

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen zur Biogenese von Microbodies in *Neurospora crassa* durchgeführt werden. Bei den filamentösen Euscomyceten treten mit den Glyoxysomen und Woronin bodies zwei Microbody-Typen gleichzeitig in einem Kompartiment auf. Während für Glyoxysomen schon verschiedene enzymatische Reaktionen beschrieben wurden (Kionka und Kunau 1985) und auch die an ihrer Biogenese beteiligten Proteine identifiziert wurden (Sichting et al. 2003), konnte für Woronin bodies mit HEX-1 bisher nur ein Protein charakterisiert werden (Jedd und Chua 2000; Yuan et al. 2003). Jedoch wurde gelegentlich durch Messungen enzymatischer Aktivitäten das Vorkommen einer Katalase in Woronin bodies gefordert (Keller et al. 1991; Tenney et al. 2000). In einem Teilprojekt dieser Arbeit sollte diese Katalase identifiziert werden. Dabei zeigten sich in nativen Aktivitätsgelen drei unterschiedliche Katalaseisoformen, die den drei bekannten *Neurospora crassa* Katalasen zugeordnet wurden. Keine dieser Katalasen war durch Aktivitätsgele oder Western Blots in Microbodies detektierbar. Die Suche nach weiteren putativen, für Katalase kodierenden Genen im Genom von *N. crassa* führte zur Identifizierung des *cat-4* Gens, dessen korrespondierendes Protein starke Homologie zu der Klasse der peroxisomalen Katalasen aufweist. Sowohl heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* als auch konstitutiv in *N. crassa* exprimiertes CAT-4 zeigte keine Lokalisation in Microbodies, besaß jedoch deutliche Katalaseaktivität. Ein *in silico* Vergleich von CAT-4 mit homologen Proteinen anderer eng verwandter Pilze zeigte, dass die Sordariomyceten keine peroxisomale Katalase besitzen, während die Eurotiomyceten eine solche aufweisen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass *N. crassa* keine Peroxisomen im engeren Sinne besitzt.

Ebenso sollte die subzelluläre Lokalisation des an der Fruchtkörperentwicklung beteiligten Proteins PRO40 aus *Sordaria macrospora* bestimmt werden. In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik der Ruhr-Universität Bochum wurde ein PRO40-DsRed Fusionsprotein in der Nähe von Septen lokalisiert. Eindeutige Hinweise auf eine Assoziation des PRO40-Proteins mit Woronin bodies lieferten Kolokalisationsstudien mit GFP-HEX-1, sowie ein biochemischer Nachweis von PRO40-DsRed in der Organellenfraktion. Eine Beteiligung des PRO40 Proteins an der Biogenese der Glyoxysomen und Woronin bodies wurde nach phänotypischer Analyse eines *pro40Δ* Stammes jedoch ausgeschlossen. Es wäre denkbar, dass die Assoziation von PRO40 mit Woronin bodies bei der Fruchtkörperbildung benötigt wird.

Neben der Identifizierung neuer Woronin body Proteine stellte die Studie der Biogenese von Woronin bodies und Glyoxysomen in *N. crassa* einen Kernpunkt dieser Arbeit dar. Sowohl die bisher bekannten glyoxysomalen Proteine aus *N. crassa* als auch das HEX-1 Protein weisen klassische peroxisomale Signalsequenzen auf. Jedoch konnte das HEX-1 Protein nur in Woronin bodies nachgewiesen werden, während glyoxysomale Proteine ausschließlich in Glyoxysomen gefunden wurden. Eine umfassende Charakterisierung des PEX14 Proteins sollte klären, ob es einen gemeinsamen Weg oder getrennte Importwege für die jeweiligen Proteine gibt. Das PEX14 Protein zeigte nicht nur „Two Hybrid“-Interaktionen mit dem Matrixprotein-Importrezeptoren und Teilen des „Dockingkomplexes“, sondern wies auch eine glyoxysomale Lokalisation auf, während PEX14 in Woronin bodies allenfalls in Spuren detektierbar war. Die Charakterisierung des Phänotyps einer *pex14Δ* Mutante zeigte einen schwerwiegenden Wachstumsdefekt auf Ölsäure, hervorgerufen durch eine fehlerhafte Fettsäure β -Oxidation. Ebenso wies die Mutante einen starken Zytoplasmaausfluss, bedingt durch fehlende Woronin bodies, auf. Das Fluoreszenzsignal eines GFP-HEX-1 Konstrukts wurde sowohl in Woronin bodies als auch in Glyoxysomen beobachtet, wobei diese Lokalisation abhängig von der C-terminalen PTS1-Sequenz war. Auf Grund dieser Daten ist davon auszugehen, dass HEX-1 über den bekannten PEX14-abhängigen PTS1 Importweg zuerst in Glyoxysomen transportiert wird. Über einen unbekanntem Teilungsmechanismus erfolgt dann die Abspaltung der Woronin bodies von den Glyoxysomen. Um zu überprüfen, ob dazu Komponenten benötigt werden, welche in Spezies ohne Woronin bodies fehlen, wurde das HEX-1 Protein heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Dabei zeigte sich, dass der PTS1-abhängige HEX-1 Import über die Ausbildung eines HEX-1 Kristalls in Peroxisomen erfolgt und anschließend Woronin body-ähnliche Organellen unter Beteiligung der Proteine VPS1 und DNM1 abgeschnürt werden. Die beobachteten Woronin body-ähnlichen Organellen hatten zwar eine hexagonale Form, wiesen jedoch nicht die für Woronin bodies filamentöser Pilze typische Dichte auf. HEX-1 ist somit maßgeblich an der Woronin body Biogenese beteiligt, scheint aber auf zusätzliche Faktoren angewiesen zu sein, um die dichten, funktionsfähigen Organellen auszubilden, wie sie in filamentösen Pilzen auftreten.