

# Charakterisierung der peroxisomalen ARF-Bindung

Inaugural-Dissertation

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

Dorothee Lay

2004

# INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Dorothee Lay  
aus Quierschied

Tag der mündlichen Prüfung:  
4. Mai 2004

# Charakterisierung der peroxisomalen ARF-Bindung

Gutachter: Prof. Dr. Felix T. Wieland  
Prof. Dr. Wilhelm W. Just

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ABKÜRZUNGEN.....	VI
ZUSAMMENFASSUNG.....	VIII
<b>I EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Peroxisomen im zellulären Kontext.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Peroxisomen - Funktionen und Erkrankungen.....</b>	<b>2</b>
<b>3 Peroxisomenbiogenese .....</b>	<b>4</b>
3.1 Die Peroxine.....	4
3.2 Modelle der Biogenese.....	6
<b>4 Peroxisomen, ARF und Coatomer.....</b>	<b>8</b>
4.1 Die Rolle von Pex11 bei der Peroxisomenproliferation.....	8
4.2 ADP-Ribosylierungsfaktoren und Hüllproteinkomplexe.....	9
<b>5 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>11</b>
<b>II ERGEBNISSE.....</b>	<b>13</b>
<b>1 Peroxisomale Spezifität der ARF- und Coatomerbindung .....</b>	<b>13</b>
1.1 Vergleichende Inkubation: Peroxisomen versus Golgi.....	13
1.2 Inkubation von Peroxisomen nach Stimulation.....	15
1.3 Hepatocytengradienten.....	17
<b>2 Identifizierung des peroxisomalen ARF-Subtyps .....</b>	<b>19</b>
2.1 ARF-Bindung an verschieden vorbehandelte Peroxisomen.....	19
2.2 Cytosolfractionierung mittels Gelfiltration.....	20
2.3 MALDI- und Edman-Analyse des peroxisomalen ARF-Subtyps.....	22
2.4 Herstellung ARF-Subtypen spezifischer Antikörper .....	24
2.4.1 Auswahl geeigneter Peptide .....	24
2.4.2 Spezifität der Antiseren.....	25
<b>3 Charakterisierung der peroxisomalen ARF- und Coatomerbindung.....</b>	<b>27</b>
3.1 ARF ist essentiell für die Coatomerbindung .....	27
3.2 ARF1 vermittelt die Bindung von Coatomer .....	28
3.3 Peroxisomale Komplexe nach ARF- und Coatomerbindung.....	30
<b>4 ATP und IPF: Beeinflussung der peroxisomalen Bindung von ARF und Coatomer.....</b>	<b>32</b>
4.1 ATP moduliert die Bindung von ARF und Coatomer.....	32
4.2 Einfluß der IPF auf die Rekrutierung von ARF und Coatomer.....	33
4.2.1 Der IPF-Effekt ist unabhängig von ATP .....	33
4.2.2 Der IPF-Effekt beruht nicht auf einem Protein-Quencheffekt .....	35
4.2.3 Genauere Studien der IPF-Wirkung in Zusammenhang mit ATP.....	36
<b>5 In vivo Daten für die Relevanz der peroxisomalen ARF- und Coatomerbindung .....</b>	<b>38</b>
5.1 Phänotypische Veränderungen in ARF- bzw. Coatomermutanten.....	38
5.2 Quantitative Auswertung der Studien in <i>S. cerevisiae</i> .....	41
<b>6 Peroxisomale Vesikulierung.....</b>	<b>44</b>
6.1 Konstriktionen peroxisomaler Membranen.....	44
6.2 Segregation peroxisomaler Membranproteine .....	46

<b>7</b>	<b>Charakterisierung niederdichter peroxisomaler Strukturen .....</b>	<b>48</b>
7.1	Dichtegradientenanalyse von Peroxisomen nach ATP-Inkubation .....	48
7.2	Die Rolle von ATP bei der Freisetzung einer peroxisomalen Subpopulation.....	51
7.2.1	Die Anwesenheit von ATP, jedoch nicht seine Hydrolyse bewirken die Veränderung .....	51
7.2.2	Neben ATP führen auch ARF und Coatomer zu niederdichten peroxisomalen Strukturen .....	54
<b>III</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>1</b>	<b>Spezifität der peroxisomalen ARF- und Coatomerbindung .....</b>	<b>58</b>
1.1	Die Bedeutung des ER .....	58
1.2	Der Vergleich mit Golgi-Membranen .....	59
1.3	Der Einfluß von Peroxisomenproliferatoren .....	60
<b>2</b>	<b>ARF1 und ARF6, Regulatoren der Peroxisomenproliferation .....</b>	<b>62</b>
2.1	ARF1, Mediator der peroxisomalen Coatomerbindung .....	62
2.2	<i>In vivo</i> -Relevanz von ARF1 und ARF6 bei der Proliferation .....	63
<b>3</b>	<b>Regulation der ARF-Bindung an Peroxisomen .....</b>	<b>64</b>
3.1	Elemente der intermediären Poolfraktion des Cytosols .....	64
3.2	ATP-abhängige Regulation .....	66
<b>4</b>	<b>Modelle der Vesikulierung peroxisomaler Membranen.....</b>	<b>69</b>
4.1	Konstitutive Vesikulierung .....	69
4.2	Coatomer-abhängige Vesikulierung.....	72
4.3	Abschließendes Modell .....	73
<b>IV</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>74</b>
<b>1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>74</b>
1.1	Chemikalien und Verbrauchsartikel .....	74
1.2	Spezielle Chemikalien und Artikel .....	74
1.3	Antikörper .....	75
1.4	Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE .....	77
1.5	Enzyme und Inhibitoren .....	77
<b>2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>78</b>
2.1	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	78
2.1.1	Puffer .....	78
2.1.2	ATP-regenerierendes System (ARS).....	78
2.2	Haltung und Behandlung der Versuchstiere.....	79
2.3	Gewinnung von Antiseren gegen ARF1 und ARF6.....	79
2.3.1	Peptide .....	79
2.3.2	Kopplung der Peptide an KLH.....	80
2.3.3	Immunisierung der Kaninchen .....	80
2.3.4	Spezifität der ARF-Antikörper .....	81
2.4	Proteinbestimmung .....	81
2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	81
2.4.2	Proteinabschätzung in einer peroxisomalen Fraktion.....	81
2.5	Bestimmung des Phospholipidgehalts.....	82
2.6	Proteinfällung.....	82
2.6.1	TCA-Präzipitation .....	82
2.6.2	Aceton-Präzipitation.....	83
2.7	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE .....	83
2.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	83

2.9	Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen .....	84
2.9.1	Silberfärbung .....	84
2.9.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 .....	85
2.9.3	Autoradiographie/Fluorographie .....	85
2.10	Westernblot-Analyse .....	86
2.10.1	Proteintransfer auf PVDF-Membranen .....	86
2.10.2	Immunchemischer Nachweis von Proteinen .....	86
2.11	Densitometrische Auswertung .....	87
2.12	Isolierung von Primärhepatozyten .....	87
2.13	Metabolisches Markieren von Proteinen <i>in vivo</i> .....	88
2.14	Isolierung von Peroxisomen .....	89
2.14.1	Großpräparation .....	89
2.14.2	Peroxisomenpräparation für Frischmaterial .....	90
2.14.3	Isolierung aus metabolisch markierten Hepatozyten .....	91
2.15	Rattenlebercytosol .....	92
2.15.1	Isolierung von Cytosol .....	92
2.15.2	Fraktionierung von Cytosol .....	92
2.16	Expression und Reinigung rekombinanter ARFs .....	93
2.16.1	Transformation von ARF und N-Myristoyltransferase .....	93
2.16.2	Expression rekombinanter ARF-Proteine .....	93
2.16.3	Reinigung rekombinanter ARF-Proteine .....	94
2.17	Isolierung peroxisomaler Membranen .....	95
2.17.1	Behandlung mit Hochsalz .....	95
2.17.2	Behandlung mit Carbonat .....	96
2.18	Cytosolinkubation von Peroxisomen und Golgi .....	96
2.18.1	Inkubation von SLO-permeabilisierten Hepatocyten .....	96
2.18.2	Inkubation von Organellen mit Cytosol und cytosolischen Fraktionen .....	97
2.18.3	Inkubation mit rekombinantem ARF .....	99
2.19	Identifizierung des ARF-Subtyps .....	99
2.19.1	Bindung von ARF an Peroxisomen .....	99
2.19.2	Massenspektrometrie .....	99
2.19.3	Sequenzierung nach Edman .....	100
2.20	CHAPS-solubilierte Komplexe .....	100
2.21	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	101
2.21.1	Verwendete Stämme .....	101
2.21.2	Kultivierung der Hefen .....	102
2.21.3	Auswertung .....	103
2.22	Arbeiten mit CHO-Zellen .....	104
2.22.1	Zellkultur .....	104
2.22.2	Immunfluoreszenz .....	105
2.23	Elektronenmikroskopie .....	106
2.24	Inkubationen zur Analyse des ATP-Einflusses .....	106
2.24.1	Inkubationen von <sup>35</sup> S-markierten Peroxisomen .....	106
2.24.2	ATP und peroxisomale Subpopulation .....	107
<b>V</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>108</b>
	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>120</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>121</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b>	Modell der peroxisomalen Biogenese (in Anlehnung an Lazarow und Fujiki, 1985).....	7
<b>Abb. 2:</b>	Vergleichende Inkubation von Peroxisomen und Golgi-Membranen mit Cytosol.....	14
<b>Abb. 3:</b>	Vergleich von stimuliertem und unstimuliertem Cytosol.....	15
<b>Abb. 4:</b>	Einfluß der Clofibratstimulation auf die peroxisomale ARF- und Coatomerbindung.....	16
<b>Abb. 5:</b>	ARF1 und Coatomer kofraktionieren im Hepatocytengradienten mit Peroxisomen.....	18
<b>Abb. 6:</b>	Bindung von ARF und Coatomer an peroxisomale Membranpräparationen.....	20
<b>Abb. 7:</b>	Fraktionierung von Rattenlebercytosol mittels Gelfiltration.....	21
<b>Abb. 8:</b>	MALDI-MS zur Analyse des peroxisomalen ARF-Subtypes.....	23
<b>Abb. 9:</b>	Identifizierung des peroxisomalen ARF-Subtypes mit Edman-Analyse.....	24
<b>Abb. 10:</b>	Alignment der sechs ARF-Subtypen und Lokalisierung der immunogenen Peptide.....	25
<b>Abb. 11:</b>	Spezifität der ARF-Antikörper im Westernblot.....	26
<b>Abb. 12:</b>	Die peroxisomale Coatomerbindung hängt von ARF·GTP ab.....	27
<b>Abb. 13:</b>	ARF1·GTP vermittelt die peroxisomale Coatomerbindung.....	29
<b>Abb. 14:</b>	Analyse peroxisomaler Membrankomplexe nach Solubilisierung in CHAPS.....	30
<b>Abb. 15:</b>	ATP und seine Hydrolyse beeinflussen die Bindung von ARF und Coatomer.....	32
<b>Abb. 16:</b>	IPF und ATP modulieren die peroxisomale ARF- und Coatomerbindung auf verschiedene Weise.....	34
<b>Abb. 17:</b>	Die Wirkung von IPF basiert nicht auf einem durch Protein hervorgerufenen Quencheffekt.....	36
<b>Abb. 18:</b>	IPF und ATP wirken voneinander unabhängig und haben verschiedene Effektoren an der Peroxisomenmembran.....	37
<b>Abb. 19:</b>	Veränderung des peroxisomalen Phänotypes in $\alpha$ COP-Mutanten der Hefe <i>S. cerevisiae</i> nach Induktion mit Oleat.....	40
<b>Abb. 20:</b>	Peroxisomaler Phänotyp in <i>arf</i> -Mutanten von <i>S. cerevisiae</i> nach Inkubation mit Oleat...	41
<b>Abb. 21:</b>	Peroxisomale Proliferation in Hefemutanten nach Stimulation mit Oleat.....	42
<b>Abb. 22:</b>	Konstriktionen der peroxisomalen Membran nach Behandlung mit Clofibrat und Thyroxin.....	45
<b>Abb. 23:</b>	Segregation peroxisomaler Membranproteine nach Überexpression von Pex1 $\alpha$ p und Pex1 $\beta$ p in CHO-Zellen.....	47
<b>Abb. 24:</b>	Umverteilung peroxisomaler Proteine zu niedrigerer Dichte nach ATP-Inkubation und Identifizierung des <i>nonmuscle myosin heavy chain-A</i> ( <i>MYH9</i> ).....	49
<b>Abb. 25:</b>	Inkubation mit ATP führt zum Freisetzen einer niederdichten peroxisomalen Subpopulation.....	52

---

<b>Abb. 26:</b> Sedimentationsanalysen durch differentielles Zentrifugieren der ATP-inkubierten Peroxisomen .....	53
<b>Abb. 27:</b> Charakterisierung flottierender peroxisomaler Strukturen .....	55
<b>Abb. 28:</b> ARF-Bindung im Zusammenspiel mit ATP- und IPF-abhängigen Prozessen an der Peroxisomenmembran .....	68
<b>Abb. 29:</b> Modell zur Vesikulierung der peroxisomalen Membran .....	71
<b>Abb. 30:</b> ARF- und PI-abhängige Interaktionen an der Peroxisomenmembran .....	73

## ABKÜRZUNGEN

Neben den international gültigen Einheiten und chemischen Symbolen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP-PNP	Adenosin-5'-[ $\beta,\gamma$ -imido]-triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APF	ARF-Poolfraktion
ARF	ADP-ribosylierungsfaktor
ARS	ATP-regenerierendes System
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
COP	<i>coat protein</i>
CPF	Coatmerpoolfraktion
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTP-Hydrolyse aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDP $\beta$ S	Guanosin-5'-[ $\beta$ -thio]-diphosphat
GEF	Guanosinnucleotid Austauschfaktor
GMP-PNP	Guanosin-5'-[ $\beta,\gamma$ -imido]-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
IPF	intermediäre Poolfraktion
kDa	Kilodalton

MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (molekulare Ausschlußgröße)
NMT	N-Myristoyltransferase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pex	Peroxin
PMP	peroxisomales Membranprotein
PNS	postnukleärer Überstand
PTS	peroxisomales Targetingsignal
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur (25°C)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
TCA	<i>tricarboxylic acid</i> (Trichloressigsäure)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
U	<i>unit(s)</i>
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht

### *Einbuchstabencode der Aminosäuren*

A	Alanin	M	Methionin
C	Cytosin	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Thyrosin

## ZUSAMMENFASSUNG

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, daß ARF zusammen mit Coatomer an isolierte Peroxisomen der Rattenleber bindet. Darauf aufbauend wurde zunächst gezeigt, daß die ARF-Bindung für Peroxisomen spezifisch ist und von einer Behandlung der Tiere mit Peroxisomenproliferatoren abhängt. Von den sechs bei Säugern bekannten ARF-Isoformen konnten ARF1 und ARF6 an der Peroxisomenmembran identifiziert werden. Funktionelle Studien zeigten, daß ARF1 nicht jedoch ARF6 für die Rekrutierung von Coatomer an Peroxisomen essentiell ist. Dabei modulieren ATP und Faktoren aus dem Cytosol in synergistischer Weise insbesondere die ARF1-Rekrutierung. Zudem lieferten Experimente in flottierenden Nycodenzgradienten *in vitro* Hinweise zur ARF- und Coatomer-abhängigen Generierung einer zusätzlichen peroxisomalen Population. Die *in vivo*-Relevanz wurde am Modell der Hefe *S. cerevisiae* mit ARF- und Coatomermutanten untersucht. Die oleat-induzierte Proliferation der Peroxisomen konnte dabei durch inaktiven Coatomer oder funktionsloses ARF1 inhibiert werden. Demgegenüber führte die Deletion von *ScARF3*, dem Hefe-Homologen des Säuger-ARF6, zu einer verstärkten Proliferation unter Oleat.

Neben der ARF1/Coatomer-abhängigen Bildung peroxisomaler Vesikel scheint ein zweiter Mechanismus der Peroxisomenvermehrung zu existieren. An ihm könnten neben Pex11 $\beta$ p auch Komponenten des Aktincytoskeletts beteiligt sein. So konnte in der vorliegenden Arbeit das Aktin-bindende Myosin MYH9 an einer durch ATP generierten peroxisomalen Subpopulation identifiziert werden. Des weiteren zeigen Arbeiten anderer Gruppen eine Beteiligung des Dynamin-ähnlichen Proteins DLP-1 an einem späteren Stadium der peroxisomalen Teilung. So führt die Deletion von DLP-1 in Zusammenhang mit Pex11 $\beta$ p-Expression zur Ausbildung tubulärer Peroxisomen. Eigene Befunde zeigen nach Expression von Pex11 $\beta$ p-Varianten ebenfalls die Ausbildung von Tubuli, die darüber hinaus gepaart sind mit einer atypischen Segregation von peroxisomalen Membranproteinen. Ähnliche Membranveränderungen in Form von Perlenschnüren mit ausgeprägten Konstriktionen ließen sich auch durch Gabe von Peroxisomenproliferatoren in der Rattenleber induzieren. All diese Befunde, die zu einer Bildung von Tubuli führen, implizieren eine verhinderte Teilung der Peroxisomen.

Aus den vorgestellten Daten lassen sich zwei Modelle entwickeln, die eine Coatomer-abhängige und eine Coatomer-unabhängige Vesikulierung der Peroxisomenmembran beschreiben. Dabei kann letzterer Prozeß als dreistufige Sequenz aus (i) Segregation von Membranproteinen, (ii) Ausbildung von Konstriktionen und (iii) Cytoskelett/DLP-1-vermittelter Membranabschnürung betrachtet werden. Zusammen mit jüngsten eigenen Beobachtungen, die eine Steuerung des peroxisomalen Phosphoinositid-Metabolismus durch ARF und Komponenten des Cytosols zeigen, weisen die hier vorliegenden Untersuchungen der kleinen GTPase ARF bei den membrandynamischen Prozessen innerhalb der Vesikulierung von Peroxisomen eine zentrale Rolle zu.

## **SUMMARY**

At the beginning of the present work, unspecified binding of both ARF (ADP-ribosylation factor) and coatomer to isolated rat liver peroxisomes was known. Based on these data, it was shown that ARF-binding to peroxisomes is specific and depends on treating the animals with peroxisome proliferators. Out of the six ARF-isoforms known in mammals both ARF1 and ARF6 are bound to the peroxisomal membrane. According to functional studies, ARF1 but not ARF6 is essential for recruiting coatomer to peroxisomes. Moreover, the ARF1-binding is modulated by ATP and cytosolic factors that both act in a synergistic manner. In addition, flotation experiments in nycodenz gradients provided evidence for the ARF- and coatomer dependent generation of a new peroxisomal population *in vitro*. The *in vivo* relevance of peroxisomal ARF/coatomer binding was studied in the yeast *S.cerevisiae* as a model system using ARF and coatomer mutants, respectively. The oleate induced proliferation of peroxisomes was inhibited by functional inactivated ARF1 and coatomer. In contrast, the deletion of *ScARF3*, the yeast homolog of mammalian ARF6, resulted in a remarkable increase in proliferation of peroxisomes.

Beside the ARF1/coatomer-dependent formation of peroxisomal vesicles, there is evidence for a second mechanism of peroxisomal propagation involving both Pex11 $\beta$ p and components of the actin cytoskeleton. In the present study, myosin MYH9, an actin binding protein, was identified in a subpopulation of peroxisomes that was generated in an ATP-dependent manner. In line with this observation, others have shown the involvement of the dynamin-like protein 1 (DLP-1) acting in a later step of peroxisomal fission. Deleting DLP-1 function in a Pex11 $\beta$ p overexpressing background caused peroxisomes to tubulate. Own studies, expressing a tagged Pex11 $\beta$ p demonstrated formation of peroxisomal tubuli accompanied by an atypical segregation of peroxisomal membrane proteins. A similar phenotype could be induced in rat livers by distinct peroxisome proliferators revealing peroxisomal constrictions that resembled pearls on a string.

According to the presented data, two models of peroxisomal vesiculation, a coatomer-dependent and a coatomer-independent one, were deduced. The latter consists of a three-step procedure comprising (i) segregation of membrane proteins, (ii) formation of constrictions, and (iii) cytoskeleton/DLP-1 mediated fission of the membrane. In the light of our recent observations, that ARF and cytosolic components regulate peroxisomal phosphoinositide metabolism, the presented data attribute a central role in peroxisome biogenesis to the small GTPase ARF.

---

# **I EINLEITUNG**

## **1 Peroxisomen im zellulären Kontext**

Das definierende Merkmal eukaryontischer Zellen ist die Unterteilung in membranumschlossene Funktionsräume, die sogenannte Kompartimentierung durch Organellen. Diese im Laufe der Evolution erworbene Eigenschaft ermöglicht eine räumliche und zeitliche Trennung von anabolen und katabolen Prozessen innerhalb einer Zelle und bietet damit die Möglichkeit, den Ablauf von Reaktionsfolgen genau zu regulieren. Die Existenz von Organellen bietet den Vorteil, enzymatische Reaktionen zu konzentrieren und erlaubt die Trennung konkurrierender metabolischer Prozesse eben so wie die Absonderung schädlicher Produkte vom Rest der Zelle. Eingebettet in das Cytoplasma der Zelle, das durchzogen ist von Elementen des Cytoskeletts, befinden sich die membranumschlossenen Organellen. Der Zellkern bietet Raum für die komplexen Vorgänge der Replikation und Transkription. Das sekretorische System mit Endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen und Plasmamembran zeichnet sich für die Organisation von Synthese, Transport und Qualitätskontrolle von Proteinen und Lipiden verantwortlich. Die wichtigen energieliefernden Prozesse konzentrieren sich in den Mitochondrien. In Pflanzenzellen findet man des weiteren die Plastiden, die im wesentlichen durch Chloro-, Leuko- und Chromoplasten repräsentiert werden und u.a. die Photosynthese und den Stoffwechsel von Reservekohlenhydraten beheimaten. Darüber hinaus ergaben v.a. morphologische Untersuchungen in den 50er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts (Rhodin, 1954) eine Gruppe von Organellen, die von einer Einzelmembran umschlossen sind, granulären Inhalt (die Matrix) besitzen und je nach Zelltyp und Differenzierungszustand eine tubuläre oder, wie in der Mehrzahl der Fälle, eine sphärische Gestalt von 0.1 bis 1.5 µm Durchmesser einnehmen. Ihre Anzahl variiert in Säugerzellen zwischen mehreren hundert und einigen tausend Einheiten. Die zunächst als *microbodies* beschriebene, heterogene Gruppe von Organellen umfaßt neben den Peroxisomen des Tierreichs u.a. auch die Glyoxisomen der Pflanzen (Breidenbach und Beevers, 1967) und die Glycosomen der Kinetoplastiden (Oppendoes und Borst, 1977). In den nachfolgenden 60er Jahren wurden in

der Gruppe um de Duve aus Rattenleber erstmals Peroxisomen isoliert und biochemisch charakterisiert (Baudhuin et al., 1965; De Duve, 1965).

## 2 Peroxisomen - Funktionen und Erkrankungen

Wie bereits angedeutet, kennt man die evolutionär hoch konservierten Peroxisomen in fast allen eukaryontischen Zellen. Sie beherbergen vielfältige metabolische Funktionen, die sowohl kataboler als auch anaboler Natur sind. Namensgebend für die Organellen waren die Enzymaktivitäten des Wasserstoffperoxid-Stoffwechsels, zu dem neben verschiedenen Oxidasen auch das Leitenzym der Peroxisomen, die Katalase, zählt (De Duve und Baudhuin, 1966). Deren Aufgabe ist es, das durch Oxidasen gebildete Wasserstoffperoxid umgehend zu Wasser und molekularem Sauerstoff zu disproportionieren und damit einen lebenswichtigen zellulären Entgiftungsmechanismus zu liefern. Als weitere wichtige katabole Aktivität der Peroxisomen ist die Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren zu nennen. Zu den wichtigsten Substraten der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation gehören sowohl verzweigte als auch unverzweigte sehr langkettige Fettsäuren ( $\geq C_{24}$ ), ebenso wie einige Vertreter der langkettigen Fettsäuren ( $C_{14-22}$ ) und langkettige Dicarboxyl-Fettsäuren (Wanders et al., 2000). Neben der  $\beta$ -Oxidation ist in Peroxisomen auch eine  $\alpha$ -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren beschrieben, die an Bedeutung jedoch hinter der erstgenannten zurücksteht (Mannaerts et al., 2000). Im Gegensatz zur mitochondrialen dient die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation allerdings nicht primär der Bereitstellung von  $NADH+H^+$  für die Atmungskette und damit letztlich der Gewinnung von ATP, sondern der Degradation der beschriebenen Fettsäuren. Eine Ausnahme stellen in dieser Hinsicht die Hefen dar, bei denen die entscheidenden Schritte der  $\beta$ -Oxidation ausschließlich in Peroxisomen und nicht in Mitochondrien lokalisiert sind und somit Peroxisomen dort für die Bereitstellung von Energie aus  $\beta$ -Oxidation unabdingbar machen (zusammengefaßt in van Roermund et al., 2003).

Neben katabolen Prozessen finden sich auch anabole Reaktionen mit peroxisomaler Beteiligung. Zu den wichtigsten zählen hier die Synthese von Gallensäuren und Isoprenoiden, wichtigen Vorstufen in der Cholesterinbiosynthese (Krisans, 1992; Nagan und Zoeller, 2001). Ferner enthalten die Peroxisomen die ersten drei Enzyme der Etherlipidsynthese und spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Bildung dieser v.a. in Herz und Hirn stark repräsentierten Lipidklasse (Hajra et al., 1988). In einigen Spezies

finden sich auch Reaktionen des Purinstoffwechsels, dessen Intermediat Harnsäure durch die peroxisomale Urat-Oxidase zu Allantoin umgesetzt wird (Hayashi et al., 2000), sowie Teile des Aminosäurenmetabolismus.

Die essentielle Bedeutung der Peroxisomen und der durch sie vermittelten Stoffwechselprozesse für den eukaryontischen Gesamtorganismus wird unterstrichen durch das Vorkommen genetischer Erkrankungen, die mit peroxisomalen Defekten verknüpft sind. Diese Krankheiten sind meist durch ein sehr komplexes Erscheinungsbild charakterisiert und führen häufig schon im frühen Kindesalter zum Tod. Aufgrund ihrer molekularen Störung lassen sich die auf peroxisomaler Dysfunktion basierenden Erkrankungen in zwei Gruppen einteilen (Wanders, 1999).

Die erste Kategorie, sog. PBDs (*peroxisomal biogenesis disorders*), umfaßt solche, die auf einer fehlerhaften Organellenbiogenese beruhen und folglich mit dem Ausfall der meisten peroxisomalen Stoffwechselfunktionen einhergehen. Die Erkrankungen dieser genetisch sehr heterogenen Gruppe folgen einem autosomal rezessiven Erbgang und lassen sich in zwölf Komplementationsgruppen einteilen. Zu ihnen rechnet man das cerebro-hepato-renale Syndrom (auch Zellweger-Syndrom, ZS), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), das infantile Refsum-Syndrom (IRD) und die rhizomelische Chondrodysplasia punctata (RCDP) Typ I (Moser, 1999; Weller et al., 2003). Am stärksten ausgeprägt sind die Symptome beim Zellweger-Syndrom, das oft auch als Prototyp der peroxisomalen Erkrankungen angesehen wird. Hier ist der Import der peroxisomalen Matrixproteine fast vollständig defekt, während peroxisomale Membranhüllen sehr wohl nachgewiesen werden können und aufgrund der fehlenden Matrix als *ghosts* oder *remnants* bezeichnet werden (Santos et al., 1988). Klinisch geht das Zellweger-Syndrom mit morphologischen Veränderungen und schweren neurologischen Entwicklungsstörungen einher, die sich oft in Blindheit und/oder Taubheit gepaart mit starker geistiger Retardierung manifestieren. Ferner leiden die betroffenen Patienten verstärkt unter Krampfanfällen und zeigen allgemein eine sehr schwache Muskelspannung (Hypotonie).

In der zweiten Kategorie sind Erkrankungen zusammengefaßt, deren Ursache im Defekt eines einzelnen peroxisomalen Enzyms liegt. Mehr als ein dutzend Vertreter dieser Gruppe sind identifiziert. Unter anderem zählen dazu die X-chromosomal verknüpfte Adrenoleukodystrophie (ABC-Transporter ALDP defekt), Hyperoxalurie Typ I (Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase), Refsum Erkrankung (Phytanoyl-CoA Hydroxylase), rhizomelische Chondrodysplasia punctata Typ II und III (Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase bzw.

Alkyl-dihydroxyacetonphosphat-Synthase) und verschiedene Störungen der  $\beta$ -Oxidation (u.a. Acyl-CoA-Oxidase, bifunktionelles Enzym, peroxisomale Thiolase) (Wanders, 1999). Wie die Bezeichnungen bereits erahnen lassen, ähneln die Pathogenesen denen der Gruppe 1, sind in Schwere und Verlauf jedoch milder ausgeprägt.

## 3 Peroxisomenbiogenese

### 3.1 Die Peroxine

Ausgehend von der Charakterisierung der humanen PBDs gelangte man schließlich über die detaillierte Untersuchung der Biogenesedefekte zu den bereits erwähnten zwölf Komplementationsgruppen. Jede repräsentiert dabei eine Gruppe von Genen, die an der Assemblierung von Peroxisomen beteiligt sind. Analoge Studien in verschiedenen Hefen (v.a. in *Saccharomyces cerevisiae* und *Yarrowia lipolytica*) führten bis dato zur Identifizierung von 32 Genen, welche die Assemblierung, Teilung und Vererbung der Peroxisomen kontrollieren (Matsumoto et al., 2003; Purdue und Lazarow, 2001; Rottensteiner et al., 2003; Vizeacoumar et al., 2004). Diese Biogenesefaktoren werden Peroxine oder kurz Pex genannt. Zu einem Teil der in Hefen identifizierten Pex-Gene existieren homologe humane Peroxine, die wiederum die genetische Basis bei der Charakterisierung der Komplementationsgruppen bilden.

Obwohl die Zahl der identifizierten *PEX*-Gene in den letzten Jahren besonders aufgrund systematischer Sequenzierprojekte in Hefe rasant zugenommen hat, ist die Funktion der meisten Pex-Proteine nur teilweise geklärt. Die Identifizierung als Pex bedeutet nicht zwangsläufig eine peroxisomale Lokalisation des Proteins. Da alle peroxisomalen Proteine im Kern codiert sind und an freien Polysomen im Cytosol translatiert werden (Lazarow und Fujiki, 1985), bedarf es einer posttranslationalen Insertion in die peroxisomale Membran bzw. Matrix. Dies impliziert ein effizientes Importsystem. Dafür nötig sind aufeinander abfolgende Reaktionen wie die Erkennung der peroxisomalen Targetingsequenz (PTS), der gerichtete Transport zur und das Anbinden an die Membran und die anschließende Translokation in/über die Membran. Alle diese Schritte werden von Pex-Proteinen vermittelt. Generell existieren Unterschiede im Import von Matrix- versus Membranproteinen, die durch unterschiedliche Signale vermittelt werden. Dabei definiert jedes Signal einen eigenen Importweg, der durch Interaktion mit einem löslichen Rezeptor im Cytosol eingeleitet wird. Bisher sind mit Pex5p, Pex7p und Pex19p drei verschiedene Rezeptoren

beschrieben. Pex5p bindet dabei an peroxisomale Matrixproteine, die am C-Terminus ein PTS von Typ1 (PTS1) mit der Sequenz -SKL bzw. konservierten Varianten davon tragen (Gould et al., 1989; Swinkels et al., 1992). Die überwiegende Mehrheit der peroxisomalen Matrixproteine erreicht die Organelle über dieses Tripeptid, das im Gegensatz zu Signalpeptiden von ER- und mitochondrialen Proteinen beim Import jedoch nicht abgespalten wird. Gemäß seiner Aufgabe kommt Pex5p sowohl cytosolisch als auch membranassoziiert vor (Dodt und Gould, 1996). In Analogie zu Pex5p fungiert Pex7p als PTS2-Rezeptor. Die Erkennungssequenz R/K-L-X<sub>5</sub>-H/Q-L des PTS Typ2 ist aminoterminal lokalisiert und wird beim Import abgespalten. Zu den wenigen Matrixproteinen, deren Import PTS2-vermittelt abläuft, zählen bei den Säugern die peroxisomale Thiolase und die Alkyl-dihydroxyacetonphosphat-Synthase (de Vet et al., 1997; Swinkels et al., 1991). Während die Konsensussequenzen für den Import von Matrixproteinen sehr gut charakterisiert sind, gibt es keine einheitliche Sequenz für das Targeting von integralen peroxisomalen Membranproteinen (PMP). Es sind mehrere Sequenzen beschrieben, die notwendig und ausreichend sind, um einzelne PMPs zur peroxisomalen Membran zu dirigieren. Diese lassen jedoch kein gemeinsames Motiv erkennen, sind mit einer Länge von 50 bis 100 Aminosäuren recht groß und teilweise redundant in den Proteinen vertreten (Biermanns et al., 2003; Jones et al., 2001; Pause et al., 2000; Wang et al., 2004). Als verbindender Faktor für den Import von PMPs wurde Pex19p postuliert, das als cytosolisches Chaperon der neu synthetisierten PMPs fungiert und für deren Import notwendig ist (Sacksteder et al., 2000). Erst kürzlich wurde dieses Modell dahingehend erweitert, daß es neben dem Pex19p-abhängigen auch einen -unabhängigen Importweg gibt (Jones et al., 2004). Wobei für den letzteren, der weitaus seltener ist, bisher nur Pex3p beschrieben wurde.

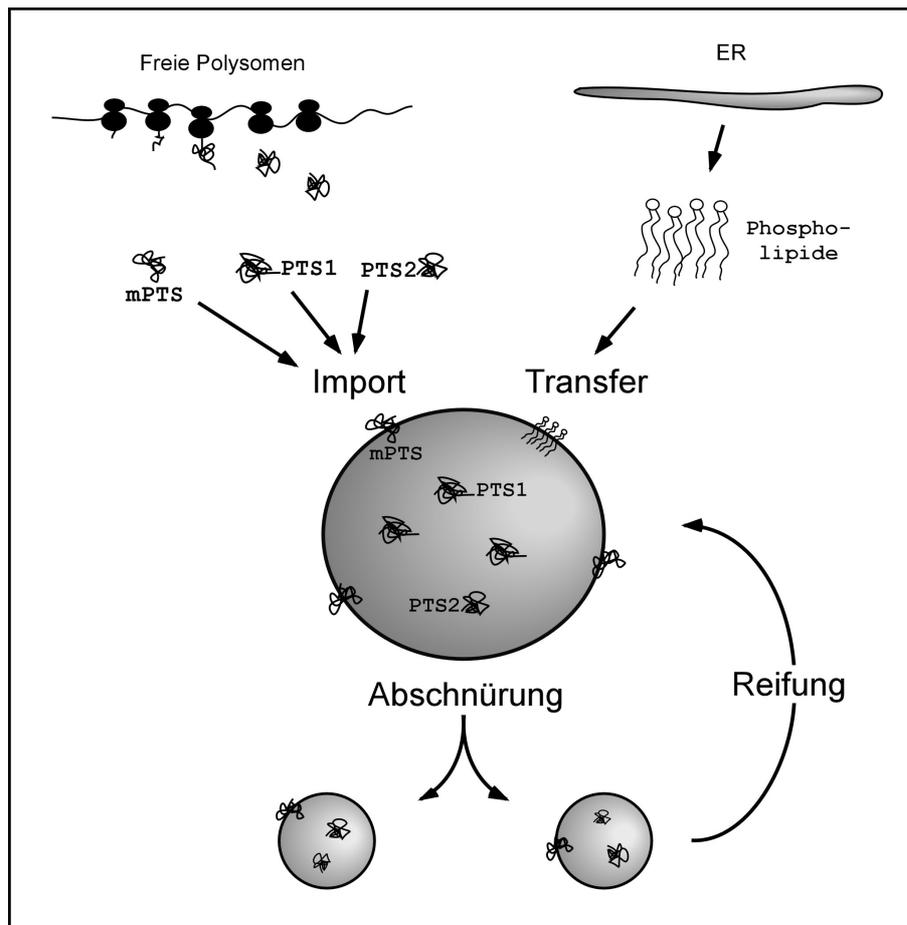
Nach Beladung mit dem entsprechenden neusynthetisierten Matrixprotein geleiten die PTS-Rezeptoren ihre Fracht zum sog. *Docking*-Komplex, wo sie mit seinen Komponenten, den Membranproteinen Pex13p, Pex14p und Pex17p, interagieren (Gould und Collins, 2002; Smith et al., 1997; Snyder et al., 1999). Für die nachfolgende Translokation über die Membran werden die Proteine Pex2p, Pex10p und Pex12p diskutiert (Sacksteder und Gould, 2000). Es sind integrale PMPs mit einer C-terminalen RING-Domäne, die Zink bindet, cytosolisch exponiert ist und essentiell für die Interaktion untereinander und mit Pex5p ist (Chang et al., 1999; Okumoto et al., 2000). Demgegenüber scheinen Pex1p, Pex4p, Pex6p und Pex22p an Schritten, die nach der Translokation folgen, beteiligt zu sein (Collins et al., 2000). Zu diesen gehört u.a. das Recycling der PTS-Rezeptoren.

## 3.2 Modelle der Biogenese

Die Frage nach dem Ursprung der Peroxisomen ist Gegenstand der aktuellen Diskussion. Dabei lieferten die biogenetischen Arbeiten der letzten 15 bis 20 Jahre das Grundgerüst für zwei kontrovers diskutierte Modelle der Peroxisomenbiogenese. Die Kernfrage lautet dabei, ob Peroxisomen ein autonomes Kompartiment darstellen und neue Peroxisomen damit durch Knospung und Abschnürung aus bereits vorhandenen hervorgehen, oder ob sie mit dem Endomembransystem der Zelle in Verbindung stehen, was bedeutet, daß peroxisomale Membranen sich vom ER abschnüren und durch nachfolgenden Import peroxisomaler Proteine zu Peroxisomen reifen.

Das Modell der Abstammung vom ER stützt sich im wesentlichen auf die Ausbildung von multilamellaren, ER-ähnlichen Strukturen nach Überexpression von peroxisomalen Membranproteinen oder chimären Pex-Proteinen. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf die beiden Membranproteine Pex3p in der Hefe *Hansenula polymorpha* und Pex15p in *S. cerevisiae* (Baerends et al., 1996; Elgersma et al., 1997; Faber et al., 2002). Eine transiente ER-Lokalisation der peroxisomalen Proteine Pex2p und Pex16p in der Hefe *Yarrowia lipolytica* wurde aufgrund ihrer N-Glycosylierung postuliert. Diese ER-spezifischen Modifikation wurde in Mutanten beobachtet, deren Proteinexport aus dem ER defekt ist (Titorenko und Rachubinski, 1998). Keiner der genannten Befunde aus Hefe konnte jedoch bisher in höheren Eukaryonten reproduziert werden. Die frühen morphologischen Untersuchungen, die eine enge strukturelle Verknüpfung von Peroxisomen mit ER-Membranen in Leberschnitten zeigten (Novikoff und Novikoff, 1982; Novikoff und Shin, 1964), wurden kürzlich durch Untersuchungen in dendritischen Mauszellen ergänzt (Geuze et al., 2003). Auch hier wurde die unmittelbare Nachbarstellung zwischen Peroxisomen- und ER-Membranen durch dreidimensionale Rekonstruktionen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen demonstriert. Wie in allen zuvor aufgeführten Studien blieben die Autoren den endgültigen Beweis einer Kollokalisierung von ER-Marker und peroxisomalem Protein jedoch schuldig.

Das zweite Modell der Peroxisomenbiogenese geht auf Studien von Lazarow und Fujiki zurück (Lazarow und Fujiki, 1985). Demnach sind Peroxisomen ähnlich den Mitochondrien und Chloroplasten autarke Organellen, die sich durch Teilung eines Mutterperoxisoms in Tochterorganellen erneuern und vermehren. Dieses Modell basiert hauptsächlich auf der Tatsache, daß nahezu alle bisher untersuchten peroxisomalen Proteine höherer Eukaryonten an freien Polysomen synthetisiert werden und posttranslational in vorhandene Peroxisomen



**Abb. 1: Modell der peroxisomalen Biogenese (in Anlehnung an Lazarow und Fujiki, 1985).** Peroxisomale Proteine werden an freien Polysomen synthetisiert und mittels der peroxisomalen Targetingsequenzen (PTS) posttranslational in die Peroxisomenmatrix (via PTS1 und PTS2) bzw. die Membran (via mPTS) importiert. Die peroxisomale Membran wird aus Phospholipiden aufgebaut, die im ER synthetisiert werden. Neue Peroxisomen gehen aus bereits existierenden hervor und stehen so für eine weitere Runde an Proteinimport und Lipidtransfer zur Verfügung (Reifung).

importiert werden (s. 3.1). Diese Beobachtung impliziert natürlich das Vorhandensein von Peroxisomen als Voraussetzung für die Entstehung neuer Organellen. Auch wenn sich Peroxisomen durch Abschnüren vermehren, brauchen sie zum Wachsen wiederum Phospholipide. Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigten, daß peroxisomale, wie andere zelluläre Membranen auch, hauptsächlich aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolaminen aufgebaut sind, jedoch tendenziell längere Fettsäuren gebunden haben (Schneider et al., 1999). Der Synthesort dieser Phospholipide ist das ER, ebenso wie das ER die Stelle für die Biosynthese der Mehrzahl der mitochondrialen Phospholipide ist. Auf welchem Weg die fraglichen Membrankomponenten letztendlich in die Peroxisomen gelangen ist bis dato noch nicht geklärt. Denkbar ist, in Anlehnung an mitochondriale Vorgänge, die Aktivität von Phospholipid-Austauschproteinen, die an den vielfach

beschriebenen Kontaktstellen zwischen ER und Peroxisomen wirksam werden könnten oder ein gerichteter vesikulärer Transport vom ER zur peroxisomalen Membran. Eine Skizze der autonomen Biogenese ist in Abb. 1 zusammengefaßt.

## 4 Peroxisomen, ARF und Coatomer

### 4.1 Die Rolle von Pex11 bei der Peroxisomenproliferation

Ein herausragendes Merkmal der peroxisomalen Proliferation ist ihre Regulation durch extrazelluläre, metabolische Stimuli. So führt zum Beispiel die Behandlung von Nagern mit Fibraten, einer Substanzklasse mit hypolipidämischer Wirkung, zu einer starken Vermehrung der Peroxisomen in der Leber (Reddy und Chu, 1996). Untersuchungen der Membranproteine von Rattenleberperoxisomen haben gezeigt, daß neben anderen Proteinen auch Pex11 $\alpha$ p (früher PMP26p) eine auffallende Stimulation durch Verabreichung von Peroxisomenproliferatoren erfährt (Abe et al., 1998; Hartl und Just, 1987). Dieser Zusammenhang kann als Evidenz für eine zentrale Rolle des Proteins in der Biogenese gedeutet werden. Unterstützt wird diese Sichtweise durch die nachfolgende Klonierung und Sequenzierung von PMP26p, die eine signifikante Homologie zu Pex11p aus *S. cerevisiae* ergab (Passreiter et al., 1998). Das Expressionsniveau von Pex11p hat in *S. cerevisiae* einen tiefgreifenden Einfluß auf die Morphologie der Peroxisomen unter Proliferationsbedingungen. So bewirkt seine Überexpression die Ausbildung vieler kleiner Organellen, während die Deletion des Gens zu wenigen großen Strukturen führt (Erdmann und Blobel, 1995; Marshall et al., 1995). Im Gegensatz zu Hefen, die nur ein *PEX11*-Gen besitzen, sind für höhere Säuger bereits drei Homologe beschrieben, die mit *PEX11 $\alpha$* , *PEX11 $\beta$*  und *PEX11 $\gamma$*  bezeichnet werden (Li et al., 2002; Schrader et al., 1998; Tanaka et al., 2003) und von denen die ersten beiden Isoformen am besten charakterisiert sind. Alle drei Isoformen codieren integrale PMPs mit zwei Transmembrandomänen und cytoplasmatisch exponierten N- und C-Termini. Während die Expression von Pex11 $\beta$ p auf niederem Niveau, aber konstitutiv in allen untersuchten Geweben zu erfolgen scheint, ist die Pex11 $\alpha$ p-Expression durch Fibrate stimulierbar und in den Geweben am ausgeprägtesten, in denen eine Peroxisomenproliferation nach Gabe von Fibraten am stärksten ist (Leber, Niere, Herz und Testis) (Li und Gould, 2002; Schrader et al., 1998). In Säugerzell-Kulturen bewirkt eine Überexpression von sowohl Pex11 $\alpha$ p als auch Pex11 $\beta$ p eine Vermehrung der Peroxisomen,

wobei der Effekt bei Pex11 $\beta$ p wesentlich deutlicher ausgeprägt ist (Passreiter et al., 1998; Schrader et al., 1998). Beiden Proteinen kommt somit eine entscheidende Rolle während der Vermehrung von Peroxisomen zu, wobei sie sich jedoch in ihrer Wirkweise unterscheiden. Während Pex11 $\alpha$ p die Peroxisomenzahl in Reaktion auf äußere Bedingungen zu regulieren scheint, erfüllt Pex11 $\beta$ p eher die Aufgabe der permanenten, wenig beeinflussbaren Kontrolle der Peroxisomenvermehrung. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Proteinen betrifft den extremen C-Terminus. Lediglich Pex11 $\alpha$ p endet mit der Sequenz -KLKAR, was einem sog. Dilysinmotiv entspricht. Dilysinmotive wurden an ER-residenten Membranproteinen beschrieben (Jackson et al., 1990; Nilsson et al., 1989), und sind für die Rückführung fehlgeleiteter Proteine vom Golgi-Apparat zurück zum ER notwendig (Jackson et al., 1993; Nilsson et al., 1989; Townsley und Pelham, 1994). Dieser Transport wird durch Interaktion des Dilysinmotivs mit Coatomer, dem Hüllproteinkomplex der sog. COPI-Vesikel, vermittelt (Cosson und Letourneur, 1994; Letourneur et al., 1994). Folgeuntersuchungen haben dann ergeben, daß auch Rattenleberperoxisomen *in vitro* ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) und Coatomer binden (Passreiter et al., 1998).

## 4.2 ADP-Ribosylierungsfaktoren und Hüllproteinkomplexe

ARF-Proteine sind kleine GTPasen mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa, die zur Ras-Superfamilie der GTP-bindenden Proteine gehören. Die Familie der Säuger-ARFs umfaßt sechs Mitglieder (ARF1 bis ARF6), die sowohl untereinander (mindestens 60 Prozent identische Aminosäuren) als auch zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert sind (zusammengefaßt in: Moss und Vaughan, 1995; Takai et al., 2001). Von den sechs ARF-Subtypen sind ARF1 und ARF6 am besten untersucht. ARF1 wurde ursprünglich als Kofaktor der Cholera-toxin-abhängigen ADP-Ribosylierung des heterotrimeren G-Proteins G<sub>s</sub> identifiziert (Kahn und Gilman, 1986). Erst später wurde es als wichtige Komponente innerhalb der Regulation des intrazellulären Transports erkannt (Serafini et al., 1991). ARF-regulierte Prozesse unterliegen einem Wechsel zwischen GDP- und GTP-gebundener Form des Moleküls und einer damit einhergehenden Konformationsänderung (Roth, 1999b). In der cytosolischen Form hat ARF GDP gebunden und die N-terminal gebundene Myristinsäure ist im Protein verborgen. Ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) katalysiert die Substitution von GDP durch GTP. In seiner GTP-gebundenen Form ist ARF aktiviert, bindet über den nun exponierten Myristoylanker an die Zielmembran und katalysiert nachfolgend die

Rekrutierung von verschiedenen Hüllproteinen intrazellulärer Transportprozesse. Umgekehrt katalysieren GTPase-aktivierende Proteine (GAP) die Hydrolyse von ARF·GTP zu ARF·GDP, was seiner Inaktivierung gleichkommt. In der Folge dissoziiert ARF von der Membran (zusammengefaßt in: Moss und Vaughan, 1998; Nie et al., 2003).

ARF1 vermittelt im frühen Sekretionsweg die Rekrutierung von Coatomer an die Golgi-Membran (Nickel et al., 2002; Rothman und Wieland, 1996; Serafini et al., 1991). Coatomer ist ein heterooligomerer Proteinkomplex, der im Cytosol aus sieben Untereinheiten assembliert, die jeweils einfach vertreten sind:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$ -COP (COP für *coat protein*) (Waters et al., 1991). ARF1 und Coatomer bilden zusammen den Hüllkomplex von COPI-Vesikeln, die sich durch Abschürung von Golgi-Membranen bilden und eine wichtige Rolle im frühen Sekretionsweg spielen (Nickel et al., 2002). Sie vermitteln sowohl bidirektionalen Transport von Proteinen und Lipiden innerhalb des Golgi-Apparates als auch deren retrograden Golgi-ER-Transport (Jackson et al., 1990; Nickel et al., 1998; Nilsson et al., 1989; Orci et al., 1997). Kürzlich wurden mit  $\gamma$ 2COP und  $\zeta$ 2COP neue Isotypen von  $\gamma$ COP bzw.  $\zeta$ COP identifiziert (Blagitko et al., 1999; Futatsumori et al., 2000), die letztlich durch entsprechende Kombinationen der Untereinheiten drei Coatomerisoformen definieren. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation innerhalb des frühen Sekretionsweges und scheinen folglich verschiedene Aufgaben zu dirigieren (Wegmann et al., 2004).

ARF1 ist nicht nur für die Rekrutierung der COPI-Hülle verantwortlich, sondern übernimmt im späteren Sekretionsweg auch wesentliche Funktionen bei der Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel (CCV, *clathrin coated vesicles*) am Trans-Golgi-Netzwerk und an den Endosomen (Hirst und Robinson, 1998). Die Hülle der CCVs setzt sich aus Clathrin und je nach Zielmembran aus einem der vier verschiedenen Adaptor-Komplexe (AP1 bis AP4) oder den kürzlich entdeckten GGAs (*Golgi-localized,  $\gamma$ -ear containing, ARF-binding protein*) zusammen (zusammengefaßt in Boehm und Bonifacino, 2001; Bonifacino, 2004). Dabei interagiert ARF1 je nach Zielort mit AP1, -3 oder -4 bzw. GGA1, -2 oder -3.

Darüber hinaus reguliert ARF1 die Synthese von wichtigen Membranphospholipiden mit regulatorischen Funktionen. In diesem Zusammenhang sei v.a. auf die Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P<sub>2</sub>) und, über die Aktivierung von Phospholipase D (PLD), auf die von Phosphatidsäure hingewiesen (De Matteis et al., 2002; Roth et al., 1999).

Neben ARF1 ist ARF6 der am besten charakterisierte ARF-Subtyp. Wie ARF1 wird auch ARF6 durch Interaktion mit verschiedenen GEFs und GAPs aktiviert bzw. deaktiviert. Im Gegensatz zu ARF1 liegt ARF6 jedoch sowohl in GDP- als auch GTP-gebundener Form membranassoziiert vor (D'Souza-Schorey et al., 1995; Radhakrishna und Donaldson, 1997). Der Hauptwirkort von ARF6·GTP scheint dabei die Plasmamembran zu sein, an der es die Sortierung von Proteinen, endocytotische Prozesse und die Struktur der Plasmamembran selbst mitbestimmt (zusammengefaßt in: Donaldson, 2003). ARF6 kolokalisiert mit PI(4)P-5-Kinase  $\alpha$ , aktiviert das Enzym und trägt damit zur Synthese von Plasmamembranständigem PI-4,5-P<sub>2</sub> bei (Honda et al., 1999). PI-4,5-P<sub>2</sub> ist ein wichtiger Regulator membrandynamischer Vorgänge und der Aktinpolymerisierung und -funktion (Toker, 1998; Yin und Janmey, 2003). Wie im Falle des ARF1 wurde auch an ARF6 eine PLD-aktivierende Eigenschaft festgestellt, die zu regulierter Sekretion und Stimulierung von Änderungen der Membranstruktur führen. Charakteristisch für ARF6 resultiert seine akute Stimulierung zu Protrusionen von PIP<sub>2</sub>-reichen Plasmamembrandomänen. Diese Protrusionen werden durch induzierte Aktinpolymerisierung ausgelöst und führen in der Folge zu vermehrter Membraninternalisierung und schnellem Recycling der Membranen zur Plasmamembran (Schafer et al., 2000).

## 5 Ziele der Arbeit

Von diesen wenigen aus der Literatur ausgewählten Daten wird ersichtlich wie vielfältig bereits die Wirkungen von ARF1 und ARF6, den beiden am besten untersuchten ARF-Subtypen, sind. Gemeinsam mit einer Reihe anderer Faktoren und Enzyme, unter ihnen besonders GEFs, GAPs, PLD und Phosphoinositid-spezifischen Kinasen, regulieren ARFs komplexe Membranprozesse, die hauptsächlich an Golgi-Membranen, endosomalen Membranen und der Plasmamembran lokalisiert wurden. Wie erwähnt haben Vorarbeiten in unserer Gruppe eine Bindung von ARF auch an isolierte Peroxisomen der Rattenleber gezeigt (Anton et al., 2000; Passreiter et al., 1998). Im Lichte des breiten Wirkspektrums von ARF ist diese Beobachtung natürlich für die bisher nicht geklärte Biogenese von Peroxisomen von großem Interesse, eröffnet sie doch zum erstenmal einen mechanistischen Einblick in die Steuerung membrandynamischer Abläufe an Peroxisomen.

Obwohl diese ersten Beobachtungen zeigten, daß an isolierte Peroxisomen ein nicht näher spezifiziertes ARF zusammen mit allen sieben Untereinheiten des Coatomer-

hüllkomplexes bindet, blieb eine Vielzahl von Fragen unbeantwortet. Daher lag das Hauptziel der vorliegenden Arbeit darin, die beobachtete ARF/Coatomer-Rekrutierung an Peroxisomen genauer zu charakterisieren. Dabei sollten ausgehend von der Verifizierung der Reinheit der isolierten Peroxisomen die peroxisomale Relevanz der ARF- und Coatomerbindung herausgearbeitet werden. Dies schließt die Untersuchung von Unterschieden zur Bindung der Proteine an Golgi-Membranen ebenso ein, wie die Analyse des Einflusses von Peroxisomenproliferatoren auf die peroxisomale ARF/Coatomerbindung. Ferner sollte ermittelt werden, ob die peroxisomale Coatomerbindung von ARF abhängt. Im positiven Falle sollte geklärt werden, welcher der sechs ARF-Subtypen an Peroxisomen diese Bindung vermittelt. In einem weiteren wichtigen Kapitel sollte herausgearbeitet werden, welche Faktoren die Bindung beeinflussen. Schließlich stellte sich die Frage, ob die Bindung von ARF und Coatomer auch unter *in vivo*-Bedingungen von Bedeutung ist. Eng damit verknüpft blieb zu untersuchen, ob deren Rekrutierung zu einer Vesikulierung der peroxisomalen Membran führt.

---

## **II ERGEBNISSE**

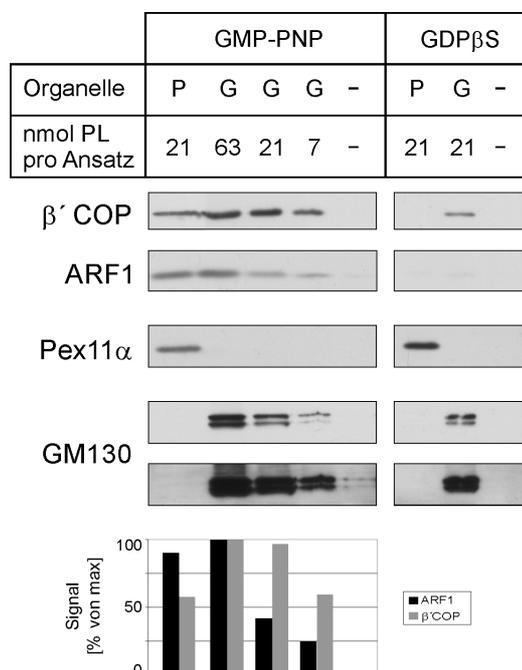
### **1 Peroxisomale Spezifität der ARF- und Coatomerbindung**

Die Bindung von ARF und den sieben Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  COP (COP für *coat protomer*) des heterooligomeren Komplexes Coatomer an Peroxisomen wurde erstmals durch Michael Paßreiter und Markus Anton in unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Passreiter et al., 1998). Im folgenden ging es darum, diese Bindung und ihre Effektoren genauer zu charakterisieren. Dabei stellte sich zunächst die Frage nach der peroxisomalen Spezifität dieser Bindung, v.a. im Vergleich zu Golgi-Membranen. Darüber hinaus sollten Bedingungen untersucht werden, die eine Rekrutierung von ARF und Coatomer an Peroxisomen spezifisch beeinflussen. Die Ergebnisse sind in Kapitel 1.1 bis 1.3 dargestellt.

#### **1.1 Vergleichende Inkubation: Peroxisomen versus Golgi**

Zunächst wurden Peroxisomen und Golgi-Membranen parallel zueinander inkubiert. Da es sich bei der Bindung von ARF und Coatomer um einen Membran-ständigen Prozeß handelt, sollten vergleichbare Mengen an Membranen zur Inkubation eingesetzt werden. Die verwendete Menge an Organellen basierte deshalb auf dem Gehalt an Phospholipiden und nicht ihrem Proteingehalt. Neben 21 nmol Phospholipid (PL) an Peroxisomen wurden drei verschiedene Mengen an Golgi-Membranen (63, 21 und 7 nmol PL) verwendet und jeweils mit einer identischen Menge an Cytosol (5 mg) versetzt. Die Inkubationen fanden in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems (ARS) statt, zusätzlich wurde entweder das nicht hydrolysierbare GTP-Analog GMP-PNP oder das nicht-hydrolysierbare GDP-Analog GDP $\beta$ S verwendet. Aus diesen Inkubationen lassen sich drei Beobachtungen ableiten (s. Abb. 2): zunächst zeigt das Signal des Golgimarkers GM130, einem Golgi-Matrixprotein, im Westernblot, daß selbst bei überlanger Exposition des Röntgenfilms (s. untere Reihe der GM130-Signale in Abb. 2) dieses Protein nicht in der peroxisomalen

Fraktion erkannt wird. Daraus läßt sich schließen, daß die beobachteten Effekte von ARF und Coatomer an Peroxisomen spezifisch sind.

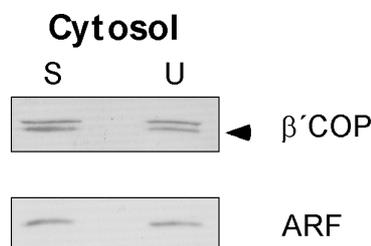


**Abb. 2: Vergleichende Inkubation von Peroxisomen (P) und Golgi-Membranen (G) mit Cytosol.** Es wurden die angegebenen Mengen an Organellen, basierend auf Phospholipid (PL)-gehalt, in Anwesenheit von ARS und GMP-PNP oder GDPβS mit identischen Mengen Cytosol (5 mg) inkubiert. Analysiert wurde die Bindung von Coatomer (β' COP) und ARF1, deren Signalintensitäten als Balkendiagramme dargestellt sind. Pex11αp wurde zur Identifizierung der Peroxisomen und das Golgi-Matrixprotein GM130 als Golgi-Marker verwendet. Für GM130 ist sowohl eine kurze Expositionszeit (obere Reihe) als auch eine Überexposition (unten) gezeigt.

Vergleicht man die peroxisomale β' COP- und ARF1-Bindung mit der Rekrutierung der Proteine an Golgi-Membranen, so binden Peroxisomen weniger Coatomer aber mehr ARF1 (s. Balkendiagramm in Abb. 2): für vergleichbare Signalstärken von β' COP muß man zur Inkubation 21 nmol PL an Peroxisomen, jedoch mit 7 nmol nur ein Drittel an Golgi-Membranen einsetzen. Demgegenüber findet das ARF1-Signal von 21 nmol eingesetzten Peroxisomen seine Entsprechung, wenn mit 63 nmol PL die dreifach höhere Menge an Golgi-Membranen eingesetzt wird. Ein weiterer Unterschied ergibt sich beim Vergleich der β' COP-Signale bei Inkubationen mit GDPβS, wo eine vergleichbare Menge Golgi deutlich mehr Coatomer bindet als Peroxisomen, die kein Signal zeigen. Da in Abwesenheit von Organellen keine unspezifische Präzipitation von ARF oder Coatomer zu beobachten ist (s. Spur 5 und 8 in Abb. 2), stehen die Signale in den Organell-haltigen Ansätzen für eine echte Bindung an Golgi bzw. Peroxisomen.

## 1.2 Inkubation von Peroxisomen nach Stimulation

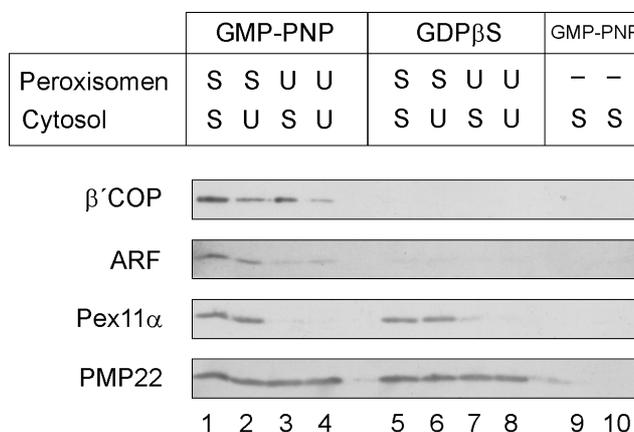
Es wurden sowohl Cytosol als auch hochreine Peroxisomen aus Ratten präpariert, die zuvor mit Clofibrat behandelt worden waren. Diese Substanz hat eine hypolipidemische Wirkung, in deren Folge das peroxisomale Kompartiment und mit ihm verbundene Faktoren spezifisch proliferieren (Reddy und Chu, 1996). Zum Vergleich wurden Peroxisomen und Cytosol nach demselben Protokoll auch aus unbehandelten Kontrolltieren isoliert. Die Untersuchung des Cytosols auf veränderte Mengen an ARF oder Coatomer (dargestellt durch  $\beta'$ COP) zeigte deutlich, daß die Behandlung mit Clofibrat keinen Einfluß auf die Gesamtmenge der beiden untersuchten Marker hatte (s. Abb. 3).



**Abb. 3: Vergleich von stimuliertem und unstimuliertem Cytosol.** Jeweils 30  $\mu$ g des Rattenlebercytosols, das entweder aus Clofibrat-behandelten Tieren (S, stimuliert) oder aus Kontrolltieren (U, unbehandelt) gewonnen worden war, wurden auf ihren Gehalt an ARF und Coatomer (gezeigt durch  $\beta'$ COP, Pfeilspitze) im Westernblot untersucht.

Mit diesem Ausgangsmaterial wurden Inkubationen von 250  $\mu$ g Peroxisomen mit Cytosol (8.5 mg) in Anwesenheit eines ARS und entweder GMP-PNP oder GDP $\beta$ S in jeder möglichen Kombination durchgeführt und auf ihre Bindung hinsichtlich ARF und Coatomer untersucht. Nach der Inkubation wurde die Gesamtheit der Organellen durch eine Schicht von 48 % (w/v) Nycodenz flottiert und in der nachfolgenden Nycodenz-Puffer-Interphase gesammelt. Auf diesem Weg sollte vermieden werden, daß durch Sedimentieren der Peroxisomen nach Standardprotokoll potentielle, umhüllte Vesikel im cytosolischen Überstand verbleiben und somit der quantitativen Analyse entgehen. Je 8 % des Interphasenmaterials wurden durch Westernblot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Auch in diesem Versuch hat sich bestätigt, daß die peroxisomale ARF- und Coatomerbindung eindeutig von GMP-PNP abhängig ist und unter GDP $\beta$ S-Bedingung keine Rekrutierung beobachtet wird (Spuren 1 - 4 gegenüber 5 - 8). Die Stimulation der Peroxisomen läßt sich anhand des peroxisomalen Membranproteins Pex11 $\alpha$ p verfolgen, dessen relative Konzentration unter Clofibrat-Bedingungen etwa zehnfach erhöht ist. Die ausgeglichene Beladung der Gelspuren wird über das peroxisomale Membranprotein PMP22p gezeigt, dessen Konzentration auch unter Stimulationsbedingungen gleichbleibt. In

Kontrollansätzen ohne Organellen (vgl. Spur 9 und 10) flottieren weder Coatomer noch ARF in die analysierte Interphase. Die Signale in den Spuren 1 bis 8 stammen folglich von membrangebundenen Proteinen.



**Abb. 4: Einfluß der Clofibratstimulation auf die peroxisomale ARF- und Coatomerbindung.** Sowohl Peroxisomen als auch Cytosol wurden aus Clofibrat-behandelten (S, stimuliert) oder Kontrolltieren (U, unstimuliert) isoliert, in den angegebenen Kombinationen in Anwesenheit von ARS und entweder GMP-PNP oder GDP $\beta$ S (je 50  $\mu$ M) inkubiert und anschließend in einem Stufengradienten durch 48 % (w/v) Nycodenz für 5 h bei 150.000 xg flottiert. Pex11 $\alpha$ p und PMP22 repräsentieren peroxisomale Membranmarker, wobei Pex11 $\alpha$ p im Gegensatz zu PMP22 durch Clofibrat stimuliert wird. PMP22 demonstriert die Beladung der einzelnen Spuren. Parallel wurden zwei Kontrollansätze ohne Organellen durchgeführt (Spur 9 und 10), bei denen Cytosol mit ARS und GMP-PNP inkubiert und analog flottiert wurde.

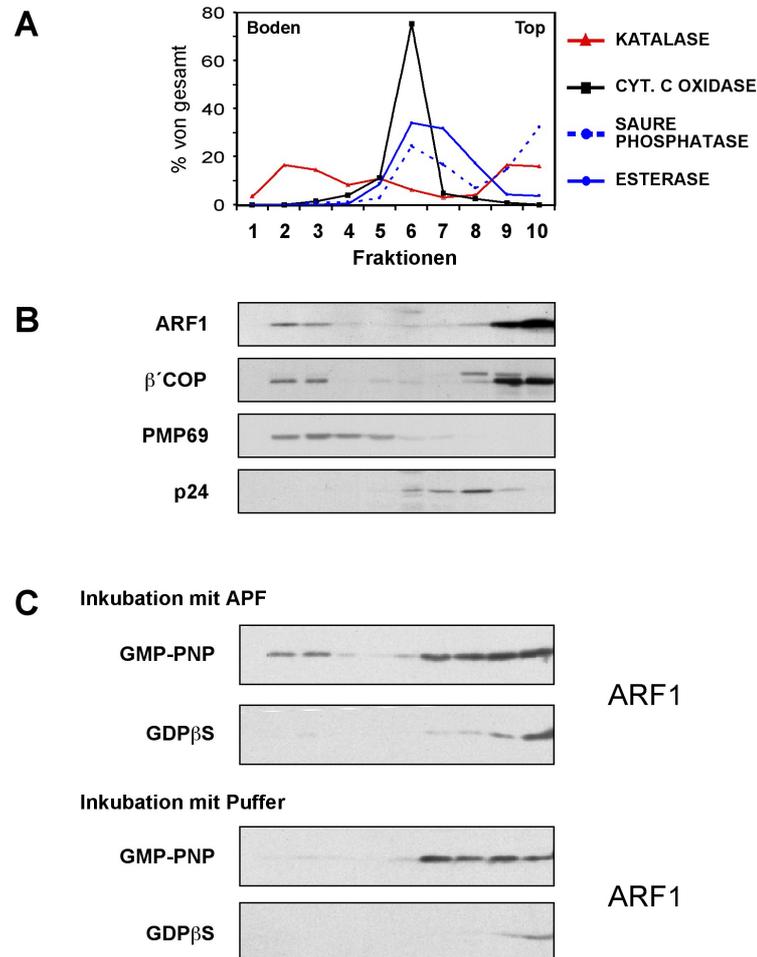
Die Stimulation durch Clofibrat zeigt deutlich zweierlei Effekte. Der eine liegt auf Seiten der Peroxisomen, der andere betrifft das Cytosol, wobei die Bindung von ARF und Coatomer unterschiedliche Abhängigkeiten zeigen. Die Coatomerbindung ist dann am stärksten, wenn stimuliertes Cytosol verwendet wird (s. Spur 1 und 3), die Art der Peroxisomen beeinflusst die Bindung weniger stark, obschon das Coatomer-Signal bei stimulierten Peroxisomen jeweils leicht gegenüber unbehandelten Peroxisomen erhöht ist. Dagegen fällt die ARF-Bindung dann deutlich stärker aus, wenn Peroxisomen aus Clofibrat-behandelten Tieren verwendet werden (Spur 1 und 2). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß stimulierte Peroxisomen aus stimuliertem Cytosol in jedem Fall mehr ARF und Coatomer binden als dies im Inkubationsansatz mit unstimulierten Komponenten der Fall ist.

### 1.3 Hepatocytingradienten

Im folgenden wurde die Verteilung von ARF und Coatomer in Rattenhepatocyten untersucht. Dazu wurde der postnukleäre Überstand (PNS) von frisch isolierten Hepatocyten Clofibrat-behandelter Tiere auf 6 ml-Nycodenzgradienten (14 - 45 % Nycodenz) aufgegeben und die Organellen zur Gleichgewichtsdichte zentrifugiert. Es wurden auch Hepatocyten verwendet, die zuvor mit Streptolysin-O (SLO) permeabilisiert und entweder mit ARF-Poolfraktion (APF, s. 2.2) oder Puffer H in Anwesenheit von 50  $\mu$ M GMP-PNP oder GDP $\beta$ S inkubiert worden waren. Die erhaltenen 10 Fraktionen wurden mit Aceton präzipitiert und im Westernblot auf die entsprechenden Marker analysiert. Wie Abb. 5A zeigt, lassen sich mit dem verwendeten Gradientensystem die Peroxisomen dank ihrer Eigenschaft, im Nycodenz eine Gleichgewichtsdichte von  $\sim 1.21$  g/ml zu zeigen, quantitativ von den übrigen Organellen trennen. Katalase als peroxisomaler Marker ist maximal in den Fraktionen 2 und 3 und stimmt darin mit der Verteilung des peroxisomalen Membranproteins PMP69p überein, das allerdings auch in den Fraktionen 4 und 5 nachgewiesen werden kann (s. Abb. 5B). Das Peroxisomenmaximum ist deutlich von dem der Mitochondrien, der Lysosomen und des ER getrennt. Die Verteilung der letztgenannten Organellen wurde jeweils über die Marker Cytochrom c Oxidase, saure Phosphatase bzw. Esterase ermittelt (Hartl et al., 1985).

Die Verteilung von ARF1 und Coatomer in unbehandelten Hepatocyten ist in Abb. 5B dargestellt. Beide zeigen ein Maximum in den peroxisomalen Fraktionen 2 und 3, neben dem Hauptsignal in den Fraktionen mit niedriger Dichte (Fraktionen 9 und 10), das im wesentlichen cytosolischem ARF und Coatomer entspricht. An gleicher Stelle ist auch freie, nicht an Organellen gebundene Katalase zu finden, die beim Homogenisieren der Zellen freigesetzt wird. Das Golgi-Membranprotein p24 findet sich ebenfalls in Fraktionen mit niedriger Dichte und zeigt keine überlappende Verteilung von Golgi- mit peroxisomalen Fraktionen. Werden SLO-permeabilisierte Hepatocyten eingesetzt, die mit APF und GMP-PNP inkubiert wurden (s. Abb. 5C), so verstärkt sich das Signal für ARF1 in den peroxisomalen Fraktionen 2 und 3 deutlich. Zusätzlich nimmt die Intensität für ARF1 in den niederdichten Fraktionen 7/8, in denen die Golgi-Membranen lokalisieren (s. p24 in Abb. 5B), unter GMP-PNP-Bedingungen deutlich zu. In Gegenwart von GDP $\beta$ S ist das Signal wesentlich schwächer. Für die quantitative Beurteilung dieser Ergebnisse muß beachtet werden, daß zur Detektion des ARF1-Signals im Gradienten der unbehandelten Hepatocyten einerseits die Expositionszeiten des Röntgenfilms in Abb. 5B um ein

Vielfaches länger gewählt werden mußten als in Abb. 5C, und andererseits pro Fraktion etwa 2.5-fach mehr Material auf dem Gel analysiert wurde als bei den inkubierten Zellen in Abb. 5C.



**Abb. 5: ARF1 und Coatamer kofraktionieren im Hepatocytengradienten mit Peroxisomen.**

Der PNS von Hepatocytan wurde in einer isopyknischen Zentrifugation im 6 ml-Nycodenzgradienten (14 - 45 % Nycodenz) getrennt und im Westernblot analysiert. **A** Verteilung der Enzymaktivität einzelner Markerenzyme für verschiedene Organellen im Gradienten: Katalase repräsentiert Peroxisomen, Cytochrom C Oxidase die Mitochondrien, saure Phosphatase steht für Lysosomen und Esterase als Marker für glattes ER. **B** Der PNS von 100 mg (bezogen aufs Feuchtgewicht) unbehandelten Primärhepatocytan wurde im Gradienten getrennt und je 10 % pro Fraktion auf ARF1,  $\beta$ -COP (als Marker für Coatamer), PMP69p als peroxisomaler Membranmarker und p24 als Golgi-Membranmarker untersucht. **C** Der PNS von 50 mg SLO-permeabilisierten Hepatocytan, die entweder mit APF oder Puffer in Gegenwart von 50  $\mu$ M GMP-PNP oder GDP $\beta$ S inkubiert wurden, wurde zur Gleichgewichtsdichte zentrifugiert und 8 % je Fraktion auf die Verteilung von ARF1 analysiert, wobei alle Blots die identische Expositionszeit zeigen, die jedoch nur ein Bruchteil derjenigen beträgt, die unter **B** für ARF1 verwendet wurde.

## 2 Identifizierung des peroxisomalen ARF-Subtyps

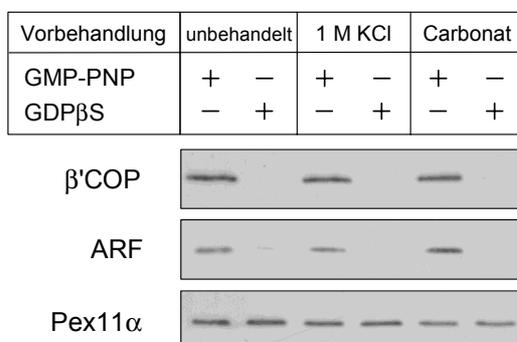
Eingangs wurde gezeigt, daß die beobachtete Bindung von ARF und Coatomer für Peroxisomen spezifisch ist, und nicht auf eine Verunreinigung der Peroxisomenfraktion mit anderen ARF- bzw. Coatomer-bindenden Membranen zurückzuführen ist. Im folgenden stellte sich die Frage, welcher der sechs bei Säugern bekannten ARF-Subtypen an Peroxisomen bindet. Da die Sequenzen aller sechs Subtypen für Ratte (*Rattus norvegicus*) bekannt sind, konnte nach Anbindung an die Peroxisomen die Identifizierung der 20 kDa-Bande des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels mittels massenspektroskopischer Analyse erfolgen. Dazu mußten zunächst experimentelle Voraussetzungen geschaffen werden, die zweierlei Ziele verfolgten: (1) Im 20 kDa-Bereich sollten nur wenige nicht-ARF-Proteine zu finden sein; peroxisomale Proteine gleicher Größe sollten abgereichert werden, um die Analyse zu erleichtern. (2) Darüber hinaus sollte diese Abreicherung auch dazu dienen, eine möglichst große Menge an Gesamtprotein in eine Gelspur zu laden. Dies ist von Bedeutung, da die zu erwartende Menge an bindendem ARF eher als gering eingeschätzt wurde.

### 2.1 ARF-Bindung an verschieden vorbehandelte Peroxisomen

Zunächst wurde getestet, in wieweit die ARF- und mit ihr die Coatomerbindung auch an peroxisomalen Membranpräparationen möglich ist. Dazu wurden Membranen nach zwei verschiedenen Methoden präpariert. Ein Teil der Peroxisomen wurde mit Hochsalz (1 M KCl / Homopuffer) gewaschen, ein weiterer Teil wurde mit stark alkalischem pH (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11) behandelt. Beide Methoden entfernen Matrix- und periphere Membranproteine (Fujiki et al., 1982). Die resultierenden Membranfraktionen wurden mit Cytosol und ARS in Gegenwart von GMP-PNP oder GDPβS inkubiert und mittels Westernblot auf ARF- und Coatomerbindung analysiert, wobei letztere durch den Nachweis von β'COP repräsentiert wurde. Parallel wurden unbehandelte Peroxisomen als Referenz inkubiert.

Wie in Abb. 6 dargestellt, unterscheidet sich die Menge von ARF und Coatomer, die an diese Membranpräparationen bindet, nur geringfügig von der an unbehandelten Peroxisomen. Die Entfernung der Matrixproteine hat also keinen entscheidenden Einfluß auf die Rekrutierung von ARF und Coatomer an peroxisomale Membranen. Die Art der Präparation

der Membranen ist ebenfalls von untergeordneter Bedeutung. Für nachfolgende Versuche wurden Carbonatmembranen verwendet, da diese etablierte Methode Matrix- und periphere Membranproteine sehr effizient entfernt (Fujiki et al., 1982).

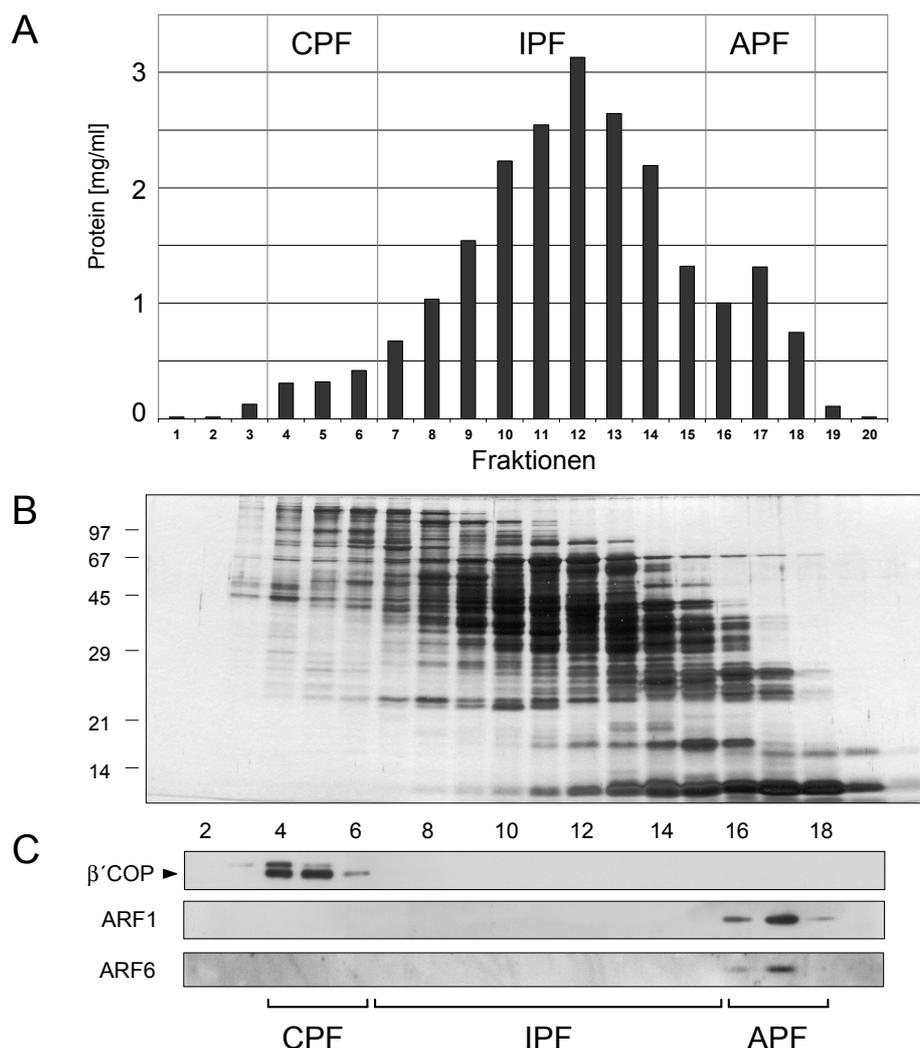


**Abb. 6: Bindung von ARF und Coatomer an peroxisomale Membranpräparationen.** Jeweils 10  $\mu$ g peroxisomale Membranen (entsprechend 100  $\mu$ g Gesamtperoxisomen) wurden mit Cytosol und ARS in Anwesenheit von GMP-PNP oder GDP $\beta$ S (je 50  $\mu$ M) inkubiert. Neben Gesamtperoxisomen (unbehandelt) kamen Membranpräparationen, die entweder mit 1 M KCl oder 100 mM Carbonat behandelt wurden, zum Einsatz. Analysiert wurde die Bindung von  $\beta'$ COP, als Coatomermarker, und ARF. Die Menge an Peroxisomen pro Spur wird durch Pex11 $\alpha$  dargestellt.

## 2.2 Cytosolfraktionierung mittels Gelfiltration

Um ARF- und Coatomerinkubationen getrennt durchführen zu können, wurde Rattenlebercytosol gelchromatographisch in drei Poolfraktionen aufgetrennt. Dazu wurde stimuliertes Rattenlebercytosol unter Verwendung einer Superdex 200<sup>®</sup>-Gelfiltrationssäule (Gesamtvolumen  $\sim$  115 ml) fraktioniert. Pro Lauf wurden 100 mg Cytosol (gelöst in Puffer H, ca. 50 mg/ml) in Puffer H getrennt und in 20 Fraktionen gesammelt. Die quantitative Proteinverteilung einer solchen Trennung ist in Abb. 7A dargestellt. Abb. 7B zeigt das Proteinmuster der einzelnen Fraktionen im 12.5 % silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel.

Die Verteilung von Coatomer, gezeigt anhand von  $\beta'$ COP, und die der beiden Isoformen ARF1 und ARF6 wurde durch Westernblot analysiert und ist in Abb. 7C dargestellt. Coatomer fraktioniert als Komplex von 550 - 600 kDa in den Fraktionen 4 bis 6, während die  $\sim$  20 kDa großen ARF-Proteine gemeinsam in den Fraktionen 16-18 eluieren. Eine Überlappung von eluiertem ARF und Coatomer ist somit in jedem Fall ausgeschlossen.



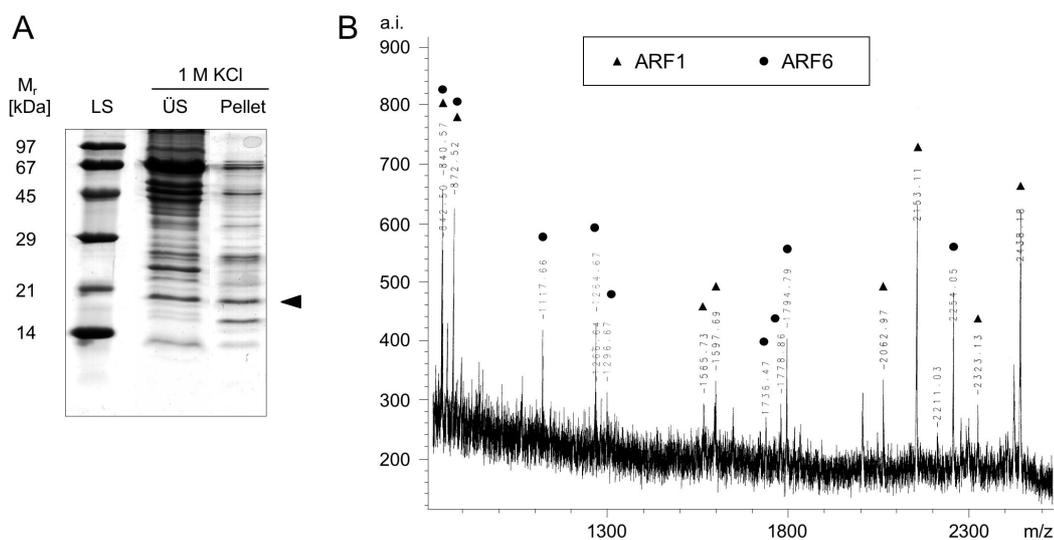
**Abb. 7: Fraktionierung von Rattenlebercytosol mittels Gelfiltration.** 100 mg Rattenlebercytosol aus Clofibrat-stimulierten Tieren wurde mit einer Superdex 200-Gelfiltrationssäule in Puffer H fraktioniert. Nach Erreichen des Ausschlußvolumens wurden 20 Fraktionen zu je 4 ml gesammelt. **A** zeigt die Proteinverteilung der einzelnen Fraktionen. **B** Je Fraktion wurden 3  $\mu$ l in einer 12.5 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Silber gefärbt. **C** Westernblot-Analyse der Verteilung von Coatomer (gezeigt durch  $\beta$ 'COP, untere Bande s. Pfeilspitze), ARF1 und ARF6 in den einzelnen Fraktionen. Coatomer-haltige Fraktionen wurden zur Coatomerpoolfraktion (CPF) zusammengefaßt, ARF-haltige Fraktionen zur ARF-Poolfraktion (APF) und die dazwischenliegenden Fraktionen zur intermediären Poolfraktion (IPF).

Die Fraktionen 7 bis 16 wurden zur sogenannten intermediären Poolfraktion (IPF) zusammengefaßt und sind fast vollständig an Coatomer und ARF angereicht. Entsprechend wurden die mit Coatomer angereicherten Fraktionen zur Coatomerpoolfraktion (CPF) und die ARF-haltigen Fraktionen zur ARF-Poolfraktion (APF) vereinigt. Um diese Poolfraktionen für Inkubationen einzusetzen, wurde ihr Volumen in entsprechenden Konzentriereinheiten nahezu verlustfrei eingengt. Wie Abb. 7B zeigt,

beinhaltet die IPF mit ~ 80 % des Gesamtproteins die Hauptmenge an cytosolischem Protein. Auf CPF entfallen ~ 5 % und auf APF ~ 15 % der Gesamtmenge an Protein, die in einem Lauf aufgetrennt wurde.

### 2.3 MALDI- und Edman-Analyse des peroxisomalen ARF-Subtyps

Zur Identifizierung des an Peroxisomen rekrutierten ARF-Subtyps wurden die peroxisomalen Membranen entweder mit Cytosol oder APF in Gegenwart von GMP-PNP inkubiert, anschließend mit Hochsalz (1 M KCl) gewaschen und Membransediment und ÜS in einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. Abb. 8A). Nach Färbung mit Coomassie wurde die deutlich erkennbare Bande im Bereich von 20 kDa, der erwarteten Größe der ARF-Proteine, ausgeschnitten, im Gel mit Trypsin proteolytisch verdaut und die erhaltenen Peptide mit *Matrix-assisted laser desorption/ionisation* (MALDI)-Massenspektrometrie analysiert (s. Abb. 8B). Diese und die nachfolgende Edman-Analyse wurden in Kooperation mit Dr. Hans Heid am DKFZ Heidelberg durchgeführt. Die resultierenden Massen wurden anhand des Programms *PeptideSearch* mit tryptischen Fragmenten der Rattenproteine in der nicht-redundanten Protein-Datenbank (nrdb) des EMBL/EBI verglichen. Von den elf identifizierten Massen ließen sich fünf eindeutig ARF6 zuordnen (s. Abb. 8C). Die verbleibenden sechs Massen ließen sich aufgrund der starken Sequenzhomologie innerhalb der ARF-Isoformen nicht eindeutig auf einen einzelnen ARF-Subtyp zurückführen.



<b>C</b>	<b>identifizierte Masse [Da]</b>	<b>Korrespondierendes Peptid</b>	<b>ARF-Subtyp</b>	<b>Aminosäureposition</b>
	840.57	IRPLWR	1-6	74-79
	1117.66	DAIILIFANK	6	114-123
	1264.67	FNVWDVGGQDK	6	59-69
	1266.64	IDEARQELHR	6	96-105
	1565.73	NISFTVWDVGGQDK	1-3	60-73
	1778.86	QDLPDAMKPHEIQEK	6	124-138
	2062.97	M(ox)LAEDELRDVLLVFANK	1,3	110-127
	2153.11	HYFQNTQGLIFVDSNDR	1-5	80-97
	2254.05	LGQSVTTIPTVGFNVETVYK	6	35-55
	2323.13	LGEIVTTIPTIGFNVETVEYK	1-5	39-59
	2438.18	HYFQNTQGLIFVDSNDRER	1-5	80-99

**Abb. 8: MALDI-MS zur Analyse des peroxisomalen ARF-Subtypes.** *A* 125 µg peroxisomale Carbonatmembranen wurden mit 50 mg Cytosol in Gegenwart von ARS und 50 µM GMP-PNP inkubiert, danach mit 1 M KCl/Homopuffer gewaschen und sowohl der Überstand (ÜS) als auch das Sediment (Pellet) dieses Waschschrittes in einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mit Coomassie R-250 gefärbt. Die relativen Molekulargewichte ( $M_r$ ) der einzelnen Banden des Laborstandard (LS) sind angegeben. Die 20 kDa-Bande des Sediments (s. Pfeilspitze) wurde ausgeschnitten, im Gel mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Fragmente durch MALDI-MS analysiert. *B* Das MALDI-Spektrum gibt einen Überblick über die Verteilung der Massen, die mindestens ARF1 (▲) repräsentieren bzw. spezifisch für ARF6 (●) sind. *C* Tabellarische Auflistung der in *B* gefundenen Massen und ihre Zuordnung zu den einzelnen ARF-Subtypen. Massen, die der oxidierten Form der bereits gelisteten Peptide entsprechen, sind nicht gezeigt.

Um den Ursprung der nicht eindeutig zuordenbaren Massen detaillierter zu analysieren, wurden die durch proteolytischen Verdau erhaltenen Peptide einer klassischen Edman-Analyse unterzogen. Dabei wurde die 20 kDa-Bande entweder mit Trypsin oder Asp-N verdaut. Asp-N spaltet Polypeptide N-terminal von Asparagin- und Cysteinsäure. Wie Abb. 9 zeigt, ermöglichte dieses Vorgehen die eindeutige Identifizierung von ARF1 als peroxisomal bindende Isoform. Von sieben sequenzierten Peptiden nach Asp-N-Verdau entspricht eine Sequenz (-DWLSNQLRNQK) dem äußersten C-Terminus von ARF1. Weitere drei Peptide stimmen mit der ARF1-Sequenz zwar überein, erlauben aber keine eindeutige Zuordnung. Bei den restlichen drei der sieben Peptide handelt es sich eindeutig um ARF6-Sequenzen. Die Identifizierung von ARF1 und ARF6 ist unabhängig davon, ob zur Inkubation Cytosol oder APF verwendet wurde.

Protease	gefundene Sequenz	ARF-Subtyp	Aminosäurenposition
Trypsin	ILMVGLDA	1-5	20-27
	GEIVTT	1-5	40-45
	IRPL	1-6	74-77
	HYFQNTQGLIFV	1-5	80-91
	DAVLLVFANK	1,3,5	118-127
Asp-N	DKIRPLWRHYFQNTQ	1-5	72-86
	DKIRPLWRHYTGT	6	68-81
	DAIILIFANKQ	6	114-124
	DAVLLVFANKQ	1,3,5	118-128
	DGLYEGLDWLSN	1,2	164-175
	EGLTWLTSNYKS	6	164-175
	DWLSNQLRNQK	1	171-181

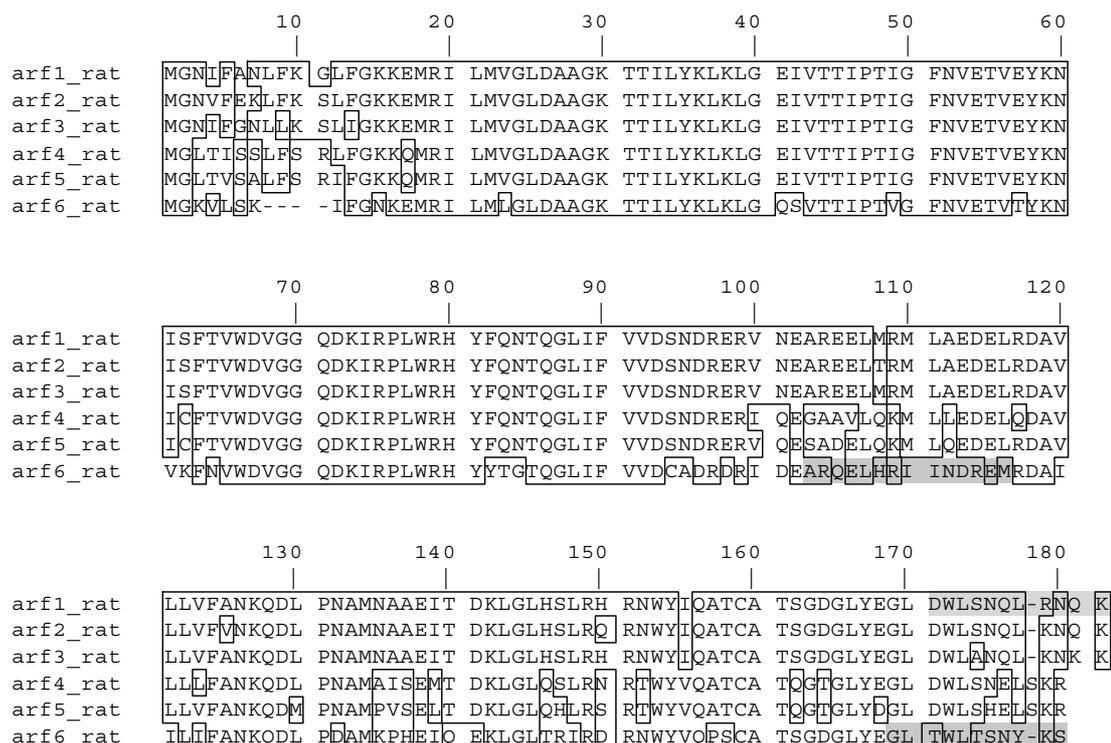
**Abb. 9: Identifizierung des peroxisomalen ARF-Subtypes mit Edman-Analyse.** Es wurden 150 µg peroxisomale Carbonatmembranen mit APF (entsprechend 100 mg Cytosol) in Gegenwart von ARS und 50 µM GMP-PNP inkubiert und analog zu Abb. 8 verfahren. Die 20 kDa-Bande wurde entweder mit Trypsin oder Asp-N im Gel verdaut, die Peptide mittels HPLC getrennt und deren Sequenz durch Edman-Abbau analysiert. Die identifizierten Sequenzen sind zusammen mit ihrer Zuordnung zu den ARF-Isoformen aufgeführt, die Aminosäurenposition basiert auf der ARF1-Sequenz.

## 2.4 Herstellung ARF-Subtypen spezifischer Antikörper

### 2.4.1 Auswahl geeigneter Peptide

Nach der Identifizierung von ARF1 und ARF6 als peroxisomale ARF-Subtypen wurden spezifische Antikörper gegen die jeweilige Isoform generiert, die die Unterscheidung der beiden Proteine im Westernblot ermöglichten. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie innerhalb der ARF-Familie kamen nur wenige Bereiche für die Auswahl der immunogenen Peptide in Frage (s. Abb. 10). Die fünf Isoformen ARF1 bis ARF5 sind auf Proteinebene zueinander 95-81 % identisch. Am stärksten unterscheidet sich davon ARF6 mit Identitätswerten von ca. 65 %.

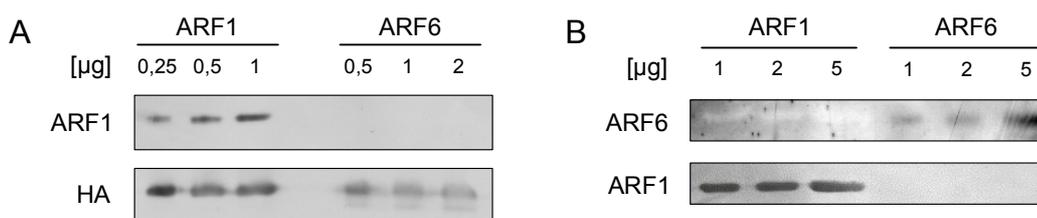
Wie das Alignment in Abb. 10 zeigt, existieren drei Bereiche mit größerer Heterogenität innerhalb der ARF-Proteine. Diese Regionen befinden sich am extremen N- und C-terminus und im mittleren Bereich zwischen Aminosäurenposition 95 und 120. Zur Immunisierung von Kaninchen wurden drei Peptide mit je 11 bis 15 Aminosäureresten ausgewählt, zwei Peptide spezifisch für ARF6: *ARF6intern* (Position 99 - 112) und *ARF6 Cterminus* (Position 165 - 175), und ein Peptid spezifisch für ARF1: *ARF1 C-terminus* (Position 171 - 181).



**Abb. 10: Alignment der sechs ARF-Subtypen und Lokalisierung der immunogenen Peptide.** Es wurden die Proteinsequenzen der sechs Subtypen der ARF-Familie aus Ratte (rat) entsprechend ihrer Homologie verglichen, die Numerierung basiert auf der ARF1-Sequenz. Umrandete Bereiche erfassen Aminosäuren die zu 100 % identisch sind. Die zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzten Peptide von ARF1 und ARF6 sind durch Schattierung hervorgehoben.

### 2.4.2 Spezifität der Antiseren

Die Spezifität der erhaltenen Antikörper wurde anhand von rekombinanten ARF-Proteinen getestet, die C-terminal sowohl eine HA- als auch eine His<sub>6</sub>-Sequenz trugen. Wie Abb. 11 zeigt, gibt es zwischen den Antikörpern gegen ARF1 und ARF6 keine wechselseitigen Kreuzreaktionen. Der gegen den C-terminus von ARF1 gerichtete Antikörper (ARF1C1) zeigt eine hohe Sensitivität in der Erkennung von ARF1, wohingegen ARF6 selbst bei 20-fach höherer Menge nicht erkannt wird (Abb. 11). Die Entwicklung des Blots in Abb. 11A mit anti-HA-Antikörper zeigt, daß in jeder der sechs Spuren rekombinantes Protein geladen ist, wobei, bedingt durch die Substratsättigung der Luminolreaktion, die HA-Signale bei höheren Konzentrationen nicht weiter steigen. Der Antikörper ARF1C1 zeigt zwischen 0,25 µg und 1 µg eine deutliche Signalzunahme mit steigender Menge an rekombinatem ARF1, während sein linearer Bereich in Abb. 11B bereits weit überschritten ist.



**Abb. 11: Spezifität der ARF-Antikörper im Westernblot.** Es wurden die angegebenen Mengen an rekombinatem ARF-Protein in einem 12.5 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt und durch Westernblot nachgewiesen. Die verwendeten ARFs waren C-terminal um eine HA-His<sub>6</sub>-Sequenz erweitert. **A** Es wurde mit dem Antikörper ARF1C1 entwickelt. Zur Kontrolle wurde anti-HA-Antikörper verwendet. **B** Zur Entwicklung wurde ARF6C1 verwendet. Die Beladung der ARF1-Spuren wurde mit ARF1C1 gezeigt.

Unter den erhaltenen ARF6-Antikörpern zeigte nur das Antiserum gegen das C-terminale Peptid ein befriedigendes Signal im Westernblot. In Abb. 11B wird deutlich, daß der Antikörper ARF6C1 eine geringere Sensitivität gegenüber seinem zugehörigen Antigen aufweist als ARF1C1. Die kleinste erkannte Menge an ARF6 lag bei 1 µg, wobei der Film deutlich länger exponiert werden mußte. Dennoch werden steigende Mengen an rekombinatem ARF6 mit steigender Signalstärke detektiert. Wichtig für die Charakterisierung des ARF6C1-Antikörpers war das Ergebnis, daß rekombinates ARF1 bis zu den eingesetzten 5 µg auch bei sehr langer Exposition nicht erkannt wird (s. Abb. 11B).

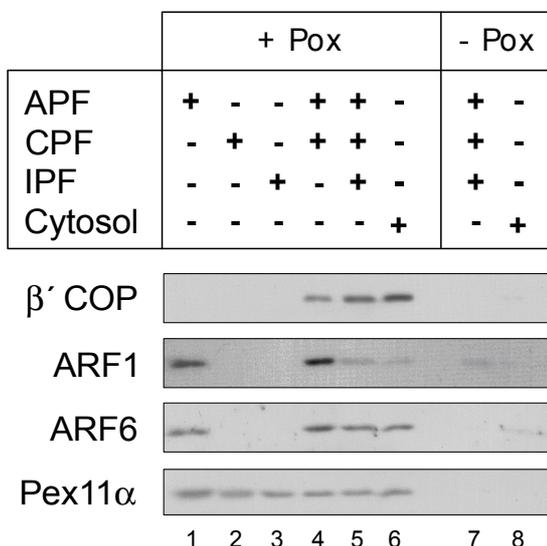
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sowohl ARF1C1 als auch ARF6C1 den jeweiligen Subtyp, gegen den sie generiert wurden, erkennen, und darüber hinaus der Antikörper ARF1C1 kein ARF6-Protein erkennt und umgekehrt. Aufgrund der hohen Homologie innerhalb der ARF-Familie (s. 2.4.1), läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß andere ARF-Isoformen, die zu einem Test nicht zur Verfügung standen, eventuell erkannt werden. Die für die Untersuchung der peroxisomalen ARF-Bindung wichtige Unterscheidung zwischen ARF1- und ARF6-Protein ist davon jedoch nicht beeinflusst.

### 3 Charakterisierung der peroxisomalen ARF- und Coatomerbindung

Nach der Identifizierung von zwei Peroxisomen-bindenden ARF-Isoformen ging es im folgenden Abschnitt um die genauere Charakterisierung dieser Bindung im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Coatomerbindung. Es galt die Frage nach der Abhängigkeit der peroxisomalen Coatomerbindung von den gefundenen ARF-Subtypen zu klären.

#### 3.1 ARF ist essentiell für die Coatomerbindung

Zunächst sollte untersucht werden, ob die peroxisomale Coatomerbindung ARF-abhängig ist. Dazu wurden Gesamtperoxisomen mit den drei in Kapitel 2.2 beschriebenen cytosolischen Fraktionen (CPF, IPF und APF) in Gegenwart von ARS und GMP-PNP inkubiert, wobei die Fraktionen entweder einzeln oder in Kombination verwendet wurden. Parallel wurde ein Ansatz mit Gesamtcytosol durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten zwei Ansätze, die alle Komponenten außer Peroxisomen enthielten. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.



**Abb. 12: Die peroxisomale Coatomerbindung hängt von ARF-GTP ab.** Je 50  $\mu$ g Peroxisomen (Pox) wurden mit den angegebenen cytosolischen Poolfraktionen (APF, CPF und IPF) oder Gesamtcytosol (2.5 mg) in Gegenwart von ARS und 100  $\mu$ M GMP-PNP inkubiert. Anschließend wurde die gebundene Menge an Coatomer ( $\beta'$ COP) bzw. ARF1 und ARF6 im Westernblot untersucht. Die Beladung der Spuren mit peroxisomalem Protein ist durch Pex11 $\alpha$  gezeigt. Die Spuren 7 und 8 zeigen Kontrollversuche, in denen Inkubationsansätze in Abwesenheit von Peroxisomen durchgeführt wurden.

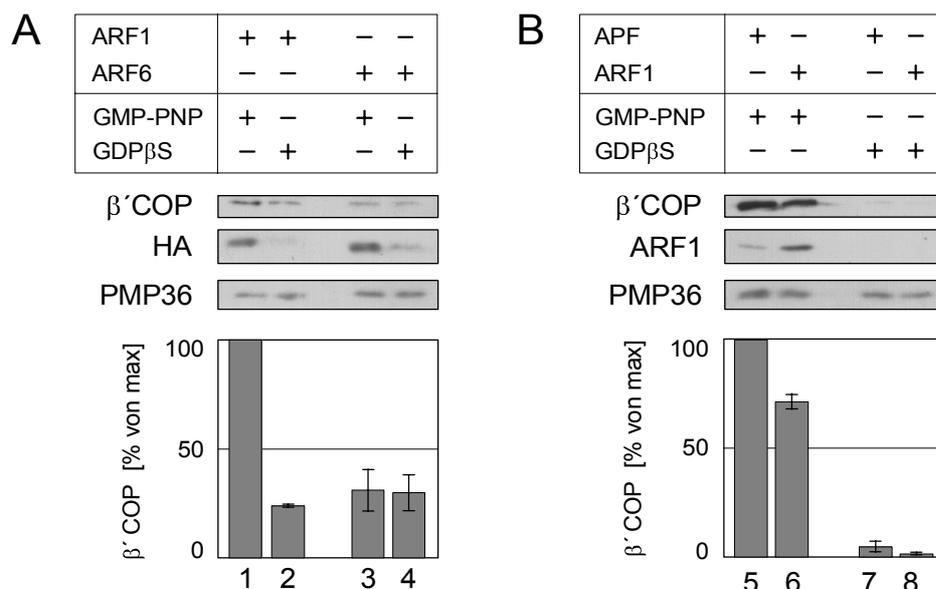
Es wurden im Westernblot die Signale für Coatomer (anhand von  $\beta'$ COP), ARF1 und ARF6 untersucht. Wie Spur 1 zeigt, werden sowohl ARF1 als auch ARF6 aus der APF in Gegenwart von GMP-PNP an Peroxisomen rekrutiert. Für die Bindung von  $\beta'$ COP

hingegen ist neben der Coatomerquelle CPF auch APF nötig (vgl. Spur 2 und 4). Bei diesen Versuchen war es unerheblich, ob die Inkubation der Peroxisomen mit APF und CPF - wie gezeigt - gleichzeitig stattfand, oder die Organellen sequenziell zuerst mit APF und in einem zweiten Schritt mit CPF inkubiert wurden. Interessanterweise bindet unter den vorgenannten Bedingungen deutlich mehr ARF1 an Peroxisomen als bei Verwendung von Gesamtcytosol (Spur 6), wohingegen die  $\beta'$ COP-Bindung von den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen nur wenig beeinflusst wird. Die cytosolischen Bindungsverhältnisse für ARF1 lassen sich jedoch erreichen, indem neben APF/CPF zusätzlich IPF verwendet wird, was einer Rekonstitution des Cytosols aus den drei Poolfraktionen gleichkommt (Spur 5). IPF wirkt sich auf die ARF1-Bindung stark reduzierend und auf die  $\beta'$ COP-Bindung leicht verstärkend aus (vgl. Spur 5 gegenüber 4). Die Bindung von ARF6 ist durch IPF nur geringfügig beeinflusst, zeigt jedoch in einer leicht erniedrigten Anbindung dieselbe Tendenz wie ARF1. Die Negativkontrollen ohne Peroxisomen demonstrieren, daß unter den gewählten Inkubationsbedingungen weder Coatomer noch ARF unspezifisch präzipitieren (Spur 7 und 8), die zuvor beschriebenen Signale also auf Bindung an die Organellen zurückzuführen sind.

Es lassen sich drei Beobachtungen zusammenfassen: i) für die Bindung von ARF1 bzw. ARF6 ist die APF in Gegenwart von GMP-PNP ausreichend, ii) Coatomer benötigt zur Anbindung CPF und APF, iii) in der IPF gibt es einen oder mehrere Faktoren, die zu einer deutlich reduzierten Bindung von ARF1 nicht aber ARF6 und Coatomer führen.

### *3.2 ARF1 vermittelt die Bindung von Coatomer*

Wie im vorangehenden Kapitel gezeigt, ist die Coatomerbindung an Peroxisomen abhängig von APF. Daraus ergaben sich zwei Fragen: (1) Reicht ARF zur Vermittlung der peroxisomalen Coatomerrekrutierung als Minimalkomponente bereits aus, oder sind andere Faktoren aus der APF nötig, und (2) vermittelt ARF1 oder ARF6 die Coatomerbindung? Zur Beantwortung dieser Aufgabenstellung wurde rekombinantes, myristoyliertes ARF1 und ARF6 bakteriell überexprimiert und zusammen mit CPF, ARS und GMP-PNP zur Inkubation von Peroxisomen verwendet.

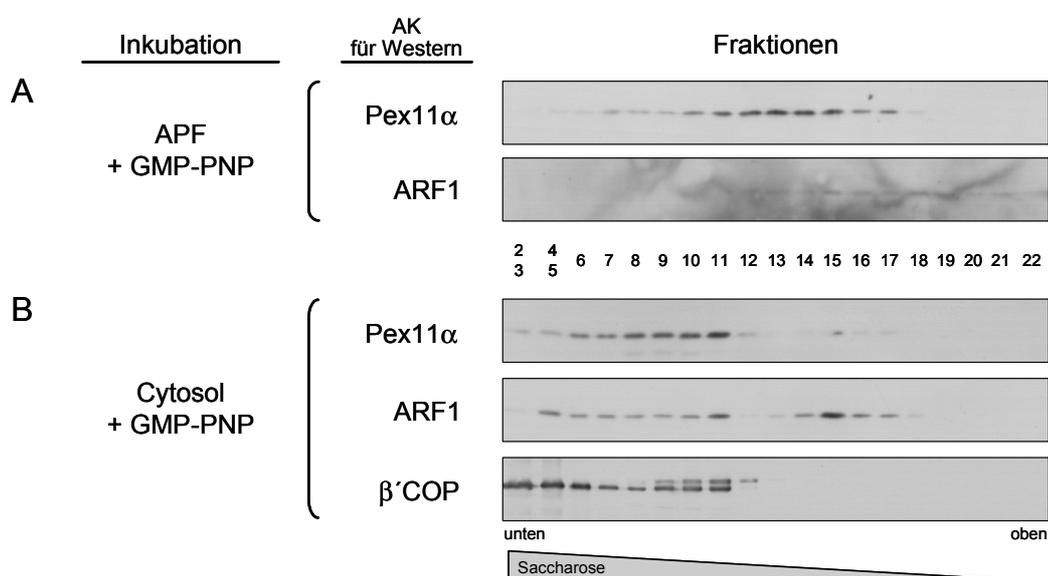


**Abb. 13: ARF1·GTP vermittelt die peroxisomale Coatomerbindung.** 50 µg Gesamtperoxisomen wurden mit CPF und den jeweiligen rekombinanten, myristoylierten ARF-Proteinen (1 µg) in Gegenwart von ARS und 50 µM GMP-PNP bzw. GDPβS inkubiert und die Bindung im Westenblot untersucht. **A** Es wurden rekombinante ARFs verwendet, die C-terminal eine HA-His<sub>6</sub>-Sequenz trugen, und deren Bindung durch HA-Antikörper detektiert wurde. **B** Als ARF-Quelle kamen entweder rekombinantes, myristoyliertes wildtyp-ARF1 oder APF zum Einsatz. Die Bindung von ARF1 wurde mit dem geeigneten ARF1C1-Antikörper gezeigt. Die Bindung von Coatomer wurde über β' COP ermittelt, dessen Signal densitometrisch ausgewertet und im Balkendiagramm dargestellt. Es sind die Mittelwerte mit ihren Fehlern aus mindestens zwei unanabhängigen Versuchen dargestellt. Die Beladung der Spuren ist über das peroxisomale Membranprotein PMP36 gezeigt.

Wie das HA-Signal in Abb. 13A zeigt, binden beide rekombinanten Proteine, sowohl ARF1 als auch ARF6, in Abhängigkeit von GMP-PNP in vergleichbarem Ausmaß an Peroxisomen. Jedoch nur ARF1 vermittelt eine GMP-PNP-abhängige Coatomerbindung. Die schwachen β' COP-Signale in Anwesenheit von ARF6 liegen im Bereich der ARF1-GDPβS-Signale und sind somit als Hintergrundsignale zu werten (s. Balkendiagramm in Abb. 13A). Die in diesem Versuch verwendeten rekombinanten ARFs sind C-terminal um eine HA-His<sub>6</sub>-Sequenz erweitert. Rekombinantes, myristoyliertes wildtyp-ARF1 ohne diese Sequenzerweiterung zeigt wesentlich ausgeprägtere und mit APF vergleichbare Coatomer-signale (s. Abb. 13B). Obwohl das β' COP-Signal bei diesen Inkubationen in vergleichbarer Größenordnung liegt, bindet bei Verwendung von rekombinantem Protein deutlich mehr ARF1 an Peroxisomen als dies beim Einsatz des cytosolischen APFs als ARF-Quelle der Fall ist. Diese Beobachtung hat jedoch qualitativ keine Auswirkung auf das Ergebnis, daß ARF1 und nicht ARF6 die peroxisomale Coatomerbindung vermittelt

### 3.3 Peroxisomale Komplexe nach ARF- und Coatomerbindung

Um mögliche Komplexbildungen in der peroxisomalen Membran nach Bindung von ARF und Coatomer genauer zu untersuchen, wurden 150 µg peroxisomale Carbonatmembranen entweder mit APF oder Cytosol in Gegenwart von ARS und 50 µM GMP-PNP inkubiert, die Organellen wie unter 1.2 beschrieben durch eine Stufe von 47 % (w/v) Nycodenz flottiert, die rückgewonnenen Membranen anschließend in 1 % (w/v) CHAPS solubilisiert und die löslichen Komplexe durch Beschleunigungszentrifugation in einem 14 - 45 % (w/v) Saccharosegradienten getrennt. Die Fraktionen wurden im Westernblot auf ihre Verteilung von ARF1,  $\beta'$ COP und dem peroxisomalen Membranmarker Pex11 $\alpha$  untersucht.



**Abb. 14: Analyse peroxisomaler Membrankomplexe nach Solubilisierung in CHAPS.** 150 µg peroxisomale Carbonatmembranen wurden mit den angegebenen Komponenten inkubiert, durch Flottieren in einer 47 % Nycodenz - Puffer - Interphase gesammelt und die rückgewonnenen Peroxisomen mit 1 % (w/v) CHAPS solubilisiert. Die löslichen CHAPS-Komplexe wurden in einem 14 - 45 % Saccharosegradienten durch Beschleunigungszentrifugation getrennt (5 h, 150.000 xg /4°C, 6 ml-Röhrchen, Vertikalmodus), die Fraktionen (je 250 µl) von unten gesammelt und im Westernblot auf ihre Verteilung von Pex11 $\alpha$ , ARF1 und Coatomer (Antikörper (AK)  $\beta'$ COP) untersucht. Die steigende Saccharosekonzentration ist angedeutet. **A** und **B** unterscheiden sich lediglich in der Art der Inkubation, bei der APF (**A**) gegenüber Cytosol (**B**) verwendet wurde.

Wie Abb. 14A zeigt, lokalisiert Pex11 $\alpha$  nach Inkubation mit APF und damit in Abwesenheit einer Coatomerquelle, im Gradienten in den Fraktionen 7 bis 17 mit einem Maximum in den Fraktionen 12 bis 16. In den letzteren Fraktionen verteilt sich ARF1

analog zu Pex11 $\alpha$ p (wobei das ARF1-Signal eher schwach ist und aufgrund des starken Hintergrundsignals nicht deutlicher darzustellen war). Nach einer Inkubation mit Cytosol anstelle von APF ändert sich die Verteilung von sowohl Pex11 $\alpha$ p als auch ARF1. Beide Marker verlagern sich im Gradienten zu höherer Dichte und zeigen eine Verteilung, die sich weitgehend mit der von  $\beta$ 'COP deckt. Pex11 $\alpha$ p lokalisiert in den Fraktionen 6 bis 11 mit Schwerpunkt zu Fraktion 11. Dieselbe Signalverschiebung zu höherer Dichte läßt sich in der ARF1-Verteilung beobachten, wobei ein zweites Maximum in den Fraktionen 14 bis 17 erhalten bleibt. Zusammen mit Pex11 $\alpha$ p und ARF1 ko-migriert der Coatomermarker  $\beta$ 'COP in den Fraktionen 7 bis 11.

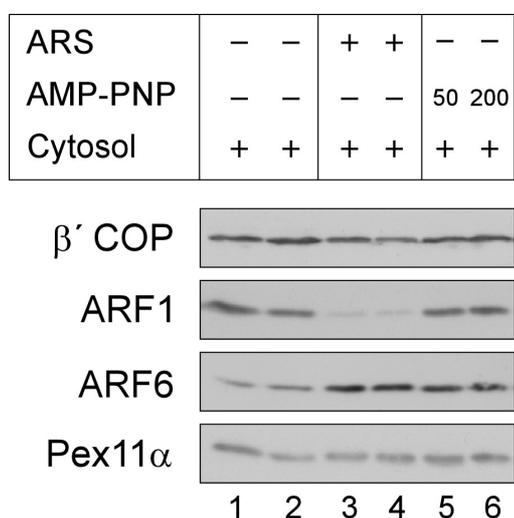
Die Tatsache, daß durch Beschleunigungszentrifugation größere Komplexe zu höherer Dichte im Gradienten zentrifugieren, zusammen mit der synchronen Umverteilung von Pex11 $\alpha$ p und ARF1 zu höherer Dichte, in denen sie mit  $\beta$ 'COP kofraktionieren, deutet darauf hin, daß sich die Proteine in einem gemeinsamen Komplex befinden. Zumal diese Umverteilung nur dann auftritt, wenn Coatomer im Inubationsansatz vorliegt, was durch Inkubation mit Cytosol anstelle von APF erreicht wird. Darüber hinaus tritt ARF1 in einem zweiten, niedermolekularen Komplex auf (siehe Fraktionen 14 bis 17), der bei derselben Saccharosekonzentration im Gradienten lokalisiert, wie dies nach APF-Inkubation beobachtet wurde (s. Abb. 14A). In diesen Fraktionen ist auch ein schwaches Signal von Pex11 $\alpha$ p zu beobachten, das darauf hindeutet, daß beide Proteine in einem Komplex vorliegen könnten. Zur Sicherung dieser Annahme bedarf es jedoch weiterer Versuche. Vernetzungsstudien mit sog. chemischen *Crosslinkern*, die auf die Charakterisierung peroxisomaler Bindungspartner von ARF1 und Coatomer zielten, blieben bislang jedoch ohne Erfolg. Damit sind die hier gezeigten Ergebnisse als Hinweise auf die Existenz eines peroxisomalen Membrankomplexes zu werten, in dem auch das Dilysinmotiv-tragende Membranprotein Pex11 $\alpha$ p vertreten sein könnte.

## 4 ATP und IPF: Beeinflussung der peroxisomalen Bindung von ARF und Coatomer

Im vorangehenden Kapitel wurde die Abhängigkeit der peroxisomalen Coatomerbindung von ARF1·GTP gezeigt. Im folgenden sollten Faktoren untersucht werden, die diese Bindung beeinflussen. Dabei standen zwei Komponenten im Mittelpunkt: ATP und die intermediäre Poolfraktion, IPF, die bei der Fraktionierung von Cytosol gewonnen wird.

### 4.1 ATP moduliert die Bindung von ARF und Coatomer

Zunächst wurde die Bedeutung von ATP bei der Rekrutierung von ARF und Coatomer an Peroxisomen untersucht. Dazu wurden Peroxisomen mit Cytosol und GMP-PNP in Ab- oder Anwesenheit von ARS oder einem ATP-Analogon inkubiert und auf Rekrutierung von ARF1, ARF6 und Coatomer im Westernblot untersucht. Wie Abb. 15 zeigt, ist insbesondere die Menge an gebundenen ARF-Proteinen durch ATP beeinflusst. Dabei ist die ARF1-Bindung in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems deutlich reduziert (vgl. Spur 3, 4 gegenüber Spur 1, 2).



**Abb. 15: ATP und seine Hydrolyse beeinflussen die Bindung von ARF und Coatomer.** 50  $\mu$ g Peroxisomen wurden mit 2.5 mg Cytosol und 100  $\mu$ M GMP-PNP in Gegenwart oder Abwesenheit von ARS bzw. AMP-PNP (50  $\mu$ M bzw. 200  $\mu$ M) inkubiert. Die Bindung von  $\beta'$ COP, ARF1 und ARF6 wurden zusammen mit dem peroxisomalen Membranmarker Pex11 $\alpha$  im Westernblot untersucht.

Darüber hinaus zeigt die starke Bindung von ARF1 in Gegenwart von AMP-PNP, einem nichthydrolysierbaren ATP-Analogon (Spur 5, 6), daß die Hydrolyse von ATP für die reduzierte ARF1-Bindung notwendig ist. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen von AMP-PNP eingesetzt, die sich im Ergebnis nicht unterscheiden. Obwohl nur noch ein Bruchteil der ARF1-Bindung in Gegenwart von ATP nachzuweisen ist, ist die Menge an

Coatomer nur unwesentlich reduziert (vgl. Spur 1, 2 mit Spur 3, 4). Demgegenüber ist die Rekrutierung von ARF6 in Anwesenheit von ATP erhöht, eine Hydrolyse ist für diesen Effekt nicht notwendig.

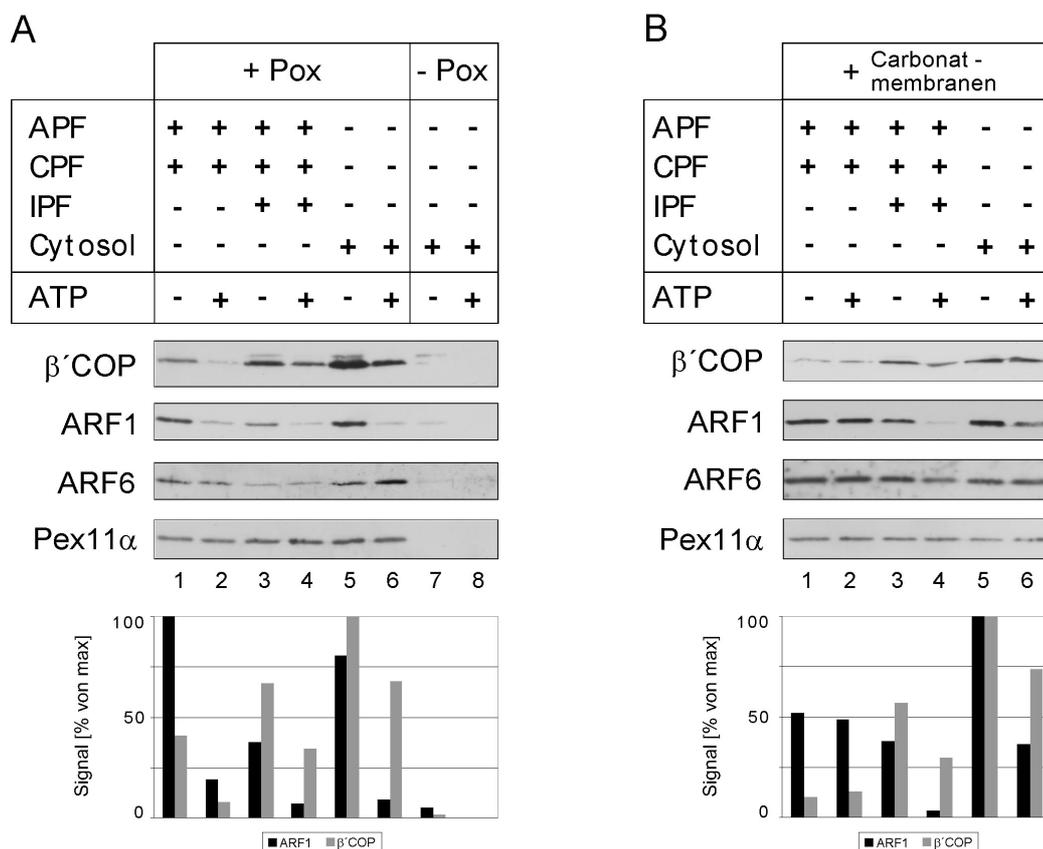
## 4.2 *Einfluß der IPF auf die Rekrutierung von ARF und Coatomer*

### 4.2.1 *Der IPF-Effekt ist unabhängig von ATP*

Neben der Wirkung von ATP auf die ARF- und Coatomerbindung wurde auch der Einfluß von IPF analysiert. Erste Inkubationen in Kapitel 3.1, bei denen unterschiedliche Kombinationen der Poolfraktionen verwendet wurden, deuteten bereits auf einen IPF-vermittelten Effekt hin (s. Abb. 12). Um diesen genauer zu untersuchen und seinen Zusammenhang mit ATP zu klären, wurden sowohl Gesamtperoxisomen als auch peroxisomale Carbonatmembranen, bei denen neben den Matrixproteinen auch periphere Membranproteine stark abgereichert sind, eingesetzt. Die Ansätze wurden unter Zugabe verschiedener Poolfraktionen durchgeführt und der Inkubation mit Gesamtcytosol gegenübergestellt. Jede Serie wurde sowohl in An- als auch Abwesenheit von ARS durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien sind in Abb. 16 zusammengefaßt.

Wie zunächst in Abb. 16A zu sehen, führt die Anwesenheit eines ARS bei der Inkubation von Gesamtperoxisomen zu einer verminderten Anbindung von sowohl ARF1 als auch  $\beta$ 'COP. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob Gesamtcytosol oder einzelne cytosolische Fraktionen zum Einsatz kommen. Darüber hinaus läßt sich noch ein weiterer Effekt beobachten: sobald die Proteine des IPF im Inkubationsansatz enthalten sind, ist die ARF1-Bindung gegenüber IPF-freier Inkubation erniedrigt, wohingegen die Coatomerrekrutierung in Anwesenheit der IPF-Proteine erhöht ist. Dabei spielt es keine Rolle, ob sie als IPF (s. Spur 3, 4) oder Gesamtcytosol zugegen sind (Spur 5, 6). Für die ARF6-Bindung ergab sich ein anderes Bild dahingehend, daß ein deutlicher Effekt in Gegenwart von ARS ausblieb. Wurden nur die beiden Poolfraktionen CPF und APF verwendet (Spur 1, 2), blieb der ATP-Effekt ebenso aus, wie bei Verwendung aller drei Poolfraktionen zusammen (Spur 3, 4). Lediglich bei Inkubationen mit Gesamtcytosol führte die Anwesenheit von ARS zu einer leicht verstärkten ARF6-Rekrutierung (Spur 6). Dieser Effekt war bereits in Abb. 15 beobachtet worden. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß die drei Poolfraktionen

APF, CPF und IPF (Spur 3, 4) ein deutlich geringeres ARF6-Signal ergeben als Gesamtcytosol (Spur 5, 6). Die Kontrollansätze der Spuren 7 und 8 in Abb. 16A, zeigen, daß unter den verwendeten Inkubationsbedingungen weder in An- noch in Abwesenheit von ATP eine unspezifische Präzipitation von ARF oder Coatomer zu beobachten ist.



**Abb. 16: IPF und ATP modulieren die peroxisomale ARF- und Coatomerbindung auf verschiedene Weise.** Jeweils 50 µg Gesamtperoxisomen (Pox, *A*) bzw. 100 µg Carbonatmembranen (*B*) wurden unter identischen Bedingungen mit GMP-PNP und den angegebenen Poolfraktionen bzw. Cytosol in An- oder Abwesenheit von ARS (+ATP/-ATP) inkubiert, die Organellen gewaschen und die Bindung von ARF1, ARF6 und β'COP analysiert. Die Beladung der Spuren ist durch Pex11α dargestellt. Die Signalintensitäten von ARF1 und β'COP wurden densitometrisch quantifiziert, auf Pex11α normiert und als Prozent Intensität vom Maximalwert jeder Serie im Diagramm dargestellt (Abb. unten).

Wurden anstelle der gesamten Organellen peroxisomale Carbonatmembranen verwendet (s. Abb. 16B), so blieb der beschriebene Effekt von ATP bei der Inkubation mit APF und CPF sowohl für die ARF1- als auch für die Coatomerbindung aus (Spur 1, 2), allerdings war die Rekrutierung von β'COP an Carbonatmembranen gegenüber Gesamtperoxisomen deutlich reduziert. Erst in Kombination mit IPF stellte sich der reduzierende Effekt von ATP

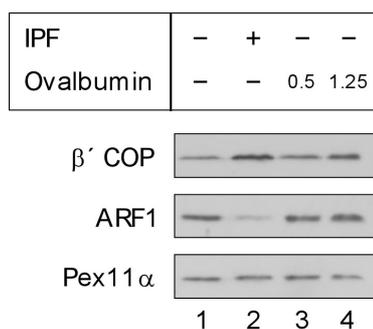
wieder ein (Spur 3, 4) und entspricht dem nach Inkubation mit Gesamtcytosol (Spur 5, 6). Folglich tritt der Effekt der IPF, die Coatomerbindung zu erhöhen und gleichzeitig die ARF1-Bindung auf einem niedrigen Niveau zu halten, auch bei Carbonatmembranen auf, die sich dahingehend nicht von Gesamtperoxisomen unterscheiden. Im Gegensatz dazu bleibt die durch IPF hervorgerufene reduzierte ARF6-Rekrutierung, die an Gesamtperoxisomen beobachtet wurde, an Carbonatmembranen weitgehend aus. Eine Veränderung im Signal ist nur marginal, lediglich in Spur 5 ist eine Reduktion der Bindung zu beobachten. In diesem Ansatz wurden die drei Poolfraktionen zusammen mit ARS verwendet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß i) die durch ATP und IPF hervorgerufenen Effekte voneinander unabhängig sind; ii) die Anwesenheit von ATP eine verringerte Rekrutierung von ARF1 und Coatomer bewirkt; iii) der Effektor von ATP an der Peroxisomenmembran residiert und durch Carbonatbehandlung funktionslos wird, jedoch aus der IPF regeneriert werden kann; iv) in der IPF ein oder mehrere Faktoren enthalten sind, die eine erhöhte Coatomer- und eine erniedrigte ARF1-Bindung hervorrufen; und v) die ARF6-Rekrutierung anderen Gesetzmäßigkeiten unterliegt als die ARF1-Bindung.

#### *4.2.2 Der IPF-Effekt beruht nicht auf einem Protein-Quencheffekt*

Die IPF stellt mit einem Anteil von 80 % des cytosolischen Gesamtproteins die proteinreichste der drei Poolfraktionen dar (s. Kapitel 2.2). Daraus ergab sich die Frage, ob der IPF-Effekt alleine auf der Anwesenheit massiver Proteinmengen beruht. Es galt folglich zu testen, ob der beobachtete Effekt durch unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zwischen beliebigen IPF-Proteinen mit ARF1 bzw. Coatomer hervorgerufen wird (sog. Quencheffekt) oder auf einer funktionellen Wechselwirkung zwischen spezifischen Faktoren aus der IPF und ARF/Coatomer beruht. Experimentell wurde diese Aufgabe gelöst, indem anstelle von IPF Ovalbumin als Trägerprotein bei der Inkubation verwendet wurde (Abb. 17). Die verwendeten Mengen an Ovalbumin (0.5 bzw. 1.25 mg) entsprachen der Größenordnung der eingesetzten IPF-Proteinmenge, die bei ~ 1.5 - 2 mg Protein lag und der IPF-Menge von 50 µl Cytosol äquivalent ist. In allen Ansätzen waren jeweils APF, CPF, ARS und GMP-PNP enthalten. Während die Verwendung von IPF die in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Effekte zur Folge hatte, zeigte dagegen der Zusatz von Ovalbumin, unabhängig von der verwendeten Menge, keinen dieser IPF-Effekte (s. Spur 3, 4). Weder

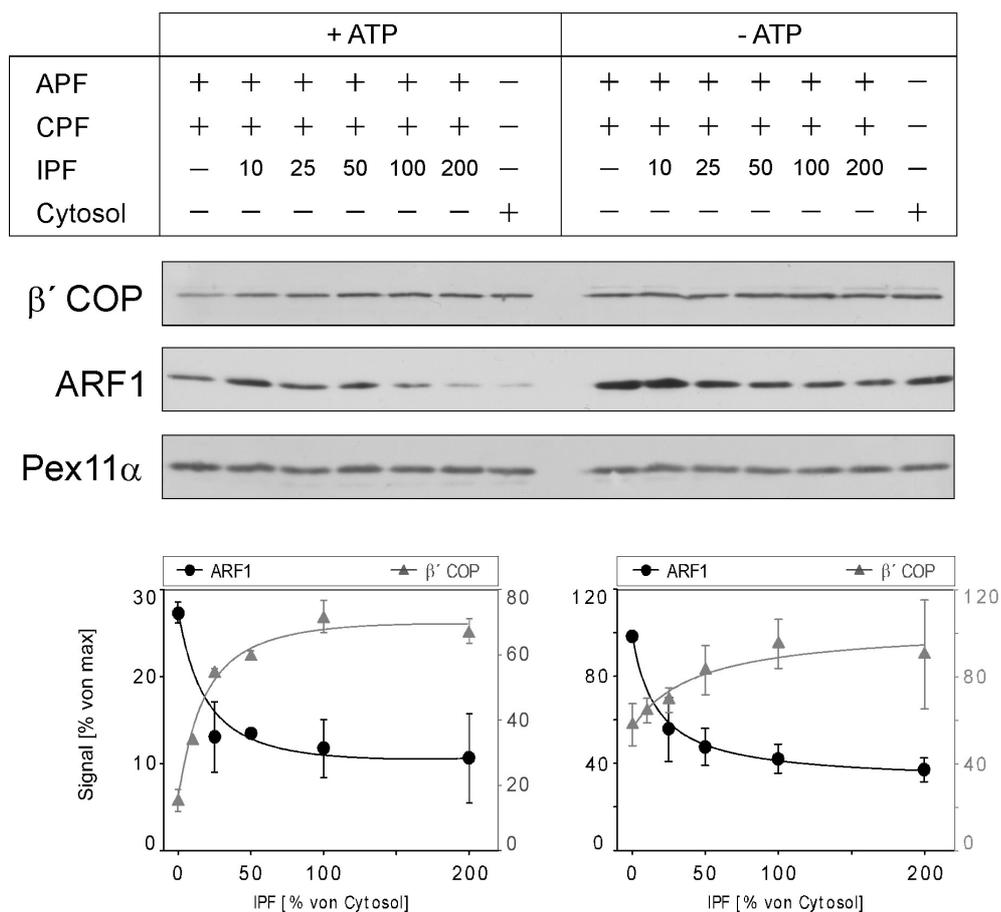
die Bindung von ARF1 noch die von  $\beta'$ COP unterschied sich wesentlich von einer Inkubation, in der nur APF und CPF verwendet wurden (s. Spur 1). Aus dieser Beobachtung läßt sich ableiten, daß der durch IPF hervorgerufene Effekt nicht auf eine unspezifische Interaktion zwischen ARF1 bzw. Coatomer und beliebigem Protein aus der IPF zurückzuführen ist, sondern eine funktionelle Bedeutung haben muß.



**Abb. 17: Die Wirkung von IPF basiert nicht auf einem durch Protein hervorgerufenen Quencheffekt.** 50  $\mu$ g Peroxisomen wurden mit APF, CPF, ARS und 100  $\mu$ M GMP-PNP in Anwesenheit von IPF oder verschiedenen Mengen an Ovalbumin (0.5 mg bzw. 1.25 mg) inkubiert. Im Westernblot wurde die Bindung von  $\beta'$ COP und ARF1 an Peroxisomen, die durch Pex11 $\alpha$ p dargestellt sind, untersucht.

#### 4.2.3 Genauere Studien der IPF-Wirkung in Zusammenhang mit ATP

Um einen detaillierteren Einblick in die Wirkungsweise der in der IPF enthaltenen Faktor(en) zu gewinnen, wurden Inkubationen durchgeführt, bei denen die IPF-Menge der einzelnen Ansätze schrittweise erhöht wurde. In allen Ansätzen waren gleiche Mengen an Peroxisomen, APF, CPF und GMP-PNP enthalten, lediglich die Menge an IPF variierte zwischen 10 und 200 %. Der 100 %-Wert entspricht dabei dem IPF-Proteinanteil in der vergleichenden Cytosolinkubation. Jede Serie wurde sowohl in Anwesenheit eines ARS als auch in dessen Abwesenheit durchgeführt. Die Bindung von ARF1 und  $\beta'$ COP wurde im Westernblot analysiert und die erhaltenen Signale quantifiziert. Um Unterschiede in der Spurbeladung auszugleichen, wurde das Signal des peroxisomalen Membranproteins Pex11 $\alpha$ p analog ausgewertet. Die maximale Signalintensität wurde 100 % gesetzt und alle weiteren Spuren auf diesen Wert bezogen. Davon ausgehend wurden die Quantifizierungen der ARF1- und  $\beta'$ COP-Signale entsprechend korrigiert und schließlich als Prozentwert der Maximalintensität beider Serien (i.e. +ATP bzw. -ATP) dargestellt (s. Abb. 18).



**Abb. 18: IPF und ATP wirken voneinander unabhängig und haben verschiedene Effektoren an der Peroxisomenmembran.** Es wurden je Ansatz 50  $\mu$ g Peroxisomen mit 100  $\mu$ M GMP-PNP in An- oder Abwesenheit von ARS (+ ATP bzw. - ATP) inkubiert. Im Ansatz waren entweder 2.5 mg Cytosol oder die adäquaten Mengen an APF und CPF enthalten; die IPF-Mengen variierten wie angegeben von 10 bis 200 %. Es wurde die Bindung von  $\beta'$ COP und ARF1 im Westernblot zusammen mit dem peroxisomalen Marker Pex11 $\alpha$  analysiert und desitometrisch quantifiziert. Die auf Pex11 $\alpha$  standardisierten Signalstärken von ARF1 (●) bzw.  $\beta'$ COP (▲) sind in Abhängigkeit des Maximalwerts dargestellt (unten). Dabei zeigt die Grafik den Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Inkubationen und den dazugehörigen Fehler.

Wie bereits zuvor beobachtet, ist die ARF-abhängige Coatomerbindung maximal bei Inkubationen ohne ARS, aber in Anwesenheit von IPF. Das stärkste ARF1-Signal beobachtet man ebenfalls unter ATP-freien Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von IPF. Innerhalb jeder Serie (i.e. +ATP oder -ATP) sinkt die Menge an gebundenem ARF1 mit steigender Menge an IPF, bis sie schließlich einen Plateauwert erreicht, der dem Niveau der Cytosolinkubation entspricht. Demgegenüber steigt die Rekrutierung von  $\beta'$ COP mit der Konzentration an eingesetzter IPF, um schließlich ebenfalls einem Sättigungswert entgegenzustreben, der die Signalstärke der Cytosolinkubation erreicht. Dabei ist auffällig, daß die Charakteristik der IPF-abhängigen Bindungskurven von ARF1 und  $\beta'$ COP für ATP-

haltige und ATP-defiziente Inkubationen sich weitgehend entsprechen. Allerdings liegt das Niveau derer in Anwesenheit von ATP etwa 2.5fach niedriger als ohne ATP. Diese Ergebnisse unterstreichen die in Kapitel 4.2.1 bereits beschriebene IPF-Unabhängigkeit des ATP-Effektes. Die gegenläufigen Bindungskurven von ARF1 und Coatomer lassen auf die Existenz einer IPF-Aktivität schließen, die die peroxisomale Membran vor einer überhöhten Menge an ARF1-Bindung schützt und gleichzeitig die Rekrutierung von Coatomer erleichtert. Damit ist die Bindung von ARF1 an die peroxisomale Membran zwar Voraussetzung für eine Rekrutierung von Coatomer (s. Kapitel 3), die Erhöhung der ARF1-Menge bedingt allerdings nicht zwangsläufig eine verstärkte Coatomerbindung an Peroxisomen. Wie die  $\beta$ 'COP-Bindungskurven deutlich zeigen, ist die Coatomerbindung sättigbar.

## 5 *In vivo* Daten für die Relevanz der peroxisomalen ARF- und Coatomerbindung

Die Beobachtung, daß isolierte Peroxisomen ARF1, ARF6 und Coatomer binden, erhob die Frage, ob diese Bindung auch unter *in vivo*-Bedingungen von Bedeutung ist. Dazu wurden Untersuchungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, die inaktivierende Mutationen in entweder den *arf*-Genen oder einzelnen Coatomeruntereinheiten trugen.

### 5.1 Phänotypische Veränderungen in ARF- bzw. Coatomermutanten

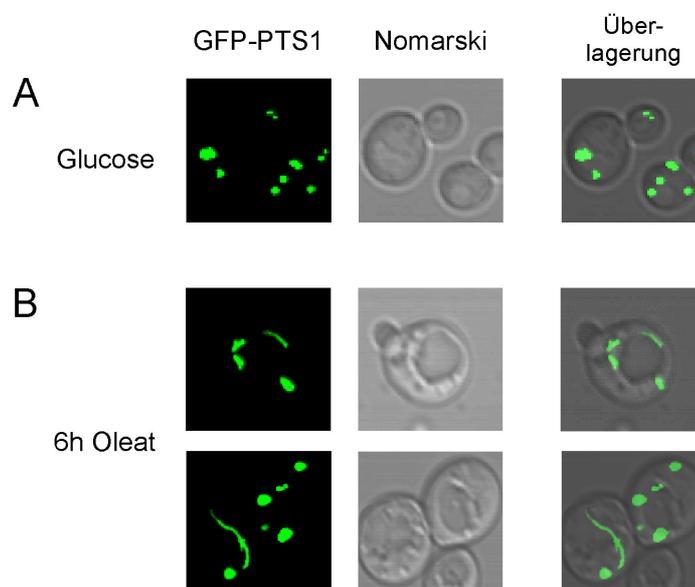
Untersucht wurden verschiedene Mutanten von *S. cerevisiae*, die entweder ein temperatursensitives (*-ts*) Gen oder eine Deletion ( $\Delta$ ) anstelle des wildtyp (*wt*) Gens trugen. Die verwendeten Stämme und ihre Genotypen sind in Tab. 2 im Kapitel Material und Methoden aufgeführt. Zu jeder Mutante wurde parallel der isogene *wt*-Stamm untersucht. In *S. cerevisiae* gibt es im Gegensatz zu Säugetieren lediglich drei ARF-Proteine: ScARF1, ScARF2 und ScARF3. ScARF1 ist das orthologe Protein zum Säugetier-ARF1 und ScARF2 ist funktionell dem ScARF1 sehr ähnlich. Basierend auf einem Sequenzvergleich entspricht ScARF3 dem Säuger-ARF6 (Donaldson und Jackson, 2000; Lee et al., 1994). Da in Hefe die Doppeldeletion der Gene für *arf1* und *arf2* synthetisch letal ist, wurde mit einer *ts*-

Mutante für ScARF1 auf einem ScARF2-negativen Hintergrund (*arf1-ts/arf2Δ*) gearbeitet; dabei war das temperatursensitive Allel *arf1-4* am ARF1-Locus integriert. Diese Genomausstattung gewährleistet die Effekte von ARF1 unmittelbar zu analysieren, da eine Überlagerung mit ARF2-vermittelten Funktionen ausgeschlossen werden kann. Da das Ausschalten von *arf3* nicht letal ist, konnte eine Deletionsmutante von ScARF3 (*arf3Δ*) verwendet werden.

Um das peroxisomale Kompartiment *in vivo* analysieren zu können, wurden die einzelnen Stämme mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) transformiert, das C-terminal ein peroxisomales Typ 1 Targetingsignal (PTS1) trägt, bestehend aus den drei Aminosäuren Serin-Lysin-Leucin (Kalish et al., 1996). Bei der Untersuchung der Bedeutung von ARF1, ARF3 und Coatomer für die peroxisomale Proliferation machte man sich den Umstand zunutze, daß in *S. cerevisiae* die  $\beta$ -Oxidation ausschließlich in Peroxisomen abläuft (Trotter, 2001). Setzt man diese Hefen Bedingungen aus, bei denen die  $\beta$ -Oxidation der alleinige Weg zur Energiegewinnung ist, so beobachtet man neben der Umstellung des Metabolismus auf  $\beta$ -Oxidation eine Proliferation der Peroxisomenzahl. Experimentell wurde dies erreicht, indem von Glucose als Standard-Kohlenstoffquelle im Medium auf Oleat als alleinige Kohlenstoffquelle gewechselt wurde. Bei *ts*-Mutanten wurde die Oleatinduktion sowohl bei permissiver (hier: 25°C) als auch bei nicht-permissiver Temperatur (35°C) durchgeführt, wobei letzterer Behandlung eine Vorinkubation für 30 min bei 35°C in SD-Medium vorausging. Diese Vorinkubation bei nicht-permissiver Temperatur stellte sicher, daß zunächst die Genprodukte temperatursensitiver Allele inaktiviert wurden, bevor mit dem Wechsel auf Oleatmedium die Peroxisomenproliferation induziert wurde. Für die *arf1-ts/arf2Δ*-Mutante tritt bereits nach 10 min bei 35°C ein umfassender Defekt im Golgi-ER-Transport auf (persönliche Information, Dr. Stephan Schröder-Köhne).

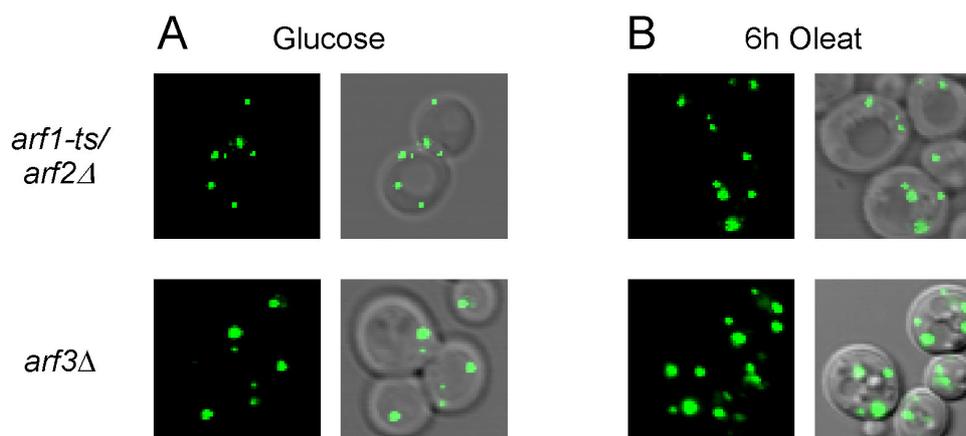
Die Analyse der Zellen erfolgte durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM), indem von jedem Präparat 9 isometrische Scanebenen, die die gesamte Präparatdicke umfaßten, zusammen mit dem Nomarski-Kontrastbild aufgenommen wurden. In einer ersten Analyse zeichnete sich für die  $\alpha$ COP-Mutante PC70 (Letourneur et al., 1994) unter Oleatbedingungen bei nicht-permissiver Temperatur eine auffällige Veränderung des peroxisomalen Phänotypes ab. In etwa einem Drittel der Zellen beobachtete man anstelle sphärischer Organellen (s. Abb. 19A) die Ausbildung langer Tubuli, die teilweise die gesamte Zelle durchspannten (s. Abb. 19B). Die Zahl der Peroxisomen pro Zelle blieb dabei

mit durchschnittlich drei Organellen unverändert. Beides deutet auf eine verhinderte Teilung der Peroxisomen hin.



**Abb. 19: Veränderung des perixosomalen Phänotypes in  $\alpha$ COP-Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* nach Induktion mit Oleat.** Die  $\alpha$ COP-*ts* Mutante (Stamm PC70) wurde mit dem GFP-PTS1-Konstrukt transformiert, um das peroxisomale Kompartiment sichtbar zu machen. Die Zellen wurden bei permissiver Temperatur in Glucose-haltigem Medium in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten (A), für 30 min bei nicht-permissiver Temperatur vorinkubiert, bevor sie für weitere 6 h bei nicht-permissiver Temperatur in Oleat-haltigem Medium kultiviert wurden (B). Die Zellen wurden mit einem cLSM analysiert. Es sind das Fluoreszenzbild des GFP-PTS1-Signals, das Nomarski-Kontrastbild und die Überlagerung beider Bilder gezeigt.

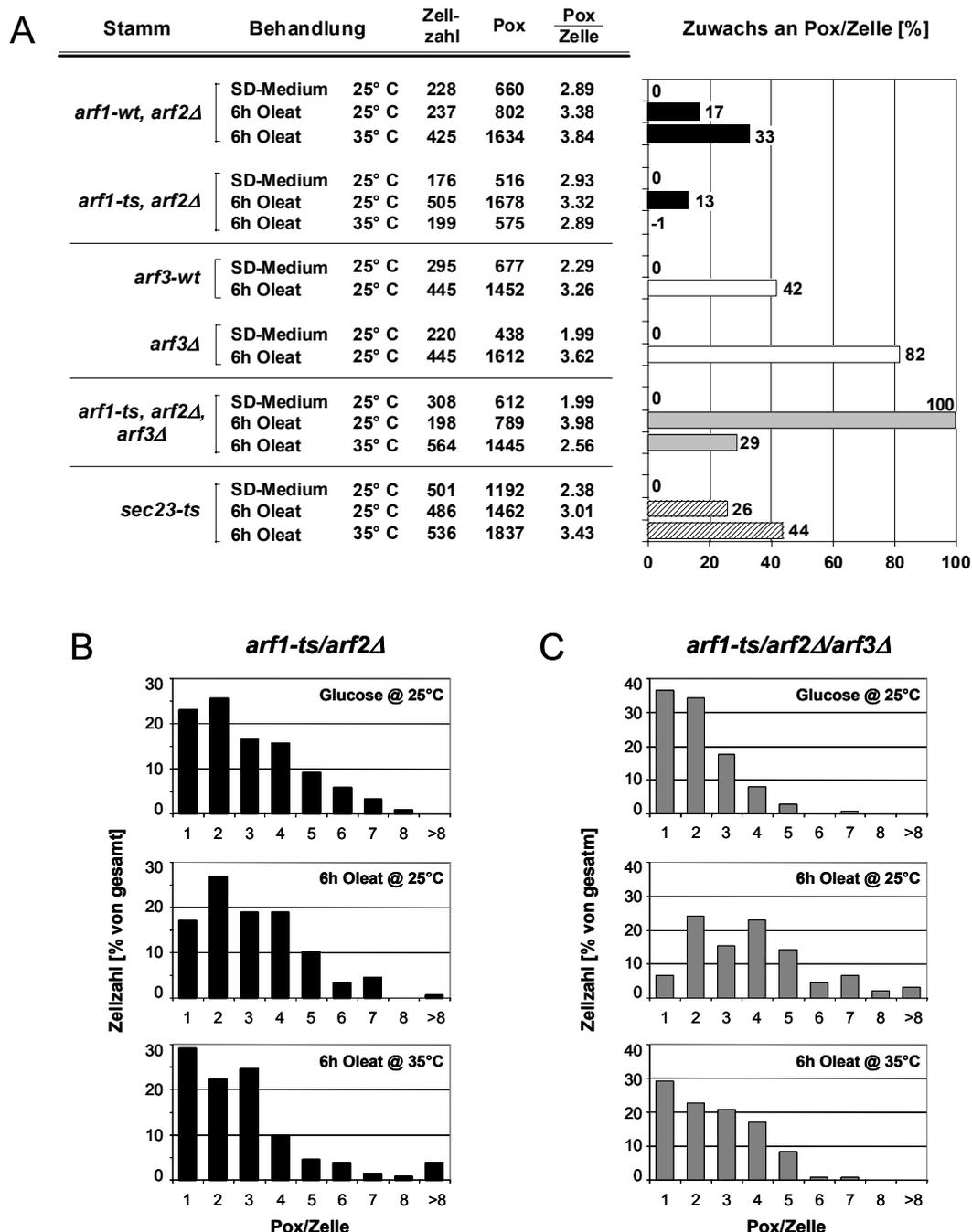
Ein anderer Phänotyp entwickelte sich bei der Inkubation von *arf*-Mutanten. Die Behandlung des *arf1-ts/arf2Δ*-Stammes mit Oleat bei nicht-permissiver Temperatur für 6 h führte, analog zur  $\alpha$ COP-*ts*-Mutante, zu keiner Vermehrung der Peroxisomenzahl pro Zelle, jedoch blieb die Morphologie der Peroxisomen unverändert. Überraschenderweise zeigte der *arf3Δ*-Stamm unter Oleatbedingungen eine stark erhöhte Proliferation der Peroxisomen. Auch hier blieb der sphärische Charakter der Organellen erhalten. Exemplarisch sind Zellen beider Stämme in Abb. 20 dargestellt. Zwischen diesen beiden Extremen – keine Proliferation bei *arf1-ts/arf2Δ* gegenüber Verdoppelung der Anzahl der Peroxisomen pro Zelle bei *arf3Δ* – bewegte sich das Spektrum aller getesteten Stämme.



**Abb. 20: Peroxisomaler Phänotyp in *arf*-Mutanten von *S. cerevisiae* nach Inkubation mit Oleat.** Die Stämme *arf1-ts/arf2Δ* und *arf3Δ* wurden in der logarithmischen Phase unter Standardbedingungen kultiviert (**A**) und anschließend für 6 h auf Oleat-Medium gehalten (**B**). Der *ts*-Stamm wurde zusätzlich für 30 min vor dem Mediumwechsel und während der Oleatphase bei nicht-permissiver Temperatur (35°C) inkubiert. Die Zellen wurden mittels cLSM analysiert. Gezeigt sind das Fluoreszenzbild des GFP-PTS1-Signals (links) und dessen Überlagerung mit dem Kontrastbild (rechts), die eine Zuordnung der Peroxisomen pro Zelle erlaubt.

## 5.2 Quantitative Auswertung der Studien in *S. cerevisiae*

In einer quantitativen Analyse der Peroxisomenzahl pro Zelle wurden insgesamt vier Mutationen-tragende Stämme und die dazugehörigen isogenen wt-Stämme untersucht. Die jeweiligen Inkubationsbedingungen sind in Abb. 21A zusammengestellt. Die Zellen wurden unmittelbar im Anschluß an die Behandlung im cLSM *in vivo* untersucht. Aus den neun aufgenommenen Scanebenen wurden die Ebenen 3, 5 und 7 überlagert und danach die Zahl der Peroxisomen ermittelt. Die zugehörige Zellzahl wurde anhand der Nomarski-Bilder bestimmt und daraus die Peroxisomenzahl pro Zelle ermittelt. Für jeden Stamm wurde der Wert aus der Inkubation bei Standardbedingungen (Glucose-haltiges SD-Medium bei 25°C) für die Berechnung des Zuwachses an Peroxisomen pro Zelle zugrunde gelegt und als 0 % Proliferation definiert. Alle weiteren Werte des jeweiligen Stammes wurden dazu in Relation gesetzt und sind als Zuwachs an Peroxisomen pro Zelle in Prozent ausgedrückt (Abb. 21A rechte Seite). Ferner wurden für zwei Stämme (*arf1-ts/arf2Δ* und *arf1-ts/arf2Δ/arf3Δ*) sog. Histogramme erstellt, die die Häufigkeit wiedergeben mit der eine bestimmte Peroxisomenzahl pro Zelle beobachtet wurde (s. Abb. 21B,C).



**Abb. 21: Peroxisomale Proliferation in Hefemutanten nach Stimulation mit Oleat.** **A** Die unterschiedlichen Stämme wurden entweder unter Standardbedingungen (Glucose-haltiges SD-Medium, 25°C) in der logarithmischen Phase kultiviert oder für 6 h in Oleatmedium bei der angegebenen Temperatur. *ts*-Mutanten wurden sowohl nach Inkubation bei permissiver (25°C) als auch bei nicht-permissiver Temperatur (35°C) analysiert. Zu jedem Mutanten-Stamm wurde darüber hinaus der isogene *wt*-Stamm bei identischen Bedingungen untersucht. Es wurde die Zahl der Peroxisomen (Pox) zusammen mit der Zellzahl ermittelt; die Peroxisomenzahl pro Zelle (Pox/Zelle) unter Standardbedingungen wurde auf 0 % Proliferation gesetzt. **B,C** Histogramme der Stämme *arf1-ts/arf2Δ* und *arf1-ts/arf2Δ/arf3Δ*. Für beide Stämme wurde die Häufigkeit ermittelt, mit der eine bestimmte Pox/Zellzahl bei den untersuchten Bedingungen auftritt. Pro Bedingung wurden zwischen 100 und 170 Zellen ausgezählt.

Unter Standardbedingungen kultivierte Zellen zeigten, abhängig vom verwendeten Stamm, 2 - 3 Peroxisomen pro Zelle. Transferierte man die beiden Stämme *arf1-wt/arf2Δ* und *arf1-ts/arf2Δ* bei 25°C in Oleatmedium, so erhöhte sich die Zahl an Peroxisomen pro Zelle in einem vergleichbaren Ausmaß um 13 % bzw. 17 % (s. Abb. 21A). Somit sind beide Stämme in der Lage unter permissiven Bedingungen Peroxisomen zu proliferieren. Wie die Histogramme in Abb. 21B zeigen, sinkt die Zahl der Zellen mit nur einem Peroxisom zugunsten derer mit mindestens drei pro Zelle. Demgegenüber stehen die Beobachtungen bei nicht-permissiver Temperatur und Oleatmedium: der wt-Stamm zeigt eine Proliferation von 33 %, wohingegen die Peroxisomenzahl der *arf1-ts/arf2Δ*-Mutante gegenüber Glucosebedingungen unverändert bleibt. Im entsprechenden Histogramm wird dies durch zunehmende Häufigkeit der Zellen mit ein bis drei Peroxisomen pro Zelle verdeutlicht. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß in *S. cerevisiae* ein funktionelles ARF1 für die Proliferation des peroxisomalen Kompartimentes nach Oleatinduktion notwendig ist.

Die Analyse der ScARF3-Deletionsmutante (*arf3Δ*) und des entsprechenden Kontrollstammes (*arf3-wt*) ergaben, daß unter Oleatbedingungen im mutierten Stamm die Proliferation mit 82 % einen deutlich höheren Wert als der Kontrollstamm mit 42 % erreichte. Das Ergebnis der Triple-Mutante *arf1-ts/arf2Δ/arf3Δ*, die durch Kreuzung der *arf1-ts/arf2Δ*- mit der *arf3Δ*-Mutante erzeugt wurde, fügte sich dahingehend ins Bild, daß unter Oleatbedingungen die Zunahme an Peroxisomen pro Zelle bei permissiver Temperatur 100 % betrug, jedoch bei nichtpermissiver Temperatur lediglich 29 %. Die Histogramme dieses Stammes (s. Abb. 21C) unterstreichen diese Beobachtung, da die Oleat-Inkubation bei permissiver Temperatur zu einer deutlichen Umverteilung führt: die Häufigkeit der Zellen mit mehr als vier Peroxisomen pro Zelle nimmt signifikant zu. Dieser Stamm scheint eine Überlagerung der zuvor beschriebenen Effekte der beiden Ausgangsmutanten zu zeigen: einerseits die eingeschränkte Proliferation der *arf1-ts*-Mutante bei nicht-permissiver Temperatur, andererseits die stark erhöhte Peroxisomenzahl, hervorgerufen durch die *arf3*-Deletion.

Die Hauptfunktionen von ARF1 betreffen Prozesse des vesikulären Transports. Dabei ist ARF an so verschiedenen Orten wie dem Golgi-Apparat, dem endosomalen Kompartiment und auch der Plasmamembran aktiv (Donaldson und Jackson, 2000; Randazzo et al., 2000). Um auszuschließen, daß die Unfähigkeit das peroxisomale Kompartiment in Abwesenheit von ScARF1 zu proliferieren auf einem Sekundäreffekt beruht, der durch pleiotrope Wechselwirkungen hervorgerufen wird, wurde mit *sec23-ts* eine weitere Mutante mit einer

Störung im sekretorischen Weg untersucht. Sec23 ist eine Komponente des COPII-Hüllkomplexes und besitzt die GAP-Aktivität für die kleine GTPase Sar1p. Die Mutante zeichnet sich bei nicht-permissiver Temperatur durch eine Blockade des Proteinexports vom ER aus (Letourneur et al., 1994). Die Analyse dieses Stammes zeigte, daß die peroxisomale Proliferation auf Oleat nicht beeinträchtigt ist. Der Zuwachs an Peroxisomen unter Oleatbedingungen beträgt 26 % bei permissiver Temperatur und 44 % bei nicht-permissiver Temperatur.

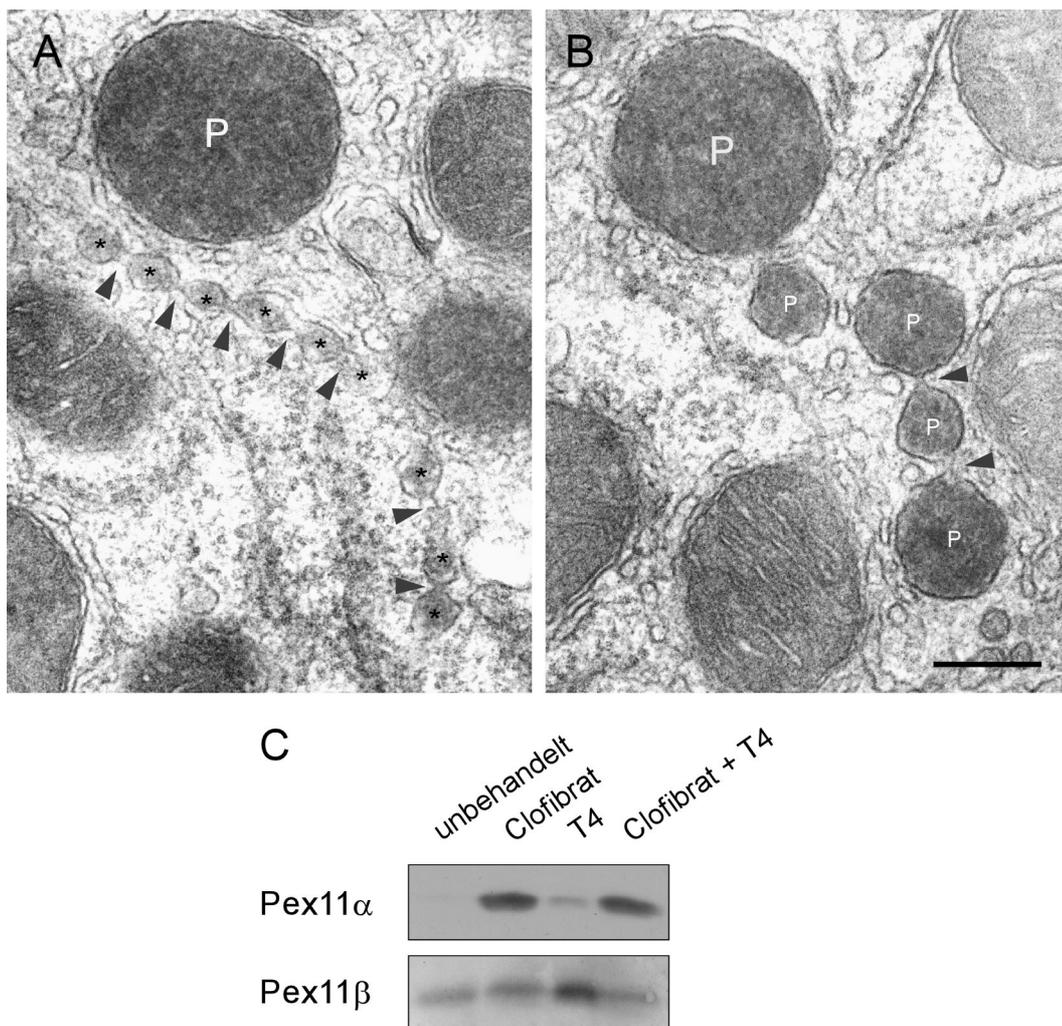
Die Ergebnisse dieser quantitativen Analyse der peroxisomalen Proliferation in *S. cerevisiae* nach Oleatinduktion lassen sich wie folgt zusammenfassen: i) ein funktionelles ScARF1 ist für diesen Prozeß notwendig; ii) die Deletion von ScARF3 bei Anwesenheit von ScARF1 führt zu einer verstärkten Proliferation, wird zusätzlich die ScARF1-Funktion temperaturvermittelt ausgeschaltet, bleibt ein proliferierender Effekt erhalten, allerdings auf einem erniedrigten Niveau; iii) wird der Proteinexport aus dem ER blockiert, unterbindet dies die peroxisomale Proliferation nicht.

## 6 Peroxisomale Vesikulierung

Wie bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben, kann man unter Peroxisomenproliferierenden Bedingungen in der Hefe *S. cerevisiae* phänotypische Veränderungen an Peroxisomen *in vivo* dann beobachten, wenn Mutationen in den Genen für *ARF1*, *ARF6* und  *$\alpha$ COP* vorliegen. Im folgenden werden zwei Säugersysteme vorgestellt, bei denen sich unter Proliferationsbedingungen die Morphologie und die Anzahl der Peroxisomen entscheidend ändert. Dabei wurde einerseits die Morphologie der Leberperoxisomen von Ratten nach Behandlung mit den beiden Proliferatoren Clofibrat und Thyroxin betrachtet und andererseits der peroxisomale Phänotyp in CHO-Zellen, die beide Pex11-Proteine überexprimiert, analysiert.

### 6.1 Konstriktionen peroxisomaler Membranen

Frühere Versuche zur Peroxisomenproliferation in der Ratte haben gezeigt, daß sowohl die hypolipidämisch wirkende Substanz Clofibrat als auch das Schilddrüsenhormon Thyroxin eine Vermehrung der Peroxisomen hervorrufen und eine Veränderung im Muster der Membranproteine bewirken (Hartl und Just, 1987). Verabreicht man männlichen Ratten



**Abb. 22: Konstriktionen der peroxisomalen Membran nach Behandlung mit Clofibrat und Thyroxin.** *A, B* Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Leberschnitten nach Behandlung der Ratte mit sowohl Clofibrat als auch Thyroxin (T4) zeigen peroxisomale Perlenschnüre unterschiedlicher Größe (P bzw. \*). Zwischen den sphärischen Abschnitten besteht Membrankontinuität (s. Pfeilspitzen). Zur Darstellung der Peroxisomen wurden die Präparate mit Diaminobenzidin gefärbt. (Balken entspricht 500 nm) *C* Männliche Wistarratten wurden mit Clofibrat, T4 oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Zum Vergleich des Expressionsniveaus von Pex11 $\alpha$  und Pex11 $\beta$  in Leberperoxisomen aus den entsprechend behandelten Tieren wurden gleiche Mengen an peroxisomalen Carbonatmembranen (je 20  $\mu$ g für Pex11 $\alpha$  bzw. je 40  $\mu$ g für Pex11 $\beta$ ) im Westernblot analysiert.

beide Substanzen gleichzeitig und untersucht anschließend die Morphologie der Peroxisomen auf ultrastrukturellem Niveau, so beobachtet man neben der erwarteten Vermehrung sphärischer Peroxisomen, einen weiteren Phänotyp, der auf atypische Veränderungen innerhalb der peroxisomalen Membran schließen läßt. Dabei treten Peroxisomen in Form von Perlenketten auf, deren sphärische Anteile verschiedene Größen ausmachen können (vgl. Abb. 22A mit Abb. 22B) in jedem Fall jedoch durch eine durchgehende Membran miteinander verbunden sind. Das Auftreten derartiger

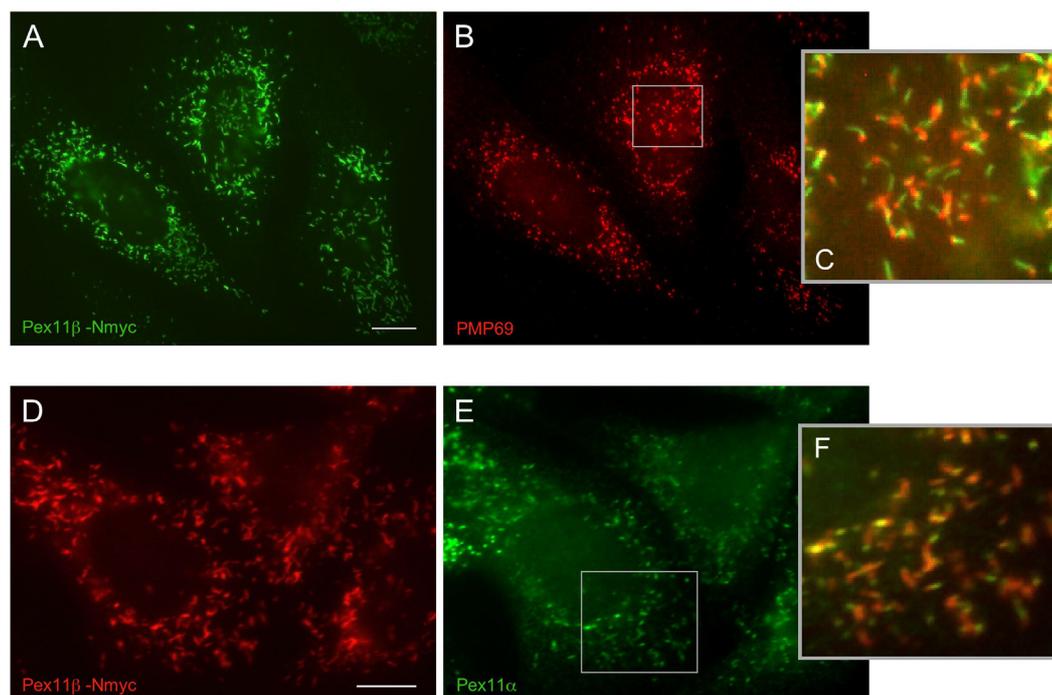
Konstriktionen trat erst nach kombinierter Gabe beider peroxisomenproliferierender Substanzen auf.

Die Untersuchung des Expressionsniveaus der beiden peroxisomalen Membranproteine Pex11 $\alpha$ p und Pex11 $\beta$ p im Zusammenhang mit der Behandlung mit Clofibrat, Thyroxin oder der Kombination beider Substanzen ergab, daß Pex11 $\alpha$ p am stärksten nach der Gabe von Clofibrat exprimiert wird, und demgegenüber die Expression von Pex11 $\beta$ p am stärksten nach Verabreichung von Thyroxin stimuliert ist (s. Abb. 22C). Allerdings steigt die Expression von Pex11 $\beta$ p nur mäßig (um den Faktor 2 bis 3) an, wohingegen das Pex11 $\alpha$ p um den Faktor 10- bis 20-fach gegenüber Kontrollbedingungen erhöht ist. Auch nach Kombination beider Substanzen ändert sich die Membranzusammensetzung bezüglich der Pex11-Proteine gegenüber Kontrollbedingungen. Dabei ist erstaunlich, daß Pex11 $\alpha$ p zwar um einen Faktor analog zur Clofibratbehandlung stimuliert wird, gleichzeitig die Vermehrung von Pex11 $\beta$ p durch Thyroxin jedoch nicht beobachtet werden kann. Obwohl das Membranproteinmuster damit dem unter Clofibratbedingungen ähnelt, wird lediglich unter Clofibrat plus Thyroxin - Bedingungen der Phänotyp der Konstriktionen beobachtet.

## 6.2 Segregation peroxisomaler Membranproteine

Um die Rolle der beiden Pex11-Membranproteine und ihr Zusammenspiel bei der Proliferation von Peroxisomen besser zu verstehen, wurden beide Proteine in CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen stabil überexprimiert. Dabei wurde für Pex11 $\alpha$ p das wildtyp-Gen verwendet und für Pex11 $\beta$ p ein Konstrukt, das N-terminal zusätzlich mit dem myc-Epitop versehen war. Exprimiert man beide Proteine einzeln, so führen sie jeweils zu einer Vermehrung der Peroxisomenzahl pro Zelle (Li und Gould, 2002; Passreiter et al., 1998). Dabei beobachtet man unter Einfluß von Pex11 $\alpha$ p eine knappe Verdoppelung der Peroxisomenzahl, wohingegen die Überexpression von Pex11 $\beta$ p zu einer wesentlich stärkeren Proliferation führt, die gepaart ist mit einer Abnahme der durchschnittlichen Größe der Peroxisomen. In diesen Zellen lassen sich die Peroxisomen in der Regel als sphärische Strukturen, die vereinzelt die Form kurzer Stäbchen einnehmen, beschreiben. Die Analyse verschiedener peroxisomaler Membranmarker ergab das immer gleiche Bild der vollständigen Kolo-kalisation der getesteten Marker (unter diesen Pex11 $\alpha$ p, Pex11 $\beta$ p-Nmyc, Pmp22p, Pmp69p und Katalase), die auf eine Gleichverteilung dieser Proteine schließen

lassen (s.a. Kreiselmeier, 2002). Die Koexpression der beiden beschriebenen Pex11-Proteine führte jedoch zu einer Veränderung des peroxisomalen Phänotyps dahingehend, daß nun fast ausschließlich tubuläre Peroxisomen beobachtet wurden. Zudem trat eine Segregation peroxisomaler Membranproteine auf (s. Abb. 23). Es findet offensichtlich eine Umstrukturierung der Membran unter dem Einfluß der verstärkten Expression von Pex11 $\alpha$ p und Pex11 $\beta$ p-Nmyc statt.



**Abb. 23: Segregation peroxisomaler Membranproteine nach Überexpression von Pex11 $\alpha$ p und Pex11 $\beta$ p in CHO-Zellen.** Sowohl Pex11 $\alpha$ p als auch Pex11 $\beta$ p-Nmyc wurden stabil in einer CHO-Zelllinie überexprimiert. Die Zellen wurden in einer doppelten Immunfluoreszenz gefärbt. Entweder wurde für Pex11 $\beta$ p-Nmyc (*A*) und PMP69p (*B*) gefärbt, oder für die Proteine Pex11 $\beta$ p-Nmyc (*D*) und Pex11 $\alpha$ p (*E*), wobei Pex11 $\beta$ p-Nmyc mit einem anti-myc-Antikörper detektiert wurde. *C* und *F* zeigen vergrößerte Ausschnitte der Überlagerungen aus *A*, *B* bzw. *D*, *E*. Der Balken entspricht 10 $\mu$ m.

Wie Abb. 23 zeigt, ist Pex11 $\beta$ p-Nmyc weitgehend gleichmäßig über die Peroxisomen verteilt, sodaß in der Immunfluoreszenz ein tubuläres Muster zu erkennen ist. Demgegenüber konzentriert sich PMP69, ein ABC-Transporter, meist auf die endständigen Regionen der Tubuli. Ein ähnliches Bild ergibt sich beim Vergleich der beiden Pex11-Proteine: Pex11 $\alpha$ p zeigt im Überblick ähnlich wie PMP69 ein punktuelltes Muster, das nur teilweise mit Pex11 $\beta$ p-Nmyc kolokalisiert. Wie die Detailvergrößerung in Abb. 23F zeigt,

gibt es auch Bereiche, bei denen Pex11 $\alpha$ p über Pex11 $\beta$ p dominiert, was in der Überlagerung durch die grüne Fluoreszenz zum Ausdruck kommt. Offensichtlich treten in der Membran Bereiche auf, die verstärkt von Pex11 $\alpha$ p besetzt sind, während andere eine Konzentrierung von Pex11 $\beta$ p zeigen. Ob diese Membranheterogenitäten eine Vorbereitung auf eine Teilung darstellen, bleibt noch genauer zu untersuchen. In jedem Falle bilden sich bei Peroxisomen unter bestimmten Bedingungen Domänen in der Membran aus, die durch unterschiedliche Membranproteine definiert sind.

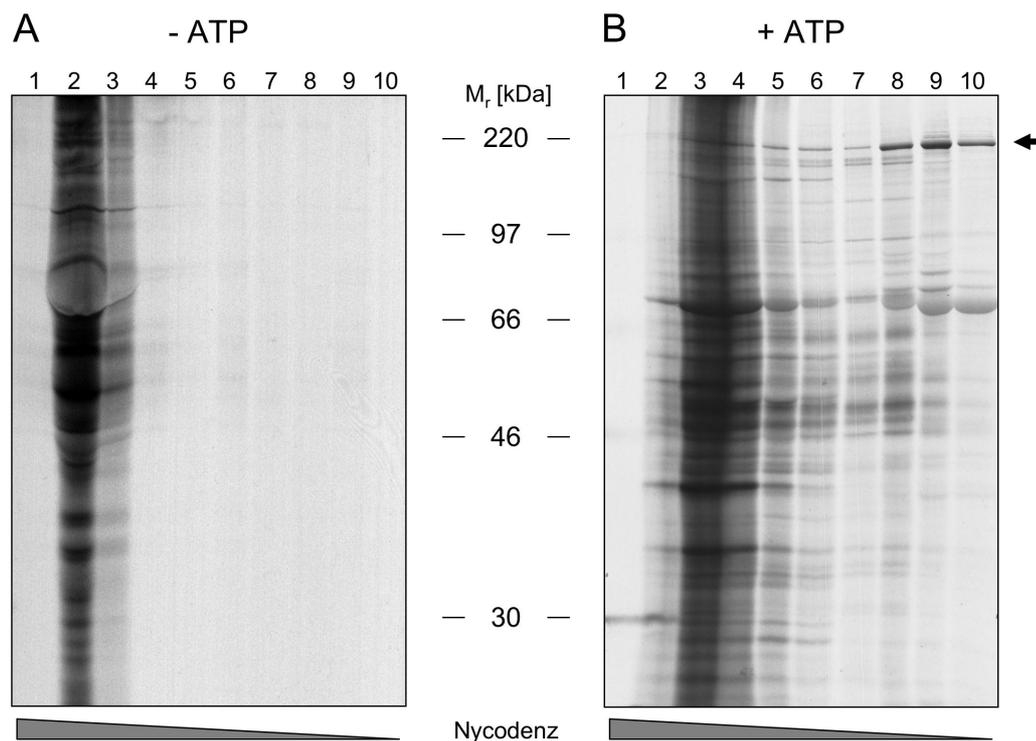
## 7 Charakterisierung niederdichter peroxisomaler Strukturen

Im vorangehenden Kapitel wurden peroxisomale Phänotypen beschrieben, die Membranheterogenitäten aufzeigen und intermediären Schritten bei der Vesikulierung von Membranen ähneln. Zusammen mit der Tatsache, daß ARF1, Coatomer und Nukleotide am Golgi-Apparat zu einem Abschnüren von COPI-umhüllten Vesikeln führen, legte dies die Frage nahe, ob ähnliche Vesikulierungsprozesse auch an peroxisomalen Membranen ablaufen. Ein Kriterium, diese Vesikulierung *in vitro* zu analysieren, ist die Gleichgewichtsdichte in einem Gradienten, die z.B. zwischen abgeschnürten COPI-Vesikeln und den Donor-Organellen unterschiedlich ist (Serafini und Rothman, 1992). Im folgenden blieben drei Fragen zu beantworten: (1) Gibt es bei Peroxisomen Prozesse, die zur Veränderung der Dichte führen, (2) von welchen Faktoren hängen diese Prozesse ab, und (3) durch welche Eigenschaften sind diese Strukturen mit veränderter Dichte charakterisiert?

### 7.1 Dichtegradientenanalyse von Peroxisomen nach ATP-Inkubation

Um Veränderungen der peroxisomalen Population im Dichtegradienten verfolgen zu können, wurde mit Peroxisomen aus <sup>35</sup>S-metabolisch markierten Rattenhepatocyten gearbeitet. Diese wurden mit nichtmarkiertem Cytosol in An- oder Abwesenheit eines ARS inkubiert. Guaninnukleotide waren in diesen Ansätzen nicht enthalten. Die Organellen wurden anschließend in einem linearen Nycodenzgradienten zur Gleichgewichtsdichte zentrifugiert. Es wurden 10 Fraktionen gesammelt und 30 % jeder Fraktion durch Zentrifugation bei 100.000 xg sedimentiert. Der Zentrifugationsschritt wurde einer

quantitativen Präzipitation mit TCA vorgezogen, um lösliches, cytosolisches von Organellengebundenem Protein zu unterscheiden und abzutrennen. Dies war von besonderer Relevanz für die Fraktionen des Auftrags (i.e. 10 und 11), die das Cytosol des Inkubationsansatzes enthielten. Das Proteinmuster der 10 isolierten Fraktionen wurde über eine 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die  $^{35}\text{S}$ -markierten Banden durch Autoradiographie detektiert. Die erhaltenen Muster sind in Abb. 24 dargestellt.



**Abb. 24: Umverteilung peroxisomaler Proteine zu niedriger Dichte nach ATP-Inkubation und Identifizierung des *nonmuscle myosin heavy chain-A (MYH9)*.**  $^{35}\text{S}$ -metabolisch markierte Peroxisomen wurden mit Cytosol in Ab- (-ATP, **A**) oder Anwesenheit (+ATP, **B**) eines ARS inkubiert, auf einen 14 - 45 % Nycodenzgradienten geladen und die Organellen entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen (1-10) wurden über eine 10 % SDS-PAGE getrennt und die radioaktiv markierten Banden mittels Autoradiographie detektiert. Das Molekulargewicht ( $M_r$ ) des Standards ist angegeben. Der Pfeil in **B** deutet auf die Bande im 220 kDa-Bereich in den Fraktionen 8 und 9, die zur massenspektroskopischen Analyse ausgeschnitten wurde.

In Abwesenheit von ATP (Abb. 24A) zentrifugieren die Peroxisomen zu der erwarteten Dichte von  $\sim 1,21$  g/ml, was den Fraktionen 2 und 3 entspricht. Die übrigen Fraktionen sind frei von radioaktiven Proteinmustern, was darauf hindeutet, daß die Organellen nach Inkubation mit Cytosol, jedoch ohne ATP, ihr Zentrifugationsverhalten bezüglich der Dichte nicht verändert haben. Demgegenüber variiert die Verteilung von Protein innerhalb des Gradienten, sobald neben Cytosol auch ein ARS zur Inkubation der Peroxisomen

verwendet wurde (Abb. 24B). Radioaktiv markierte Proteine finden sich in den niederdichten Fraktionen des Gradienten. Während das Hauptmaximum um Fraktion 3 erhalten bleibt, hat sich unter Einfluß von ATP ein Nebenmaximum in den Fraktionen 8 und 9 (Dichte ~ 1,11 g/ml) gebildet. Da radioaktiv markierte Proteine ausschließlich in der zur Inkubation eingesetzten Peroxisomenfraktion enthalten sind, müssen die im Autoradiogramm detektierten Proteine dieser peroxisomalen Fraktion entstammen.

Von besonderem Interesse erwies sich eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht ( $M_r$ ) von ~ 220 kDa in den Fraktionen 8 und 9, die sich relativ zu den anderen Proteinen im niederdichten Bereich am stärksten anreicherte. Um diese 220 kDa-Bande näher zu analysieren, wurde das Protein aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau massenspektroskopisch (MS) untersucht. Der resultierende sog. *fingerprint* der Peptidmassen wurde mit der nicht-redundanten Datenbank *NCBI* verglichen, deren Einträge auf die Massen der tryptischen Fragmente aller bekannten Proteine aus Ratte spezifiziert waren (Programm *Mascot Search*). Die MS-Analyse lieferte 29 Massen, von denen 22 mit tryptischen Peptiden aus der Sequenz des *Nonmuscle Myosin Heavy Chain-A* (NMMHC-A) der Ratte übereinstimmten. Dieses Protein ist auch unter der Bezeichnung MYH9 (für *Myosin Heavy Chain 9*) beschrieben (Accession-Nr: Q62812). MYH9 besitzt ein Molekulargewicht von 226 kDa, das sich auf 1.961 Aminosäuren verteilt. Davon sind 317 Aminosäuren (16 %) durch 22 der gefundenen 29 Peptidmassen abgedeckt, was einer signifikanten Übereinstimmung entspricht. Innerhalb der achtzehn verschiedenen Klassen der Myosin-Superfamilie ordnet man MYH9 den nicht-muskulären (bzw. cytoplasmatischen) Myosinen der Klasse II A zu, die einen bipolaren Filamentaufbau besitzen (Berg et al., 2001). Vertreter dieser Myosinklasse stellen hexamere Proteinkomplexe dar, die sich aus zwei schweren Ketten (*heavy chain*) mit je 171 - 244 kDa und aus je einem Paar essentieller bzw. regulatorischer leichter Ketten zusammensetzen. MYH9 als Repräsentant der schweren Ketten unterteilt sich in mehrere funktionelle Domänen. Während die carboxyterminalen Hälften zweier Ketten zu *coiled-coil*  $\alpha$ -Helices dimerisieren, bildet der Aminoterminus jeweils eine globuläre Kopfregion, die die leichten Ketten bindet, mit Aktin interagiert und ATP hydrolysiert. Sie stellt den Träger der katalytischen Aktivität dar.

## *7.2 Die Rolle von ATP bei der Freisetzung einer peroxisomalen Subpopulation*

Der in 7.1 beobachtete Effekt von ATP, eine peroxisomale Subpopulation freizusetzen, wurde im folgenden genauer untersucht. Dabei standen zwei Fragen im Mittelpunkt: (1) Hängt die Bildung dieser Subpopulation alleine von ATP ab, und (2) welchen Beitrag leistet das Cytosol bei diesem Prozeß?

### *7.2.1 Die Anwesenheit von ATP, jedoch nicht seine Hydrolyse bewirken die Veränderung*

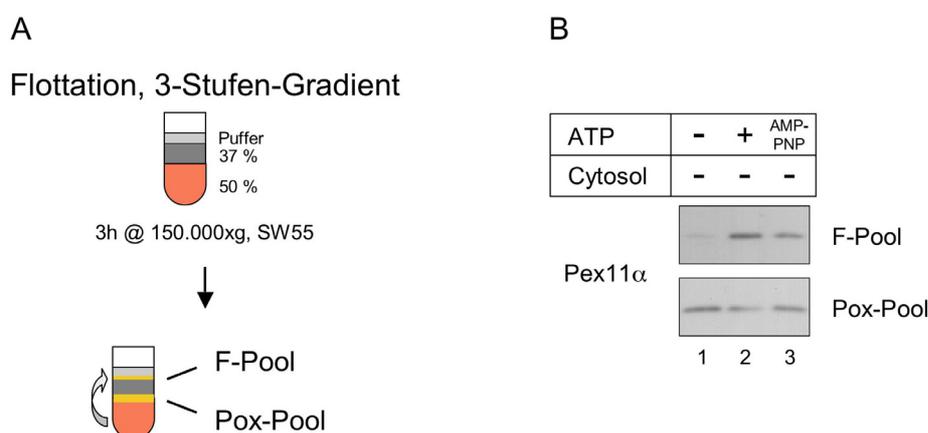
Zunächst wurden frisch isolierte Peroxisomen ausschließlich mit ARS inkubiert. Cytosol oder Guaninnukleotide waren im Ansatz nicht enthalten. Diese Inkubationen wurden Kontrollansätzen, die entweder kein ARS enthielten oder bei denen das ARS durch das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon AMP-PNP ersetzt worden war, gegenübergestellt. Die Analyse der Inkubationen erfolgte nach zwei Kriterien, einmal, in Anlehnung an die zuvor beschriebenen Inkubationen mit radioaktiv markierten Peroxisomen (s. 7.1), nach unterschiedlicher Dichte, zum anderen nach unterschiedlicher Größe.

#### *7.2.1.1 Flottieren im Dichtegradienten*

Um die Organellen gemäß ihrer Dichte zu untersuchen und gleichzeitig sicherzustellen, daß anschließend nur membrangebundene Proteine analysiert werden, wurden die Peroxisomen flottiert. Dazu wurde der Inkubationsansatz auf eine Dichte von 50 % (w/v) Nycodenz eingestellt und mit zwei Stufen aus je 37 % Nycodenz bzw. Homopuffer überlagert. Nach der Zentrifugation zur Gleichgewichtsdichte wurden an den beiden Phasenübergängen von 50 % nach 37 % Nycodenz und von 37 % Nycodenz nach Puffer Organellen beobachtet. Eine Verlaufsskizze zum Versuch ist in Abb. 25A gezeigt.

Der Hauptteil der Peroxisomen zentrifugierte, wie erwartet, zur unteren Interphase und wurde als sog. Pox-Pool isoliert. Lediglich in den Ansätzen mit ARS und AMP-PNP flottierte ca. ein Fünftel des Gesamtmaterials an die obere Interphase. Auch hier wurde die Bande quantitativ isoliert und als sog. F-Pool bezeichnet (mit F für flottiert). Die Analyse beider Pools im Westernblot spiegelt die im vorangehenden Kapitel beschriebenen Beobachtungen zum Zentrifugationsverhalten wider (s. Abb. 25B). Lediglich in Anwesenheit von ATP oder seinem Analogon AMP-PNP flottieren größere Mengen an Peroxisomen

an die obere Interphase, wie das Signal des peroxisomalen Membranmarkers Pex11 $\alpha$  im F-Pool zeigt. Unter Berücksichtigung der aufgetragenen Mengen läßt sich der Anteil an flottiertem Material mit ~15-20 % abschätzen. Dabei ist bemerkenswert, daß für den Hauptteil des beobachteten Effekts die Anwesenheit von ATP, nicht jedoch dessen Hydrolyse, ausschlaggebend ist, wie die Verwendung von AMP-PNP verdeutlicht (Spur 3). Die Inkubation mit AMP-PNP (Spur 3) zeigt jedoch auch, daß weniger Pex11 $\alpha$  in den F-Pool flottiert, als dies nach ARS-Inkubation (Spur 2) der Fall ist. Dies legt den Schluß nahe, daß der Effekt unter ARS-Bedingungen sich aus zwei gleichgerichteten Vorgängen zusammensetzt. Die Hauptmenge flottiert bereits in Anwesenheit von ATP, wobei dessen Hydrolyse nicht notwendig ist. Eine kleinere Menge hingegen flottiert nur in Abhängigkeit von der ATP-Hydrolyse.

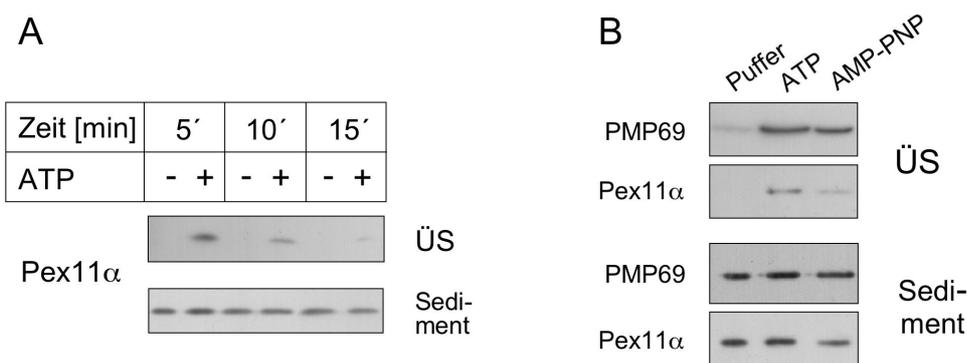


**Abb. 25: Inkubation mit ATP führt zum Freisetzen einer niederdichten peroxisomalen Subpopulation.** **A** 1 mg frisch isolierte Peroxisomen wurden mit einem ARS (+ATP) in Abwesenheit von Cytosol inkubiert, auf eine Dichte von mind. 50 % Nycodenz eingestellt und in einen Stufengradienten (aus 37 % Nycodenz überlagert von Homopuffer) flottiert. **B** 1.5 % der Organellen am 50 % - 37 %-Phasenübergang (Pox-Pool) und 10 % des flottierten Materials am 37 %-Puffer-Übergang (F-Pool) wurden durch Westernblot auf den peroxisomalen Membranmarker Pex11 $\alpha$  untersucht. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne ATP (Spur 1) bzw. mit 100  $\mu$ M AMP-PNP anstelle von ARS (Spur 3).

Es läßt sich also zusammenfassen, daß i) nach Inkubation mit ATP eine peroxisomale Subpopulation von geringerer Dichte als die der Ausgangsperoxisomen entsteht, ii) für diesen Effekt ATP ausreichend ist, und cytosolische Faktoren nicht notwendig sind, iii) die Hydrolyse von ATP für den Hauptteil des Effekts nicht notwendig ist.

### 7.2.1.2 Sedimentationsanalysen

Neben Untersuchungen der peroxisomalen Subpopulation auf veränderte Dichte wurde in Sedimentationsanalysen auch die Frage nach einem Unterschied bezüglich deren Größe gestellt. Dazu wurden die Inkubationsansätze differentiell zentrifugiert. Dabei macht man sich zunutze, daß Partikel, z.B. Organellen, im Zentrifugalfeld gemäß ihrer Größe sedimentieren, wobei die größten die stärkste Beschleunigung erfahren und somit den Gefäßboden als erste erreichen. Zunächst mußte die optimale Zentrifugationszeit ermittelt werden (s. Abb. 26A). Diese ist dann erreicht, wenn der zu untersuchende Marker (hier: Pex11 $\alpha$ ) in der Negativkontrolle (-ATP) bereits vollständig sedimentiert ist, während er im ATP-haltigen Ansatz noch im Überstand detektiert werden kann. Es wurden Zentrifugationszeiten von 5, 10 und 15 min bei ~ 13.000 xg untersucht.



**Abb. 26: Sedimentationsanalysen durch differentielles Zentrifugieren der ATP-inkubierten Peroxisomen.** **A** Je 1 mg frisch isolierte Peroxisomen wurden in An- oder Abwesenheit eines ARS (ATP +/-) in einem Volumen von 750  $\mu$ l inkubiert, danach wurde auf 2 ml mit Puffer ergänzt und für die angegebenen Zeiten bei 13.000 Upm in einer Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert. 25 % des ÜS und 2 % des Sediments wurden im Westernblot auf Pex11 $\alpha$  untersucht. **B** Es wurde wie in **A** inkubiert, wobei das ARS auch durch Puffer bzw. 100  $\mu$ M AMP-PNP ersetzt wurde. Die Zentrifugationszeit betrug 5 min. Durch Westernblot wurden 25 % des ÜS und 2 % des Sediments auf Pex11 $\alpha$  und PMP69 untersucht.

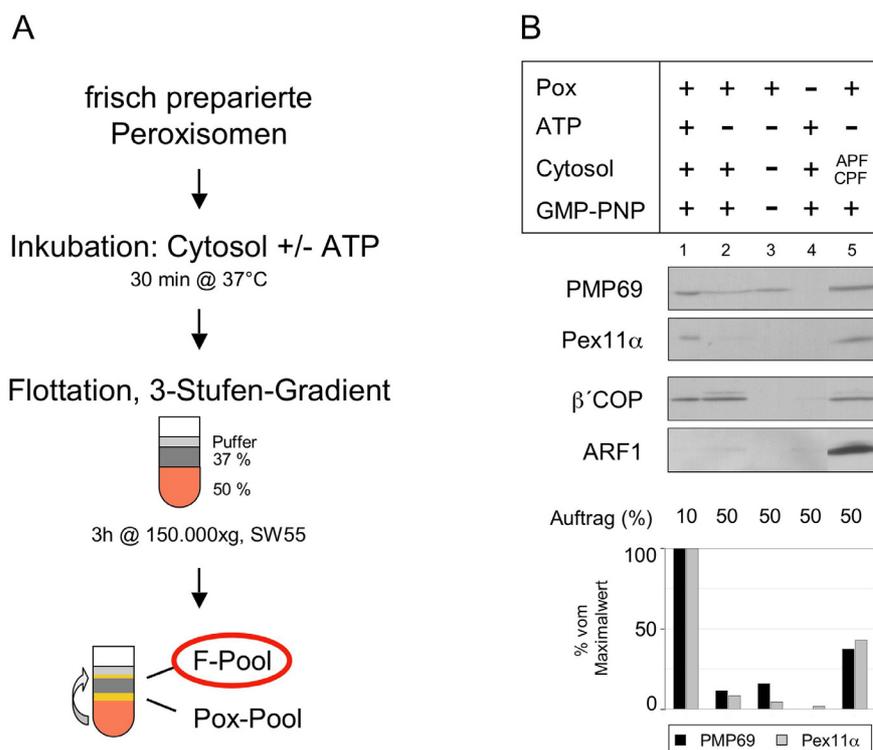
Wie in Abb. 26A zu sehen, sind bereits 5 min ausreichend, um die Peroxisomen des ATP-freien Ansatzes quantitativ zu sedimentieren. Des weiteren wird deutlich, daß im ÜS der ATP-inkubierten Ansätze mit zunehmender Zeit das Signal des Membranmarkers Pex11 $\alpha$  schwächer wird. Dies deutet darauf hin, daß das detektierte Protein kein unter ATP-Bedingungen freigesetztes Material darstellt, sondern membrangebundenes Protein repräsentiert und diese Membranen nach 15 min bei ~ 13.000 xg nahezu quantitativ sedimentiert sind.

Im nachfolgenden Versuch wurde eine Zentrifugationszeit von 5 min verwendet. In Analogie zu den flottierten Proben wurden drei Inkubationen (mit Puffer, ARS oder AMP-PNP) miteinander verglichen. Im Westernblot wurden 25 % des ÜS und 2 % des Sediments auf die Membranmarker Pex11 $\alpha$ p und PMP69p untersucht. Wie Abb. 26B zeigt, gleichen sich beide Proteine in ihrem Sedimentationsverhalten. Unter den gewählten Bedingungen verbleiben sowohl PMP69p als auch Pex11 $\alpha$ p im ÜS, sofern mit ATP inkubiert wurde. Wie bei den Flottationsstudien ist dieser Effekt weitgehend unabhängig von der ATP-Hydrolyse, da nach Inkubation mit AMP-PNP beide Proteine ebenfalls im ÜS zu finden sind. Doch auch hier ist nach Inkubation mit ARS ihr Anteil im ÜS höher als unter AMP-PNP-Bedingungen, was besonders für Pex11 $\alpha$ p zutrifft.

Dieses Experiment zeigt, daß die unter ATP geschaffene peroxisomale Subpopulation kleinere Organellen enthält, deren Generierung der Hydrolyse von ATP zwar nicht notwendigerweise bedarf, jedoch durch ATP-Hydrolyse gefördert wird.

### *7.2.2 Neben ATP führen auch ARF und Coatomer zu niederdichten peroxisomalen Strukturen*

Das zur Analyse des ATP-Effektes etablierte Gradientensystem zum Flottieren inkubierter Ansätze wurde in einem weiteren Versuch auch zur Analyse von Cytosol/GMP-PNP inkubierten Peroxisomen verwendet. Der Versuchsablauf ist in Abb. 27A skizziert. Es wurden frisch isolierte Peroxisomen mit GMP-PNP und verschiedenen Kombinationen aus ARS und Cytosol verwendet. Dabei wurde in einem Ansatz das Gesamtytosol durch die beiden Poolfraktionen APF und CPF ersetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden Banden an den beiden Interphasen beobachtet. Dabei variierte besonders an der 37 %-Puffer-Phasengrenze die Menge an flottiertem Material erheblich. Die größte Menge wurde in Ansatz 1 beobachtet, in dem neben Cytosol und GMP-PNP auch ARS verwendet wurde. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache wurden unterschiedliche Mengen des F-Pools im Westernblot analysiert, wobei von Ansatz 1 nur ein Zehntel und von allen übrigen Ansätzen die Hälfte des F-Pools auf das Gel aufgetragen wurde. Neben  $\beta$ 'COP und ARF1 wurden PMP69p und Pex11 $\alpha$ p untersucht. Die Signale der peroxisomalen Membranproteine wurden darüber hinaus densitometrisch quantifiziert, auf die Gesamtmenge an F-Pool hochgerechnet und als Prozentsatz der berechneten Maximalintensität angegeben (s. Abb. 27B).



**Abb. 27: Charakterisierung flottierender peroxisomaler Strukturen.** *A* Frisch präparierte Peroxisomen (je 1 mg) wurden nach gezeigtem Schema inkubiert und anschließend flottiert. *B* Die angegebenen Kombinationen aus Peroxisomen, ARS (ATP), GMP-PNP und Cytosol bzw. den Poolfraktionen APF/CPF wurden wie in *A* gezeigt inkubiert und flottiert und der F-Pool im Westernblot für die angegebenen Marker untersucht. Die aufgetragene Menge variierte zwischen 10 und 50 % des F-Pools. Die Signale von PMP69p und Pex11αp wurden quantifiziert, auf 100 % F-Pool hochgerechnet und in Abhängigkeit vom Maximalwert dargestellt (s. untere Grafik).

In Bestätigung der zuvor gemachten Beobachtungen, flottiert in Ansatz 1, in dem Peroxisomen zusammen mit ATP vorliegen, etwa zehnfach mehr peroxisomales Membranprotein in den F-Pool als in Abwesenheit von ATP (s. Ansatz 2). In dieser Hinsicht verhalten sich die beiden Membranmarker PMP69p und Pex11αp vergleichbar. Demgegenüber bleiben die Signalintensitäten für β' COP und ARF1 weitgehend unbeeinflusst von der An- oder Abwesenheit eines ARS während der Inkubation. Sowohl in Ansatz 1 als auch 2 bleibt die Signalstärke jeweils auf ähnlichem Niveau, wobei die ARF1-Signale insgesamt sehr schwach sind. Demzufolge flottieren unter ATP-defizienten Bedingungen zwar weniger peroxisomale Membranen in den F-Pool, diese tragen jedoch dieselbe Menge an ARF1 und Coatomer.

Wird während der Inkubation das Gesamtytosol durch APF und CPF ersetzt (s. Ansatz 5), ansonsten die Bedingungen gegenüber Ansatz 2 jedoch konstant gehalten, so flottiert mindestens die doppelte Menge an peroxisomalen Markern an die obere Interphase

(vgl. Ansatz 2 und 5). Insbesondere für Pex11 $\alpha$ p ist eine Vermehrung um den Faktor drei bis vier zu beobachten. Zudem verstärkt sich das ARF1-Signal deutlich, während die  $\beta$ 'COP-Intensität auf gleichem Niveau bleibt. Diese Beobachtung, daß ARF1 unter ATP-freien Bedingungen und in Abwesenheit der IPF verstärkt an peroxisomale Membranen bindet, ist konsistent mit Bindungsstudien in Kapitel 4.2. Darüber hinaus konnte im vorliegenden Versuch gezeigt werden, daß sowohl ARF1 als auch Coatomer zusammen mit peroxisomalem Membranprotein flottieren. In den beiden Kontrollansätzen 3 und 4, die entweder nur Peroxisomen (Ansatz 3) oder Cytosol/ARS/ GMP-PNP (Ansatz 4) enthielten, flottierte deutlich weniger peroxisomaler Marker bzw. weder ARF1 noch Coatomer. Daraus kann geschlossen werden, daß das in Ansatz 5 beobachtete Ko-Flottieren von ARF1 und Coatomer mit peroxisomalem Marker eine funktionelle Bedeutung hat.

---

### **III DISKUSSION**

Die Beobachtung, daß sowohl ARF als auch der hepta-heterooligomere Proteinkomplex Coatomer an Peroxisomen gefunden wurden (Passreiter et al., 1998), warf zunächst die Frage nach der Spezifität dieser Bindung auf. Der eigentliche Hauptwirkungsort von Coatomer ist die Golgi-Membran, wo der Komplex das Abschnüren von COPI-Vesikeln vermittelt, deren Haupthüllprotein er darstellt (Rothman und Wieland, 1996; Schekman und Orci, 1996). Die Rekrutierung von Coatomer an die Membran erfolgt über eine bivalente Interaktion, die einerseits durch die kleine GTPase ARF in ihrer GTP-gebundenen Form und andererseits durch ein Transmembranprotein mit Rezeptorfunktion vermittelt wird (Sohn et al., 1996; Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). Durch diese Interaktion wird eine Konformationsänderung innerhalb des Coatomerkomplexes ausgelöst, die in einer Polymerisation an der Membran resultiert und letztlich zum Abschnüren eines proteinumhüllten Vesikels führt (Reinhard et al., 1999).

ARF, der zweiten Komponente der COPI-Hülle, werden neben seiner Funktion, die Coatomerrekrutierung zu vermitteln, noch weitere wichtige Funktionen zugeordnet. So findet man die GTPase auch am späten Golgi, wo sie den Clathrin-vermittelten Transport reguliert (Hirst und Robinson, 1998). Darüber hinaus wurde ARF an der Plasmamembran und dem endosomalen Kompartiment nachgewiesen, wo er so verschiedene Aufgaben wie Recycling der Plasmamembran, Aktivierung von Membranlipid-modifizierenden Enzymen und Modulierung von Aktinstrukturen übernimmt (Donaldson, 2003; Randazzo et al., 2000). Im Hinblick auf die bisher beschriebenen Funktionen von Coatomer und insbesondere das vielfältige Wirkspektrum von ARF an ganz unterschiedlichen Organellen stellte sich natürlich zunächst die Frage nach der Spezifität der *in vitro* beobachteten Bindung dieser beiden Komponenten an Peroxisomen.

# 1 Spezifität der peroxisomalen ARF- und Coatomerbindung

## 1.1 Die Bedeutung des ER

Um die Spezifität der Rekrutierung von ARF und Coatomer an Peroxisomen zu klären, wurde zunächst die Reinheit der Peroxisomen betrachtet. Aufgrund der Isolierungsmethode (Hartl et al., 1985), bei der die zellulären Bestandteile zunächst nach Größe und anschließend nach Schwimmdichte getrennt werden, sind die einzigen beobachteten Verunreinigungen Mitochondrien und ER-Membranen. Wobei jüngste Beobachtungen zeigen, daß mitochondriale Membranen praktisch nicht nachweisbar sind (Jeynov et al., 2004). Die Kontamination mit ER bewegt sich dagegen zwischen 5 und 10 % und ist nicht mehr vernachlässigbar. Zahlreiche elektronenmikroskopische Aufnahmen nicht nur der Rattenleber zeigen ER-Membranen in dichter Nachbarschaft zu Peroxisomen (persönliche Kommunikation Dr. Karin Gorgas und Geuze et al., 2003; Novikoff und Novikoff, 1982). Detaillierte EM-Bilder weisen darauf hin, daß deren Lage möglicherweise durch Strukturproteine stabilisiert wird, deren biochemische Charakterisierung allerdings noch aussteht. Dennoch deuten diese Beobachtungen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen ER und Peroxisomen hin; denkbar ist der Austausch von Lipiden an diesen Kontaktstellen, ein Mechanismus, der auch für Mitochondrien vorgeschlagen wird (Vance, 2003). Eine funktionelle und strukturelle Assoziation zwischen Peroxisomen und ER liefert zumindest eine plausible Erklärung für die recht erhebliche Kontamination der peroxisomalen Präparation mit ER-Membranen und wirft darüber hinaus die Frage auf, ob mit konventionellen Methoden überhaupt ER-freie Peroxisomen zu isolieren sind. Betrachtet man die Relevanz der ER-Verunreinigung im Hinblick auf die Bindung von ARF und Coatomer, dann stehen unterschiedliche Beobachtungen zur Diskussion. Es gibt frühe morphologische Arbeiten, die die Bindung von Coatomer an ER (Orci et al., 1994) und an mit der Kernmembran im Kontinuum stehende Membranen (Bednarek et al., 1995) auf immunhistochemischem Weg demonstrierten. Dennoch ergaben spätere Untersuchungen der Interaktion von ER mit verschiedenen Hüllproteinkomplexen, daß ausschließlich der sog. COPII-Komplex an ER-Membranen bindet, während COPI an den Golgi rekrutiert wird (Barlowe et al., 1994). Der COPII-Hüllkomplex besteht aus der kleinen GTPase Sar1p (Barlowe et al., 1993; Nakano und Muramatsu, 1989), die regulatorische Funktion besitzt, und den beiden Teilkomplexen Sec23p/Sec24p bzw. Sec13p/Sec31p (Sec für *secretion*)

(Hicke et al., 1992; Pryer et al., 1993; Salama et al., 1993). Die COPII-Hüllproteine binden an das ER und vermitteln den vesikulären Transport in anterograder Richtung zum ER-Golgi intermediären Kompartiment (ERGIC) (Barlowe et al., 1994). Obwohl die Rekrutierung von sowohl COPI- als auch COPII-Hülle durch eine kleine GTPase gesteuert wird, weisen beide Hüllkomplexe keine strukturelle Verwandtschaft auf (Barlowe et al., 1994; Bednarek et al., 1995). Aus diesen Beobachtungen folgt die heute weitverbreitete Meinung, daß ARF und Coatomer keine funktionelle Bedeutung für die Vesikulierung an ER-Zisternen besitzen.

## 1.2 *Der Vergleich mit Golgi-Membranen*

Weitere Hinweise für eine peroxisomale Spezifität der ARF/Coatomerbindung ergeben sich aus dem direkten Vergleich der Bindungseigenschaften von hochreinen Peroxisomen und Golgi-Membranen, dem Hauptwirkungsort für ARF und Coatomer. Relativ zu Golgi-Membranen binden Peroxisomen mehr ARF und weniger Coatomer. Darüber hinaus ist unter GDP $\beta$ S-Bedingungen keine Coatomerbindung an Peroxisomen zu finden, während Golgi-Membranen ein  $\beta$ 'COP-Signal zeigen, das ungefähr 15 % des GMP-PNP-Signals entspricht (s. Abb. 2). Die geschilderten Unterschiede zum Golgi, zusammen mit dem absoluten Fehlen der Golgi-Marker GM130, p23 und der UDP-Galaktosyltransferase in der Peroxisomenfraktion (s. Abb. 2 und Passreiter et al., 1998), lassen auf eine peroxisomale Spezifität der ARF- und Coatomerrekrutierung schließen. Unterstützt werden diese Ergebnisse, durch die Analyse der subzellulären Organellen isolierter Hepatocyten, bei der die Organellen entsprechend ihrer Schwimmdichte aufgetrennt wurden (s. Abb. 5). Es wurden entweder unbehandelte oder nach SLO-Permeabilisierung mit APF inkubierte Hepatocyten untersucht. Die Lokalisierung von ARF und Coatomer innerhalb dieser Gradienten ergab, daß selbst in unbehandelten Zellen geringe Mengen an ARF und Coatomer in den peroxisomalen Fraktionen 2 und 3 nachweisbar sind. Durch Inkubation der permeabilisierten Zellen mit APF und GMP-PNP konnte das ARF-Signal in diesen Fraktionen weiter verstärkt werden. Diese Rekrutierung von ARF war dabei eindeutig von GTP abhängig.

### 1.3 Der Einfluß von Peroxisomenproliferatoren

Ebenfalls auf eine peroxisomale Spezifität der ARF- und Coatomerbindung an Peroxisomen lassen Untersuchungen schließen, in denen Peroxisomen und Cytosol aus unbehandelten und Clofibrat-behandelten Tieren verwendet wurden. Clofibrat gehört zur Substanzklasse der Fibrate, die bei vielen Spezies eine stark hypolipidämische Wirkung ausüben. Bei Nagern bewirken sie zudem eine Peroxisomenvermehrung, die vorwiegend in der Leber der behandelten Tiere beobachtet wird (Reddy und Chu, 1996). Der Reaktionsweg läuft dabei über die Stimulierung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), einem Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor, der zur Familie der nuklearen Hormonrezeptoren gehört und vorwiegend in der Leber, der Niere und der Darmschleimhaut exprimiert wird (Berger und Moller, 2002). Neben der Stimulation des Lipid- und Glucosemetabolismus werden zusätzlich verstärkt Gene exprimiert, die mit der Proliferation von Peroxisomen in Verbindung stehen und für den Faktor namensgebend waren (zusammengefaßt in: Cherkaoui-Malki et al., 2001; Desvergne und Wahli, 1999). Erst kürzlich konnte für Pex11 $\alpha$ p gezeigt werden, daß seine Expression durch die Interaktion von PPAR $\alpha$  mit einem *Peroxisome Proliferator Response*-Element stimuliert wird (Shimizu et al., 2004). Die cytosolischen Konzentrationen von ARF und Coatomer änderten sich durch die Clofibrat-Behandlung nicht (s. Abb. 3). Dagegen zeigten sowohl ARF als auch Coatomer bei der Rekrutierung an Peroxisomen Abhängigkeiten von der Stimulation. Während die Bindung von ARF dann am stärksten ist, wenn stimulierte Peroxisomen eingesetzt werden, wird Coatomer vermehrt aus stimuliertem Cytosol rekrutiert (s. Abb. 4). Für die Bindung von ARF ist damit die Beschaffenheit der peroxisomalen Membran von Bedeutung. Membranständige Faktoren, die durch Clofibrat stimuliert werden, wirken auf die ARF-Bindung offensichtlich förderlich. Diese können sowohl proteinöser Natur als auch Lipidkomponenten der Membran sein. Versuche, bei denen Peroxisomen vor der Cytosolinkubation mit Protease behandelt wurden, haben die Relevanz der proteinösen Faktoren auf der Peroxisomenoberfläche bereits gezeigt. So reduzierte die Proteasebehandlung die ARF-Bindung und verhinderte die Coatomerbindung fast vollständig (Passreiter et al., 1998).

Ob das peroxisomale Membranprotein Pex11 $\alpha$ p dabei eine Rolle spielt, ist unklar. Pex11 $\alpha$ p erfüllt jedoch zwei Voraussetzungen: (i) seine Expression wird nach Gabe von Clofibrat um den Faktor 10 bis 20 stimuliert (Abe et al., 1998; Schrader et al., 1998), und

(ii) es trägt an seinem extremen C-terminus ein cytosolisch exponiertes Dilysinmotiv mit der Sequenz -KLKAR, das *in vitro* mit Coatomer interagiert (Passreiter et al., 1998). Dilysinmotive sind als sog. *Retrieval*signale von ER-residenten Proteinen beschrieben und interagieren dabei mit Coatomer (Letourneur et al., 1994). Für p23, einem der Haupttransmembranproteine von COPI-Vesikeln, das als Coatomer-Rezeptor in der Golgimembran fungiert, wurde gezeigt, daß die erste Interaktion mit ARF in dessen GDP-Form stattfindet. In der Folge kommt es zum GEF-vermittelten (GEF für *guanine nucleotide exchange factor*) Austausch des GDPs zu GTP, was zur festen Verankerung des ARFs in der Membran führt. Damit sind die beiden membranständigen Interaktionspartner von Coatomer aktiviert und ermöglichen dessen Anbindung, was zum Abschnüren eines COPI-Vesikels führt (Gommel et al., 2001; Nickel et al., 2002). Die Bedeutung von p23 als Coatomerrezeptor wurde zudem durch Nachweis einer direkten Interaktion seines C-Terminus mit der  $\gamma$ -COP Untereinheit des Coatomerkomplexes gezeigt (Harter et al., 1996). Ob bei Peroxisomen Pex11 $\alpha$ p diese Funktion übernimmt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen auf Ebene eines Crosslinks konnte bislang nicht nachgewiesen werden, es wurde jedoch nach Inkubation mit Coatomer eine Veränderung des Migrationsverhaltens von CHAPS-solubilisierten Membrankomplexen im Sucrosegradienten beobachtet. Dabei ko-sedimentiert Pex11 $\alpha$ p mit ARF und Coatomer im Gradienten (s. Abb. 14).

Im Gegensatz zur ARF-Bindung ist die Rekrutierung von Coatomer an Peroxisomen von der Art des eingesetzten Cytosols abhängig. Aus Clofibrat-behandeltem Cytosol wird mehr  $\beta$ 'COP an Peroxisomen gebunden als aus unbehandeltem (s. Abb. 3). Somit muß es im Cytosol Faktoren geben, deren Aktivität durch Clofibrat stimuliert wird und die letztlich eine verstärkte Anbindung von Coatomer an Peroxisomen ermöglichen. Insgesamt verursacht die Behandlung mit dem Peroxisomenproliferator Clofibrat einen synergistischen Effekt. Die Veränderungen der Peroxisomenmembran einerseits, sowie des Cytosols andererseits, bewirken letztendlich gemeinsam die verstärkte Bindung von ARF und Coatomer an die Organelle.

## 2 *ARF1 und ARF6, Regulatoren der Peroxisomenproliferation*

### 2.1 *ARF1, Mediator der peroxisomalen Coatomerbindung*

Im Laufe der Untersuchung der ARF-Subtypen, die an Peroxisomen rekrutiert werden, konnten sowohl ARF1 als auch ARF6 identifiziert werden. Für Säuger sind sechs ARF-Isoformen bekannt, die sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie in drei Klassen einteilen lassen: Klasse I umfaßt die Subtypen ARF1 bis ARF3, Klasse II die von ARF4 und ARF5, während ARF6 die Klasse III bildet (Moss und Vaughan, 1995). Dabei ist ARF6 die Isoform, die sich am stärksten von den übrigen unterscheidet. An Peroxisomen binden demnach ARFs aus zwei unterschiedlichen Klassen. Während ARF1 an Golgi und Endosomen bindet und vesikulären Transport innerhalb und zwischen diesen Kompartimenten vermittelt (Boehm und Bonifacino, 2001; Bonifacino, 2004; Rothman und Wieland, 1996), wurde ARF6·GTP an der Plasmamembran und ARF6·GDP im endosomalen Kompartiment lokalisiert (Peters et al., 1995; Radhakrishna und Donaldson, 1997). Damit wird ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Subtypen ARF1 und ARF6 deutlich: während ARF1 zwischen einer cytosolischen GDP- und einer membran- gebundenen GTP-Form variiert, liegt ARF6 in beiden Formen membrangebunden vor. Im Falle der Peroxisomen war die Rekrutierung von sowohl ARF1 als auch ARF6 von GTP abhängig. In Gegenwart von GDP wurde keine Bindung beobachtet (s. Abb. 13). Darüber hinaus unterscheidet sich das Bindungsverhalten der beiden ARFs jedoch in ihrer Abhängigkeit von ATP und cytosolischen Faktoren. Cytosolische Faktoren, die in der intermediären Poolfraktion (IPF) enthalten sind, und hydrolysierbares ATP beeinflussen die Bindung von ARF1 an Peroxisomen viel deutlicher als diejenige von ARF6. Eingehender werden diese Abhängigkeiten im folgenden Kapitel diskutiert.

Deutliche funktionelle Unterschiede zwischen den beiden ARF-Subtypen fanden sich im Hinblick auf die Coatomerbindung an Peroxisomen. Lediglich ARF1 nicht aber ARF6 ist in der Lage, die Bindung von Coatomer zu vermitteln (s. Abb. 13). Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen am Golgi. Auch an dieser Membran ist die Coatomerbindung durch ARF1 vermittelt (Palmer et al., 1993). Von dem Modell der minimalen Maschinerie des COPI vermittelten Abschnürens eines Vesikels von einer Donormembran (Bremser et al., 1999; Spang et al., 1998) ausgehend kann analog auch für Peroxisomen ein entsprechender Vesikulierungsprozeß diskutiert werden. Daten, die in diese Richtung zeigen ergeben sich

aus Versuchen mit Hefen und Analysen der Heterogenität der Gleichgewichtsdichte von Peroxisomen nach Inkubation mit Cytosol.

## 2.2 In vivo-Relevanz von ARF1 und ARF6 bei der Proliferation

Versuche mit verschiedenen Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* ergaben, daß sowohl ARF1 als auch Coatomer an der Proliferation der Peroxisomen beteiligt sind. Dabei zeigten sich zwei Arten von peroxisomalen Phänotypen. Entweder veränderte sich die sphärische Morphologie der Hefeperoxisomen zu tubulären Strukturen hin, oder die Anzahl der Peroxisomen pro Zelle variierte gegenüber dem Kontrollstamm. Setzte man eine  $\alpha$ COP-*ts*-Mutante bei nicht-permissiver Temperatur Peroxisomen-proliferierenden Bedingungen aus, indem man das glucosehaltige Kulturmedium gegen ein oleathaltiges ersetzte, so entwickelte sich ein Phänotyp mit tubulären Peroxisomen (s. Abb. 19). Die Zahl der Peroxisomen stieg dabei nicht an. Ein ähnlicher Phänotyp wurde in einem System mit Säugerzellen beobachtet. Wird die CHO-Zelllinie IdIF, die in der  $\epsilon$ COP-Untereinheit des Coatomerkomplexes temperatursensitiv ist (Guo et al., 1996; Guo et al., 1994), nicht-permissiven Bedingungen ausgesetzt, so ändert sich der sphärische Phänotyp der Peroxisomen zu tubulären Strukturen hin (Passreiter et al., 1998).  $\epsilon$ COP ist in diesen Zellen durch eine Punktmutation destabilisiert, infolgedessen reduziert sich die Halbwertszeit des Coatomerkomplexes. Funktionell äußert sich dies im Verlust der Vesikulierung der Golgimembran (Duden et al., 1998; Gomez et al., 2000). Zieht man den analogen Schluß für eine peroxisomale Vesikulierung unter Beteiligung von Coatomer, so scheint dieser Hüllproteinkomplex auch für Peroxisomen eine Rolle bei der Proliferation unter Oleatbedingungen in Hefe zu spielen.

Versuche mit ARF-Hefemutanten zeigten Veränderungen hinsichtlich der Zahl von Peroxisomen pro Zelle nach Kultur in Oleatmedium. Dabei bewirkte die *ts*-Mutation im *ScARF1*-Gen das Ausbleiben der Proliferation bei nicht-permissiver Temperatur. Während die Deletion des *ScARF3*-Gens, das dem ARF6 der Säuger homolog ist, den gegenteiligen Effekt zeigte und zu einer starken Vermehrung der Peroxisomen führte (s. Abb. 21). Zur Erklärung dieser Beobachtungen kann man mit zwei verschiedenen Hypothesen arbeiten. In Hypothese 1 ist ARF1 essentiell für die Vermehrung der Peroxisomen, während ARF3 deren Abbau reguliert. Diese Annahme erklärt zwar, warum in Abwesenheit von ARF1 die Proliferation ausbleibt und weshalb die Deletion von *ScARF3* zu einer verstärkten Vermehrung führt, liefert jedoch keine Erklärung für die beobachtete Proliferation bei der

Kombination von funktionslosem ARF1 und fehlendem ARF3 (s. Dreifachmutante *arf1-ts, arf2Δ, arf3Δ*). Außerdem sollte man bei defektem ARF1 und aktivem ARF3 (*arf1-ts, arf2Δ*-Mutante) anstelle einer gleichbleibenden Peroxisomenzahl eine ARF3-bedingte Abnahme erwarten. Deshalb ist in einem zweiten Modell die Existenz mindestens eines zwischengeschalteten Faktors oder Reaktionsweges gefordert, der Oleat-vermittelt die Proliferation der Peroxisomen in Hefe steuert und dessen Aktivität durch ARF1 positiv und ARF3 negativ reguliert wird. Mit dieser Annahme läßt sich auch die Beobachtung der Dreifachmutante erklären: bis zum Wechsel auf nicht-permissive Temperatur ermöglicht ein funktionelles ARF1 eine gewisse Grundaktivität des Faktors, die abgerufen werden kann, sobald der Wechsel auf Oleat stattfindet. Die Deletion von *ScARF3* führt darüber hinaus zu einem Ausbleiben des negativen Einflusses von ARF3 und damit zu einer verstärkten Aktivierung des Faktors, was letztendlich mit verstärkter Proliferation einhergeht.

### 3 Regulation der ARF-Bindung an Peroxisomen

Hinweise auf ARF-Interaktionspartner ergaben sich aus Bindungsstudien, die *in vitro* die Abhängigkeiten der ARF-Rekrutierung an die Peroxisomenmembran untersuchten. Dabei standen ATP und die cytosolische Fraktion IPF im Mittelpunkt der Untersuchungen. Wie die Versuche zeigten, wirkten ATP und IPF voneinander unabhängig auf die Bindung von ARF, wobei deren Einfluß auf ARF1 wesentlich ausgeprägter ist als auf ARF6 (s. Abb. 16).

#### 3.1 Elemente der intermediären Poolfraktion des Cytosols

IPF und ATP reduzieren beide in synergistischer Weise die Menge an membrangebundenem ARF1. Für die unabhängige Regulation beider Komponenten spricht die Beobachtung, daß auch in Abwesenheit von ATP die Zugabe von IPF zu einer Abnahme an ARF1-Bindung führt. Umgekehrt führt auch in Abwesenheit von IPF die Präsenz von ATP zu weniger ARF1 an der peroxisomalen Membran. In Abwesenheit von ATP ist jedoch die IPF-Wirkung etwa dreifach stärker (s. Abb. 18). Dabei stellt sich die Frage welche Aktivität(en) aus der IPF, die mit einem Anteil von 80 Prozent die Mehrzahl der cytosolischen Proteine enthält, für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten. Gegenwärtig kann darüber nur spekuliert werden. Aus der Literatur sind zahlreiche Regulatoren der ARF-Bindung bekannt. Unter ihnen sind direkte Interaktionspartner ebenso

zu finden wie solche mit indirekter Wirkung. Zu den ersteren zählen u.a. Proteine, die durch direkte Interaktion den Status des gebundenen Guaninnukleotids beeinflussen. Dazu zählen sog. GTP-Austauschfaktoren (GEFs für *guanine-nucleotide exchange factor*), die den GDP-GTP-Austausch fördern, ebenso wie GTPase-aktivierende Proteine (GAP), die die intrinsische GTPase-Aktivität des ARF-Moleküls stimulieren, woraus ARF1·GDP resultiert, das wiederum von der Membran abdissoziiert (zusammengefaßt in: Donaldson und Jackson, 2000; Moss und Vaughan, 1998). Zusammen mit der Tatsache, daß in Säugern mittlerweile 16 verschiedene ARF-GAPs identifiziert sind, die zudem an unterschiedlichen Membranen aktiv sind (zusammengefaßt in: Donaldson und Jackson, 2000; Nie et al., 2003), erscheint ein ARF-GAP als potenter Anwärter für die negativ regulierende IPF-Aktivität an Peroxisomen naheliegend. Dagegen spricht allerdings, daß alle Experimente in Gegenwart von GMP-PNP durchgeführt wurden, einem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogon, das sich einer ARF-GAP-Wirkung folglich entzieht. Demnach scheiden bei dieser Betrachtung auch alle weiteren Faktoren aus, die darauf abzielen, ein einmal an die Membran gebundenes ARF1 wieder zu entfernen.

Als weitere Kandidaten der IPF-Aktivität kommen Faktoren in Frage, die indirekt die ARF1-Bindung erniedrigen, indem sie a priori ARF1-Bindungsstellen in der Membran reduzieren. Als membranständige ARF1-„Rezeptoren“ stehen sowohl Phospholipid- als auch proteinöse Komponenten im Blickpunkt. Phosphatidsäure (PA für *phosphatidic acid*) und Phosphoinositide (PIs) werden in diesem Zusammenhang als stimulierende Phospholipide für die ARF1-Bindung diskutiert (Roth, 1999a). Die Membrankonzentration von PA wird durch Enzyme wie PA-Hydrolase negativ bzw. Phospholipase D (PLD) positiv reguliert. Damit würde eine Stimulation der PA-Hydrolaseaktivität ebenso wie eine Inhibierung der PLD-Aktivität zu einer Erniedrigung der PA-Konzentration und damit einer reduzierten ARF1-Bindung führen. Interessant ist diese Regulation auch deshalb, da sie unabhängig von ATP abläuft und zudem Faktoren betrifft, die löslich im Cytosol vorkommen und aufgrund ihrer Größe in der IPF enthalten sein können. Die Membrankonzentration der PIs wiederum wird durch PI-spezifische Kinasen erhöht bzw. PI-spezifische Phosphatasen erniedrigt. Beide können sowohl membrangebunden als auch cytosolisch vorliegen. Jedoch nur die Phosphataseaktivität ist ATP-unabhängig und kommt daher für den IPF-Effekt in Frage. Für das Modell als positiv zu bewerten ist jedoch, daß ihre Stimulation zu einem erniedrigten PI-Spiegel in der Membran führt und damit zu reduzierter ARF1-Rekrutierung. Gestützt wird diese Hypothese durch Experimente in unserem Labor, die auf der hier vorgestellten Arbeit basieren. Dabei hat die Inkubation von

Peroxisomen mit radioaktiv markiertem ATP zur Identifizierung von neugebildeten PI-Spezies geführt und gezeigt, daß in Gegenwart von Cytosol starke PI-spezifische Phosphataseaktivitäten vorhanden sind (Jeynov et al., 2004).

### 3.2 ATP-abhängige Regulation

Auch der ATP-Effekt, der analog zum IPF-Effekt eine reduzierende Wirkung auf die ARF-Rekrutierung hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht befriedigend erklärt werden. Dafür kommen zunächst alle ATP-abhängigen Prozesse, die an der Peroxisomenmembran lokalisiert sind, in Frage. An der Membran lokalisiert wurden bisher zwei Klassen von ATPasen: einerseits peroxisomale ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter wie PMP70, ALDP (Adrenoleukodystrophie-Protein) oder ALDRP (*ALD-related Protein*), andererseits AAA-Proteine (AAA für ATPasen assoziiert mit verschiedenen zellulären Aktivitäten) wie Pex1p und Pex6p. Während die peroxisomalen ABC-Transporter wahrscheinlich beim Transport langkettiger und sehr langkettiger Fettsäuren-Acyl-CoA-Derivate über die Membran beteiligt sind (Smith et al., 1999), wird für Pex1p und Pex6p eine Funktion innerhalb der späten Schritte des Imports von peroxisomalen Matrixproteinen diskutiert (Purdue und Lazarow, 2001; Weller et al., 2003). In beiden Fällen handelt es sich um Reaktionen, die im peroxisomalen Stoffwechsel oder beim Proteinimport in die peroxisomale Matrix eine wichtige Rolle spielen. Da die peroxisomale ARF-Bindung in erster Linie von GTP abhängt und durch ATP lediglich moduliert wird, für keinen der oben beschriebenen Faktoren jedoch eine GTP-Abhängigkeit bekannt ist, gilt ein Bezug zur hier diskutierten Regulation der ARF-Bindung als unwahrscheinlich.

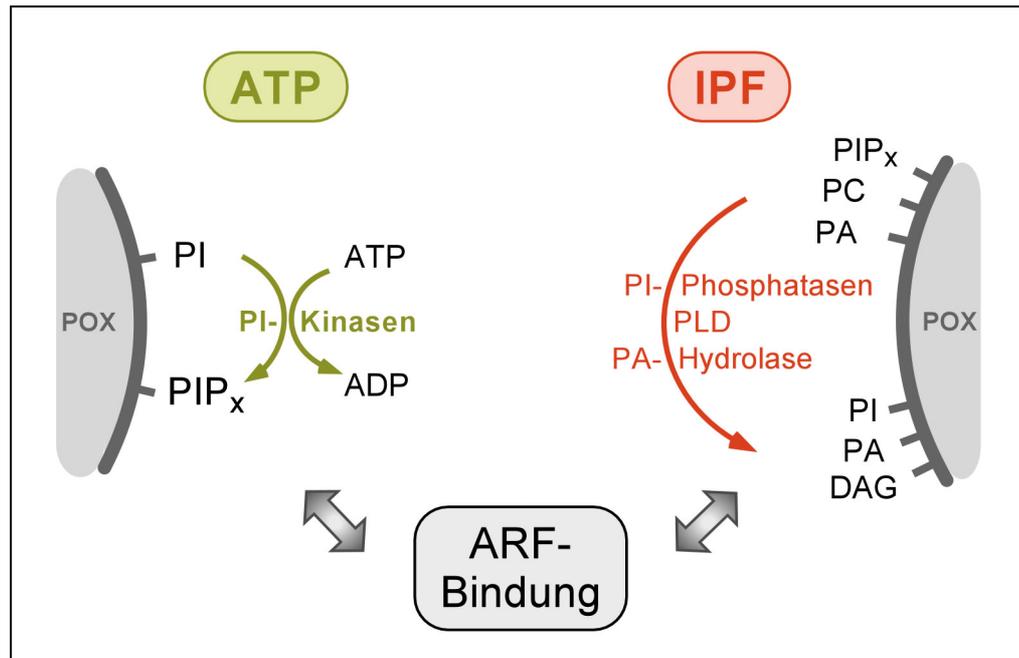
Eine denkbare Erklärung für den ATP-Effekt wäre die Aktivität von Kinasen, die entweder Proteine oder bestimmte Klassen von Membranlipiden phosphorylieren und damit die ARF1-Bindung regulieren. Erst kürzlich wurde von Roth und Mitarbeitern ein solcher Mechanismus zur Regulierung der ARF1-Konzentration an der Golgi-Membran beschrieben (Yu und Roth, 2002). Dabei wird ARF-GAP1 durch die cytosolisch lokalisierte Caseinkinase I $\delta$  phosphoryliert, was eine erhöhte Konzentration von ARF-GAP1 an der Golgi-Membran zur Folge hat. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Hydrolyse von ARF1·GTP zu ARF1·GDP und damit zum Abdissoziieren des ARF1 von der Membran. Ein adäquater, ATP-abhängiger Mechanismus scheint bei Peroxisomen aus zweierlei Gründen nicht von Bedeutung zu sein. Zum einen konnte in Gegenwart von Caseinkinase I $\delta$  keine Anbindung von phosphoryliertem ARF-GAP1 an die peroxisomale Membran beobachtet

werden, zum anderen tritt der ATP-Effekt auch in Gegenwart nicht-hydrolysierbarer GTP-Analoga auf, die eine Hydrolyseaktivität von GAP grundsätzlich nicht zulassen.

Welche ATP-abhängigen Prozesse kommen für die Regulation der ARF-Bindung darüber hinaus in Frage? Eine Parallele zum ATP-Effekt an ARF1 existiert auch an einer anderen kleinen GTPase, die an Peroxisomen lokalisiert wurde. Die Rekrutierung von RhoA an Peroxisomen ist in Gegenwart von ATP ebenfalls deutlich geringer als in dessen Abwesenheit (Satyagraha, 2003). Ob es sich dabei um einen Peroxisomen-spezifischen Regulationsmechanismus handelt, ist noch nicht geklärt. Immerhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß der ATP-abhängige Effekt an der peroxisomalen Membran lokalisiert, Carbonat-sensitiv ist und aus der IPF restauriert werden kann (s. Abb. 16). Möglicherweise spielen bei dieser Regulation PI-spezifische Kinasen eine Rolle, die einerseits bereits mit der peroxisomalen Membran assoziiert vorliegen können, andererseits aber auch aus dem cytosolischen Pool rekrutiert werden können. An Golgi-Membranen ist bekannt, daß ARF1 und ARF-GEFs an PI-4,5-P<sub>2</sub> binden und auch die Aktivität von PLD durch PIP<sub>2</sub> stimuliert wird, was wiederum zur Bildung von PA führt. Daraus ergibt sich ein komplexes Gefüge von Regulationsmechanismen für die ARF1-Bindung, die sowohl in einem positiven als auch einem negativen Regelkreis enden können (Antonny et al., 1997 und zusammengefaßt in: Roth, 1999a). Aufbauend auf den in der vorliegenden Arbeit diskutierten Experimenten konnte für Peroxisomen kürzlich gezeigt werden, daß PI-4-Kinase  $\beta$  GTP-abhängig an Peroxisomen rekrutiert. Des Weiteren wurde gezeigt, daß ARF1 nicht aber ARF6 an dieser Rekrutierung beteiligt ist und daß diese zu einer enormen Steigerung der Synthese von sowohl PI-4-P als auch PI-4,5-P<sub>2</sub> führt (Jeynov et al., 2004). Erste Hinweise dafür, daß auch an Peroxisomen die für membrandynamische Prozesse so wichtigen PIs eine nennenswerte Rolle spielen, liegen damit vor. In welcher Art die Bindung von ARF1 und die Bildung von PIs sich jedoch gegenseitig bedingen, wird noch zu klären sein.

In jedem Fall scheinen die Faktoren der IPF ebenso wie die ATP-abhängigen Mechanismen unter physiologischen Bedingungen (bei denen sowohl die cytosolischen Elemente als auch ATP zur Verfügung stehen) dafür zu sorgen, daß nur eine geringe, aber spezifische Menge von ARF1 an Peroxisomen bindet. Zieht man als Gradmesser für die Funktionalität des gebundenen ARF1 die nachgeschaltete Coatmerbindung in Betracht, dann ist auffällig, daß diese unter ATP-Bedingungen zwar auch leicht reduziert ist, durch IPF-Faktoren jedoch deutlich verstärkt wird (s. Abb. 18). Letztlich bedingt also eine geringe

Menge an rekrutiertem ARF eine erhöhte Menge an Coatomer. Darüber hinaus machen diese Betrachtungen plausibel, weshalb es sich als ausgesprochen schwierig erwies, ARF1 unter *in vivo*-Bedingungen an der peroxisomalen Membran z.B. mittels Immunfluoreszenz direkt nachzuweisen.



**Abb. 28: ARF-Bindung im Zusammenspiel mit ATP- und IPF-abhängigen Prozessen an der Peroxisomenmembran.** In Gegenwart von ATP können PI-spezifische Kinasen Phosphoinositide (PI) zu mono- oder biphosphorylierten PIs (PIP<sub>x</sub>) umsetzen. In Gegenwart von IPF laufen ATP-unabhängige Prozesse ab, die die Aktivität von PI-Phosphatasen (PIP<sub>x</sub> → PI), Phospholipase D (PLD: PC → PA) und PA-Hydrolasen (PA → DAG) beeinhaltend können. Es bleibt zu beachten, daß die geschilderten Prozesse, die ARF-Bindung nicht nur unidirektional bedingen, sondern umgekehrt ARF auch die Aktivität von z.B. PI-Kinasen und PLD beeinflusst. [DAG - Diacylglycerin, PA - Phosphatidsäure, PC - Phosphocholin, Pox - Peroxisom]

## 4 Modelle der Vesikulierung peroxisomaler Membranen

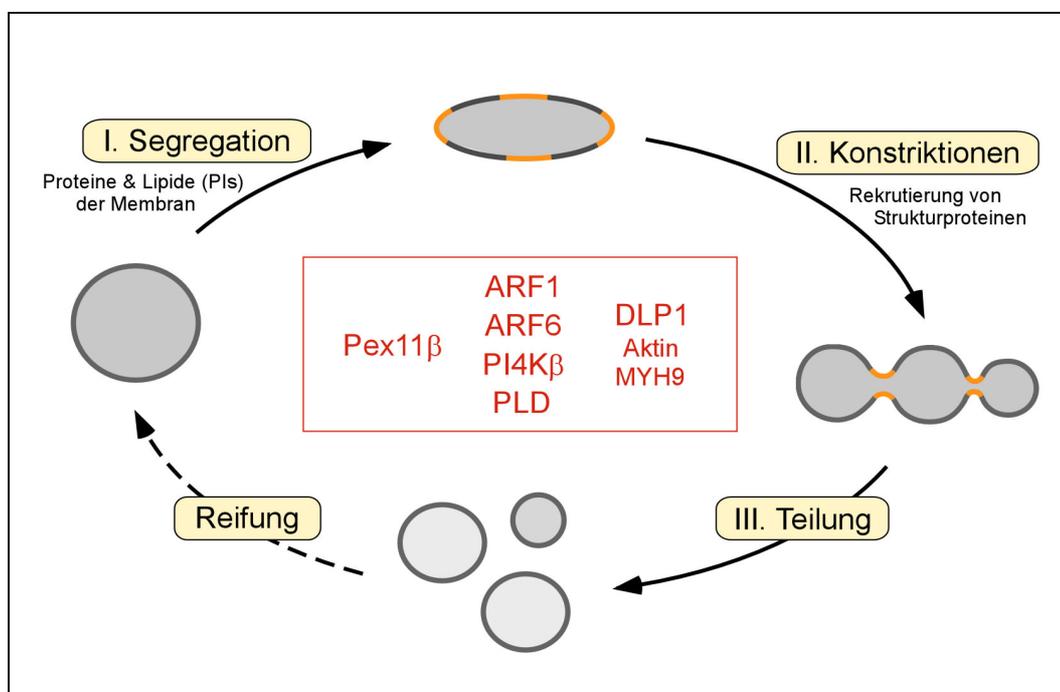
Wie bereits in der Einleitung dargelegt gibt es verschiedene Gründe, die für ein Modell der autonomen Replikation von Peroxisomen sprechen. Betrachtet man die Vermehrung der Organellen, so kommen zwei Szenarien in Frage. Einerseits ein konstitutiv ablaufender Prozeß, der im normalen *turnover* der Zelle von Bedeutung ist und als Gegengewicht zum Abbau eine konstante Zahl von Organellen garantiert. Andererseits läßt sich die Vermehrung der Peroxisomen durch externe Stimuli induzieren (z.B. durch xenobiotische Substanzen wie Fibrate) (Reddy und Krishnakantha, 1975).

### 4.1 Konstitutive Vesikulierung

Wenn neue Peroxisomen durch Teilung aus bestehenden hervorgehen, stellt sich die Frage, von welchen Faktoren dieser Prozeß abhängt. Unter *in vivo*-Bedingungen wurde für die Hefe *S. cerevisiae* gezeigt, daß sich Peroxisomen einer *PEX11*-Deletionsmutante unter Oleatbedingungen nicht vermehren und darüber hinaus bei Zellteilungen keine Peroxisomen an die Tochterzellen weitergeben (Erdmann und Blobel, 1995). Andererseits führt die Überexpression von Pex11p zu einer erhöhten Anzahl von Peroxisomen (Marshall et al., 1995). Pex11p scheint bei der Vermehrung von Peroxisomen in *S. cerevisiae* also eine entscheidende Rolle zu spielen. In Säugern wurden mittlerweile mit Pex11 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  drei homologe Proteine identifiziert, von denen nur Pex11 $\alpha$ p und Pex11 $\beta$ p teilweise funktionell charakterisiert sind (Li et al., 2002; Passreiter et al., 1998; Schrader et al., 1998; Tanaka et al., 2003). Auch in Säugierzellen führt, in Analogie zur Hefe, die Überexpression von entweder Pex11 $\alpha$ p oder Pex11 $\beta$ p zur Proliferation von Peroxisomen (Passreiter et al., 1998; Schrader et al., 1998). Interessant ist allerdings, daß die Modifizierung von Pex11 $\beta$ p z.B. durch ein myc-Epitop zu einer Veränderung des peroxisomalen Phänotyps und einer verminderten Teilung führt (s. Abb. 23). Wie die Immunfluoreszenz zeigt, führt die Expression von Pex11 $\beta$ p-Nmyc einerseits zur Ausbildung von Tubuli und andererseits zu einer Umstrukturierung der Membran in Form einer Segregation und lokalen Konzentrierung von peroxisomalen Membranproteinen. Interpretieren lassen sich diese Beobachtungen dahingehend, daß die Überexpression von *wt* Pex11 $\beta$ p die Proliferation stimuliert und die durch das myc-Epitop hervorgerufene Modifikation eine Teilung verhindert. Ein weiterer *in vivo*-Befund, bei dem ein atypischer Phänotyp von Peroxisomen

beobachtet wurde, ergab sich bei der Analyse von Leberschnitten der Ratte. Die Tiere waren zuvor gleichzeitig mit den beiden Peroxisomenproliferatoren Clofibrat und Thyroxin behandelt worden, beides Substanzen, die das Expressionsniveau der Pex11-Proteine beeinflussen (s. Abb. 22). Die Verabreichung einer der beiden Substanzen alleine führt im Wesentlichen zur Vermehrung von einzelnen sphärischen Partikeln. Die Kombination beider Proliferatoren jedoch führt zu einer vermehrten Ausbildung von peroxisomalen Perlenschnüren, bei denen sowohl kleine (150 - 200 nm) als auch relativ große Einheiten (> 500 nm) durch Konstriktionen miteinander verbunden sind. Das vermehrte Auftreten dieser Perlenschnüre erweckt den Anschein, als sei die Vesikulierung der Membran im letzten Schritt, dem Abschnüren, inhibiert. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, daß das Dynamin-ähnliche Protein DLP1 an Peroxisomen bindet, von besonderem Interesse (Koch et al., 2003; Li und Gould, 2003). Dynamine sind GTPasen und bilden eine Klasse von mechanochemisch wirksamen Proteinen, die in eine Reihe von Membranvesikulierungen involviert sind (zusammengefaßt in: McNiven et al., 2000). Während des Abschnürens sind sie an der Unterbrechung der Membrankontinuität zwischen gebildetem Vesikel und Donormembran beteiligt und führen damit zur Vesikelfreisetzung. Für Peroxisomen konnte gezeigt werden, daß ein Fehlen der DLP1-Funktion die Ausbildung von Tubuli fördert und die Teilung der Organellen verhindert (Koch et al., 2003; Li und Gould, 2003). Damit wird über DLP1 die Beteiligung des Cytoskeletts an der peroxisomalen Vesikulierung wahrscheinlich. Neuere Daten liefern Hinweise für ein Konzept, nach dem die Mitglieder der Dynamin-Familie während der Vesikelbildung als kontraktile Gerüstproteine an der Schnittstelle zwischen biologischen Membranen und filamentösem Aktin tätig sind (Orth und McNiven, 2003). Für die Bildung endocytotischer Vesikel der apikalen Membran wurden dabei die Proteine N-WASP (neuronales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein), der Arp2/3-Komplex (Arp für: *actin-related protein 2/3*) und Syndapin als Vermittler einer Dynamin-Aktin-Beziehung beschrieben (Da Costa et al., 2003). Für Peroxisomen liefern Zellen, die Modifikationen von Pex11 $\beta$  überexprimieren, Hinweise auf eine Beteiligung des Cytoskeletts an einer peroxisomalen Proliferation (Kreiselmeier, 2002). Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurde dabei gezeigt, daß Peroxisomen in enger Nachbarschaft zu mikrotubulären und filamentösen Strukturen liegen. Versuche, die darauf abzielten, *in vitro* eine Vesikulierung von Peroxisomen zu verfolgen, zeigten, daß nach Inkubation von Peroxisomen mit Cytosol und ATP eine niederdichte Population von Peroxisomen generiert werden kann, in der sich mit dem nicht-muskulären

Myosin MYH9 ein weiteres Aktin-bindendes Protein anreichert (s. Abb. 24). Inwieweit MYH9 aktiv an der Generierung der niederdichten peroxisomalen Population beteiligt ist, muß durch weiterführende Experimente geklärt werden.



**Abb. 29: Modell zur Vesikulierung der peroxisomalen Membran.** Der mehrstufige Prozeß setzt sich aus drei Teilschritten zusammen: (I) Segregation von Membranproteinen und -lipiden, (II) weitere Membranzustukturierungen bis hin zur Ausbildung von Konstriktionen und (III) Teilung der Peroxisomen an den präformierten Stellen. Proteine, die zur Vermittlung der einzelnen Schritte diskutiert wurden, sind zentral aufgeführt. Pex11 $\beta$  spielt sicher eine Rolle bei den frühen Ereignissen der Segregation, teilweise unterstützt von ARF1, ARF6, PI-4-Kinase  $\beta$  (PI4K $\beta$ ) und Phospholipase D (PLD), denen als membranmodifizierenden Enzymen eine Funktion bei der Etablierung der Konstriktionen zugeordnet werden kann. Die Abschnürung erfolgt schließlich unter Beteiligung von DLP1, möglicherweise im Zusammenspiel mit weiteren Cytoskelettelementen wie Aktin und Myosin MYH9.

Zusammenfassend läßt sich aus den oben diskutierten Daten jedoch ein Modell für die konstitutive peroxisomale Vesikulierung ableiten, das in Abb. 29 zusammengefaßt ist. Demnach erfolgt die Teilung als mehrstufiger Prozeß, der sich in folgende Schritte gliedert:

- An wachsenden, teilungs-disponierten Peroxisomen findet zunächst eine Umstrukturierung der Membran in Form der Segregation von Membranproteinen statt. Dies könnte mit einer Neuordnung von bestimmten Membranlipiden, z.B. PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub>, einhergehen.
- Nachfolgend werden für die Vesikulierung wichtige Proteine an dabei gebildete, spezialisierte Membranabschnitte rekrutiert, was zur Ausbildung von

Konstriktionen führt. (iii) Im letzten Schritt kommt es zur Abschnürung an den Konstriktionen. Neugebildete Peroxisomen können sowohl vor als auch nach erfolgter Abschnürung durch Import von Membran- und Matrixkomponenten wachsen.

## 4.2 Coatomer-abhängige Vesikulierung

In dem vorgestellten Modell kommt Pex11 $\beta$ p eine zentrale Rolle zu, was experimentell dadurch untermauert wird, daß dieses Protein in allen untersuchten Geweben konstitutiv exprimiert wird und seine Überexpression zu einer starken Peroxisomenproliferation führt (Li und Gould, 2002; Schrader et al., 1998). Da Pex11 $\beta$ p im Gegensatz zu Pex11 $\alpha$ p kein funktionelles Dilysinmotiv besitzt - das C-terminale Pex11 $\beta$ -Peptid ist nicht zur Interaktion mit Coatomer befähigt (Kreiselmeier, 2002; Maier et al., 2000) - ist eine Beteiligung von Coatomer am vorgestellten Prozeß eher unwahrscheinlich. Kommt der ARF1-vermittelten Coatomerbindung dennoch eine funktionelle Rolle bei der Vesikulierung der peroxisomalen Membran zu? Hinweise dafür bieten Experimente, bei denen die Bildung von niederdichten Peroxisomen nach Inkubation der Organellen mit ARF- und Coatomer-haltigen Cytosolfractionen in Gegenwart von GTP-Analoga biochemisch nachgewiesen wurden (s. Abb. 27). Natürlich bleibt die Frage zu klären, welche Bedeutung der ARF1/Coatomer-vermittelten Vesikulierung an Peroxisomen zukommt. Im Hinblick auf die Teilung und Vermehrung von Peroxisomen scheint der Prozeß, wie oben bereits diskutiert, eine eher nebengeordnete Rolle zu spielen. Im Zuge des Stoffaustausches und -transportes von und zu anderen zellulären Kompartimenten (v.a. der Transport von Phospholipiden) könnte diese Art der Vesikulierung von zentraler Bedeutung sein. Aufgrund der zu transportierenden Menge an Material, besonders unter Proliferationsbedingungen, scheint ein einzig über Lipidaustauschproteine vermittelter Transport in seiner Kapazität unzureichend. Ein gerichteter vesikulärer Transport z.B. vom ER zum Peroxisom wäre daher durchaus denkbar, impliziert jedoch in Analogie zum ER-Golgi-Transport einen Rücktransport fehlsortierter ER-Proteine ins ER. Eben diese Funktion könnte der COPI-vermittelten Vesikulierung der Peroxisomenmembran zufallen.

### 4.3 Abschließendes Modell

Wie bereits ausführlich diskutiert, ist ARF1 für die Coatomerbindung an Peroxisomen essentiell (Kapitel 2.1). Die ARF-Bindung selbst ist hochreguliert und scheint eine wichtige Rolle bei der Bildung peroxisomaler PIs einzunehmen (Kapitel 3). Im Hinblick auf diese Eigenschaft ist es sehr wohl denkbar, daß sowohl ARF1 als auch ARF6 eine entscheidende Rolle bei der Umstrukturierung der peroxisomalen Membran im oben vorgestellten Modell der konstitutiven Vesikulierung zukommt (Kapitel 4.1). In Abb. 30 sind die ARF- und letztlich PI-abhängigen Prozesse an der peroxisomalen Membran noch einmal zusammengestellt. ARF kommt dabei eine zentrale Funktion bei der Regulation membrandynamischer Prozesse zu. Dabei unterliegt die ARF-Bindung per se einer Regulation durch sowohl cytosolische Faktoren, die an die Membran rekrutiert werden, als auch ATP-abhängigen Faktoren. Zu den möglichen Regulatoren der ARF-Bindung zählen ARF-GEFs und ARF-GAPs im Zusammenspiel mit Phospholipid-modifizierenden Enzymen wie PI-spezifischen Kinasen und Phosphatasen, PLD und PA-Hydrolase. Auf der Seite der ARF-Effektoren sind bisher Coatomer und PI-4-Kinase  $\beta$  für Peroxisomen nachgewiesen. Damit kommt ARF sowohl bei der Coatomer-vermittelten Vesikulierung von Peroxisomen als auch bei Coatomer-unabhängigen PI-vermittelten Prozessen die Rolle eines zentralen Bausteins zu.

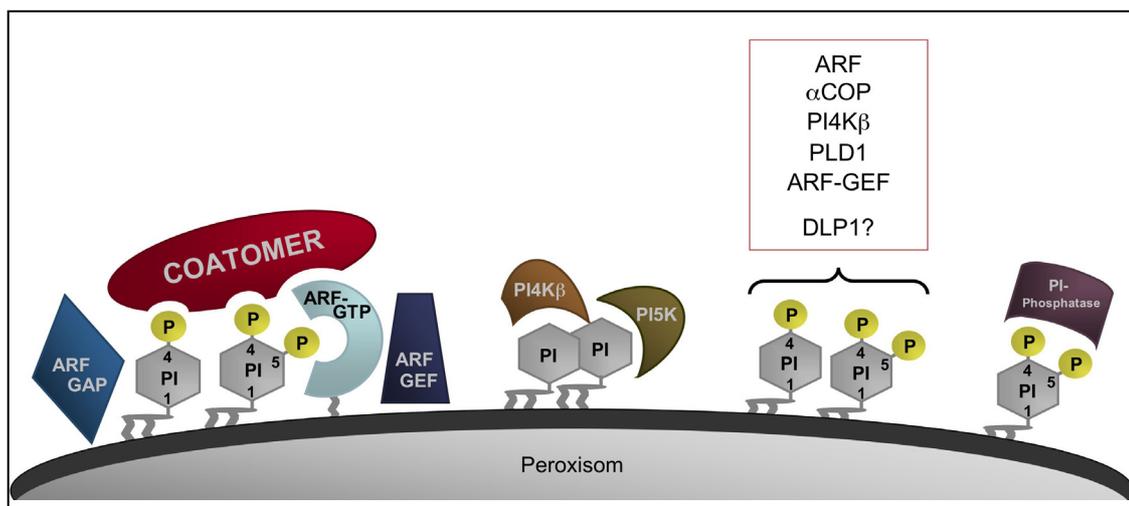


Abb. 30: ARF- und PI-abhängige Interaktionen an der Peroxisomenmembran.

---

## **IV MATERIAL UND METHODEN**

### **1 Materialien**

#### **1.1 Chemikalien und Verbrauchsartikel**

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien und Gebrauchsgüter wurden von folgenden Firmen bezogen: J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

#### **1.2 Spezielle Chemikalien und Artikel**

Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30), Carl Roth, Karlsruhe

BioMax MR Film, Kodak, Stuttgart

BSA/Fraktion V, Biomol, Hamburg

BSA/Fraktion V, *fatty acid free*, Roche Diagnostics, Mannheim

Clofibrat (2-(4-Chlorphenoxy)-2-methyl-propionsäure-ethylester), Fluka, Buchs, CH

p-Coumarinsäure (trans-4-Hydroxycinnaminsäure), Sigma, Deisenhofen

Dextran T10, Amersham Pharmacia, Freiburg

DTT (Dithiothreitol), Biomol, Hamburg

Fuji Super RX, Fuji Photo Film, Düsseldorf

Fluorotrans (PVDF-Blotmembran), Pall, Wiesbaden

Freund'sches Adjuvans, Difco, Detroit, MI, USA

Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie (25%), Serva, Heidelberg

Heparin (Liquenin N 10.000) Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

KLH (*Keyhole-limpet hemocyanin*) lyophilisiert, Sigma, Deisenhofen

Kreatinphosphat, Calbiochem, Bad Soden

Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion), Sigma, Deisenhofen

Myristinsäure (Na-Salz), Sigma, Deisenhofen

Nembutal (Pentobarbital), Sanofi Ceva, Hannover

NZCYM Broth, Sigma, Deisenhofen

Nycodenz, Gibco LifeTechnologies, Eggenstein

TEMED, Bio-Rad, München

Vivaspin, Vivascience, Hannover

- *Nukleotide*

AMP-PNP (Adenosin 5'-[ $\beta,\gamma$ -imido]triphosphat), # A2647, Sigma-Aldrich, München

ATP (Adenosintriphosphat), Roche Diagnostics, Mannheim

GDP $\beta$ S (Guanosin 5'-[ $\beta$ -thio]diphosphat), # G7637, Sigma-Aldrich, München

GMP-PNP (Guanosin 5'-[ $\beta,\gamma$ -imido]triphosphat), # G0635, Sigma-Adrich, München

- *Zellkulturmedien und -puffer*

Die Standardmedien und -lösungen für die Kultur von Hepatocyten und CHO-Zellen wurden von Biochrom KG, Berlin bezogen. Darüberhinaus kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

Collagen R, Serva, Heidelberg

Dexamethason, Sigma-Aldrich, München

DMEM, Methionin-/Cysteinfrei (#D3916), Sigma, Deisenhofen

G418-Sulfat, Sigma, Deisenhofen

Insulin (Insuman Rapid), Hoechst Marion Roussel, Frankfurt/Main

Zeocin, CAYLA, Toulouse, Frankreich

### 1.3 Antikörper

- *Primärantikörper*

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Verdünnungen beziehen sich auf ihre Verwendung im Westernblot. Alternativ ist die Verdünnung für Immunfluoreszenz (IF) angegeben.

Die Antikörper 2048 (Helms et al., 1993; Palmer et al., 1993) und 891 (Harter et al., 1996) wurden freundlicherweise von Dr. Bernd Helms (Universität Utrecht, Niederlande) bzw. Dr. Felix Wieland (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Antikörper gegen ARF und peroxisomale Proteine wurden in unserer Gruppe hergestellt.

Name	gegen	Antigen	Verdünnung	Bemerkung
ARF1C1	mmARF1	C-terminales Peptid	1 : 3.000	s. 2.3
ARF6C1	mmARF6	C-terminales Peptid	1 : 2.000	s. 2.3
2048	hsARF1	rekombinantes Protein	1 : 2.000	erkennt neben ARF1 auch andere Isoformen
891	bt $\beta'$ COP	C-terminales Peptid	1 : 1.000	Kreuzreaktion mit ca 10 kDa größerem Protein
pep3	rnPmp69p	C-terminales Peptid	1 : 5.000 1 : 300 (IF)	
Pex11-2 N1	hsPex11 $\beta$ p	N-terminales Peptid	1 : 1.000	
PMP22-88	rnPmp22p	Gesamtprotein aus Ratte	1 : 2.000	
PMP26ges	rnPex11 $\alpha$ p	Gesamtprotein aus Ratte	1 : 2.000 1 : 300 (IF)	
PMP36	rnPmp36p	Gesamtprotein aus Ratte	1 : 2.000	
$\beta$ -Actin (AC-74)	$\beta$ -Actin	N-terminales Peptid	1 : 5.000	aus Maus, monoklonal Sigma, Taufkirchen
GM130 (35)	rnGM130	C-terminales Peptid	1 : 250	aus Maus, monoklonal BDBiosciences, Heidelberg
HA.11 (16B12)	HA-Epitop	Peptid: CYPYDVPDYASL	1 : 1.000	aus Maus, monoklonal BabCO, Berkeley, USA
myc (9E10)	myc-Epitop	Peptid: EQKLISEEDL	1 : 2 (IF)	aus Maus, monoklonal Hybridoma-Überstand
$\beta$ -Tubulin (TUB2.1)	$\beta$ -Tubulin	Tubulin aus Rattenhirn	1 : 2.000	aus Maus, monoklonal Sigma, Taufkirchen

#### Tab 1: Verwendete Primärantikörper

Soweit nicht anders vermerkt, stammen die Antikörper aus Kaninchen und stellen polyklonales Serum dar. Bei monoklonalen Antikörpern ist die Bezeichnung des Klons hinter dem Namen in Klammern angegeben. Die Abkürzungen *bt*, *mm*, *hs* und *rn* stehen dabei für die jeweils verschiedenen Spezies Rind (*bos taurus*), Maus (*mus musculus*), Mensch (*homo sapiens*) und Ratte (*rattus norvegicus*), aus denen die Proteinsequenz isoliert wurde.

#### • Sekundärantikörper:

Als Sekundärantikörper für Western Blot wurden Meerrettichperoxidase-konjugierte Antikörper der Firma Dianova (Hamburg) in der Verdünnung 1:10.000 verwendet:

- Peroxidase-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Kaninchen IgG-Gesamtantikörper (H + L)
- Peroxidase-konjugierter AffiniPure Ziege anti-Maus IgG-Gesamtantikörper (H + L)

Als Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz wurden Fluorescein (FITC)- bzw. Rhodamin (TRITC)-konjugierte anti-Maus (oder anti-Kaninchen) IgG-Gesamtantikörper

(H+L) aus Ziege verwendet (Dianova, Hamburg und Sigma, Taufkirchen). Die jeweilige Verdünnung lag zwischen 1:50 und 1:100.

#### 1.4 Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE

- **Laborstandard:**

Phosphorylase b (97 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsininhibitor (21 kDa), Lysozym (14 kDa)

- **vorgefärbter Standard:**

Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs GmbH, Frankfurt)

Myosin (212 kDa), Maltose-bindendes Protein-β-Galactosidase-Fusionsprotein (158 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), BSA (67 kDa), Glutamatdehydrogenase (55,6 kDa), Maltose-bindendes Protein 2 (42,7 kDa), Laktatdehydrogenase (36,5 kDa), Triosephosphatisomerase (26,9 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa), Lysozym (14,3 kDa), Aprotinin (6,5 kDa)

- **Radioaktiv-Standard:**

<sup>14</sup>C-methylierte Proteine-Molekulargewichtsstandard (Amersham Biosciences, Freiburg)

Myosin (220 kDa), Phosphorylase b (97 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Lysozym (14,3 kDa)

#### 1.5 Enzyme und Inhibitoren

- **Enzyme:**

Asp-N, Roche Diagnostics, Mannheim

Collagenase CLS II, Biochrom, Berlin

Kreatinkinase, Roche Diagnostics, Mannheim

Trypsin, Roche Diagnostics, Mannheim

- **Inhibitoren:**

Antipain, Bachem, Heidelberg

Complete®, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Roche Diagnostics, Mannheim

Leupeptin, Bachem, Heidelberg

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), Serva, Heidelberg

## 2 Methoden

### 2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

#### 2.1.1 Puffer

Die nachfolgend aufgeführten Puffer fanden in unterschiedlichen Methoden Verwendung und sind deshalb hier zusammengetragen.

Glycylglycinpuffer	10 mM Glycylglycin (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Ethanol
Homopuffer	250 mM Saccharose in Glycylglycinpuffer
Homopuffer+	Homopuffer ergänzt mit 1 mM DTT, 100 $\mu$ M PMSF, 10 $\mu$ M Antipain, 1 $\mu$ M Leupeptin
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5.4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Puffer H	50 mM Hepes/KOH (pH 7.55), 165 mM K-Acetat, 2 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT
Puffer H+	Puffer H ergänzt mit 1 $\mu$ M Leupeptin, 10 $\mu$ M Antipain, 100 $\mu$ M PMSF

#### 2.1.2 ATP-regenerierendes System (ARS)

In zahlreichen Inkubationen kam ein ATP-regenerierendes System (ARS) zum Einsatz, das sich aus den drei Komponenten ATP, Kreatinkinase und Kreatinphosphat zusammensetzte und jeweils frisch angesetzt wurde. Während der Inkubation betrug die jeweilige Endkonzentration: 2 mM ATP, 20 mM Kreatinkinase und 250  $\mu$ g/ml Kreatinphosphat.

ATP-regenerierendes System	13-fache Stammlösung als 1:1:1 Mischung aus: 80 mM ATP (pH-Wert mit 1 N NaOH korrigieren), 800 mM Kreatinphosphat, 10 mg/ml Kreatinkinase jeweils in 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5)
----------------------------	--

*Bemerkung:* Bei Verwendung weiterer Nukleotide (z.B. GTP oder Derivate) wurden diese ebenfalls in 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5) gelöst.

## 2.2 Haltung und Behandlung der Versuchstiere

- *Ratten:*

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten (Stamm Wistar, 150 - 170 g bei Versuchsbeginn), die unter Standardbedingungen gehalten wurden (22-24°C Raumtemperatur, Tag/Nacht-Rhythmus 7.00-19.00 Uhr). Die Tiere erhielten Standarddiät (Ssniff, Soest) und Wasser ad libitum. Zur Proliferation der Peroxisomen mit Clofibrat wurden 0.5 % (w/w) Clofibrat zur pulverisierten Standarddiät gemischt und je nach Versuch an 5 - 14 aufeinanderfolgenden Tagen verfüttert. Kontrolltiere erhielten im gleichen Zeitraum die normale Standarddiät. Zur Proliferation der Peroxisomen durch Hyperthyreose wurde den Tieren an 10 aufeinanderfolgenden Tagen täglich 100 µg L-Thyroxin (Merck KG, Darmstadt) subcutan injiziert. Vor der Organentnahme hatten die Ratten für 16 h gehungert. Diese Hungerperiode entfiel bei nachfolgender Isolierung von Hepatocyten.

- *Kaninchen:*

Zur Herstellung von Antiseren wurden weiße Neuseelandkaninchen verwendet (2 - 2,5 kg bei Versuchsbeginn). Die Tiere wurden unter Standardbedingungen (s.o.) gehalten.

## 2.3 Gewinnung von Antiseren gegen ARF1 und ARF6

### 2.3.1 Peptide

Es wurden Antiseren gegen immunogene Peptide gewonnen. Die Peptide zur Immunisierung von Kaninchen wurden als Auftragsarbeit am ZMBH synthetisiert. Die Sequenz entspricht dem jeweiligen C-terminus der ARF-Proteine. Für ARF1 wurde CDWLSNQLRNQK-COOH gewählt, für ARF6 CGLTWLTSNYKS-COOH. Beide Peptide trugen N-terminal ein zusätzliches Cystein, das eine kovalente Kopplung an Thiopropylsapharose erlaubt und damit einen Einsatz der Peptide bei der Affinitätsreinigung des gewonnenen Antikörpers ermöglicht.

### 2.3.2 Kopplung der Peptide an KLH

Die Peptide wurden in Anlehnung an Kreis (1986) an das Trägerprotein KLH (*Keyhole-limpet hemocyanin* / Hämocyanin aus *Megathura crenulata*) gekoppelt. Dazu wurden 2 mg Peptid in 500 µl PBS gelöst, KLH-lösung in mindestens 40-fachem molarem Überschuß zugesetzt und die Mischung mit PBS auf 1 ml Endvolumen ergänzt. Die kovalente Kopplung des Peptides an KLH erfolgte durch Zugabe von 5x 4 µl Glutaraldehyd (500 mM Stammlösung) in Abständen von 5 min unter Rühren (Endkonzentration: 10 mM). Zur quantitativen Umsetzung wurde nachfolgend 30 min auf Eis inkubiert, bevor der Überschuß an Glutaraldehyd durch Zugabe von 25 mM Glycin umgesetzt wurde. Die Kopplungslösung wurde ÜN bei 4°C gegen ein 100-faches Probenvolumen PBS mit dreifachem Pufferwechsel dialysiert. Die gekoppelten Peptide wurden entweder direkt zur Immunisierung eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

KLH-Stammlösung	10 mg/ml in PBS, Rekonstitution nach Vorschrift (# H-7017, Sigma, Deisenhofen)
Glutaraldehyd-Stammlösung	5 % (w/v) in ddH <sub>2</sub> O aus 25 % (w/v) Originallösung (# 23114, Serva, Heidelberg)
Glycin-Stammlösung	1 M Glycin (pH 8.5)

### 2.3.3 Immunisierung der Kaninchen

Die Grundimmunisierung eines Kaninchens erfolgte mit 1 mg KLH-gekoppeltem Peptid, pro Peptid wurden in der Regel zwei Kaninchen (-C1 bzw. -C2) immunisiert. Dazu wurden gleiche Volumenanteile von Kopplungslösung und Freund'schem Adjuvans emulgiert und dem Kaninchen im Nackenbereich subcutan injiziert. Ein Boostern der Immunantwort erfolgte durch Injektion von je 500 µg gekoppeltem Peptid als Emulsion in Freund'schem Adjuvans am 21. und 31. Tag. Nach Titerbestimmung (i.d.R. durch Test im Westernblot) wurden die Tiere am 41. Tag entblutet und nach vollständiger Koagulation des Hämatokrits das Serum durch Zentrifugation gewonnen. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -20°C.

### 2.3.4 Spezifität der ARF-Antikörper

Die Spezifität der gewonnenen C-terminalen ARF1- und ARF6-Antikörper wurde im Westernblot überprüft. Dazu wurden steigende Mengen an rekombinantem ARF1-HA-His bzw. ARF6-HA-His (s. 2.16) verwendet. Die Entwicklung der Blots ergab, daß ARF1C1 keine Kreuzreaktivität gegen ARF6 aufweist und umgekehrt.

Ein Test im Westernblot ergab ferner für ARF1C1 und ARF6C1 den jeweils besseren Titer gegenüber ARF1C2 und ARF6C2. Folglich wurden alle weiteren Analysen mit den C1-Seren durchgeführt.

## 2.4 Proteinbestimmung

### 2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die colorimetrische Methode nach Bradford (1976) verwendet, die mit Hilfe einer Proteinfärbelösung der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt wurde. Parallel zur Proteinbestimmung der zu untersuchenden Probe wurde stets eine Eichgerade mit 2.5 - 25 µg BSA (6 verschiedene Mengen) zuzüglich Blindwert erstellt. Die entsprechende Proteinmenge wurde in 800 µl wässriger Lösung in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, 200 µl Färbereagenz zugegeben, gut gemischt und nach 5 min Inkubationszeit bei RT die OD bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen. Zur Messung wurden je 200 µl der Probe pro Kavität einer 96-fach Mikrotiterplatte pipettiert und im ELISA-Photometer (anthos 2001, Anthos, Krefeld) ausgewertet. Anhand der Eichgerade ließ sich die Proteinkonzentration der Probe ermitteln.

### 2.4.2 Proteinabschätzung in einer peroxisomalen Fraktion

In erster Näherung ließ sich die Proteinkonzentration einer peroxisomalen Fraktion mit einem einfachen optischen Test ermitteln. Dazu wurden 50 µl der Peroxisomenlösung mit 950 µl Homopuffer gemischt und die OD<sub>500</sub> in einem Photometer (Ultrospec 3100, Amersham Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Der Nullwertabgleich erfolgte gegen Homopuffer. Die Proteinkonzentration errechnete sich nach der folgenden empirischen Formel:  $0,1 \text{ OD}_{500} = 1,46 \text{ mg/ml}$ .

## 2.5 Bestimmung des Phospholipidgehalts

Der Gehalt an Phospholipiden in einer Peroxisomen- oder Golgi-Fraktion wurde nach der Methode von Rouser et al. (1970) bestimmt, die nach einer sauren Spaltung den Gehalt an Phosphat im nanomolaren Bereich ermittelt. Zunächst wurden die Lipide mit Chloroform/Methanol/HCl (50:100:1.5, vol/vol/vol) nach der Methode von Bligh und Dyer (1959) extrahiert, unter einem schwachen Stickstoffstrom getrocknet und in Chloroform/Methanol (1:2, vol/vol) gelöst. Die Phosphatbestimmung wurde in 10 ml-Reagenzröhrchen mit Schraubdeckel durchgeführt, deren Deckel während der Inkubation bei hohen Temperaturen wegen des Druckausgleichs jedoch nicht vollständig geschlossen wurden. Zu jeder Einzelbestimmung wurde parallel eine Eichreihe mitgeführt, die 5 Ansätze im Bereich von 4 - 80 nmol Phosphatidylcholin (400  $\mu$ M Stammlösung) und zwei Blindwerte ohne Phosphatquelle als Referenz enthielt. Zur jeweiligen Probe wurden zunächst 300  $\mu$ l Perchlorsäure (70 %) gegeben, kurz gemischt und für 40 min bei 180°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben nacheinander mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O, 400  $\mu$ l Ammoniummolybdat-Lösung (1.25 % (w/v) in ddH<sub>2</sub>O) und 400  $\mu$ l Ascorbinsäure-Lösung (5 % (w/v) in ddH<sub>2</sub>O) versetzt, jeweils gut gemischt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlen wurde die Absorption der einzelnen Proben bei 797 nm im Photometer (Ultrospec 3100, Amersham Pharmacia, Freiburg) gegen den Blindwert bestimmt. Anhand der Eichgerade konnte der Phosphatgehalt der Probe und damit ihr Phospholipidgehalt ermittelt werden.

## 2.6 Proteinfällung

### 2.6.1 TCA-Präzipitation

Zur Fällung der Proteine wurde die wässrige Proteinlösung mit Desoxycholat (2 % (w/v) Stammlösung) auf 0.02 % Endkonzentration eingestellt, gut gemischt und mit eiskalter 100 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA)-Lösung auf 10 % TCA-Endkonzentration eingestellt. Die Probe wurde für 30 min auf Eis inkubiert und das denaturierte Protein für 20 min bei 15.000 xg / 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert. Der Überstand (ÜS) wurde verworfen und der Proteinniederschlag in einer geeigneten Menge 1x SDS-Probenpuffer (s. 2.7) gelöst. Bei Bedarf wurde mit Ammoniakdampf neutralisiert, wobei das Bromphenolblau des Probenpuffers als pH-Indikator diente.

## 2.6.2 Aceton-Präzipitation

Zur Fällung der Proteine mittels Aceton enthielt die Präzipitationsmischung 3 Teile der wässrigen Proteinlösung, ein Teil eiskalte Ammoniaklösung (25 % Stammlösung) und 16 Teile eiskaltes Aceton (100 % Stammlösung, p.A.). Nach gründlichem Mischen wurde die Probe für 20 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 15.000 xg, 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge) sedimentiert. Der ÜS wurde verworfen, der Proteinniederschlag für ca. 5 min bei RT getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Diese Präzipitationsmethode eignete sich besonders zur Darstellung der ARF-Proteine in einer anschließenden Westernblot-Analyse.

## 2.7 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Die Proteine lagen entweder als Niederschlag (z.B. nach Proteinfällung, s. 2.6) oder in gelöster Form vor. In erstem Fall wurden die Proteine in einem geeigneten Volumen 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 37°C unter Schütteln vollständig gelöst. Bereits gelöste Proteine wurden mit 1/3 Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Kurz vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proben für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend potentielle Aggregate durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 xg / RT entfernt.

1x SDS-Probenpuffer      10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 4 % (w/v) SDS,  
10 % (w/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol,  
Bromphenolblau bis zur intensiven Bau färbung

## 2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-denaturierte Proteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem modifizierten diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) elektrophoretisch getrennt. Es wurden vertikale Polyacrylamid-Gelsysteme verschiedener Größe verwendet (6 ml Bio-Rad-Minigele, 11 ml Midigele oder 18 ml Maxigele). Die Acrylamidkonzentration der Trenngele variierte zwischen 10 % (zur Darstellung von  $\beta$ 'COP) und 12.5 % bzw. 15 % Acrylamid (zur Identifizierung der ARF-Proteine). Das Sammelgel hatte unabhängig vom Trenngel eine konstante Acrylamidkonzentration von 0.53 % Acrylamid und 2 % Bisacryl-

amid. Polymerisiert wurden die Trenngele mit 0.05 % (w/v) APS und 0.1 % (v/v) TEMED; für Sammelgele wurden 0.1 % (w/v) APS und 0.1 % (v/v) TEMED eingesetzt.

Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke von 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel.

Trenngel-Acrylamid (37.5:1)	30 % (w/v) Acrylamid 0.8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in ddH <sub>2</sub> O
4 x Trenngelpuffer	1.5 M Tris/HCl (pH 8.8) 0.4 % (w/v) SDS
Sammelgel-Acrylamid	4 % (w/v) Acrylamid 15 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in ddH <sub>2</sub> O
4 x Sammelgelpuffer	0.5 M Tris/HCl (pH 6.8) 0.4 % (w/v) SDS
APS-Stammlösung	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in ddH <sub>2</sub> O
10 x Elektrophoresepuffer	250 mM Tris/HCl (pH 8.8, einstellen entfällt) 1.92 M Glycin 1 % (w/v) SDS

## 2.9 Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen

### 2.9.1 Silberfärbung

Sollten Proteine im Nanogramm-Maßstab (1-10 ng/Bande) nachgewiesen werden, wurden die Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen mittels Silberauflagerung visualisiert (Oakley et al., 1980). Dabei wurde nach folgendem Schema unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle Schritte erfolgten bei RT. Die Lösungen für die Schritte 3, 5 und 7 wurden jeweils frisch angesetzt.

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
1. Fixierung	30 % Ethanol, 10 % Essigsäure	mind. 1 h
2. Waschen	10 % Ethanol	2 x 15 min
3. Na-Thiosulfat	0.2 g/l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1 min
4. Waschen	ddH <sub>2</sub> O	3 x 20 s
5. Silberfärbung	2 g/l AgNO <sub>3</sub> , 0.27 ‰ (v/v) Formaldehyd	20 min

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer
6. Waschen	ddH <sub>2</sub> O	2 x 20 s
7. Entwicklung	10 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 4 mg/l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5H <sub>2</sub> O, 0.185 ‰ (v/v) Formaldehyd	max 10 min *
8. Stoppen	7 % (v/v) Essigsäure	mind 10 min

\* Die Entwicklung der Gele erfolgte bis zur gewünschten Intensität und wurde durch unmittelbares Überführen in 7 % Essigsäure gestoppt.

### 2.9.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Betrag die nachzuweisende Proteinmenge 100-500 ng/Bande, so wurden die Polyacrylamidgele mit Coomassie gefärbt. Dazu wurde das Gel für mindestens 1 h unter leichtem Schütteln in der Färbelösung inkubiert (RT) und anschließend solange in Entfärber gewaschen, bis sich die blauen Proteinbanden deutlich vor einem klaren Hintergrund abzeichneten.

Diese Färbemethode ließ sich auch auf bereits mit Milchpulver blockierte und für Antikörperdetektion prozessierte PVDF-Blotmembranen anwenden. Die Färbezeit wurde dabei allerdings auf 5 - 10 min reduziert.

Coomassie-Färbelösung	0.5 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

### 2.9.3 Autoradiographie/Fluorographie

Zum Nachweis <sup>35</sup>S-markierter Proteine wurden das Polyacrylamid-Gel auf einem Whatman 3MM-Filterpapier für 1 h bei 60°C in einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet und anschließend gegenüber einem Spezial-Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak, Stuttgart) exponiert. Die Expositionsdauer variierte zwischen 1 und 5 Tagen.

## 2.10 Westernblot-Analyse

### 2.10.1 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Zur spezifischen Detektion mittels Antikörpern wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Fluorotrans, Pall, Wiesbaden) übertragen. Es wurde das sog. Naßblot-Verfahren in einer entsprechenden Apparatur der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Dazu wurde ein Membranstück, das der Größe des Polyacrylamidgels entsprach, für 1 min in Methanol benetzt und dann in Transferpuffer equilibriert. Das entsprechende Gelstück wurde ebenfalls kurz in Transferpuffer equilibriert, luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt und zwischen zwei Whatmann 3MM-Filterpapieren mittels des Halters in die Naßblot-Kammer (Trans-Blot Cell, Bio-Rad) eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte für 3,5 h bei 400 mA in Transferpuffer. Wurde die kleinere Einheit (Mini Trans-Blot Cell) verwendet, reduzierte sich die Zeit auf 75 min bei 400 mA.

Transferpuffer	50 mM Natriumborat (pH 9.0), 5 % (v/v) Methanol, 0.05 % (w/v) SDS
----------------	--

### 2.10.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran zur Vermeidung unspezifischer Antikörperanbindung mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS abgesättigt. Dieses Blockieren erfolgte entweder für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C. Nach Waschen der Membran für 10 min in PBS-T erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper (in PBS-T / 1 % BSA) für 45-60 min bei RT. Nachfolgend wurde der Blot 5 min in PBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (in PBS-T / 3 % Milchpulver) für weitere 30 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde 4x 5 min in PBS-T gewaschen und der Blot entwickelt.

Zur Detektion des Sekundärantikörpers wurde die Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenz des Substrates Luminol herangezogen. Dazu wurden 4 ml Luminollösung mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O und 10 µl Verstärkerlösung versetzt und der Blot damit für 1 min gespült. Die überschüssige Lösung wurde quantitativ entfernt, der Blot auf ein Kunststoffbrett aufgelegt, mit handelsüblicher Haushaltsfolie abgedeckt und schließlich die Lichtemission durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji Super RX) detektiert.

---

PBS-T	0.05 % Tween 20 in PBS
Luminollösung	50 mg Na-Luminol, 62 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , gelöst in 200 ml 0.1 M Tris/HCl (pH 8.5) (Lagerung lichtgeschützt bei 4°C)
Verstärkerlösung	11 mg p-Coumarinsäure in 10 ml DMSO gelöst (Lagerung lichtgeschützt bei RT)

### 2.11 Densitometrische Auswertung

Zur Quantifizierung der Signale auf Röntgenfilmen wurden diese zunächst eingescannt (ScanMaker E6 (Microtek) gesteuert über die Software SilverFast SE (Lasersoft)). Der Schwärzungsgrad einzelner Banden wurde mittels QuantityOne<sup>®</sup>-Software (Bio-Rad, München) bestimmt. Dazu wurde mit dem Modus *trace intensity [Int x mm]* quantifiziert und die Einzelwerte mittels *rolling disk*-Anwendung um das Hintergrundsignal reduziert.

### 2.12 Isolierung von Primärhepatozyten

Die Isolierung von Primärhepatozyten erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Berry and Friend (1969) und Just and Schimassek (1980). Dazu wurde die Ratte, die für 5 Tage mit Clofibrat stimuliert war, zunächst durch intraperitoneale Injektion von 70 µl Nembutal (Sanofi Ceva, Hannover) pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Zur Vermeidung der Blutgerinnung wurden anschließend 100 I.E. Heparin (Liquemin N 10.000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) pro 100 g Körpergewicht in die Beinvene verabreicht. Das Abdomen wurde geöffnet und die entsprechenden Ligaturen vorbereitet. Für den Zulauf wurde eine Kanüle in die Pfortader und nach Eröffnen des Thorax eine Kanüle für den Ablauf in die *Vena cava* eingeführt. Die Ligaturen wurden dabei vollzogen. Anschließend wurde die Leber zunächst für 10 min bei 37°C mit Carbogen-gesättigtem Medium III durchspült und danach mit Carbogen-gesättigter Collagenaselösung für weitere 10 min bei 37°C perfundiert, um den Gewebeverband zu lösen. Die Collagenase-Lösung wurde dabei zirkulierend geführt. Nach Entnahme der Leber wurde diese mit einer Schere zerkleinert und zusammen mit dem Collagenasemedium in einen silikonisierten 100 ml-Rundkolben gegeben. Unter Schütteln und fortdauernder Carbogenbegasung wurde der Zellverband für

weitere 10 min bei 37°C desintegriert. Aus der erhaltenen Zellsuspension wurden größere Gewebeteile mittels sequenziellem Filtrieren durch Nylonfilter absteigender Maschenweite (250, 100, 60 µm) entfernt. Die gefilterte Suspension wurde anschließend für 10 min auf Eis inkubiert und Collagenase zusammen mit toten Zellen durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem DMEM-H entfernt (Zentrifugation für 3 min bei 300 Upm (20 xg), 4°C / Megafuge 1.0R, Hereaus). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen schonend in einem geeigneten Volumen DMEM-H resuspendiert, um eine Konzentration von ca. 100 mg Zellen/ml ( $\approx 10^7$  Zellen/ml) zu erhalten. Die Zellen wurden zur Vitalitätsprüfung 1 : 2 mit 0.5 % (w/v) Trypanblau gemischt und unter dem Mikroskop analysiert. Tote Zellen sind an der Blaufärbung des Kernes zu erkennen, da der Farbstoff die poröse Zellmembran durchdringen kann. Für weitere Experimente wurden nur Zellpopulationen mit mindestens 90 % intakten Zellen verwendet.

Medium III	12.5 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ergänzt mit: 12 mM NaHCO <sub>3</sub> , 7.5 mM Glucose
DMEM-H	50 mM Hepes/NaOH (pH 7.4) in DMEM
Collagenaselösung	0.05 % (w/v) Collagenase CLS II in DMEM-H

### 2.13 *Metabolisches Markieren von Proteinen in vivo*

Die metabolische Markierung von Proteinen erfolgt in einer adhärennten Hepatozytenkultur. Die Primärhepatozyten wurden wie unter 2.12 beschrieben gewonnen. Insgesamt wurden 10 x 60 mg Zellen (bezogen auf das Feuchtgewicht) auf Collagen-beschichtete 10 cm - Schalen ausgesät und für 2 - 3 h in je 10 ml  $\alpha$ MEM+ anwachsen lassen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> / 100 % Luftfeuchte. Danach wurden die Zellen je einmal mit PBS-Dulbecco und DMEM(-M/C) (Methion-/Cystein-freies DMEM, Sigma, Deisenhofen) gewaschen, bevor sie mit je 5 ml DMEM(-M/C) / Penicillin/ Streptomycin / 5 % (v/v) FCS versetzt wurden. Das FCS war zuvor ÜN gegen PBS-Dulbecco dialysiert worden war, um Methion und Cystein abzureichern. Zum metabolischen Markieren der Proteine wurde jede 10 cm-Schale mit 700 µCi L-[<sup>35</sup>S] *in vitro Cell labelling mix* (Redivue PRO-MIX™, 1.000 Ci/mmol, Amersham, Braunschweig) versetzt und für 11 h unter Standardbedingungen inkubiert.

$\alpha$ MEM+	$\alpha$ MEM mit 5 % (v/v) FCS, 1 % (w/v) L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 25 I.E. Insulin, 10 $\mu$ M Dexamethason
PBS-Dulbecco	ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , alle Angaben in (w/v): 0.8 % NaCl, 0.02 % KCl, 0.115 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.02 % $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Collagen-R	0.2 mg/ml in 0.01 % Essigsäure, max. 2 ml pro 10 cm-Schale

## 2.14 Isolierung von Peroxisomen

### 2.14.1 Großpräparation

Hochreine Peroxisomen wurden aus einer Großpräparation in Anlehnung an das Protokoll von Hartl et al. (1985) gewonnen. Es wurden 12 Tiere verwendet, die – sofern erforderlich – für 14 Tage mit Clofibrat-haltiger Diät gefüttert wurden. Unmittelbar vor der Organentnahme wurden die Tiere durch einen Schlag auf den Kopf getötet und entblutet. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis/4°C ausgeführt. Die entnommenen Lebern wurden grob zerkleinert, 1:5 (Frischgewicht : Puffervolumen) mit Homopuffer verdünnt und mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators (Typ Potter-Elvehjem, 60 ml Volumen) in einem Hub bei 850 Upm homogenisiert. Anschließendes Filtrieren durch drei Lagen Gaze entfernte große Gewebsetzen. Zelldebris und Zellkerne wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 3.000 xg (Rotor JA-20, Beckman Coulter, 6.000 Upm) sedimentiert und verworfen. Der erhaltene Überstand (postnukleärer Supernatant, PNS) wurde für 35 min bei 12.000 xg (JA-20, 12.000 Upm) zentrifugiert, der ÜS wurde verworfen. Das resultierende Sediment stellt die leichte Mitochondrienfraktion (L-Fraktion) dar und ist mit Peroxisomen angereichert. Die L-Fraktion aller Röhrchen wurde vereinigt, in maximal 35 ml Homopuffer resuspendiert und mittels Beschleunigungszentrifugation getrennt. Dazu wurde ein Zonalrotor (RPZ48T-211, Hitachi, Krefeld) während des Laufes (3.000 Upm) mit 400 ml linearem Saccharose-Gradienten (14.5 % - 45 % (w/w)), der mit einem Kissen aus 100 ml 60 % (w/w) Saccharose unterschichtet war, beschickt und dann mit der L-Fraktion und anschließend 10 ml Homopuffer überlagert. Trennung erfolgte für 11 min bei 7.000 xg (12.000 Upm). Nach Reduzierung der Drehzahl auf 3.000 Upm wurden Fraktionen von je 10 ml entnommen, mit der niedrigsten Dichte beginnend. In den Fraktionen 1-5 eluiert eine ER-angereicherte Fraktion, gefolgt von der peroxisomenreichen Fraktion in 6 - 16 und der

Mitochondrien-angereicherten Fraktion in 17 - 21. Die peroxisomenreiche Gesamtfraktion wurde mit Dextran T10 auf 3 % (w/v) Endkonzentration eingestellt, die Organellen für 15 min bei 30.000 xg (Rotor TFT 50.38, Kontron Instruments, 18.000 Upm) sedimentiert und der ÜS verworfen. Das Sediment wurde für die nachfolgende Gleichgewichtszentrifugation in 16 % (w/v) Saccharose resuspendiert. Die isopyknische Zentrifugation erfolgte in vier 35 ml-*Ultracrimp*-Zentrifugenröhrchen (Sorvall Instruments, Hanau) mit einem 14 - 45 % (w/v) linearen Nycodenzgradienten, der einen 4.76 - 0 % (w/v) gegenläufigen Saccharosegradienten zum Ausgleich der Osmolarität enthielt (s. Seite 91). Die Gradienten wurden mit der Organellensuspension (max. 4 ml) überschichtet und für 1 h bei 52.000 xg (Vertikalrotor RPV50T, Sorvall, 25.000 Upm) mit verlangsamer Beschleunigungs- und Bremsgeschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden mit der höchsten Dichte beginnend 10 Fraktionen zu je 3 ml geerntet. Die hochgereinigten Peroxisomen befinden sich in den Fraktionen 2 und 3. Aliquots dieser Präparation wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Die Proteinkonzentration betrug üblicherweise 2.5 - 3.5 mg/ml.

### *2.14.2 Peroxisomenpräparation für Frischmaterial*

Für verschiedene Bindungsstudien und Dichtegradientenversuche wurden frisch isolierte Peroxisomen verwendet. Die Präparation erfolgte aus einer Rattenleber, die je nach Bedarf für 5 Tage mit Clofibrat stimuliert war. Das Protokoll ist bis zur Gewinnung der L-Fraktion mit dem der Großpräparation identisch (s. 2.14.1), mit der Ausnahme, daß ein 1:10 Homogenat in Homopuffer+ hergestellt wurde. Die erhaltene L-Fraktion wurde einmal gewaschen, indem das Sediment aus 35 ml PNS in je 20 ml Homopuffer resuspendiert und für 18 min bei 12.000 xg (JA-20, 12.000 Upm) zentrifugiert wurde. Die gewaschenen Peroxisomen wurden in Homopuffer resuspendiert, auf einen 14 - 45 % (w/v) Nycodenzgradienten (s.o.) geladen und für 1 h bei 52.000 xg im Vertikalrotor (RPV50T, 25.000 Upm) zentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben.

### 2.14.3 Isolierung aus metabolisch markierten Hepatozyten

Die  $^{35}\text{S}$ -markierten, adhärenenten Hepatozyten (600 mg Feuchtegewicht, s. 2.13) wurden mit eiskaltem Puffer  $\text{H}^+$  (s. 2.1.1) gewaschen und dieser quantitativ entfernt, bevor sie mit einem Zellschaber von der Schale gesammelt und in einem 5 ml-Glas-Teflon-Homogenisator (Typ Potter-Elvehjem) bei 850 Upm auf Eis homogenisiert wurden. Diese Prozedur wurde solange fortgeführt, bis bei der Kontrolle des Homogenats unter dem Mikroskop keine intakten Zellen mehr zu erkennen waren. Das Homogenat (ca. 5 ml) wurde für 2 min bei 800 xg / 4°C (Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand (PNS) für weitere 15 min bei 12.000 xg / 4°C (Tischzentrifuge) zur Gewinnung der L-Fraktion sedimentiert. Diese wurde einmal in Homopuffer (mit 1  $\mu\text{M}$  Leupeptin, 10  $\mu\text{M}$  Antipain, 100  $\mu\text{M}$  PMSF) gewaschen (10 min, 12.000 xg / 4°C), in insgesamt 1 ml Homopuffer (mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert und auf zwei 6 ml-Nycodenzgradienten geladen (14 - 45 % (w/v) Nycodenz mit 4.76 - 0 % (w/v) gegenläufigem Saccharosegradienten, *Ultracrimp*-Röhrchen, Sorvall, Hanau). Isopyknische Zentrifugation im Vertikalrotor erfolgte für 1 h bei 80.000 xg / 4°C (TV865, Sorvall, 30.000 Upm). Die Peroxisomenfraktion beider Gradienten wurde vereinigt (ca. 2 ml mit 1 mg/ml peroxisomalem Protein) und gegebenenfalls bei -80°C bis zur Inkubation (s. 2.24.1) gelagert.

Dextran T10	30 % (w/v) Stammlösung in ddH <sub>2</sub> O
Nycodenzlösungen	- 70 % (w/v) Nycodenz in ddH <sub>2</sub> O - 14 % (w/v) Nycodenz in Glycylglycinpuffer, ergänzt mit 4.76% (w/v) Saccharose - 45 % (w/v) Nycodenz in Glycylglycinpuffer
Gradient (35 ml)	Kissen aus 2,1 ml 70 % Nycodenzlösung überschichtet mit 27 ml linerarem Gradient, der durch Mischung von 14 % und 45 % Nycodenzlösung mittels Gradientenmischer gebildet wurde
Gradient (6 ml)	Kissen aus 350 $\mu\text{l}$ 70 % Nycodenzlösung überschichtet mit 4.5 ml linerarem Gradienten (14 - 45 % Nycodenz), pipettiert aus 9 Fraktionen zu je 500 $\mu\text{l}$ absteigender Dichte (45.0 - 41.1 - 37.3 - 33.4 - 29.5 - 25.6 - 21.8 - 17.9 - 14.0 % Nycodenz), die durch Mischung der 14 % und 45 % Nycodenzausgangslösungen erhalten wurden

## 2.15 Rattenlebercytosol

### 2.15.1 Isolierung von Cytosol

Zur Isolierung von Rattenlebercytosol wurden sechs Tiere verwendet, die je nach Versuchsbedingung für 14 Tage mit Clofibrat-haltiger Diät gefüttert wurden. Die Organentnahme erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis/4°C durchgeführt. Die Leber wurde 1:10 (Frischgewicht : Puffervolumen) mit Puffer H+ verdünnt und mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators (Typ Potter-Elvehjem, 60 ml Volumen) in einem Hub bei 850 Upm homogenisiert. Zelldebris, Kerne und Plasmamembran wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 6.000 xg (Rotor JA-20, 9.000 Upm) sedimentiert und verworfen. Der ÜS wurde für 1 h bei 100.000 xg (Rotor TFT55.38, 33.000 Upm) zentrifugiert und das Sediment verworfen. Um verbliebene vesikuläre Strukturen zu entfernen, wurde nachfolgend für 1.5 h bei 180.000 xg (Rotor TFT55.38, 44.000 Upm) zentrifugiert und das Sediment verworfen. Das erhaltene Cytosol wurde anschließend mit einem Minitan™-System (MWCO 10.000, Millipore, Schwalbach) um den Faktor 10 konzentriert und potentielle Proteinaggregate durch Zentrifugation für 1 h bei 100.000 xg entfernt. Das Cytosol wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Proteinkonzentration lag bei 50 - 55 mg/ml.

### 2.15.2 Fraktionierung von Cytosol

Die Fraktionierung von stimuliertem Cytosol erfolgte durch Gelfiltration unter Verwendung einer Superdex 200™-Säule (HiLoad XK 16/60, Amersham Pharmacia, Freiburg) an einem FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia. Dazu wurden 2 ml Cytosol aufgetaut, für 20 min bei 21.000 xg, 4°C geklärt und auf die mit Puffer H equilibrierte Säule appliziert. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min mit Puffer H. Es wurden 20 Fraktionen zu je 4 ml gesammelt, wobei erst kurz vor Erreichen des Ausschlußvolumens  $v_0$  mit dem Fraktionieren begonnen wurde (i.e. nach 35 min). Coatomer- und ARF-positive Fraktionen wurden durch Westernblot identifiziert und die entsprechenden Fraktionen zu Pools vereinigt. Die resultierenden Coatomer-poolfraktion (CPF), intermediäre Poolfraktion (IPF) und ARF-Poolfraktion (APF) wurden anschließend auf ein Endvolumen von 500 - 800 µl konzentriert. Dabei wurden

Vivaspin 15 - Zentrifugationseinheiten (Vivascience, Hannover) verschiedener molekularer Ausschlußgrößen (MWCO) verwendet: MWCO 30.000 für CPF, MWCO 10.000 für IPF und MWCO 5.000 für APF. Die Konzentrierung erfolgte mit 2.000 xg bei 15°C in einem Ausschwingrotor (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau).

## 2.16 Expression und Reinigung rekombinanter ARFs

### 2.16.1 Transformation von ARF und N-Myristoyltransferase

Um ARF mit N-terminaler Myristoylierung bakteriell zu exprimieren, muß neben der cDNA für ARF auch die cDNA für das modifizierende Enzym Myristoyl-CoA : Protein N-Myristoyltransferase (NMT) vorliegen. Die cDNA für ARF1 bzw. ARF6 basierte auf der Mausequenz (Hosaka et al., 1996) und war 3' um die Sequenzen für das Hämagglutinin-Epitop (HA) und einen His<sub>6</sub>-tag erweitert. Die Konstrukte waren in den bakteriellen Expressionsvektor pET-20b(+) (Novagen, Bad Soden) subkloniert. Die cDNA für *NMT1* basierte auf der Sequenz aus *S. cerevisiae*, die sich im Vektor pBB131 befand (Duronio et al., 1990). Beide Vektoren wurden in kompetente BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), One Shot - Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers ko-transformiert, wobei für die Transformation 3 ng ARF/pET-20b(+) und 6 ng pBB131 eingesetzt wurden. Die Selektion der ARF- und NMT-positiven Klone erfolgte auf LB-Agarplatten, die sowohl Ampicillin (100 µg/ml) als auch Kanamycin (50 µg/ml) enthielten.

### 2.16.2 Expression rekombinanter ARF-Proteine

Rekombinantes, myristoyliertes ARF1 und ARF6 wurden dem Protokoll von Franco et al. (1995) folgend exprimiert. Zunächst wurde von einem geeigneten Klon, der sowohl das Konstrukt für ARF als auch den Vektor für NMT trug, eine 10 ml-ÜN-Kultur (LB-Medium mit 150 µg/ml Ampicillin und 75 µg/ml Kanamycin) erstellt, mit der eine Vorkultur von 100 ml NZCYM Broth (mit 150 µg/ml Ampicillin und 75 µg/ml Kanamycin) 1 : 50 angeimpft wurde. Das logarithmische Wachstum dieser Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0.7 verfolgt und dann die eigentliche Expressionskultur von 1 l NZCYM Broth/ Amp<sub>150</sub>/ Kana<sub>75</sub> gestartet, indem das vorgewärmte Medium mit 0.05 - 0.1 OD<sub>600</sub> inokuliert wurde. Die Inkubation erfolgte wie zuvor bei 37°C, das Wachstum wurde durch Messen der OD<sub>600</sub> verfolgt. Bei 0.2 OD<sub>600</sub> wurde 1 % (v/v) Myristinsäure/BSA-Mischung zugesetzt und

weiterhin bei 37°C kultiviert. Bei 0.5 OD<sub>600</sub> wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und gleichzeitig die Kultur nach 28°C transferiert, um eine effizientere Myristoylierung zu ermöglichen. Nach 3 h Expression erfolgte die Ernte der Bakterien durch Zentrifugation bei 3.000 xg für 6 min (Rotor JA-10, Zentrifuge Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld). Danach wurde das Bakteriensediment zweimal mit PBS gewaschen: zunächst mit insgesamt 200 ml PBS (6 min, 3.000 xg, 4°C), dann in 50 ml PBS (10 min, 3.300 xg, 4°C / Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau). Das Sediment wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl, pH 7.5
NZCYM-Broth Medium	21.98 g/l NZCYM Broth (# N-3643, Sigma, Deisenhofen)
Ampicillin	150 mg/ml Stammlösung in ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin	75 mg/ml Stammlösung in ddH <sub>2</sub> O
IPTG	100 mM Stammlösung in ddH <sub>2</sub> O

*Myristinsäure/BSA-lösung (100-fach Stammlösung):*

Mischung aus 0.6 mM BSA / *fatty acid free* (Roche Diagnostics, Mannheim) und 4.6 mM Na-Myristat (Sigma, Deisenhofen), die wie folgt hergestellt wurde:

- 1.0 g BSA / *fatty acid free* wurden in 15 ml ddH<sub>2</sub>O bei 37°C gelöst.
- 114 mg Na-Myristat wurden in 8.75 ml ddH<sub>2</sub>O bei 60 °C gelöst und nacheinander 1 ml NaOH (1 N) und 0.25 ml HCl (1N) unter Mischen zügig zugegeben.
- 2.5 ml der Na-Myristat-Lösung wurden tropfenweise bei 37°C zur BSA-lösung unter Rühren zugegeben und danach auf 25 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt (pH ≈ 8.0). Die fertige Lösung sollte auch bei RT klar bleiben. Lagerung bei -20°C.

### 2.16.3 Reinigung rekombinanter ARF-Proteine

Die Reinigung der rekombinanten, myristoylierten ARF-Proteine erfolgte über den C-terminalen His<sub>6</sub>-tag. Dazu wurden die Zellen in 40 ml Lysepuffer (ergänzt durch eine Proteaseninhibitor-tablette Complete<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim)) resuspendiert und für 5 min bei 500 xg / 4°C geklärt. Die Lyse der Bakterien erfolgte bei 10.000 - 15.000 psi in einem EmulsiFlex-C5 System (Avestin Inc, Mannheim). Anschließend wurden aus dem Lysat Zelltrümmer und intakte Zellen durch Zentrifugation bei 18.000 xg / 4°C für 30 min

(Rotor JA-20, 15.000 Upm) entfernt, der ÜS auf 1 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt, verbliebene Proteinaggregate durch Ultrazentrifugation sedimentiert (90 min bei 180.000 xg / 4°C, Rotor TFT 55.38, 44.000 Upm) und der erhaltene ÜS schließlich mit einer 5 M NaCl-Stammlösung langsam auf 300 mM Endkonzentration eingestellt. Die eigentliche Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels einer 10 ml - Ni<sup>2+</sup>-Säule (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Superflow, Qiagen, Hilden), die in einem FPLC-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) betrieben wurde. Die mit Waschpuffer equilibrierte Säule wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min beladen und nicht gebundenes Material mit Waschpuffer vollständig entfernt. Für die Elution von rekombinantem ARF-HA-His wurde ein Imidazolgradient (100 - 300 mM Imidazol in Waschpuffer) verwendet und Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Das Protein eluierte bei 170 - 190 mM Imidazol, die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und zunächst in einer Vivaspin 15 - Einheit (MWCO 5.000, Vivascience, Hannover) bei 3.000 xg / 4°C um den Faktor 2-3fach konzentriert. Danach erfolgte ÜN eine Dialyse gegen das 300-fache Probenvolumen mit zweimaligem Pufferwechsel. Es wurde ein Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose mit MWCO 6 - 8.000 und 1.7 ml/cm verwendet (Spectra/Por 1, Carl Roth, Karlsruhe). Das hochgereinigte myristoylierte ARF-Protein wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration betrug 1 - 2 mg/ml.

Lysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 5 mM β-Mercaptoethanol, 200 μM GDP, 10 mM Imidazol, 1 μM MgCl <sub>2</sub>
Waschpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 μM GDP, 10 mM Imidazol
Dialysepuffer	20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM DTT, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 μM GDP

## 2.17 Isolierung peroxisomaler Membranen

### 2.17.1 Behandlung mit Hochsalz

Die Behandlung von Organellen mit 1 M KCl ermöglicht die Entfernung peripher angelagerter Membranproteine und wurde in erster Linie als stringenter Waschschrift benutzt. Dazu wurde die zu behandelnde Probe in 1 M KCl / Homopuffer aufgenommen, für

30 min unter Rühren auf Eis inkubiert und anschliessend die Organellen durch Zentrifugation für 60 min bei 100.000 xg / 4°C (Rotor TLA-45, 45.000 Upm) reisoliert.

### 2.17.2 *Behandlung mit Carbonat*

Um die integralen Membranproteine einer Organelle von Matrix- und peripheren Membranproteinen zu trennen, wurden die Organellen mit 100 mM Carbonat behandelt (Fujiki et al., 1982). Dazu wurde die wässrige Probe auf Eis mit 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 100 mM Endkonzentration eingestellt und mit eiskalter 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung soweit ergänzt, daß die Proteinkonzentration der Lösung 0.3 mg/ml nicht überschritt. Dies gewährleistet eine quantitative Entfernung der nicht-integralen Proteine. Die Probe wurde für 30 min unter Rühren auf Eis inkubiert und anschließend die Membranen für 1 h bei 100.000 xg / 4°C sedimentiert. Matrix- und periphere Membranproteine befinden sich im Überstand.

## 2.18 *Cytosolinkubation von Peroxisomen und Golgi*

### 2.18.1 *Inkubation von SLO-permeabilisierten Hepatocyten*

- *Permeabilisierung mit Streptolysin-O*

Primäre Hepatocyten aus einer über 5 Tage mit Clofibrat behandelten Ratte wurden wie unter 2.12 beschrieben isoliert und in Homopuffer resuspendiert. Je 50 mg Hepatocyten (bezogen auf das Feuchtgewicht) wurden in Suspension mit Streptolysin-O (SLO) (Bhakdi et al., 1985) permeabilisiert. Dazu wurden 5 µl SLO-Lösung (ca. 20.000 Hämolytische Einheiten) (freundlicher Weise von Dr. Sucharit Bhakdi, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt) mit 45 µl Puffer H / 5 mM DTT durch Inkubation für 10 min bei RT aktiviert und mit weiteren 450 µl Homopuffer einsatzbereit verdünnt. Ca. 50 µl dieser Verdünnung wurden zur Permeabilisierung von 50 mg Hepatocyten in 150 µl Endvolumen verwendet. Die Zellen wurden nach Zugabe von SLO zunächst für 5 min auf Eis inkubiert (Rapp et al., 1993), um eine Anlagerung des Toxins an Cholesterin-haltige Membranen zu ermöglichen. Die eigentliche Permeabilisierung erfolgte während der anschließenden Inkubation bei 37°C.

- *Inkubation permeabilisierter Hepatocyten*

Je 50 mg SLO-Hepatocyten (150  $\mu$ l) wurden mit APF (äquivalent zu 200  $\mu$ l Cytosol) in Anwesenheit von 50  $\mu$ M GMP-PNP oder GDP $\beta$ S in einem Endvolumen von 250  $\mu$ l für 30 min bei 37°C in einem 50 ml-Röhrchen im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 30 min auf Eis wurden 600  $\mu$ l Homopuffer zugegeben, die Zellen für 3 min bei 270 Upm / 4°C (Megafuge 1.0R, Heraeus) sedimentiert und der ÜS verworfen. Das Zellsediment wurde in einen 1 ml-Glas-Teflon-Homogenisator (Typ Potter-Elvehjem) überführt, mit 25  $\mu$ l Dextran T10 (30 % (w/v) Stammlösung) versetzt und in einem Endvolumen von ~ 300  $\mu$ l bei 850 Upm auf Eis homogenisiert. Danach wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 800 xg / 4°C (Tischzentrifuge) der PNS gewonnen, dieser auf einen 6 ml-Nycodenzgradienten geladen (14 - 45 % (w/v) Nycodenz mit 4.76 - 0 % (w/v) gegenläufigem Saccharosegradienten, *Ultracrimp*-Röhrchen, Sorvall, Hanau) und für 1 h bei 80.000 xg / 4°C (TV865, Sorvall, 30.000 Upm) zentrifugiert. Der Gradient wurde mit der höchsten Dichte beginnend in 10 Fraktionen zu je 500  $\mu$ l geerntet.

In Kontrollansätzen mit nicht permeabilisierten Hepatocyten wurden 100 mg Zellen (bezogen auf das Feuchtgewicht) verwendet. Homogenisierung, Gewinnung des PNS und isopyknische Zentrifugation verliefen analog zu inkubierten Hepatocyten.

## 2.18.2 *Inkubation von Organellen mit Cytosol und cytosolischen Fraktionen*

### 2.18.2.1 *Inkubation mit Cytosol*

Die Inkubation der Peroxisomen mit Cytosol erfolgte in Anlehnung an die von Passreiter et al. (1998) beschriebene Methode. Peroxisomen wurden mit einem 40- bis 50-fachen Überschuß an cytosolischem Gesamtprotein inkubiert. Dazu wurde das Cytosol bzw. die entsprechenden cytosolischen Fraktionen zunächst mit 50 - 100  $\mu$ M GMP-PNP bzw. GDP $\beta$ S für 30 min bei 37°C unter Schütteln vorinkubiert, mögliche Präzipitate für 20 min bei 50.000 xg / 25°C (Rotor TLA45, Beckman Coulter, 33.000 Upm) sedimentiert und verworfen. Die entsprechende Menge an Peroxisomen (als Nycodenzfraktion) wurde mit mindestens 3 Volumen Homopuffer verdünnt und für 15 min bei 15.000 xg / 4°C sedimentiert (Tischzentrifuge). Die Peroxisomen wurden im jeweiligen Volumen an vorinkubiertem Cytosol resuspendiert und der Ansatz mit ATP-regenerierendem System

(ARS, s. 2.1.2) versetzt. Wurde kein ARS verwendet, so wurde das entsprechende Volumen durch 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5) ersetzt.

Ein Standardansatz enthielt 50 µg Peroxisomen, die mit 50 µl Cytosol (50 mg/ml), 2.5 µl GMP-PNP oder GDPβS und 4 µl ARS für 30 min bei 37°C unter Schütteln und 30 min auf Eis inkubiert wurden. Danach wurden die Peroxisomen durch Zentrifugation für 10 min bei 15.000 xg / 4°C reisoliert, in 300 µl Homopuffer gewaschen und in 50 µl 1 x SDS-Probenpuffer gelöst.

### *2.18.2.2 Inkubation mit cytosolischen Fraktionen*

Wurden anstelle von Gesamtytosol die cytosolischen Poolfraktionen verwendet, so wurde die zu verwendende Menge in Bezug zum Gesamtytosol adäquat berechnet. Beispiel: pro Gelchromatographie werden 2 ml Cytosol fraktioniert und der aus diesem Lauf resultierende APF hat nach dem Konzentrieren ein Endvolumen von 600 µl. Anstelle von 50 µl Gesamtytosol (=  $\frac{1}{40}$  von 2 ml Cytosol) wurden von den erhaltenen 600 µl APF ebenfalls  $\frac{1}{40}$ , d.h. 15 µl, zur Inkubation eingesetzt. Die Differenz zum potenziellen Cytosolvolumen wurde durch Puffer H ausgeglichen (im gegebenen Beispiel also 35 µl). Ansonsten erfolgte die Inkubation, einschließlich der Vorinkubation der cytosolischen Fraktionen, analog zu derjenigen mit Cytosol.

### *2.18.2.3 Inkubation von Golgi-Membranen:*

Die Inkubation von Rattenleber-Golgi (freundlicherweise von Dr. Britta Brügger (BZH) zur Verfügung gestellt) erfolgte analog zum Protokoll für Peroxisomen, mit dem Unterschied, daß die Golgi-Membranen zuvor mit 300 mM KCl (in Homopuffer) gewaschen wurden. Dazu wurden maximal 100 nmol Golgi in 400 µl 300 mM KCl / Homopuffer mit einer Mikroliterpipette (P200, Gilson) durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und durch 16 % (w/v) Saccharose-lösung sedimentiert. Dabei wurde die Golgi / KCl - Suspension mit 150 µl 16 % (w/v) Saccharose und 30 µl 45 % (w/v) Saccharose unterschichtet und für 20 min bei 20.000 xg / 4°C (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die gewaschenen Golgi-Membranen befanden sich auf dem 45 % Saccharosekissen, wurden anschließend in einem geeigneten Volumen Homopuffer aufgenommen und alternativ zu Peroxisomen zur Inkubation eingesetzt.

### 2.18.3 Inkubation mit rekombinantem ARF

Zur Inkubation von Peroxisomen mit rekombinanten ARF-Subtypen wurden 50 µg Peroxisomen mit 1 µg ARF (in 50 µl Puffer H) und CPF (entsprechend 50 µl Cytosol) in Anwesenheit von ARS und 50 - 100 µM GMP-PNP bzw. GDPßS nach der oben beschriebenen Methode (s. 2.18.2) inkubiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

GDPßS	2 mM Stammlösung in 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5)
GMP-PNP	2 mM Stammlösung in 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5)

## 2.19 Identifizierung des ARF-Subtyps

### 2.19.1 Bindung von ARF an Peroxisomen

Zur Identifizierung des peroxisomen-gebundenen ARF-Subtyps wurden von 1.25 mg Gesamtperoxisomen Carbonatmembranen isoliert (s. 2.17.2), anschließend in 1 ml Homopuffer resuspendiert und mit 1 ml Cytosol (50 mg/ml) oder der äquivalenten Menge APF in Anwesenheit von 165 µl ATP-regenerierendem System (ARS) mit 50 µM GMP-PNP wie unter 2.18.2 beschrieben inkubiert. Die inkubierten Membranen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 20.000 xg, 4°C (Rotor 1379, Heraeus, Hanau) reisoliert, mit 800 µl Homopuffer gewaschen und lose gebundene Proteine durch Behandlung mit 800 µl 1 M KCl / Homopuffer (s. 2.17.1) extrahiert. Das Membransediment wurde anschließend in 40 µl 1x SDS-Probenpuffer gelöst und die Proteine durch 12.5 % SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie R-250 gefärbt, die Bande im 20 kDa-Bereich ausgeschnitten und analysiert.

### 2.19.2 Massenspektrometrie

Die massenspektroskopische Analyse der ARFs wurde in Kooperation mit Dr. Hans Heid (DKFZ Heidelberg) durchgeführt. Die Identifizierung des Myosins fand in Zusammenarbeit mit Dr. Johannes Lechner (BZH) statt. Dazu wurden die Proteine der ausgeschnittenen Bande zunächst im Gel ÜN mit der Protease Trypsin (Roche Diagnostics, Mannheim) proteolytisch geschnitten und die erhaltenen Peptide durch *matrix-assisted laser desorption/ionization* Massenspektrometrie (MALDI-MS) in einem Reflex II (Bruker-Daltronic, Bremen) analysiert (Zatloukal et al., 2002).

### 2.19.3 Sequenzierung nach Edman

Zur ARF-Identifizierung wurde parallel zur MALDI-MS die ausgeschnittene Bande auch einer klassischen Analyse nach Edman unterzogen, ebenfalls in Kooperation mit Dr. Hans Heid (DKFZ Heidelberg). Dazu wurden die Proteine der 20 kDa-Bande zuerst mit der Endoproteinase Asp-N verdaut, die Peptidbindungen N-terminal von Asparagin- und Cysteinsäure spaltet. Die erhaltenen Peptide wurden durch *high pressure liquid chromatography* (HPLC) über eine Hypersil C18-Säule (BIA, Bensheim) aufgetrennt und anschließend mittels Edman-Degradation in einem Protein-Sequenziersystem Procise 494 A (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert (Heid et al., 1998).

## 2.20 CHAPS-solubilisierter Komplexe

Um mögliche Komplexe zwischen peroxisomalen Proteinen und Coatomer bzw. ARF zu analysieren, wurde wie folgt verfahren.

Für jeden Ansatz wurden 1.5 mg Peroxisomen eingesetzt. Zunächst wurden wie unter 2.17.2 beschrieben Carbonatmembranen präpariert, die in je 150 µl Homopuffer+ resuspendiert und mit 600 µl Cytosol bzw. einer äquivalenten Menge an APF in Gegenwart von 50 µM GMP-PNP inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte wie beschrieben für 30 min bei 37°C unter Schütteln und 30 min auf Eis. Danach wurden die Peroxisomen durch Flottieren vom löslichen Material des Inkubationsansatzes getrennt. Dazu wurde der Ansatz mit 1.9 ml 70 % (w/v) Nycodenz auf eine Konzentration von mindestens 50 % (w/v) Nycodenz eingestellt und auf den Boden eines SW 50-Zentrifugenröhrchens gegeben. Darüber wurden 1 ml 47 % (w/v) Nycodenz und 500 µl Homopuffer+ geschichtet. Die Peroxisomen wurden durch Zentrifugation für 1 h bei 150.000 xg / 4°C im Ausschwingrotor (SW 55 Ti, Beckman Coulter, 40.000 Upm) an die Phasengrenze zwischen 47 % Nycodenz und Homopuffer flottiert und nach dem Lauf mit einer 1 ml-Spritze und Kanüle durch seitliches Anstechen wiedergewonnen. Die Nycodenz-haltige Peroxisomensuspension (zwischen 400 - 450 µl) wurde mit 900 µl Homopuffer+ vermischt und für 25 min bei 20.800 xg / 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert, um die Organellen quantitativ zu sedimentieren, der ÜS wurde verworfen.

Die Solubilisierung der Membranen mit CHAPS und nachfolgende Trennung der Komplexe orientierte sich an dem Protokoll von Thai et al. (1997). Dazu wurden die Peroxisomen mit einem Mikropistill in je 375 µl 10 mM Tris/HCl (pH 7.4) resuspendiert, mit 375 µl Solubilisierungslösung vermischt (d.h. 7.5 mg CHAPS / 150 µg Membranen) und auf Eis für 3x 20 sec mit der Ultraschallspitze bei 40 % Intensität / Stufe 3 beschallt (Branson Sonifier B-30, Branson, Danbury, CT, USA). Unlösliche Membranen wurden anschließend für 30 min bei 100.000 xg / 4°C (TLA-45, 45.000 Upm) sedimentiert und verworfen. Der ÜS, der die CHAPS-solubilisierten Komplexe enthält, wurde auf einen kontinuierlichen 6 ml-Saccharosegradienten (14 - 45 % (w/w)) geladen und für 5 h bei 150.000 xg / 4°C im Vertikalrotor zentrifugiert (TV865, Sorvall, 41.000 Upm). Anschließend wurden die Gradienten, mit der hohen Dichte beginnend, in Fraktionen zu je 250 µl geerntet, das enthaltene Protein mit TCA präzipitiert, in 1x SDS-Probenpuffer gelöst und ein viertel jeder Fraktion auf einem 12.5 % SDS-PAGE getrennt und mittels Westernblot analysiert.

Solubilisierungslösung	2 % (w/v) CHAPS in 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 300 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 2 µM Leupeptin
Saccharosegradient	350 µl Kissen aus 60 % (w/w) Saccharose (in ddH <sub>2</sub> O), 4.5 ml linearer Gradient gemischt aus 45 % (w/w) und 14 % (w/w) Saccharose jeweils in 5 mM Tris/HCl (pH 7.4), 0.2 % (w/v) CHAPS

## 2.21 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.21.1 Verwendete Stämme

Die verwendeten Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und ihre Genotypen sind in Tab. 2 aufgeführt. Die Stämme *SSY145* und *SSY146* wurden freundlicherweise von Dr. Stephan Schröder-Köhne (BioMedTec Franken eV, Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Stämme der *SCMIG*-Reihe wurden von Dr. Bianka Großhans (Universität Yale, New Haven, USA) im Labor von Dr. Maribel Geli (Barcelona, Spanien) hergestellt und konnten freundlicherweise verwendet werden.

<i>Name</i>	<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Herkunft</i>
<i>arf1wt, arf2Δ</i>	SSY145	<b>MATa</b> <i>ARF1, arf2::URA3, ura3, <u>leu2</u>, lys2, bar1, his3</i>	Stephan Schröder-Köhne
<i>arf1ts, arf2Δ</i>	SSY146	<b>MATa</b> <i>arf1-4::HIS3, arf2Δ::URA3, ura3, <u>leu2</u>, lys2, bar1, his3</i>	Stephan Schröder-Köhne
<i>arfwt</i>	SCMIG22	<b>MATα</b> <i>ade2, his3, leu2, trp1, <u>ura3</u>, bar1</i>	Bianka Großhans
<i>arf3Δ</i>	SCMIG631	<b>MATα</b> <i>ade2, his3, leu2, trp1, <u>ura3</u>, bar1, arf3::LEU2</i>	Bianka Großhans
<i>arf1ts, arf2Δ, arf3Δ</i>	SCMIG561	<b>MATa</b> <i>ade2, lys2, <u>trp1</u>, his3, ura3, leu2, bar1 arf1-4::HIS3, arf2::URA3, arf3::LEU2</i>	Bianka Großhans
<i>αCOP-ts</i>	PC70	<b>MATα</b> <i><u>ura3</u>, leu2, trp1, ret1-1</i>	(Letourneur et al., 1994)
<i>sec23-ts</i>	RH1436	<b>MATa</b> <i>sec23-1, his4, leu2, <u>ura3</u>, bar1</i>	(Funato und Riezman, 2001)

**Tab 2: Verwendete Hefestämme**

Aufgeführt sind die Bezeichnungen der einzelnen Hefestämme und die zugehörigen Genotypen. Die unterstrichenen Selektionsmarker wurden zur Transformation mit GFP-PTS1 tragendem Vektor verwendet.

Um das peroxisomale Kompartiment im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden die einzelnen Hefestämme mit einem passenden Vektor transformiert, in den das grün-fluoreszierende Protein mit C-terminaler peroxisomaler Targetingsequenz vom Typ 1 (GFP-PTS1) subkloniert war. Dabei wurden verschiedene Selektionsmarker benutzt: die Stämme *SSY145* und *SSY146* wurden mit dem Vektor pRS315 (*leu2*) transformiert, für die Stämme *SCMIG22*, *SCMIG631*, *PC70* und *RH1436* wurde pRS416 (*ura3*) verwendet, und bei *SCMIG561* kam pRS414 (*trp1*) zum Einsatz. Die Transformation erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Sherman, 1991).

### 2.21.2 Kultivierung der Hefen

Generell wurden die Ausgangsstämme bei 25°C in YPD Vollmedium unter Schütteln kultiviert, wohingegen mit Vektor transformierte Stämme in synthetischem D-Glucose (SD-) Minimalmedium, das mit den entsprechenden auxotrophen Aminosäuren ergänzt war, kultiviert wurden.

Zur Induktion der Peroxisomen mit Oleat ließ man die Hefen zunächst in einer ÜN-Vorkultur in SD-Medium (15 ml) wachsen. Danach wurden die Zellen in SD-Medium auf eine  $OD_{600} = 0.1$  verdünnt und für die nachfolgenden 18 h in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, indem sie alle 6 h erneut auf  $OD_{600} = 0.1$  verdünnt wurden. Für Temperaturwechsel-Versuche (sog. *shift*-Experimente) mit temperatursensitiven (*-ts*) Mutanten wurden diese zunächst für 30 min bei der nicht-permissiven Temperatur (35°C)

inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und das SD-Medium durch Oleat-haltiges YNO-Medium, ebenfalls mit den individuell benötigten Aminosäuren ergänzt, ersetzt wurde, und die Inkubation bei 35°C für weitere 6 h fortgesetzt wurde. Für *ts*-Kontrollansätze und  $\Delta$ Mutanten entfiel die Vorinkubation bei 35°C; hier wurde nach dem Wechsel auf Oleat-medium ebenfalls für 6 h weiterhin bei 25°C inkubiert.

YPD-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose
SD-Medium	0.67 % <i>yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren, 2 % Glucose
YNO-Medium	0.67 % <i>yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren, 0.1 % Hefeextrakt, 0.1 % (w/v) Oleinsäure, 0.02 % (w/v) Tween 40
Aminosäuren	jeweils als 100-fach Stammlösung in ddH <sub>2</sub> O, autoklaviert: - Histidin, Methionin, Tryptophan, Uracil je 0.2 % (w/v) - Leucin, Lysin je 0.3 % (w/v)

### 2.21.3 Auswertung

Nach der individuellen Behandlung wurde die Vitalität der Zellen durch eine Methyleneblaufärbung abgeschätzt, bei der sich tote Zellen durch intensive Aufnahme des blauen Farbstoffes von lebenden unterscheiden. Dazu wird ein Aliquot der Kultur mit einem Tropfen der Färbelösung versetzt und lichtmikroskopisch untersucht; in der Regel lag die Vitalitätsrate auch bei Oleat-inkubierten Stämmen auf nicht-permissiver Temperatur bei mindestens 90 - 95 %. Um die Anzahl der Peroxisomen pro Zelle zu ermitteln, wurden die einzelnen Stämme unmittelbar nach der individuellen Inkubation in einen konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM) lebend analysiert (Leica TCS SP, Leica Microsystems, Bensheim). Dazu wurden die Zellen in einer Alginatmatrix immobilisiert (Smidsrod und Skjak-Braek, 1990), d.h. jeweils 1 ml der Kultur wurde sedimentiert (30 sec bei 6.000 Upm, Tischzentrifuge), in ca. 50  $\mu$ l Alginatlösung resuspendiert und davon 1 - 1.5  $\mu$ l auf einen Objektträger gegeben. Der Tropfen wurde mit einem Deckglas abgedeckt, sodaß sich die Probe gleichmäßig verteilt, und anschließend die Polymerisierung des Alginats durch Calcium initialisiert, indem am Deckglasrand umlaufend 1 - 2  $\mu$ l 50 mM CaCl<sub>2</sub> verteilt wurden, die durch Kapillarkräfte das Präparat vollständig durchdrangen.

Die Untersuchung im cLSM erfolgte mit einem 100x-Ölimmersionsobjektiv in einer Einstellung zur Analyse der GFP-Fluoreszenz (Anregung mit 488 nm, Emissionsdetektion: 500 - 560 nm, Pinhole 1 *airy unit*), wobei pro Bildausschnitt 9 aufeinander folgende Scanebenen, die die gesamte Präparatdicke von 3 - 4  $\mu$ m abdeckten, aufgenommen wurden.

Parallel zum Datensatz der Fluoreszenzbilder wurde auch ein Transmissionsbild aufgezeichnet. Zur Zählung der Zellen und der dazugehörigen Peroxisomen wurden die Ebenen 3, 5 und 7 zusammen mit dem Hellfeldbild übereinanderprojiziert (Software: Adobe Photoshop), das resultierende Bild ausgedruckt und die Zellen bzw. Peroxisomen pro Ausschnitt per Hand gezählt. Für jede einzelne Versuchsbedingung wurden mindestens 200 Zellen gezählt und der Mittelwert aus Peroxisomen- pro Zellzahl ermittelt. Darüber hinaus wurden für die Stämme SSY146 und SCMIG561 sog. Histogramme erstellt. Diese stellen dar, wie häufig Zellen mit einer bestimmten Peroxisomenzahl pro Zelle vorkommen, und geben dadurch Aufschluß über die Zusammensetzung der zuvor ermittelten Durchschnittswerte an Peroxisomen pro Zelle.

Methylenblau-färbelösung	Mischung aus: 2 ml 1 % (w/v) Methylenblau, 99.75 ml 0.2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ und 0.25 ml 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Alginatlösung	2 % <i>Alginic Acid</i> (#A7003, Sigma, Deisenhofen) in 50 mM Glycin (pH 6.2), sterilfiltriert

## 2.22 Arbeiten mit CHO-Zellen

### 2.22.1 Zellkultur

Es wurde eine CHO (*chinese hamster ovary*)-Zelllinie verwendet, die mit den beiden Konstrukten Pex11 $\alpha$ p und Pex11 $\beta$ p-Nmyc, das N-terminal die Sequenz für das myc-Epitop trug, stabil transfiziert war. Dabei war Pex11 $\alpha$ p in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 mit Neomycinresistenz kloniert (Paßreiter, 1999) und Pex11 $\beta$ p-Nmyc in pcDNA 3.1/Zeo, der Zeocinresistenz vermittelt (Kreiselmeier, 2002). Zunächst wurde ein Ein-Zell-Klon selektioniert, der eine starke und gleichmäßige Expression beider Proteine zeigte (Klon CHO NI-13). Für die Kultur der Zellen wurde  $\alpha$ -MEM (Stanners et al., 1971) verwendet, das ergänzt war mit 5 % (v/v) fötalem Kälberserum, 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (w/v) L-Glutamin, 500  $\mu\text{g/ml}$  G418 und 100  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin.

## 2.22.2 Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenz wurden die Zellen am Vortag auf sterile, runde Deckgläser (Ø 13 mm) derart ausgesät, daß am Folgetag ca. 70 bis 80 % Konfluenz erreicht wurde. Unmittelbar vor der Fixierung wurden die Zellen bei RT kurz in PBS-Dulbecco gewaschen, anschließend für 20 min bei RT fixiert und für 15 min bei RT permeabilisiert. Nachfolgend wurde 2x 10 min in reichlich PBS-IF gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer, wobei die Deckgläser mit dem Zellrasen auf einem Tropfen (ca. 45 µl) der geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in PBS-IF, 1 % (w/v) BSA zu liegen kamen. Nach 2x 10 min Waschen in PBS-IF erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper in Analogie zum Erstantikörper (30 min, 37°C, feuchte Kammer). Nach weiteren Waschschritten (2x 10 min in PBS-IF und kurz in ddH<sub>2</sub>O) wurden die Deckgläser mit der Zelleseite nach unten auf einen Tropfen (6 µl) Einbettlösung gelegt, bevor die Präparate ÜN bei 4°C aushärteten.

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiovert 35 mit 63-fach Ölimmersionsobjektiv. Zur Anregung der Fluoreszenz diente eine Quecksilberdampflampe (100 W) in Kombination mit den für FITC und TRIC geeigneten Filtersätzen (Filterset 10 bzw. 15, Zeiss, Göttingen). Die Dokumentation erfolgte digital (CCD-Camera AxioCam in Kombination mit Axiovision-Software, Zeiss). Die Nachbearbeitung wurde mit Photoshop 7 (Adobe) durchgeführt.

PBS-Dulbecco	s. Kapitel 2.13
PBS-IF	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 2.5 mM KCl (pH 7.4)
Fixierung	3 % (w/v) Paraformaldehyd, 1 % (v/v) Pikrinsäure in PBS-IF
Permeabilisierung	0.2 % (w/v) Saponin, 10 % (v/v) FCS in PBS-IF
Mowiol-Lösung	6 g Glycerin, 2.4 g Mowiol 4-88, 6 ml ddH <sub>2</sub> O, 12 ml 0.2 M Tris/HCl (pH 8.5)
p-Phenylendiamin	10 g/l in 0.1 M Tris/HCl (pH 8.8), frisch angesetzt
Einbettlösung	Mischung aus Mowiol-Lösung und p-Phenylendiamin (10:1)
Verdünnung der Antikörper:	s. Zusammenstellung in Kapitel 1.3

## 2.23 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Analyse der Leber von Ratten, die über 10 Tage sowohl mit Clofibrat als auch mit Thyroxin behandelt wurden (s.a. 2.2), erfolgte in Kooperation mit Dr. Karin Gorgas (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Heidelberg). Die Präparate wurden entsprechend Standardprotokollen fixiert und die peroxisomale Katalase cytochemisch mit 3,3'-Diaminobenzidin gefärbt; Einbettung erfolgte in Epon (Gorgas, 1985). Die Betrachtung der Ultradünnschnitte erfolgte in einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10, Zeiss, Oberkochen).

## 2.24 Inkubationen zur Analyse des ATP-Einflusses

### 2.24.1 Inkubationen von $^{35}\text{S}$ -markierten Peroxisomen

Pro Ansatz wurden 200  $\mu\text{g}$  metabolisch markierte Peroxisomen (2.13) mit 4-fachem Volumen Homopuffer+ gemischt und für 10 min bei 15.000  $\text{xg} / 4^\circ\text{C}$  sedimentiert, um sie von Nycodenz zu befreien. Danach wurden die Organellen in 160  $\mu\text{l}$  Homopuffer+ resuspendiert und mit 200  $\mu\text{l}$  Cytosol in Anwesenheit von ARS und 50  $\mu\text{M}$  GMP-PNP für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  gefolgt von 30 min auf Eis inkubiert. Dabei konnten einzelne Komponenten durch den entsprechenden Puffer ersetzt werden. Der gesamte Inkubationsansatz wurde anschließend auf einen 6 ml-Nycodenzgradienten (s. 2.14.3) geladen, für 1 h bei 80.000  $\text{xg} / 4^\circ\text{C}$  im Vertikalrotor (TV865, Sorvall, 30.000 Upm) zentrifugiert und danach der Gradient in 10 x 500  $\mu\text{l}$ , mit der höchsten Dichte beginnend, fraktioniert. Zur Analyse wurden von jeder Fraktion 150  $\mu\text{l}$  mit je 1 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  versetzt, die Organellen für 1 h bei 100.000  $\text{xg} / 4^\circ\text{C}$  (Rotor TLA 45, Beckman Coulter, 45.000 Upm) sedimentiert, in je 25  $\mu\text{l}$  1x SDS-Probenpuffer gelöst und durch eine 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteinbanden wurden durch Autoradiographie (s. 2.9.3) detektiert.

## 2.24.2 ATP und peroxisomale Subpopulation

### 2.24.2.1 Inkubation von Peroxisomen mit ATP

Für diese Inkubationen wurden frisch isolierte Peroxisomen verwendet (s. 2.14.2) verwendet. Pro Ansatz wurden 1 mg Peroxisomen von Nycodenz befreit, in 100 µl Homopuffer+ resuspendiert und mit 500 µl Puffer H und 75 µl ARS bzw. AMP-PNP (100 µM Endkonzentration) versetzt. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln für 30 min bei 37°C, gefolgt von 30 min auf Eis. Die Inkubationsansätze wurden auf zwei Arten untersucht.

### 2.24.2.2 Differentielles Zentrifugieren

Zum differentiellen Zentrifugieren wurden die Ansätze in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, das Volumen mit Homopuffer+ auf 1950 µl ergänzt und für 8 min bei 13.000 Upm / 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde unmittelbar nach der Zentrifugation in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, anschließend mit TCA präzipitiert (s. 2.6.1), in 40 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Sediment der differentiellen Zentrifugation wurde ebenfalls in 1x SDS-Probenpuffer (200 µl) gelöst und elektrophoretisch analysiert.

### 2.24.2.3 Flottieren im Dichtegradienten

Parallel zur differentiellen Zentrifugation wurden die Ansätze nach dem Kriterium der Dichte in einem Stufengradienten getrennt. Dazu wurde jede Probe durch Zugabe von 1.9 ml 70 % (w/v) Nycodenzlösung auf eine Dichte, die mindestens 50 % (w/v) Nycodenz entspricht, eingestellt und auf den Boden eines 5 ml-Zentrifugenröhrchens pipettiert (SW 50, Beckman Coulter), danach mit 1.5 ml 37 % (w/v) Nycodenzlösung und 300 µl Homopuffer+ überschichtet. Die Trennung erfolgte für 3 h bei 150.000 xg / 4°C in einem Ausschwingrotor (SW 55 Ti, Beckman Coulter, 40.000 Upm). An beiden Interphasen befand sich nach dem Lauf Material in einer scharfen Bande, die jeweils mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und passender Kanüle durch seitliches Anstechen des Zentrifugenröhrchens quantitativ gesammelt wurde. Beide Poolfraktionen wurden mit Aceton präzipitiert, in einem geeigneten Volumen 1x SDS-Probenpuffer gelöst und durch SDS-PAGE analysiert.

---

## V LITERATURVERZEICHNIS

- Abe I, K Okumoto, S Tamura and Y Fujiki (1998) Clofibrate-inducible, 28-kDa peroxisomal integral membrane protein is encoded by PEX11. *FEBS Lett* **431**, 468-472.
- Anton M, M Passreiter, D Lay, TP Thai, K Gorgas and WW Just (2000) ARF- and coatomer-mediated peroxisomal vesiculation. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**, 27-36.
- Antonny B, I Huber, S Paris, M Chabre and D Cassel (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* **272**, 30848-30851.
- Baerends RJ, SW Rasmussen, RE Hilbrands, M van der Heide, KN Faber, PT Reuvekamp, JA Kiel, JM Cregg, IJ van der Klei and M Veenhuis (1996) The Hansenula polymorpha PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity. *J Biol Chem* **271**, 8887-8894.
- Barlowe C, C d'Enfert and R Schekman (1993) Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**, 873-879.
- Barlowe C, L Orci, T Yeung, M Hosobuchi, S Hamamoto, N Salama, MF Rexach, M Ravazzola, M Amherdt and R Schekman (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.
- Baudhuin P, H Beaufay and C De Duve (1965) Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. Analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *J Cell Biol* **26**, 219-243.
- Bednarek SY, M Ravazzola, M Hosobuchi, M Amherdt, A Perrelet, R Schekman and L Orci (1995) COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* **83**, 1183-1196.
- Berg JS, BC Powell and RE Cheney (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* **12**, 780-794.
- Berger J and DE Moller (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **53**, 409-435.
- Berry MN and DS Friend (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **43**, 506-520.

- Bhakdi S, J Tranum-Jensen and A Sziegoleit (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun* **47**, 52-60.
- Biermanns M, J von Laar, U Brosius and J Gartner (2003) The peroxisomal membrane targeting elements of human peroxin 2 (PEX2). *Eur J Cell Biol* **82**, 155-162.
- Blagitko N, U Schulz, AA Schinzel, HH Ropers and VM Kalscheuer (1999) gamma2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Hum Mol Genet* **8**, 2387-2396.
- Bligh EG and WJ Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Boehm M and JS Bonifacino (2001) Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-2920.
- Bonifacino JS (2004) The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 23-32.
- Bradford MM (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.
- Breidenbach RW and H Beevers (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 462-469.
- Bremser M, W Nickel, M Schweikert, M Ravazzola, M Amherdt, CA Hughes, TH Sollner, JE Rothman and FT Wieland (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* **96**, 495-506.
- Chang CC, DS Warren, KA Sacksteder and SJ Gould (1999) PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J Cell Biol* **147**, 761-774.
- Cherkaoui-Malki M, K Meyer, WQ Cao, N Latruffe, AV Yeldandi, MS Rao, CA Bradfield and JK Reddy (2001) Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expr* **9**, 291-304.
- Collins CS, JE Kalish, JC Morrell, JM McCaffery and SJ Gould (2000) The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p, and pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *Mol Cell Biol* **20**, 7516-7526.
- Cosson P and F Letourneur (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-1631.
- Da Costa SR, E Sou, J Xie, FA Yarber, CT Okamoto, M Pidgeon, MM Kessels, AK Mircheff, JE Schechter, B Qualmann, *et al.* (2003) Impairing actin filament or syndapin functions promotes accumulation of clathrin-coated vesicles at the apical plasma membrane of acinar epithelial cells. *Mol Biol Cell* **14**, 4397-4413.

- De Duve C (1965) The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect* **59**, 49-87.
- De Duve C and P Baudhuin (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**, 323-357.
- De Matteis M, A Godi and D Corda (2002) Phosphoinositides and the golgi complex. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 434-447.
- de Vet EC, AW Zomer, GJ Lahaut and H van den Bosch (1997) Polymerase chain reaction-based cloning of alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase complementary DNA from guinea pig liver. *J Biol Chem* **272**, 798-803.
- Desvergne B and W Wahli (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**, 649-688.
- Dotz G and SJ Gould (1996) Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* **135**, 1763-1774.
- Donaldson JG (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-41576.
- Donaldson JG and CL Jackson (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 475-482.
- D'Souza-Schorey C, G Li, MI Colombo and PD Stahl (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**, 1175-1178.
- Duden R, L Kajikawa, L Wuestehube and R Schekman (1998) epsilon-COP is a structural component of coatamer that functions to stabilize alpha-COP. *Embo J* **17**, 985-995.
- Duronio RJ, E Jackson-Machelski, RO Heuckeroth, PO Olins, CS Devine, W Yonemoto, LW Slice, SS Taylor and JI Gordon (1990) Protein N-myristoylation in Escherichia coli: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1506-1510.
- Elgersma Y, L Kwast, M van den Berg, WB Snyder, B Distel, S Subramani and HF Tabak (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 and G Blobel (1995) Giant peroxisomes in oleic acid-induced Saccharomyces cerevisiae lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *J Cell Biol* **128**, 509-523.
- Faber KN, GJ Haan, RJ Baerends, AM Kram and M Veenhuis (2002) Normal peroxisome development from vesicles induced by truncated Hansenula polymorpha Pex3p. *J Biol Chem* **277**, 11026-11033.

- Franco M, S Paris and M Chabre (1995) The small G-protein ARF1GDP binds to the Gt beta gamma subunit of transducin, but not to Gt alpha GDP-Gt beta gamma. *FEBS Lett* **362**, 286-290.
- Fujiki Y, AL Hubbard, S Fowler and PB Lazarow (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **93**, 97-102.
- Funato K and H Riezman (2001) Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* **155**, 949-959.
- Futatsumori M, K Kasai, H Takatsu, HW Shin and K Nakayama (2000) Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits. *J Biochem (Tokyo)* **128**, 793-801.
- Geuze HJ, JL Murk, AK Stroobants, JM Griffith, MJ Kleijmeer, AJ Koster, AJ Verkleij, B Distel and HF Tabak (2003) Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* **14**, 2900-2907.
- Gomez M, SJ Scales, TE Kreis and F Perez (2000) Membrane recruitment of coatamer and binding to dilysine signals are separate events. *J Biol Chem* **275**, 29162-29169.
- Gommel DU, AR Memon, A Heiss, F Lottspeich, J Pfannstiel, J Lechner, C Reinhard, JB Helms, W Nickel and FT Wieland (2001) Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *Embo J* **20**, 6751-6760.
- Gorgas K (1985) Serial section analysis of mouse hepatic peroxisomes. *Anat Embryol (Berl)* **172**, 21-32.
- Gould SJ and CS Collins (2002) Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 382-389.
- Gould SJ, GA Keller, N Hosken, J Wilkinson and S Subramani (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**, 1657-1664.
- Guo Q, M Penman, BL Trigatti and M Krieger (1996) A single point mutation in epsilon-COP results in temperature-sensitive, lethal defects in membrane transport in a Chinese hamster ovary cell mutant. *J Biol Chem* **271**, 11191-11196.
- Guo Q, E Vasile and M Krieger (1994) Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP. *J Cell Biol* **125**, 1213-1224.
- Hajra AK, S Horie and KO Webber (1988) The role of peroxisomes in glycerol ether lipid metabolism. *Prog Clin Biol Res* **282**, 99-116.
- Harter C, J Pavel, F Coccia, E Draken, S Wegehangel, H Tschochner and F Wieland (1996) Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1902-1906.

- Hartl FU and WW Just (1987) Integral membrane polypeptides of rat liver peroxisomes: topology and response to different metabolic states. *Arch Biochem Biophys* **255**, 109-119.
- Hartl FU, WW Just, A Koster and H Schimassek (1985) Improved isolation and purification of rat liver peroxisomes by combined rate zonal and equilibrium density centrifugation. *Arch Biochem Biophys* **237**, 124-134.
- Hayashi S, S Fujiwara and T Noguchi (2000) Evolution of urate-degrading enzymes in animal peroxisomes. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**, 123-129.
- Heid HW, R Moll, I Schwetlick, HR Rackwitz and TW Keenan (1998) Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* **294**, 309-321.
- Helms JB, DJ Palmer and JE Rothman (1993) Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J Cell Biol* **121**, 751-760.
- Hicke L, T Yoshihisa and R Schekman (1992) Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **3**, 667-676.
- Hirst J and MS Robinson (1998) Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 173-193.
- Honda A, M Nogami, T Yokozeki, M Yamazaki, H Nakamura, H Watanabe, K Kawamoto, K Nakayama, AJ Morris, MA Frohman, *et al.* (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-532.
- Hosaka M, K Toda, H Takatsu, S Torii, K Murakami and K Nakayama (1996) Structure and intracellular localization of mouse ADP-ribosylation factors type 1 to type 6 (ARF1-ARF6). *J Biochem (Tokyo)* **120**, 813-819.
- Jackson MR, T Nilsson and PA Peterson (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J* **9**, 3153-3162.
- Jackson MR, T Nilsson and PA Peterson (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **121**, 317-333.
- Jeynov B, D Lay, F Schmidt, S Tahirovic and WW Just (2004) GTP-dependent and ARF1-mediated control of peroxisomal phosphoinositide levels. *JBC submitted*.
- Jones JM, JC Morrell and SJ Gould (2001) Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **153**, 1141-1150.
- Jones JM, JC Morrell and SJ Gould (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* **164**, 57-67.

- Just WW and H Schimassek (1980) Lack of ornithine decarboxylase activity in isolated rat liver parenchymal cells. *Eur J Cell Biol* **22**, 649-653.
- Kahn RA and AG Gilman (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* **261**, 7906-7911.
- Kalish JE, GA Keller, JC Morrell, SJ Mihalik, B Smith, JM Cregg and SJ Gould (1996) Characterization of a novel component of the peroxisomal protein import apparatus using fluorescent peroxisomal proteins. *Embo J* **15**, 3275-3285.
- Koch A, M Thiemann, M Grabenbauer, Y Yoon, MA McNiven and M Schrader (2003) Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* **278**, 8597-8605.
- Kreis TE (1986) Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *Embo J* **5**, 931-941.
- Kreiselmeier A (2002) Funktionelle Aspekte der zwei Pex11-Homologe Pex11-1 und Pex11-2 bei der Peroxisomenbiogenese in Säugern. *Dissertation*. Universität Heidelberg.
- Krisans SK (1992) The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 358-364.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazarow PB and Y Fujiki (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 489-530.
- Lee FJ, LA Stevens, YL Kao, J Moss and M Vaughan (1994) Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 20931-20937.
- Letourneur F, EC Gaynor, S Hennecke, C Demolliere, R Duden, SD Emr, H Riezman and P Cosson (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207.
- Li X, E Baumgart, GX Dong, JC Morrell, G Jimenez-Sanchez, D Valle, KD Smith and SJ Gould (2002) PEX11 $\alpha$  is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -mediated peroxisome proliferation. *Mol Cell Biol* **22**, 8226-8240.
- Li X and SJ Gould (2002) PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol* **156**, 643-651.
- Li X and SJ Gould (2003) The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J Biol Chem* **278**, 17012-17020.

- Maier AG, S Schulreich, M Bremser and C Clayton (2000) Binding of coatomer by the PEX11 C-terminus is not required for function. *FEBS Lett* **484**, 82-86.
- Mannaerts GP, PP Van Veldhoven and M Casteels (2000) Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**, 73-87.
- Marshall PA, YI Krimkevich, RH Lark, JM Dyer, M Veenhuis and JM Goodman (1995) Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J Cell Biol* **129**, 345-355.
- Matsumoto N, S Tamura and Y Fujiki (2003) The pathogenic peroxin Pex26p recruits the Pex1p-Pex6p AAA ATPase complexes to peroxisomes. *Nat Cell Biol* **5**, 454-460.
- McNiven MA, H Cao, KR Pitts and Y Yoon (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci* **25**, 115-120.
- Moser HW (1999) Genotype-phenotype correlations in disorders of peroxisome biogenesis. *Mol Genet Metab* **68**, 316-327.
- Moss J and M Vaughan (1995) Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem* **270**, 12327-12330.
- Moss J and M Vaughan (1998) Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* **273**, 21431-21434.
- Nagan N and RA Zoeller (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* **40**, 199-229.
- Nakano A and M Muramatsu (1989) A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **109**, 2677-2691.
- Nickel W, B Brugger and FT Wieland (2002) Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J Cell Sci* **115**, 3235-3240.
- Nickel W, J Malsam, K Gorgas, M Ravazzola, N Jenne, JB Helms and FT Wieland (1998) Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci* **111 ( Pt 20)**, 3081-3090.
- Nie Z, DS Hirsch and PA Randazzo (2003) Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 396-404.
- Nilsson T, M Jackson and PA Peterson (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**, 707-718.
- Novikoff AB and PM Novikoff (1982) Microperoxisomes and peroxisomes in relation to lipid metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **386**, 138-152.
- Novikoff AB and WJ Shin (1964) The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microsc* **3**, 187-206.

- Oakley BR, DR Kirsch and NR Morris (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **105**, 361-363.
- Okumoto K, I Abe and Y Fujiki (2000) Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p. *J Biol Chem* **275**, 25700-25710.
- Opperdoes FR and P Borst (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* **80**, 360-364.
- Orci L, A Perrelet, M Ravazzola, M Amherdt, JE Rothman and R Schekman (1994) Coatamer-rich endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11924-11928.
- Orci L, M Stannes, M Ravazzola, M Amherdt, A Perrelet, TH Sollner and JE Rothman (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-349.
- Orth JD and MA McNiven (2003) Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 31-39.
- Palmer DJ, JB Helms, CJ Beckers, L Orci and JE Rothman (1993) Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem* **268**, 12083-12089.
- Paßreiter M (1999) Permeabilität und Biogenese von Peroxisomen: Charakterisierung beteiligter Membrankomponenten. *Dissertation*. Universität Heidelberg.
- Passreiter M, M Anton, D Lay, R Frank, C Harter, FT Wieland, K Gorgas and WW Just (1998) Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatamer. *J Cell Biol* **141**, 373-383.
- Pause B, R Saffrich, A Hunziker, W Ansorge and WW Just (2000) Targeting of the 22 kDa integral peroxisomal membrane protein. *FEBS Lett* **471**, 23-28.
- Peters PJ, VW Hsu, CE Ooi, D Finazzi, SB Teal, V Oorschot, JG Donaldson and RD Klausner (1995) Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol* **128**, 1003-1017.
- Pryer NK, NR Salama, R Schekman and CA Kaiser (1993) Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J Cell Biol* **120**, 865-875.
- Purdue PE and PB Lazarow (2001) Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 701-752.
- Radhakrishna H and JG Donaldson (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *J Cell Biol* **139**, 49-61.
- Randazzo PA, Z Nie, K Miura and VW Hsu (2000) Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci STKE* **2000**, RE1.

- Rapp S, U Soto and WW Just (1993) Import of firefly luciferase into peroxisomes of permeabilized Chinese hamster ovary cells: a model system to study peroxisomal protein import in vitro. *Exp Cell Res* **205**, 59-65.
- Reddy JK and R Chu (1996) Peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses: pursuit of a phenomenon. *Ann N Y Acad Sci* **804**, 176-201.
- Reddy JK and TP Krishnakantha (1975) Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science* **190**, 787-789.
- Reinhard C, C Harter, M Bremser, B Brugger, K Sohn, JB Helms and F Wieland (1999) Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1224-1228.
- Rhodin J (1954) Correlation of ultrastructural organisation and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of mouse kidney. *Dissertation*. Stockholm.
- Roth MG (1999a) Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol* **9**, 174-179.
- Roth MG (1999b) Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation. *Cell* **97**, 149-152.
- Roth MG, K Bi, NT Ktistakis and S Yu (1999) Phospholipase D as an effector for ADP-ribosylation factor in the regulation of vesicular traffic. *Chem Phys Lipids* **98**, 141-152.
- Rothman JE and FT Wieland (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.
- Rottensteiner H, K Stein, E Sonnenhol and R Erdmann (2003) Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 4316-4328.
- Rouser G, S Fkeischer and A Yamamoto (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-496.
- Sacksteder KA and SJ Gould (2000) The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet* **34**, 623-652.
- Sacksteder KA, JM Jones, ST South, X Li, Y Liu and SJ Gould (2000) PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol* **148**, 931-944.
- Salama NR, T Yeung and RW Schekman (1993) The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *Embo J* **12**, 4073-4082.

- Santos MJ, T Imanaka, H Shio, GM Small and PB Lazarow (1988) Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome--aberrant organelle assembly. *Science* **239**, 1536-1538.
- Satyagraha A (2003) Analysis of kinectin and small GTPases on peroxisomes. *Dissertation*. Universität Heidelberg.
- Schafer DA, C D'Souza-Schorey and JA Cooper (2000) Actin assembly at membranes controlled by ARF6. *Traffic* **1**, 892-903.
- Schekman R and L Orci (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Schneiter R, B Brugger, R Sandhoff, G Zellnig, A Leber, M Lampl, K Athenstaedt, C Hrastnik, S Eder, G Daum, *et al.* (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* **146**, 741-754.
- Schrader M, BE Reuber, JC Morrell, G Jimenez-Sanchez, C Obie, TA Stroh, D Valle, TA Schroer and SJ Gould (1998) Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem* **273**, 29607-29614.
- Serafini T, L Orci, M Amherdt, M Brunner, RA Kahn and JE Rothman (1991) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-253.
- Serafini T and JE Rothman (1992) Purification of Golgi cisternae-derived non-clathrin-coated vesicles. *Methods Enzymol* **219**, 286-299.
- Sherman F (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **194**, 3-21.
- Shimizu M, A Takeshita, T Tsukamoto, FJ Gonzalez and T Osumi (2004) Tissue-selective, bidirectional regulation of PEX11 alpha and perilipin genes through a common peroxisome proliferator response element. *Mol Cell Biol* **24**, 1313-1323.
- Smidsrod O and G Skjak-Braek (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* **8**, 71-78.
- Smith JJ, RK Szilard, M Marelli and RA Rachubinski (1997) The peroxin Pex17p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is associated peripherally with the peroxisomal membrane and is required for the import of a subset of matrix proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 2511-2520.
- Smith KD, S Kemp, LT Braiterman, JF Lu, HM Wei, M Geraghty, G Stetten, JS Bergin, J Pevsner and PA Watkins (1999) X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res* **24**, 521-535.
- Snyder WB, A Koller, AJ Choy, MA Johnson, JM Cregg, L Rangell, GA Keller and S Subramani (1999) Pex17p is required for import of both peroxisome membrane and luminal proteins and interacts with Pex19p and the peroxisome targeting signal-receptor docking complex in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell* **10**, 4005-4019.

- Sohn K, L Orci, M Ravazzola, M Amherdt, M Bremser, F Lottspeich, K Fiedler, JB Helms and FT Wieland (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol* **135**, 1239-1248.
- Spang A, K Matsuoka, S Hamamoto, R Schekman and L Orci (1998) Coatomer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11199-11204.
- Stanners CP, GL Eliceiri and H Green (1971) Two types of ribosome in mouse-hamster hybrid cells. *Nat New Biol* **230**, 52-54.
- Swinkels BW, SJ Gould, AG Bodnar, RA Rachubinski and S Subramani (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Embo J* **10**, 3255-3262.
- Swinkels BW, SJ Gould and S Subramani (1992) Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett* **305**, 133-136.
- Takai Y, T Sasaki and T Matozaki (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- Tanaka A, K Okumoto and Y Fujiki (2003) cDNA cloning and characterization of the third isoform of human peroxin Pex11p. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 819-823.
- Thai TP, H Heid, HR Rackwitz, A Hunziker, K Gorgas and WW Just (1997) Ether lipid biosynthesis: isolation and molecular characterization of human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase. *FEBS Lett* **420**, 205-211.
- Titorenko VI and RA Rachubinski (1998) Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 2789-2803.
- Toker A (1998) The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 254-261.
- Townsley FM and HR Pelham (1994) The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur J Cell Biol* **64**, 211-216.
- Trotter PJ (2001) The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **21**, 97-119.
- van Roermund CW, HR Waterham, L Ijlst and RJ Wanders (2003) Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1838-1851.
- Vance JE (2003) Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **75**, 69-111.
- Vizeacoumar FJ, JC Torres-Guzman, D Bouard, JD Aitchison and RA Rachubinski (2004) Pex30p, Pex31p, and Pex32p Form a Family of Peroxisomal Integral Membrane Proteins Regulating Peroxisome Size and Number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 665-677.

- Wanders RJ (1999) Peroxisomal disorders: clinical, biochemical, and molecular aspects. *Neurochem Res* **24**, 565-580.
- Wanders RJ, EG van Grunsven and GA Jansen (2000) Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid alpha- and beta-oxidation systems in humans. *Biochem Soc Trans* **28**, 141-149.
- Wang X, MA McMahon, SN Shelton, M Nampaisansuk, JL Ballard and JM Goodman (2004) Multiple Targeting Modules on Peroxisomal Proteins Are Not Redundant: Discrete Functions of Targeting Signals within Pmp47 and Pex8p. *Mol Biol Cell*.
- Waters MG, T Serafini and JE Rothman (1991) 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**, 248-251.
- Wegmann D, P Hess, C Baier, FT Wieland and C Reinhard (2004) Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals. *Mol Cell Biol* **24**, 1070-1080.
- Weller S, SJ Gould and D Valle (2003) Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **4**, 165-211.
- Yin HL and PA Janmey (2003) Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**, 761-789.
- Yu S and MG Roth (2002) Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. *Mol Biol Cell* **13**, 2559-2570.
- Zatloukal K, C Stumptner, A Fuchsbichler, H Heid, M Schnoelzer, L Kenner, R Kleinert, M Prinz, A Aguzzi and H Denk (2002) p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* **160**, 255-263.
- Zhao L, JB Helms, B Brugger, C Harter, B Martoglio, R Graf, J Brunner and FT Wieland (1997) Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4418-4423.
- Zhao L, JB Helms, J Brunner and FT Wieland (1999) GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem* **274**, 14198-14203.

---

## **PUBLIKATIONEN**

- Lay D**, B Großhans, H Heid, K Nakayama, K Gorgas and WW Just (2004) Binding of ARF on mammalian and yeast peroxisomes. *J Biol Chem* (in revision).
- Jeynov B, **D Lay**, F Schmidt, S Tahirovic and WW Just (2004) GTP-dependent and ARF1-mediated control of peroxisomal phosphoinositide levels. *J Biol Chem* (in revision).
- Eisenhut M, WE Hull, A Mohammed, W Mier, **D Lay**, W Just, K Gorgas, WD Lehmann and U Haberkorn (2000) Radioiodinated N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization. *J Med Chem* **43**, 3913-3922.
- Anton M, M Passreiter, **D Lay**, TP Thai, K Gorgas and WW Just (2000) ARF- and coatomer-mediated peroxisomal vesiculation. *Cell Biochem Biophys* **32 Spring**, 27-36.
- Passreiter M, M Anton, **D Lay**, R Frank, C Harter, FT Wieland, K Gorgas and WW Just (1998) Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatomer. *J Cell Biol* **141**, 373-383.

## **DANKSAGUNG**

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Felix Wieland für die freundliche Aufnahme am Institut, das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Fakultät für Biowissenschaften zu vertreten.

Prof. Wilhelm Just für die äußerst spannende Themenstellung und die Betreuung dieser Arbeit verbunden mit einem regen Interesse für deren Gelingen, sowie für die zahlreichen stimulierenden Diskussionen, aufgrund derer mein Interesse an biochemischen und zellbiologischen Fragestellungen weiter wuchs.

Prof. Karin Gorgas für die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen, verbunden mit der Möglichkeit, mein Spektrum an biochemischen Methoden und ausgefeilten Immunfluoreszenztechniken deutlich zu erweitern.

Dr. Michael Schweikert für die spontane Bereitschaft, mir erste elektronenmikroskopische Einblicke in meine peroxisomalen Vesikelpopulationen zu verschaffen.

Dr. Britta Brügger, Dr. Bernd Helms und allen nicht genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland für die freundliche Unterstützung mit Rattenleber-Golgi, dem ARF-Antikörper 2048 und weiteren Antikörpern zur Detektion von Coatomer und p23.

Dres. Stephan Schröder-Köhne und Bianka Großhans für die freundliche Überlassung aller *arf1*- und *arf3Δ*-Hefemutanten.

Dres. Hans Heid und Johannes Lechner für die MALDI- und Edman-Analysen.

Jutta Worsch dafür, daß sie mir in den letzten Jahren mehr als nur zwei helfende Hände war und maßgeblich zum Gelingen vieler Experimente dieser Arbeit beigetragen hat, und Constanze Reinhard für die ungezählten spannenden Diskussionen und ihre nicht zu bezahlende Hilfsbereitschaft in Situationen, in denen es mal nicht so lief. Danke Euch beiden; mit Euch hat's richtig Spaß gemacht!

Ari Satyagraha, Boyan Jeynov, Claus Rodemer und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Just für eine prima motivierende Laboratmosphäre, ohne die manch langes Experiment nur halb soviel Freude gemacht hätte.

Marco Düring für die exzellenten Tipps in allen Computerfragen und sein ausgezeichnetes Gespür in stilistischen Fragen.

Allen Freunden in und um Heidelberg für entspannte Stunden außerhalb des Labors.

Meinen Eltern und Patrik für die großartige Unterstützung in den letzten Jahren und den bedingungslosen Rückhalt in der Familie.