkt auf 40 % des Kontrollwertes wurde die Bindung durch Zugabe von PMP-26-Antikörpern (0,1 mg Protein/ml) zu den Peroxisomen. Dies weist darauf hin, daß sich die Antikörper an das entsprechende peroxisomale Membranprotein (PMP-26) anlagern und so die Assoziation der Peroxisomen an Mikrotubuli sterisch behindern.

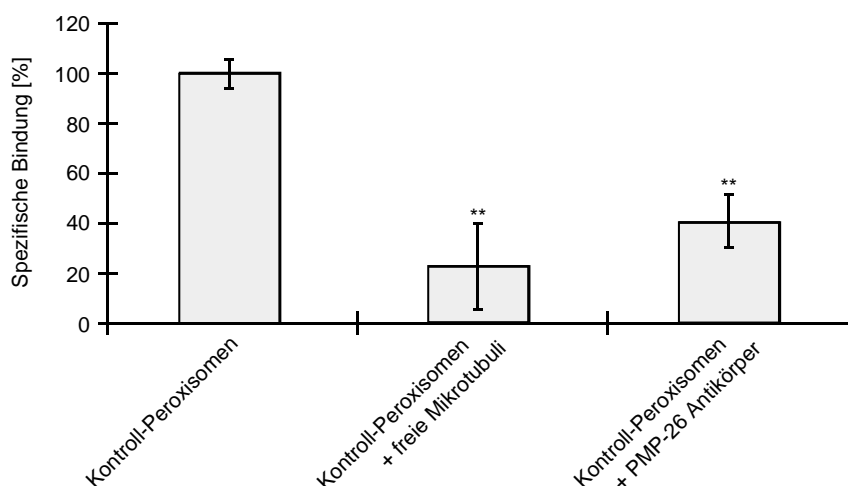


Abbildung 17: Zugabe von freien Mikrotubuli und von PMP-26-Antikörpern vermindern die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Peroxisomen wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay freie Taxol-stabilisierte Mikrotubuli (1 mg Protein/ml) bzw. PMP-26-Antikörper (0,1 mg Protein/ml; siehe LÜERS et al. 1990) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen dienen als Kontrolle. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 5 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollperoxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$).

4. Biochemische Charakterisierung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Wie in Abschnitt 3. dokumentiert wurde, eignet sich der *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay hervorragend zur Bestimmung der spezifischen Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. In diesem Abschnitt soll nun die biochemische Charakterisierung dieser *in vitro* Bindung beschrieben werden. Vorrangig untersucht wurde der Einfluß von Proteinen, die mit Mikrotubuli interagieren, die Bedeutung von Phosphorylierung, der Effekt von zugegebenem Cytosol und der Einfluß der Vorbehandlung von Peroxisomen und Cytosol.

4.1. Einfluß von Proteinen, die mit Mikrotubuli interagieren, auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Zur Untersuchung des Einflusses von Proteinen, die mit Mikrotubuli interagieren, auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli, wurden zum Bindungsassay verschiedene Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), Motorproteine und CLIP-115 zugegeben.

4.1.1. Zugabe von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs)

Die Zugabe der MAPs MAP2 und TAU und einer MAP-Fraktion, sowie die Zugabe einer ATP-Release-Fraktion führten allesamt zu einer hoch signifikanten Verringerung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli (Abbildung 18). Die größten Reduktionen wurden mit der MAP-Fraktion und der ATP-Release-Fraktion erreicht, wo die Bindungslevel auf 5 % bzw. 6 % absanken. Zugegebenes MAP2 reduzierte die Bindung auf 25 % und Zugabe von TAU auf 32 % des Kontrollwertes. Der stark inhibitorische Effekt dieser Proteine ist nicht erstaunlich, da sie an Mikrotubuli binden und somit eine Anlagerung der Peroxisomen an die Mikrotubuli sterisch behindern. Auch der stärkere inhibitorische Effekt der MAP-Fraktion, verglichen mit MAP2 und TAU, liegt auf der Hand. Während MAP2 und TAU nur an jeweils eine spezifische Stelle des β -Tubulins binden (HAGIWARA et al. 1994), liegen in der MAP-Fraktion weitere MAPs

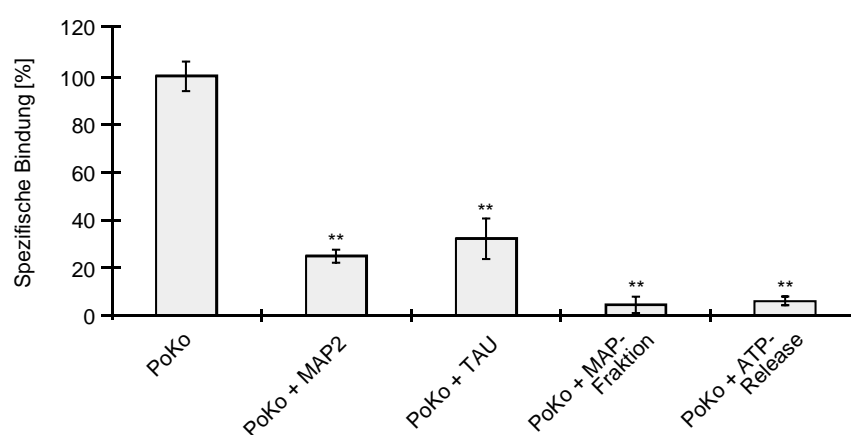


Abbildung 18: Verschiedene MAPs reduzieren die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Kontroll-Peroxisomen (PoKo) wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay MAP2 (50 μ g Protein/ml), TAU (50 μ g Protein/ml), MAP-Fraktion (50 μ g Protein/ml), bzw. eine ATP-Release-Präparation (50 μ g Protein/ml) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen (PoKo) dienen als Kontrolle. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollperoxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$).

vor, die auch an andere Stellen des Tubulins binden. Somit sind mehr Stellen entlang der Mikrotubuli für eine Anlagerung der Peroxisomen blockiert. Bei der ATP-Release-Fraktion handelt es sich um eine Mischung aus verschiedenen MAPs und Motorproteinen. Da auch hier eine deutliche Hemmung der Anlagerung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu beobachten war, scheint der inhibitorische Effekt der MAPs den stimulierenden Effekt der Motorproteine (siehe Abbildung 19) zu überwiegen.

4.1.2. Zugabe von Motorproteinen

Ein hoch signifikanter Anstieg der Bindung wurde durch Zugabe der Motorproteine Kinesin und Dynein und des Dynein-assoziierten Proteins Dynactin zu den Peroxisomen, unmittelbar bevor diese in den Bindungsassay eingesetzt wurden, erreicht (Abbildung 19). Dynein war mit einer dreifachen Steigerung des Bindungsniveaus am effektivsten, während Kinesin die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli auf 130 % und Dynactin auf 242 % erhöhte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Motorproteine Dynein und Kinesin sowie das Dynein-assoziierte Protein Dynactin in der Lage sind, die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu vermitteln. Diese Rolle ist unabhängig von der Motoraktivität von Kinesin und Dynein zu sehen, da es keinen Unterschied machte, ob den Versuchsansätzen mit den Motorproteinen ATP zugefügt wurde oder nicht.

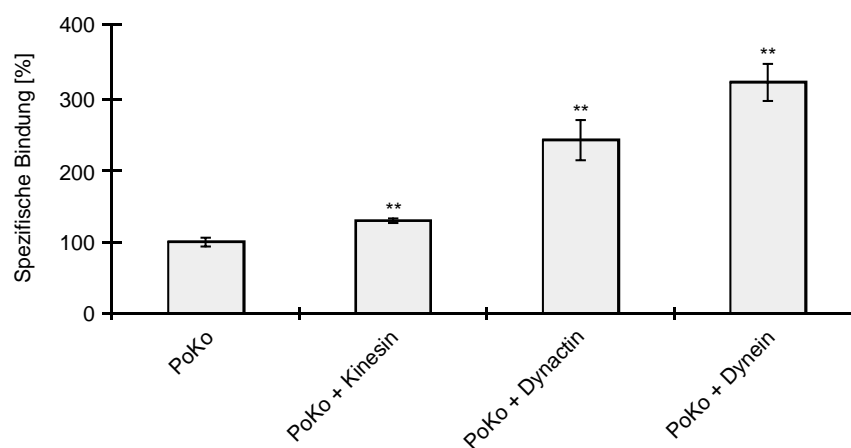


Abbildung 19: Motorproteine erhöhen die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Kontroll-Peroxisomen (PoKo) wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay Kinesin (50 µg Protein/ml), Dynactin (50 µg Protein/ml), bzw. Dynein (50 µg Protein/ml) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen (PoKo) dienen als Kontrolle. Die Säulen sind Mittelwerte ± Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$).

4.1.3. Zugabe von CLIP-115

Mit CLIP-115 wurde der Einfluß eines Proteins aus der CLIP-Familie auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli getestet. Dazu wurden den Peroxisomen unmittelbar vor deren Einsatz in den Bindungsassay verschiedene Konzentrationen an GST-CLIP-115 zugefügt. Vom Fusionsprotein GST-CLIP-115, das aus Glutathion-S-Transferase (GST) und den Aminosäuren 1 – 333 von CLIP-115 (inclusive der beiden Mikrotubuli-Bindungsdomänen, siehe auch HOOGENRAAD et al. 2000) besteht, kann der CLIP-115-Anteil nicht ohne weitere Zerstückelung des Polypeptids abgespalten werden (Dr. N. Galjart, persönliche Mitteilung).

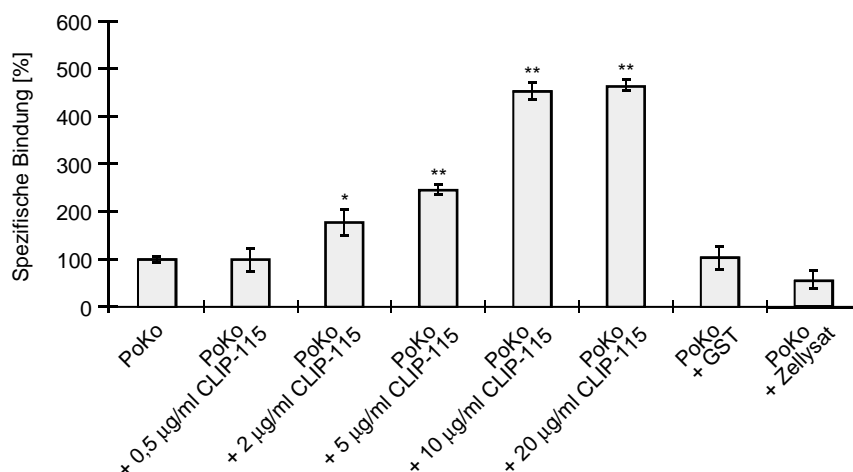


Abbildung 20: Rekombinantes CLIP-115 steigert die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Kontroll-Peroxisomen (PoKo) wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay verschiedene Mengen an GST-CLIP-115 (0,5, 2, 5, 10, bzw. 20 µg/ml) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen (PoKo) dienten als Kontrolle. Als weitere Kontrollen dienten Ansätze, bei denen den Peroxisomen GST (5 µg/ml) bzw. bakterielles Zellysat (5 µg/ml) zugefügt wurde. Die Säulen sind Mittelwerte ± Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Deshalb wurde das komplette aufgereinigte Fusionsprotein in den Bindungsassay eingesetzt. GST-CLIP-115 steigerte die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli in einer konzentrationsabhängigen Weise bis zum 5-fachen des Kontrollwertes (Abbildung 20). Schon so geringe Konzentrationen wie 2 µg GST-CLIP-115/ml führten zu einem signifikanten Anstieg der Bindung. Daß dieser Anstieg nicht auf den GST-Teil des Fusionsproteines zurückzuführen ist, bewies die Kontrolle mit nicht konjugiertem GST, wo keine Veränderung der Bindungseigenschaften zu verzeichnen war. Auch eine potentielle Bindungssteigerung durch Kontaminationen des aufgereinigten GST-CLIP-115 mit Proteinen des bakteriellen Zellysates kann ausgeschlossen werden, da die Kontrolle mit bakteriellem Zellysat nicht zu einer Erhöhung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli führte. Insgesamt ist der hier beobachtete stimulierende Effekt von CLIP-115 unerwartet, da zu vermuten war, daß CLIP-115 die Mikrotubuli besetzt und somit die Anlagerung von Peroxisomen behindern würde. Zudem fehlt dem Fusionsprotein der C-Terminus von CLIP-115, der die potentielle Organellen-bindende Domäne enthält.

4.2. Einfluß von Phosphorylierung auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Der Einfluß von Phosphorylierung auf die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli *in vitro* wurde untersucht, indem dem Bindungsassay ATP, ADP, ATP-Analoga, ein ATP-depletierendes System, Proteinkinasen, ein Kinase-Inhibitor bzw. ein Phosphatase-Inhibitor zugefügt wurden. Zudem wurde untersucht, welche Proteine *in vitro* phosphoryliert werden.

4.2.1. Zugabe von ATP, ADP und ATP-Analoga

Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wurde durch die Zugabe von 2 mM ATP ungefähr verdoppelt (Abbildung 21). Dieser signifikante Anstieg wurde durch die Zugabe von Kreatinphosphat und Kreatinkinase, einem ATP-regenerierenden System, weiter verstärkt auf 284 % des Kontrollwertes. Andererseits führte das ATP-depletierende System Glukose + Hexo-

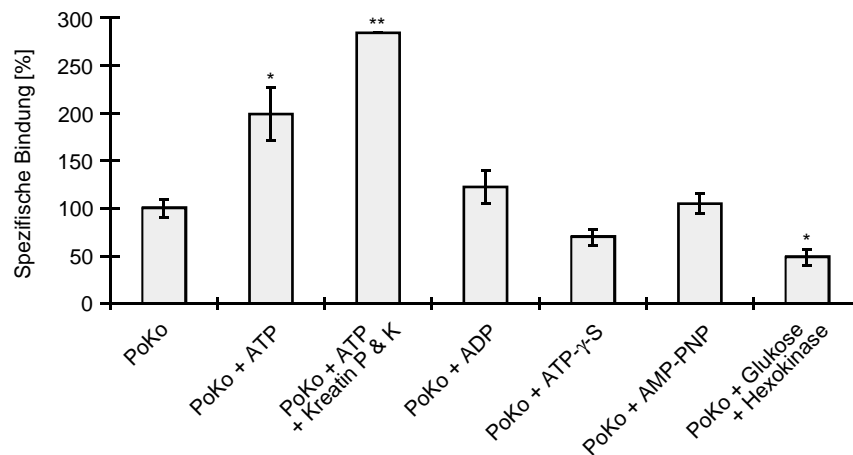


Abbildung 21: Einfluß von ATP, ADP, ATP-Analoga und ATP-Depletion auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Kontroll-Peroxisomen (PoKo) wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay ATP (2 mM), ATP (2 mM) + Kreatinphosphat (13,3 mM) + Kreatinkinase (13,3 U/ml) (Kreatin P & K), ADP (2 mM), ATP- γ -S (2 mM), AMP-PNP (2 mM), bzw. das ATP-depletierende System Glukose (10 mM) + Hexokinase (15 U/ml) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen (PoKo) dienen als Kontrolle. Die Abbildung verdeutlicht den bindungssteigernden Effekt von ATP, insbesondere in der Gegenwart von Kinasen. Dagegen beeinflussten ATP-Analoga und ADP die Bindung nicht und ATP-Depletion verminderte sie. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

kinase zu einer Reduktion der Bindung auf 49 % des Wertes für Kontrollperoxisomen. ADP und die ATP-Analoga ATP- γ -S und AMP-PNP beeinflussten die Bindung nicht signifikant. Der fehlende Einfluß der nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga in Verbindung mit dem stimulierenden Effekt von ATP – insbesondere bei ATP-Regeneration – und dem inhibitorischen Einfluß der ATP-Depletion, weisen auf eine Phosphorylierung durch ATP-Hydrolyse und nicht auf ATP-Anlagerung als Ursache dieser Effekte hin.

4.2.2. Zugabe einer Kinase und eines Kinase-Inhibitors

Um die mögliche Rolle der ATP-Hydrolyse zu überprüfen, wurde der Einfluß einer Kinase und eines Kinase-Inhibitors im Bindungsassay ausgetestet. Durch das Zufügen einer Proteinkinase (katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase) in Verbindung mit ATP, wurde das hohe Bindungsniveau nach ATP-Zugabe weiter auf annähernd das 3-fache des Kontrollwertes gesteigert (Abbildung 22). Dieser Effekt war bereits beim Einsatz von Kreatinkinase zu beobachten (siehe Abbildung 21).

Der Einsatz von Staurosporin, einem wirkungsvollen generellen Inhibitor von Proteinkinasen, führte zu einer Verringerung der Bindung von sowohl ATP- als auch ATP- und Proteinkinase-supplementierten Peroxisomen an Mikrotubuli. Dabei wurde die Bindung auf das Niveau abgesenkt, das für Kontrollperoxisomen erhalten wurde. Auch der Einsatz von Staurosporin ohne ATP und Proteinkinase führte zu ähnlichen Bindungswerten, wie bei nicht supplementierten Peroxisomen. Das bedeutet, daß Staurosporin allein keine inhibitorische Wirkung auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli auszuüben scheint, sondern daß dessen Wirkung auf die Hemmung der Proteinkinase zurückzuführen ist. Die Proteinkinase benötigte zur Stimulierung der Bindung ATP; ohne dieses Substrat war sogar ein inhibierender Effekt auf die Bindung zu beobachten.

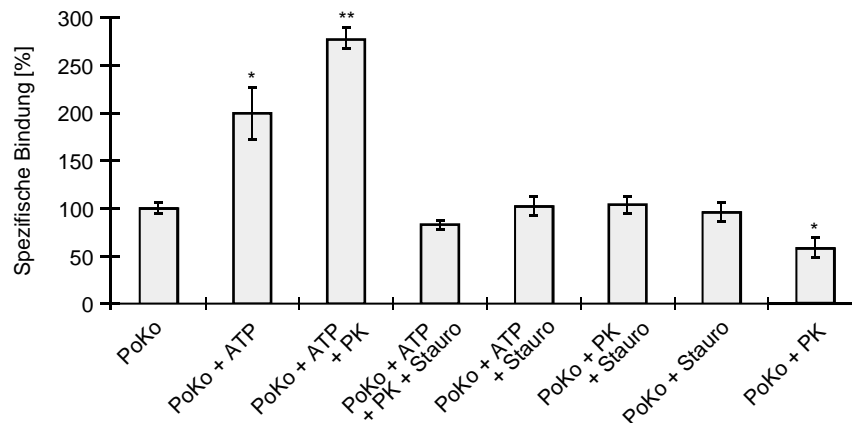


Abbildung 22: Einfluß einer Kinase und eines Kinase-Inhibitors auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Kontroll-Peroxisomen (PoKo) wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay ATP (2 mM), ATP (2 mM) + Proteinkinase (PK; katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Schweineherz; 125 U/ml), ATP (2 mM) + PK (125 U/ml) + Staurosporin (Stauro; 100 nM), ATP (2 mM) + Stauro (100 nM), PK (125 U/ml) + Stauro (100 nM), Stauro (100 nM), bzw. PK (125 U/ml) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen (PoKo) dienen als Kontrolle. Die Abbildung unterstreicht den hemmenden Effekt des Kinase-Inhibitors Staurosporin auf die Bindungssteigerung durch ATP. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Diese Versuche unterstreichen die Bedeutung der Phosphorylierung durch ATP-Hydrolyse für die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der stimulierende Effekt von ATP in Abwesenheit einer zugefügten Proteinkinase läßt die Existenz einer endogenen Kinaseaktivität, die auch nach der Aufreinigung der Peroxisomen erhalten bleibt, vermuten.

4.2.3. Zugabe eines Phosphatase-Inhibitors

Der Einfluß von Phosphatasen im Bindungsassay wurde indirekt durch den Einsatz von Okadarsäure getestet (Abbildung 23). Okadarsäure, ein selektiver Inhibitor von Serin/Threonin-Phosphatasen, bewirkte eine Erhöhung der Bindung auf 153 %. Noch etwas deutlicher war die Erhöhung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli nach Zugabe von Okadarsäure in Kombination mit ATP (auf 185 % des Kontrollwertes). Aufgrund der relativ hohen Streuung der Meßwerte ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zum Versuchsansatz mit Okadarsäure ohne zugefügtes ATP. Der stimulierende Effekt von Okadarsäure war deutlich geringer als die Bindungssteigerung, die durch die Proteinkinase in Gegenwart von ATP hervorgerufen wurde (vergleiche Abbildung 22). Die Wirksamkeit des Phosphatase-Inhibitors Okadarsäure deutet auf das Vorhandensein einer endogenen Phosphatase, die die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli *in vitro* herunterregulieren kann.

4.2.4. *In vitro* Phosphorylierung von Proteinproben

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli durch ATP-Hydrolyse gesteigert wird, sollte untersucht werden, welche Proteine dabei phosphoryliert werden. Dazu wurde ein *in vitro* Phosphorylierungsassay durchgeführt, bei dem verschiedene Proteinproben mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert wurden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine, Färben und Trocknen der Gele wurde die Autoradiographie der phosphorylierten Proteinbanden durch Exposition von Röntgenfilmen gemessen (Abbildung 24).

Während bei Peroxisomen-Präparationen mehrere Polypeptide phosphoryliert wurden (deutliche Banden bei ungefähr 40 kDa, 45 kDa, 55 kDa und 220 kDa), konnte bei Proteinen des Eluates von KCl-behandelten Peroxisomen mit diesem Versuchssystem keine *in vitro* Phosphorylierung nachgewiesen werden.

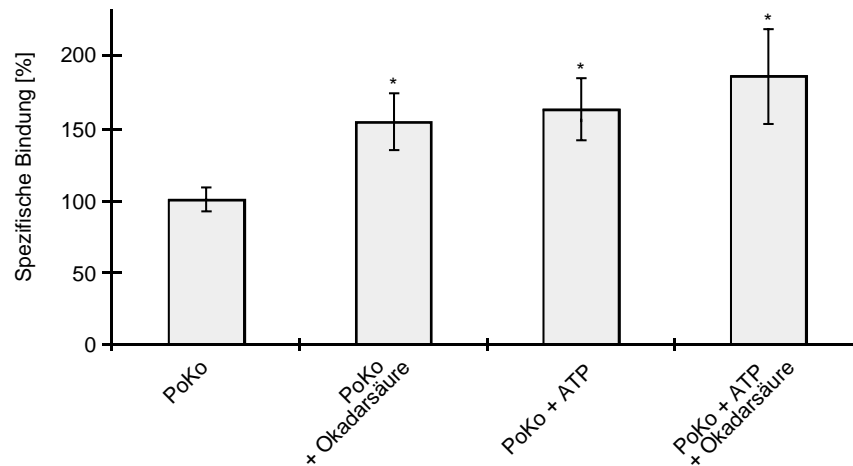


Abbildung 23: Der Phosphatase-Inhibitor Okadarsäure erhöht die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Den Kontroll-Peroxisomen (PoKo) wurden vor ihrem Einsatz in den Bindungsassay Okadarsäure (1 μ M), ATP (2 mM) bzw. ATP (2 mM) + Okadarsäure (1 μ M) zugefügt. Nicht supplementierte Peroxisomen (PoKo) dienen als Kontrolle. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$).

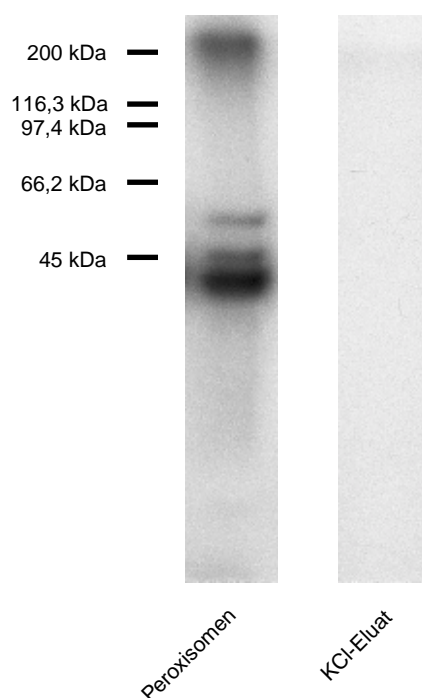


Abbildung 24: *In vitro* Phosphorylierungsassay mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Die Proteinproben (Peroxisomenlösung, KCl-Eluat) wurden mit 0,4 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und Proteinkinase (2 U/Ansatz, katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Schweineherz) inkubiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend gefärbt und getrocknet. Dann wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, für 80 Stunden exponiert und entwickelt. Während im KCl-Eluat keine *in vitro* Phosphorylierung festgestellt werden konnte, wiesen die Peroxisomen mehrere phosphorylierte Polypeptidbanden auf. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Banden wurde der „high range“ Molekulargewichtsstandard benutzt.

4.3. Einfluß der Vorbehandlung von Peroxisomen auf deren *in vitro* Bindung an Mikrotubuli

Um aufzuklären, welche Eigenschaften der Peroxisomen für die *in vitro* Bindung an Mikrotubuli von Bedeutung sind, wurden die Peroxisomen auf unterschiedliche Weise vorbehandelt und daraufhin ihre Bindungseigenschaften im Bindungsassay überprüft. Die Vorbehandlung der Peroxisomen umfaßte die Inkubation mit Proteasen und NEM sowie die Behandlung mit KCl.

4.3.1. Vorbehandlung von Peroxisomen mit Proteasen und NEM

Eine hochsignifikante Reduktion der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wurde aufgrund der Vorbehandlung der Peroxisomen mit den Proteasen Trypsin und Proteinase K sowie der alkylierenden Substanz NEM beobachtet (Abbildung 25). Die Bindung war reduziert auf 13 % (Trypsin-behandelte Peroxisomen), 5 % (Proteinase K-behandelte Peroxisomen), bzw. auf 38 % (NEM-behandelte Peroxisomen) des Wertes für nicht behandelte Peroxisomen. Somit ist die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli Protease- und NEM-sensitiv.

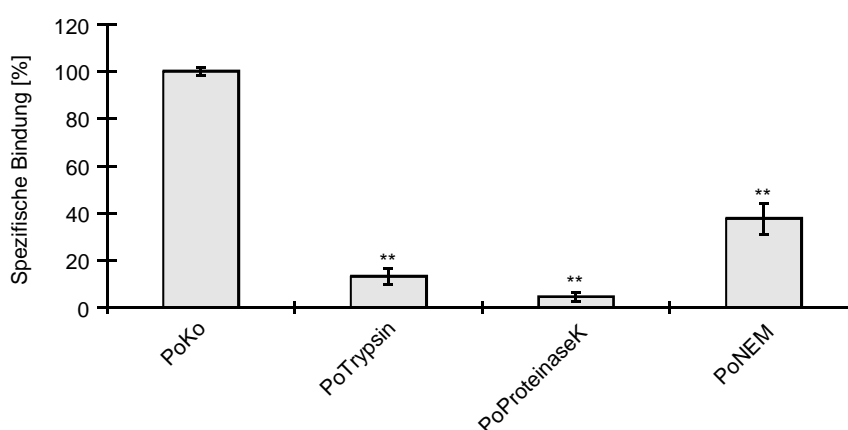


Abbildung 25: Die Vorbehandlung von Peroxisomen mit Proteasen und NEM reduziert ihre *in vitro* Bindung an Mikrotubuli. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Die Peroxisomen (Po) wurden vorbehandelt mit TPCK-behandeltem Trypsin (0,1 mg Protein/ml), mit Proteinase K (1 mg protein/ml), bzw. mit NEM (4 mM). Nicht vorbehandelte Peroxisomen (PoKo) dienten als Kontrolle. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$).

4.3.2. Vorbehandlung von Peroxisomen mit KCl

Die Vorbehandlung von Peroxisomen mit 100 mM KCl, die zu einer Entfernung peripherer Membranproteine führt und zum Teil auch Matrixproteine extrahiert, resultierte in einer signifikanten Verminderung der Bindung auf 64 % des Levels für nicht behandelte Peroxisomen (Abbildung 26). Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und für Konzentrationen von ≥ 100 mM KCl signifikant. Die Behandlung mit KCl scheint ein peripheres Protein der Peroxisomenmembran abzulösen, das für die *in vitro* Bindung an Mikrotubuli wichtig ist und das während des Aufreinigungsprozesses der Peroxisomen an die Peroxisomenmembran assoziiert bleibt.

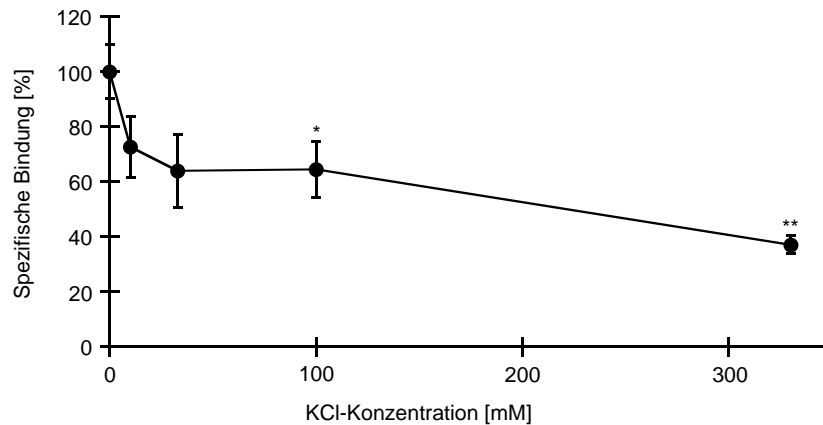


Abbildung 26: Die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wird durch die Vorbehandlung der Peroxisomen mit KCl reduziert. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Die Peroxisomen wurden mit verschiedenen KCl-Konzentrationen (0,01 M, 0,033 M, 0,1 M, 0,33 M, 1 M) vorbehandelt. Nicht vorbehandelte Peroxisomen dienten als Kontrolle. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

4.4. Einfluß von Cytosol auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Zur Untersuchung des Einflusses von cytosolischen Proteinen auf die *in vitro* Bindung von unbehandelten und behandelten Peroxisomen an Mikrotubuli wurde dem Bindungsassay unbehandeltes Rattenlebercytosol und vorbehandeltes Rattenlebercytosol zugefügt. Des weiteren wurden Bindungsassays mit einem zusätzlichen Cytosol-Inkubationsschritt durchgeführt.

4.4.1. Zugabe von Cytosol zu vorbehandelten Peroxisomen

Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli *in vitro* wurde zwar durch Vorbehandlung der Peroxisomen mit KCl reduziert (siehe auch Abbildung 26), sie wurde aber durch Zugabe von Rattenlebercytosol vollkommen wiederhergestellt (Abbildung 27). Sowohl die Absenkung des Bindungslevels durch KCl-Behandlung, als auch die Wiederherstellung der Bindungskapazität mit Cytosol ist signifikant bzw. hoch signifikant. Dagegen konnte die reduzierte Bindung infolge der Trypsin-Vorbehandlung der Peroxisomen durch die Zugabe von Rattenlebercytosol nicht kompensiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der KCl-sensitive peroxisomale Bindungsfaktor durch ein oder mehrere cytosolische Proteine funktionell ersetzt werden kann. Denkbar ist auch, daß ein cytosolischer Pool dieses peripheren Proteins der Peroxisomenmembran vorliegt. Im Kontrast dazu wird durch die Protease-Behandlung die Bindungsfähigkeit der Peroxisomen an Mikrotubuli irreversibel reduziert. Somit scheint dieser Protease-Effekt nicht auf die Proteolyse des KCl-sensitiven peripheren peroxisomalen Membranproteins zurückzuführen zu sein. Vielmehr könnte die proteolytisch bedingte Modifikation eines potentiellen peroxisomalen Membranrezeptors für den KCl-sensitiven Bindungsfaktor der Grund für den Verlust von Bindungskapazität sein.

4.4.2. Cytosol-Konzentrationsreihe

Der im vorigen Abschnitt beschriebene Effekt von Rattenlebercytosol auf die *in vitro* Bindung von KCl-behandelten Peroxisomen an Mikrotubuli wies eine Konzentrationsabhängigkeit auf (Abbildung 28). Während bei niedrigen Cytosol-Konzentrationen (1 bzw. 2,5 mg Protein/ml)

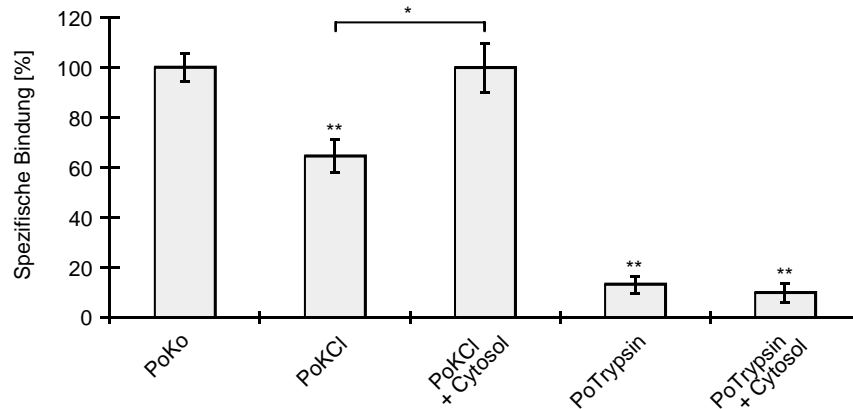


Abbildung 27: Die Zugabe von Cytosol kann die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen wiederherstellen, nicht aber die von Protease-behandelten Peroxisomen. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Zu den KCl-vorbehandelten Peroxisomen (PoKCl) und den Trypsin-vorbehandelten Peroxisomen (PoTrypsin) wurde vor dem *in vitro* Bindungsassay Rattenlebercytosol (5 mg Protein/ml) hinzugefügt. Deren Bindungskapazität wird verglichen mit nicht vorbehandelten Peroxisomen (PoKo), bzw. mit PoKCl oder PoTrypsin, die nicht mit Cytosol supplementiert wurden. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

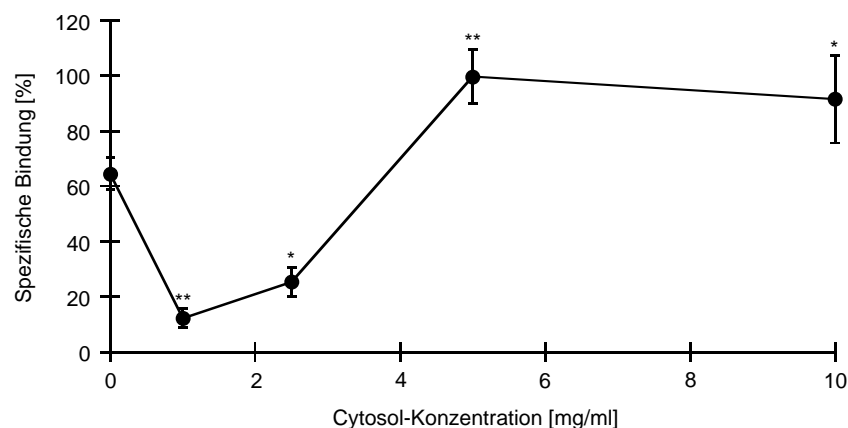


Abbildung 28: Die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen hängt von der Konzentration des zugefügten Cytosols ab. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Zu den KCl-vorbehandelten Peroxisomen wurden vor dem *in vitro* Bindungsassay verschiedene Konzentrationen an Rattenlebercytosol (1, 2,5, 5, bzw. 10 mg Protein/ml) hinzugefügt. Deren Bindungskapazität wird verglichen mit nicht supplementierten Peroxisomen. Während niedrige Cytosolkonzentrationen die Bindung inhibierten, steigerten höhere Konzentrationen die Bindung. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber den nicht supplementierten Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen noch weiter auf etwa 20 % des Wertes für nicht behandelte Kontrollperoxisomen absank, trat nach Zugabe höherer Cytosol-Konzentrationen (5 bzw. 10 mg Protein/ml) eine Wiederherstellung der Bindungskapazität auf das Niveau der nicht behandelten Kontrollperoxisomen ein. Sowohl das Absenken der Bindungsfähigkeit KCl-behandelter Peroxisomen mit geringen Cytosolmengen als auch die Steigerung der Bindungsfähigkeit mit höheren Cytosolmengen, war signifikant bzw. hoch signifikant. Dieser gegensätzliche Effekt von Cytosol könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei niedrigen Cytosol-Konzentrationen der Einfluß von cytosolischen Proteinen, die einen inhibitorischen Effekt auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli haben, überwiegt. Bei höhe-

ren Cytosol-Konzentrationen könnte dann der Einfluß von cytosolischen Proteinen zum Tragen kommen, die die Bindung steigern.

4.4.3. Vorinkubation mit Cytosol

Wie bereits erwähnt wurde, übt Cytosol einen gegensätzlichen Effekt auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli aus. Um die Einflüsse des Cytosols, die auf eine Interaktion mit Mikrotubuli beruhen, selektiv zu betrachten, wurde ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit Rattenlebercytosol in das Protokoll des Bindungsassays eingefügt. Dazu wurden die Wells nach dem Blocken mit Casein mit Cytosol inkubiert und danach mit Puffer gewaschen, so daß im Well nur die cytosolischen Proteine verblieben, die spezifisch an Mikrotubuli banden. Anschließend wurde der Bindungsassay mit der Inkubation von KCl-behandelten Peroxisomen wie gewohnt fortgeführt. Durch die Vorinkubation der Mikrotubuli mit Cytosol konnte die Bindungskapazität der Peroxisomen deutlich auf das 2,5-fache des Ausgangswertes gesteigert werden (Abbildung 29). Somit ist der die Bindung stimulierende Effekt des Cytosols auf Proteine zurückzuführen, die mit Mikrotubuli interagieren.

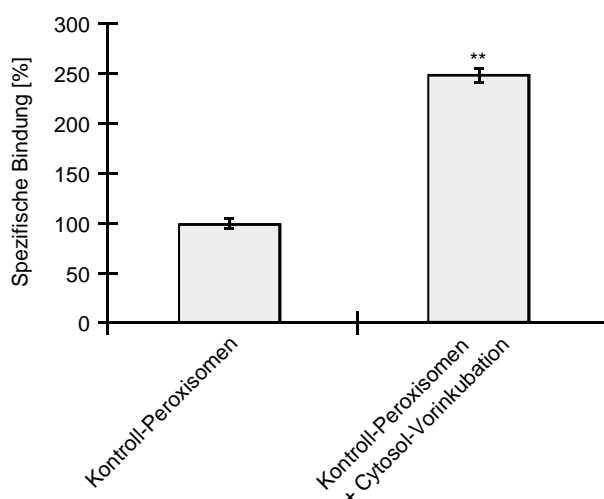


Abbildung 29: Der bindungssteigernde Effekt von Cytosol beruht auf cytosolischen Proteinen, die an Mikrotubuli binden. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Abweichend vom Standard-Bindungsassay wurde ein zusätzlicher Inkubationsschritt eingeschoben. Nach dem Blocken mit Casein wurden die Wells für 40 Minuten mit 40 µl Cytosol (5 mg Protein/ml) inkubiert und einmal mit 50 µl pro Well P/G/T-Puffer gewaschen. Die Vorinkubation mit Cytosol führte zu einer deutlichen Bindungssteigerung. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 4 Experimenten. Der signifikante Unterschied gegenüber den Kontroll-Peroxisomen wurde mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (**: $p < 0,01$).

4.4.4. Zugabe von vorbehandeltem Cytosol

Um die Eigenschaften der cytosolischen Proteine, die die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli stimulieren, weiter zu untersuchen, wurde das Rattenlebercytosol auf verschiedene Weise vorbehandelt und dann zu den Peroxisomen in den Bindungsassay zugegeben. Die Vorbehandlungen von Cytosol mit den Proteasen Trypsin und Proteinase K sowie der alkylierenden Substanz NEM verhinderten nicht nur den positiven Einfluß von Cytosol auf die Bindung KCl-behandelter Peroxisomen an Mikrotubuli, sie führten sogar zu einer signifikanten Reduktion auf 26 – 30 % des Bindungsniveaus, das für nicht-supplementierte KCl-behandelte Peroxisomen erhalten wurde (Abbildung 30). Somit scheinen die cytosolischen Proteine, die die Bindungskapazität der Peroxisomen steigern, Protease- und NEM-sensitiv zu sein. Durch die Inaktivierung dieser Proteine können dann die inhibitorischen Faktoren des Cytosols wieder dominieren (siehe auch Abschnitt 4.4.2.).

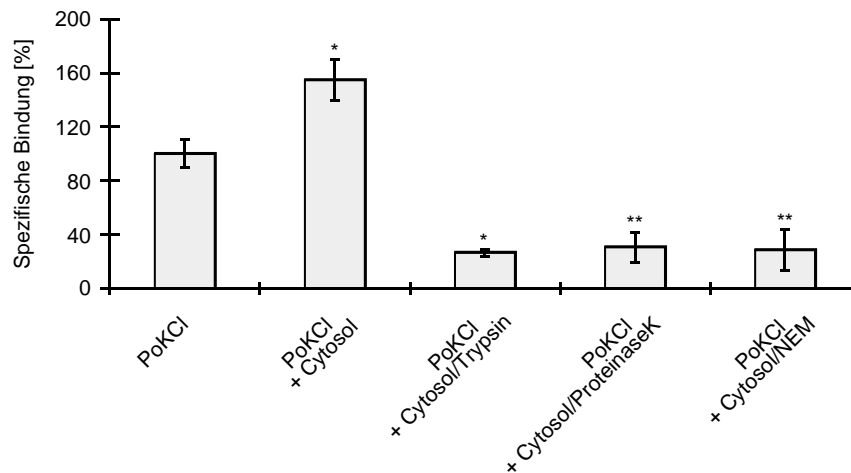


Abbildung 30: Die Steigerung der Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen durch Cytosol ist Protease- und NEM-sensitiv. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Zu den KCl-vorbehandelten Peroxisomen (PoKCl) wurde vor dem *in vitro* Bindungsassay Rattenlebercytosol bzw. vorbehandeltes Rattenlebercytosol (jeweils 5 mg Protein/ml) hinzugefügt. Cytosol wurde mit TPCK-behandeltem Trypsin (0,1 mg Protein/ml), mit Proteinase K (1 mg protein/ml), bzw. mit NEM (4 mM) vorbehandelt. PoKCl dient als Kontrolle. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens 4 Experimenten. Signifikante Unterschiede gegenüber nicht supplementierten KCl-behandelten Peroxisomen wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

5. Identifizierung und Isolierung von Proteinen, die an der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli beteiligt sind

In diesem Abschnitt wird die Identifizierung und Aufreinigung von Proteinen beschrieben, die an der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli beteiligt sind. Dazu wurden chromatographische Methoden wie Gelfiltration und Affinitätschromatographie eingesetzt. Die so aufgereinigten Proteinfraktionen wurden mit dem Bindungsassay auf ihren bindungssteigernden Effekt getestet, und ihre Kreuzreaktivität in Immunoblots mit CLIP-Antikörpern wurde überprüft. Weiterhin wurde die Interaktion von Proteinen dieser Proteinfraktionen mit Mikrotubuli untersucht.

5.1. Fraktionierung von KCl-Eluat

Der in Abschnitt 4.3.2. beschriebene Versuch deutet darauf hin, daß durch KCl-Behandlung ein peripheres Protein der Peroxisomenmembran, das die Bindung an Mikrotubuli vermittelt, abgelöst wird. Nun sollte versucht werden, dieses Protein aus dem KCl-Eluat zu isolieren. Dazu wurde das KCl-Eluat mittels Gelfiltration fraktioniert und die Fraktionen auf ihren Effekt im Bindungsassay getestet. Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität dieser Fraktionen und verschiedener Peroxisomen-Präparationen mit Antikörpern gegen CLIPs überprüft. So sollte geklärt werden, ob ein Protein aus der CLIP-Proteinfamilie für die Vermittlung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli in Frage kommt.

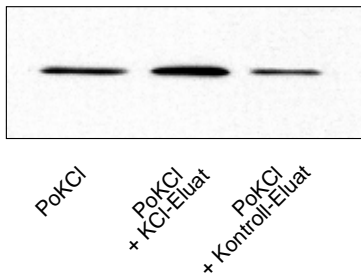


Abbildung 31: Dialysiertes KCl-Eluat erhöht die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt. Hier dargestellt sind die Uratoxidase-Signale nach der ECL-Reaktion. KCl-behandelten Peroxisomen (PoKCl) wurde vor ihrem Einsatz im Bindungsassay dialysiertes KCl-Eluat (Eluat der Behandlung von Peroxisomen mit 0,1 M KCl) und dialysiertes Kontroll-Eluat (Eluat der Behandlung von Peroxisomen mit Homogenisationspuffer) zugefügt.

5.1.1. Fraktionierung von KCl-Eluat mittels Gelfiltration

Zunächst sollte nachgeprüft werden, ob die KCl-Behandlung der Peroxisomen wie vermutet Proteine ablöst, die für die Bindung an Mikrotubuli wichtig sind, oder ob KCl auf andere Weise die Bindungsfähigkeit der Peroxisomen beeinträchtigt. Zur Klärung dieser Frage wurden Bindungsassays durchgeführt, bei denen KCl-behandelte Peroxisomen mit dialysiertem KCl-Eluat supplementiert wurden. Die Dialyse diente der Entfernung des KCl. Abbildung 31 zeigt einen entwickelten Röntgenfilm dieses Bindungsassays. Es ist deutlich zu sehen, daß die Bindungsfähigkeit KCl-behandelter Peroxisomen durch die Zugabe von dialysiertem KCl-Eluat erhöht wurde. Die Kontrolle mit dem Eluat von Peroxisomen, die mit Homogenisationspuffer anstelle von KCl inkubiert wurden, wies keine Bindungssteigerung auf. Damit wird die Hypothese bestätigt, daß die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli in der Tat von einem peroxisomalen Protein abhängt, das durch KCl von den Peroxisomen abgelöst wird.

Um dieses Protein aufzureinigen, wurde das KCl-Eluat mit einer Superdex-200 Säule fraktioniert. Mit dieser Säule erfolgt die Auftrennung der Proteine unter nativen Bedingungen entsprechend ihrer Größe. Die Abbildung 32 illustriert diese Auftrennung. Dargestellt ist ein silbergefärbtes SDS-Gel des KCl-Eluates und der Fraktionen 26 bis 43 des KCl-Eluates. Es wird deutlich, daß sich die Elution eines Proteines über mehrere Fraktionen hinzieht. Rot unterlegt sind die Fraktionen, die im Bindungsassay einen stimulierenden Effekt zeigten (siehe Abbildung 33). In diesen Fraktionen (Fraktion 35 bis 39) ist die Gesamtproteinmenge wesentlich geringer als z.B. in den Fraktionen 29 bis 31. Anhand einer mit Proteinen bekannten Molekulargewichtes erstellten Eichgerade für die Superdex-200 Säule, wurde für die Fraktionen 35 bis 39 ein Molekulargewicht der eluierenden nativen Proteine von etwa 150 kDa ermittelt. Es ist zu beachten, daß bei dem in Abbildung 32 dargestellten SDS-Gel die aufgetragenen Proteine aufgrund der reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE in Polypeptidketten aufgetrennt wurden.

5.1.2. Fraktioniertes KCl-Eluat im Bindungsassay

Die Fraktionen des mit der Superdex-200 Säule aufgetrennten KCl-Eluates wurden zu den Peroxisomen-Präparationen im Bindungsassay zugefügt. Bestimmte Superdex-200 Fraktionen übten nicht nur einen ähnlich stimulierenden Effekt auf die Bindung KCl-behandelter Peroxisomen aus wie Cytosol, sie übertrafen sogar den Effekt von Cytosol um bis zu 56 % (Abbildung 33 B). Einen Überblick über das Bandenmuster der Polypeptide der Superdex-200 Fraktionen gibt das SDS-Gel in Abbildung 32.

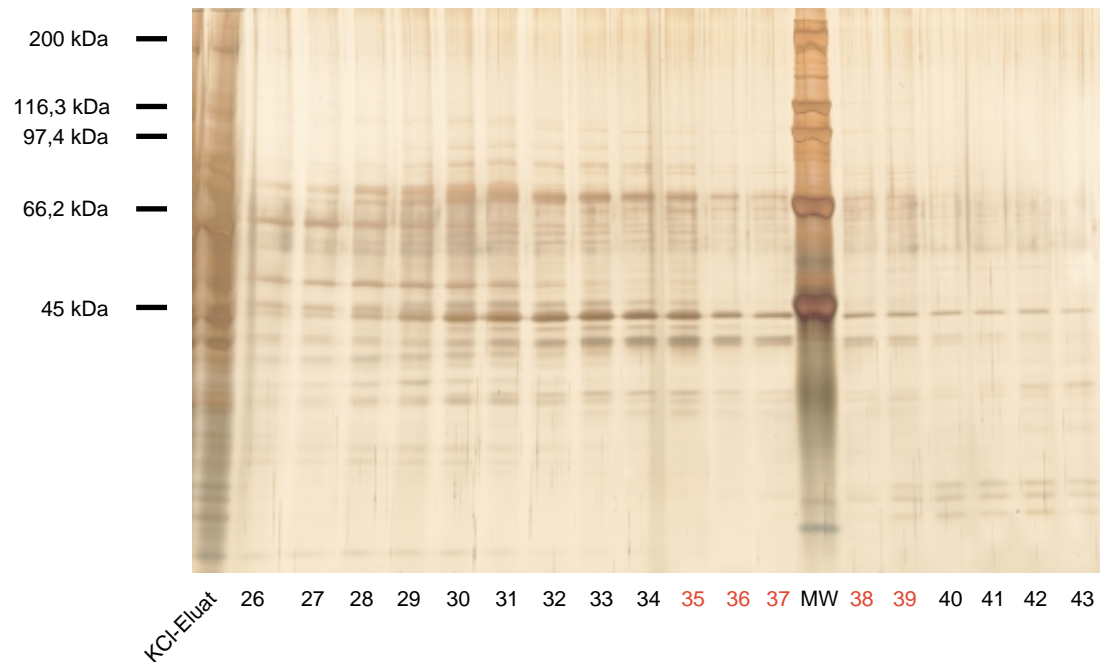


Abbildung 32: Gelfiltration von KCl-Eluat. Das Eluat von KCl-behandelten Peroxisomen wurde mit einer Superdex-200 Säule entsprechend den Molekulargewichten der Proteine chromatographisch aufgetrennt. Hier ist ein silbergefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen dieser Säulenchromatographie, dem KCl-Eluat und dem „high range“ Molekulargewichtsstandard (MW) dargestellt. Die rot hervorgehobenen Fraktionen zeigten einen deutlich stimulierenden Effekt auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli (siehe Abbildung 33).

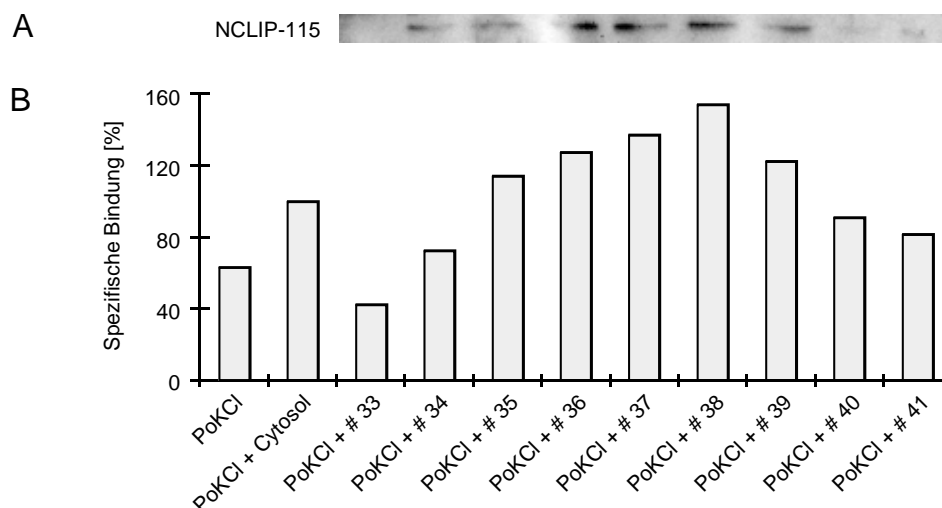


Abbildung 33: Bestimmte Superdex-200 Fraktionen, die mit einem Antikörper gegen CLIP-115 kreuzreagieren, erhöhen die Bindung von KCl-behandelten Peroxisomen an Mikrotubuli.

A Entwickelter Röntgenfilm eines Immunoblots der Superdex-200 Fraktionen 33 bis 41 des KCl-Eluates (# 33 – # 41) mit dem NCLIP-115-Antikörper. Dieser Antikörper, der gegen den N-Terminus von CLIP-115 gerichtet ist (DE ZEEUW et al. 1997), markierte eine einzige Polypeptidbande bei etwa 70 kDa. **B** Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt und die Bindung wurde quantifiziert. Zu den KCl-vorbehandelten Peroxisomen (PoKCl) wurde vor dem *in vitro* Bindungsassay Rattenlebercytosol (5 mg Protein/ml) bzw. die Superdex-200 Fraktionen 33 bis 41 hinzugefügt. PoKCl dienen als Kontrolle.

5.1.3. Kreuzreaktionen mit CLIP-Antikörpern

Von essentieller Bedeutung für die Bindung von Organellen an Mikrotubuli scheinen Proteine aus der Familie der cytoplasmatischen Linker Proteine (CLIPs) zu sein (RICKARD und KREIS 1996). Für zwei Proteine aus dieser Familie konnte diese Funktion bisher nachgewiesen werden (siehe auch die Tabellen 6 und 7, Seite 85 und 89): für CLIP-170 (PIERRE et al. 1992) und CLIP-115 (DE ZEEUW et al. 1997). Um zu überprüfen, ob ein Protein aus der CLIP-Proteinfamilie für die Vermittlung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli in Frage kommt, wurde die Kreuzreaktivität der Superdex-200 Fraktionen des KCl-Eluates und von verschiedenen Peroxisomen-Präparationen mit Antikörpern gegen CLIPs getestet. Aufgrund der großen Homologie der bekannten CLIP-Proteine, insbesondere der beiden N-terminalen Mikrotubuli-Bindungsdomänen, ist eine Kreuzreaktion von CLIPs mit Antikörpern gegen andere CLIPs nicht unwahrscheinlich.

Superdex-200 Fraktionen, die die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli stimulierten, zeigten in Immunoblots mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von CLIP-115 (NCLIP-115) (DE ZEEUW 1997) eine einzige immunreaktive Bande bei etwa 70 kDa (Abbildung 33 A). Die Intensität dieser Bande korrelierte mit dem stimulierenden Effekt der entsprechenden Superdex-200 Fraktion im Bindungsassay (vergleiche mit Abbildung 33 B).

Die Superdex-200 Fraktionen mit dem stimulierenden Effekt im Bindungsassay zeigten auch mit einem Antikörper gegen CLIP-170 (PIERRE et al. 1992) eine immunreaktive Bande bei etwa 70 kDa, wengleich diese Kreuzreaktion deutlich schwächer ausgeprägt war, als mit dem Antikörper gegen CLIP-115. Abbildung 34 zeigt eine Markierung von mehreren Polypeptiden des KCl-Eluates mit dem CLIP-170-Antikörper, u.a. ein Polypeptid von etwa 70 kDa. Diese Bande ist auch bei der Superdex- 200 Fraktion 37 zu finden, sowie eine weitere noch schwächere Bande von etwa 75 kDa.

Bei Immunoblots mit verschiedenen Peroxisomen-Präparationen markierte der NCLIP-115-Antikörper eine Polypeptidbande von ebenfalls ca. 70 kDa (Abbildung 35). Dabei zeigten unbehandelte Peroxisomen und Peroxisomen, die mit einer niedrigen KCl-Konzentrationen

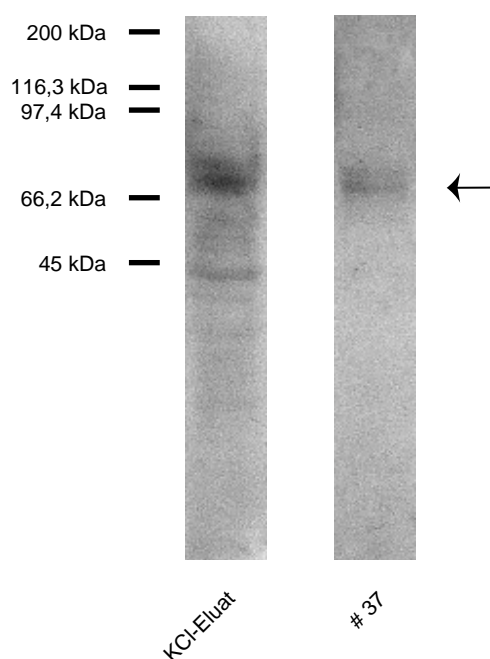


Abbildung 34: CLIP-170-Antikörper kreuzreagieren in Immunoblots mit einem 70 kDa Protein aus Superdex-200 Fraktionen des KCl-Eluates, die im Bindungsassay die Bindungskapazität KCl-behandelter Peroxisomen erhöhen. Dargestellt ist ein entwickelter Röntgenfilm eines Immunoblots von KCl-Eluat und der Superdex-200 Fraktion 37 des KCl-Eluates (# 37) mit einem Antikörper gegen CLIP-170 (2D6 und 4D3, PIERRE et al. 1992). Dieser Antikörper markierte bei # 37 eine Polypeptidbande von etwa 70 kDa (Pfeil) und direkt darüber eine schwächere Bande. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde der „high range“ Molekulargewichtstandard verwendet.

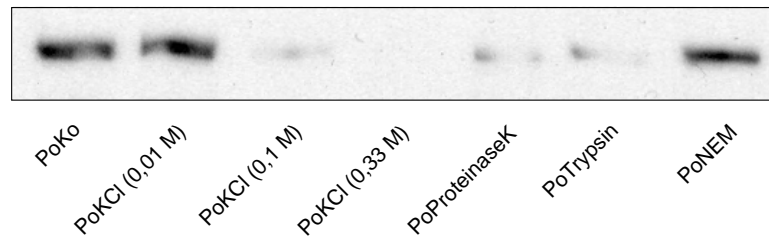


Abbildung 35: Ein 70 kDa Protein peroxisomaler Präparationen kreuzreagiert mit einem Antikörper gegen CLIP-115. Dargestellt ist ein entwickelter Röntgenfilm eines Immunoblots von verschiedenen Peroxisomen-Präparationen mit dem NCLIP-115-Antikörper, der gegen den N-Terminus von CLIP-115 gerichtet ist (DE ZEEUW et al. 1997). Dieser Antikörper markierte eine prominente Polypeptidbande bei etwa 70 kDa, insbesondere bei den Kontrollperoxisomen, den NEM-behandelten Peroxisomen und den mit 0,01 M KCl behandelten Peroxisomen. Die Peroxisomen (Po) wurden vorbehandelt mit verschiedenen KCl-Konzentrationen (0,01 M, 0,1 M, 0,33 M), mit Proteinase K (1 mg Protein/ml), mit TPCK-behandeltem Trypsin (0,1 mg Protein/ml), bzw. mit NEM (4 mM). Nicht vorbehandelte Peroxisomen (PoKo) dienten als Kontrolle.

(0,01 M) behandelt wurden, sowie NEM-behandelte Peroxisomen ein starkes Signal. Die Behandlung von Peroxisomen mit höheren KCl-Konzentrationen (0,1 M, 0,33 M) und mit den Proteasen Trypsin und Proteinase K führte zu einer starken Reduktion der Bandenintensität. Auch nach Behandlung der Peroxisomen mit 0,33 M KCl ließ sich das 70 kDa Polypeptid noch nachweisen, wie man es auf Röntgenfilmen mit längerer Expositionszeit sehen konnte.

Die Kreuzreaktion eines 70 kDa Polypeptides aus den Superdex-200 Fraktionen, die im Bindungsassay die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli steigern, mit Antikörpern gegen CLIP-115 und CLIP-170, weist auf die mögliche Beteiligung eines CLIP-ähnlichen Proteines an der Bindung hin. Dieser Hinweis wird unterstützt durch die Kreuzreaktion des CLIP-115-Antikörpers mit einem Polypeptid aus peroxisomalen Präparationen, welches das gleiche Molekulargewicht aufweist. Dieses Polypeptid wird durch KCl- und Protease-Behandlung von den Peroxisomen entfernt, was im Einklang mit der stark reduzierten Bindungskapazität der so vorbehandelten Peroxisomen im Bindungsassay steht (siehe Abbildungen 25 und 26). Das starke immunreaktive Signal des 70 kDa Polypeptids bei den NEM-behandelten Peroxisomen könnte, hinsichtlich der geringen Bindungskapazität dieser Peroxisomen im Bindungsassay, ein Hinweis darauf sein, daß NEM das 70 kDa Polypeptid alkyliert und dadurch dessen Bindungseigenschaften beeinträchtigt, es aber nicht von den Peroxisomen ablöst.

5.1.4. Einfluß von Konkurrenz mit Antikörpern und Immundepletion auf den Effekt von fraktioniertem KCl-Eluat im Bindungsassay

Zur weiteren Bestätigung des bindungssteigernden Effektes von KCl-Eluat und bestimmten Superdex-200 Fraktionen des KCl-Eluates, wurden Bindungsassays durchgeführt, bei denen das KCl-Eluat und die Superdex-200 Fraktion 38 immundepletiert wurden, bzw. Antikörper zwecks Konkurrenz zugefügt wurden.

Der stimulierende Effekt von Superdex-200 Fraktion 38 des KCl-Eluates im Bindungsassay wurde durch die zusätzliche Inkubation der Peroxisomen-Präparation mit dem NCLIP-115-Antikörper aufgehoben (Abbildung 36 A). Analog dazu führte die Behandlung mit MTCLIP-1, einem Mausantiserum, das gegen eine Peptidsequenz aus der hochkonservierten Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIPs hergestellt wurde, zum Aufheben des stimulierenden Effektes der Superdex-200 Fraktionen 38. Die Inkubation mit dem entsprechenden Präimmenserum minderte den stimulierenden Einfluß der Fraktion 38 nicht (Abbildung 36 B).

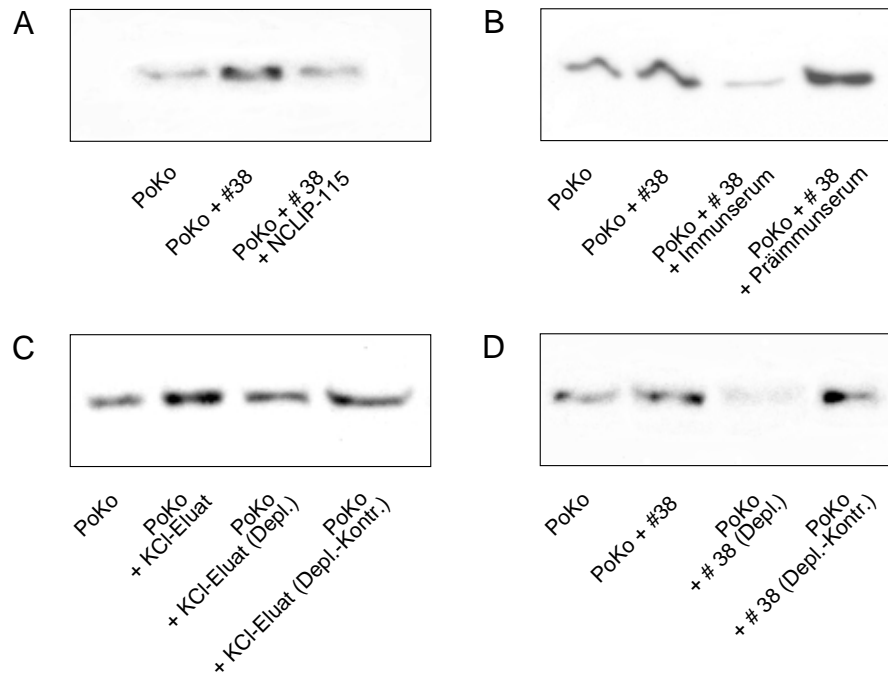


Abbildung 36: Antikörper gegen CLIPs und Immundepletion heben den stimulierenden Einfluß von KCl-Eluat und fraktioniertem KCl-Eluat auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli auf. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt. Hier dargestellt sind die Uratoxidase-Signale nach der ECL-Reaktion. **A** Nicht vorbehandelten Peroxisomen (PoKo) wurde vor ihrem Einsatz im Bindungsassay Superdex-200 Fraktion 38 des KCl-Eluates (# 38) bzw. # 38 + NCLIP-115-Antikörper (gerichtet gegen den N-Terminus von CLIP-115, De Zeeuw et al. 1997) zugefügt. **B** Den Peroxisomen wurde vor ihrem Einsatz im Bindungsassay # 38, # 38 + MTCLIP-1-Immuns serum (ein Maus-Antiserum gegen ein synthetisches Peptid aus der hochkonservierten Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIP-Proteinfamilie), bzw. # 38 + MTCLIP-1-Präimmuns serum (als Kontrolle zum Immuns serum) zugefügt. **C** Den Peroxisomen wurde vor ihrem Einsatz im Bindungsassay KCl-Eluat, mit MTCLIP-1-Immuns serum depletiertes KCl-Eluat bzw. mit MTCLIP-1-Präimmuns serum depletiertes KCl-Eluat (als Depletionskontrolle) zugefügt. **D** Den Peroxisomen wurde vor ihrem Einsatz im Bindungsassay # 38, mit MTCLIP-1-Immuns serum depletierte # 38 bzw. mit MTCLIP-1-Präimmuns serum depletierte # 38 (als Depletionskontrolle) zugefügt. **A – D** PoKo diente jeweils als Kontrolle.

Durch Immundepletion des KCl-Eluates (Abbildung 36 C) und der Superdex-200 Fraktion 38 des KCl-Eluates (Abbildung 36 D) mit dem MTCLIP-1-Immuns serum wurde der stimulierende Einfluß des KCl-Eluates bzw. der Fraktion 38 aufgehoben. Im Gegensatz dazu vermochte die Kontrolldepletion mit dem entsprechenden Präimmuns serum die Bindungssteigerung durch KCl-Eluat und Fraktion 38 nicht zu beeinträchtigen.

Die Kompetitionsversuche und insbesondere die Depletionsversuche deuteten darauf hin, daß der Peptidantikörper gegen die Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIPs mit dem für die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wichtigen Protein des KCl-Eluates, bzw. dessen Superdex-200 Fraktionen, interagiert. Dies ist ein weiteres Indiz für die Bedeutung eines CLIP-ähnlichen Proteins für die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli.

5.2. Proteine, die mit Mikrotubuli interagieren

Nachdem der bisherige Schwerpunkt auf der Interaktion von Proteinen mit Peroxisomen lag, sollte nun die Assoziation dieser Proteine an Tubulin bzw. an Mikrotubuli genauer untersucht werden. Dazu wurden Tubulin-Overlay-Blots und Mikrotubuli-Sedimentationsassays durchgeführt.

5.2.1. Tubulin-Overlay-Blot

Beim Tubulin-Overlay-Blot handelt es sich um einen Immunoblot, dem ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit Tubulin eingefügt wird. Das Tubulin, das sich an die aufgeblotteten Polypeptide des Immunoblots anlagert, wird nach den üblichen Immuninkubationsschritten (u.a. mit einem Primärantikörper gegen Tubulin) und der ECL-Reaktion detektiert. Abbildung 37 zeigt das Bandenmuster von den Polypeptiden, die mit Tubulin interagieren. Bei den Peroxisomen-Präparationen, dem KCl-Eluat und der Superdex-200 Fraktion 37 des KCl-Eluates sind zahlreiche Polypeptide zu erkennen, die von Tubulin markiert wurden. Der Pfeil in der Abbildung hebt eine Bande von etwa 70 kDa hervor, die beim KCl-Eluat und der Fraktion 37 deutlich sichtbar ist. Ein Polypeptid gleichen Molekulargewichtes scheint eine für die Assoziation von Peroxisomen an Mikrotubuli wichtige Rolle zu spielen (siehe Abschnitt 5.1.3.). Zur Klärung, ob das 70 kDa Polypeptid, das mit Tubulin interagiert, identisch ist mit dem durch CLIP-Antikörper markierten Polypeptid, wurde ein Mikrotubuli-Sedimentationsassay durchgeführt.

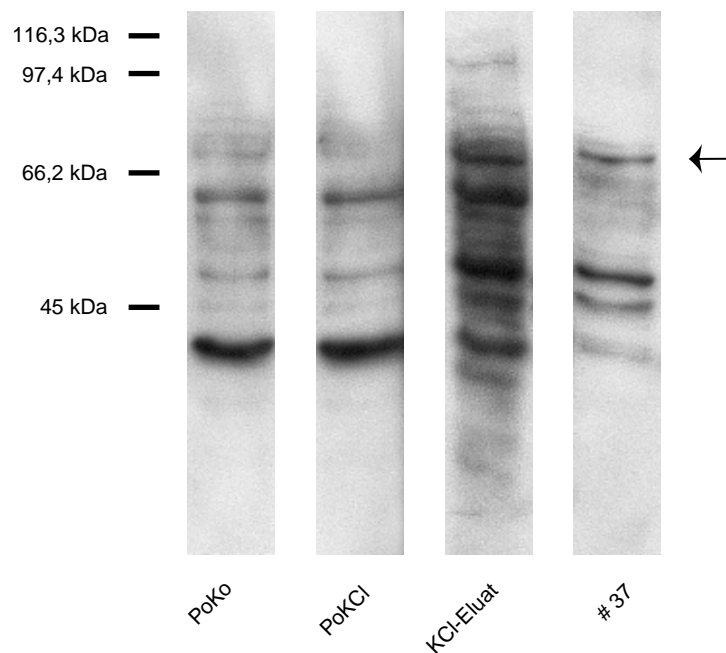


Abbildung 37: Im Tubulin-Overlay-Blot wird bei fraktioniertem KCl-Eluat u.a. ein 70 kDa Protein markiert. Hier ist ein Tubulin-Overlay-Blot von nicht vorbehandelten Peroxisomen (PoKo), mit KCl vorbehandelten Peroxisomen (PoKCl), KCl-Eluat und Superdex-200 Fraktion 37 des KCl-Eluates (# 37) präsentiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blotting der hier aufgeführten Proben erfolgte die Inkubation der Blotmembran mit Tubulin. Anschließend wurde an die Membran gebundenes Tubulin mit einem β -Tubulin-Antikörper markiert und die Banden nach Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (RaM-IgG-HRP) und der ECL-Reaktion visualisiert. Der „high range“ Molekulargewichtsstandard diente zur Bestimmung des Molekulargewichtes. Hervorgehoben ist die Polypeptidbande bei etwa 70 kDa (Pfeil).

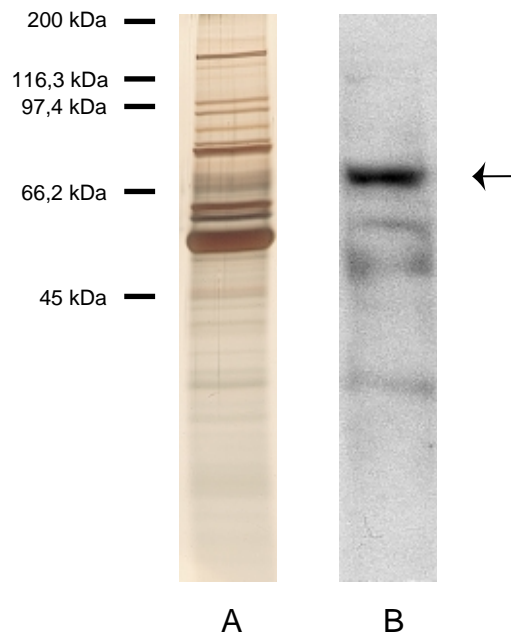


Abbildung 38: Ein Antikörper gegen CLIP-115 markiert in Immunoblots ein 70 kDa Polypeptid, das mit Mikrotubuli cosedimentiert. **A** Silbergefärbtes SDS-Gel von Proteinen des KCl-Eluates, die mit Mikrotubuli cosedimentierten und mit NaCl eluiert wurden. Bei der prominenten Bande von 55 kDa handelt es sich um Tubulin. **B** Entwickelter Röntgenfilm eines Immunoblots dieser Proteinfraktion mit dem NCLIP-115-Antikörper, der gegen den N-Terminus von CLIP-115 gerichtet ist (DE ZEEUW et al. 1997). Durch den Pfeil ist die starke Bande bei 70 kDa hervorgehoben. Der „high range“ Molekulargewichtsstandard diente zur Bestimmung des Molekulargewichtes.

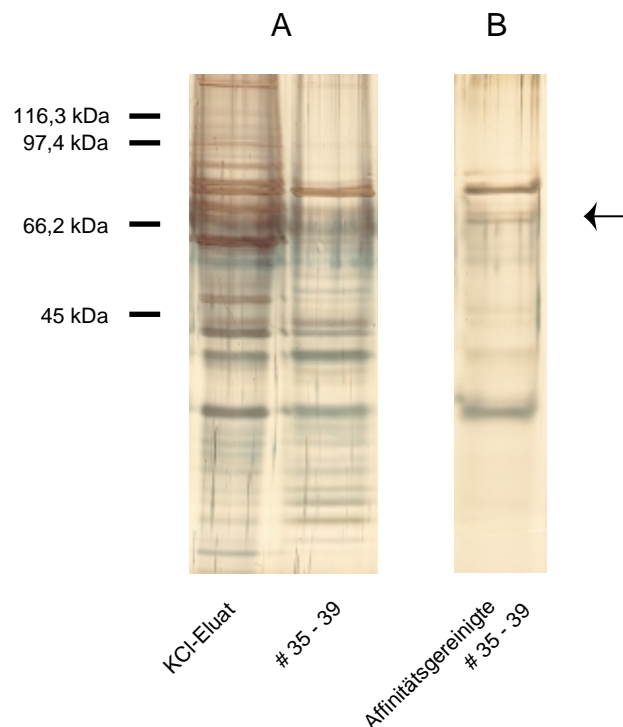


Abbildung 39: Affinitätschromatographie von fraktioniertem KCl-Eluat. Die vereinigten Superdex-200 Fraktionen 35 bis 39 des KCl-Eluates (# 35 – 39) wurden mit einer NHS-aktivierten Säule, an die ein Peptidantikörper (MTCLIP-1) gegen einen hochkonservierten Abschnitt der Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIP-Proteinfamilie gekoppelt wurde, affinitätsgereinigt. Hier sind zwei silbergefärbte SDS-Gele dargestellt: **A** KCl-Eluat und # 35 – 39; **B** affinitätsgereinigte # 35 – 39. Der „high range“ Molekulargewichtsstandard diente der Bestimmung des Molekulargewichtes. Durch den Pfeil ist die Polypeptidbande bei 70 kDa hervorgehoben.

5.2.2. Mikrotubuli-Sedimentationsassay

Mit dem Mikrotubuli-Sedimentationsassay wurden Proteine des Eluates KCl-behandelter Peroxisomen, die mit Mikrotubuli interagieren, zusammen mit den Mikrotubuli pelletiert und durch NaCl-Zugabe eluiert. Das Bandenmuster der so hergestellten Proteinfraktion im silbergefärbten SDS-Gel ist in Abbildung 38 A dargestellt. Wie zu erwarten war, cosedimentierten mehrere Proteine mit Mikrotubuli, u.a. ist eine schwache Polypeptidbande bei etwa 70 kDa zu sehen. Ein Immunoblot mit dem NCLIP-115-Antikörper weist eine deutliche Kreuzreaktion mit dieser 70 kDa Polypeptidbande auf (siehe Pfeil, Abbildung 38 B).

Dieser Versuch zeigt die Interaktion eines KCl-extrahierbaren peroxisomalen Polypeptids von 70 kDa sowohl mit Mikrotubuli, als auch mit dem CLIP-Antikörper und liefert somit einen weiteren Beleg für die Rolle eines CLIP-ähnlichen 70 kDa Polypeptides bei der Vermittlung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli *in vitro*.

5.3. Affinitätsreinigung von fraktioniertem KCl-Eluat

Da die Fraktionierung des KCl-Eluates mit der Superdex-200 Säule Fraktionen mit mehreren Polypeptiden ergab, sollte durch den Einsatz eines weiteren Chromatographieschrittes die im Bindungsassay wirksame Proteinfraktion weiter aufgereinigt werden. Für die hierfür eingesetzte Affinitätschromatographie wurde zunächst, nach der Affinitätsreinigung des MTCLIP-1-Antiserums (das gegen ein synthetisches Peptid aus der hochkonservierten Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIPs gerichtet ist), der aufgereinigte MTCLIP-1-Antikörper an eine NHS-aktivierte Affinitätssäule gekoppelt. Mit dieser Säule wurde dann die Affinitätsreinigung von den vereinigten Superdex-200 Fraktionen 35 bis 39 des KCl-Eluates durchgeführt. In der Abbildung 39 sind die chromatographischen Aufreinigungsschritte des KCl-Eluates durch silbergefärbte Gele dokumentiert. Links ist das Bandenmuster des KCl-Eluates zu sehen, in der Mitte sind die vereinigten Superdex-200 Fraktionen 35 bis 39 des KCl-Eluates dargestellt und rechts die affinitätsgereinigte Fraktion 35 bis 39. Zwar wurden durch die Affinitätsreinigung die meisten Polypeptidbanden aus der Proteinfraktion eliminiert, jedoch finden sich neben dem Polypeptid von etwa 70 kDa (siehe Pfeil) noch weitere Polypeptide in der affinitätsgereinigten Proteinfraktion. Darunter ist eine starke Polypeptidbande von etwa 80 kDa, die auch schon im KCl-Eluat als starke Bande zu finden war.

Um zu testen, ob diese affinitätsgereinigte Proteinfraktion (APF) die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli steigert, wurde ein Bindungsassay durchgeführt. In Abbildung 40 ist ein entwickelter Röntgenfilm dieses Bindungsassays zu sehen. Durch die APF wurde die Bindungskapazität KCl-behandelter Peroxisomen deutlich gesteigert. Ein Kontrollversuch, bei

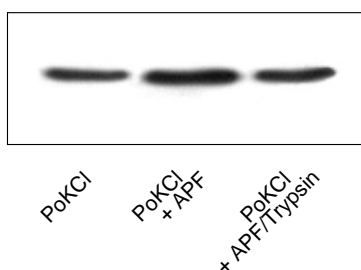


Abbildung 40: Affinitätsgereinigtes fraktioniertes KCl-Eluat erhöht die Bindungskapazität von KCl-behandelten Peroxisomen. Der *in vitro* Bindungsassay wurde ausgeführt. Hier dargestellt sind die Uratoxidase-Signale nach der ECL-Reaktion. KCl-behandelten Peroxisomen (PoKCl) wurde vor ihrem Einsatz im Bindungsassay eine affinitätsgereinigte Proteinfraktion (APF) und als Kontrolle mit TPCK-behandeltem Trypsin (0,1 mg Protein/ml) inkubierte APF zugefügt. Die APF wurde nach Affinitätschromatographie der Superdex-200 Fraktionen 35 bis 39 des KCl-Eluates mit einer NHS-aktivierten Säule, an die ein Peptidantikörper (MTCLIP-1) gegen einen hochkonservierten Abschnitt der Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIP-Proteinfamilie gekoppelt wurde, erhalten.

dem die APF einem Trypsinverdau ausgesetzt wurde, führte nicht zu einer Bindungssteigerung.

Dieser Versuch zeigt, daß auch nach Gelfiltration und Affinitätsreinigung des Eluates KCl-behandelter Peroxisomen der bindungssteigernde Effekt der so erhaltenen Proteinfraction erhalten bleibt. Zwar konnte mit den chromatographischen Aufreinigungen nicht eine einzelne Polypeptidbande isoliert werden, jedoch weisen die hier dargestellten Versuche (insbesondere die Kreuzreaktionen mit CLIP-Antikörpern, die Interaktion eines 70 kDa Polypeptides mit Mikrotubuli und die Überprüfung des Einflusses der entsprechenden Proteinfractionen auf den Bindungsassay) klar auf die wichtige Rolle eines 70 kDa Polypeptides für die *in vitro* Interaktion von Peroxisomen mit Mikrotubuli hin.

V. Diskussion

1. Die Morphologie der *in vitro* Assoziation von Peroxisomen an Mikrotubuli

Mit Hilfe der Negativkontrast-Elektronenmikroskopie und konfokaler Laserscanningmikroskopie konnte die spezifische *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli gezeigt werden und somit die mit Video-verstärkter Kontrastmikroskopie gemachten Beobachtungen (SCHRAEDER et al. 1996a, THIEMANN et al. 2000) bestätigt werden. Es zeigte sich, daß isolierte Rattenleberperoxisomen entlang des gesamten Mikrotubulus in großer Anzahl spezifisch binden. Durch die Fluoreszenzmarkierung des Peroxisomen-spezifischen Enzyms Uratoxidase konnte der eindeutige Beweis erbracht werden, daß es sich bei den dargestellten Organellen in der Tat um Peroxisomen handelt.

Zahlreiche Bindungsstudien nutzten die Negativkontrast-Elektronenmikroskopie zum Nachweis der *in vitro* Bindung von verschiedenen Organellen an Mikrotubuli. Bei axoplasmatischen Vesikeln (PRATT 1986), Lysosomen (MITHIEUX et al. 1988, RAJAS et al. 1996), sekretorischen Granula (SUPRENANT und DENTLER 1982, SEVERIN et al. 1991), cytoplasmatischen Granula (ROTHWELL et al. 1989), Exocytose-Vesikeln (VAN DER SLUIJS et al. 1990), Golgi-Vesikeln (COFFE und RAYMOND 1990) und Mitochondrien (JUNG et al. 1993) wurde – wie in dieser Studie über Peroxisomen – mit dieser Methode die enge *in vitro* Bindung an MAP-freie Mikrotubuli gezeigt. Auch mittels Elektronenmikroskopie an Ultradünnschnitten wurde die enge Assoziation von axoplasmatischen Vesikeln (PRATT 1986) bzw. Phagosomen (BLOCKER et al. 1996) an MAP-freie Mikrotubuli nachgewiesen. In einem Versuch mit MAP-vorinkubierten Mikrotubuli (SUPRENANT und DENTLER 1982) wiesen die sekretorischen Granula, die in Abwesenheit der MAPs eng an den Mikrotubulus assoziiert waren, einen größeren Abstand zum Mikrotubulus auf (ca. 20 bis 40 nm). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Funktion der MAPs als Abstandhalter. Bei der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wäre ebenfalls ein größerer Abstand zwischen Organell und mit MAPs assoziierten Mikrotubuli zu erwarten, falls die Bindung nicht durch MAPs verhindert würde. Weiterhin wurde die spezifische *in vitro* Bindung von Golgi Membranen an Mikrotubuli mit Doppelimmunfluoreszenz und Video-verstärkter Kontrastmikroskopie gezeigt (MURATA et al. 1992).

Die Ergebnisse der morphologischen Studien bestätigten eindeutig die Bindung der isolierten Partikel, die mittels Immunfluoreszenz als Peroxisomen identifiziert wurden, an Mikrotubuli.

2. Der *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay

In der hier vorliegenden Arbeit wird der erste semiquantitative *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay vorgestellt. Dieses *in vitro* System basiert auf der Bindung von Organellen an Mikrotubuli, die an die Oberfläche von Mikrotiterplatten gebunden sind, und ermöglicht die Quantifizierung der Bindung, sowie die Untersuchung der Bindungsbedingungen und der an der Bindung beteiligten Komponenten.

2.1. Validierung des *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays

Die Validität dieses Bindungsassays wurde durch mehrere voneinander unabhängige Kriterien bestätigt:

- die Auswertung der Uratoxidase-Signale auf den Immunoblots ist quantitativ
- die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli hängt von der Konzentration der Mikrotubuli und der Peroxisomen ab, ist exakt reproduzierbar und für beide Komponenten zu sättigen
- die Bindung der Peroxisomen setzt polymerisierte Mikrotubuli voraus und kann durch Zugabe freier Mikrotubuli und Antikörper gegen ein peroxisomales Membranprotein kompetitiv gehemmt werden
- für die Bindung an Mikrotubuli werden intakte Peroxisomen, umgeben von einer Membran, benötigt, da isolierte peroxisomale Cores nicht binden
- die Bindungsintensität hängt von der Inkubationszeit, der Temperatur, dem pH-Wert und den zugefügten Nukleotiden ab
- die Vorbehandlung der Peroxisomen mit Proteasen, NEM und KCl reduziert ihre Bindungsfähigkeit
- die verminderte Bindung von KCl-behandelten Peroxisomen kann durch einen oder mehrere cytosolische Faktoren, die Protease- und NEM-sensitiv sind, kompensiert werden

Der hier vorgestellte *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay erweist sich als eine geeignete Methode, um die spezifische *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli mit hoher Reproduzierbarkeit quantitativ zu erfassen.

2.2. Eigenschaften der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

In diesem Abschnitt sollen die Eigenschaften der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli kurz zusammengefasst werden, bevor im nächsten Abschnitt die Ergebnisse des Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassays mit anderen Studien zur *in vitro* Bindung von Organellen an Mikrotubuli verglichen werden. Folgende Schlüsse lassen sich aus den Versuchen mit dem Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay ziehen:

- Voraussetzung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli sind auspolymerisierte Mikrotubuli. MAPs werden für die Bindung nicht benötigt, sie behindern sogar die Anlagerung der Peroxisomen.
- Essentiell für die Bindung der Peroxisomen ist ein Rezeptor bzw. Rezeptorkomplex an der Peroxisomenmembran. Dieser Rezeptor ist Protease- und NEM-sensitiv und wird durch diese Agentien irreversibel geschädigt.
- Zur Vermittlung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wird mindestens ein Protein benötigt. Bei diesem Protein, das Protease- und NEM-sensitiv ist, handelt es sich anscheinend um ein an die Peroxisomenmembran assoziiertes Protein, das durch KCl-Behandlung von der Peroxisomenmembran abgelöst wird und von dem auch ein cytosolischer Pool existiert. Möglicherweise ist dieses Protein ein neues Mitglied der CLIP-Proteinfamilie mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa.

- Obwohl auch zugegebene Motorproteine die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli verstärken können, ist der genannte Bindungsfaktor für die *in vitro* Bindung von essentieller Bedeutung.
- Die *in vitro* Bindung wird durch ATP gesteigert. Dieser ATP-Effekt scheint auf der ATP-Hydrolyse durch eine endogene Kinase zu beruhen. Welcher Faktor dabei phosphoryliert wird, ist bislang noch unklar.

2.3. Vergleich mit anderen *in vitro* Organellen-Mikrotubuli Bindungsassays

Die in dieser Arbeit untersuchte Interaktion von Peroxisomen mit Mikrotubuli zeigt Ähnlichkeiten zur *in vitro* Bindung anderer membranumgrenzter Zellorganellen (für eine Übersicht siehe Tabelle 6), weist aber auch einige unterschiedliche Merkmale auf, wie weiter unten ausführlich diskutiert wird. Eine ähnliche Abhängigkeit der Bindungskapazität von der Konzentration der Mikrotubuli wurde für Mitochondrien (JUNG et al. 1993), trans-Golgi-Vesikel (COFFE und RAYMOND 1990) und Lysosomen (MITHIEUX et al. 1988) gezeigt. Die Bindung der Peroxisomen war sättigbar, wie die der Endocytose-Vesikel (SCHEEL und KREIS 1991) und der Golgi-Vesikel (KARECLA und KREIS 1992). Ebenso wie bei Endocytose-Vesikeln (SCHEEL und KREIS 1991), wurde die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli durch Konkurrenz mit freien Mikrotubuli deutlich herabgesetzt. Die *in vitro* Bindung von diversen membranumgrenzten Organellen an Mikrotubuli stieg – wie die der Peroxisomen – mehr oder weniger linear mit der Zeit an und erreichte ein Plateau nach 20 bis 60 Minuten (BLOCKER et al. 1996, MITHIEUX et al. 1988, SCHEEL und KREIS 1991). Während die Phagosomen-Mikrotubuli-Bindung wenig Unterschied zwischen 25 und 37°C zeigte (BLOCKER et al. 1996), war die Bindung der Peroxisomen, ähnlich wie die der Lysosomen (MITHIEUX et al. 1988), bei höheren Temperaturen deutlich gesteigert.

2.3.1. Die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli ist Protease- und NEM-sensitiv

Die Behandlung von Organellen mit Trypsin (SEVERIN et al. 1991, VAN DER SLUIJS et al. 1990, BLOCKER et al. 1996, MURATA et al. 1992, SCHEEL und KREIS 1991, KARECLA und KREIS 1992) oder Proteinase K (BLOCKER et al. 1996, MURATA et al. 1992) reduzierte die Bindung an Mikrotubuli oder blockierte sie sogar vollständig, was auf die Beteiligung eines Membranproteins hindeutet. Diese Proteaseabhängigkeit konnte auch für Peroxisomen nachgewiesen werden, so daß das Vorhandensein eines für die Bindung wichtigen peroxisomalen Membranproteins vermutet werden kann.

Unterschiedliche Effekte auf die Bindung von Organellen an Mikrotubuli werden von der alkylierenden Substanz NEM berichtet. Während Exocytose (VAN DER SLUIJS et al. 1990) und Endocytose-Vesikel (SCHEEL und KREIS 1991), sowie Golgi-Vesikel (MURATA et al. 1992) von einer NEM-Behandlung nicht beeinflusst wurden, fanden KARECLA und KREIS (1992) eine verstärkte Bindung bei NEM-behandelten Golgi-Vesikeln. Andererseits blockierte NEM-Behandlung die Bindung von Lysosomen an Mikrotubuli (MITHIEUX et al. 1988). Die Wirkung von NEM beruht auf der Alkylierung von Sulfhydryl-Gruppen, wie sie z.B. in der Aminosäure Cystein vorkommen. Proteine, die Cysteine im aktiven Zentrum aufweisen, können daher durch NEM-Behandlung inaktiviert werden. So beobachteten WALKER et al. (1997) in einem *in vitro* Motilitätsassay die Inhibierung der Bindung von Kinesin an Mikrotubuli durch die Vorbehandlung

des Kinesins mit NEM. Da die Bindung von Peroxisomen ebenfalls NEM-sensitiv war, kann vermutet werden, daß der oben erwähnte peroxisomale Membranrezeptor auch die Aminosäure Cystein enthält und durch NEM inaktiviert wird.

Tabelle 6: *In vitro* Bindungsstudien zur Interaktion von Zellorganellen mit Mikrotubuli. Mehrere Mikrotubuli-Bindungsassays führten zur Identifikation von möglichen Bindungsproteinen.

Zellorganelle	Untersuchungsmethode	mögliches Bindungsprotein [kDa]	MW	Referenz
Peroxisomen	Mikrotiterplattenassay	PoCLIP (?)	70	THIEMANN et al. 2000
axoplasmatische Vesikel	Cosedimentationsassay	292 kDa Protein	292	PRATT 1986
Lysosomen	Cosedimentationsassay	GDH-Isoform	50	MITHIEUX et al. 1988 RAJAS et al. 1996
Exocytose-Vesikel	Cosedimentationsassay	FTCD-Isoform	58	VAN DER SLUIJS et al. 1990 HENNIG et al. 1998
Sekretgranula	Cosedimentationsassay	-		SHERLINE et al. 1977
Sekretgranula	Cosedimentationsassay	MAP2	200	SEVERIN et al. 1991
Golgi-Vesikel	Cosedimentationsassay	-		MURATA et al. 1992
Mitochondrien	Cosedimentationsassay	-		JUNG et al. 1993
Endocytose-Vesikel	Magnetische Kügelchen	CLIP-170	170	SCHEEL und KREIS 1991 PIERRE et al. 1992
Golgi-Vesikel	Magnetische Kügelchen	-		KARECLA und KREIS 1992
trans-Golgi-Vesikel	Reflotations-Technik	-		COFFE und RAYMOND 1990
Phagosomen	Lichtmikroskopischer Assay	150 kDa Protein	150	BLOCKER et al. 1996
Sekretgranula	Lichtmikroskopischer Assay	-		SUPRENANT und DENTLER 1982
Sekretgranula	VECM, Elektronenmikroskopie	-		ROTHWELL et al. 1989

VECM: Video-verstärkte Kontrastmikroskopie; FTCD: Formiminotransferase-Cyclodeaminase; GDH: Glutamatdehydrogenase

2.3.2. Die KCl-Behandlung von Peroxisomen vermindert ihre Bindungsfähigkeit an Mikrotubuli und Zugabe von Cytosol stellt sie wieder her

Während die Entfernung peripherer Membranproteine durch Salzbehandlung mit 0,1 M KCl die Bindungsfähigkeit von Peroxisomen an Mikrotubuli deutlich verminderte, wurde die Bindungsfähigkeit von Endosomen (SCHEEL und KREIS 1991) und Phagosomen (BLOCKER et al. 1996) an Mikrotubuli durch Behandlung mit 1 M NaCl nicht bzw. nur leicht beeinträchtigt.

In verschiedenen *in vitro* Systemen scheint die Zugabe von Cytosol für die Bindung von Organellen an Mikrotubuli essentiell zu sein (VAN DER SLUIJS et al. 1990, SCHEEL und KREIS 1991, KARECLA und KREIS 1992, BLOCKER et al. 1996, NIELSEN et al. 1999), wohingegen andere Assays die Zugabe von Cytosol nicht benötigen (MITHIEUX et al. 1988, COFFE und RAYMOND 1990, SEVERIN et al. 1991, MURATA et al. 1992, JUNG et al. 1993). Obwohl in dem hier dargestellten Assay-system die Peroxisomen kein Cytosol für die Bindung an Mikrotubuli benötigten, kann Cytosol

in einer dosisabhängigen Weise die Bindungsaktivität von KCl-vorbehandelten Peroxisomen komplett wiederherstellen, was auf die Existenz eines oder mehrerer cytosolischer Bindungsfaktoren hinweist. In ähnlicher Weise konnte die Bindung von Golgi-Vesikeln (KARECLA und KREIS 1992) und Exocytose-Vesikeln (VAN DER SLUIJS et al. 1990) an Mikrotubuli mit steigenden Cytosolkonzentrationen erhöht werden. Weiterhin kann die NEM-Behandlung von Cytosol die Bindung von Organellen an Mikrotubuli beeinflussen. So verminderte die NEM-Behandlung des Cytosols die Bindung von Peroxisomen, Exocytose-Vesikeln (VAN DER SLUIJS et al. 1990) und Golgi-Vesikeln (KARECLA und KREIS 1992), während es die Bindung von Endocytose-Vesikeln (SCHEEL und KREIS 1991) nicht beeinflusste.

2.3.3. Nukleotide können die Mikrotubuli-Bindungskapazität von Peroxisomen steigern

Die Sensitivität von *in vitro* Bindungsassays gegenüber Nukleotiden und Nukleotid-Analoga wurde zur Unterscheidung von Motorproteinen und regulatorischen Bindungsproteinen ohne Motorfunktion als Vermittler der Organellen-Mikrotubuli-Interaktion benutzt. Die Zugabe von Nukleotiden und Nukleotid-Analoga hatte auf die Mikrotubuli-Bindung verschiedener Zellorganellen (SEVERIN et al. 1991, VAN DER SLUIJS et al. 1990, BLOCKER et al. 1996, JUNG et al. 1993, KARECLA und KREIS 1992) keinen Effekt, was darauf hindeutet, daß Proteine ohne Motoraktivität die Bindung vermitteln. Bei anderen Organellen, für die ebenfalls die Beteiligung von nicht-Motorproteinen an der Bindung vorgeschlagen wurde, reduzierte die Zugabe von ATP die Bindung. In diesem Zusammenhang muß betont werden, daß die Phosphorylierung vieler MAPs deren Interaktion mit Mikrotubuli herabsetzt (SATO-HARADA et al. 1996). So ist die verminderte *in vitro* Bindung von Endocytose-Vesikeln an Mikrotubuli in der Gegenwart von ATP (SCHEEL und KREIS 1991) vermutlich auf die Ablösung des die Bindung vermittelnden Proteines CLIP-170 von den Mikrotubuli, verursacht durch die Phosphorylierung von CLIP-170, zurückzuführen (PIERRE et al. 1992, RICKARD und KREIS 1991). Auch für CLIP-115 konnte die Ablösung von den Mikrotubuli durch Phosphorylierung gezeigt werden (HOOGENRAAD et al. 2000). MITHIEUX und ROUSSET (1988) berichteten von einer Hemmung der lysosomalen Bindung an Mikrotubuli durch ATP (unabhängig von der ATP-Hydrolyse), ADP und anderen Nukleotiden, was darauf hindeutet, daß das regulatorische Bindungsprotein zwar keine ATPase-Aktivität aufweist, aber Bindungsstellen für Nukleotide besitzt. Während die Motorproteine der Mikrotubuli in Abwesenheit von ATP oder in der Gegenwart von nichthydrolisierbaren ATP-Analoga fest an Mikrotubuli binden, dissoziieren sie in Gegenwart von ATP von den Mikrotubuli (VALE 1996). Somit könnte die ATP-Abhängigkeit, wie sie für verschiedene Sekretgranula beschrieben wurde (SHERLINE et al. 1977, SUPRENANT und DENTLER 1982, ROTHWELL et al. 1989), auf Motorproteine zurückzuführen sein. Bei den Golgi-Vesikeln, bei denen die *in vitro* Bindung durch ATP reduziert und durch ADP nicht beeinflusst wurde (MURATA et al. 1992), ist unklar, ob dies mit dem Einfluß eines Motorproteines oder eines nicht-Motorproteines zu erklären ist.

In dieser Studie wurde gezeigt, daß Peroxisomen – im Gegensatz zu anderen Zellorganellen – in Gegenwart von ATP verstärkt an Mikrotubuli binden, insbesondere wenn ein ATP-regenerierendes System eingesetzt wurde. Während ADP und ATP-Analoga nur geringen Einfluß hatten, wurde die Bindungskapazität durch ATP-Depletion vermindert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli wahrscheinlich durch Phosphorylierung reguliert wird. Die Bindung axoplasmatischer Vesikel an Mikrotubuli war ebenfalls ATP-abhängig, allerdings – anders als bei Peroxisomen – auch abhängig von AMP-PNP. Dies deutet auf eine Funktion der Bindung von ATP unabhängig von dessen Hydro-

lyse. Für die Vermittlung der Bindung wurde ein Protein von 292 kDa vorgeschlagen (PRATT 1986). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die *in vitro* Bindung von frühen Endosomen an Mikrotubuli durch ATP verstärkt und durch ein ATP-depletierendes System vermindert wird, wobei die kleine GTPase Rab5 eine wichtige Rolle für die Bindung spielte (NIELSEN et al. 1999). Die Beteiligung eines Motorproteines an der Bindung in diesem Bindungsassay wird ausgeschlossen durch den stimulierenden Effekt von ATP auf die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli, der wahrscheinlich durch endogene Kinasen vermittelt wird, in Verbindung mit dem fehlenden Einfluß der nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga. Der hier beschriebene mutmaßliche Bindungsfaktor könnte durch Phosphorylierung reguliert werden, obwohl mit einem Phosphorylierungsassay mit [γ - 32 P]-ATP im fraktionierten KCl-Eluat kein phosphoryliertes Protein entdeckt werden konnte. Eine alternative Erklärung ist die mögliche Aktivierung eines Rezeptors auf der Peroxisomenmembran oder die Modulation eines Cofaktors durch Phosphorylierung. Verschiedene molekulare Mechanismen des Einflusses der Phosphorylierung auf die Interaktion von Organellen mit Mikrotubuli konnten mit Motilitätsstudien aufgezeigt werden. So führt die Phosphorylierung eines Serinrestes von MAP2 durch eine Mikrotubuli-assoziierte cAMP-abhängige Kinase zur Ablösung von MAP2 vom Mikrotubulus (LOPEZ und SHEETZ 1995). Weiterhin wird vermutlich die ATPase Aktivität von cytoplasmatischem Dynein durch eine Dynactin-abhängige Phosphorylierung der leichten Ketten des Dyneins reguliert (KUMAR et al. 2000).

2.3.4. MAPs hemmen die Peroxisomen-Mikrotubuli Bindung und Motorproteine steigern sie

In dieser Studie wurde gezeigt, daß die Zugabe verschiedener MAPs zu den Peroxisomen deren Bindung an Mikrotubuli inhibiert. Dies ist ein Hinweis darauf, daß – bezogen auf Peroxisomen – die MAPs als Abstandhalter und nicht als „Crosslinker“ fungieren. Es ist denkbar, daß die peroxisomalen Bindungsfaktoren ähnliche Bindungsstellen auf den Mikrotubuli besetzen wie einzelne MAPs. Für die Motorproteine Dynein und Kinesin konnte gezeigt werden, daß sie mit MAP2 und TAU um fast die gleiche Bindungsdomäne des β -Tubulins konkurrieren (HAGIWARA et al. 1994). TAU behindert dadurch die Anlagerung von Kinesin und somit den Kinesin-vermittelten Transport (TRINCZEK et al. 1999). Im Gegensatz dazu zeigten JUNG et al. (1993), daß MAP2 und TAU die Assoziation von isolierten Mitochondrien an Mikrotubuli stimulieren, wenn die Mitochondrien zuvor mit MAPs inkubiert wurden. Wenn dagegen die Mikrotubuli vor der Organellenzugabe mit den MAPs inkubiert wurden, war eine Verringerung der Bindung von Mitochondrien an Mikrotubuli festzustellen.

Bei Peroxisomen wurde durch Zugabe der molekularen Motoren Kinesin und Dynein sowie des an Dynein-assoziierten Proteines Dynactin die Bindung an Mikrotubuli erhöht. Die Motorproteine, die in der Abwesenheit von ATP fest an Mikrotubuli binden (VALE 1996), sind anscheinend in der Lage, auch an die Peroxisomen zu assoziieren und vermitteln so deren Bindung an Mikrotubuli. Daß für die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli ein nicht-Motorprotein essentiell ist, zeigen die nachfolgend diskutierten Versuche, deren Ergebnisse die Beteiligung eines potentiellen CLIP-ähnlichen 70 kDa Polypeptides vermuten lassen.

3. Proteine zur Vermittlung der *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Proteine zu identifizieren, die die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli vermitteln. Der Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay diente dabei zur Untersuchung des Einflusses aufgereinigter Proteinfractionen, welche die mutmaßlichen Bindungsproteine enthielten, auf die *in vitro* Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli.

3.1. Proteine, die für die Bindung von Organellen an Mikrotubuli wichtig sind

In vitro Studien zur Interaktion von Organellen mit Mikrotubuli haben zur Identifikation von verschiedenen Proteinen, die am Bindungsprozeß beteiligt sind, geführt (für eine Übersicht siehe Tabelle 6). Beispiele sind CLIP-170 bei Endocytose-Vesikeln (PIERRE et al. 1992), eine membrangebundene Isoform der Glutamatdehydrogenase bei Lysosomen (MITHIEUX und ROUSSET 1989, RAJAS et al. 1996), ein 150 kDa Protein bei Phagosomen (BLOCKER et al. 1996), eine Formiminotransferase-Cyclodeaminase Isoform bei Vesikeln des trans-Golgi Netzwerkes (HENNIG et al. 1998) und MAP2 bei chromaffinen Granula (SEVERIN et al. 1991). Die funktionelle Bedeutung der meisten dieser aufgrund ihrer *in vitro* Bindung an Mikrotubuli identifizierten Proteine für den intrazellulären Transport *in vivo* muß noch geklärt werden. So wurde z.B. die Relevanz der Formiminotransferase-Cyclodeaminase für die Bindung von Vesikeln des trans-Golgi Netzwerkes an Mikrotubuli *in vivo* in Frage gestellt (BASHOUR und BLOOM 1998).

Von verschiedenen anderen Proteinen wurde die Assoziation an bestimmte Zellorganellen beobachtet und anschließende Untersuchungen zeigten ihre Bedeutung für die Vermittlung der Organellen-Mikrotubuli Bindung. Eine Übersicht dieser Proteine bietet Tabelle 7. Die Rolle für die Bindung an Mikrotubuli wurde für CLIP-115 bei den sogenannten „dendritic lamellar bodies“ (DE ZEEUW et al. 1997), für CLIMP-63 beim endoplasmatischen Retikulum (KLOPFENSTEIN et al. 1998), für Aut2p und Aut7p bei der Bindung von Autophagosomen (LANG et al. 1998, KIRISAKO et al. 2000), für GMAP-210 beim cis-Golgi-Netzwerk (INFANTE et al. 1999) und für Hook3 bei Golgi-Vesikeln (WALENTA et al. 2001) gezeigt.

3.2. Das mutmaßliche peroxisomale Bindungsprotein

Der in dieser Arbeit vorgestellte Bindungsassay wurde benutzt, um den Einfluß von verschiedenen Proteinfractionen auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zu testen. Zunächst wurde das KCl-Eluat mittels einer Superdex-200 Säule chromatographisch aufgetrennt. Mehrere Fraktionen, die jeweils einige Polypeptidbanden in silbergefärbten SDS-Gelen aufwiesen, zeigten einen stimulierenden Einfluß im Bindungsassay.

Tabelle 7: Proteine, denen eine Vermittlerrolle für die Bindung von Zellorganellen an Mikrotubuli zugeschrieben wird. Bei mehreren Proteinen konnte eine Rolle bei der Bindung von verschiedenen Zellorganellen an Mikrotubuli nachgewiesen werden.

Protein	MW[kDa]	Interaktion mit	Untersuchungsmethoden	Referenz
CLIP-115	115	„dendritic lamellar bodies“	Klonierung und Sequenzierung Transfektionen Mikrotubuli-Depolymerisation	DE ZEEUW et al. 1997
CLIMP-63	63	endoplasmatisches Retikulum	Transfektionen Deletionskonstrukte Cosedimentationsassay	KLOPFENSTEIN et al. 1998
Aut2p	57	Autophagosomen	Klonierung und Sequenzierung	LANG et al. 1998
Aut7p	14		Transfektionen Deletionskonstrukte „two-hybrid“-Assay	
GMAP-210	210	cis-Golgi Netzwerk	Klonierung und Sequenzierung Transfektionen Deletionskonstrukte Glutathion-Kügelchen Cosedimentationsassay	INFANTE et al. 1999
Hook3	83	Golgi-Vesikel	Klonierung und Sequenzierung Transfektionen Cosedimentationsassay	WALENTA et al. 2001
Hook1	85	nicht identifizierte	Klonierung und Sequenzierung	WALENTA et al. 2001
Hook2	83	Organellen	Transfektionen Cosedimentationsassay	

3.2.1. Ein 70 kDa Polypeptid aus dem Eluat KCl-behandelter Peroxisomen kreuzreagiert mit Antikörpern gegen CLIPs

Um die Hypothese zu überprüfen, ob an der Bindung ein CLIP-ähnliches Protein beteiligt ist, wurden Superdex-200 Proteinfraktionen mit Hilfe von Immunoblots auf ihre Kreuzreaktivität mit CLIP-Antikörpern getestet. Der Antikörper gegen CLIP-170 zeigte eine schwache Kreuzreaktion mit einer Polypeptidbande von etwa 70 kDa, während ein Antikörper gegen den N-Terminus von CLIP-115 diese Polypeptidbande deutlicher markierte. Dabei korrelierte die Bandenstärke im CLIP-115 Immunoblot mit dem Ausmaß des bindungssteigernden Effektes der entsprechenden Superdex-200 Proteinfraktionen im Bindungsassay. Während die stimulierenden Superdex-200 Proteinfraktionen in SDS-Gelen eine einzelne mit dem CLIP-115-Antikörper kreuzreagierende Bande von etwa 70 kDa aufwiesen, wurden beim Cytosol neben dieser Bande noch weitere Banden markiert. Der N-Terminus von CLIP-115 enthält die beiden Mikrotubuli-Bindungsdomänen, die sich bei den bisher bekannten CLIPs durch ihre außerordentlich hohe Homologie auszeichnen (zwischen 80 und 90 % Identität der Aminosäuren bei

den verschiedenen CLIPs der Wirbeltiere). Somit ist – vorausgesetzt, daß es sich bei der markierten Polypeptidbande von 70 kDa um ein Mitglied der CLIP-Proteinfamilie handelt – die Kreuzreaktion mit den CLIP-Antikörpern nicht verwunderlich.

3.2.2. Das 70 kDa Polypeptid vermittelt die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Weitere Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei diesem Protein von etwa 70 kDa um ein peroxisomales CLIP handeln könnte. So konnte die inhibitorische Wirkung des CLIP-115-Antikörpers und eines Peptidantikörpers gegen einen Abschnitt aus der hochkonservierten Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIPs auf die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli gezeigt werden. Sowohl die Bindung des 70 kDa Polypeptids an Mikrotubuli, als auch die Assoziation eines Polypeptides mit gleichem Molekulargewicht an Peroxisomen konnte nachgewiesen werden. Die Assoziation des mit dem CLIP-115-Antikörper kreuzreagierenden 70 kDa Polypeptides an Peroxisomen war abhängig von der Vorbehandlung der Peroxisomen. So entfernte die Vorbehandlung der Peroxisomen mit Proteasen und KCl das Protein, was im Einklang mit der reduzierten Bindungsfähigkeit dieser Peroxisomen im Bindungsassay steht. Die Behandlung mit NEM führte nicht zu einer nennenswerten Entfernung des 70 kDa Polypeptides, wobei die *in vitro* Bindung dieser Peroxisomen an Mikrotubuli dennoch deutlich beeinträchtigt war. Dies könnte mit einer möglichen Inaktivierung des Peroxisomen-assoziierten Bindungsfaktors durch NEM, die aber nicht zu dessen Ablösung vom Peroxisom führt, erklärt werden.

3.2.3. Das potentielle peroxisomale CLIP könnte als Homodimer vorliegen

Das potentielle peroxisomale CLIP von etwa 70 kDa könnte nativ als Homodimer vorliegen, da bei der Gelfiltration mit der Superdex-200 Säule die Proteinfractionen, die einen stimulierenden Effekt im Bindungsassay aufwiesen und die das potentielle CLIP-ähnliche 70 kDa Polypeptid enthielten, zu dem Zeitpunkt eluierten, bei dem – entsprechend der Eichgerade mit Proteinen bekannten Molekulargewichtes – ein natives Protein von etwa 150 kDa eluieren würde. Von CLIP-170 (PIERRE et al. 1992, SCHEEL et al. 1999) und CLIP-115 (HOOGENRAAD et al. 2000) konnte gezeigt werden, daß sie als Homodimer vorliegen.

Die bisher beschriebenen CLIPs haben Molekulargewichte zwischen 115 und 190 kDa (PIERRE et al. 1992, DE ZEEUW et al. 1997, GRIPARIC et al. 1998, LANTZ und MILLER 1998). Das hier beschriebene potentielle peroxisomale CLIP weist mit ungefähr 70 kDa ein geringeres Molekulargewicht auf. Kürzlich wurde allerdings die Sequenz von CLIP-50 beschrieben, ein Maus-Protein von 50 kDa, das bei der Spermiogenese für die Formgebung des Spermien-Kernes wichtig zu sein scheint; jedoch liegt noch keine Publikation darüber vor (Zugangsnummer der Sequenz: AAD56414, GI:593918; eingereicht von Tarsounas, M., Pearlman, R.E. und Moens, P.B. 1999).

3.2.4. Rekombinantes CLIP-115 steigert die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Versuche mit GST-CLIP-115, einem rekombinanten bakteriellen Fusionsprotein von Glutathion-S Transferase (GST) und dem N-Terminus von CLIP-115, zeigten einen deutlichen bindungssteigernden Effekt im Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay. Diese Steigerung, die nicht durch GST alleine ausgelöst werden konnte, ist überraschend, da zu vermuten ist, daß CLIP-115 die Mikrotubuli besetzt und somit die Anlagerung der Peroxisomen behindert.

Zudem fehlt dem Fusionsprotein der C-Terminus von CLIP-115, der die potentielle Organellenbindende Domäne enthält. Über die Gründe dieses starken GST-CLIP-115 Effektes kann nur spekuliert werden. Möglicherweise interagiert CLIP-115 oder GST mit den Peroxisomen und vermittelt über die Mikrotubuli-Bindungsdomänen des CLIP-115 die Bindung an Mikrotubuli.

3.2.5. Affinitätsgereinigte Fraktionen mit dem potentiellen peroxisomalen CLIP steigern die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Wie bereits erwähnt befinden sich in den Superdex-200 Proteinfraktionen des KCl-Eluates neben dem potentiellen peroxisomalen CLIP noch andere Proteine. Zur weiteren Aufreinigung dieser Proteinfraktionen wurden Affinitätsäulen eingesetzt, an die Peptidantikörper gegen die hochkonservierte Mikrotubuli-Bindungsdomäne der CLIPs gekoppelt wurden. Mit der Affinitätschromatographie konnte die Anzahl der Proteine in der aufgereinigten Proteinfraktion verringert werden und der stimulierende Einfluß dieser Proteinfraktion im Bindungsassay konnte gezeigt werden. Jedoch befanden sich in der affinitätsgereinigten Proteinprobe neben der 70 kDa Bande noch weitere Polypeptide, so daß zur Isolierung des Proteins weitere Aufreinigungsschritte erforderlich sind.

Zur Ermittlung der Sequenz des potentiellen peroxisomalen CLIP bietet sich die Durchführung einer 2D-Gelelektrophorese mit anschließender massenspektrometrischer Bestimmung von Peptidsequenzen des 70 kDa Polypeptides an. Diese für die Zukunft geplanten Versuche werden klären, ob es sich bei dem 70 kDa Polypeptid wirklich um ein Mitglied der CLIP-Proteinfamilie handelt.

4. Modelle zur Regulation der Bindung von Organellen an Mikrotubuli

4.1. Die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluß nahe, daß die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli zumindest teilweise anderen Regulationsmechanismen unterworfen ist, als sie für andere Zellorganellen beschrieben wurden. Außergewöhnlich ist insbesondere die Steigerung der Bindungsaktivität durch ATP. Jedoch ist unklar, wie ATP die Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli stimuliert. Eine direkte Phosphorylierung des potentiellen peroxisomalen CLIP konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Angesichts der für Motorproteine, MAPs und CLIPs beschriebenen Lösung der Assoziation mit Mikrotubuli durch Phosphorylierung (RICKARD und KREIS 1991, SATO-HARADA et al. 1996, VALE 1996), erscheint die Ablösung des potentiellen peroxisomalen CLIP von den Mikrotubuli durch eine direkte Phosphorylierung des Proteins unwahrscheinlich. Die vermehrte Peroxisomen-Mikrotubuli Bindung durch ATP-Hydrolyse könnte auch auf der Aktivierung eines peroxisomalen Membranrezeptors oder eines stimulierenden Cofaktors beruhen.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wird für die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli folgendes Modell vorgeschlagen: Die Bindung wird von einem Protein vermittelt, das peripher an die peroxisomale Membran assoziiert ist und von dem ein cytosolischer Pool existiert. Hierbei handelt es sich um ein peroxisomales CLIP, das Dimere bildet und ein

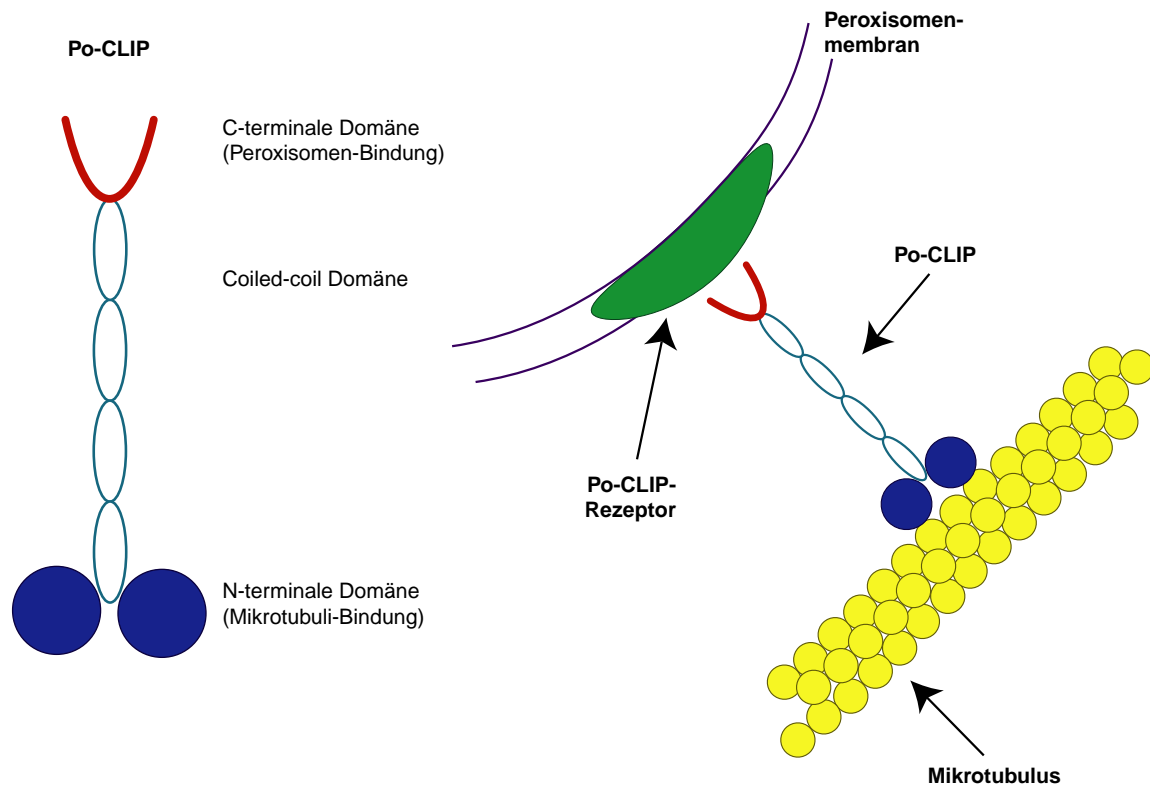


Abbildung 41: Modell für die *in vitro* Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli. Mögliche Struktur des mutmaßlichen peroxisomalen cytoplasmatischen Linker-Proteins (PoCLIP) und dessen voraussichtliche Assoziation mit Peroxisomen und Mikrotubuli in Anlehnung an das Modell für CLIP-170 (RICKARD und KREIS 1996, SCHEEL et al. 1999).

Molekulargewicht von etwa 70 kDa aufweist. Das peroxisomale CLIP ist Protease- und NEM-sensitiv und interagiert mit der Peroxisomenmembran über einen Membranrezeptor, der ebenfalls Protease- und NEM-sensitiv ist. Weiterhin kann das peroxisomale CLIP über seine Mikrotubuli-Bindungsdomänen, die homolog zu den Mikrotubuli-Bindungsdomänen der CLIP-Proteinfamilie sind, an Mikrotubuli binden. Die Peroxisomen-Mikrotubuli Bindung wird durch Phosphorylierung reguliert. In Analogie zum Modell für CLIP-170 (RICKARD und KREIS 1996, SCHEEL et al. 1999), dem mit Abstand am besten charakterisierten Mitglied der CLIP-Familie, stellt die Abbildung 41 ein hypothetisches Schema für die CLIP-vermittelte Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli und für die mögliche Struktur des peroxisomalen CLIP dar.

Der hier dargestellte *in vitro* Peroxisomen-Mikrotubuli Bindungsassay dient als Instrument für die Identifikation und Charakterisierung von Proteinen, die auf molekularer Ebene an diesem Bindungsprozeß beteiligt sind. Zusätzlich könnten ähnlich konzipierte Assaysysteme für die Untersuchung der Interaktionen anderer membranumgrenzter Zellorganellen mit Mikrotubuli hilfreich sein.

4.2. Die Bindung von Organellen an Mikrotubuli und ihre Bedeutung für die Organisation der Zelle

Die temporäre morphologische Stabilität vieler Zellorganellen und deren geordnete Verteilung, vor allem in polarisierten Zellen, bedarf angesichts der hochdynamischen Prozesse in der Zelle, wie dem permanenten Fluß von Proteinen und Lipiden, einer Regulation. Bisher ist über die

Regulation des Gleichgewichtes von Dynamik und Stabilität der Zellorganellen kaum etwas bekannt und es existieren nur wenige Modelle. Eines davon ist das Modell zur Regulierung der Interaktion von Endosomen mit Mikrotubuli durch CLIP-170 (RICKARD und KREIS 1996, siehe auch Abbildung 2, Seite 17). Für CLIP-170 wurde vorgeschlagen, daß es zunächst an einen Rezeptor der Endosomenmembran assoziiert und nach seiner Dephosphorylierung (möglicherweise durch eine GTPase) die Verbindung zum Plusende des Mikrotubulus herstellt und die Anlagerung eines Motorkomplexes aus Dynein und Dynactin an das Endosom bewirkt. Der Motorkomplex ist so lange inaktiv, bis CLIP-170 aufgrund der Phosphorylierung durch eine Mikrotubuli-assoziierte Kinase vom Endosom und Mikrotubulus dissoziiert. Daraufhin erfolgt der Dynein-vermittelte Endosomentransport zum Minusende des Mikrotubulus. Für die Vermittlung der Kinesin-Anlagerung und für die Bindung anderer Zellorganellen an Mikrotubuli wurde die Beteiligung weiterer CLIPs postuliert (RICKARD und KREIS 1996).

Andere Studien beschreiben die Regulation der Bindung von Organellen an Mikrotubuli durch MAPs. Gestützt wird dies durch Experimente zur Überexpression von MAPs, die eine verminderte Motilität der Organellen zeigten (BULINSKI et al. 1997, EBNETH et al. 1998). Mit dem MAP-bindenden Protein Mapmodulin wurde ein regulierendes Protein gefunden, das die Interaktion von MAPs mit Mikrotubuli inhibiert (ULITZUR et al. 1997) und das Bestandteil eines zeitlichen und räumlichen Mechanismus der Regulation Mikrotubuli-basierender Motilität sein könnte (ITIN et al. 1999).

Neben den CLIPs und MAPs wurden weitere Proteine gefunden, die als statische Bindeglieder zwischen Organellen und Mikrotubuli in Frage kommen (siehe Tabellen 6 und 7). Die Bedeutung der Phosphorylierung als zentralem Regulationsmechanismus, sowohl für zelluläre Transportprozesse, als auch für die stabile Assoziation der Organellen an Mikrotubuli, ist in den letzten zehn Jahren klar geworden. So wurde die Regulation von Bindungsproteinen, wie z.B. CLIP-170, durch Phosphorylierung beschrieben und es konnte gezeigt werden, daß auch die Aktivität der Motorproteine und ihre Assoziation mit Organellen durch Kinasen und Phosphatasen gesteuert wird (für einen Übersichtsartikel siehe ALLAN und SCHROER 1999). Wie aber das Zusammenspiel von Bindungsproteinen, Motorproteinen und deren Regulatoren gesteuert wird, ist noch wenig verstanden und bedarf der weiteren Erforschung.

5. Die Bedeutung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli

Peroxisomen weisen in den meisten Zellen eine gleichmäßige Verteilung auf, im Gegensatz zu manchen anderen Zellorganellen, die, wie z.B. der perinukleär organisierte Golgi-Apparat, in bestimmten Regionen der Zelle lokalisiert sind. In einigen wenigen Zelltypen sind die Peroxisomen nicht gleichmäßig verteilt. So sind sie in Nierenepithelzellen basal (ZAAR 1992) und in Darmepithelzellen apikal (GRABENBAUER et al. 2001) lokalisiert. Für die Positionierung der Organellen innerhalb der Zelle sind Mikrotubuli und Transportprozesse entlang der Mikrotubuli essentiell. In Zellkulturmodellen wurde die Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli gezeigt und die bidirektionale Bewegung eines kleinen Teils der Peroxisomen entlang der Mikrotubuli beschrieben (SCHRADER et al. 1996a, RAPP et al. 1996, WIEMER et al. 1997). Obwohl es Hinweise auf den Transport von Peroxisomen durch Dynein gibt (SCHRADER et al. 2000) und die Beteiligung von Kinesin am Transport vermutet wird, konnten weder Kinesin noch

Dynein direkt an der Peroxisomenmembran lokalisiert werden. Auch Kinectin konnte bei Peroxisomen nicht nachgewiesen werden, während die Überexpression einer Dynactin-Untereinheit den Dynein-vermittelten Transport blockierte (SCHRADER et al. 2000) und Dynactin *in vitro* mit Peroxisomen cosedimentierte (Dr. M. Schrader, persönliche Mitteilung). Weitere Studien deuten auf die Regulation der Peroxisomen-Motilität durch heterotrimere G-Proteine über den G_i/G_o -Phospholipase A_2 -Signalweg (HUBER et al. 1997 und 1999). Extrazelluläre Costimulation von CHO-Zellen mit ATP und Lysophosphatidylsäure führte zum Arrest der Peroxisomen und zur Inhibierung der Peroxisomen-Motilität. Die Autoren postulieren als Endpunkt der Signalkaskade den indirekten Einfluß von Arachidonsäure auf das peroxisomale CLIP oder auf die peroxisomalen Motorproteine (HUBER et al. 2000).

Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung von Motilität und Assoziation der Peroxisomen an Mikrotubuli gibt es kaum experimentelle Befunde. Die durch Mikrotubuli gewährleistete gleichmäßige Verteilung der Peroxisomen in den meisten Zellen könnte Ausdruck für die Notwendigkeit peroxisomaler Stoffwechselprozesse in der gesamten Zelle sein. Allerdings scheint bei der Zellteilung die Verteilung der Peroxisomen auf die Tochterzellen zufällig zu sein, da nur wenige Peroxisomen mit der mitotischen Spindel interagieren (WIEMER et al. 1997). Angesichts der biochemischen Heterogenität der Peroxisomen und der engen Assoziation mit anderen Organellen, wie glattes endoplasmatisches Retikulum und Lipidvakuolen (GORGAS 1985, BLANCHETTE-MACKIE et al. 1995), ergeben sich mögliche Erklärungen für den Transport entlang der Mikrotubuli. Peroxisomen-Motilität könnte z.B. wichtig sein, um Organellen in anderen Regionen des Cytoplasmas zu erreichen und um dort mit anderen Peroxisomen bzw. anderen Organellen Proteine und Substrate auszutauschen. Mikrotubuli-vermittelte vorübergehende und langandauernde Kontakte einzelner Peroxisomen untereinander konnten kürzlich gezeigt werden (SCHRADER et al. 2000). Weiterhin wurde neulich – angesichts der Heterogenität der Peroxisomen (ANGERMÜLLER und FAHIMI 1988, LÜERS et al. 1993) – die Fusion von biochemisch unterschiedlichen Peroxisomen nachgewiesen (TITORENKO et al. 2000, TITORENKO und RACHUBINSKI 2001). Dies legt die Existenz einer Fusionsmaschinerie nahe, die auf der Peroxisomenoberfläche neben der gut charakterisierten Protein-Importmaschinerie und den vermuteten Bindungsproteinen organisiert sein könnte. Denkbar ist auch der Transport der Peroxisomen zu Orten in der Zelle, an denen die metabolische Aktivität bestimmter Peroxisomen-Populationen erforderlich ist. So könnte in Pflanzenzellen ein Mikrotubuli-vermittelter Transport von Glyoxysomen zu den Lipidreserven in keimenden Ölsaaten erfolgen. Dort entwickeln sich nämlich zuerst die Glyoxysomen, die zumeist an Lipidvakuolen assoziiert sind und mittels Glyoxylatzyklus die Umwandlung von Fetten in Kohlenhydrate betreiben. Nach dem Keimungsprozeß entstehen die Peroxisomen, die eine völlig unterschiedliche Enzymausstattung aufweisen und in der Regel an Plastiden assoziiert sind (HUANG et al. 1983). Die Mikrotubuli-vermittelte Dynamik könnte ferner für eine gleichmäßige Peroxisomen-Verteilung in der Zelle nach Peroxisomen-Proliferation von Bedeutung sein.

Hingegen scheinen die Mikrotubuli bei der Bildung, Aufrechterhaltung und Dynamik von tubulären und retikulären Peroxisomen keine Rolle zu spielen (SCHRADER et al. 1996a, 1998 und 2000). Unwahrscheinlich ist auch die Beteiligung von Mikrotubuli an der Vermehrung der Peroxisomen durch Knospung und Teilung (SCHRADER et al. 1996a und 1998).

5.1. Fazit

Insbesondere die oben genannten neueren Studien (SCHRADER et al. 2000, TITORENKO et al. 2000, TITORENKO und RACHUBINSKI 2001) verdeutlichen die dynamische Organisation des peroxisomalen Kompartimentes. Diese Dynamik ist geprägt durch das Zusammenspiel von der Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli mit der Lösung dieser statischen Bindung und dem Motorprotein-vermittelten Transport entlang der Mikrotubuli. Die weitere Erforschung der molekularen Grundlagen der Peroxisomen-Mikrotubuli Interaktion ist wichtig für das bessere Verständnis der Funktionen der Peroxisomen, sowie für das Verständnis der Dynamik von Zellorganellen allgemein. Ein wesentlicher Baustein hierfür ist die Untersuchung der Bindung der Peroxisomen an Mikrotubuli und die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Proteine. Die hier vorgelegte Arbeit liefert einen Beitrag zur Erforschung der Bindung von Peroxisomen an Mikrotubuli und stellt einen Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung des peroxisomalen Mikrotubuli-Bindungsfaktors und der Identifizierung seines peroxisomalen Membranrezeptors dar.

VI. Literaturverzeichnis

- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F. und Galjart, N. (2001) CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104, 923–935
- Allan, V.J. und Schroer, T.A. (1999) Membrane motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 476–482
- Angermüller, S. und Fahimi, H.D. (1981) Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry* 71, 33–44
- Angermüller, S. und Fahimi, H.D. (1986) Ultrastructural cytochemical localization of uricase in peroxisomes of rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 159–165
- Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Wesch, H. und Fahimi, H.D. (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.* 45, 137–144
- Angermüller, S. und Fahimi, H.D. (1988) Heterogenous staining of D-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney. A light and electron microscopic study. *Histochemistry* 88, 277–285
- Baerends, R.J., Faber, K.N., Kiel, J.A., van der Klei, I.J., Harder, W. und Veenhuis, M. (2000) Sorting and function of peroxisomal membrane proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 291–301
- Baglivi, G. (1703) Specimen quatuor librorum de fibra motrice et morbosa. Zitiert in: Frixione, E. (2000)
- Banani, E., Murray, J.W., Stockert, R.J., Satir, P. und Wolkoff, A.W. (2000) Microtubule and motor-dependent endocytic vesicle sorting *in vitro*. *J. Cell Biol.* 151, 179–186
- Bashour, A.M. und Bloom, G.S. (1998) 58 k, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. *J. Biol. Chem.* 273, 19612–19617
- Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P. und Wahli, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor β regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J. Biol. Chem.* 274, 35881–35888
- Baudhuin, P., Evrard, P. und Berthet, J. (1967) Electron microscopic examination of subcellular fractions. I. The preparation of representative samples from suspensions of particles. *J. Cell Biol.* 32, 181–191
- Baumann, O. und Murphy, D.B. (1995) Microtubule-associated movement of mitochondria and small particles in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Motil. Cytoskel.* 32, 305–317
- Baumgart, E. (1998) Lipidstoffwechsel in Peroxisomen und dessen experimentelle Beeinflussung. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Universität Heidelberg
- Beier, K., Völkl, A. und Fahimi, H.D. (1993) The impact of aging on enzyme proteins of rat liver peroxisomes: quantitative analysis by immunoblotting and immunoelectron microscopy. *Virchows Archiv B Cell Pathol.* 63, 139–146
- Berlin, V., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1990) BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin. *J. Cell Biol.* 111, 2573–2586
- Bilbe, G., Delabie, J., Bruggen, J., Richener, H., Asselbergs, F.A., Cerletti, N., Sorg, C., Odink, K., Tarcsay, S. und Wiesendanger, W. (1992) Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *EMBO J.* 11, 2103–2113
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S. und Londos, C. (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid Res.* 36, 1211–1226
- Blocker, A., Severin, F.F., Habermann, A., Hyman, A.A., Griffiths, G. und Burkhardt, J.K. (1996) Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.* 271, 3803–3811
- Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A. und Griffiths, G. (1997) Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J. Cell Biol.* 137, 113–129

- Blocker, A., Griffiths, G., Olivo, J.C., Hyman, A.A. und Severin, F.F. (1998) A role for microtubule dynamics in phagosome movement. *J. Cell Sci.* 111, 303–312
- Bloom, G.S. und Goldstein, L.S.B. (1998) Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 140, 1277–1280
- Bowen, P., Lee, C.S.N., Zellweger, H. und Lindenberg, R. (1964) A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 114, 402–414
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254
- Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S.J. und Valle, D. (1997) Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Nat. Genet.* 15, 369–376
- Breidenbach, R.W. und Beevers, H. (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 462–469
- Brunner, D. und Nurse, P. (2000) CLIP-170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695–704
- Bulinski, J.C., McGraw, T.E., Gruber, D., Nguyen, H.L. und Sheetz, M.P. (1997) Overexpression of MAP4 inhibits organelle motility and trafficking *in vivo*. *J. Cell Sci.* 110, 3055–3064
- Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T. und Vallee, R.B. (1997) Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* 139, 469–484
- Burkhardt, J.K. (1998) The role of microtubule-based motor proteins in maintaining the structure and function of the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1404, 113–126
- Carson, J.H., Worboys, K., Ainger, K. und Barbarese, E. (1997) Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 318–328
- Cavalier-Smith, T. (1987) The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts, and microbodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 503, 55–71
- Chang, L.Y., Slot, J.W., Geuze, H.J. und Crapo, J.D. (1988) Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 107, 2169–2179
- Chinetti, G., Fruchart, J.C. und Staels, B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49, 497–505
- Clayton, C.E. und Michels, P. (1996) Metabolic compartmentation in trypanosomes. *Parasitol. Today* 12, 465–471
- Coffe, G. und Raymond, M.N. (1990) Association between microtubules and Golgi vesicles isolated from rat parotid glands. *Biol. Cell* 70, 143–152
- Corton, J.C., Anderson, S.P. und Stauber, A. (2000) Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 491–518
- Croes, K., Casteels, M., De Hoffmann, E., Mannaerts, G.P. und van Veldhoven, P.P. (1996) α -Oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids in rat liver. Production of formic acid instead of CO₂, cofactor requirements, subcellular localization and formation of a 2-hydroxy-3-methylacyl-CoA intermediate. *Eur. J. Biochem.* 240, 674–683
- D'Arrigo, A., Bucci, C., Toh, B.H. und Stenmark, H. (1997) Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and rab5-dependent vacuolation of early endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 72, 95–103
- De Duve, C. und Baudhuin, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46, 323–357
- De Hoop, M.J. und Ab, G. (1992) Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem. J.* 286, 657–669
- De Matteis, M.A. und Morrow, J.S. (2000) Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* 113, 2331–2343

- DePina, A.S. und Langford, G.M. (1999) Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc. Res. Tech.* 47, 93–106
- De Robertis, E. und Schmitt, F.O. (1948) An electron microscope analysis of certain nerve axon constituents. *J. Cell Comp. Physiol.* 31, 1–23
- De Zeeuw, C.I., Hoogenraad, C.C., Goedknecht, E., Hertzberg, E., Neubauer, A., Grosveld, F. und Galjart, N. (1997) CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron* 19, 1187–1199
- Diamantopoulos, G.S., Scheel, J., Kreis, T.E. und Rickard, J.E. (1998) Purification and Assay of CLIP-170. In: *Methods in Enzymology*, Band 298 (Editor: Vallee, R.B.) Academic Press, London, U.K., 197–206
- Diamantopoulos, G.S., Perez, F., Goodson, H.V., Batelier, G., Melki, R., Kreis, T.E. und Rickard, J.E. (1999) Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 144, 99–112
- Distel, B., Braakman, I., Elgersma, Y. und Tabak, H.F. (2000) Transactions at the peroxisomal membrane. In: *Subcellular Biochemistry*, Band 34 (Editoren: Hilderson, H. und Fuller, S.) Kluwer Academic, Dordrecht, Niederlande, 303–322
- Downing, K.H. (2000) Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 89–111
- Dujardin, D., Wacker, U.I., Moreau, A., Schroer, T.A., Rickard, J.E. und De Mey, J.R. (1998) Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* 141, 849–862
- Dutcher, S.K. (2001) The tubulin fraternity: α to ϵ . *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 49–54
- Dyer, J.M., McNew, J.A. und Goodman, J.M. (1996) The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J. Cell Biol.* 133, 269–280
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. und Mandelkow, E. (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 143, 777–794
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. und Goud, B. (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279, 580–585
- Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W.B., Distel, B., Subramani, S. und Tabak, H.F. (1997) Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S. cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 16, 7326–7341
- Erdmann, R., Veenhuis, M. und Kunau, W.H. (1997) Peroxisomes: organelles at the crossroads. *Trends Cell Biol.* 7, 400–407
- Escher, P. und Wahli, W. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res.* 448, 121–138
- Everett, L., Galli, A. und Crabb, D. (2000) The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Liver* 20, 191–199
- Fahimi, H.D. (1969) Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.* 43, 275–288
- Fahimi, H.D., Reich, D., Völkl, A. und Baumgart, E. (1996) Contributions of the immunogold technique to investigation of the biology of peroxisomes. *Histochem. Cell Biol.* 106, 105–114
- Fahimi, H.D. und Baumgart, E. (1999) Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1219–1232
- Feierbach, B., Nogales, E., Downing, K.H. und Stearns, T. (1999) Alf1p, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with α -tubulin. *J. Cell Biol.* 144, 113–124
- Fischer, R. (1999) Nuclear movement in filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 39–68
- Frixione, E. (2000) Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 46, 73–94

- Fuchs, E. und Karakesisoglou, I. (2001) Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* 15, 1–14
- Fujiki, Y. (2000) Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett.* 476, 42–46
- Garcia, M.L. und Cleveland, D.W. (2001) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 41–48
- Goode, B.L., Drubin, D.G. und Barnes, G. (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 63–71
- Gorgas, K. (1985) Serial section analysis of mouse hepatic peroxisomes. *Anat. Embryol.* 172, 21–32
- Gould, S.J., Keller, G.A. und Subramani, S. (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* 107, 897–905
- Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. und Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol.* 108, 1657–1664
- Gould, S.J. und Valle, D. (2000) Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet.* 16, 340–345
- Grabenbauer, M., Fahimi, H.D. und Baumgart, E. (2001) Detection of peroxisomal proteins and their mRNAs in serial sections of fetal and newborn mouse organs. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 155–164
- Griparic, L. und Keller, T.C. (1998) Identification and expression of two novel CLIP-170/Restin isoforms expressed predominantly in muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1405, 35–46
- Griparic, L., Volosky, J.M. und Keller, T.C.S. (1998) Cloning and expression of chicken CLIP-170 and restin isoforms. *Gene* 206, 195–208
- Griparic, L. und Keller, T.C. (1999) Differential usage of two 5' splice sites in a complex exon generates additional protein sequence complexity in chicken CLIP-170 isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* 1449, 119–124
- Häyrinen, H.M., Svensson, L.T., Hultenby, K., Sormunen, R.T., Wilcke, M., Hiltunen, J.K. und Alexson, S.E.H. (1997) Immunocytochemical localization of the 70 kDa peroxisomal membrane protein in connections between peroxisomes in rat liver: support for a reticular organization of peroxisomes maintained by the cytoskeleton. *Eur. J. Cell Biol.* 72, 70–78
- Hagiwara, H., Yorifuji, H., Sato-Yoshitake, R. und Hirokawa, N. (1994) Competition between motor molecules (kinesin and cytoplasmic dynein) and fibrous microtubule-associated proteins in binding to microtubules. *J. Biol. Chem.* 269, 3581–3589
- Hajra, A.K., Burke, C.L. und Jones, C.L. (1979) Subcellular localization of acyl coenzyme A: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in rat liver peroxisomes (microbodies). *J. Biol. Chem.* 254, 10896–10900
- Hawkins, J.M., Jones, W.E., Bonner, F.W. und Gibson, G.G. (1987) The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug Metab. Rev.* 18, 441–515
- Heinemann, P. und Just, W.W. (1992) Peroxisomal protein import. *In vivo* evidence for a novel translocation competent compartment. *FEBS Lett.* 300, 179–182
- Hennig, D., Scales, S.J., Moreau, A., Murley, L.L., De Mey, J. und Kreis, T.E. (1998) A formiminotransferase cyclodeaminase isoform is localized to the Golgi complex and can mediate interaction of trans-Golgi network-derived vesicles with microtubules. *J. Biol. Chem.* 273, 19602–19611
- Herrmann, H. und Aebi, U. (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 79–90
- Heupel, R. und Heldt, H.W. (1994) Protein organization in the matrix of leaf peroxisomes. A multi-enzyme complex involved in photorespiratory metabolism. *Eur. J. Biochem.* 220, 165–172
- Hirokawa, N. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519–526
- Holzbaue, E.L., Hammarback, J.A., Paschal, B.M., Kravit, N.G., Pfister, K.K. und Vallee, R.B. (1991) Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene Glued. *Nature* 351, 579–583

- Hoogenraad, C.C., Eussen, B.H., Langeveld, A., van Haperen, R., Winterberg, S., Wouters, C.H., Grosveld, F., De Zeeuw, C.I. und Galjart, N. (1998) The murine CYLN2 gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 Williams syndrome critical region. *Genomics* 53, 348–358
- Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Grosveld, F., De Zeeuw, C.I. und Galjart, N. (2000) Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell Sci.* 113, 2285–2297
- Hruban, Z. und Rechcigl, M. (1969) Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry, and physiology. *Int. Rev. Cytol. Supplement* 1, 1–296
- Huang, A.H.C., Trelease, R.N. und Moore, T.S. jr. (1983) Biogenetic relationship between glyoxysomes and leaf-type peroxisomes in greening cotyledons of oilseeds. In: *Plant Peroxisomes* (Editoren: Huang, A.H.C., Trelease, R.N. und Moore, T.S. jr.) Academic Press, New York, USA, 183–197
- Huber, C.M., Saffrich, R., Anton, M., Paßreiter, M., Ansorge, W., Gorgas, K. und Just, W.W. (1997) A heterotrimeric G protein-phospholipase A₂ signaling cascade is involved in the regulation of peroxisomal motility in CHO cells. *J. Cell Sci.* 110, 2955–2968
- Huber, C.M., Saffrich, R., Ansorge, W. und Just, W.W. (1999) Receptor-mediated regulation of peroxisomal motility in CHO and endothelial cells. *EMBO J.* 18, 5476–5485
- Huber, C.M., Saffrich, R., Gorgas, K. und Just, W.W. (2000) Organelle motility regulated by the cell's environment: dissection of signaling pathways regulating movements of peroxisomes. *Protoplasma* 213, 18–27
- Imanaka, T., Shiina, Y., Takano, T., Hashimoto, T. und Osumi, T. (1996) Insertion of the 70-kDa peroxisomal membrane protein into peroxisomal membranes *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 271, 3706–3713
- Infante, C., Ramos-Morales, F., Fedriani, C., Bornens, M. und 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
- Issemann, I. und Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650
- Itin, C., Ulitzur, N., Muhlbauer, B. und Pfeffer, S.R. (1999) Mapmodulin, cytoplasmic dynein, and microtubules enhance the transport of mannose 6-phosphate receptors from endosomes to the trans-golgi network. *Mol. Biol. Cell* 10, 2191–2197
- Jansen, G.A., Ofman, R., Ferdinandusse, S., Ijlst, L., Muijsers, A.O., Skjeldal, O.H., Stokke, O., Jakobs, C., Besley, G.T., Wraith, J.E. und Wanders, R.J. (1997) Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat. Genet.* 17, 190–193
- Jedlitschky, G., Huber, M., Völkl, A., Müller, M., Leier, I., Müller, J., Lehmann, W.D., Fahimi, H.D. und Keppler, D. (1991) Peroxisomal degradation of leukotrienes by β -oxidation from the ω -end. *J. Biol. Chem.* 266, 24763–24772
- Johnsingh, A.A., Johnston, J.M., Merz, G., Xu, J., Kotula, L., Jacobsen, J.S. und Tezapsidis, N. (2000) Altered binding of mutated presenilin with cytoskeleton-interacting proteins. *FEBS Lett.* 465, 53–58
- Johnson, L.V., Walsh, M.L. und Chen, L.B. (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 990–994
- Jung, D., Filliol, D., Miehe, M. und Rendon, A. (1993) Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or TAU. *Cell Motil. Cytoskel.* 24, 245–255
- Kadota, Y., Niiya, A., Masaki, R., Yamamoto, A., Araki, M. und Taketani, S. (1997) A newly identified membrane protein localized exclusively in intracellular organelles of neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 46, 265–273
- Kammerer, S., Holzinger, A., Welsch, U. und Roscher, A.A. (1998) Cloning and characterization of the gene encoding the human peroxisomal assembly protein Pex3p. *FEBS Lett.* 429, 53–60
- Karecla, P.I. und Kreis, T.E. (1992) Interaction of membranes of the Golgi complex with microtubules *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 57, 139–146
- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. und Hallewell, R.A. (1991) CuZn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7381–7385

- Keller, J.M., Collet, P., Bianchi, A., Huin, C., Bouillaud-Kremarik, P., Becuwe, P., Schohn, H., Domenjoud, L. und Dauca, M. (2000) Implications of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in development, cell life status and disease. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 429–442
- Kersten, S., Desvergne, B. und Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421–424
- King, S.J. und Schroer, T.A. (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Cell Biol.* 2, 20–24
- King, S.M. (2000) The dynein microtubule motor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496, 60–75
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. und Ohsumi, Y. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151, 263–276
- Klopfenstein, D.R.C., Kappeler, F. und Hauri, H.P. (1998) A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J.* 17, 6168–6177
- Köhrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G. und Kiebler, M.A. (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* 10, 2945–2953
- Krämer, H. und Phistry, M. (1996) Mutations in the *Drosophila* hook gene inhibit endocytosis of the boss transmembrane ligand into multivesicular bodies. *J. Cell Biol.* 133, 1205–1215
- Krämer, H. und Phistry, M. (1999) Genetic analysis of hook, a gene required for endocytic trafficking in *Drosophila*. *Genetics* 151, 675–684
- Kraemer, J., Schmitz, F. und Drenckhahn, D. (1999) Cytoplasmic dynein and dynactin as likely candidates for microtubule-dependent apical targeting of pancreatic zymogen granules. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 265–277
- Krisans, S.K. (1996) Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804, 142–164
- Kumar, J., Yu, H. und Sheetz, M.P. (1995) Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. *Science* 267, 1834–1837
- Kumar, S., Lee, I.H. und Plamann, M. (2000) Cytoplasmic dynein ATPase activity is regulated by dynactin-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 31798–31804
- Kunau, W.H. und Erdmann, R. (1998) Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr. Biol.* 8, R 299–302
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680–685
- Lane, J. und Allan, V. (1999) Microtubule-based endoplasmic reticulum motility in *Xenopus laevis*: activation of membrane-associated kinesin during development. *Mol. Biol. Cell* 10, 1909–1922
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D.H. und Thumm, M. (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* 17, 3597–3607
- Lantz, V.A. und Miller, K.G. (1998) A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *J. Cell Biol.* 140, 897–910
- Lazarow, P.B. und De Duve, C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2043–2046
- Lazarow, P.B. und Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1, 489–530
- Lee, T.C. (1998) Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1394, 129–145
- Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Glozman, R. und Elazar, Z. (2000) Aut7p, a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane trafficking processes. *J. Biol. Chem.* 275, 32966–32973
- Leterrier, J.F., Rusakov, D.A., Nelson, B.D. und Linden, M. (1994) Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria *in situ* and *in vitro*. *Microsc. Res. Tech.* 27, 233–261

- Liao, G. und Gundersen, G.G. (1998) Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to deetyrosinated tubulin and vimentin. *J. Biol. Chem.* 273, 9797–9803
- Ligon, L.A. und Steward, O. (2000) Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* 427, 351–361
- Lim, H., Gupta, R.A., Ma, W.G., Paria, B.C., Moller, D.E., Morrow, J.D., DuBois, R.N., Trzaskos, J.M. und Dey, S.K. (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Genes Dev.* 13, 1561–1574
- Lock, E.A., Mitchell, A.M. und Elcombe, C.R. (1989) Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 145–163
- Lopez, L.A. und Sheetz, M.P. (1995) A microtubule-associated protein (MAP2) kinase restores microtubule motility in embryonic brain. *J. Biol. Chem.* 270, 12511–12517
- Lüers, G., Beier, K., Hashimoto, T., Fahimi, H.D. und Völkl, A. (1990) Biogenesis of peroxisomes: sequential biosynthesis of the membrane and matrix proteins in the course of hepatic regeneration. *Eur. J. Cell Biol.* 52, 175–184
- Lüers, G., Hashimoto, T., Fahimi, H.D. und Völkl, A. (1993) Biogenesis of peroxisomes: isolation and characterization of two distinct peroxisomal populations from normal and regenerating rat liver. *J. Cell Biol.* 121, 1271–1280
- Mannaerts, G.P., van Veldhoven, P.P. und Casteels, M. (2000) Peroxisomal lipid degradation via β - and α -oxidation in mammals. *Cell Biochem. Biophys.* 32, 73–87
- Marx, A., Pless, J., Mandelkow, E.M. und Mandelkow, E. (2000) On the rigidity of the cytoskeleton: are MAPs crosslinkers or spacers of microtubules? *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 949–965
- Masters, C. und Crane, D. (1995) In: *The peroxisome: a vital organelle* (Editoren: Masters, C. und Crane, D.) Cambridge University Press, New York, 1–286
- Masters, C. (1997) Gluconeogenesis and the peroxisome. *Mol. Cell. Biochem.* 166, 159–168
- Mithieux, G., Audebet, C. und Rousset, B. (1988) Association of purified thyroid lysosomes to reconstituted microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 969, 121–130
- Mithieux, G. und Rousset, B. (1988) Regulation of the microtubule-lysosome interaction: activation by Mg²⁺ and inhibition by ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 971, 29–37
- Mithieux, G. und Rousset, B. (1989) Identification of a lysosome membrane protein which could mediate ATP-dependent stable association of lysosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.* 264, 4664–4668
- Moser, H.W. (2000) Molecular genetics of peroxisomal disorders. *Front Biosci.* 5, D298–306
- Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L. und Aubourg, P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726–730
- Mosser, J., Lutz, Y., Stoeckel, M.E., Sarde, C.O., Kretz, C., Douar, A.M., Lopez, J., Aubourg, P. und Mandel, J.L. (1994) The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum. Mol. Genet.* 3, 265–271
- Motley, A.M., Hettema, E.H., Hogenhout, E.M., Brites, P., ten Asbroek, A.L., Wijburg, F.A., Baas, F., Heijmans, H.S., Tabak, H.F., Wanders, R.J. und Distel, B. (1997) Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nat. Genet.* 15, 377–380
- Müller, W.H., van der Krift, T.P., Krouwer, A.J., Wosten, H.A., van der Voort, L.H., Smaal, E.B. und Verkleij, A.J. (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10, 489–495
- Murata, M., Itoh, T.J., Kagiwada, S., Hishida, R., Hotani, H. und Ohnishi, S. (1992) Interaction of the Golgi membranes isolated from rabbit liver with microtubules *in vitro*. *Biol. Cell* 75, 127–134
- Murray, J.W., Bananis, E. und 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

- Neve, B.P., Fruchart, J.C. und Staels, B. (2000) Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1245–1250
- Newman, G.R., Jasani, B. und Williams, E.D. (1983) A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem. J.* 15, 543–555
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A. und Zerial, M. (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.* 1, 376–382
- Oakley, B.R. (2000) An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* 10, 537–542
- Ong, L.L., Lim, A.P.C., Er, C.P.N., Kuznetsov, S.A. und Yu, H. (2000) Kinectin-kinesin binding domains and their effects on organelle motility. *J. Biol. Chem.* 275, 32854–32860
- Opperdoes, F.R. und Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 80, 360–364
- Osumi, T. und Hashimoto, T. (1978) Acyl-CoA oxidase of rat liver: a new enzyme for fatty acid oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 479–485
- Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S. und 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
- Pedersen, J.I., Kase, B.F., Prydz, K. und Björkem, I. (1987) Liver peroxisomes and bile acid formation. In: *Peroxisomes in Biology and Medicine* (Editoren: Fahimi, H.D. und Sies, H.) Springer Verlag, Heidelberg, 67–77
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R. und Kreis, T.E. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends *in vivo*. *Cell* 96, 517–527
- Perichon, R., Bourre, J.M., Kelly, J.F. und Roth, G.S. (1998) The role of peroxisomes in aging. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 641–652
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* 70, 887–900
- Pierre, P., Pepperkok, R. und Kreis, T.E. (1994) Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 *in vivo*. *J. Cell Sci.* 107, 1909–1920
- Poll-The, B.T., Roels, F., Ogier, H., Scotto, J., Vamecq, J., Schutgens, R.B., Wanders, R.J., van Roermund, C.W., van Wijland, M.J., Schram, A.W., Tager, J.M. und Saudubray, J.M. (1988) A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy). *Am. J. Hum. Genet.* 42, 422–434
- Porter, K.R. (1957) The submicroscopic morphology of protoplasm. *Harvey Lect.* 51, 175–228
- Poulos, A., Sharp, P., Singh, H., Johnson, D.W., Carey, W.F. und Easton, C. (1993) Formic acid is a product of the α -oxidation of fatty acids by human skin fibroblasts: deficiency of formic acid production in peroxisome-deficient fibroblasts. *Biochem. J.* 292, 457–461
- Powers, J.M. und Moser, H.W. (1998) Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol.* 8, 101–120
- Pratt, M.M. (1986) Stable complexes of axoplasmic vesicles and microtubules: protein composition and ATPase activity. *J. Cell Biol.* 103, 957–968
- Purdue, P.E., Zhang, J.W., Skoneczny, M. und Lazarow, P.B. (1997) Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat. Genet.* 15, 381–384
- Radcliffe, P.A., Hirata, D., Vardy, L. und Toda, T. (1999) Functional dissection and hierarchy of tubulin-folding cofactor homologues in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 2987–3001
- Radcliffe, P.A. und Toda, T. (2000) Characterisation of fission yeast alp11 mutants defines three functional domains within tubulin-folding cofactor B. *Mol. Gen. Genet.* 263, 752–760
- Rajas, F., Gire, V. und Rousset, B. (1996) Involvement of a membrane-bound form of glutamate dehydrogenase in the association of lysosomes to microtubules. *J. Biol. Chem.* 271, 29882–29890

- Rapp, S., Saffrich, R., Anton, M., Jäckle, W., Ansorge, W., Gorgas, K. und Just, W. (1996) Microtubuli-based peroxisome movement. *J. Cell Sci.* 109, 837–849
- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–229
- Rhodin, J. (1954) Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Dissertationsschrift, Karolinska Institutet, Aktiebolaget, Godvil, Stockholm, Schweden
- Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1990) Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 110, 1623–1633
- Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1991) Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 17597–17605
- Rickard, J.E. und Kreis, T.E. (1996) CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* 6, 178–183
- Rickard, J.E. (1999) CLIP-170. In: *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins* (Editoren: Kreis, T. E. und Vale, R. D.) 2. Ausgabe, Oxford University Press, Oxford, U.K., 199–202
- Rogers, S.L., Tint, I.S., Fanapour, P.C. und Gelfand, V.I. (1997) Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3720–3725
- Rogers, S.L. und Gelfand, V.I. (2000) Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 57–62
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M. und Mortensen, R.M. (1999) PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell* 4, 611–617
- Rothwell, S.W., Nath, J. und Wright, D.G. (1989) Interactions of cytoplasmic granules with microtubules in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 108, 2313–2326
- Sack, S., Kull, F.J. und Mandelkow, E. (1999) Motor proteins of the kinesin family. *Eur. J. Biochem.* 262, 1–11
- Sacksteder, K.A. und Gould, S.J. (2000) The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 34, 623–652
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J. und Avila, J. (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* 61, 133–168
- Sato-Harada, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y. und Hirokawa, N. (1996) Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports. *Cell Struct. Funct.* 21, 283–295
- Sawin, K.E. (2000) Microtubule dynamics: the view from the tip. *Curr. Biol.* 10, R860–862
- Scheel, J. und Kreis, T.E. (1991) Motor protein independent binding of endocytic carrier vesicles to microtubules *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266, 18141–18148
- Scheel, J., Pierre, P., Rickard, J.E., Diamantopoulos, G.S., Valetti, C., van der Goot, F.G., Häner, M., Aebi, U. und Kreis, T.E. (1999) Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J. Biol. Chem.* 274, 25883–25891
- Schepers, L., Casteels, M., Vamecq, J., Parmentier, G., van Veldhoven, P.P. und Mannaerts, G.P. (1988) β -oxidation of the carboxyl side chain of prostaglandin E₂ in rat liver peroxisomes and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 263, 2724–2731
- Schiebel, E. (2000) γ -tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 113–118
- Schrader, M., Burkhardt, J.K., Baumgart, E., Lüers, G., Spring, H., Völkl, A. und Fahimi, H.D. (1996a) 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
- Schrader, M., Burkhardt, J.K., Baumgart, E., Lüers, G., Völkl, A. und Fahimi, H.D. (1996b) The importance of microtubules in determination of shape and intracellular distribution of peroxisomes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804, 669–671

- Schrader, M., Kriegelstein, K. und Fahimi, H.D. (1998) Tubular peroxisomes in HepG2 cells: selective induction by growth factors and arachidonic acid. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 87–96
- Schrader, M., King, S.J., Stroh, T.A. und Schroer, T.A. (2000) Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. *J. Cell Sci.* 113, 3663–3671
- Schroer, T.A. (2000) Motors, clutches and brakes for membrane traffic: a commemorative review in honor of Thomas Kreis. *Traffic* 1, 3–10
- Schroer, T.A. (2001) Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 92–96
- Scotto, J.M., Hadchouel, M., Odievre, M., Laudat, M.H., Saudubray, J.M., Dulac, O., Beucler, I. und Beaune, P. (1982) Infantile phytanic acid storage disease, a possible variant of Refsum's disease: three cases, including ultrastructural studies of the liver. *J. Inherit. Metab. Dis.* 5, 83–90
- Severin, F.F., Shanina, N.A., Kuznetsov, S.A. und Gelfand, V.I. (1991) MAP2-mediated binding of chromaffin granules to microtubules. *FEBS Lett.* 282, 65–68
- Sheetz, M.P. (1999) Motor and cargo interactions. *Eur. J. Biochem.* 262, 19–25
- Sherline, P., Lee, Y.C. und Jacobs, L.S. (1977) Binding of microtubules to pituitary secretory granules and secretory granule membranes. *J. Cell Biol.* 72, 380–389
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858
- Shpetner, H.S. und Vallee, R.B. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 59, 421–432
- Singh, I. (1996) Mammalian peroxisomes: metabolism of oxygen and reactive oxygen species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804, 612–627
- Sisson, J.C., Field, C., Ventura, R., Royou, A. und Sullivan, W. (2000) Lava lamp, a novel peripheral golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization. *J. Cell Biol.* 151, 905–918
- Small, G.M., Brolly, D. und Connock, M.J. (1980) Palmitoyl-CoA oxidase: detection in several guinea pig tissues and peroxisomal localisation in mucosa of small intestine. *Life Sci.* 27, 1743–1751
- Smith, D.S., Järlfors, U. und Cameron, B.F. (1975) Morphological evidence for the participation of microtubules in axonal transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253, 472–506
- South, S.T. und Gould, S.J. (1999) Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J. Cell Biol.* 144, 255–266
- Spranger, J.W., Opitz, J.M. und Bidder, U. (1971) Heterogeneity of Chondrodysplasia punctata. *Humangenetik* 11, 190–212
- Stebbins, H. (1997) Direct evidence for the nature of the binding of mitochondria to microtubules in ovarian nutritive tubes of an hemipteran insect. *Cell Tissue Res.* 289, 333–337
- Subramani, S. (1996) Protein translocation into peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 271, 32483–32486
- Subramani, S., Koller, A. und Snyder, W.B. (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 399–418
- Suprenant, K.A. und Dentler, W.L. (1982) Association between endocrine pancreatic secretory granules and *in-vitro*-assembled microtubules is dependent upon microtubule-associated proteins. *J. Cell Biol.* 93, 164–174
- Svoboda, A. und Slaninová, I. (1997) Colocalization of microtubules and mitochondria in the yeast *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*. *Can. J. Microbiol.* 43, 945–953
- Swanson, J., Bushnell, A. und Silverstein, S.C. (1987) Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1921–1925
- Swanson, J.A., Locke, A., Ansel, P. und Hollenbeck, P.J. (1992) Radial movement of lysosomes along microtubules in permeabilized macrophages. *J. Cell Sci.* 103, 201–209

- Terasaki, M. und Reese, T.S. (1994) Interactions among endoplasmic reticulum, microtubules, and retrograde movements of the cell surface. *Cell Motil. Cytoskel.* 29, 291–300
- Terasaki, M. (2000) Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol. Biol. Cell.* 11, 897–914
- Terlecky, S.R. und Fransen, M. (2000) How peroxisomes arise. *Traffic* 1, 465–473
- Thiemann, M., Schrader, M., Völkl, A., Baumgart, E. und 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
- Thyberg, J. und Moskalewski, S. (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp. Cell Res.* 246, 263–279
- Titorenko, V.I., Chan, H. und Rachubinski, R.A. (2000) Fusion of small peroxisomal vesicles *in vitro* reconstructs an early step in the *in vivo* multistep peroxisome assembly pathway of *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Biol.* 148, 29–43
- Titorenko, V.I. und Rachubinski, R.A. (2001) Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends Cell Biol.* 11, 22–29
- Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J.C. und Simons, K. (1999) Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* 112, 21–33
- Toyoshima, I., Yu, H., Steuer, E.R. und Sheetz, M.P. (1992) Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J. Cell Biol.* 118, 1121–1131
- Trinczek, B., Ebner, A., Mandelkow, E.M. und Mandelkow, E. (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J. Cell Sci.* 112, 2355–2367
- Tuma, M.C. und Gelfand, V.I. (1999) Molecular mechanisms of pigment transport in melanophores. *Pigment Cell Res.* 12, 283–294
- Ulitzur, N., Humbert, M. und Pfeffer, S.R. (1997) Mapmodulin: a possible modulator of the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5084–5089
- Ulrich, J., Herschkowitz, N., Heitz, P., Sigrist, T. und Baerlocher, P. (1978) Adrenoleukodystrophy. Preliminary report of a connatal case. Light- and electron microscopical, immunohistochemical and biochemical findings. *Acta Neuropathol. (Berl)* 43, 77–83
- Vale, R.D. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J. Cell Biol.* 135, 291–302
- Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E. und 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
- van den Bosch, H., Schutgens, R.B., Wanders, R.J. und Tager, J.M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 157–197
- van der Blik, A.M. und Meyerowitz, E.M. (1991) Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* 351, 411–414
- van der Klei, I.J. und Veenhuis, M. (1996) Peroxisome biogenesis in the yeast *Hansenula polymorpha*: a structural and functional analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804, 47–59
- van der Sluijs, P., Bennet, M.K., Antony, C., Simons, K. und Kreis, T.E. (1990) Binding of exocytotic vesicles from MDCK cells to microtubules *in vitro*. *J. Cell Sci.* 95, 545–553
- van Roermund, C.W., van den Berg, M. und Wanders, R.J. (1995) Localization of peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase in particles of varied density in rat liver: implications for peroxisome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1245, 348–358
- Vaughan, K.T. und Vallee, R.B. (1995) Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150^{glued}. *J. Cell Biol.* 131, 1507–1516

- Vaughan, K.T., Tynan, S.H., Faulkner, N.E., Echeverri, C.J. und Vallee, R.B. (1999) Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* 112, 1437–1447
- Völkl, A. und Fahimi, H.D. (1985) Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats. *Eur. J. Biochem.* 149, 257–265
- Völkl, A., Baumgart, E. und Fahimi, H.D. (1988) Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J. Histochem. Cytochem.* 36, 329–336
- Völkl, A., Baumgart, E. und Fahimi, H.D. (1996) Isolation and characterization of peroxisomes. In: *Subcellular Fractionation: A Practical Approach* (Editoren: Graham, J. und Rickwood, D.) Oxford University Press, Oxford, U. K., 143–167
- Wacker, I., Kaether, C., Krömer, A., Migala, A., Almers, W. und Gerdes, H.H. (1997) Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J. Cell Sci.* 110, 1453–1463
- Walenta, J.H., Didier, A.J., Liu, X. und Krämer, H. (2001) The golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J. Cell Biol.* 152, 923–934
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Epstein, D.L. und Sheetz, M.P. (1997) n-ethylmaleimide and ethacrynic acid inhibit kinesin binding to microtubules in a motility assay. *Cell Motil. Cytoskel.* 37, 289–299
- Wanders, R.J.A., van Grunsven, E.G. und Jansen, G.A. (2000) Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α - and β -oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 141–149
- Waterman-Storer, C.M. und Salmon, E.D. (1998) Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.* 8, 798–806
- Wiemer, E.A.C., Lüers, G.H., Faber, K.N., Wenzel, T., Veenhuis, M. und Subramani, S. (1996) Isolation and characterization of Pas2p, a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* 271, 18973–18980
- Wiemer, E.A.C., Wenzel, T., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. und Subramani, S. (1997) Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behaviour and association with microtubules. *J. Cell Biol.* 136, 71–80
- Wilcke, M., Hultenby, K. und Alexson, S.E. (1995) Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver. Implications for peroxisome structure and biogenesis. *J. Biol. Chem.* 270, 6949–6958
- Wintrebert, P. (1931) La rotation immédiate de l'œuf pondu et la rotation d'activation chez *Discoglossus pictus* *Oth.* *Comptes Rend. Soc. Biol.* 106, 439–442. Zitiert in: Frixione, E. (2000)
- Yaffe, M.P., Harata, D., Verdes, F., Eddison, M., Toda, T. und Nurse, P. (1996) Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11664–11668
- Yaffe, M.P. (1999) Dynamic mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 1, E149–E150
- Yamamoto, K. und 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
- Zaar, K., Völkl, A. und Fahimi, H.D. (1991) Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: identification with L- α -hydroxyacid oxidase B. *J. Cell Biol.* 113, 113–121
- Zaar, K. (1992) Structure and function of peroxisomes in the mammalian kidney. *Eur. J. Cell Biol.* 59, 233–254

Publikationsliste

Aus dieser Studie hervorgegangene Publikationen:

Originalarbeiten:

Thiemann, M., Schrader, M., Völkl, A., Baumgart, E. und 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

Schrader, M., Thiemann, M. und Fahimi, H.D. (2001) Peroxisomal motility and interaction with microtubules. Manuskript eingereicht (*Microsc. Res. Tech.*)

Poster:

Thiemann, M., Schrader, M., Völkl, A., Baumgart, E. und Fahimi, H.D. (1998) Interaction of peroxisomes with microtubules: a novel quantitative *in vitro* microtubule-peroxisome binding assay. *Eur. J. Cell Biol.* 75, Suppl. 48, 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) in Saarbrücken, 15.-19.3.1998.

Thiemann, M., Baumgart, E., Völkl, A. und Fahimi, H.D. (1999) Purification of a protein mediating the binding of rat liver peroxisomes to microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* 78, Suppl. 49, 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) in Rostock, 14.-18.3.1999.

Thiemann, M., Schrader, M., Völkl, A., Baumgart, E. und Fahimi, H.D. (1999) Specific binding of peroxisomes to microtubules: a novel quantitative *in vitro* microtubule-peroxisome binding assay. Abstract 148. International Meeting on „Transport of proteins and membranes in eukaryotic cells“. Göttingen, 29.9.-1.10.1999.

Thiemann, M., Grabenbauer, M., Völkl, A., Baumgart, E. und Fahimi, H.D. (2000) Peroxisome-microtubule binding. Evidence suggesting the involvement of a CLIP-like protein. *Mol. Biol. Cell* 11, Suppl. 422a. 40. Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Zellbiologie (ASCB) in San Francisco, 9.-13.12.2000.

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Christine Clayton für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und vor der Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg zu vertreten. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Dariush Fahimi für die Bereitstellung der Ressourcen des Institutes für Anatomie und Zellbiologie II, für die sehr guten Rahmenbedingungen in der Abteilung, für das Überlassen des Themas, sowie für die stimulierenden Diskussionen und die ausgezeichnete Betreuung. Auch Herrn Prof. Dr. Dr. Alfred Völkl und Frau PD Dr. Eveline Baumgart danke ich für die stetige Gesprächsbereitschaft und für wertvolle Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Herrn Markus Grabenbauer für seine Unterstützung bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie und Elektronenmikroskopie, für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit, sowie für anregende Diskussionen und gutes Miteinander.
- Herrn Arno Schad für mancherlei Unterstützung bei diversen Computerprogrammen und für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.
- Frau Dr. Irmtraud Steinmetz für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Michael Schrader für stimulierende Diskussionen, für die Bereitstellung des VECM-Bildes und für die gute Zusammenarbeit.
- Herrn Gernot Rothardt für die Einführung in molekularbiologische Methoden.
- Frau Gabie Krämer für die Anfertigung von Ultradünnschnitten und deren Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie.
- Herrn PD Dr. Kurt Zaar für seine Einführung in die Negativkontrast-Elektronenmikroskopie.
- Herrn Uwe Böhm für die Einführung in das Programm InDesign.
- Herrn Dr. Niels Galjart für stimulierende Diskussionen und für die Bereitstellung von CLIP-115-Antikörpern und CLIP-115-Fusionsprotein.
- Herrn Prof. Dr. Thomas Kreis (†) für das Schicken von CLIP-170-Antikörpern.
- Frau Prof. Dr. Trina A. Schroer für die Bereitstellung von Dynein, Dynactin und ATP-Release-Fraktion.
- Herrn Richard Morlang für die Durchführung von Fotoarbeiten.
- Herrn Heribert Mohr für die Einführung in biochemische Methoden.
- Frau Annemarie Achten für ihre Hilfe bei organisatorischen Fragen.
- Herrn PD Dr. Hans-Peter Köst für wertvolle Ratschläge.
- Frau Antje Kohler für ihre stete Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie II mein Dank, insbesondere für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.