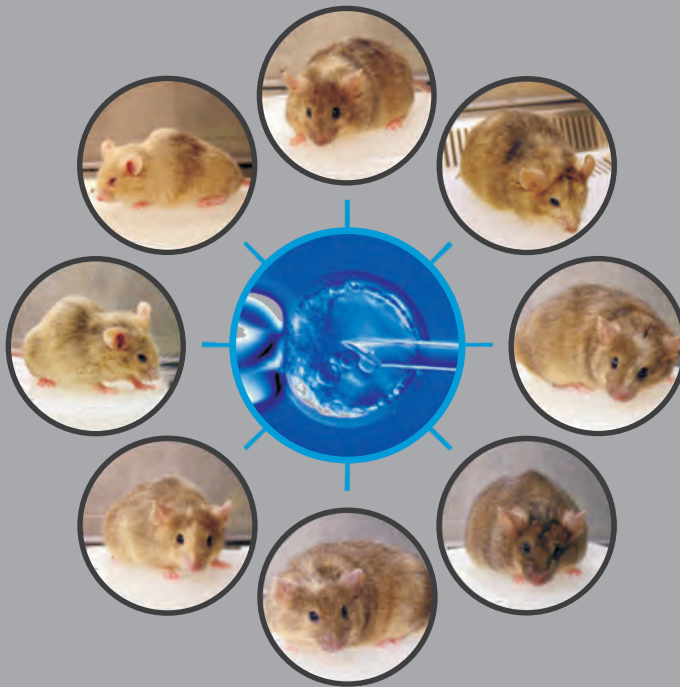


# Generierung und Charakterisierung eines neuen Tiermodells für Zellweger Syndrom (PEX19 KO-Maus) zum Studium der peroxisomalen Membranbiogenese

**ANJA BECK**



## DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie und Chemie der  
Justus-Liebig-Universität  
Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Generierung und Charakterisierung eines neuen Tiermodells  
für Zellweger Syndrom (PEX19 KO-Maus) zum Studium der  
peroxisomalen Membranbiogenese**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
im Fachbereich Biologie und Chemie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Diplom-Biologin  
**Anja Christina Beck**  
aus Gießen

Gießen 2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie II des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt durchgeführt.

1. Gutachten: Prof. Dr. Manfred Kröger

Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Fachbereich Biologie und Chemie,  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachten: Prof. Dr. Tina E. Trenczek

Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, Fachbereich Biologie und Chemie,  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Diese Dissertation wird mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der vorliegenden Form in der Deutschen Nationalbibliothek (<http://www.d-nb.de>) veröffentlicht.

Teile der Dissertation wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

## Posterpräsentation:

- 2008** 103. Internationaler Kongress der Anatomischen Gesellschaft, Innsbruck  
Anja Beck, Elke Richter, James C. Morrell, Jürgen Okun, Stephen J. Gould, Eveline Baumgart-Vogt  
Mistargeting of peroxisomal proteins into distinct subcellular compartments in peroxisomal biogenesis disorders: PEX19-KO mice as a new model system  
*Poster Abstract Booklet DOI 10.3337/anatges.2008.0006, Nr. 145*

### AUSGEZEICHNET MIT DEM POSTERPREIS DER ANATOMISCHEN GESELLSCHAFT

- 2007** 102. Internationaler Kongress der Anatomischen Gesellschaft, Gießen,  
Anja Beck, James C. Morrell, Georg H. Lüers, Stephen J. Gould, Eveline Baumgart-Vogt  
The PEX19-knockout mouse - a new model for Zellweger Syndrome and to study peroxisomal membrane biogenesis  
*Poster Abstracts Booklet DOI 10.3337/anatges.2007.0001, Nr. 83*

- 2007** 30. Internationale Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Frankfurt am Main  
Beck A., Morrell J.C., Gould S.J., Baumgart-Vogt E.  
The PEX19-knockout mouse - a model to study peroxisomal membrane biogenesis  
*Eur J Cell Biol. 86S1, Suppl. 57 (2007): 54*

### AUSGEZEICHNET MIT DEM POSTERPREIS DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR ZELLBIOLOGIE



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Peroxisomen .....	1
1.2 Biogenese von Peroxisomen .....	2
1.2.1 Import von Matrixproteinen in Peroxisomen .....	2
1.2.2 Biogenese der Peroxisomenmembran.....	5
1.2.3 PEX19 und Pex19p - Aufbau und Funktion .....	8
1.3 Metabolische Funktionen von Peroxisomen.....	10
1.3.1 $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren.....	10
1.3.2 $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren.....	11
1.3.3 Biosynthese von Etherphospholipiden.....	15
1.3.4 Biosynthese von Cholesterin und Isoprenoidderivaten.....	16
1.4 Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen.....	16
1.5 Mausmodelle peroxisomaler Erkrankungen.....	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2. Material</b> .....	<b>22</b>
2.1 Chemikalien .....	22
2.2 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme.....	22
2.3 Enzym- und Aufreinigungssysteme (Kits) .....	22
2.4 Molekulargewichtsmarker .....	23
2.5 Vektoren.....	23
2.6 Bakterienstämme .....	24
2.7 Mausstämme.....	24
2.8 Sonstiges .....	24
2.9 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	24
2.10 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie.....	25
2.11 Medien für die Bakterienkultur .....	25
2.12 Medium für die Zellkultur .....	25
2.13 Puffer und Lösungen für die Biochemie .....	26
2.14 Puffer und Lösungen für die Histologie .....	26
2.15 Puffer und Lösungen für die Elektronenmikroskopie .....	27
2.16 Lösungen für die Immunfluoreszenz .....	27
2.17 Antikörper.....	28



2.18 Oligonukleotide .....	29
<b>3. Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	32
3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe .....	32
3.1.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	33
3.1.3 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	34
3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe .....	34
3.1.5 „Schnelle“ Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien .....	35
3.1.6 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren .....	36
3.1.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	36
3.1.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	37
3.1.9 DNA-Amplifikation (Polymerasekettenreaktion, PCR) .....	37
3.1.10 DNA-Sequenzierung .....	39
3.2 Methoden zur Klonierung .....	41
3.2.1 Schnelle Isolierung von Plasmid-DNA .....	41
3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Qiagen-Säulen .....	41
3.2.3 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	43
3.2.4 Restriktionsanalyse .....	44
3.2.5 Entfernung endständiger Phosphatgruppen (Dephosphorylierung) .....	44
3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	45
3.2.7 Ligation .....	45
3.2.8 Kultivierung von E.coli .....	46
3.2.9 Anlegen von Glycerinkulturen .....	46
3.2.10 Herstellung elektrokompetenter Bakterien .....	47
3.2.11 Transformation von E.coli durch Elektroporation .....	47
3.2.12 Blau-Weiß-Screening ( $\alpha$ -Komplementation) .....	48
3.2.13 Kolonie-PCR .....	49
3.2.14 Gerichtete Mutagenese .....	49
3.3 Biochemische Methoden .....	50
3.3.1 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation .....	50
3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	52
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese .....	53
3.3.4 Herstellung von Western Blots .....	54
3.3.5 Färbung von Western Blots mit Ponceaurot .....	55
3.3.6 Immunchemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen .....	55
3.3.7 Lipidanalysen .....	56

3.4. Zellkulturmethoden.....	58
3.4.1 Präparation embryonaler Mausfibroblasten.....	58
3.4.2 Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten.....	58
3.4.3 Passagieren von adhärennten Zellen.....	58
3.4.4 Zellzahlbestimmung.....	59
3.4.5 Kryokonservierung embryonaler Mausfibroblasten.....	59
3.4.6 Mikroporation embryonaler Mausfibroblasten.....	60
3.4.7 Markierung von Zellorganellen mit <i>in vivo</i> Fluoreszenz-Farbstoffen.....	61
3.4.8 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz-färbung.....	61
3.5 Fixierung von Geweben für Licht- und Elektronenmikroskopie.....	62
3.5.1 Perfusionsfixierung.....	62
3.5.2 Immersionsfixierung von Gewebe.....	62
3.6 Methoden für die Lichtmikroskopie.....	63
3.6.1 Paraffineinbettung.....	63
3.6.2 Herstellung von Paraffinschnitten.....	63
3.6.3 Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten.....	64
3.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellen.....	65
3.6.5 Zellkerngegenfärbung.....	65
3.7 Elektronenmikroskopie.....	66
3.7.1 Herstellung von Vibratom-Schnitten.....	66
3.7.2 Postfixierung mit reduziertem Osmiumtetroxid.....	66
3.7.3 Cytochemischer Nachweis von Katalase durch alkalische DAB-Reaktion.....	66
3.7.4 Einbettung in Epoxidharz ( <i>Agar 100 Epoxy Resin</i> ).....	67
3.7.5 Herstellung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung.....	68
3.8 Generierung einer PEX19-Knockout-Mauslinie.....	68
3.8.1 Isolierung genomischer PEX19-DNA.....	71
3.8.2 Klonierung des PEX19-Targeting-Vektors.....	71
3.8.3 Transfektion embryonaler Stammzellen und Generierung von chimären Mäusen.....	72
3.8.4 Testen der chimären Mäuse auf Keimbahntransmission.....	74
3.8.5 Aufbau congener Mauslinien.....	74
3.9 Tierexperimentelle Arbeiten.....	75
3.9.1 Tierversuchsgenehmigungen.....	75
3.9.2 Entnahme von Schwanzbiopsien.....	75
3.9.3 Identifikation der Tiere.....	75
3.9.4 Narkotisierung und Tötung von Versuchstieren.....	76
3.9.5 Blutentnahme.....	76

---

<b>4. Ergebnisse mit Erläuterungen</b> .....	<b>77</b>
4.1 Klonierung des PEX19-Targeting-Vektors .....	77
4.1.1 Identifizierung des BAC-Klons .....	77
4.1.2 Klonierung des PEX19-Targetingvektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen .....	79
4.1.3 Sequenzierung des PEX19-Gens .....	80
4.2 Generierung chimärer PEX19-Mäuse .....	84
4.2.1 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen .....	85
4.2.2 Nachweis der homologen Rekombination .....	85
4.2.3 Generierung chimärer Mäuse .....	86
4.3. Aufbau von PEX19-defizienten Mauslinien .....	87
4.3.1 Genotypisierung mittels PCR .....	87
4.3.2 Nachweis der Keimbahntransmission.....	88
4.4 Charakterisierung der PEX19-defizienten Mauslinie 129/BL6-PEX19tm3B9.....	90
4.4.1 Phänotypische Analyse von PEX19 KO-Mäusen .....	91
4.4.2 Analyse des Gendefektes auf Transkriptionsebene .....	92
4.4.3 Analyse des Gendefektes auf Proteinebene.....	96
4.4.4 Nachweis der Peroxisomendefizienz .....	102
4.4.5 Biochemische Analyse der Peroxisomenfunktion bei PEX19-Mäusen .....	106
4.5 Untersuchungen zur peroxisomalen Biogenese an PEX19-defizienten embryonalen Fibroblasten in Zellkultur .....	108
4.5.1 Charakterisierung der PEX19-defizienten embryonalen Fibroblasten (MEFs) ...	108
4.5.2 Klonierung von Expressionsvektoren.....	111
4.5.3 Komplementationsversuche zur funktionellen Analyse des PEX19-Proteins (Pex19p) .....	115
4.5.4 Zeitlicher Verlauf der peroxisomalen Biogenese .....	116
4.5.5 Lokalisation von Katalase, Pex14p und ABCD3 während der Peroxisomenbiogenese .....	121
<b>5. Diskussion und Ausblick</b> .....	<b>122</b>
5.1 Die PEX19 KO-Maus.....	122
5.1.1 Verwendung isogener DNA .....	123
5.1.2 Konstruktion des Targetingvektors .....	124
5.1.3 Generierung chimärer Mäuse .....	125
5.1.4 Vor- und Nachteile des konventionellen „gene targetings“ von PEX19 .....	125
5.1.5 Zucht in verschiedenen genetischen Hintergründen.....	128

5.2 Charakterisierung der PEX19 KO-Maus mit C57BL/6JCrI-Hintergrund als neues Mausmodell für Zellweger Syndrom.....	129
5.2.1 Nachweis peroxisomaler Membranstrukturen.....	129
5.2.2 Mislokalisierung peroxisomaler Proteine in PEX19 KO-Mäusen .....	132
5.2.3 Biochemische Veränderungen ausgesuchter Fettsäuren und von Plasmalogenen in PEX19 KO-Mäusen.....	134
5.3. Auswirkung der Peroxisomendefizienz auf zelluläre Signalwege .....	138
5.4. Zellbiologische Untersuchungen mit PEX19-defizienten embryonalen Mausfibroblasten.....	140
5.5 Ausblick.....	144
<b>6. Literatur .....</b>	<b>146</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>165</b>
7.1 Sequenzen .....	165
7.1.1 Sequenzierter Bereich des PEX19-Targetingvektors .....	165
7.1.2 Proteinsequenzen.....	168
7.2 Statistische Auswertung der biochemischen Daten .....	169
7.2.1 Gesättigte Fettsäuren .....	169
7.2.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren .....	171
7.2.3 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren .....	172
7.2.4 Verzweigt-kettige Fettsäuren .....	175
7.2.5 Plasmalogene .....	176
7.3 Plasmidkarten.....	176
7.3.1 Vektoren.....	176
7.3.2 Expressions-Klone aus Klonierung mit pCI-neo .....	178
7.3.3 Organellenmarker (Peroxisomen).....	178
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>179</b>

## Zusammenfassung

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Ihre Hauptfunktionen liegen im Intermediärstoffwechsel reaktiver Sauerstoffverbindungen, dem Abbau verschiedener Fettsäuren, von Eicosanoiden, Leukotrienen, Glycero- und Etherlipiden sowie von Cholesterin. Sind Peroxisomen des Menschen in ihrer normalen Funktion gestört, kommt es zu einer Reihe von schwerwiegenden, immer tödlich verlaufenden Erkrankungen. Die schwerste Form einer peroxisomalen Erkrankung, das cerebrohepatorenale Syndrom oder auch Zellweger Syndrom, entsteht durch fehlerhafte Biogenese dieser Zellorganellen und dem damit verbundenen kompletten Ausfall aller peroxisomaler Stoffwechselwege. Da peroxisomale Stoffwechselwege auch andere Zellorganellen (z.B. glattes endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Cytoplasma) mit einschließen, scheitern häufig biochemische Untersuchungsmethoden. Das gezielte Ausschalten von Genen für die Peroxisomenbiogenese mit Hilfe moderner gentechnischer Methoden ermöglicht jedoch die Analyse der molekularen Folgen einer Peroxisomen-Defizienz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine sog. Knockout (KO)-Maus mit PEX19-Defekt hergestellt, und die Rolle des cytoplasmatischen Pex19p-Proteins bei der peroxisomalen Membransynthese untersucht.

Bisher wurden drei Proteine der Peroxinfamilie (Pex3p, Pex16p, Pex19p) mit der Synthese der peroxisomalen Membran in Verbindung gebracht. Das Pex19p spielt als cytoplasmatisches Chaperon und Shuttle-Rezeptor für peroxisomale Membranproteine bereits im frühen Stadium der Membranentstehung dieser Organellen eine wichtige Rolle. Sowohl durch histologische als auch durch biochemische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass diese Maus ähnliche phänotypische Merkmale zeigt, wie sie in bisher etablierten Knockout-Mausmodellen mit Matrixproteinimportdefekten oder auch bei Patienten mit Zellweger Syndrom beschrieben wurden. Mit dieser PEX19 KO-Maus konnten zellbiologische Untersuchungen in Bezug auf peroxisomale Membranreststrukturen („ghosts“) und auf den zielgerichteten Einbau peroxisomaler Membran- und Matrixproteine („targeting“) durchgeführt werden. Weiterhin wurden bisher unbekannte Veränderungen im Muster von mehrfach ungesättigten Fettsäuren nachgewiesen.

Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung wurde nachgewiesen, dass bei Abwesenheit von Pex19p der Import von peroxisomalen Membran- und Matrixproteinen gestört ist. So werden verschiedenste peroxisomale Membranproteine in andere Organellen (z.B. Mitochondrien) fehlgeleitet, und Matrixproteine verbleiben im Cytoplasma oder werden komplett abgebaut. Darüber hinaus konnten in Hepatocyten der PEX19 KO-Mäuse knäuelartige Lipid-Membranstrukturen in der Nähe von Glykogenfeldern nachgewiesen werden, an denen in Wildtyptieren normale Peroxisomen zu finden sind. Diese Strukturen wurden bisher in keiner Fibroblastenzelllinien von Patienten mit Defekten in den an der Membranbiogenese beteiligten peroxisomalen Proteinen Pex3p, Pex16p und Pex19p beschrieben.

In dieser Studie wurden außerdem fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Ablauf der Neuentstehung von Peroxisomen in primären embryonalen Fibroblasten von PEX19 KO-Mäusen durchgeführt, die ein eindeutiges Muster bei der Peroxisomenentstehung und –reifung vermuten lassen.

## Summary

Peroxisomes are ubiquitous organelles, present in all eukaryotic cells. They play an essential role in several important metabolic processes, such as the degradation of reactive oxygen species, the breakdown of toxic and bioactive fatty acids, or the synthesis of eicosanoids leucotriens, glycerolipids, ether lipids and cholesterol. The vital importance of this organelle for normal cellular homeostasis and the survival of the whole organism are highlighted by several lethal inherited autosomal-recessive diseases known as peroxisomal biogenesis disorders of the Zellweger Syndrome spectrum. Because peroxisomes are functionally cross-linked to other cell compartments, such as smooth endoplasmatic reticulum, mitochondria and cytoplasm, biochemical analysis are often not successful to study the function of this organelle. In contrast, the knockout of peroxisomal biogenesis genes by genetic engineering allows studying the molecular consequences of peroxisomal deficiency. In the present study, knockout (KO) mice with Pex19p-deficiency have been generated to study the role of the Pex19p protein during peroxisomal membrane biogenesis.

Three peroxins, Pex3p, Pex16p and Pex19p, are suggested to be involved in the early steps of peroxisomal membrane biogenesis. A bifunctional role of Pex19p as a chaperone and as an import receptor for peroxisomal membrane proteins at the peroxisomal membrane has been proposed. Several histological and biochemical analyses revealed that the newly generated PEX19 KO mice exhibited a phenotype similar to formerly established knockout mouse models with peroxisomal matrix protein import defects and patients with Zellweger syndrome. However, the PEX19 KO mouse showed cell biological differences in relationship to peroxisomal residual membrane structures ("ghosts") and the targeting of peroxisomal membrane proteins. Furthermore hitherto unknown changes in levels of polyunsaturated fatty acids have been detected.

Phenotypical characterisation revealed that PEX19 knockout mice exhibited an import defect of both peroxisomal membrane and matrix proteins. Peroxisomal membrane proteins were mistargeted to other organelles like mitochondria, whereas peroxisomal matrix proteins were mislocalised to the cytoplasm and the nucleus or were degraded. In addition in hepatocytes of the PEX19 KO mice loop- or whorl-like membrane structures, suggestive for peroxisomal "membrane ghosts", were detected in the vicinity of glycogen areas, where normal peroxisomes would be located in wildtype animals. This is the first description of these residual membrane structures, which have not been found in corresponding human patient fibroblasts before.

Furthermore, the kinetic of peroxisomal membrane and matrix protein import was studied by immunofluorescence analyses in primary cultures of embryonic mouse fibroblasts at different time-points after complementation with PEX19-cDNA.



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADHAPS	Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDR	<i>Adrenoleukodystrophy related</i>
ACOX	Acyl-CoA-Oxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC-DNA	<i>Bacterial artificial chromosome</i> –DNA
BDMA	Benzyl dimethylamin (Beschleuniger)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bp	<i>Base pair(s)</i>
C	Cytosolische Fraktion
ca.	Cirka
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHO-Zellen	<i>Chinese hamster ovary</i> -Zellen
Cre Rekombinase	<i>Causes recombination</i> Rekombinase
CyP450Red	Cytochrom P450-Reduktase
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHAPAT	Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase
ddNMP	Didesoxyribonukleosidmonophosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DDSA	Dodecylsuccinylsäureanhydrid (Eponhärter)
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
<i>g</i>	Konstante der Erdbeschleunigung ( $g = 9,81\text{m/s}^2$ )
GANC	Ganciclovir

---

GC	Gaschromatograph
Gew. %	Gewichtsprozent
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
G418	Geneticin
h	<i>Hour</i>
HZ	Heterozygot
i.d.R.	In der Regel
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infantile Form des Morbus Refsum
IVC	<i>Individually ventilated cage</i>
K	Kerne
kb	<i>Kilo base</i>
KO	<i>Knockout</i>
lacZ	$\beta$ -Galactosidase
Lamp1	Lysosomen assoziiertes Membranprotein 1
LM	Leichte Mitochondrienfraktion
loxP	<i>Locus of crossing over</i> der P1-Rekombinase
M	Mikrosomen
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MFP-1	Multifunktionelles Protein-1
MFP-2	Multifunktionelles Protein-2
MNA	Methylnorboren-2,3-dicarbonsäureanhydrid (Eponhärter)
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
NALD	Neonatale Adrenoleukodystrophie
NEO	Neomycinresistenz-Kassette
OxPhos Complex III	Ubihydrochinon:Cytochrom c-Oxidoreduktase
P x	Post partum (x Tage nach der Geburt)
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PUFA	Mehrfach (poly-) ungesättigte Fettsäuren
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PLG	Phase Lock Gel
PTS	Peroxisomal targeting signal

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCDP	Rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
SAP	<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase
SCPx	<i>Sterol carrier</i> Protein x
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDH A	Succinat-Dehydrogenase A
SM	Schwere Mitochondrienfraktion
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	So genannte
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
s.u.	Siehe unten
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidinkinase
U	Unit
Ü	Überstand
vgl.	Vergleiche
VLCFA	<i>very long chain fatty acid</i>
Vol.	Volumen
vs.	Versus (gegen)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
z.B.	Zum Beispiel
ZTL	Zentrales Tierlabor
ZS	Zellweger Syndrom
ZSS	Zellweger Syndrom-Spektrum

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Alle Säugetierzellen sind trotz ihrer unterschiedlichen Funktion, Form und Größe prinzipiell identisch organisiert. Sie werden stets von einer Plasmamembran umgrenzt und enthalten einen Zellkern und das Cytoplasma mit weiteren Organellen. Membranschlüssene Kompartimente (Organellen) ermöglichen den gleichzeitigen Ablauf unterschiedlicher – zum Teil konkurrierender – biochemischer Reaktionen in derselben Zelle. Zu diesen Organellen gehören neben dem Zellkern, den Mitochondrien, den Membransystemen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates auch die Peroxisomen.

### 1.1 Peroxisomen

Peroxisomen sind eine heterogene Gruppe von Zellorganellen, die sich abhängig von Zelltyp und Umweltbedingungen in ihrer Größe, Anzahl und Proteinzusammensetzung unterscheiden (Titorenko & Rachubinski, 2001). Von Rhodin erstmals 1954 in Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere entdeckt und als „microbodies“ bezeichnet (Rhodin, 1954), erhielten sie 1965 ihren heutigen Namen - Peroxisomen - von De Duve und Baudhuin, denen durch den Nachweis von  $H_2O_2$ -produzierenden Oxidasen und  $H_2O_2$ -abbauender Katalase in diesen Organellen die erste funktionelle Charakterisierung gelang (Baudhuin et al., 1965a, b; DeDuve & Baudhuin, 1966).

Freier Sauerstoff ist in der Zelle ein starkes Gift und kann als reaktive Sauerstoffspezies (ROS - reactive oxygen species) wichtige Funktionen der Zelle zerstören. Die Oxidasen der Peroxisomen produzieren Wasserstoffperoxid bei der Umsetzung unterschiedlicher, toxischer Substanzen und Zellgifte. Der Katalase der Peroxisomen kommt die wichtige Rolle zu, das durch die Oxidasen gebildete Wasserstoffperoxid und andere Radikale abzubauen. Die verschiedenen Oxidasen können in der granulären Matrix der Peroxisomen kristalline Einschlüsse bilden, z.B. „Cores“ aus Urat-Oxidase oder „Marginalplatten“ aus L- $\alpha$ -Hydroxysäure-Oxidase B (Angermüller et al., 1987; Völkl et al., 1988; Zaar et al., 1991).

Bislang wurden Peroxisomen in allen eukaryotischen Zellen außer in den Erythrocyten des Blutes beschrieben. Die korrespondierenden Organellen werden in Speichergewebe fettreicher Pflanzensamen als Glyoxysomen (Breidenbach & Beevers, 1967) und in Trypanosomen als Glycosomen (Opperdoes & Borst, 1977) bezeichnet. Eine Sonderform von Peroxisomen sind die bei filamentösen Pilzen vorkommenden „*woronin bodies*“, die zur Verschließung septaler Poren nach Beschädigung der Hyphen dienen, um das Austreten

des Zytoplasmas zu verhindern (Woronin, 1864; Jedd & Chua, 2000). In Hepatocyten sind Peroxisomen sehr zahlreich und besitzen einen Durchmesser von 0,1 bis 1 µm. Peroxisomen sind meist runde oder ovale Organellen und können in regenerierenden Hepatocyten nach partieller Hepatektomie auch in Form eines peroxisomalen Retikulums vorkommen (Yamamoto & Fahimi, 1987). Im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten sind Peroxisomen von einer einfachen Membran umschlossen und besitzen kein eigenes Genom. Sie müssen also zur anfänglichen Grundausstattung der Zellen gezählt werden. Es verwundert daher nicht, dass ihre Biogenese innerhalb der verschiedenen Spezies stark konserviert ist.

### 1.2 Biogenese von Peroxisomen

Die Biogenese der Peroxisomen erfordert zuerst die Bildung einer Organellen begrenzenden Lipid-Doppelschicht, dann den Import von integralen Membranproteinen in diese neu gebildete Membran und schließlich den Import von Proteinen in die peroxisomale Matrix, d.h. in das Innere der Peroxisomen. Inzwischen sind bei unterschiedlichen Spezies insgesamt 32 Gene bekannt, deren Protein-Produkte für die Biogenese von Peroxisomen benötigt werden. Seit der Vereinheitlichung der Nomenklatur 1996 (Distel et al., 1996) werden alle Proteine, die an der peroxisomalen Biogenese beteiligt sind, als Peroxine (Pex...p) und ihre zugehörigen Gene als PEX-Gene (PEX...) bezeichnet. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die bisher bekannten Peroxine und deren Charakteristika.

#### 1.2.1 Import von Matrixproteinen in Peroxisomen

Alle so genannten Matrixproteine, also die Proteine, die sich im Inneren (Matrix) der Peroxisomen befinden, werden von nukleären Genen kodiert, an freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert und posttranslational in die Peroxisomen importiert (Lazarow et al., 1982, Fujiki et al., 1984) (vgl. Abbildung 1.1). Dazu ist eine komplexe Importmaschinerie notwendig, die die Proteine spezifisch erkennen und Proteinkomplexe durch die peroxisomale Membran schleusen kann. Bisher wurden zwei unterschiedliche Erkennungssequenzen (PTS – „*peroxisomal targeting signals*“) für den zielgerichteten Transport („*targeting*“) von Matrixproteinen zum Peroxisom identifiziert.

**Tab. 1.1: Übersicht der bisher identifizierten Peroxine und deren Charakteristika**

PEX-Gen	Charakteristika	Organismus
<b>PEX 1</b>	ATPase der AAA-Familie	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 2</b>	Zink bindendes integrales peroxisomales Membranprotein mit C3HC4-Motiv	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 3</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, benötigt für Membranproteinimport	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 4</b>	Ubiquitin konjugierendes Enzym (E2), Peroxisomen-assoziiert	Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 5</b>	PTS1-Rezeptor, enthält 7 TPR-Motive, im Cytoplasma und an die Außenseite der Peroxisomenmembran assoziiertes	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 6</b>	ATPase der AAA-Familie	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 7</b>	PTS2-Rezeptor, 6 WD 40-Motive, im Cytoplasma und an die Außenseite der Peroxisomenmembran assoziiertes	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 8</b>	Peripheres Membranprotein mit PTS1- und PTS2-Signalsequenz in Peroxisomen	Hefen
<b>PEX 9</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein	Yl
<b>PEX 10</b>	Zink bindendes integrales peroxisomales Membranprotein mit C3HC4-Motiv	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 11</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 12</b>	Zink bindendes integrales peroxisomales Membranprotein mit C3HC4-Motiv	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 13</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein mit C-terminaler SH3-Domäne, Bestandteil des Docking-Komplexes für Matrixprotein-Rezeptoren, bindet Pex5p, Pex7p, Pex14p	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 14</b>	Peroxisomales Membranprotein, Klasse II-Bindemotiv für SH3-Liganden, Bestandteil des Docking-Komplexes für Matrixprotein-Rezeptoren, bindet Pex5p, Pex7p und Pex13p	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 15</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, phosphoryliert und glykosyliert	Sc
<b>PEX 16</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, benötigt für Membranbiogenese	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 17</b>	Peripheres Membranprotein, bindet Pex14p	Hefen, Pflanzen
<b>PEX 18</b>	Überwiegend cytoplasmatisches Protein, nur für PTS2-Import benötigt, starke Homologie zu Pex21p	Sc
<b>PEX 19</b>	Farnesyliertes Protein, bindet Pex3p, im Cytoplasma und an die Außenseite der Peroxisomenmembran assoziiertes	Hs, Hefen, Säuger, Pflanzen
<b>PEX 20</b>	Cytosolisches Protein, zur Dimerisierung und zum Import von Fox3p benötigt	Yl, Nc
<b>PEX 21</b>	Cytosolisches Protein, benötigt für PTS2-vermittelten Proteinimport, starke Homologie zu Pex18p	Sc
<b>PEX 22</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, interagiert mit Pex4p	Hefen
<b>PEX 23</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein	Yl, Nc
<b>PEX 24</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein	Yl, Nc
<b>PEX 25</b>	An Peroxisomen lokalisiert, reguliert Peroxisomenzahl und -größe	Sc
<b>PEX 26</b>	Peroxisomales Membranprotein, Recycling des PTS1-Rezeptors Pex5p	Hs, Säuger
<b>PEX 27</b>	An Peroxisomen lokalisiert, reguliert Peroxisomenzahl und -größe	Sc
<b>PEX 28</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, Dynamik von Peroxisomen	Sc
<b>PEX 29</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, Dynamik von Peroxisomen	Sc
<b>PEX 30</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, reguliert Peroxisomengröße	Sc
<b>PEX 31</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, reguliert Peroxisomengröße	Sc
<b>PEX 32</b>	Integrales peroxisomales Membranprotein, reguliert Peroxisomengröße	Sc

Hs = Homo sapiens, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Yl = *Yarrowia lipolytica*, Nc = *Neurospora crassa*

Die meisten peroxisomalen Matrixproteine tragen das carboxterminale PTS1, das aus der Tripeptidsequenz Serin-Lysin-Leucin (SKL) oder konservierten Varianten davon besteht, die sich von der allgemeinen Konsensussequenz (S/A/C)(K/R/H)(L/A) ableiten (Gould et al., 1989; Miura et al., 1992; Purdue et al., 1996; Lametschwandtner et al., 1998). Das zweite Targeting-Signal (PTS2) ist geringer konserviert und auch nur für wenige peroxisomale Proteine beschrieben worden. Die aminoternale Konsensussequenz (R/K)-(L/V/I)-x5-(H/Q)-(L/A) wird im Gegensatz zu der PTS1-Erkennungssequenz beim Import in das Peroxisom abgespalten (Swinkels et al., 1991 und 1992; Tsukamoto et al., 1994; Glover et al., 1994; Elgersma et al., 1996). Die beiden im Cytoplasma zirkulierenden Rezeptorproteine Pex5p (PTS1-Rezeptor) und Pex7p (PTS2-Rezeptor) binden jeweils die spezifischen, frisch synthetisierten PTS1- bzw. PTS2-Proteine, transportieren diese zielgerichtet zu den Peroxisomen (Zielerkennung = „*targeting*“) und „docken“ an einen Proteinkomplex in der peroxisomalen Membran an.

Beim Menschen kommen zwei Isoformen von Pex5p vor, eine kurze Pex5S und eine lange Pex5L, die durch alternatives Spleißen entstehen. Während Pex5S nur die Bindung und den Transport von PTS1-Proteinen steuert, ist Pex5L neben seiner Funktion als PTS1-Rezeptor auch essentiell für den gezielten, spezifischen Transport von PTS2-Proteinen. So kann der Komplex aus Pex7p und PTS2-Proteinen in humanen Zellen in Kombination mit Pex5L an den „*Docking*“-Komplex der peroxisomalen Membran binden (Otera et al., 2000; Braverman et al., 1998). Orthologa zu Pex5L sind Pex18p und Pex21p in *S. cerevisiae* und Pex20p in Pilzen (Schliebs & Kunau, 2006).

In der peroxisomalen Matrix sind außerdem Proteine lokalisiert, die weder ein PTS1- noch ein PTS2-Signal aufweisen. Der Import dieser Non-PTS Proteine erfolgt über verschiedene individuelle Mechanismen. So wird beispielsweise Acyl-CoA-Oxidase (Fox1p) in *S. cerevisiae* ebenfalls durch Pex5p erkannt, allerdings wird es an einen anderen Bereich als die regulären PTS1-Proteine gebunden (Imanaka et al., 1987; Small et al., 1988; Klein et al., 2002). Es existieren weiterhin Hinweise darauf, dass Proteine, denen eine PTS-Sequenz fehlt, an Partnerproteine binden können, die ein PTS-Signal aufweisen und „Huckepack“ („*piggy-back*“) zusammen mit diesen PTS1-haltigen Partnerproteinen importiert werden. Dies wurde z.B. für die Enoyl-CoA-Isomerasen Dci1p und Eci1p aus *S. cerevisiae* (Yang et al., 2001) demonstriert. Trotz dieser verschiedenen Wege verläuft der Non-PTS Import immer in Abhängigkeit von Pex5p (van der Klei & Veenhuis, 2006).

Die Matrixproteine werden als komplex gefaltete Proteine in ihrer funktionellen Tertiärstruktur in das peroxisomale Lumen eingeschleust (Eckert & Erdmann, 2003) und die Rezeptoren wiederverwertet (Rachubinski & Subramani, 1995; Gould & Collins, 2002). Die Mechanismen der Translokation, der Dissoziation der Matrixproteine von ihrem Rezeptor und deren „*Recycling*“ beruhen weitestgehend auf Daten, die in Hefen gewonnen wurden. Als mögliche „*Docking*“-Komponenten für die PTS-Rezeptoren wurden die Peroxine Pex13p, Pex14p und Pex17p identifiziert. (Smith et al., 1997; Huhse et al., 1998; Snyder et al., 1999; Gould & Collins, 2002). Für die nachfolgende Translokation über die Membran werden die Ringfingerproteine Pex2p, Pex10p und Pex12p diskutiert (Sacksteder & Gould, 2000), die über Pex8p mit dem „*Docking*“-Komplex gekoppelt sind. Die Rezeptoren dissoziieren von ihren Rezeptorproteinen in der peroxisomalen Matrix und werden anschließend wieder über Pex1p und Pex6p ins Cytoplasma freigesetzt. Für den PTS1-Rezeptor (Pex5S) und dessen Co-Rezeptoren Pex5L bzw. Pex18p und Pex21p konnte gezeigt werden, dass diese von Pex4p mono- bzw. von den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ubc4p, Ubc5p und Ubc1p polyubiquitinyliert werden. Polyubiquitinylierte Rezeptoren werden über Proteasomen abgebaut, während monoubiquitinylierte Rezeptoren wieder verwendet werden und neue PTS1-Proteine binden (Platta & Erdmann, 2007a, b).

### 1.2.2 Biogenese der Peroxisomenmembran

Im Gegensatz zum Import von Matrixproteinen in Peroxisomen ist über die Bildung der Organellenmembran von Peroxisomen nur wenig bekannt. Für ihren zielgerichteten Transport zur Organellenmembran brauchen peroxisomale Membranproteine (PMPs) mehrere funktionell getrennte Erkennungssignale (mPTS). Anders als die PTS1- und PTS2-Signale der peroxisomalen Matrixproteine scheinen diese nicht auf einen kleinen Sequenzbereich beschränkt zu sein, sondern umfassen mehrere Proteindomänen (Van Ael & Franssen, 2006). Bisher wurden drei Peroxine (Pex3p, Pex16p, Pex19p) identifiziert, die für die frühe Membranbiogenese und einen ordnungsgemäßen Einbau der PMPs in die peroxisomale Membran verantwortlich sind (South & Gould, 1999; Sacksteder et al., 2000; Muntau et al., 2000; Honsho et al., 2002). Defekte in den Genen dieser Proteine konnten bei Patienten mit Erkrankungen des Zellweger Syndromspektrums nachgewiesen werden (Shimozawa et al., 2000; Honsho et al., 1998; Shimozawa et al., 2002).



Die meisten peroxisomalen Membranproteine besitzen eine konservierte Pex19p-Bindedomäne, die den Transport der Membranproteine zur Zielmembran vermittelt. Über dieses mPTS bindet Pex19p die neusynthetisierten Membranproteine und stabilisiert sie während des Transportes zur Membran (Jones et al., 2004; Shibata et al., 2004). Über das integrale Membranprotein Pex3p bindet das PMP-beladene Pex19p an die Peroxisomenmembran (Fang et al., 2004). Zur dauerhaften Verankerung benötigen integrale Membranproteine zusätzlich eine Transmembrandomäne (Rottensteiner et al., 2004) und membranassoziierte Proteine eine intakte Bindungsstelle für das Ankerprotein (Girzalsky et al., 2006).

Die Funktion von Pex16p beim Import von Membranproteinen ist noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise fungiert es als Kopplungsfaktor für Pex3p oder ist Bestandteil der Importmaschinerie für Membranproteine (Kim et al., 2006). Alle Membranproteine, die über Pex19p, Pex3p und ggf. Pex16p in die Membran importiert werden, werden als Typ I-PMPs bezeichnet. Dagegen werden Typ II-PMPs unabhängig von diesen Proteinen importiert. Eventuell geschieht dies über das endoplasmatische Retikulum mit einem bisher noch unbekanntem Mechanismus (Höpfner et al., 2005; Kragt et al., 2005; Tam et al., 2005; Karnik & Trelease, 2007). Die Beteiligung des ER an der Bildung peroxisomaler Vorläufervesikel oder die Herkunft der Membranlipide ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt.

Nach Abschluss der Membranbiogenese wachsen und „reifen“ die Peroxisomen durch Import von Membran- und Matrixproteinen und teilen sich schließlich durch funktionelles Zusammenspiel der Membranproteine Pex11p und Fis1 sowie des „*Dynamamin-like protein*“ DLP1 (Li & Gould, 2002; Li & Gould, 2003; Schrader 2006). Eine Übersicht über die Peroxisomenbiogenese gibt Abbildung 1.1.



### 1.2.3 PEX19 und Pex19p - Aufbau und Funktion

PEX19 wurde erstmals 1994 in humanen Zellen identifiziert und aufgrund seiner ubiquitären Expression zunächst als *Housekeeping*-Gen (HK33) beschrieben (Braun et al., 1994). Gleichzeitig isolierten James et al. (1994) aus Hamsterzellen ein farnesyliertes, an Peroxisomen gebundenes Protein. Die Sequenz dieses Proteins PxF („*peroxisomal farnesylated protein*“) war zu 93 % identisch mit der des HK33-Proteins. Nachdem Götte et al. (1998) den Nachweis führten, dass HK33 das humane Ortholog zu Pex19p darstellt, das in *S. cerevisiae* in die Peroxisomenbiogenese involviert ist, erhielt es aufgrund der Vereinheitlichung der Nomenklatur für Peroxine seinen endgültigen Namen Pex19p (Distel et al., 1996).

Das humane PEX19-Gen wurde von Braun et al. (1994) auf dem Chromosom 1 lokalisiert und durch *in situ* Hybridisierung dem Locus 1q22 zugewiesen (Kammerer et al., 1997). Es besteht aus 8 Exons und 7 Introns und hat eine Größe von ca. 9 kb. Die Promotorregion reicht bis -239 bp stromaufwärts von Exon 1 und enthält weder eine TATA- noch eine CAAT-Box, wie sie für „*Housekeeping*“-Gene typisch sind (Dyanan, 1986). An den Positionen -66 bis -60 und -52 bis -46 relativ zu Exon 1 konnten zwei Sequenzbereiche identifiziert werden, die der Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor SP-1 ähneln. Zusätzlich wurde an der Position -763 bis -389 ein Alu-Element lokalisiert. Das Startcodon liegt an Position +10 in Exon 1, während in Exon 8 die Terminationsstelle (Stopcodon) sowie mindestens zwei Polyadenylierungssignale identifiziert wurden, die zu ca. 2 kb bzw. 4 kb großen Transkripten führen (Kammerer et al., 1997; Braun et al., 1994). Weiterhin wurden beim Menschen zwei unterschiedliche PEX19-mRNA-Isoformen identifiziert, die vermutlich durch alternatives Spleißen entstehen. Die lange Isoform beinhaltet alle Exone, während bei der kurzen Isoform der 3'-Bereich bis zu einem zweiten „in-frame“ Startcodon in Exon 3 fehlt (Kammerer et al., 1997).

Das humane Pex19p-Protein besteht aus 299 Aminosäuren, besitzt eine theoretische Masse von ca. 33 kDa (Braun et al., 1994) und ist das einzige peroxisomale Protein, das ein Farnesylierungssignal trägt. An dieser carboxyterminal gelegenen CAAX-Box (C: Cystein, A: aliphatische, X: C-terminale, beliebige Aminosäure; HsPEX19: CLIM) wird Pex19p bei Mensch, Hamster und *S. cerevisiae* von der Farnesyltransferase farnesyliert. Dagegen wurde in *P. pastoris* und in *Y. lipolytica* keine Farnesylierung gefunden. (Götte et al., 1998; Kammerer et al., 1997; Lambkin et al., 2001; Matsuzono et al., 1999).

Die Funktion der Farnesylierung von Pex19p ist bislang nicht eindeutig geklärt, da sie nicht essentiell für die peroxisomale Biogenese zu sein scheint (Vastiau et al., 2006). Für manche Proteine ist jedoch bekannt, dass eine kovalente Modifizierung durch Farnesylierung wichtig für deren zelluläre Verteilung ist (Clarke, 1992). Diese scheint eine entscheidende Rolle bei der Assoziation von Proteinen an Membranen oder bei der Fusion von Vesikeln zu spielen (Hancock et al., 1989; Gorvel et al., 1991; Kato et al., 1992). So konnte nachgewiesen werden, dass die Membranbindung von Pex19p in *S. cerevisiae* von der Farnesylierung des Proteins abhängig ist (Götte et al., 1998).

Das hydrophile Protein Pex19p ist nur zu einem kleinen Teil über Pex3p an die Peroxisomenmembran gebunden. Überwiegend liegt es im Cytoplasma vor und interagiert mit einer Vielzahl von peroxisomalen Membranproteinen (Sacksteder et al., 2000). In Abwesenheit von Pex19p werden Membranproteine entweder abgebaut oder misslokalisiert. Da Pex19p die Transmembrandomänen der peroxisomalen Membranproteine im Cytoplasma unspezifisch bindet und diese Proteine während ihres Transportes zur Membran stabilisiert, wird es als zirkulierender Importrezeptor und Chaperon diskutiert (Hetteema et al., 2000; Jones et al., 2004; Shibata et al., 2004; Kashiwayama et al., 2005). Abweichend davon wurde aber auch eine Interaktion von Pex19p mit den Membranproteinen direkt an der Peroxisomenmembran nachgewiesen (Muntau et al., 2003a, b). Daher ist es auch als regulatorischer Faktor für Membranproteinkomplexe im Gespräch (Snyder et al., 2000; Fransen et al., 2002). Zu diesen beiden Theorien haben nicht nur die widersprüchliche Daten über den Ort der Interaktion geführt, sondern auch die Lage des Sortierungssignals für PMPs sowie der Erkennungssequenz für Pex19p. In vielen PMPs stimmt die peroxisomale Zielerkennungssequenz mit der Bindedomäne für Pex19p überein (Purdue & Lazarow, 2001; Sacksteder & Gould, 2000; Heiland & Erdmann, 2005). Der Bereich, in dem die meisten PMPs gebunden werden, kann auf elf Aminosäuren begrenzt werden (Rottensteiner et al., 2004). Bei einer geringen Anzahl an Membranproteinen liegt jedoch die Zielerkennungssequenz getrennt von der Bindedomäne für Pex19p. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass Pex19p entscheidend für den Transport von Fis1 zu Peroxisomen verantwortlich ist. Fis1 ist sowohl an der Proliferation von Peroxisomen als auch an der Teilung von Mitochondrien beteiligt (Delille & Schrader, 2008).

### 1.3 Metabolische Funktionen von Peroxisomen

In Abhängigkeit von Zelltyp und Organismus erfüllen Peroxisomen unterschiedliche metabolische Funktionen. Die Hauptfunktionen der Peroxisomen liegen sowohl im Bereich des katabolen als auch des anabolen Zellstoffwechsels (siehe Tabelle 1.2). Dazu gehören in der Säugetierzelle u.a. der Abbau verschiedener Klassen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die  $\beta$ -Oxidation bioaktiver Lipide (z.B. Eicosanoide, Arachidonsäure) und die  $\alpha$ -Oxidation verzweigt-kettiger Fettsäuren (Mannaerts et al., 2000) sowie die Cholesterin-, Plasmalogen-, Phospholipid-, Isoprenoid- und Gallensäurebiosynthese (Hajra & Bishop, 1982; Biardi & Krisans, 1996). In Pflanzen sind sie am Glyoxylatzyklus (Breidenbach & Beevers, 1967) und in einigen filamentösen Pilzen an der Penicillinbiosynthese (Müller et al., 1991; van den Bosch et al., 1992) beteiligt.

**Tab. 1.2: Übersicht über die metabolischen Funktionen von Peroxisomen bei verschiedenen Organismen (nach Titorenko & Rachubinski, 2001)**

<b>Hefen</b>	
Biosynthese:	Lysin
Degradierung:	Methanol, $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Abbau von $H_2O_2$ , Glyoxylatzyklus
<b>Pilze</b>	
Biosynthese:	Penicillin
Degradierung:	$\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Abbau von $H_2O_2$ , Glyoxylatzyklus
<b>Pflanzen</b>	
Degradierung:	Purine, Reaktionen der Photorespiration (Umwandlung von Glykolat zu Glyzin und von Serin zu Glycerat), $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Abbau von $H_2O_2$ , Glyoxylatzyklus
<b>Säuger</b>	
Biosynthese:	Etherlipide, Cholesterol und Gallensäuren, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)
Degradierung:	Aminosäuren, Purine, Polyamine, $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren, $\beta$ -Oxidation von verschiedensten Lipidderivaten, Abbau von $H_2O_2$
<b>Mensch</b>	
Biosynthese:	Etherlipide, Plasmalogene, Cholesterol und Gallensäuren, mehrfach ungesättigte Fettsäuren
Degradierung:	Aminosäuren, Purine, $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren, $\beta$ -Oxidation verschiedenster Lipidderivate, Abbau von $H_2O_2$

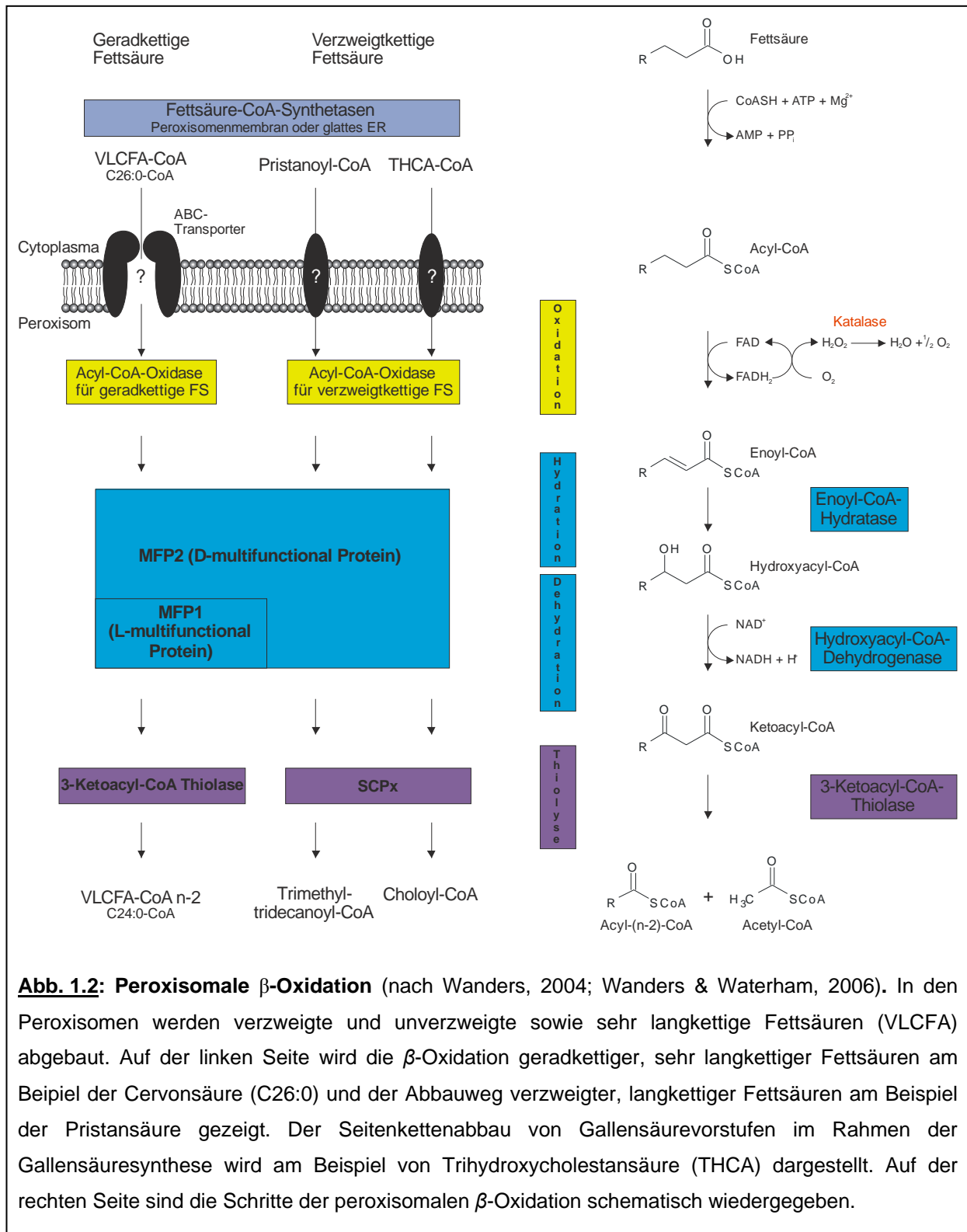
#### 1.3.1 $\alpha$ -Oxidation von Fettsäuren

Da 3-Methyl-verzweigte Fettsäuren am  $\beta$ -C-Atom eine Methylgruppe tragen, können sie nicht direkt in die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation eingeschleust werden. Diese Fettsäuren werden daher zuerst in der peroxisomalen  $\alpha$ -Oxidation decarboxyliert, wodurch die Methylgruppe dann am  $\alpha$ -C-Atom der Acyl-CoA-Verbindung sitzt, die jetzt in die  $\beta$ -Oxidation eingeschleust werden kann.

Die wichtigste 3-Methyl-verzweigte Fettsäure ist die Phytansäure. Sie kann nicht im Körper synthetisiert, sondern muss mit der Nahrung aufgenommen werden. Wie andere Fettsäuren wird auch die Phytansäure zuerst durch eine Acyl-CoA-Synthetase zum Phytanoyl-CoA aktiviert (Watkins et al., 1994). Dieser Schritt findet an der Außenseite der peroxisomalen Membran statt (Watkins et al., 1996). Die anschließende  $\alpha$ -Oxidation besteht wie die  $\beta$ -Oxidation aus drei Schritten. Nach dem Import in Peroxisomen wird Phytanoyl-CoA im ersten Schritt der  $\alpha$ -Oxidation durch das Enzym Phytanoyl-CoA-Hydroxylase hydrolysiert (Mihalik et al., 1995). Eine Lyase (2-Hydroxyphytanoyl-CoA-Lyase) spaltet das entstandene Zwischenprodukt 2-Hydroxyphytanoyl-CoA in Pristanal und Formyl-CoA (Croes et al., 1997; Verhoeven et al., 1997; Foulon et al., 1999). Abschließend wird das Pristanal durch eine Aldehyd-Dehydrogenase in der Peroxisomenmembran in Pristansäure umgewandelt, die dann der  $\beta$ -Oxidation zugeführt wird (Verhoeven et al., 1998).

### 1.3.2 $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren

In der  $\beta$ -Oxidation werden die Fettsäuren durch sukzessiven Abbau am  $\beta$ -C-Atom verkürzt. Bei höheren Tieren findet die  $\beta$ -Oxidation arbeitsteilig zwischen Mitochondrien und Peroxisomen statt. Die  $\beta$ -Oxidationssysteme in den verschiedenen Organellen unterscheiden sich durch die beteiligten Enzyme voneinander (Cooper & Beever, 1969; Hashimoto, 1982; Kunau et al., 1988). Mitochondrien haben ein relativ kleines Lipidsubstratspektrum und oxidieren im Wesentlichen kurz- (< C8), mittel- (C8 - C12) und langkettigen ( $\leq$  C20) Fettsäuren. Im Gegensatz hierzu hat die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation ein sehr breites Substratspektrum. Es werden sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA, > C22) sowie langkettige Dicarboxyl-Fettsäuren (die Produkte der mikrosomalen  $\omega$ -Oxidation) (Mannaerts et al., 2000), Prostaglandine, Leukotriene, die Seitenketten von Cholesterin (Gallensäurevorläufer) oder Steroide in Peroxisomen oxidiert (Reddy & Mannaerts, 1994). Auch die  $\alpha$ -Oxidation verzweigter Fettsäuren wie Phytansäure findet in Peroxisomen statt, bevor die entstandene Pristansäure der  $\beta$ -Oxidation zugeführt wird. In Abbildung 1.2 sind die Schritte der  $\beta$ -Oxidation dargestellt.



**Abb. 1.2: Peroxisomale  $\beta$ -Oxidation** (nach Wanders, 2004; Wanders & Waterham, 2006). In den Peroxisomen werden verzweigte und unverzweigte sowie sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA) abgebaut. Auf der linken Seite wird die  $\beta$ -Oxidation geradkettiger, sehr langkettiger Fettsäuren am Beispiel der Cervonsäure (C26:0) und der Abbauweg verzweigter, langkettiger Fettsäuren am Beispiel der Pristansäure gezeigt. Der Seitenkettenabbau von Gallensäurevorstufen im Rahmen der Gallensäuresynthese wird am Beispiel von Trihydroxycholestansäure (THCA) dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Schritte der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation schematisch wiedergegeben.

Vor der Oxidation werden Fettsäuren zur Aktivierung an Coenzym-A gebunden. Diese Reaktion erfolgt durch unterschiedlich substratspezifische Acyl-CoA-Synthetasen (Uchida et al., 1996). Die Acyl-CoA-Synthetase für sehr langkettige Fettsäuren fehlt in Mitochondrien, was als Grund für den exklusiven Abbau von VLCFAs in Peroxisomen angegeben wird (Uchiyama et al., 1996). Außer an der Peroxisomenmembran können Fettsäuren

(Eicosanoide, Dicarbonsäuren, Gallensäurezwischenstufen) auch am glatten ER aktiviert werden (Van Veldhoven & Mannaerts, 1999). Aus dem Cytoplasma werden die aktivierten Fettsäuren über verschiedene, nur zum Teil identifizierte Transportmechanismen in die Peroxisomenmatrix transportiert. Der Transport von VLCFAs läuft vermutlich über ABC-Transporter wie z.B. ABCD1 (ALDP) oder ABCD3 (PMP70) (Schaffer et al., 1994; Lombard-Platet et al., 1996; Netik et al., 1999).

Sowohl in Mitochondrien als auch in Peroxisomen besteht ein  $\beta$ -Oxidationszyklus aus vier Reaktionsschritten, die bei Pflanzen und Menschen von verschiedenen Enzymen durchgeführt werden. Er dient dazu, Fettsäuren oder andere Lipidderivate in Acetyl-CoA-Einheiten zu zerlegen. In jedem Zyklus werden die Fettsäuren am Carboxyl-Ende um zwei Kohlenstoffatome gekürzt, um ein Acetyl-CoA zu gewinnen. Ein Unterschied zwischen peroxisomaler und mitochondrialer  $\beta$ -Oxidation liegt im ersten Schritt des Fettsäure-Abbaus, bei dem die CoA-aktivierten Fettsäuren durch spezifische Acyl-CoA-Oxidasen zu den entsprechenden trans-2-enoyl-CoA-Fettsäuren oxidiert werden. Dieser Schritt wird in Mitochondrien durch Acyl-CoA-Dehydrogenasen und in Peroxisomen durch Acyl-CoA-Oxidasen katalysiert. Die freigesetzten Wasserstoffatome werden dabei auf FAD übertragen. In den Mitochondrien wird dieser Schritt zur Energiegewinnung genutzt, da der Wasserstoff der Acyl-CoA-Dehydrogenase über  $\text{NADH}+\text{H}^+$  in die Atmungskette weitergeleitet wird. Im Gegensatz dazu werden bei der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation die Elektronen nicht einer Elektronentransportkette zugeführt, sondern über  $\text{FADH}_2$  unter Bildung von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) auf molekularen Sauerstoff übertragen.

In Peroxisomen existieren zwei getrennte  $\beta$ -Oxidationswege, deren Schlüsselenzyme Acyl-CoA-Oxidasen mit unterschiedlicher Substratspezifität (Mensch, Ratte, Maus: ACOX1 und 2; Ratte, Maus: ACOX3) sind (Vanhooren et al., 1996; Baumgart et al., 1996a, b; Nenicu et al., 2007).

Auf dem ersten  $\beta$ -Oxidationsweg werden geradkettige Fettsäuren oxidiert. Alle Enzyme dieses Weges sind über den Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ , Issemann & Green, 1990), einem Mitglied der Familie der Liganden-aktivierten nukleären Rezeptoren, transkriptionell induzierbar (Reddy et al., 1986; Fan et al., 1998). Dieser Rezeptor bindet als Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor- $\alpha$  (RXR $\alpha$ ; Gearing et al., 1993; Keller et al., 1993) an entsprechende „responsive Elemente (PPRE)“ in dem „*Enhancer*“-abschnitt der Promotorregion der jeweiligen „induzierbaren“  $\beta$ -Oxidationsgene (Tugwood et al., 1992). Neben mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Eicosanoiden und Fettsäure-Methylestern sind auch hypolipidämische Pharmaka als Liganden von PPAR $\alpha$



beschrieben worden (Osumi, 1993; Hertz et al., 1996; Devchand et al., 1996; Schmidt et al., 1996). Verzweigt-kettige Fettsäuren und Gallensäureintermediate wie zum Beispiel THCA (Trihydroxycholestansäure) und DHCA (Dihydroxycholestansäure) werden auf dem zweiten  $\beta$ -Oxidationsweg abgebaut. Im Gegensatz zu den Genen des  $\beta$ -Oxidationsweges für geradkettige Fettsäuren sind die entsprechenden Gene der Enzyme für die  $\beta$ -Oxidation von verzweigt-kettigen Fettsäuren nicht durch gängige Hypolipidämika induzierbar (Baumgart et al., 1996c).

Das durch die Oxidasen gebildete Wasserstoffperoxid wird von der Katalase, dem Leitenzym der Peroxisomen, zu Wasser und Sauerstoff abgebaut (Lazarow & DeDuve, 1976). Ein kleiner Teil des freigesetzten Wasserstoffperoxids kann möglicherweise für metabolische Signalgebung und –transduktion verwendet werden (Masters, 1996).

Für den zweiten und dritten Schritt der  $\beta$ -Oxidation (Hydratation und Dehydratation) existiert in den Peroxisomen ein multifunktionales Enzym mit Isomerase-Funktion (Enoyl-CoA-Hydratase- und Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase), während es in den Mitochondrien für diese Reaktionen getrennte Enzyme gibt. Bisher sind zwei peroxisomale, multifunktionale Enzyme bekannt: Das L-spezifische multifunktionale Protein1 (MFP1), welches unverzweigte Enoyl-CoA-Fettsäuren umsetzt, und das D-spezifische multifunktionale Protein2 (MFP2), welches sich durch ein breiteres Substratspektrum auszeichnet und neben den unverzweigten auch verzweigte Enoyl-CoA-Fettsäuren metabolisiert.

Im letzten Schritt, der thiolytischen Spaltung, wird eine Acetyl-CoA-Einheit vom Ketoacyl-CoA-Ester durch eine 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase abgetrennt. Humane Peroxisomen besitzen zwei verschiedene Thiolasen: die 3-Ketoacyl-CoA Thiolase für unverzweigte Fettsäuren und die Sterol Carrier Protein-2/3-Ketoacyl-CoA Thiolase (SCPx) für 2-Methyl-verzweigte Fettsäuren, Pristansäure, Di- und Trihydroxycholestansäure (Wanders & Waterham, 2006). Peroxisomen von Maus und Ratte enthalten dagegen drei verschiedene Thiolasen: 3-Ketoacyl-CoA Thiolase A und B sowie Sterol Carrier Protein-2/3-Ketoacyl-CoA Thiolase (Miyazawa, et al., 1981; Antonenkov et al., 1997).

In den Peroxisomen werden die Fettsäuren nur bis zu einer Länge von acht Kohlenstoffatomen abgebaut. Der Mechanismus zum Transport der Fettsäuremetabolite aus den Peroxisomen ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass der Export, wie für Acetyl-CoA und Propionyl-CoA gezeigt, über Carnitinester erfolgt (Jakobs & Wanders, 1995). Der vollständige Abbau der verkürzten Fettsäure-CoA-Ester erfolgt in den Mitochondrien. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren gelangen als freie Fettsäuren in ihrer protonierten Form durch

Diffusion in die Mitochondrien, während langkettige Fettsäuren über den Carnitinzyklus importiert werden (Wanders & Waterham, 2006)

Da die Lipidsubstrate der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation auch zur Modifizierung von Proteinen verwendet werden (Isoprenylierung), als Liganden für nukleäre Rezeptoren in Signaltransduktionswege fungieren, sowie den Prozess der Apoptose auslösen können, ist eine funktionell intakte  $\beta$ -Oxidation für die Lipidhomöostase in allen davon abhängigen Organen von großer Bedeutung.

### 1.3.3 Biosynthese von Etherphospholipiden

Etherphospholipide sind eine besondere Klasse von Phospholipiden. Im Gegensatz zu den regulären Diacylphospholipiden enthalten Etherphospholipide an der Position C-1 des Glycerols eine Etherbindung anstelle einer Esterbindung. Je nachdem, ob die Fettsäure an C-1-Position des Glycerols durch ein Fettsäurealdehyd oder einen Fettsäurealkohol ersetzt ist, unterscheidet man zwischen Enol- und Alkyletherphospholipiden (Hänsel & Sticher, 2006). Zur letzten Gruppe gehört der „Plättchenaktivierende Faktor“ PAF. Die Enoletherphospholipide sind auch unter der Bezeichnung „Plasmalogene“ bekannt. Die Substituenten an der Position C-1 des Glycerols leiten sich bei den Plasmalogenen von Palmitin- (C16:0), Stearin- (C18:0) oder Ölsäure (C18:1) ab. Die Position C-2 ist mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) der  $\omega$ -3 oder  $\omega$ -6 Familie essentieller Fettsäuren besetzt (Linolsäure, Arachidonsäure).

Besonders die Plasmalogene sind wichtiger Bestandteil von Zellmembranen. Sie machen den größten Teil der Phospholipide im Gehirn, Testis, Herz, und Makrophagen aus (Cook et al., 1991; Zoeller & Raetz, 1986). Einen besonders hohen Anteil haben sie im Myelin (Farooqui & Horrocks, 2001).

Die ersten Schritte der Plasmalogensynthese finden im Peroxisom statt. Die Synthese beginnt mit der Acylierung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) durch das auf der Innenseite der Peroxisomenmembran gelegene Enzym Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase (DHAPAT; Das et al., 1992) oder Glyceronphosphat-Acyltransferase (GNPAT; Hajra, 1997). Im anschließenden Schritt entsteht die für Etherphospholipide charakteristische Etherbindung. Dieser Schritt wird von dem Enzym Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (ADHAPS) katalysiert, das in der Matrix der Peroxisomen lokalisiert ist (van den Bosch & De Vet, 1997). Das entstandene Alkyl-DHAP wird durch die Acyl/Alkyl-DHAP-Reduktase auf der

cytoplasmatischen Seite der Peroxisomen in 1-Alkyl-Glycerol-3-Phosphat überführt und an das endoplasmatische Retikulum abgegeben. Alle weiteren Enzyme für die Plasmalogensynthese liegen im endoplasmatischen Retikulum (Paltauf, 1994; Lee, 1998). Nach der Synthese werden die Plasmalogene entweder über Phospholipid-Austauschproteine zur Membran transportiert oder über direkten Kontakt zwischen den Membranen der verschiedenen Zellkompartimente ausgetauscht (Honsho et al., 2008).

#### **1.3.4 Biosynthese von Cholesterin und Isoprenoidderivaten**

Ein weiterer wichtiger Bestandteil von Zellmembranen ist das Cholesterin. Die Biosynthese erfolgt aus aktiviertem Acetyl-CoA, das sowohl im Cytoplasma als auch in Peroxisomen durch die Enzyme Acetacetyl-CoA-Thiolase und HMG-CoA-Synthetase zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) kondensiert wird (Krisans, 1992; Antonenkov et al., 2000). Die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat durch das Enzym HMG-CoA-Reduktase erfolgt sowohl in Peroxisomen als auch im endoplasmatischen Retikulum. Alle weiteren Schritte bis zum Farnesylpyrophosphat (FPP) finden durch eine Vielzahl an Enzymen ausschließlich in Peroxisomen statt (Krisans, 1996). Die Synthese von Squalen aus zwei Molekülen FPP wird dagegen nur im endoplasmatischen Retikulum katalysiert. Deswegen müssen die Reaktionsintermediate zwischen den beiden Zellorganellen ausgetauscht werden. Die Endsynthese von Squalen zum Cholesterin kann sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch im Peroxisom geschehen.

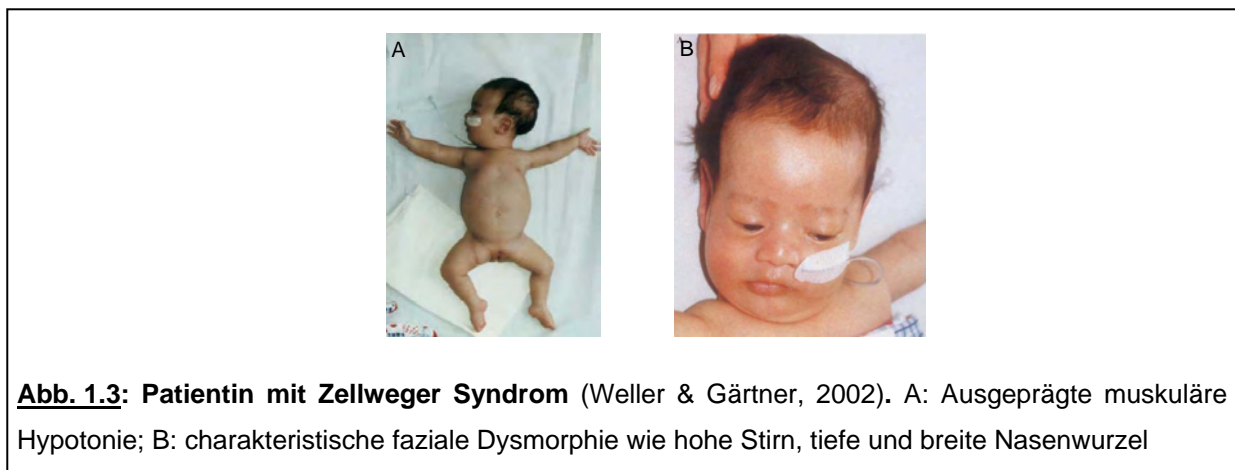
FPP dient nicht nur für Cholesterin als Vorstufe, sondern auch für die Synthese von Dolichol und Ubichinon sowie von Isoprenoiden für die posttranslationale Modifikation von Proteinen und t-RNA.

#### **1.4 Peroxisomale Erkrankungen beim Menschen**

Die Vielzahl an metabolischen Funktionen und deren essentielle Bedeutung für den eukaryotischen Organismus wird durch das Vorkommen genetischer Erkrankungen verdeutlicht, die mit peroxisomalen Defekten verknüpft sind. Aufgrund ihrer molekularen Störungen lassen sich die peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen in zwei Gruppen einteilen.

Die erste Gruppe ist dadurch gekennzeichnet, dass Peroxisomen entweder nicht oder nur sehr unvollständig gebildet werden. Da dieses Charakteristikum auf dem Ausfall eines Proteins beruht, das an der peroxisomalen Biogenese (siehe Kapitel 1.2) beteiligt ist, werden die Erkrankungen dieser Gruppe auch als Peroxisomenbiogenesedefekte (PBD) bezeichnet. Es handelt sich dabei um angeborene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen, die mit massiven Stoffwechsel- und Entwicklungsstörungen, neurologischen Defekten sowie anatomischen Fehlbildungen einhergehen. Entsprechend ihrem klinischen Phänotyp unterscheidet man das cerebrohepatorenale Syndrom oder auch Zellweger Syndrom (ZS), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und den infantilen Morbus Refsum (IR). Im Hinblick auf den gemeinsamen genetischen Hintergrund werden diese Erkrankungsformen als ein Kontinuum der klinischen Ausprägung angesehen und daher als Zellweger Syndrom-Spektrum (ZSS) zusammengefasst (s. Abbildung 1.3) (Sacksteder & Gould, 2000). Eine Sonderstellung unter den peroxisomalen Biogeneserkrankungen nimmt die rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata Typ I (RCDP) ein, bei der nur wenige der peroxisomalen Funktionen ausgefallen sind (PTS2-Rezeptor / Pex7p-Defekt).

Aufgrund von Zellfusionsexperimenten mit Patientenfibroblasten werden die PBD in verschiedene Komplementationsgruppen (Powers & Moser, 1998) eingeteilt. Jede Komplementationsgruppe repräsentiert dabei den Defekt eines bestimmten Gens. Die Art der Mutation und damit die vorhandene Restaktivität des zugehörigen Proteins entscheiden über den Schweregrad der Erkrankung und damit über den klinischen Phänotyp (Gärtner, 2003). Die schwerste Verlaufsform ist das cerebrohepatorenale Syndrom (Zellweger Syndrom), das oft auch als Prototyp der PBDs angesehen wird (Moser et al. 1991). Nahezu alle Organe sind betroffen. Patienten fallen durch ein typisch verändertes Gesicht mit hoher Stirn, tiefer und breiter Nasenwurzel, Hypertelorismus, Epikanthus und leicht mongoloider Lidachse sowie typischem Turmschädel auf (siehe Abbildung 1.3, B).



Die an dieser Krankheit leidenden Neugeborenen zeichnen sich in der Groß- und Kleinhirnrinde durch starke Migrationsdefekte und Hypomyelinisierungen von Nervenzellen aus. Aufgrund dieser schweren neurologischen Entwicklungsstörungen sind sie oft blind und/oder taub und geistig stark retardiert. Sie leiden an Krampfanfällen, zeigen eine allgemeine Muskelschwäche sowie einen schwachen Muskeltonus (Hypotonie, siehe Abbildung 1.3, A), die zu einer ausgesprochenen Trinkschwäche führt. Sie werden mit Nierenzysten geboren und entwickeln innerhalb von wenigen Monaten starke degenerative Veränderungen in Leber (Leberzirrhose), Nebenniere (NN-Rindeninsuffizienz) und in den Genitalorganen (z.B. Leydigzell-Degeneration). Weiterhin zeigen Patienten des Zellweger Syndrom-Spektrums biochemische Auffälligkeiten. Die Konzentrationen sehr langkettiger Fettsäuren, der Intermediate der Gallensäurensynthese sowie der Phytan- und Pristansäure sind erhöht. Dagegen sind die Werte für Plasmalogene erniedrigt (Schutgens et al., 1986; Moser, 1987; Wanders et al., 1988; Lazarow & Moser, 1995).

Während mit Zellweger Syndrom betroffene Kinder oft bereits innerhalb der ersten Lebensmonate sterben (Wanders et al., 1993), kann die Überlebensdauer von NALD- oder IR-Patienten bis zu 40 Jahre betragen, da diese Erkrankungen weniger schwere Verlaufsformen haben (Brosius & Gärtner, 2002). Die Symptome und biochemischen Störungen dieser Erkrankungen entsprechen in wesentlich schwächerer Ausprägung denen des Zellweger Syndroms (Lazarow & Moser, 1995). Die Inzidenz einzelner Erkrankungen dieser Erkrankungsgruppe I liegt in Europa bei 1:100 000 bis 1:200 000 (Weller und Gärtner, 2002).

In der zweiten Gruppe der peroxisomalen Erkrankungen beim Menschen werden die Krankheiten zusammengefasst, deren Ursache in der Mutation eines einzelnen peroxisomalen Enzyms liegt. Dies führt zum isolierten Ausfall eines speziellen Stoffwechselweges. Die Peroxisomenstruktur und die übrigen peroxisomalen Funktionen sind unbeeinträchtigt. Die Pathogenese der Erkrankungen in dieser Gruppe ähnelt der der PBDs, jedoch sind deren Schweregrad und Verlauf deutlich milder ausgeprägt. Die Überlebensdauer der Patienten hängt von der Erkrankungsform ab. Die häufigste Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:25 000 ist die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie. Darüberhinaus zählen u.a. Hyperoxalurie Typ 1, die adulte Form des Morbus Refsum sowie die rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata Typ II und Typ III zu dieser Gruppe (Wanders, 1999).

## 1.5 Mausmodelle peroxisomaler Erkrankungen

Um die Pathogenese peroxisomaler Krankheiten studieren zu können, war man bis vor ca. zwanzig Jahren auf Untersuchungen in Zellkulturen beschränkt, da natürlich vorkommende Tiermodelle fehlten. Durch die Entwicklung des „*gene targeting*“ (Nobelpreis für Medizin 2007; Capecchi, 1989) wurde es möglich, Gene, die für peroxisomale Proteine kodieren, im Mausgenom gezielt zu eliminieren. So wurden in den letzten Jahren Mausmodelle für unterschiedliche peroxisomalen Erkrankungen generiert.

Durch generelles Ausschalten von PEX-Genen wurde versucht, Modelle für das Zellweger Syndrom zu entwickeln. In Abhängigkeit davon, welche Gene inaktiviert wurden, entstanden Mausmodelle, bei denen der PTS1- und PTS2- abhängige (Pex2p, Pex5p, Pex13p) oder nur der PTS2-abhängige (Pex7p) Import von Matrixproteinen oder die Proliferation der Peroxisomen (Pex11 $\alpha$ p, Pex11 $\beta$ p) betroffen war (Faust & Hatten, 1997; Baes et al., 1997; Li et al., 2002a, b; Maxwell et al., 2003; Brites et al., 2003). Weiterhin wurden Mausmodelle für peroxisomale Einzelenzymdefekte hergestellt. So wurden u.a. folgende Gene ausgeschaltet: ACOX1 (Fan et al., 1996a, b), MFP1 (Qi et al., 1999), MFP2 (Baes et al., 2000; Huyghe et al., 2006a, b), SCPx (Seedorf et al., 1998), Phytanoyl-CoA-Hydroxylase,  $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase (Savolainen et al., 2004), DHAPAT (Rodemer et al., 2003a, b), ALD (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Pujol et al., 2002), ALDR (Ferrer et al., 2005). So versprach man sich u. a. auch Mausmodelle für die rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata Typ I (DHAPAT-Gen) oder für die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (ALD-Gen).

Mit fortschreitender Entwicklung des „*gene targeting*“ wurde es möglich, Gene „konditionell“ auszuschalten. Dazu wird eine Maus mit einem von loxP-Sequenzen flankierten („gefloxten“) Bereich des zu untersuchenden Gens mit einer für die Cre-Rekombinase transgenen Maus verpaart. In den Nachkommen wird der „gefloxte“ Bereich in Abhängigkeit von der Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt (Thomas & Capecchi, 1987). Indem man die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle von Promotoren stellt, die unterschiedlichen transkriptionellen und / oder posttranslationalen Regulationsmechanismen unterliegen, wird die Generierung von Mäusen möglich, in denen eine zeitlich bzw. gewebespezifisch induzierte Inaktivierung des zu untersuchenden Gens erfolgt (Rajewsky, et al. 1996; Sauer, 1998; Kwan et al., 2002). Bis jetzt existieren mit Pex5-loxP und Pex13-loxP-Mäusen zwei Mauslinien mit „gefloxten“ PEX-Genen (Baes et al., 2002a; Bjorkman et al., 2002).

Die Mausmodelle für Zellweger Syndrom weisen einen Großteil der entsprechenden Organdefekte sowie der strukturellen- und metabolischen Veränderungen auf, die für Zellweger-Patienten charakteristisch sind. Somit eignen sich diese Tiermodelle ideal zum Studium peroxisomaler Erkrankungen. Die Generierung derartiger Tiermodelle wird in Kapitel 3.8 beschrieben.

## 1.6 Zielsetzung

Von den drei Schritten der peroxisomalen Biogenese ist der Import von Matrixproteinen bisher am besten untersucht worden, gefolgt von der Teilung der Peroxisomen. Der Ursprung der Peroxisomenmembran sowie die frühen Ereignisse während der peroxisomalen Membranbiogenese sind dagegen noch immer nicht geklärt. Erst kürzlich ist jedoch der Ursprung der Peroxisomenmembran wieder vermehrt in den Focus der Forschung gerückt, und es wurden zunehmend Untersuchungen zur peroxisomalen Membranbiogenese durchgeführt. Alle bisher publizierten Studien wurden entweder mit Fibroblastenkulturen von Patienten mit Zellweger Syndrom oder mit Hefekulturen durchgeführt, da bisher noch kein geeignetes Säugetiermodell für die Untersuchung der peroxisomalen Membranbiogenese existiert.

Von den drei Peroxinen (Pex3p, Pex16p, Pex19p), die bisher mit der frühen Membranbiogenese in Verbindung gebracht wurden, eignet sich Pex19p aufgrund seiner zentralen Bedeutung als Importrezeptor und Chaperon für die Insertion peroxisomaler Membranproteine vom Typ I am besten für die Generierung eines Mausmodells zur Untersuchung der peroxisomalen Membranbiogenese. Durch gezieltes Ausschalten des PEX19-Gens kann die Entstehung von Peroxisomen verhindert werden. Pex3p und Pex16p können zur Markierung peroxisomaler Membranvorläufer herangezogen werden, da sie unabhängig von Pex19p importiert werden. Ziel dieser Dissertation ist deshalb die Generierung und Charakterisierung eines Pex19 KO-Mausmodells zum Studium der Biogenese der Peroxisomenmembran.

Neben einer neuen Mauslinie als Tiermodell für Untersuchungen zur molekularen Pathogenese der Organveränderungen beim Zellweger Syndrom sollen mit diesem Mausmodell sowohl genaue Funktionsanalysen von Pex19p als auch Untersuchungen der frühen Membranbiogenese der Peroxisomen in Zellen mit unterschiedlichem Stoffwechsel ermöglicht werden (z.B. Fibroblasten versus Hepatocyten). Eine PEX19 KO-Maus bietet eine

hervorragende Möglichkeit, die Auswirkungen einer fehlenden peroxisomalen Membranbiogenese auf den Gesamtorganismus zu untersuchen. Damit kann sie zum tieferen Verständnis peroxisomaler Erkrankungen beitragen, um zukünftig neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

Um die PEX19 KO-Maus als neues Tiermodell für Zellweger Syndrom zu etablieren, ist es nötig, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede durch Vergleich dieses Mausstammes mit bisher publizierten peroxisomalen Mausmodellen zu zeigen. Dazu soll durch immunhistochemische Analysen in unterschiedlichen Organsystemen und in Fibroblastenkulturen der PEX19 KO-Tiere nachgewiesen werden, dass der Import von peroxisomalen Membran- und Matrixproteinen tatsächlich gestört ist und somit keine funktionsfähigen Peroxisomen gebildet werden. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen soll zusätzlich das Vorhandensein eventueller peroxisomaler Membranvorstufen geklärt werden. Um darüber hinaus die Importdefizienz, den Verbleib sowie die subzelluläre Verteilung noch vorhandener peroxisomaler Proteine in der Zelle näher charakterisieren zu können, ist es nötig, die Methode der differentiellen Zellfraktionierung an die Aufarbeitung von Kleinstmengen embryonaler Mausleber anzupassen. Die Westernblot-Analysen der verschiedenen Zellfraktionen mit Antikörpern gegen unterschiedliche peroxisomale Proteine und gegen spezifische Markerproteine anderer zellulärer Subkompartimente sowie RT-PCR-Analysen sollen die morphologisch erhobenen Daten ergänzen.

Die Auswirkung der Peroxisomendefizienz auf den peroxisomalen Fettsäurestoffwechsel und die damit verbundenen Veränderungen der Metabolite, die für Patienten mit Zellweger Syndrom charakteristisch sind, sollen durch Untersuchungen zum Fettsäurestoffwechsel essentieller Fettsäuren erweitert werden.

Des Weiteren sollen für Komplementationsversuche verschiedene Plasmide konstruiert werden. Durch Expression unterschiedlicher Abschnitte des Pex19-Proteins soll ermöglicht werden, die funktionell notwendigen Anteile im Pex19p-Protein, die für die Komplementation des genetischen Defekts essentiell sind, zu identifizieren und deren Wirkung auf die peroxisomalen Membranbiogenese näher zu charakterisieren. Mit Hilfe dieses Expression-Komplementation-Systems sollen abschließend erste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Zeitverlauf der Neuentstehung von Peroxisomen und zur Abfolge des Importes von Membran- und Matrixproteinen in primären Zellen durchgeführt werden.



## 2. Material

Im Folgenden sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien mit ihren Bezugsquellen sowie die Rezepturen für Puffer und Lösungen angegeben.

### 2.1 Chemikalien

Standardchemikalien in Analysequalität wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Hamburg), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

### 2.2 Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme

Folgende Restriktionsendonukleasen der Firma Promega (Mannheim) wurden verwendet: *BamHI*, *BglII*, *DpnI*, *HpaI*, *KpnI*, *NheI*, *NotI*, *Sall*, *SacI*, *XbaI*, *XhoI*.

Die Bezugsquellen der folgenden Enzyme waren:

Proteinase K	Roche (Penzberg)
RNAasin	Promega (Mannheim)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche (Penzberg)
Superscript First Strand Synthesis System	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase	Eppendorf (Hamburg)
Triple Master Mix	Eppendorf (Hamburg)
Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene (Amsterdam, NL)
Proteaseinhibitormix	Sigma Aldrich (Hamburg)

### 2.3 Enzym- und Aufreinigungssysteme (Kits)

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Expressway Plus Expression System	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
LigaFast Rapid DNA Ligation System	Promega (Mannheim)
MP Solution Kit 10 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Nexttec DNA Isolation System (Clean Columns)	Nexttec (Leverkusen)
Phase Lock Gel 15 ml Heavy	Eppendorf (Hamburg)

Qiagen Large-Construct Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Mini, Midi und EndoFree Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Superscript First-Strand Synthesis System	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)

## 2.4 Molekulargewichtsmarker

100 bp DNA ladder	(100, 200, 300, 400, <u>500</u> , 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 bp)	Promega (Mannheim)
200 bp DNA step ladder	(200, 400, 600, 800, <u>1000</u> ,..., 3000, 3400, 3800, 4200, ..., 6600 bp)	Promega (Mannheim)
1 kb DNA ladder	(75/134/154/201/220, 298, 344, 396, <u>500/517</u> , 1018, <u>1636</u> , 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216 bp)	Gibco BRL (Eggenstein)
1 kb DNA ladder	(250/253, 500, <u>750</u> , <u>1000</u> , 2000, 2500, <u>3000</u> , 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp)	Promega (Mannheim)
Gene Ruler 100 bp DNA ladder	(100, 200, 300, 400, <u>500</u> , 600, 700, 800, 900, 1000 bp)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Precision Plus Protein dual color standard	(10, 15, 20, <u>25</u> , 37, <u>50</u> , <u>75</u> , 100, 150, 250 kD)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Precision Plus Protein unstained standard	(10, 15, 20, <u>25</u> , 37, <u>50</u> , <u>75</u> , 100, 150, 250 kD)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
RNA markers	(281, 623, 955, 1383, 1908, 2604, 3638, 4981, 6583 bp)	Promega (Mannheim)

## 2.5 Vektoren

pKO Scrambler NTK 1908	Stratagene (Amsterdam, NL)
pLitmus29	New England Biolabs (Frankfurt)
pCMVSPORT6	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
pCI-neo	Promega (Mannheim)

## 2.6 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene (Amsterdam, NL)
<i>E. coli</i> ElectroTen-Blue	Stratagene (Amsterdam, NL)

## 2.7 Mausstämme

Inzuchtstämme zur Rückkreuzung in den entsprechenden genetischen Hintergrund:

C57BL/6JCrI	Charles River Laboratories (Sulzfeld)
129S1/SvImJ	Charles River Laboratories (Sulzfeld)
BALB/cOlaHsd	Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen)

## 2.8 Sonstiges

DNA Low Melt Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
BioMax MR	Kodak Industrie (Calon-sur-Saône, F)
Extra Thick Blot Paper für PROTEAN II xi Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Hyperfilm	Amersham Biosciences (Freiburg)
Immobilon-P	Milipore GmbH (Schwalbach)
Mowiol 4-88	Polyscience Inc. (Eppelheim)
RNAse-Zap	Ambion (Darmstadt)
Bisbenzimid H33258	Merck (Darmstadt)

## 2.9 Allgemeine Puffer und Lösungen

10x MOPS	200 mM MOPS; 50 mM NaOAc (pH 5,0); 10 mM EDTA (pH 8,0); auf pH 7,0 einstellen
10x TAE	400 mM Tris, 200 mM Essigsäure, 10 mM EDTA (pH 8,0)
1x TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl; auf pH 7,4 einstellen
1x TE	20 mM Tris; 1mM EDTA (pH 8,0)
10x PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O, 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; auf pH 7,4 einstellen,

## 2.10 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Trizol Reagent	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
Nuklease-freies Water, nicht DEPC-behandelt	Ambion (Darmstadt)
Lyse-Puffer	400 mM NaCl; 50 mM Tris (pH 8,0); 100 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 % SDS
Fällungsmix	35 ml abs. Ethanol; 12,6 ml H <sub>2</sub> O (HPLC-Qualität); 1,4 ml 3 M NaOAc (pH 5,0); 10 µl 1 M MgCl <sub>2</sub>
HiDi Formamid	Applied Biosystems (Darmstadt)
RNA-Laufpuffer	1x MOPS-Puffer; 2,5 M Formaldehyd
RNA-Probenpuffer	25 mg Bromphenolblau, 80 µl 500 mM EDTA (pH 8,0), 750 µl 37 % Formaldehyd, 2 ml Glycerin, 3,1 ml Formamid, 4 ml 10x MOPS-Puffer

## 2.11 Medien und Puffer für die Bakterienkultur

TENS-Puffer	1x TE; 0,1 M NaOH; 0,5 % SDS
LB-Medium	1 % Trypton, 5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl; auf pH 7,2 einstellen
LB-Agar	1 % Trypton; 5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 1,5 % Agar; auf pH 7,2 einstellen
SOC-Medium	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose

## 2.12 Medium für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden von PAA Laboratories (Coelbe) bezogen, falls nicht anders angegeben.

EF-Medium	DMEM (high Glucose); 10 % FBS; 2 mM L-Glutamine; 50 µg / ml Pen/Strep
-----------	--

### 2.13 Puffer und Lösungen für die Biochemie

Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Puffer A	1,5 M Tris, 0,4 % SDS; auf pH 8,8 einstellen
Puffer B	500 mM Tris, 0,4 % SDS; auf pH 6,8 einstellen
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Sammelgel-Lösung	für 4 Gele: 1,5 ml 30 % Acrylamidlösung; 2,25 ml ddH <sub>2</sub> O, 3 ml Puffer B, Spatelspitze Bromphenolblau, 65 µl 10 % APS; 7,5 µl TEMED
Trenngel-Lösung	für 12%iges Gel: 2 ml 30% Acrylamidlösung, 0,5 ml ddH <sub>2</sub> O, 2,5 ml Puffer A; 65 µl 10 % APS; 7,5 µl TEMED
10x Laemmli-Puffer	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS
Laemmli-Probenpuffer	3,55 ml ddH <sub>2</sub> O; 1,25 ml 500 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2,5 ml Glycerol; 2,0 ml 10 % (w/v) SDS; Spatelspitze Bromphenolblau
Ponceau Solution	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
NuPAGE Transferpuffer	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
ImmunStar Chemiluminescent Protein Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

### 2.14 Puffer und Lösungen für die Histologie

4 % PFA / PBS	4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4)
0,01 % Trypsin-Lösung	0,01 % Trypsin-Lösung in PBS (pH 7,4)
10 mM Citratpuffer	15 ml Stammlösung A und 85 ml Stammlösung B ad 1 l mit ddH <sub>2</sub> O (Stammlösung A = 0,1 M Zitronensäure; Stammlösung B = 0,1 M Natriumcitrat)
Blocklösung	4 % BSA in PBS (pH 7,4); 0,05 % Tween 20
Verdünnungspuffer	1 % BSA in PBS (pH 7,4); 0,05 % Tween 20
Mowiollösung	2,4 g Mowiol 4-88; 6,0 g Glycerol; 6 ml ddH <sub>2</sub> O; 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5)
Bleichschutz	2,5 g n-Propylgallat in 50 ml PBS (pH 7,4) und 50 ml Glycerin
Mowiol-Eindeckmedium	Mowiollösung und Bleichschutz 3:1 mischen

## 2.15 Puffer und Lösungen für die Elektronenmikroskopie

4 % PFA / 0,05 % Glutardialdehyd-Fixans	4 % Paraformaldehyd; 0,05 % Glutardialdehyd in PBS (pH 7,4)
1 % Glutardialdehyd-Fixans	1 % Glutardialdehyd in PBS, pH 7,4
0,2 M PIPES	6,048 g PIPES in 100 ml ddH <sub>2</sub> O; auf pH 7,4 einstellen
0,05 M Teorell-Stenhagen Puffer	50 mM Phosphorsäure; 75 mM Borsäure; 35 mM Zitronensäure; 345 mM NaOH; in 1 l ddH <sub>2</sub> O; auf pH 10,5 einstellen
DAB-Lösung	2 mg/ml 3,3-Diaminobenzidin; 0,15 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 0,01 M Teorell-Stenhagen Puffer
Agar 100 Epoxy Resin-Lösung	12 ml Agar 100 Epoxy Resin; 8 ml DDSA-Härter; 4 ml MNA-Härter; 0,65 ml BDMA-Beschleuniger
Methylen-Azur-II-Färbelösung	Methylenblau-Lösung (1 % Methylenblau in ddH <sub>2</sub> O) und Azur-II-Lösung (1 % Azur II in ddH <sub>2</sub> O) 1:1 mischen, filtrieren
Bleicitrat nach Reynolds	0,665 g Bleinitrat; und 0,88 g Natriumcitrat × 2 H <sub>2</sub> O in ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 M NaOH abpuffern bis die Lösung klar wird, mit ddH <sub>2</sub> O auf 25 ml auffüllen

## 2.16 Lösungen für die Immunfluoreszenz

MitoTracker Orange CMTMRos	Molecular Probes / Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
Lysosomen LysoTracker DND-99	Molecular Probes / Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
4% PFA / HEPES	4 % Paraformaldehyd in 0,15 M HEPES (pH 7,3)
Permeabilisierungspuffer	0,05 % Tween 20 und 0,05 % Triton-X-100 in PBS (pH 7,4)
Waschpuffer	0,01 % Tween 20 und 0,01 % Triton-X-100 in PBS (pH 7,4)
Roti-ImmunoBlock	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Zell-Eindeckmedium	50 % Glycerol 1,5 % (w / v) n-Propylgallat in PBS (pH 7,2)

## 2.17 Antikörper

**Tab. 2.1: Primärantikörper**

Antikörper (anti-)	Spezies	Verdünnung für		Herkunft
		WB	IF	
<b>Cytoplasma</b>				
Peroxin 5 Protein (Pex5p)	Maus	1:750		BD Transduction (Heidelberg)
<b>Peroxisomen</b>				
ABC-Transporter D3 (ABCD3)	Kaninchen	1:2000	1:2000	A. Vökl (Heidelberg)
Acyl-CoA-Oxidase I (ACOX)	Kaninchen	1:5000		P. P. van Veldhoven (Leuven, B)
Katalase	Kaninchen	1:100000	1:5000	D. I. Crane (Brisbane, AUS)
Peroxin 3 Protein (Pex3p)	Kaninchen	1:500		S. J. Gould (Baltimore, USA)
Peroxin 13 Protein (Pex13p)	Kaninchen	1:5000		D. I. Crane (Brisbane, AUS)
Peroxin 14 Protein (Pex14p)	Kaninchen	1:20000	1:5000	D. I. Crane (Brisbane, AUS)
Peroxisomale 3-Keto-Acyl-CoA-Thiolase (Thiolase)	Kaninchen	1:5000		P. P. van Veldhoven (Leuven, B)
<b>Mitochondrien</b>				
Komplex III des oxidativen Phosphorylierungssystems von Mitochondrien (OxPhos Compl III)	Maus	1:1000	1:500	Molecular Probes (Karlsruhe)
Mitochondriale Succinat-Dehydrogenase A (SDH A)	Kaninchen	1:1000		W. Kummer (Gießen)
Superoxid-Dismutase 2 (SOD2)	Kaninchen	1:7000		Abcam (Cambridge, UK)
<b>Lysosomen</b>				
Lysosomen-assoziiertes Membranprotein (Lamp1)	Ratte	1:100		Abcam (Cambridge, UK)
<b>Endoplasmatisches Retikulum</b>				
Cytochrom P450-Reduktase (CyP450Red)	Kaninchen	1:1000		Abcam (Cambridge, UK)

WB = Western-Blot, IF = Immunfluoreszenz

**Tab. 2.2: Sekundärantikörper**

Antikörper (anti-)	Spezies	Verdünnung für		Herkunft
		WB	IF	
Kaninchen-IgG alkalische Phosphatase gekoppelt	Esel	1:30000		Sigma-Aldrich (Hamburg)
Ratte-IgG alkalische Phosphatase gekoppelt	Esel	1:30000		Sigma-Aldrich (Hamburg)
Maus-IgG Alkalkalische aine Phosphatase gekoppelt	Esel	1:30000		Sigma-Aldrich (Hamburg)
Kaninchen-IgG Alexa Fluor 488 gekoppelt	Esel		1:300	Molecular Probes (Karlsruhe)
Maus-IgG Texas Red gekoppelt	Pferd		1:300	Vector Peterborough, UK)
Kaninchen-IgG Cy3 gekoppelt	Ziege		1:1000	Dianova (Hamburg)

WB = Western-Blot, IF = Immunfluoreszenz

## 2.18 Oligonukleotide

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) synthetisiert und als Primer für die PCR oder zur Sequenzierung verwendet.

**Tab. 2.3: Oligonukleotide**

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendete Annealing-Temperatur
3ForEnd1	GGA AGT GGA CAT GCA GTG TTT GCT G	56°C
3ForEnd2	AGC AGA TTG GTA GCT TTG CCA CG	56°C
3RevEnd1	ATT GGT GCT AAG GCA TCT GGA CTC C	56°C
3RevEnd2	CAG CTC CTT TAG TGT CCC AAC ATG C	56°C
5ForCopa1	GCC TGC CAG CTC AAT TAT GAC ATG C	60°C
5ForCopa2	CCA CAG GTG ACA GAG ATT GGC AAA G	57°C
5RevCopa1	CAG CCC AAT CAC ATC TTT GCC AAT C	60°C
5RevCopa2	CTG GAA TTG ACA GGA AGG TGG TGG	57°C
ABCD2-For3	TGC AAA ATT CTG GGG AAG A	58°C
ABCD2-Rev2	TGA CAT CAG TCC TCC TGG TG	58°C
ABCD4-For3	TGA AAG GCT CAG TGC AGA TG	62°C
ABCD4-Rev3	GGC TGC AGG TAG AAG AGA CG	62°C
ALDP-For2	GAG GGA GGT TGG GAG GCA GT	63°C
ALDP-Rev2	GGT GGG AGC TGG GGA TAA GG	63°C
M13-20	GTA AAA CGA CGG CCA GT	55°C



Name	Sequenz 5'-3'	Verwendete Annealing-Temperatur
MmKatalase-345F	CAC CAG ATA CTC CAA GGC AAA GG	64°C
MmKatalase-716R	TAG CCA TTC ATG TGC CGG TGA	64°C
MmPex14-Rev3	CTG ACA GGG GAG ATG TCA CTG CT	64°C
MmPex16-304F	CAG AAG TTG CTG ACA TGG CTG AG	64°C
MmPex19-445F	TCT GAA GAG GAG CTG ATG AAA G	64°C
MmPex19-831R	GTT GAG GCC AGG AGG CAT CT	64°C
MmPex3-1090R	CTA AAG GCA GGC TGA CAC TGG A	64°C
MmPex3-722F	CCT TGT CCC TTT TGG ACT TGG A	64°C
MmPex5-1477F	GGC CTG GGA GTC CTG TTC AA	64°C
MmPex5-1858R	AGG CAT CGC TCT GGC CTA AC	64°C
MmPMP70 -879F	CTC AGT CTT CCG AAA ACT GGT GG	64°C
MmPMP70-1256R	TCA ATA CCC TTC CCC TGT TGT GA	64°C
Pex19-For1	TTA GGG GAG ACA GGG TTC ATT TG	55°C
Pex19-For2	CTC ACA ACC ACC TGT AAT GCC AG	55°C
Pex19-For3	TCC CCC CAA CAC ACA AAG AAA AC	55°C
Pex19-For29	TGA GGC CAT GCT AGA TCT CAA TGC AGC AGT TAC AGG CCT TG	65°C
Pex19-For35	CCC GCT CGA GCG GCA TGA AGG AGC TGG CTG AGG AAG AGC CCC ATC	50°C
Pex19-For33	CCA TGC TAG ATC TCA TGC AGC A	60°C
Pex19-For39	ATG GCG GCT GCT GAG GAA GGT TG	65°C
Pex19-For4	AAC GCA ATA AAC CCT CCC ACC C	55°C
Pex19-For5	GCA GGT AAG GCT TTC TCT CCT CAC	55°C
Pex19-For6	GCT AAC AAA CAG CAA CCA ACA TCC C	55°C
Pex19-For7	CAC ACT CTC CAT CCC ATT CAA GAC	55°C
Pex19-For8	GAG TTC GTA ACA TCA TTT CCC CTG	55°C
Pex19ko-F1	CCA TAA CTT CCG TTC CAT GAG	60°C
Pex19ko-F2	GTA CGA CAT ATG GCA TTC GAC	60°C
Pex19ko-F3	AAC ACT GAG CCA TCT CAC CAG	60°C
Pex19ko-F3b	CCT TTG GAA GAG CAA TCA GTC	60°C
Pex19ko-F4	CAA ACA GGT AAC TAC TTA CCA GT	60°C
Pex19ko-F5	ACA ATT GGC TAA AGA GCA AGA TG	60°C
Pex19ko-F6	CAC TGT GCT CAG CAC GAT TG	60°C
Pex19ko-F6b	CCT GGT CTA CAG AGT TCC AG	60°C
Pex19ko-F7	TGA GCA ATC TAT CTA GTT CAA GG	60°C
Pex19ko-F8	CAA CAG AGT CAC TGG GAA CTG	60°C
Pex19ko-F9	TCC TGA GAA CTC ATG TTG CTG	60°C
Pex19ko-F10	GTG TTG TTA GGC TCT ACC ATG	60°C
Pex19ko-F11	ACA GCT TAT CAA ACG GAA GAC T	60°C
Pex19ko-R1	CAT TTC CAT AGA ATA TGT TGC ATC	60°C
Pex19ko-R2	CAC TCT GCA GTT TAT AGA AAC TAG	60°C
Pex19ko-R3	AAC CCG ACC ATG GCT AAG TG	60°C
Pex19ko-R4	GAC ACT GTT CGC CAT TAG CAC	60°C
Pex19ko-R4	GAC ACT GTT CGC CAT TAG CAC	60°C

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendete Annealing-Temperatur
Pex19ko-R5	CAA ACT ACT TGA CCC ATG AG	60°C
Pex19ko-R5b	TAG ATA GAT TGC TCA AGC TGG T	60°C
Pex19ko-R6	GAA ACA CAG ATG TTA CTT AAG CA	60°C
Pex19ko-R7	GAT TCT TGC CTG ACC TTG AAG	60°C
Pex19ko-R8	GAA AAA GAT ACA CAA GGC AGT TAG	60°C
Pex19ko-R9	CAC ATG GTG GCT CAT AAC GA	60°C
Pex19ko-R10	AGT TGT ATG TGC ATT TGT GGA C	60°C
Pex19ko-R11	CTC ACT GTG TAG CCA TTG GAC	60°C
Pex19-Rev1	CAC TAT GTA GAC AGG ACC AGG TTG G	55°C
Pex19-Rev2	CGA CTG ATT GCT CTT CCA AAG G	55°C
Pex19-Rev25	CAA GGC CTG TAA CTG CTG CAT TGA GAT CTA GCA TGG CCT CA	65°C
Pex19-Rev3	TCC ACC TCC CAA GGA CAG AGA TTA C	55°C
Pex19-Rev4	CCC GAT ACT TCT GGT CTT TCC CAT C	55°C
Pex19-Rev5	GGG ATG TTG GTT GCT GTT TGT TAG	55°C
Pex19-Rev6	GAA GAC AAA CTC ACC ATC TCC CCA G	55°C
Pex19-Rev7	TTC TGG CTA CAC CCC TTT CCC AAG	55°C
Pex19-Rev31	TCA CAT GAT CAG ACA CTG TTC G	65°C
Pex19-Rev8	ACA CAT ACC TTG AGG AGG ACT GCC	55°C
PGK-as	GCT AAA GCG CAT GCT CCA GAC TG	60°C
pKo-ScramblerA_as	GTG GGC TCT ATG GCT TCT GA	60°C
pKo-ScramblerA_s	GGA CGA ACT AAA CCT GAC TAC	60°C
pKo-ScramblerB_as	ACC TGA CGT CAA ACA GCT ATG	60°C
PPAR $\alpha$ -For2	AGA CCG TCA CGG AGC TCA CA	68°C
PPAR $\alpha$ -Rev2	GGC CTG CCA TCT CAG GAA AG	68°C
PPAR $\beta$ -For1	CAC CGA GTT CGC CAA GAA CA	60°C
PPAR $\beta$ -Rev1	AGA GCC CGC AGA ATG GTG TC	60°C
PPAR $\gamma$ -For2	TCC GTA GAA GCC GTG CAA GA	60°C
PPAR $\gamma$ -Rev2	CAC CTT GGC GAA CAG CTG AG	60°C
rRNA-For1	CCT TCG ATG TCG GCT CTT CCT AT	65°C
rRNA-For2	GGT CTC CAA GGT GAA CAG CCT CT	65°C
SOD1-For2	AGC GGT GAA CCA GTT GTG TTG T	64°C
SOD1-Rev2	CCA CAC AGG GAA TGT TTA CTG C	64°C
SOD2-For2	AAG TAG GTA GGG CCT GTC CGA TG	58°C
SOD2-Rev2	CTA AGG GAC CCA GAC CCA ACA AG	58°C
SOD3-For1	GGA GAG CGA GTG CAA GAC CAC TT	64°C
SOD3-Rev1	TCA AAG GTG CTC ACT GGG AAG TC	64°C
$\alpha$ -Thiolase-556F	GAG AAT GTG GCT GAG CGG TTT G	64°C
$\alpha$ -Thiolase-936R	GAC CCC GAC CAC TGC ATA GG	64°C

## 3. Methoden

In diesem Kapitel sind alle Methoden beschrieben, die zur Generierung der PEX19 KO-Mauslinie, ihrer Genotypisierung und Charakterisierung, sowie für zellbiologische Untersuchungen angewendet wurden.

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung von *Trizol Reagent*<sup>®</sup> und *Heavy Phase Lock Gel*<sup>®</sup> nach Angaben der Hersteller.

*Trizol*<sup>®</sup> ist eine gebrauchsfertige Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, die zur Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe eingesetzt wird. Dabei werden in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) die Zellen durch Homogenisierung und Verwendung bestimmter Detergenzien aufgeschlossen. Guanidiniumthiocyanat zerstört zelluläre Strukturen, bewirkt die Denaturierung von Proteinen und inaktiviert die bei der Lyse von Zellen freigesetzten RNAsen. Durch saure Phenolextraktion kommt es zur Abtrennung der RNA von anderen Nukleinsäuren. Dabei wird die Trennung der wässrigen, die RNA enthaltende Phase, von der organischen Interphase durch die Verwendung von *Phase Lock Gel*<sup>®</sup> (PLG) erleichtert. Bei PLG handelt es sich um inerte und hitzestabile Verbindungen, deren Dichten zwischen der von wässrigen und organischen Lösungen liegen. Deswegen bilden sie eine Barriere zwischen den beiden Phasen. Da organische Lösungen in der Dichte variieren können, wird PLG in zwei unterschiedlichen Dichten angeboten („*Heavy and Light*“). Für die Präparation von RNA mit *Trizol*<sup>®</sup> wurde die Variante „*Heavy*“ eingesetzt.

Die verwendeten Arbeitsgeräte wurden vor Beginn der Präparation mit RNase-Zap<sup>®</sup> gereinigt. Alle Arbeitsschritte wurden mit vom Hersteller als DNase- und RNase-frei zertifizierten Plastikwaren durchgeführt.

Bis zu 100 mg Lebergewebe wurden in 2 ml *Trizol*<sup>®</sup> aufgenommen und mit einem Ultrathurax homogenisiert. Durch Zentrifugation des Homogenates (5000 g, 4 °C, 10 min) (Kendro Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Karlsruhe) wurden Zelltrümmer als Niederschlag entfernt, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform / Isoamylalkohol (49:1) wurden die Proben kräftig geschüttelt, in ein vorbereitetes 15 ml *Phase Lock Gel*<sup>®</sup>-Gefäß überführt und weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (5000 g, 4 °C, 15 min) wurde die wässrige Phase

durch die Gel-Matrix von der organischen Phase getrennt. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne die Gel-Barriere zu verletzen, abgenommen und mit 2 ml Isopropanol versetzt. Durch Zentrifugation (3500 g, 4 °C, 10 min) wurde die RNA gefällt, das RNA-Pellet zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde in nukleasefreiem Wasser gelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Da RNA wesentlich empfindlicher als DNA gegenüber Nukleasen und Hydrolyse durch Säuren und Basen ist, wurde jeweils vor einem weiteren Einsatz die Qualität der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### 3.1.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung, Trennung und selektiven Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten wurde die von Aaij und Borst (1972) beschriebene und von Meyers et al. (1976) verfeinerte Methode der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Das Sichtbarmachen der Banden erfolgte durch Einlagerung des dann unter UV-Licht (266 nm) fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (Waring, 1965).

RNAs neigen stark zum Ausbilden von Sekundärstrukturen durch Basenpaarung. Deshalb ist es nötig, denaturierende Gele für die Größenbestimmung zu verwenden. Formaldehyd im Gel zerstört die Sekundärstruktur der RNA, so dass die RNA-Moleküle nur aufgrund ihrer Ladung aufgetrennt werden. Dazu wurden 1,5 %ige Agarose-Flachbett-Gele verwendet. 1,5 g Agarose wurde in 72 ml ddH<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgeköcht, nach Abkühlen im Wasserbad auf 55 °C mit 10 ml 10x MOPS-Puffer und 18 ml 37 % Formaldehyd versetzt und in einen Gelschlitten mit Kamm ausgegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Kamm entfernt. Die durch den Kamm entstandenen Geltaschen dienen der Aufnahme der RNA-Proben. Das Gel wurde mit dem Gelschlitten in eine mit RNA-Laufpuffer gefüllte horizontale Gelkammer (Mini-Sub Cell GT Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gelegt.

1-5 µl RNA-Probe wurde mit 2 µl RNA-Probenpuffer und 0,5 µl RNase-Inhibitor (*RNAasin*<sup>®</sup>) gemischt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (Stocklösung [10 mg/ml] 1:10 verdünnt) zugegeben und die Proben auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von maximal 100 V. Nach einer Laufstrecke von ca. 3 cm wurden die Gele unter UV-Licht (266 nm) fotografiert.

### 3.1.3 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Da mittels PCR-Reaktion keine RNA vervielfältigt werden kann, geht bei der RT-PCR der eigentlichen PCR-Reaktion zunächst eine andere enzymatische Reaktion voraus. Mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) wird mit RNA als Matrize eine einzelsträngige DNA-Kopie (cDNA = „*complementary*“ DNA) erstellt. Vor der Durchführung jeder Reaktion wurde die Qualität der RNA mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Die Erststrang-Synthese erfolgte mit dem *Superscript First-Strand Synthesis System*<sup>®</sup> nach Herstellerprotokoll aus 2 µg Gesamt-RNA. Dazu wurde der Reaktionsansatz aus 2 µg RNA, 1 µl Oligo-dT-Primer ([0,5 µg/µl], mit dem Enzymsystem mitgeliefert), und 1 µl dNTPs (jeweils 10 µM) 5 min bei 65 °C erwärmt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes wurden 9 µl einer Mischung aus 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (40 U, mit dem Enzymsystem mitgeliefert) und 2 µl 10x-Reaktionspuffer hinzugefügt. Nach zweiminütigem Erwärmen auf 42 °C folgte die Zugabe von 1 µl (50 U) der *SuperScript II reversen Transkriptase*<sup>®</sup>. Das Reaktionsgemisch wurde 50 min bei 42 °C im *TrioThermoblock*<sup>®</sup> (Biometra, Göttingen) inkubiert, wodurch die cDNA-Synthese, also die Verlängerung des Primers, durch die reverse Transkriptase erfolgte. Anschließend wurde das Enzym hitzeinaktiviert (70 °C, 15 min).

Am Ende der Reaktion lag die synthetisierte cDNA als Hybridmolekül mit der Matrix-RNA vor. Zur Freilegung der einzelsträngigen cDNA wurde das Reaktionsgemisch 20 min bei 37 °C mit 1 µl *E.coli* RNase H (2 U) behandelt.

Die in einzelsträngige cDNA umgeschriebenen RNA-Fragmente wurden anschließend nach Standard-Protokoll (s. Kapitel 3.1.10) in die PCR-Reaktion eingesetzt.

### 3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe

Die für die Typisierung benötigte genomische DNA wurde nach einem Protokoll von Miller et al. (1988) aus Geweben von Mausembryonen (Herz, Leber) oder aus Schwanzspitzen (3-5 mm) bzw. Ohrbiopsien (max. 2 Ohrlochstanzen) 3 Wochen alter Mäuse isoliert. Das Gewebe wurde entweder direkt nach Entnahme verarbeitet oder bis zur Extraktion der DNA bei -20 °C gelagert.

Jeweils das gesamte Gewebe wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 600 µl Lyse-Puffer und 20 µl Proteinase K (15 mg/ml) versetzt und unter ständigem Schütteln im Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 55 °C über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurde die Gewebelösung mit 167 µl 6 M NaCl-Lösung versetzt, kräftig gemischt und anschließend zentrifugiert (16000 g, RT, 50 min; Heraeus Biofuge pico; Thermo Scientific, Karlsruhe). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von 700 µl absolutem Ethanol und vorsichtigem Mischen wurde die DNA gefällt und durch 5 minütige Zentrifugation bei 16000 g pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das verbleibende DNA-Pellet einmal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernen der Ethanol-Lösung wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30-80 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.1.5 „Schnelle“ Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Die Typisierung neugeborener Knockout-Jungtiere erforderte aufgrund ihrer geringen Lebenserwartung die Etablierung eines Protokolls für eine schnelle Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien. Die Ergebnisse der DNA-Analyse mussten vor dem Ableben der Jungtiere vorliegen, um eine Durchführung nachfolgender Versuche möglich zu machen. Daher wurde für diese spezielle Anwendung die Aufarbeitung mit *Clean Columns*<sup>®</sup> der Firma Nexttec (Leverkusen) und dem dazugehörigen Puffersystem eingesetzt. Dieses System verfügt über einen sehr effizienten *Lysis-Puffer*, der das Verdauen des Gewebes innerhalb von 15-30 min ermöglicht. Hinzu kommt, dass bei diesem System im Gegensatz zu anderen Aufreinigungsmethoden Proteine, Detergenzien und niedermolekulare Substanzen an die Säulen-Matrix binden, während die DNA in Lösung bleibt und nach einem kurzen Inkubationsschritt in ein Probengefäß zentrifugiert wird. Dadurch entfallen zusätzliche Wasch- und Isolierungsschritte. Die für die Aufarbeitung benötigte Zeit wird deutlich verkürzt.

Die Isolierung der DNA wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Schwanzspitzenbiopsien (2-3 mm) wurden mit 303 µl *Lysis-Puffer* (265 µl *Puffer G1*, 10 µl *Puffer G2*, 25 µl *Puffer G3* und 3 µl DTT) 25 min bei 60 °C im Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. 120 µl des Lysats wurden auf eine 5 min zuvor mit 350 µl *Prep Puffer* äquilibrierte Säule gegeben. Für das Anlagern von Proteinen und Detergenzien an das Säulenmaterial wurde eine Ruhepause von 3 min eingehalten, und die DNA abschließend bei 700 g (Heraeus Biofuge pico; Thermo Scientific, Karlsruhe) in ein sauberes Probengefäß zentrifugiert.

Da Puffersubstanzen des *Nexttec DNA Isolation Systems*<sup>®</sup> die photometrische Messung der DNA verfälschen, wurde auf eine Konzentrationsbestimmung verzichtet. Unabhängig von der Konzentration wurden jeweils 2 µl des Eluates in die PCR-Reaktion eingesetzt.

### 3.1.6 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren

Um aus Reaktionsansätzen vorhandene Enzyme und Salze zu entfernen oder DNA zu konzentrieren, wurde die DNA einer Ethanol-Fällung unterzogen. Dafür wurde zur DNA-Lösung  $\frac{1}{10}$  des Volumens 3 M Natriumacetat und das 2,5 fache Volumen 100 % Ethanol (RT) gegeben, gemischt und für 15 min bei 16000 g (Heraeus Biofuge pico; Thermo Scientific, Karlsruhe) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 % Ethanol (RT) gewaschen, nach Abnahme des Überstandes getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.1.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäure-Lösungen wurde mit Hilfe von Spektralphotometern bestimmt (SmartSpec 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München oder Nanodrop, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Die Extinktion bei 260 nm gibt Auskunft über die Konzentration, wobei nach Maniatis et al. (1989) gilt:

OD <sub>260</sub> =1 entspricht:	50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA
	33 µg/ml bei einzelsträngiger DNA
	40 µg/ml bei RNA

Das Verhältnis OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> spiegelt den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäure wider und sollte im Bereich 1,8 bis 2,0 liegen.

Für die Messung mit dem SmartSpec Plus wurden die Lösungen zuvor verdünnt (1:100) und deren Extinktion bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette gemessen. Bei Messungen mit dem Nanodrop entfiel eine Verdünnung. 2 µl der Proben wurden hier direkt auf die Linse der optischen Einrichtung des Gerätes pipettiert.

### 3.1.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die benötigte Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Zusatz von 5 µl Ethidiumbromid-Stocklösung (10 mg/ml) in einen Gelschlitten gegossen. Mit Hilfe eines Kamms wurden Geltaschen ausgespart, die der Aufnahme der DNA-Proben dienten. Nach der Polymerisation und nach dem Entfernen des Kamms wurde das Gel im Gelschlitten in eine mit Laufpuffer (1x TAE) gefüllte Flachgelkammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gelegt. Die DNA-Proben wurden mit  $\frac{1}{5}$  Vol. 5x Probenpuffer (Promega, Mannheim) gemischt, in die Geltaschen pipettiert und durch Anlegen einer Spannung von maximal 100 V aufgetrennt.

Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht (266 nm) fotografiert (Gel doc 2000, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

### 3.1.9 DNA-Amplifikation (Polymerasekettenreaktion, PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur exponentiellen *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden werden (Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988).

Mit dieser Methode wurden mit Hilfe spezieller Primer zusätzliche Nukleotide in das PCR-Produkt eingeführt (gerichtete Mutagenese) oder die Enden des DNA-Fragments mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen modifiziert. Dadurch konnten verschiedene PCR-Fragmente in eukaryotische Expressionsvektoren eingesetzt werden. Darüber hinaus diente die PCR in der RT-PCR-Technik zum Nachweis der mRNA-Expression.

In dieser Arbeit wurden je nach Verwendungszweck unterschiedliche hitzestabile DNA-Polymerasen eingesetzt. Je nach Enzym-Hersteller variierte die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes. Bei der Amplifikation genomischer DNA oder schwieriger Amplikons wurde dem Reaktionsansatz DMSO zugegeben. Der Zusatz von DMSO (Masoud et al., 1992) bewirkt die Auflösung von sich ausbildenden Sekundärstrukturen der als Vorlage dienenden DNA und ermöglicht so besonders bei GC-reichen Strukturen eine korrekte DNA-Synthese. So kann sich auch die Spezifität der Reaktion erhöhen (Hung & Fong, 1990), wenn bis zu 10 % DMSO dem Reaktionsmix zugesetzt werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden für die verschiedenen Primerpaare individuell ermittelt und angepasst. Die für die



durchgeführten PCR-Reaktionen benötigten Primer sind unter Kapitel 2.18 mit ihrer Nukleotidsequenz und ihrer verwendeten Annealing-Temperatur aufgeführt.

Standardmäßig wurde für alle PCR-Reaktionen die *Taq DNA Polymerase*<sup>®</sup> benutzt. Nur bei der Amplifikation von PCR-Fragmenten, die in die Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden DNA-Polymerasen mit „*Proofreading*“-Aktivität verwendet (*Triple Master Mix*<sup>®</sup>, *Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase*<sup>®</sup>) und die Reaktionsbedingungen nach den Vorgaben der Hersteller angepasst.

Alle in dieser Arbeit angewendeten PCRs wurden auf dem *iCycler*<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Für eine Auswertung der PCR-Ergebnisse wurden nach den Reaktionen jeweils ca. 20 % der einzelnen Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert.

Eine Standard-PCR-Reaktion setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

DNA	x µg
10x Puffer	2,5 µl
10 mM dNTPs	0,2 µl
„ <i>Forward</i> “-Primer [10 µM]	0,5 µl
„ <i>Reverse</i> “-Primer [10 µM]	0,5 µl
DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Nach einer fünfminütigen Denaturierungsphase bei 95°C wurde folgender Reaktionszyklus 35x wiederholt:

Denaturierung	95 °C	5 min
„ <i>Annealing</i> “	siehe „verwendete Annealing-Temperatur“ der Primer	30-45 s
Extension	72 °C	30 s - 1 min

Nach Ablauf des letzten Zyklus schloss sich eine ein- bis fünfminütige Extensionsphase an, um noch vorhandene, primerassoziierte Template-DNA möglichst vollständig in ein doppelsträngiges Produkt zu überführen. Anschließend wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C abgekühlt.

### 3.1.10 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Verfahren des partiellen Kettenabbruchs von enzymatisch hergestellten DNA-Kopien mit dem *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*<sup>®</sup> durchgeführt.

Hierbei wird einzelsträngige oder der „*Template*“-Strang einer doppelsträngigen DNA mit Hilfe eines Primers in Gegenwart von DNA-Polymerasen und den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) analog einer PCR synthetisiert (McBride et al., 1989). Bei diesem als „Cycle-sequencing“ bezeichneten Verfahren führt nach dem Sanger-Verfahren der Einbau von Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP), die im Ansatz im Überschuss vorhanden sind, zu einer zufälligen Termination der Kettenverlängerungsreaktion. Somit entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Ketten jeweils mit einem entsprechenden Didesoxyribonukleosidmonophosphat (ddNMP) am Strangende. Dieses Verfahren wurde so modifiziert, dass im Gegensatz zu der herkömmlichen Methode, bei der die ddNTPs oder alternativ die Primer radioaktiv markiert sind, fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt werden (Smith et al., 1986). Da diese „Terminatoren“ bei Anregung mit einem Laser Licht verschiedener Wellenlängen emittieren, kann die Reaktion mit allen vier „Terminatoren“ in nur einem Gefäß durchgeführt werden.

Die automatische Sequenzierung erfolgte am Gießener Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen-Marburg mit dem Fluoreszenzsequenzierautomaten *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer*<sup>®</sup> der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, D). Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Kapillarelektrophoresegerät, bei dem die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sequenzierprodukte während der Elektrophorese durch 16 unabhängige Kapillaren wandern und automatisch detektiert und dokumentiert werden. Die gespeicherten Daten wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit der *ABI Prism™ Sequencing Analysis Software* ausgewertet. Anschließend wurden alle aus den Sequenzierreaktionen resultierenden Sequenzen mit der Software *SeqMan*<sup>®</sup> (*DNASTar-Package*<sup>®</sup>, Madison, USA) z. B. gegen Datenbanksequenzen abgeglichen.

Da eine Sequenzierreaktion auf dem *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer*<sup>®</sup> der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) mit einem 30 cm-Kapillar-Array eine Leseweite von ca. 600 bp erreicht, wurde für die Lage der Sequenzier-Primer ein Abstand von 550 bp gewählt. War die Leseweite einer Sequenzierreaktion nicht ausreichend, wurde die Lücke durch Sequenzierung mit einem weiteren Primer geschlossen. Die Sequenzierung erfolgte sowohl aus 3'- als auch aus 5'-Richtung.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA [10-500 ng]	x µl
Primer [10 µM]	1 µl
Sequenzier-Mix	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die anschließende Reaktion lief standardmäßig unter den unten aufgeführten Bedingungen ab. Da es sich bei der Sequenzierreaktion um eine PCR-analoge Reaktion handelt, wurde auch das gleiche Gerät wie bei der PCR (*iCycler*<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) benutzt.

Denaturierung	96 °C	15 s	} 30 Zyklen
„Annealing“/ Extension	60 °C	4 min	

Die Sequenzierreaktion wurde bei schlechten Ergebnissen variiert, indem die Reaktionsbedingungen verändert wurden. Vor dem Auftragen der Reaktion erfolgte eine Aufreinigung der Proben.

Um die Sequenzierprodukte von nicht eingebauten ddNTPs und Primern zu reinigen, wurden die Proben mit 350 µl Fällungsmix (4 °C) gemischt und durch Zentrifugation (16000 g, RT, 30 min; Heraeus Biofuge pico; Thermo Scientific, Karlsruhe) gefällt. Eine Reinigung des Pellets erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 80 % Ethanollösung (RT) und anschließender Zentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 20 µl *HiDi Formamid*<sup>®</sup> aufgenommen und bei 70 °C für 10 min denaturiert. In dieser Form kann der Reaktionsansatz bei -20 °C gelagert oder direkt analysiert werden.

## 3.2 Methoden zur Klonierung

### 3.2.1 Schnelle Isolierung von Plasmid-DNA

Mit Hilfe der Methode von Zhou et al. (1990) ist es möglich, in sehr kurzer Zeit Plasmid-DNA zu isolieren. Daher wurde dieses Verfahren hauptsächlich eingesetzt, wenn eine große Anzahl von Bakterienkolonien nach Transformation durch PCR-Screening oder Restriktionsanalyse untersucht werden mussten. Da bei dieser Präparation eine Phenol- / Chloroform-Aufreinigung fehlt, weist die so gewonnene DNA nur eine geringe Reinheit auf.

Von einer Übernachtskultur wurden 1,5 ml abzentrifugiert (3500 g, 4 °C, 5 min; Heraeus Biofuge pico, Thermo Scientific, Karlsruhe), der Überstand abgegossen und das Bakterien-Pellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl TENS-Puffer wurden die Proben gemischt, auf Eis abgekühlt, mit 150 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) versetzt und erneut gemischt. Die lysierten Bakterienzellen wurden vom Überstand durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 16000 g getrennt, der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 900 µl absolutem Ethanol und vorsichtigem Mischen wurde die DNA ausgefällt und durch 2 minütige Zentrifugation bei 16000 g pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das verbleibende DNA-Pellet einmal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernen der Ethanol-Lösung trocknete das Pellet bei Raumtemperatur und wurde anschließend in 20-40 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Qiagen-Säulen

Zur Isolierung hochreiner BAC- und Plasmid-DNA für Klonierungen, Sequenzierungen und Elektroporationen von Bakterien- und Säuger-Zellen wurden Aufreinigungssysteme der Firma Qiagen (Hilden) verwendet, deren Methode auf der von Birnboim und Doly (1979) entwickelten alkalischen Lyse basiert. Auch hier wird auf eine Phenol-/Chloroform-Aufreinigung verzichtet.

Je nach Verwendungszweck wurden verschiedene Aufreinigungssysteme eingesetzt. So erfolgte die Isolierung von BAC-DNA mit dem *Qiagen Large-Construct Kit*<sup>®</sup>. Ein zusätzlicher ATP-abhängiger Exonuklease-Verdau ermöglicht hier, dass nur intakte BAC-DNA isoliert wird, während genomische DNA oder beschädigte BAC-DNA entfernt werden. Für die Präparation von Plasmid-DNA zur Klonierung wurde der *Qiagen Plasmid Mini / Midi Kit*<sup>®</sup>, für

die Isolierung von Plasmid-DNA, die für die Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt werden sollte, der *Qiagen EndoFree Maxi Kit*<sup>®</sup> verwendet. Letzterer enthält im Vergleich zu den Standard-Plasmidisolierungskits einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit *Puffer ER*, der das Entfernen von Endotoxinen aus dem klaren Lysat ermöglicht. Als Endotoxine werden Lipopolysaccharide bezeichnet, die bei der Bakterien-Zellyse freierwerden, weil sie von intakten Bakterien nicht abgegeben werden. Sie wirken toxisch auf eukaryotische Zellen und sind bereits in niedrigsten Konzentrationen (unterer pg / ml-Bereich) wirksam.

Je nach gewünschter DNA-Menge oder verwendetem Aufreinigungssystem wurden unterschiedliche Kulturvolumina angeimpft und Säulen mit unterschiedlicher Kapazität eingesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Aufreinigungssysteme gibt Tabelle 3.1. Nachfolgend wird das Prinzip der Plasmid-Präparation mit Hilfe der Aufreinigungssysteme der Firma Qiagen beschrieben.

**Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Plasmidisolierungskits der Firma Qiagen**

Aufreinigungssystem	Kulturvolumen	DNA-Ausbeute	Zusatz zum Standardprotokoll
<i>Qiagen Plasmid Mini Kit</i> <sup>®</sup>	5 ml	bis 20 µg	
<i>Qiagen Plasmid Midi Kit</i> <sup>®</sup>	50 ml	bis 100 µg	
<i>Qiagen EndoFree Maxi Kit</i> <sup>®</sup>	250 ml	bis 500 µg	Inkubation der DNA-Lösung mit <i>Puffer ER</i>
<i>Qiagen Large-Construct Kit</i> <sup>®</sup>	500 ml	bis 200 µg	Lösen des DNA-Pellets in <i>Puffer EX</i> , Inkubation mit ATP-abhängiger Exonuklease

Zur Zellernte wurde eine Übernachtskultur bei 15000 g und 4 °C für 20 min (Sorvall Evolution) zentrifugiert, das Bakterienpellet in der im Aufreinigungssystem angegebenen Menge *Puffer P1* resuspendiert und nach Zugabe von *Puffer P2* für 5 min bei RT inkubiert.

EDTA, das in *Puffer P1* enthalten ist, setzt bei gram-negativen Bakterien wie *E. coli* durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatierung einen Teil der Lipopolysaccharide der Zellwand frei (Schnaitman, 1971). Durch den SDS- und NaOH-haltigen *Lysispuffer P2* kommt es zur Lyse der Zellen (Birnboim & Doly, 1979; Birnboim, 1983) und zur Denaturierung von Proteinen. Chromosomale DNA denaturiert irreversibel, während Plasmide bedingt durch ihre „covalently closed circular (ccc)“-Konfiguration nach Neutralisation wieder renaturieren. RNase A verdaut die RNA-Moleküle.

Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von *Puffer P3* und Inkubation für 20 min auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (15000 g, 4 °C, 30 min) verblieb das Plasmid im Überstand, während Zelltrümmer und chromosomale DNA sedimentierten. Das klare Lysat wurde auf eine mit *Puffer QBT* voräquiliibrierte Qiagen-Säule geladen, die die Plasmid-DNA selektiv bindet. Durch zwei aufeinander folgende Waschschrirte mit *Puffer QC* wurden Proteine und andere Verunreinigungen entfernt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit *Puffer QF* eluiert und mit 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.2.3 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind natürlicher Bestandteil von Bakterien und dienen dazu, Fremd-DNA anzugreifen und zu inaktivieren. Sie erkennen spezifische Nukleotidsequenzen in der DNA und spalten jeden der beiden Stränge. Zelleigene DNA wird nicht angegriffen, da sie in der Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme methyliert vorliegt. Es wurden nur Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt.

Für die gezielte Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Promega (Mannheim) mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verwendet. Zur Spaltung von 1 µg DNA wurden in der Regel 5 U Enzym eingesetzt. Je nach Menge der eingesetzten DNA variierte das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes zwischen 20 µl und 100 µl, da das Volumen des eingesetzten Enzyms ein Zehntel des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Für einen vollständigen Verdau wurde die DNA, sofern vom Hersteller nicht anders beschrieben, für 1 - 5 h bei der vorgeschriebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsendonukleasen durch Inkubation bei 65 °C für 15 min inaktiviert.

Sollte DNA mit zwei Enzymen gleichzeitig verdaut werden, wurde der Reaktionspuffer verwendet, in dem beide Enzyme die höchste Aktivität aufwiesen. Ansonsten wurde die DNA zuerst mit dem ersten und nach Reinigung durch Ethanol-Fällung mit dem zweiten Enzym geschnitten. Im Ergebnisteil werden die verwendeten Enzyme detailliert genannt.

### 3.2.4 Restriktionsanalyse

Um nach einer Klonierung den gesuchten Klon zu identifizieren wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Dazu wurden alle Konstrukte zuerst mit Hilfe des Programms *Clonemanager 7*<sup>®</sup> (Scientific & Educational Software, Cary, USA) am Computer entworfen. Die charakteristischen Schnitte wurden festgelegt und die Fragmentgrößen errechnet. Nach Restriktion der Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde der gesuchte Klon aufgrund seines spezifischen Bandenmusters durch Vergleich gegen einen Größenstandard im Agarose-Gel bestimmt. Nur Klone, die in allen Größen vollständige Übereinstimmung mit den errechneten Werten zeigten, wurden zur Weiterbearbeitung verwendet. Entsprechende Daten wurden im Laborbuch hinterlegt.

### 3.2.5 Entfernung endständiger Phosphatgruppen (Dephosphorylierung)

Verfügt die linearisierte Vektor-DNA über kompatible überhängende oder glatte Enden, kommt es bei einer Ligation häufig zur Rezirkularisierung. Um die Effizienz einer Klonierung zu steigern, müssen daher die 5'-terminalen Phosphatgruppen des linearisierten Vektors durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt werden. Dazu wurde in dieser Arbeit die *Shrimp alkalische Phosphatase*<sup>®</sup> (SAP) verwendet. Da dieses Enzym in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, konnte auf eine Reinigung des Vektors aus dem Restriktionsansatz verzichtet werden. Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurde direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau durchgeführt, wobei durch Vergrößerung des Reaktionsvolumens die Pufferbedingungen für die alkalische Phosphatase folgendermaßen eingestellt wurden:

linearisierter Vektor	x µl
10x Dephosphorylierungspuffer	5 µl
SAP [1 U]	1 µl
dd H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend bei 65°C inaktiviert. Danach wurde der linearisierte Vektor über ein Agarose-Gel gereinigt.

### 3.2.6 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um das gewünschte DNA-Fragment von weiteren Spaltprodukten eines Restriktionsverdaus oder Nebenprodukten einer PCR-Reaktion zu trennen, wurde das gewünschte DNA-Fragment nach einer Agarose-Gelelektrophorese mit einem sauberen Skalpell nach Größenbestimmung mit separat gefärbtem Marker aus dem Gel ausgeschnitten. Für die Herstellung des Gels wurde *DNA Low Melt Agarose*<sup>®</sup> verwendet. Dadurch löst sich bei Hitze das Gel auf und die DNA lässt sich leicht aus der Agarose-Matrix herauslösen.

Die Reinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *QiaQuick Gel Extraction Kit*<sup>®</sup> nach Protokoll des Herstellers. Das Prinzip dieses Aufreinigungssystems beruht auf dem Schmelzen der Agarose und einer selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an Kieselgel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen nach Vogelstein und Gillespie (1979). Die Elution der DNA erfolgt dann bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Maximal 400 mg Agarose wurden durch Zugabe von 3 Vol. *Puffer QG* und zehnmütiger Inkubation bei 50 °C im Thermoschüttler aufgelöst. Die Lösung wurde auf die im Aufreinigungssystem enthaltenen Minisäulen pipettiert und die DNA durch Zentrifugieren (16000 g, RT, 1 min; Heraeus Biofuge pico; Thermo Scientific, Karlsruhe) an das Säulenmaterial gebunden. Falls das Volumen der DNA-Lösung die Säulenkapazität von 750 µl überschritt, wurde dieser Zentrifugationsschritt mehrfach wiederholt. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 750 µl *Puffer PE* und anschließendes einminütiges Zentrifugieren gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte dann mit 30 µl auf 50 °C vorgewärmten Elutionspuffer oder ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.7 Ligation

Die Ligation von Insert und linearisiertem Vektor erfordert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen. Zur Verminderung einer Religation des geschnittenen Vektors müssen die endständigen Phosphatgruppen des linearisierten Vektors entfernt werden (Dephosphorylierung). Da die für die Ligation benötigten 5'-Phosphatreste nun nur vom Insert stammen, werden auch nur zwei statt vier Phosphodiesterbrücken ausgebildet. Das Hybrid-Molekül (Vektor + Insert) trägt demnach zwei Einzelstrangbrüche („nicks“), die jedoch repariert werden, wenn das Plasmid in kompetente Zellen transformiert wird.



Die Ligation wurde mit dem *LigaFast Rapid DNA Ligation System*<sup>®</sup> nach Anleitung des Herstellers in einem Volumen von 10 µl nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Vektor-DNA [10-100ng]	x µl
Insert-DNA	y µl
<i>2x Rapid Ligation Buffer</i>	5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei kohaesiven Enden 5 min und bei glatten Enden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine vorherige Reinigung der Ligationsreaktion für die Transformation in elektrokompente Bakterien ist bei der Verwendung dieses Enzymsystems nicht mehr notwendig.

### 3.2.8 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte entweder auf Agar-Platten oder als Flüssigkultur in LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Selektionsmarker.

Dazu wurden eine Bakteriensuspension (z.B. nach Transformation) oder eine Glycerinkultur mit einem Glasspatel oder einer Platinöse auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit Einzelkolonien von diesen Platten wurden 2 bis 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht unter ständiger Bewegung bei 37 °C inkubiert. Nach ca. 8 bis 15 h konnte eine „flüssig-flüssig-Überimpfung“ erfolgen oder es konnten, ausgehend von dieser Vorkultur, größere Kulturen angeimpft werden (Verdünnung 1:100).

### 3.2.9 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur langfristigen Lagerung wurden von den rekombinanten Bakterien Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 200 µl 100 % Glycerin und 800 µl frische Bakterienkultur in einem Kryo-Röhrchen durch vorsichtiges Pipettieren gut gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte anschließend bei -80 °C (Morrison, 1977).

### 3.2.10 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Bakterien, die für die Elektroporation eingesetzt werden, müssen sich zum Vermeiden eines elektrischen Durchschlages in einer Lösung mit sehr geringer Ionenstärke befinden. Nach der Ernte der Zellen wird daher das Medium durch Glycerin-Lösung ersetzt. Die Anzucht der Zellen erfolgt bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase („log“-Phase), die durch eine konstante maximale Teilungsrate charakterisiert ist. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Bakterien in einem physiologischen Zustand, in dem die Fähigkeit (Kompetenz), freie DNA aufzunehmen, am größten ist.

Für die Präparation elektrokompetenter Bakterien wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 - 0,8 bei 37 °C geschüttelt. Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde die Bakteriensuspension 20 min auf Eis abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 10 min; Sorvall Evolution RC; Thermo Scientific, Karlsruhe) geerntet. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Bakterienpellet in 500 ml destilliertem Wasser resuspendiert und wie oben angegeben zentrifugiert. Nach zweifacher Wiederholung dieses Waschschrittes mit 250 ml ddH<sub>2</sub>O wurde das so gereinigte Bakterienpellet in 250 ml 10 % Glycerin aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 50 ml 10 % Glycerin wiederholt. Abschließend wurden die Bakterien in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu je 100 µl im Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Je ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde für die Elektroporation eingesetzt.

### 3.2.11 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA in Bakterienzellen (Transformation). Durch ein elektrisches Feld werden Löcher in der Zellmembran erzeugt. Die Poreninduktion führt zu einem Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran, was zum einen die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und zum anderen die Aufnahme von exogener DNA in die Zelle zur Folge hat (Neumann & Rosenheck, 1972; Zimmermann et al., 1974). Die Erfolgsrate der Elektroporation hängt stark von der Reinheit der Plasmid- und Bakterienlösung ab. Insbesondere müssen die Lösungen frei von Salzen sein, da es sonst bei der Elektroporation zu elektrischen Durchschlägen kommt, wodurch die Zellvitalität verloren geht.

Zur Elektroporation wurde ein 100 µl Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µl eines Ligationsansatzes (alternativ 1 ng Plasmid-DNA) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde die DNA-Zell-Suspension 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine auf Eis vorgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvette (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem *Gene Pulser*<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 25 µF, 400 Ω und 2,5 kV. Direkt nach dem elektrischen Impuls wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben, denn je geringer der Zeitunterschied zwischen Elektroporation und Zugabe des SOC-Mediums ist, desto größer ist die Effizienz der Transformation (Dower et al., 1988). Die Suspension wurde aus der Küvette in ein Reaktionsgefäß überführt und 60 min bei 37 °C im Schüttelinkubator regeneriert.

Zur Selektion wurden anschließend 50 µl – 1 ml des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **3.2.12 Blau-Weiß-Screening ( $\alpha$ -Komplementation)**

Plasmide, die für Blau-Weiß-Screening eingesetzt werden können, tragen eine  $\beta$ -Galaktosidase-Kassette ( $lacZ\alpha$ ). In diese Sequenz ist die „*Multiple Cloning Site*“ (MCS) so eingebaut, dass das Leseraster nicht unterbrochen wird, und so das sog.  $\alpha$ -Peptid als Fusionsprotein funktionsfähig bleibt. In diesem Fall färben sich in Gegenwart von X-Gal (Substrat) und IPTG (synthetischer Induktor) die Kolonien blau.

Bei Insertion eines DNA-Fragmentes in die MCS des Vektors, wird i. d. R. das Leseraster unterbrochen. Das  $\alpha$ -Peptid wird nicht gebildet und dadurch wird die Bildung der kompletten Enzymaktivität von  $lacZ$  verhindert. In Gegenwart von X-Gal und IPTG ergeben sich somit nur weiße Kolonien.

Für die Herstellung von Indikatorplatten wurden pro antibiotikahaltiger Agar-Platte 100 µl 2 % X-Gal- und 100 µl 10 mM IPTG-Lösung mit 100 µl SOC-Medium gemischt, auf den Agar-Platten verteilt und trocknen gelassen. Nach Ausstreichen der Bakteriensuspension und Inkubation bei 37 °C über Nacht konnten die rekombinanten Klone anhand ihrer Färbung identifiziert werden.

Zusätzlich zu dieser Methode wurde immer noch eine Restriktionsanalyse oder ein Kolonie-PCR zur Selektion der Klone durchgeführt.

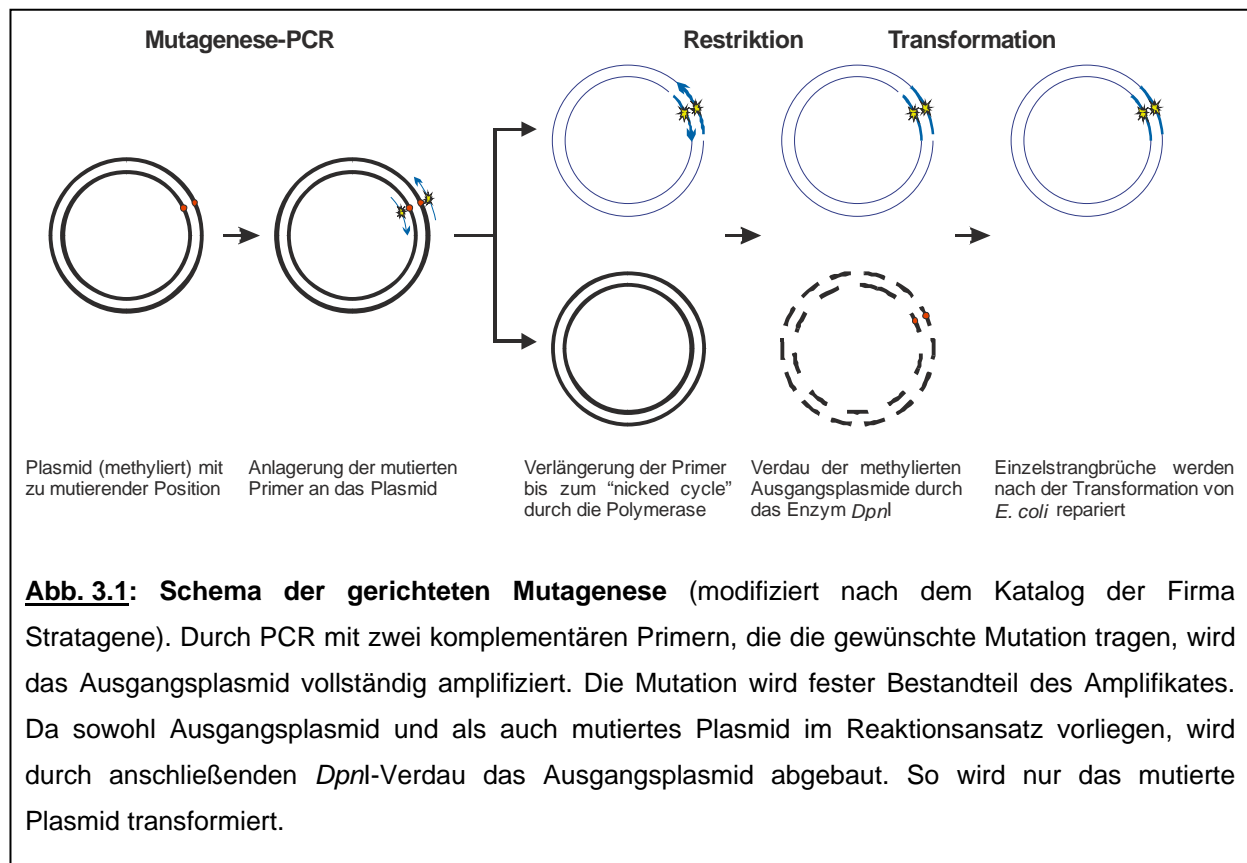
### 3.2.13 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde eingesetzt, wenn eine große Anzahl von Bakterienkolonien nach Transformation analysiert werden sollten. Dazu wurde ein PCR-Ansatz analog einer Standard-PCR mit einem vektor- und einem insert-spezifischen Primer zusammengestellt. Als Template dienten willkürlich ausgesuchte Bakterienkolonien, die mit einer Pipettenspitze vorsichtig auf der Platte angepickt und in den PCR-Ansatz unter leichten Drehungen abgestreift wurde.

Alternativ wurde an Stelle der Bakterienkolonie die nach dem „schnellen“ Protokoll isolierte Plasmid-DNA in die PCR eingesetzt. Konnten mit dieser Methode rekombinate Klone nicht eindeutig identifiziert werden, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

### 3.2.14 Gerichtete Mutagenese

Zur Einführung einer Basen-Insertion wurde die Methode der gerichteten Mutagenese angewendet (Braman et al. 1996). Der Ablauf der Methode ist in Abbildung 3.1 dargestellt.



Für die Durchführung der gerichteten Mutagenese wurden zwei komplementäre Primer konstruiert, die beide die gewünschte Mutation enthielten. Damit die modifizierten Primer trotz abweichender Sequenz an die DNA-Matritze banden, lag die Mutation in der Mitte der Primer und wurde beidseitig von mindestens acht, zum Ausgangsplasmid komplementären Nukleotiden flankiert. Durch PCR mit einer DNA-Polymerase, die „Blunt-Ends“ generiert und eine Korrekturlesefunktion besitzt (*Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase*<sup>®</sup>) wurde das vollständige Plasmid amplifiziert. Die Veränderung wurde im Rahmen der PCR mitvervielfältigt, und die gezielte Mutation wurde somit fester Bestandteil des Amplifikats. Das Ausgangsplasmid, das aus einem Adenosin-methylierenden (*dam*<sup>+</sup>) *E. coli*-Stamm stammen mußte, wurde anschließend durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *DpnI* abgebaut. Dieses schneidet nur methylierte und hemimethylierte DNA. Daher blieb das PCR-Produkt erhalten. Die mutierten Plasmide, die als ungeschlossene DNA-Ringe, sog. „*nicked circles*“ vorliegen, wurden in *E. coli ElectroTen Blue*<sup>®</sup> transformiert. Da die Bakterien die Einzelstrangbrüche reparieren können, war es möglich, Plasmide mit Mutation zu präparieren.

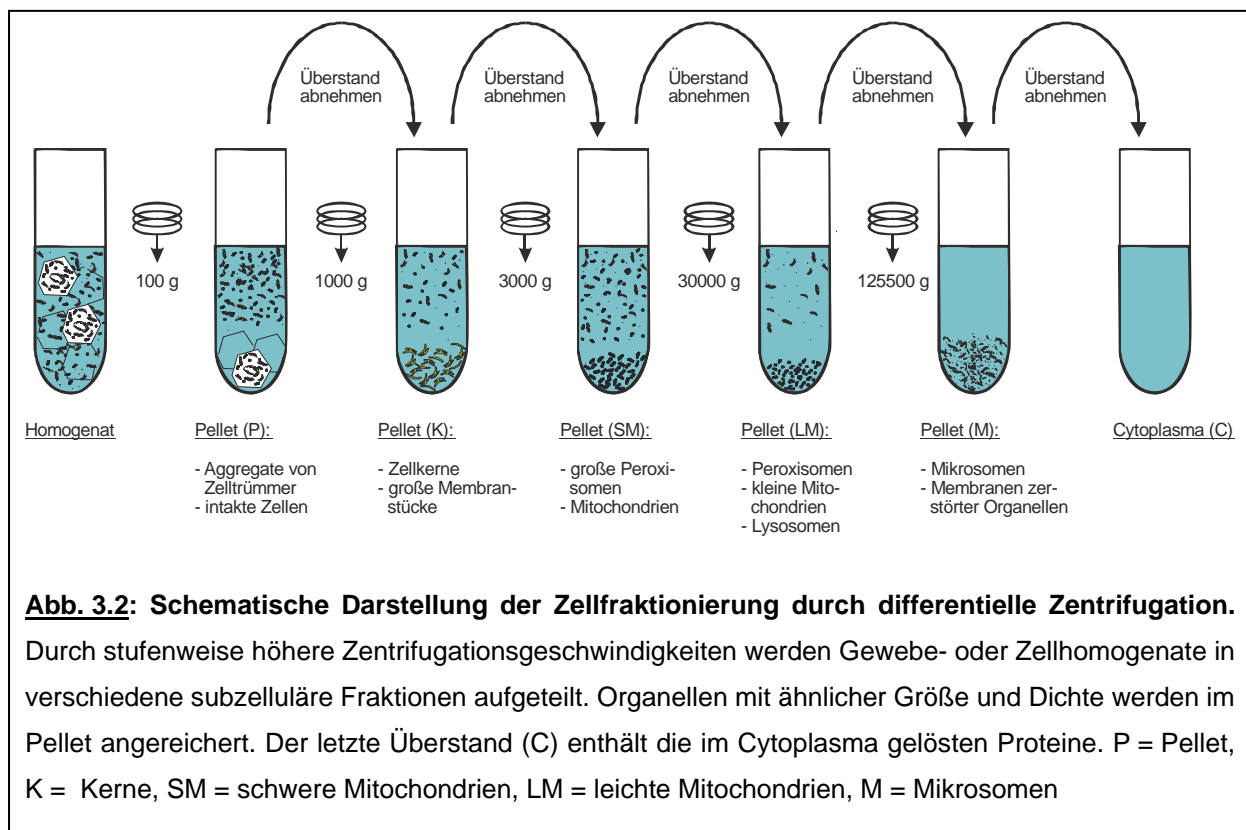
### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Für die biochemische Zuordnung von Proteinen zu unterschiedlichen Zellkompartimenten ist es erforderlich, die verschiedenen Zellorganellen und das Cytoplasma voneinander zu trennen. Hierfür wurde die Methode der differentiellen Zellfraktionierung in Anlehnung an Völkl et al. (Völkl et al., 1985 und 1996) durchgeführt. Aufgrund von Größe und der zur Flüssigkeit höheren Dichte der einzelnen Zellorganellen können diese durch stufenweise höhere Zentrifugationsgeschwindigkeiten in verschiedene subzelluläre Fraktionen aufgeteilt werden. Dabei werden die Zellbestandteile mit großen Dichten im Pellet angereichert, während der Überstand langsamer sedimentierende Partikel und die im Cytoplasma gelösten Proteine enthält. Die Pellets setzen sich jeweils aus Organellen mit ähnlicher Größe und Dichte zusammen. Durch Western Blot-Analysen der gewonnenen Fraktionen mit organellen-spezifischen Proteinen kann die Verteilung der verschiedenen Zellkompartimente innerhalb der Fraktionen bestimmt werden.

Auch wenn man bei dieser Methode nur angereicherte und keine hochgereinigten Zellfraktionen erhält, eignet sie sich trotzdem, um eine Änderung in der Verteilung peroxisomaler Membran- und Matrixproteine zwischen Wildtyp-, heterozygoten und PEX19 KO-Mäusen durch Western Blot-Analysen zu identifizieren. Im Gegensatz zur Isolierung von Gesamtprotein bietet die Methode der differentiellen Zellfraktionierung neben einer Quantifizierung außerdem die Möglichkeit, die untersuchten Proteine annäherungsweise einzelnen subzellulären Kompartimenten zuzuordnen. Die Isolierung hochgereinigter Organellenfraktionen ist nur über Dichtegradientenzentrifugation möglich. Diese Methode konnte jedoch nicht angewendet werden, da aufgrund der geringen Größe der Leber von neugeborenen Mäusen die Proteinausbeute für vergleichende Western Blot-Analysen nicht ausreichte.

Es wurden zwei Zellfraktionierungen mit PEX19-Mäusen durchgeführt. Um mindestens drei Lebern (Minimalmenge) einsetzen zu können, wurden Tiere von zwei Würfen, die zum gleichen Zeitpunkt geboren wurden, gemeinsam verarbeitet. Hierfür wurden nach der Typisierung der neugeborenen Mäuse die Lebern entnommen, gewogen und entsprechend ihres Genotyps gemeinsam verarbeitet. Das Verfahren ist in Abbildung 3.2 schematisch zusammengefasst.



Die entnommenen Lebern wurden mit einer kleinen Schere grob zerkleinert und mit einem Potter S Homogenisator (B. Braun Biotech international GmbH, Melsungen) in eiskaltem Homogenisationspuffer (2 µl / µg Leber) homogenisiert (1 Stroke, 2 min, 1000 rpm). Um Bindegewebe, ganze Zellen und Zelltrümmeraggregate abzutrennen, wurde das Ausgangshomogenat in der Zentrifuge *Sorvall Evolution* mit dem Rotor *SE-12* mit Adapter (Thermo Scientific, Karlsruhe) zentrifugiert (100 g, 4 °C, 15 min). Dieses Pellet (P) mit noch nicht aufgeschlossenen Zellen und Bindegewebsresten wurde verworfen und die Zellkerne (K) vom Überstand abgetrennt (1000 g, 4 °C, 15 min). Der erhaltene Überstand wurde für 15 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Das Pellet (SM) enthält schwere Peroxisomen und Mitochondrien. Der Überstand wurde zur Gewinnung der leichten Mitochondrienfraktion (LM) bei 4 °C und 30000 g erneut 15 min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde abschließend für 45 min bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge (*Sorvall Ultra Pro 80*, Rotor *T865*; Thermo Scientific, Karlsruhe) bei 125500 g aufgeschlossen. Der Überstand (C) enthält Proteine des Cytoplasmas sowie herausgelaufene Matrixproteine eventuell zerstörter Organellen. Das Pellet (M) enthält Mikrosomen und Membranproteine zerstörter Organellen. Die Zellfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Durchführung der Western Blot-Analysen bei -80 °C aufbewahrt.

#### **3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht darauf, dass im sauren Milieu die anionische Form des Farbstoffs *Coomassie brilliant blue G-250* durch ionische Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren einen Komplex bildet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs *Coomassie brilliant blue G-250* von 465 nm nach 595 nm. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge und Vergleich mit einer Eichkurve kann die Konzentration einer unbekanntes Proteinlösung berechnet werden. Voraussetzung ist, dass das für die Eichung verwendete und das unbekannte Protein einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren haben. Rinder-Serumalbumin hat sich als international anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt.

Unbekannte Proteinlösungen müssen so verdünnt werden, dass die Messwerte im linearen Teil der Eichkurve liegt. Der lineare Bereich für BSA als Standardprotein liegt bei der durchgeführten Bradford-Messung bei 0,1-1,4 mg / ml Protein.

Zunächst wurde mit einer BSA-Stammlösung (1 mg / ml) eine Eichgerade erstellt. Standard und Probe wurden jeweils mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 500 µl *Bradford-Reagenz*<sup>®</sup> wurden die Proben gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm in Einwegküvetten im Photometer *SmartSpec 3000*<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (Laemmli, 1970) wird zur Auftrennung von Proteinen eingesetzt. Dabei wandern die zu untersuchenden Proteine in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix aus Polyacrylamid. Bei der Gel-Herstellung bildet Acrylamid in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere quer zu vernetzen. Als Katalysator wird TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt .

Die Gele setzten sich aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel mit unterschiedlichem prozentualem Anteil an Acrylamid und einem oberen Sammelgel zusammen. Zwei Glasplatten, die durch „Spacer“ von 0,75 mm Dicke getrennt waren, wurden bis ca. 3 cm unterhalb der oberen Glaskante mit der Trenngel-Lösung befüllt. Zur Ausbildung einer geraden, luftblasenfreien Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Gelkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm gezogen. Die entstandenen Geltaschen dienten der Aufnahme der Proteinproben.

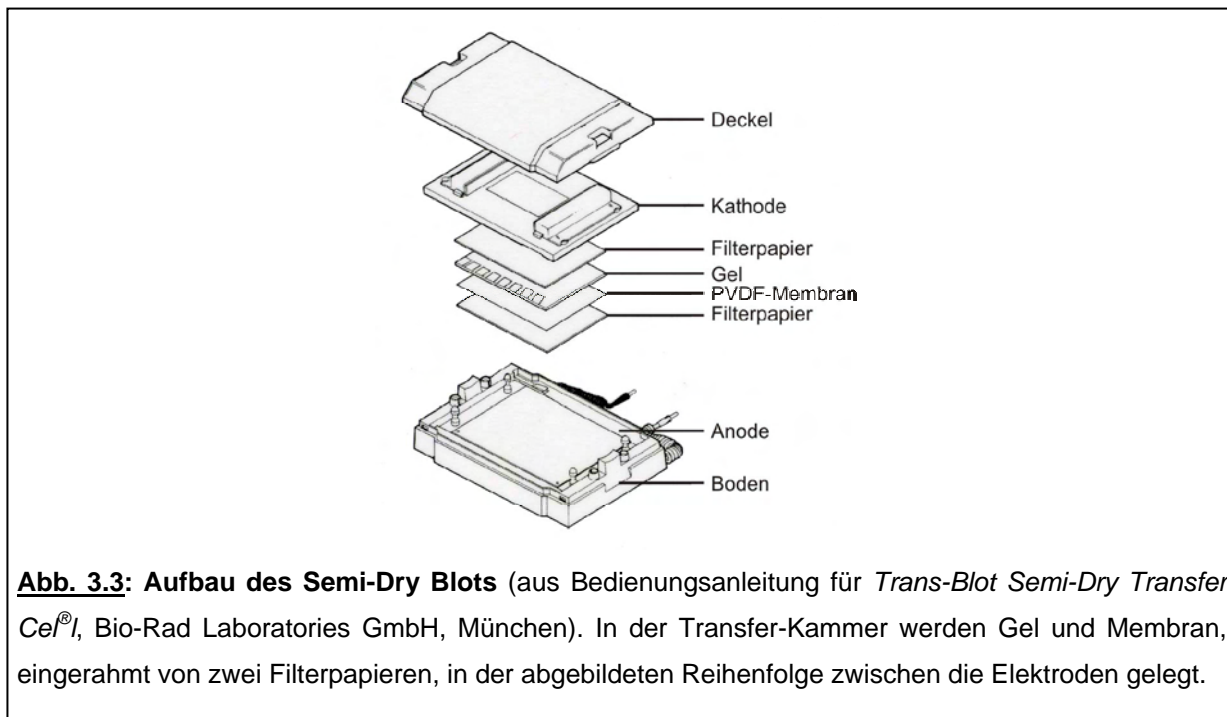
Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 3 - 5 min bei 100 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V im Minigel (8 cm x 10 cm x 0,075 cm) in einer *Mini Protean3* Gelapparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Wenn die Front des Bromphenolblaus die untere Grenze des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Die Proteine konnten nun direkt angefärbt oder auf einen Träger (PVDF-Membran) transferiert und im Western Blot-Verfahren analysiert werden.



### 3.3.4 Herstellung von Western Blots

Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit Antikörpern nachzuweisen, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Träger-Matrix übertragen werden. Der Transfer von Proteinen auf eine proteinbindende Membran, der als Western Blot bezeichnet wird (Burnette, 1981), erfolgt über Elektrophorese. Die Membran besteht in der Regel aus Nitrozellulose (Towbin et al., 1979), positiv geladenem Nylon oder Polyvinylidendifluorid (PVDF; LeGendre 1990). Senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung wird ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran wechseln und dort durch hydrophobe (Nitrozellulose) oder hydrophobe und ionische Wechselwirkung (+Nylon) gebunden werden. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt bei der Übertragung erhalten.

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte mit der Semi-Dry-Transfer-Methode. Dazu wurden zwei Spezialfilterpapiere (*Extra Thick Blot Paper*<sup>®</sup> für PROTEAN II xi Gele) und eine PVDF-Membran (*Immobilon-P*<sup>®</sup>) auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer (*NuPAGE*<sup>®</sup> Transferpuffer) getränkt. SDS-Gel, Membran und Filterpapiere wurden wie in Abbildung 3.3 beschrieben in der Blot-Apparatur (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) aufgebaut und die Proteine bei 60 mA für ca. 55 min auf die Membran übertragen.



**Abb. 3.3: Aufbau des Semi-Dry Blots** (aus Bedienungsanleitung für *Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). In der Transfer-Kammer werden Gel und Membran, eingerahmt von zwei Filterpapieren, in der abgebildeten Reihenfolge zwischen die Elektroden gelegt.

### 3.3.5 Färbung von Western Blots mit Ponceaurot

Zur Überprüfung des elektrophoretischen Transfers von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot) wurden die Blot-Membranen mit Ponceaurot (Salinovich & Montelaro, 1986) gefärbt, das die Gesamtheit der auf der Membran gebundenen Proteine detektiert. Die Färbung ist reversibel, so dass sie eine anschließende Immundetektion der Proteine zulässt.

Die zu färbende Membran wurde 5 min in Ponceaurot-Lösung bei Raumtemperatur gelegt. Um überschüssige Farbe zu entfernen, wurde anschließend mit Wasser so lange gewaschen, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Vor der Verwendung für die Immunfärbung wurde die Membran mit 1x TBS / 0,05 % Tween gewaschen.

### 3.3.6 Immunchemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Im Gegensatz zur Färbung der Western Blots mit Farbstoffen, die alle Proteine auf der Membran unspezifisch markieren, können durch Immundetektion einzelne Proteinbanden spezifisch auf der Membran sichtbar gemacht werden. Die Antigenlokalisation basiert auf einem von Hawkes et al. (1982) entwickelten indirekten Nachweisverfahren, das auf dem konsekutiven Einsatz zweier verschiedener Antikörper beruht. Der primäre Antikörper bindet monospezifisch an die zu detektierende Proteinbande auf der Membran. Dieser Antigen-Antikörperkomplex wird über einen Enzym-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Enzymaktivität bewirkt nach Zugabe eines entsprechenden Substrates eine Farb- oder Lichtreaktion zur optischen Erkennung der Immunkomplexe.

Vor der Inkubation eines Blots mit Antikörpern erfolgte das Blockieren der restlichen freien Proteinbindungsstellen der Membran mit 10 % Magermilchlösung in 1x TBS / 0,05 % Tween 20 für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum unter sanftem Bewegen. Der Erstantikörper wurde in gewünschter Verdünnung mit 5 % Magermilchlösung angesetzt und die Membran damit 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach 3 x 10 min Waschen mit 1x TBS / 0,05 % Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem sekundären alkalische-Phosphatase-markierten Antikörper für 1 h. Abschließend wurde der Blot zweimal 10 min mit 1x TBS / 0,05 % Tween 20 und einmal 10 min mit 1x TBS gewaschen.

Die Detektion der immunreaktiven Banden erfolgte durch Inkubation der Membran mit einer Luminol-Substratlösung (*ImmunStar Chemiluminescent Protein Detection System*<sup>®</sup>) für 3-5 min und anschließender Visualisierung der entstehenden Chemilumineszenz mit Hilfe eines Films (*BioMax MR*<sup>®</sup> oder *Hyperfilm*<sup>®</sup>).

### 3.3.7 Lipidanalysen

Zur Diagnose peroxisomaler Stoffwechselstörungen wurden der Gehalt an sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA), Plasmalogenen und einer Auswahl an essentiellen Fettsäuren (ESFA) in Blut, Leber und Gehirn von neugeborenen PEX19-Mäusen aller Genotypen bestimmt. Insgesamt wurden 5 Tiere pro Genotyp untersucht. Die entnommenen Gewebe wurden bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gesammelt.

Die Lipiddiagnostik erfolgte in Kooperation mit Herrn PD Dr. Jürgen Okun im Stoffwechsellabor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum in Heidelberg mit Hilfe der dort etablierten Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) nach Moser & Moser (1991) und Dacremont & Vincent (1995). Der Gaschromatograph dient zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches. Das aus der biologischen Matrix extrahierte und ggf. derivatisierte Substanzgemisch (Probe) wird mit Hilfe eines Gasstromes über eine stationäre Phase geleitet. Dabei wird die Probe in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt. Das inerte Trägergas ist in der Regel Helium und die stationäre Phase besteht aus einer Quarzsäule, die Innen mit einem dünnen Film eines Trennmaterials belegt ist. Die Einzelkomponenten der Probe verlassen nach einer bestimmten Zeit (Retentionszeit) die Trennsäule und werden im nachgeschalteten Massenspektrometer über die Molmasse identifiziert und durch Vergleichsanalysen quantifiziert.

Für die Bestimmung der Plasmalogene wurde das zu untersuchende Gewebe (Blut, Leber, Gehirn) in einem 50 ml Röhrchen zusammen mit 4 – 5 Glasperlen und 100 µl ddH<sub>2</sub>O gut gemischt, mit 3 ml 2-Propanol versetzt und unter gelegentlichem Mischen 10 min stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde nach Zugabe von 2 ml Chloroform wiederholt. Nach Zentrifugation der Proben (1500 g, RT, 5 min) wurde der Überstand durch einen Faltenfilter in einen 25 ml Spitzkolben filtriert, das Chloroform / 2-Propanol-Gemisch im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und anschließend mit 2x 1 ml methanolischer 3 M Salzsäure in ein vorgespültes Pyrexröhrchen überführt. Die Methylierung erfolgte bei 80 °C für 1 h. Zu den auf Raumtemperatur abgekühlten Proben wurden nacheinander 2 ml

Kaliumcarbonat (14 %) und 2 ml n-Hexan zugegeben, die Proben 15 min im Überkopfschüttler gemischt und bei 1500 g für 5 min zentrifugiert. 300 µl dieser Hexanphase wurden in einem Röhrchen der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) eingedampft und anschließend in 60 µl Hexan rückgelöst.

Zur Bestimmung der Fettsäuren wurden 20 µl interner Standard und das zu untersuchende Gewebe (Blut, Leber, Gehirn) mit 1 ml methanolischer 3 M Salzsäure gemischt und anschließend bei 80 °C für 1 h im Thermoblock methyliert. Nach Abkühlen der Proben im Eisbad wurden nacheinander 2 ml Kaliumcarbonat (14 %) und 2 ml n-Hexan unter kräftigem Mischen zugegeben, die Proben 20 - 30 min im Überkopfmischer gemischt und anschließend bei 1500 g für 5 min zentrifugiert. Die Hexanphasen wurden in ein Fluorimeter-Röhrchen überführt, mit 2 ml Acetonitril gemischt und zentrifugiert (3000 U / min, RT, 5 - 10 min). Nach Abnehmen und Eindampfen der Hexanphase wurden die Proben in 200 µl Hexan rückgelöst und in ein *Reacti*<sup>®</sup>-Röhrchen (Thermo Scientific, Karlsruhe) überführt. Das Hexan wurde abgedampft und der Rückstand in 50 µl Dichlormethan gelöst und kräftig gemischt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der SAS/STAT Software (Version 9.2) in Kooperation mit dem Statistiker, Herrn Kay-Martin Hanschmann (Paul-Ehrlich-Institut, Bundesinstitut für Sera und Impfstoffe, Langen).

Für die verschiedenen Messwerte wurden deskriptive Maße wie Anzahl der Werte, Mittelwert, Standardabweichung und das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert bestimmt. Zusätzlich wurden heterozygote Tiere und Wildtyp-Mäuse jeweils mit den Mutanten verglichen. Hierfür wurde ein F-Test zum Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  gerechnet. Aufgrund des explorativen Charakters dieser ersten Untersuchungen fand eine  $\alpha$ -Adjustierung für multiple Vergleiche (Vergleich Wildtyp – Mutante und heterozygoten Tier – Mutante) nicht statt. Die p-Werte des F-Tests, die kleiner oder gleich 0,05 sind, bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Maustypen. An den p-Werten und an den Graphiken können die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Mausgenotypen abgelesen werden. Detaillierte Angaben zu Mittelwert, zu Standardabweichung, zu 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert und zu den p-Werten sind in Kapitel 7.2 angegeben.

## 3.4. Zellkulturmethoden

### 3.4.1 Präparation embryonaler Mausfibroblasten

Embryonale Mausfibroblasten (MEFs) werden vorzugsweise aus dem Bindegewebe ungeborener Mäuse (14 Tage *post coitum*) gewonnen. Dazu wurde unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen (s. u.) am 14. Tag der Schwangerschaft ein trächtiges Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und deren Bauch mit 70 % Ethanol desinfiziert. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde der Uterus herausgenommen und in PBS gewaschen. Die Embryos wurden dem Uterus entnommen, von Dottersack, Amnion und der Plazenta befreit und jeder Embryo einzeln in eine kleine Petrischale mit PBS überführt.

Kopf und Eingeweide (Viscera) wurden mit der Pinzette entfernt und für die Genotypisierung verwahrt. Das restliche Gewebe wurde in 2 ml 0,5 % Trypsin-EDTA pro Embryo bei 37 °C für 3 - 5 min inkubiert, der Verdau anschließend mit 5 ml EF-Medium (s. u.) gestoppt und die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde 6 min bei 600 g (Heraeus Multifuge 3S-R; Thermo Scientific, Karlsruhe) pelletiert, die Zellen anschließend in 2 ml Medium resuspendiert und auf jeweils zwei 10 cm Zellkulturschalen pro Embryopräparation ausgesät. Unter täglichem Mediumwechsel wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert.

### 3.4.2 Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten

Die Kultivierung der embryonalen Mausfibroblasten erfolgte bei 37 °C und einer 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration im Brutschrank (Heraeus, Thermo Scientific, Karlsruhe). Als Nährlösung (EF-Medium) wurde Dulbeccos Modifikation des *Minimal Essential-Mediums* (DMEM - high glucose) mit 10 % FKS (fötales Kälberserum) unter Zusatz von Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) eingesetzt, um das Wachstum von Bakterien zu hemmen.

### 3.4.3. Passagieren von adhärenenten Zellen

Adhärenent wachsende Zellen haften hauptsächlich Calcium-abhängig mit Hilfe von Oberflächenproteinen auf dem Boden der Kulturschalen. Um Zellen zu passagieren, müssen die Zell-Matrix- und die Zell-Zell-Kontakte gelöst werden. Dies wird erreicht durch den Entzug freier bivalenter Ionen mit EDTA und durch das enzymatische Andauen der Zelloberflächen mit Trypsin.

Wenn die Mausfibroblasten bis zur gewünschten Konfluenz herangewachsen waren, wurde der Zellrasen zur Stammerhaltung oder für Versuchszwecke passagiert. Hierzu wurden die MEFs nach Absaugen des Mediums zunächst zweimal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung (1 ml pro 10 ml Kulturschale) bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert (trypsiniert), bis sich die Zellen abgerundet hatten und sich durch leichtes Klopfen vom Boden lösen ließen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem EF-Medium transferiert, gut gemischt und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung abgenommen. Während die Zellsuspension zentrifugiert (600 g, RT, 5 min; Heraeus Multifuge 3S-R; Thermo Scientific, Karlsruhe, D), wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde das Zellpellet in EF-Medium resuspendiert, dabei auf eine gewünschte Zellzahl eingestellt und entweder erneut in Zellkulturschalen ausgesät oder im entsprechenden Versuch eingesetzt.

#### 3.4.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in den einzelnen Zellkulturen wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Dazu wurde das Deckglas für die Neubauerkammer leicht angefeuchtet und über die Zählkammer geschoben. Damit die richtige Tiefe von 0,1 mm eingestellt ist, müssen hierbei Newtonsche Ringe erscheinen. Von der Zellsuspension wurde vor dem Zentrifugieren ein Aliquot abgenommen und die Zählkammer damit befüllt. Es wurden vier große Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und anschließend der Mittelwert der gezählten Zellen aus den vier Quadraten ermittelt. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$ . Dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von  $0,1 \mu\text{l}$ . Aus dem Mittelwert der gezählten Zellen und dem Volumen wurde die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Zellen} \times 10^4}{0,1 \mu\text{l}} = \text{Zellen} / \text{ml}$$

#### 3.4.5 Kryokonservierung embryonaler Mausfibroblasten

Primäre Zellkulturen können nicht beliebig oft passagiert werden. Um diese Kulturen dauerhaft zu erhalten, ist es nötig, Zellen mit einer möglichst niedrigen Passagennummer in flüssigem Stickstoff zu konservieren. Als Konservierungsmedium wird Medium mit einem Zusatz von 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Durch Zugabe dieser relativ geringen Menge an DMSO als Kälteschutzmittel wird die Schädigung der Zellen beim Gefriervorgang

vermindert, da dadurch die Bildung von spießähnlichen Eiskristallen unterbunden wird (Lovelock & Bishop, 1959).

Die MEFs wurden zunächst trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 900  $\mu$ l EF-Medium aufgenommen und im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt, um den Zellstoffwechsel auf ein Minimum zu reduzieren. Nach Zugabe von weiteren 900  $\mu$ l kaltem (4 °C) EF-Medium, dem 20 % DMSO zugesetzt waren, wurden die Zellen in einer speziellen Einfrierbox (Nalgene Labware, Neerijse, B), die ein langsames und kontrolliertes Einfrieren gewährleistet, bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot möglichst schnell bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 10 ml EF-Medium überführt. Nach Zentrifugation (600 g, RT, 5 min; Heraeus Multifuge 3S-R; Thermo Scientific, Karlsruhe) wurden die Zellen in 10 ml EF-Medium resuspendiert, auf eine 10 ml Kulturschale ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert.

#### **3.4.6 Mikroporation embryonaler Mausfibroblasten**

Zum Transfer von Plasmid-DNA in embryonale Mausfibroblasten wurde die von der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) entwickelte Methode der Mikroporation mit dem *MicroPorator MP-100*<sup>®</sup> eingesetzt, da durch herkömmliche Transfektionsmethoden wie lipidbasierte Transfektion oder Elektroporation nur eine unzureichende Transfektionsrate oder eine geringe Vitalität erreicht werden konnten. Entgegen konventionellen Elektroporationsküvetten, die mit seitlichen Aluminiumelektroden ausgestattet sind, wird bei der Mikroporation eine spezielle Pipettenspitze mit einer Goldelektrode als Reaktionsraum verwendet.

Am Tag vor der geplanten Mikroporation wurden die Zellen passagiert. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen zentrifugiert (600 g, RT, 5 min; Heraeus Multifuge 3S-R; Thermo Scientific, Karlsruhe) und das Pellet in dem vom Hersteller mitgelieferten Resuspensionspuffer auf  $5 \times 10^3$  Zellen /  $\mu$ l eingestellt. Zu 10  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurde 1  $\mu$ g Plasmid-DNA gegeben. Dieser Mix wurde in die 10  $\mu$ l Mikroporationsspitze des *MP Solution Kit*<sup>®</sup> aufgezogen und mit 100 V und 40 ms „mikroporiert“. Die Zellen wurden in ein „Well“ einer „24-Well-Platte“ ausgesät, in dem 1 ml EF-Medium und ein Deckgläschen vorgelegt waren. Zur Expressionsanalyse wurden die

Zellen für das indirekte Immunfluoreszenzverfahren mittels verschiedenen Markerantikörpern und fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörpern präpariert.

#### **3.4.7 Markierung von Zellorganellen mit *in vivo* Fluoreszenz-Farbstoffen**

Neben der Immunfluoreszenzanalyse erfolgte die Markierung der Zellorganellen mit Hilfe von fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Reagenzien. Während der Inkubation der lebenden Zellen mit einem organellenspezifischen Farbstoff erfolgt ein passiver Transport der Farbstoffmoleküle durch die Plasmamembran und eine Akkumulation in den jeweiligen Zielorganellen. Für die Anfärbung der Mitochondrien wurde der Fluoreszenzfarbstoff *MitoTracker Orange CMTMRos*<sup>®</sup> und für die Markierung von Lysosomen *LysoTracker DND-99*<sup>®</sup> verwendet.

Für die Färbung wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen 5-10 min mit frischem Medium inkubiert, das Medium abgesaugt und durch die Färbelösung ersetzt. Für die Markierung von Mitochondrien erfolgte die Inkubation mit 100 nM *MitoTracker Orange CMTMRos*<sup>®</sup> und für die Markierung von Lysosomen mit 80 nM *LysoTracker DND-99*<sup>®</sup> im Medium für jeweils 30 min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die indirekte Immunfluoreszenz präpariert.

#### **3.4.8 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Die Fixierung von Zellen für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung dient in erster Linie der Aufrechterhaltung der Zellstruktur. Das Standardverfahren ist die Fixierung mit depolymerisiertem Paraformaldehyd, das zu den so genannten quervernetzenden Substanzen gehört. Es verbindet Proteine durch Bildung intermolekularer Bindungen (meist zwischen freien Aminogruppen) miteinander und immobilisiert somit auch lösliche Antigene. Da die Fixierung mit Paraformaldehyd die Membran für Antikörper unpassierbar macht, ist eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit nichtionischen Detergenzien nötig.

Für die Herstellung indirekter Immunfluoreszenzpräparate wurden embryonale Fibroblasten auf Deckgläschen angezogen. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernen des Fixativs wurden die Zellen einmal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und mit demselben Puffer für 20 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die in diesem Puffer



enthaltenen Detergenzien sorgen dafür, dass Zell- und Organellenmembranen ausreichend für Antikörper zugänglich sind. Die so vorbereiteten Zellen wurden in die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

### **3.5 Fixierung von Geweben für Licht- und Elektronenmikroskopie**

#### **3.5.1 Perfusionsfixierung**

Bei der Perfusionsfixierung lebender Tiere werden die zur Untersuchung anstehenden Organe über das Blutgefäßsystem mit einem Fixiermittel durchspült. Dies ermöglicht eine gleichmäßige und zügige Durchtränkung des Gewebes mit der Fixierlösung. Die Art des Fixatives hing vom Verwendungszweck ab. Für Paraffineinbettungen wurde 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS, für elektronenmikroskopische Einbettungen 4 % PFA / 0,05 % Glutaraldehyd in PBS und für die Zellfraktionierung isotonische NaCl-Lösung verwendet.

Für die Perfusion wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektionsnarkose anästhesiert. Dem Anästhetikum wurden 5 µl Heparin-Natrium 25000 (Ratiopharm, Ulm) zur Inhibierung der Gerinnungskaskade zugesetzt. Nach Eintritt der Narkose wurde die Maus an den vier Gliedmaßen fixiert, die Ventralseite des Tieres mit 70 % Ethanol befeuchtet und der Thorax mittels mediansagittalem Schnitts durch das Sternum eröffnet. Die Herzspitze wurde zur Öffnung beider Ventrikel mit einer Federschere so fein wie möglich abgeschnitten. Die Perfusion erfolgte über den linken Ventrikel mit einer Knopfkanüle, die an eine Peristaltikpumpe (Pumpdrive 5001; Heidolph, Schwabach) angeschlossen war. Im Anschluss wurden die gewünschten Organe entnommen oder bei neugeborenen Mäusen auch das gesamte Tier verwendet.

#### **3.5.2 Immersionsfixierung von Gewebe**

Für die Herstellung von Paraffinpräparaten für die Lichtmikroskopie wurden die zu untersuchenden Gewebe bzw. die kompletten neugeborenen Mäuse nach der Perfusion durch Immersionsfixierung nachfixiert. Dazu wurden die Proben im Fixativ über Nacht gelagert, bevor die Gewebe in Paraffin eingebettet wurden.

### 3.6 Methoden für die Lichtmikroskopie

#### 3.6.1 Paraffineinbettung

Da das fixierte Gewebe nicht die erforderliche Festigkeit besitzt, die zum Schneiden auf dem Mikrotom nötig ist, muss es vor dem Schneiden mit einem Medium durchtränkt werden, das dem Präparat nach dem Erstarren eine gut schneidbare Beschaffenheit verleiht. Das gebräuchlichste Einbettungsmittel ist Paraffin. Es gestattet die Herstellung dünner Schnitte (1–5  $\mu\text{m}$ ).

Vor der Einbettung wurden die PFA-fixierten neugeborenen Mäuse mit einem Skalpell median sagittalisiert und über insgesamt zwölf Tauchbäder mit Hilfe eines Gewebeinfiltrationsautomaten *Leica TP 1020* (Leica Microsystems, Bensheim) über eine steigende Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin überführt. Die Einzelschritte der Paraffineinbettung sind der nachfolgenden Tabelle 3.2 zu entnehmen.

**Tab. 3.2: Paraffineinbettung**

Tauchbad-Nr.	Lösung	Dauer
1	70 % Ethanol	1 x 1,5 h
2	80 % Ethanol	1 x 1,5 h
3	90 % Ethanol	1 x 1,5 h
4 bis 6	100 % Ethanol	je 1,5 h
7 bis 10	100 % Xylol	je 1,5 h
11 und 12	Paraffin	je 2,0 h

Anschließend wurde das Gewebe in Metallförmchen korrekt ausgerichtet und an einer Paraffin-Ausgießstation (PSI Instruments Ltd., Basel, CH) in Metallförmchen mit Paraffin überschichtet. Das Förmchen wurde mit Schnellhalterdeckeln versehen und vollständig mit Paraffin aufgefüllt. Das Aushärten des Paraffins erfolgte bei Raumtemperatur.

#### 3.6.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Nach dem Vorkühlen der Paraffinblöcke bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für ca. 10 min wurden 1-2  $\mu\text{m}$  dünne Paraffinschnitte an einem Rotationsmikrotom mit Schnittauffangwanne (Leica RM 2135; Leica Microsystems, Bensheim) angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden zum Strecken auf ein auf  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiertes Wasserbad überführt. Anschließend wurden die gestreckten

Schnitte auf Objektträger *Superfrost (+)* aufgezogen und vor der Weiterverarbeitung auf einer Heizplatte bei 40 °C getrocknet, um ein Abschwimmen bei den folgenden Inkubationen zu verhindern.

### 3.6.3 Indirekte Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Bei der indirekten Immunfluoreszenz-Methode werden Zellen oder Gewebsschnitte konsekutiv mit zwei Antikörpern inkubiert. Zuerst bindet ein unmarkierter Primärantikörper an das entsprechende Antigen. Anschließend wird ein zweiter, fluorochrommarkierter Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt. Bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Präparate wird das Fluorochrom des Sekundärantikörpers mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert daraufhin Licht einer spezifischen Wellenlänge (Anregungswellenlänge immer kürzer als Emissionswellenlänge). Dadurch werden die Antikörperkomplexe sichtbar gemacht.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 60 °C zum Abfließen des Paraffins inkubiert, direkt in Xylol (3 x 5 min) überführt und anschließend für je 5 min in 2 x 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol inkubiert und 2 x mit destilliertem Wasser gewässert.

Um Aldehyd-fixierte und durch die Paraffineinbettung veränderte Antigene wiederherzustellen sowie zusätzliche Epitope für eine Antikörperbindung freizulegen, wurden die Schnitte durch eine Kombination aus enzymatischem Andau und Mikrowellenbehandlung behandelt. Dadurch wird eine deutliche Verbesserung der Immunreaktion erreicht (Shi et al., 1991 und 1997; Ezaki, 2000). Je nach verwendetem Gewebesblock und Primärantikörper mussten die optimalen Andauparameter durch Verdünnungs- und Inkubationszeitreihen ermittelt werden.

Standardmäßig wurden die Schnitte 10 min mit 0,01 % Trypsin-Lösung bei 37 °C auf dem Wärmetisch proteolytisch angedaut, mit PBS gewaschen, und 3x 5 min in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 720 W erhitzt (Morgan et al. 1994). Der durch das Erhitzen entstandene Flüssigkeitsverlust wurde jeweils nach Ablauf der 5 min durch Nachfüllen mit ddH<sub>2</sub>O ausgeglichen. Anschließend wurden die Schnitte langsam und ohne Pufferwechsel auf Raumtemperatur zur Antigenrückfaltung abgekühlt und in PBS und ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

Vor der Antikörper-Inkubation wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit Blocklösung in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 2 h abgesättigt. Anschließend wurde der Primärantikörper mit Verdünnungspuffer verdünnt, auf die Schnitte aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem ausgiebigem Waschen in PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper appliziert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur unter Vermeidung von Lichteinwirkung. Danach wurden die Präparate in PBS gewaschen, gegebenenfalls die Kerne gegengefärbt und in Mowiollösung mit 25 % (w / v) Bleichschutz eingedeckt, um das Ausbleichen der Fluoreszenzen zu vermeiden (Heimer & Taylor, 1974; Giloh & Sedat, 1982). Die mikroskopische Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop *Leica DMRD* (Leica Mikroskopie und Systeme, Wetzlar).

#### **3.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellen**

Nach Fixieren und Permeabilisieren der Zellen wurden die embryonalen Fibroblasten zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 30 min bei Raumtemperatur mit *Roti-ImmunoBlock*<sup>®</sup> inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen in einer feuchten Kammer mit dem Zellrasen nach oben auf Parafilm ausgelegt. 60 µl Primärantikörper der geeigneten Verdünnung in *Roti-ImmunoBlock*<sup>®</sup> wurden auf den Zellrasen gegeben und die Deckgläser 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch intensives Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper erfolgte analog zum Erstantikörper. Danach wurden die Zellen erneut mit Waschpuffer gewaschen und gegebenenfalls die Kerne (s. u.) gegengefärbt. Vor dem Eindecken mit Zelleindeckmedium wurden die Deckgläser zum Abspülen der Salze in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte mit dem *Leica-DMRD* Fluoreszenzmikroskop (Leica Mikroskopie und Systeme, Wetzlar).

#### **3.6.5 Zellkerngegenfärbung**

Zum Anfärben der Zellkerne wurden sowohl die Paraffinschnitte als auch die fixierten Zellen 5 min mit einer Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes *Hoechst 33258*<sup>®</sup> (Bisbenzimid H33258; 0,05 µg / ml) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Absaugen der *Hoechst 33258*<sup>®</sup>-Lösung wurden die Präparate mehrfach mit PBS gewaschen und mit Zelleindeckmedium eingedeckt.

## 3.7 Elektronenmikroskopie

### 3.7.1 Herstellung von Vibratom-Schnitten

Nach Perfusionsfixierung mit 4 % PFA und 0,05 % Glutardialdehyd in PBS wurden von den entnommenen Lebern der verschiedenen Tiere mit einem Vibratom *Leica VT 1000 S* (Leica Microsystems, Bensheim) ca. 120 - 150 µm dicke Schnitte angefertigt. Dazu wurden die Lebern an ihrer Unterseite mit einer dünnen Schicht Sekundenkleber (Pattex Blitzkleber flüssig; Henkel, Düsseldorf) auf den Teller des Vibratoms aufgeklebt. Die Schnitte wurden mit einem dicken Filterpapier vorsichtig aus dem Puffertank mit PBS abgefischt und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von 1,5 - 2 mm zerteilt. Diese Gewebsabschnitte wurden in Rollrandgläsern für 15 min mit 1 % Glutardialdehyd / PBS bei 4 °C nachfixiert.

### 3.7.2 Postfixierung mit reduziertem Osmiumtetroxid

Während die Fixierung mit Glutardialdehyd durch Quervernetzung der Proteinstrukturen über Aminogruppen erfolgt, dient Osmiumtetroxid zur Fixierung von Lipiden mit ungesättigten Doppelbindungen und damit auch zur Darstellung phospholipidhaltiger Membranen (Karnovsky, 1971). Bei der Methode von Karnovsky reagiert das Osmiumtetroxid mit Ethylengruppen ungesättigter Lipide und wird über Kaliumhexacyanoferrat (II) reduziert. Dadurch wird eine starke Kontrastierung von Membranen erreicht.

Das Gewebe wurde nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PIPES für 10 min bei 4 °C in wässrigem 2 % Osmiumtetroxid vorkubiert. Nach Zugabe von gleichen Volumenanteilen einer 3 % Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung wurden alle Proben für weiter 50 min in dem reduzierten Osmiumtetroxidgemisch postfixiert.

### 3.7.3 Cytochemischer Nachweis von Katalase durch alkalische DAB-Reaktion

Zum spezifischen Nachweis der Katalase in Peroxisomen wurde eine alkalische DAB-Reaktion durchgeführt (Fahimi, 1969; LeHir et al., 1979; Angermüller & Fahimi, 1981). Dabei wird durch die peroxidatische Aktivität der Katalase die Polymerisation des rosa gefärbten Monomers 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) zum oxidierten braunen,

elektronendichten und amorphen Polymer katalysiert, das an der Stelle ausfällt, an der die Katalasereaktion stattfindet.

Die 8 - 10 µm dicken Vibratomschnitte wurden zuerst in 0,1 M PIPES gewaschen und anschließend in 0,01 M Teorell-Stenhagen Puffer (Teorell & Stenhagen, 1938) voräquilibriert. Für die DAB-Reaktion wurden die Gewebestücke mit DAB-Lösung (ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 min im Dunkeln bei 45 °C im Schüttelbad vorinkubiert und dann die eigentliche DAB-Reaktion durch Zugabe von frischer DAB-Lösung mit 0,15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 1 Stunde bei 45 °C gestartet. Nach der DAB-Reaktion wurden die Vibratom-Schnitte in 0,1 M PIPES gewaschen und anschließend mit 1 % wässrigem Osmiumtetroxid 1 h bei 4 °C kontrastiert. Da das DAB-Reaktionsprodukt Osmiumtetroxid binden kann, entsteht ein elektronendichter DAB-Osmium-Schwarz-Komplex und der elektronenmikroskopische Kontrast wird enorm verstärkt (Hanker, 1979).

#### 3.7.4 Einbettung in Epoxidharz (*Agar 100 Epoxy Resin*)

Für elektronenmikroskopische Untersuchung müssen die Proben stabilisiert werden, damit die zellulären Strukturen im Vakuum nicht kollabieren. Dies erfolgt durch Einbettung in Kunstharz (häufig auf Epoxidbasis).

Die Einbettung in das stark hydrophobe Epoxidharz *Agar 100 Epoxy Resin*<sup>®</sup> erfordert eine komplette Gewebedehydrierung mit abschließender Wärmepolymerisation (Richardson et al., 1960; Luft, 1961). Dazu wurden die Vibratom-Schnitte wie in Tabelle 3.3 dargestellt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, Propylenoxid als Zwischenmedium verwendet und dieses durch das alkoholunlösliche *Agar 100 Epoxy Resin*<sup>®</sup> ausgetauscht.

**Tab. 3.3:** Einbettung in Epoxidharz (*Agar 100 Epoxy Resin*)

Lösung	Dauer
70 % Ethanol	3 x 5 min
80 % Ethanol	3 x 5 min
90 % Ethanol	3 x 5 min
100 % Ethanol	3 x 5 min
Propylenoxid	3 x 5 min
Propylenoxid / <i>Agar 100 Epoxy Resin</i> (1:1)	2 x 30 min
<i>Agar 100 Epoxy Resin</i>	24 h

Danach wurden die penetrierten Schnitte in Beem-Kapseln in frische *Agar 100 Epoxy Resin*<sup>®</sup>-Lösung eingebettet und diese bei 60 °C im Wärmeschrank für mindestens 2 Tage polymerisiert.

### 3.7.5 Herstellung von Ultradünnschnitten und Kontrastierung

Die auspolymerisierten *Agar 100 Epoxy Resin*<sup>®</sup>-Blöcke wurden mit einer Fräse an den Seiten bis zum eingebetteten Schnitt zur Pyramidenform „getrimmt“. Von den „getrimmten“ Kunstharzblöcken wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms zuerst Semidünnschnitte (1 µm) angefertigt. Diese wurden mit der fertigen Methylen-Azur-II-Färbelösung nach Richardson gefärbt (Richardson et al., 1960). Die Färbelösung wurde auf die Schnitte gegeben und nach einer Minute bei 60 °C mit destilliertem Wasser abgewaschen, für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und eingedeckt. Nach der Färbung wurden die Schnitte lichtmikroskopisch untersucht, um geeignete Stellen für die anschließende Herstellung von Ultradünnschnitten auszuwählen.

Nach dem „Trimmen“ einer kleinen Pyramide der ausgewählten Gewebeareale wurden am Ultramikrotom *Leica Ultracut E* (Leica Microsystems, Bensheim) mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, CH) Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60 - 80 nm angefertigt und auf Kupfernetze aufgezogen. Die Schnittdicke wurde mit Hilfe der Interferenzmethode (Interferenzfarbe grau) bestimmt (Hayat, 1970).

Zur Erhöhung des Kontrastes im Gewebe wurden die Schnitte bis zu 5 min mit 2 % Uranylacetat und bis maximal bis zu 2 min mit Bleicitrat kontrastiert (Reynolds, 1963).

Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte bei 80 kV mit einem LEO906 Elektronenmikroskop der Firma Zeiss (Wetzlar).

### 3.8 Generierung einer PEX19-Knockout-Mauslinie

Bei der Generierung einer Knockout-Maus (KO-Maus) wird durch genetische Manipulation gezielt ein endogenes Gen ausgeschaltet. Die dafür verwendete Technik, das sog. „*gene targeting*“ (Nobelpreis für Medizin 2007; Capecchi, 1989), nutzt die homologe Rekombination aus, durch die in embryonalen Stammzellen identische Sequenzen im Genom ausgetauscht werden können.

Der Gen-Transfer erfolgt mit Hilfe eines Targetingvektors in pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die aus der inneren Zellmasse von Blastocysten isoliert werden. Diese Zellen werden *in vitro* mit dem linearisierten Targetingvektor transfiziert. Durch

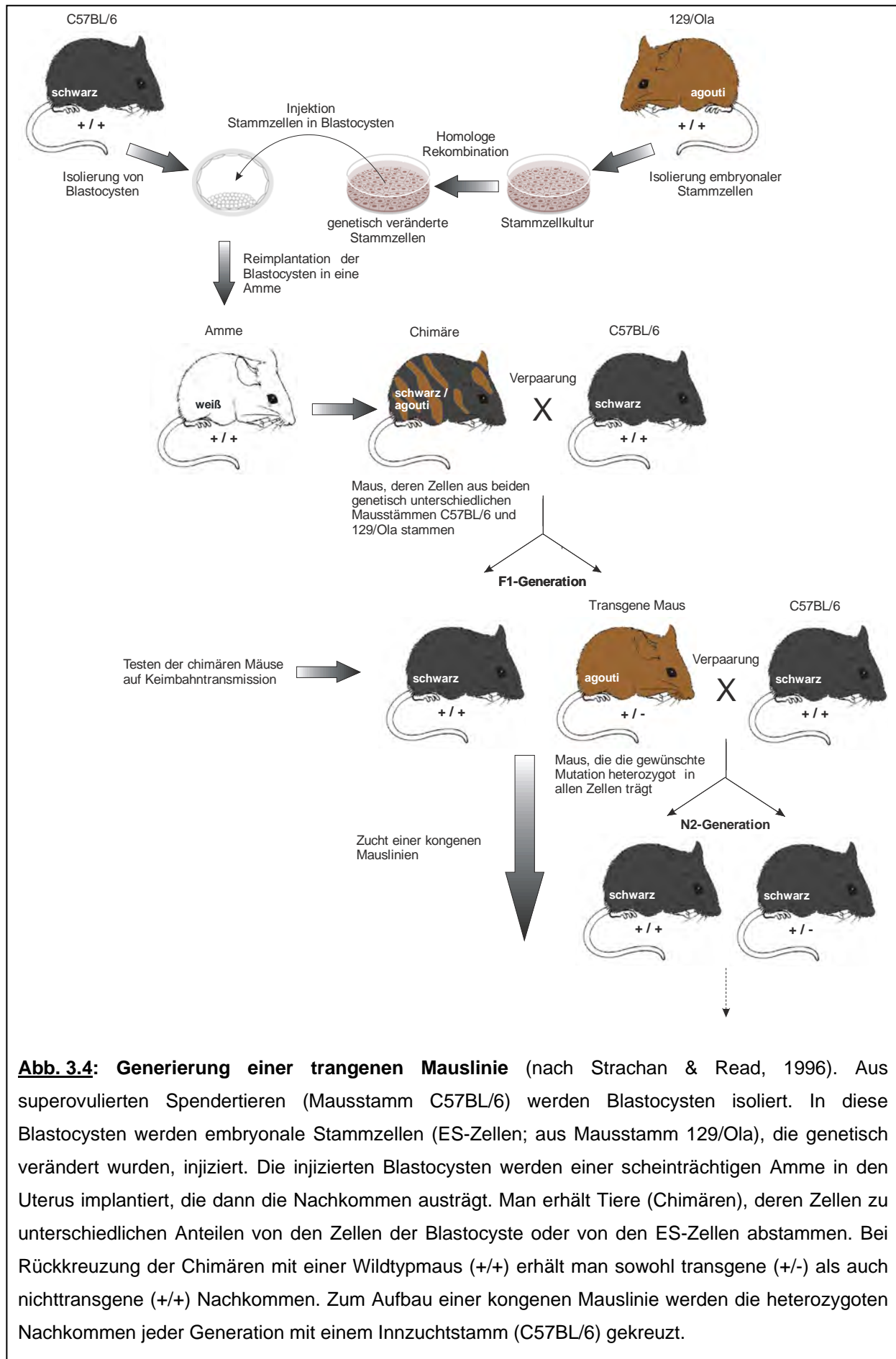
homologe Rekombination wird das modifizierte Gen gegen sein chromosomales Äquivalent ausgetauscht, so dass die gewünschte Modifikation stabil ins Chromosom eingeführt wird. Nach Selektion auf genetisch veränderte Zellen werden positive ES-Zellklone in Blastocysten von Mäusen mit anderer Fellfarbe injiziert, die anschließend in den Uterus einer Amme transferiert werden. Die eingenisteten Embryos werden von der Amme ausgetragen. Mit dieser Technik entwickeln sich graduell unterschiedliche chimäre Tiere.

Chimäre Mäuse besitzen einen Anteil von Zellen, der aus den Blastocysten stammt, und einen Anteil von Zellen, der aus den injizierten ES-Zellen hervorgegangen ist. Wenn die ES-Zellen zum Beispiel von *Agouti*-farbenen 129/Ola-Mäusen (schwarz mit gelben Sprenkeln) und die Blastocysten von schwarzen C57BL/6 Spendertiere abstammen, kann der Grad der Chimärität anhand der unterschiedlichen Fellfärbung abgelesen werden. Ein hoher *Agouti*-Anteil ergibt eine hell (beige) gefleckte Fellfarbe und deutet auf einen starken Beitrag der ES-Zellen zur Entstehung der somatischen Gewebe hin. Damit ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass diese Tiere die veränderten ES-Zellen auch in ihren Keimzellen (Spermatogonien) eingebaut haben. Bei hochgradig chimären Tieren ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die genetische Veränderung bei einer Verpaarung der Chimären mit Wildtyptieren über die Spermatozoen weitergeben wird.

Aus der ersten Verpaarung der Chimäre mit einem Wildtyptier (z.B. C57BL/6) werden heterozygote Nachkommen mit der gewünschten genetischen Modifikation zum Aufbau der transgenen Mauslinie eingesetzt („*Founder*“tiere; Generation F1). Durch wiederholtes Rückkreuzen heterozygoter Nachkommen nachfolgender Generationen in denselben Inzuchtstamm (C57BL/6) wird ein kongener Mausstamm aufgebaut. Mit jeder Generation (Generationen N2, N3, etc.) wird der genetische Hintergrund der transgenen Mäuse dem der Wildtyptiere zunehmend ähnlicher. Nach zehn Generationen sind die transgenen Mäuse zu 99,8 % identisch (kongen) mit dem Mausstamm, in den sie rückgekreuzt wurden.

Die für die Generierung einer transgenen Mauslinie notwendigen, aufeinander aufbauenden Schritte sind in Abbildung 3.4. dargestellt.





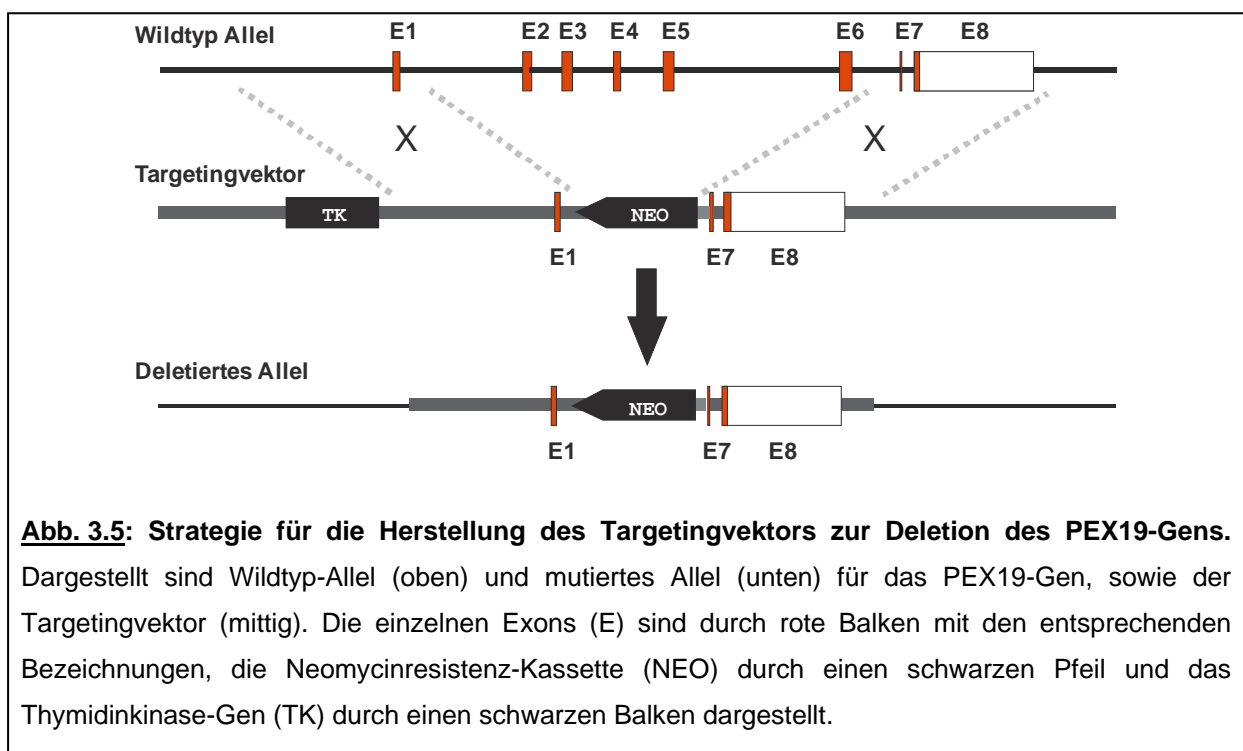
**Abb. 3.4: Generierung einer transgenen Mauslinie** (nach Strachan & Read, 1996). Aus superovulierten Spendertieren (Mausstamm C57BL/6) werden Blastocysten isoliert. In diese Blastocysten werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen; aus Mausstamm 129/Ola), die genetisch verändert wurden, injiziert. Die injizierten Blastocysten werden einer scheinträchtigen Amme in den Uterus implantiert, die dann die Nachkommen austrägt. Man erhält Tiere (Chimären), deren Zellen zu unterschiedlichen Anteilen von den Zellen der Blastocyste oder von den ES-Zellen abstammen. Bei Rückkreuzung der Chimären mit einer Wildtypmaus (+ / +) erhält man sowohl transgene (+ / -) als auch nichttransgene (+ / +) Nachkommen. Zum Aufbau einer kongenen Mauslinie werden die heterozygoten Nachkommen jeder Generation mit einem Inzuchtstamm (C57BL/6) gekreuzt.

### 3.8.1 Isolierung genomischer PEX19-DNA

Für die Konstruktion des Targetingvektors war es notwendig, die genomische DNA des murinen PEX19-Gens zu isolieren. Hierfür wurde ein genomischer Klon einer BAC-DNA Bank (Incyte Genomics, USA) des Mausstammes 129/SvJ verwendet. Damit ein spezifischer Klon identifiziert werden konnte, der das gesamte PEX19-Gen inklusive Promotorbereich trägt, wurden geeignete PCRs auf genomischer 129/SvJ Maus-DNA entwickelt. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des PEX19-Gens amplifizieren. Der BAC-Klon wurde durch den Anbieter identifiziert und an unser Labor übergeben. Er wurde in Bakterien vermehrt und die DNA mit dem *Qiagen Large Construct Kits*<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) isoliert. Detaillierte Angaben zu den oben genannten Schritten werden in Kapitel 4.1.1 gemacht.

### 3.8.2 Klonierung des PEX19-Targetingvektors

Voraussetzung für eine erfolgreiche Inaktivierung eines Proteins ist, einen Bereich des dazugehörigen Gens, der für die biologische Funktion von Bedeutung ist, durch einen Selektionsmarker zu ersetzen. Um eine Inaktivierung von Pex19p zu erreichen, wurde die Targetingstrategie so gewählt, dass ein Großteil des PEX19-Gens (Exons 2 bis 6) durch eine Neomycinresistenz-Kassette (NEO) ausgetauscht wurde (s. Abbildung 3.5).



Die entsprechenden Genbereiche für die homologe Rekombination wurden erst ausgewählt, nachdem das gesamte PEX19-Gen auf repetitive Sequenzen hin untersucht worden war, um die Möglichkeit von Fehlinsertionen gering zu halten. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche des PEX19-Gens in Abschnitte von 1000 bp Länge unterteilt und einer Datenbanksuche unterzogen.

Für die Klonierung wurde der Targetingvektor *pKO Scrambler NTK 1908*<sup>®</sup> der Firma Stratagene (Amsterdam) verwendet (s. Kapitel 7.3.1). Dieser Vektor besitzt zwei Polylinker für die Klonierung der 5'- und 3'-Homologiebereiche des Zielgens, die das bakterielle Neomycin-Resistenzgen (Neo-Gen) unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK-Promotors) flankieren. Als weiteren Selektionsmarker trägt der Vektor das Thymidinkinase-Gen (TK) unter der Kontrolle des MC1-Promotors (Mario Capecchi-Promotor 1).

Die isolierte BAC-DNA des als PEX19-positiv identifizierten Klons wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten, die entsprechenden Fragmente aus Agarosegelen isoliert und -teils über Subklonierung in einen Zwischenvektor- abschließend in den Targetingvektor *pKO Scrambler NTK 1908*<sup>®</sup> der Firma Stratagene (Amsterdam, NL) kloniert. Die verschiedenen Klonierungsschritte sind in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

#### **3.8.3 Transfektion embryonaler Stammzellen und Generierung von chimären Mäusen**

Die Kultivierung, die Transfektion und das Screening auf homologe Rekombination der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus sowie die Blastocysteninjektion und -implantation zur Generierung der chimären Mäuse wurden von GenOway Germany GmbH (Hamburg) durchgeführt (siehe auch Kapitel 4.2).

Für die Transfektion embryonaler Stammzellen wurde der PEX19-Targetingvektor (s. Kapitel 4.1.2) vor der Elektroporation mit *NotI* linearisiert und durch Ethanol-Fällung gereinigt.  $1 \times 10^7$  Zellen der embryonalen Stammzelllinie E14.1, die aus einer männlichen 129/Ola Mausblastocyste stammt (Kuhn et al., 1991), wurden mit 30  $\mu\text{g}$  des linearisierten Konstruktes elektroporiert. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde dem Nährmedium 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 (positive Selektion) und nach weiteren 24 Stunden 1  $\mu\text{M}$  GANC (negative Selektion) zugegeben. Neomycinresistente Klone wurden isoliert und jeder Klon wurde separat in einer 96-well-Platte bis zur Konfluenz weitervermehrt. Konfluente Platten wurden im Verhältnis 1:3 aufgeteilt und erneut bis zur Konfluenz expandiert.

Neomycinresistenz bedeutete, dass das PEX19-Targetingkonstrukt in das Genom der murinen, embryonalen Stammzellen integriert wurde. Nun musste überprüft werden, ob die Integration des eingebrachten PEX19-Targetingvektors tatsächlich an dem dafür vorgesehenen chromosomalen Locus stattgefunden hatte (homologe Rekombination). Dazu wurde pro Plattenset (s. o.) von einer Platte DNA isoliert und auf homologe Rekombination hin untersucht. Die verbleibenden 2 Platten wurden eingefroren und aufbewahrt.

Bei homologer Rekombination kommt es durch Einfügen der Neomycinresistenz-Kassette zur Deletion der Exons 2 bis 6 des PEX19-Gens (vgl. auch Kapitel 4.1.2, Abbildung 4.3). Dadurch veränderten sich die Größen für *Bam*HI-, *Bsr*GI- und *Spe*I-*Eco*RV-Fragmente von Wildtyp- und mutiertem Allel. Diese Veränderung konnte für die Genotypisierung neomycinresistenter Stammzellklone mittels Southern Blot-Analyse herangezogen werden. Die Strategie war so gewählt, dass mit zwei unterschiedlichen Sonden überprüft werden konnte, ob sowohl der 5'- als auch der 3'-Homologiebereich korrekt ins Genom der E14.1 Stammzellen integriert wurde (s. Tabelle 3.4).

**Tab. 3.4:** Erwartete Fragmentgrößen der Southern Blot-Analyse

Enzym	Sonde	Erwartete Fragmentgrößen von	
		Wildtyp-Allel	Mutiertes Allel
<i>Bam</i> HI	5'-Sonde	5,4 kb	7,1 kb
<i>Bsr</i> GI	3'-Sonde	5,4 kb	12,2 kb
<i>Spe</i> I- <i>Eco</i> RV	3'-Sonde	9,6 kb	6,5 kb

Die beiden Sonden wurden durch PCR-Amplifikation genomischer DNA unter Verwendung digoxigeninmarkierter Nukleotide hergestellt. Die verwendeten Primer wurden von GenOway Germany GmbH (Hamburg) konstruiert und sind daher separat von den anderen Oligonukleotiden (s. Kapitel 2.18) in Tabelle 3.5 dargestellt.

**Tab. 3.5:** Verwendete Primer zur Herstellung der DIG-markierten 5'- und 3'-Sonden

	Produktgröße	Primer	5'-3'-Sequenz
5'-Sonde	507 bp	Pex-5' S-F	ACT CCT CCC TTC CCA CCA CCT T
		Pex-5' S-R	CTC TTT ACA CCA GTC CCC AAC A
3'-Sonde	678 bp	Pex-3' S-F	CCA TCC CAT TCA AGA CTC TGC CAT
		Pex-3' S-R	AGG AAG GCA AGG GTC TAG GGA

Für die Southern Blot-Analyse wurde die DNA der isolierten ES-Zellklone auf Nylonmembranen übertragen und mit den beiden Sonden hybridisiert.

Von korrekt rekombinierten ES-Zellklonen wurden jeweils 10 - 12 Stammzellen in das Blastozoele einer Blastocyste injiziert. Die Blastocysten wurden zuvor am Tag 3,5 *post coitum* aus 3 Wochen alten, trächtigen Weibchen des Stammes C57BL/6 isoliert. Erfolgreich manipulierte Embryonen wurden in den Uterus scheinträchtiger CB6F1-Weibchen (Tag 2,5 *post coitum*) implantiert. Nach der Geburt wurden die Chimären anhand ihrer Fellfärbung identifiziert.

#### **3.8.4 Testen der chimären Mäuse auf Keimbahntransmission**

Die männlichen, chimären Mäuse wurden mit Weibchen des Stammes C57BL/6JCrI verpaart. Im Alter von 3 Wochen wurden den Jungtieren Schwanzspitzenbiopsien zur Isolierung von DNA entnommen, die zur Genotypisierung mittels PCR eingesetzt wurde. Damit wurde überprüft, ob heterozygote Nachkommen, d.h. Tiere, die ein transgenes Allel tragen, aus der Verpaarung hervorgegangen waren.

#### **3.8.5 Aufbau kongener Mauslinien**

Zum Aufbau verschiedener kongener Mauslinien wurden Chimären, die das mutierte Allel weitervererbten, mit Tieren der Inzuchtstämme C57BL/6JCrI, 129S1/SvImJ (beide Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld) oder BALB/cOlaHsd (Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln,) gekreuzt. Heterozygote Nachkommen (PEX19 +/-) wurden in jeder folgenden Generation entsprechend ihres Hintergrundes mit Tieren dieser Inzuchtstämme verpaart.

Die genetisch veränderten PEX19-Mäuse wurden in der SPF-Anlage des Zentralen Tierlabors (ZTL) der Justus-Liebig Universität in Typ II L (365 x 207 x 140 mm) Makrolon (Polycarbonat)-Käfigen (Tecniplast, Hohenpeißenberg) mit H-Temp Sealsafe-Haube in Sealsafe-IVC-Systemgestellen gehalten. Zur Zucht wurden die Käfige zusätzlich mit Maushäusern angereichert.

Als Einstreu wurden autoklavierte Späne (WH-Grade 6) (Altromin, Lage) verwendet. Die Fütterung mit Haltungsfutter Ratten/Mäuse (Altromin, Lage) und die Wasserversorgung erfolgten *ad libidum*.

### **3.9 Tierexperimentelle Arbeiten**

#### **3.9.1 Tierversuchsgenehmigungen**

Die Generierung der Pex19-Knockout-Tiere wurde von GenOway Germany GmbH (Hamburg) mit Genehmigung der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Freie und Hansestadt Hamburg durchgeführt. Alle weiteren tierexperimentellen Arbeiten erfolgten unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießens, Dezernat V54-Veterinärwesen.

Die Genehmigungsnummern lauten:

Freie und Hansestadt Hamburg, Behörde für Wissenschaft und Gesundheit	Nr.:70/04
--	-----------

Regierungspräsidium Gießen, Dezernat V54-Veterinärwesen	V54-19c20/15c GI 20/23
--	------------------------

#### **3.9.2 Entnahme von Schwanzbiopsien**

Die Entnahme der Schwanzbiopsien erfolgte im Alter von drei bis vier Wochen beim Absetzen der Jungtiere vom Muttertier unter Narkose und wurde anfänglich selbst und später von den Tierpflegern des Zentralen Tierlabors der Justus-Liebig-Universität durchgeführt.

Neugeborenen, die vor der Probengewinnung typisiert werden mussten, wurden ca. 0,3 cm der Schwanzspitze mit einem Elektrokauter abgetrennt. Die heiße Drahtschlinge garantiert eine sofortige Blutstillung durch „Verschweißen“ der Wunde.

#### **3.9.3 Identifikation der Tiere**

Parallel zu den Schwanzbiopsien für die Genotypisierung wurden die Tiere durch Ohrlochmarkierung gekennzeichnet. Gleichzeitig mit der Ohrlochmarkierung wurden die Tiere im Datenbanksystem „TierBase“ erfasst. Für jeden Wurf wurde ein Protokoll erstellt, in dem Anzahl der Nachkommen, Geburtsdatum und Geschlecht der Tiere festgehalten wurden. Außerdem teilt dieses Programm jedem Tier zur eindeutigen Identifikation eine laufende Nummer in Kombination mit einer Ohrmarke zu.

### **3.9.4 Narkotisierung und Tötung von Versuchstieren**

Zur histologischen Probengewinnung, die eine Perfusionsfixierung erforderte, erhielten die Mäuse eine Injektionsnarkose durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus 5 µg / g Körpergewicht Ketamin (Rompun®; Bayer, Leverkusen) und 2 µg / g Körpergewicht Xylazin (Ketavet®; Pharmacia & Upjohn, Nürnberg). Für eine Probengewinnung, die keine Perfusion erforderte, wurden die erwachsenen Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Neugeborene wurden dekapitiert.

### **3.9.5 Blutentnahme**

Das für die biochemische Diagnostik benötigte Blut wurde gewonnen, indem die neugeborenen Jungtiere dekapitiert, und das austretende Blut mit einer Pipette abgenommen wurde. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

## 4. Ergebnisse mit Erläuterungen

Der Ergebnisteil der Dissertation ist in die nachstehenden vier Abschnitte unterteilt:

- Klonierung des PEX19-Targetingvektors
- Herstellung einer PEX19-Knockout-Mauslinie
- Charakterisierung der PEX19-defizienten Mauslinie 129/BL6-PEX19<sup>tm3B9</sup>
- Untersuchungen zur peroxisomalen Biogenese an PEX19-defizienten embryonalen Fibroblasten

Die Ergebnisse zu diesen vier Bereichen werden im folgenden Kapitel dargestellt. Zum besseren Verständnis sind zu den Ergebnissen zusätzlich Erläuterungen eingefügt.

### 4.1 Klonierung des PEX19-Targetingvektors

Die Konstruktion eines Targetingvektors ist eine Voraussetzung für die Generierung von genetisch veränderten Tieren. Für die Isolierung der dafür benötigten genomischen DNA stehen BAC-DNA Banken kommerziell zur Verfügung. Das bedeutet, dass der Kunde auf Basis nicht klonierter, genomischer DNA zunächst geeignete PCR-Primer entwickeln muss, die in der Firma für das „*Screening*“ eingesetzt werden.

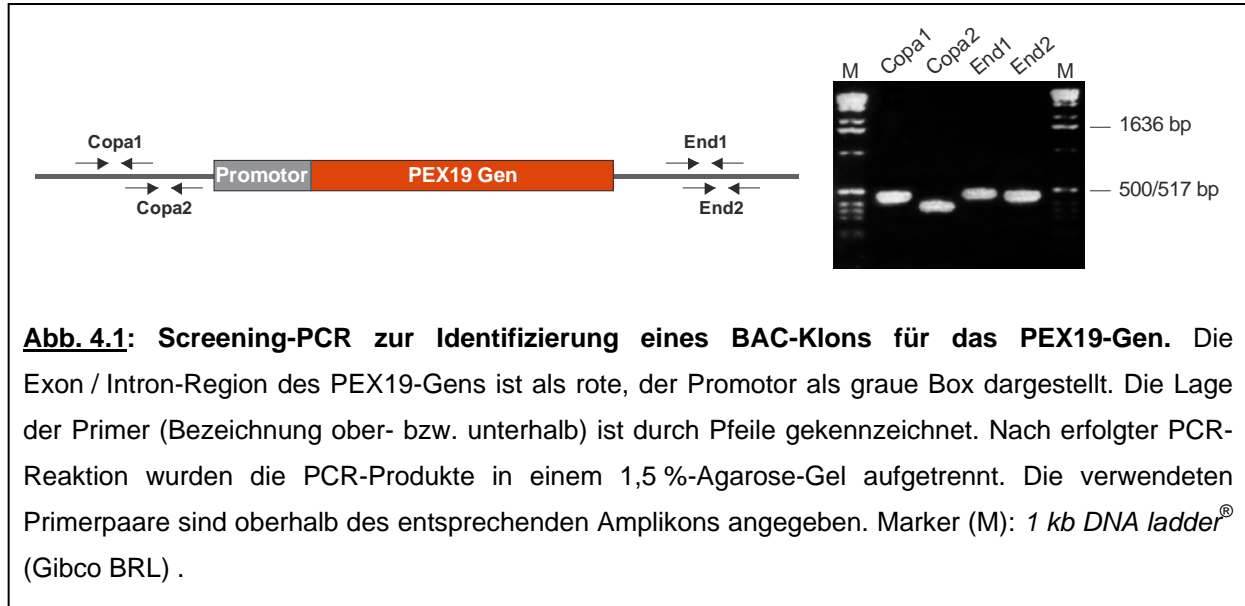
Nach erfolgreicher Charakterisierung des BAC-Klons wurde der gewünschte Targetingvektor konstruiert und sequenziert. Zum Abgleich der Sequenzen aus den Sequenzierreaktionen des PEX19-Targetingvektors, der genomische DNA des Mausstammes 129/SvJ enthält, wurde eine Datenbanksequenz des Mausstammes C57BL/6 herangezogen.

#### 4.1.1 Identifizierung des BAC-Klons

Zum „*Screening*“ der BAC-Bibliothek (Incyte Genomics, USA) und zur Identifizierung des spezifischen genomischen Klons für das PEX19-Gen wurden PCRs auf 200 ng genomischer 129/SvJ-DNA unter Verwendung der Primer 5ForCopa1, 5RevCopa1 (Copa1), 5ForCopa2, 5RevCopa2 (Copa2), 3ForEnd1, 3RevEnd1 (End1), 3ForEnd2, 3RevEnd2 (End2) durchgeführt (s. Abbildung 4.1).

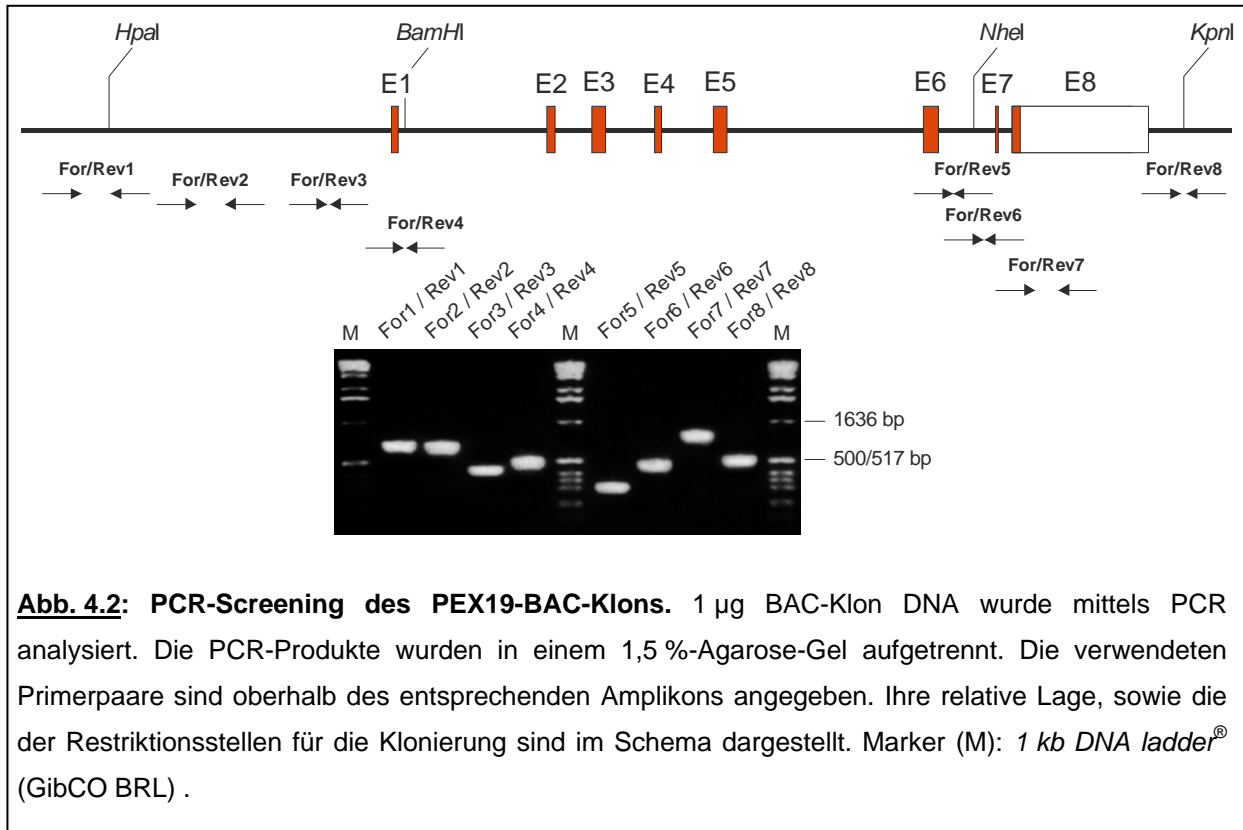


Protokoll und Primer wurden an Incyte Genomics (USA) gesandt. Das Durchsuchen der BAC-DNA Bank *Mouse ES-129/SvJ Library Rel. II* (Kat. Nr.: BAC-4925) nach geeigneten Klonen erfolgte durch den Anbieter Incyte Genomics. Der dort, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, identifizierte BAC-Klon Nr. 271 wurde zur weiteren Verwendung an unser Labor geschickt.



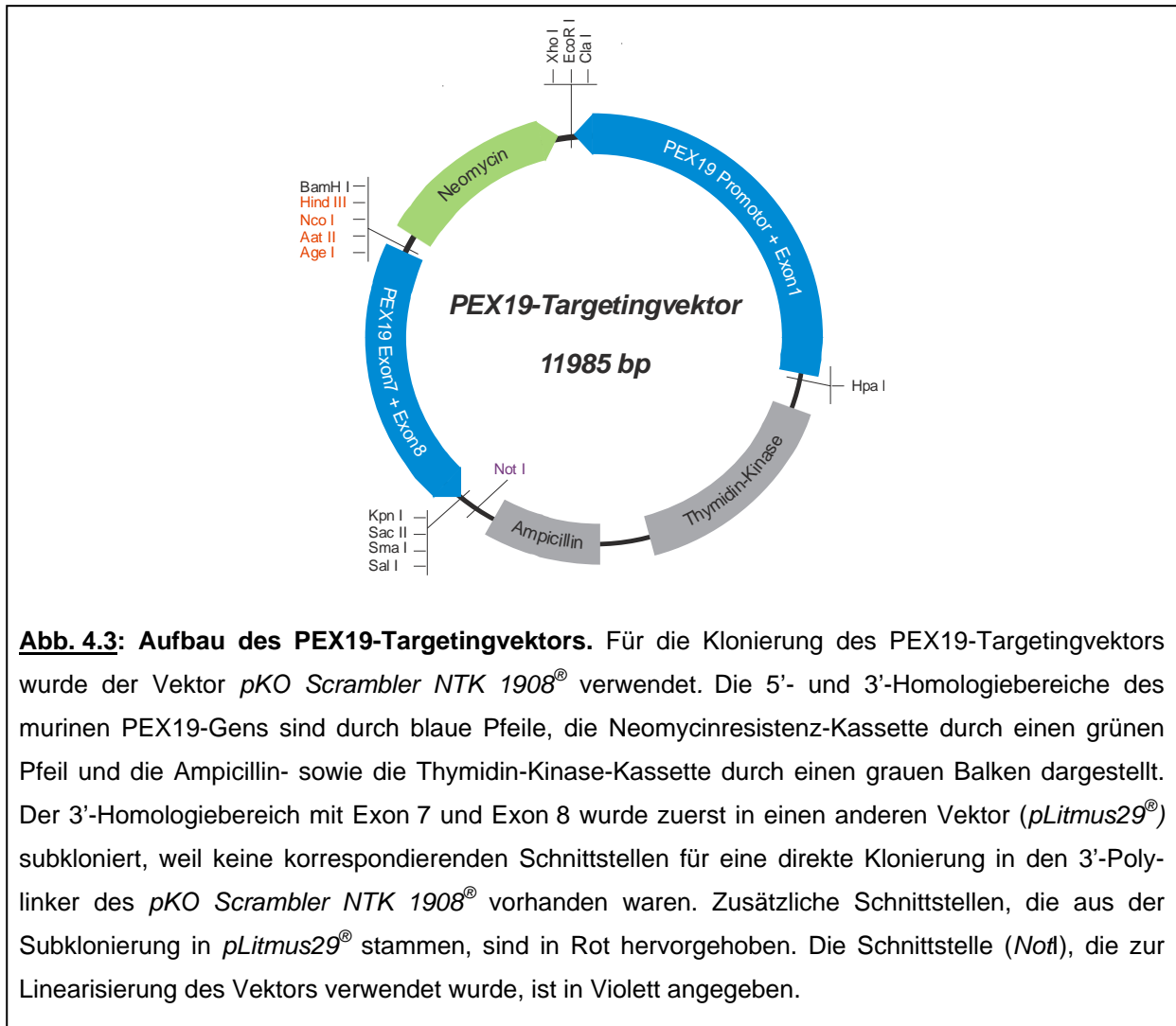
Durch PCR mit PEX19-spezifischen Primern wurde kontrolliert, ob der von Incyte Genomics bezogene BAC-Klon die Bereiche inklusive der geplanten Restriktionsstellen enthielt, die für die Klonierung des PEX19-Targetingvektors nötig waren (s. Abbildung 4.2). Diese umfassten die Promotorregion und Exon 1 (Pex19-For1 / Rev1, Pex19-For2 / Rev2, Pex19-For3 / Rev3, Pex19-For4 / Rev4), das Intron zwischen Exon 6 und 7 (Pex19-For5 / Rev5, Pex19-For6 / Rev6) sowie Exon 8 und die 3'-Region von Exon 8 (Pex19-For7 / Rev7 und Pex19-For8 / Rev8).

Die Größen der PCR-Produkte entsprachen den anhand der genomischen Sequenz berechneten Größen. Somit wurde der BAC-Klon für die Klonierung des PEX19-Targetingvektors verwendet.



#### 4.1.2 Klonierung des PEX19-Targetingvektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen

Zur Klonierung der 5'- und 3'- flankierenden Arme wurde PEX19 BAC-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Durch *HpaI* / *BamHI* -Verdau wurde ein 3746 bp großes Fragment, das die Promotor-Region sowie das Exon 1 des PEX19-Gens enthält, ausgeschnitten und in die *HpaI* / *BglII*-Schnittstelle des 5'-Polylinkers von *pKO Scrambler NTK 1908*® eingefügt. Das 2375 kb große Fragment mit Exon 7 und 8 für den 3'-Polylinker wurde zuerst durch *KpnI/NheI*-Verdau in den Vektor *pLitmus29*® (s. Kapitel 7.3.1) subkloniert. Dieser Zwischenschritt war nötig, da innerhalb des gewählten genomischen Abschnittes keine korrespondierenden Schnittstellen für eine direkte Klonierung in den 3'-Polylinker des *pKO Scrambler NTK 1908*® vorhanden waren. Da *XbaI* kompatibel zu *NheI* kloniert werden kann, erhielt man durch Subklonierung in *pLitmus29*® zusätzliche Restriktionsschnittstellen (*HindIII*, *NcoI*, *AatII*, *AgeI*, *BamHI*, etc.). Damit konnte durch *BamHI/KpnI*-Verdau der 3'-Homologiebereich des PEX19-Gens in die korrespondierenden Schnittstellen des *pKO Scrambler NTK 1908*® ligiert werden. Das resultierende Plasmid (PEX19-Targetingvektor) wurde vollständig charakterisiert. Es ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

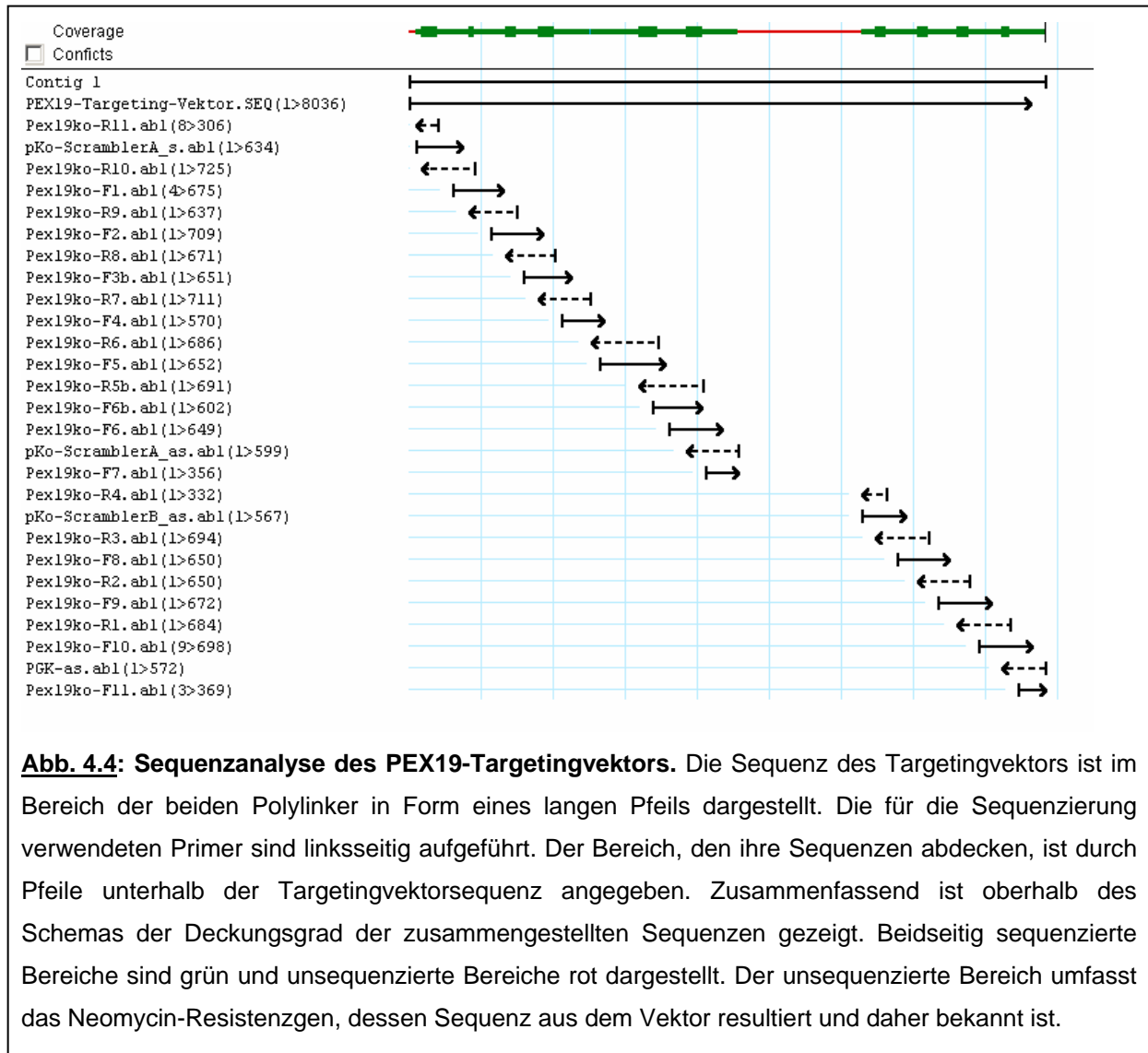


**Abb. 4.3: Aufbau des PEX19-Targetingvektors.** Für die Klonierung des PEX19-Targetingvektors wurde der Vektor *pKO Scrambler NTK 1908*<sup>®</sup> verwendet. Die 5'- und 3'-Homologiebereiche des murinen PEX19-Gens sind durch blaue Pfeile, die Neomycinresistenz-Kassette durch einen grünen Pfeil und die Ampicillin- sowie die Thymidin-Kinase-Kassette durch einen grauen Balken dargestellt. Der 3'-Homologiebereich mit Exon 7 und Exon 8 wurde zuerst in einen anderen Vektor (*pLitmus29*<sup>®</sup>) subkloniert, weil keine korrespondierenden Schnittstellen für eine direkte Klonierung in den 3'-Polylinker des *pKO Scrambler NTK 1908*<sup>®</sup> vorhanden waren. Zusätzliche Schnittstellen, die aus der Subklonierung in *pLitmus29*<sup>®</sup> stammen, sind in Rot hervorgehoben. Die Schnittstelle (*NotI*), die zur Linearisierung des Vektors verwendet wurde, ist in Violett angegeben.

#### 4.1.3 Sequenzierung des PEX19-Gens

Nach der Klonierung wurden die beiden Homologiebereiche des PEX19-Targetingvektors zur Kontrolle sequenziert. Die Abbildung 4.4 zeigt die verwendeten Primer, ihre entsprechenden Leseweiten und die relative Lage der ermittelten Sequenzen.

Die aus der Sequenzierung resultierende Sequenz (s. Kapitel 7.1.1) wurde mit dem Programm *MegAlign*<sup>®</sup> (DNASTar-Package, Madison, USA) unter Verwendung der *ClustalW*<sup>®</sup> Methode (Thompson et al., 1994) mit einem Datenbankeintrag für genomische DNA des Mausstammes C57BL/6J (AC074310) verglichen.



Die Analyse ergab, dass im „klonierten“ Targetingvektor (mit 129/SvJ-DNA) zusätzlich ein 208 bp großer Abschnitt innerhalb der möglichen Promotorregion des PEX19-Gens im Vergleich zur genomischen Datenbanksequenz (AC074310: C57BL/6J-DNA) enthalten ist. Der entsprechende Abschnitt dieses Sequenzabgleiches ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

Eine anschließende BLASTN-Datenbanksuche (Altschul, et al. 1990) ergab, dass diese zusätzliche Sequenz vielfach im Mausgenom vorkommt (1108 „Hits“) und dabei Sequenzähnlichkeiten von über 95 % aufweist. Mit wenigen Ausnahmen fehlten in der Beschreibung der gefundenen Datenbanksequenzen die Angaben, um welchen Mausstamm es sich bei den Datenbankeinträgen handelt. Daher konnte nicht ermittelt werden, ob diese 208 bp-große Sequenz spezifisch in einem bestimmten Mausstamm vorkommt.

```

2595 A G A G A G A C A G G - - - - - AC074310
2636 A G A G A G A C A G G G C T G G T G A G A T G G C T C A G T Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2680                2690                2700
-----+-----+-----+

2606 - - - - - AC074310
2666 G G G T A A G A G C A T C C G A C T G C T C T T C C G A A G Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2710                2720                2730
-----+-----+-----+

2606 - - - - - AC074310
2696 G T C T G A A G T T C A A A T C C C A G C A A C C A C A T G Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2740                2750                2760
-----+-----+-----+

2606 - - - - - AC074310
2726 G T G G C T C A C A A C C A T C C G T A A T G A G A T C T G Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2770                2780                2790
-----+-----+-----+

2606 - - - - - AC074310
2756 A C T C C C T C T T C T G G A G T G T C T G A A G A C A G C Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2800                2810                2820
-----+-----+-----+

2606 - - - - - AC074310
2786 T C A G T G T A C T T A T A T A C A A T A A A A T A A A T Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2830                2840                2850
-----+-----+-----+

2606 - - - - - AC074310
2816 A A T A A A T A A A T C T T T A A A A A A A G A A A A G Targeting-Vektor

-----+-----+-----+
                2860                2870                2880
-----+-----+-----+

2606 - - - - - T G T G G T G G T A C A C G C A T T T A A AC074310
2846 A G A G A C A G G T G T G G T G G T A C A C G C A T T T A A Targeting-Vektor

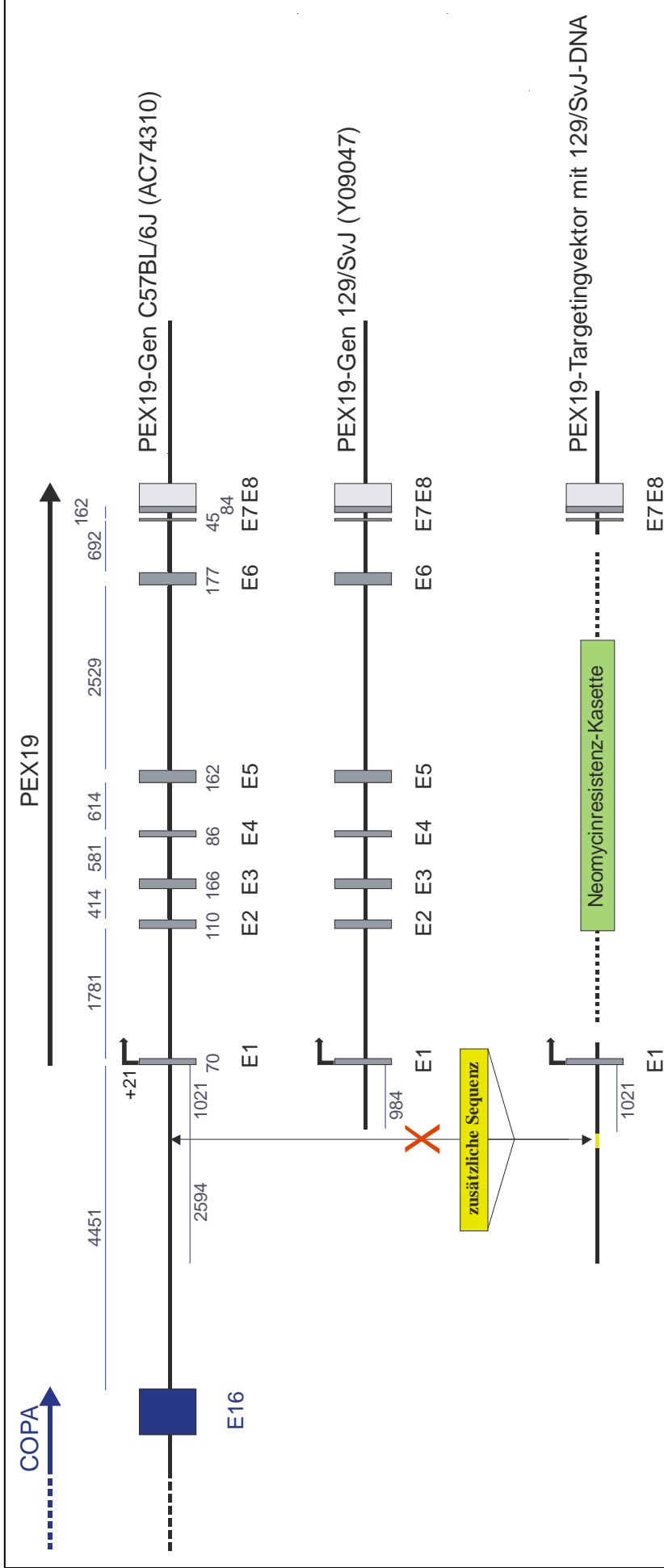
-----+-----+-----+
                2890                2900                2910
-----+-----+-----+

2627 T G C C A C C A C C C T C G A G G C A G A G T C A A G A G T AC074310
2876 T G C C A C C A C C C T C G A G G C A G A G T C A A G A G T Targeting-Vektor

```

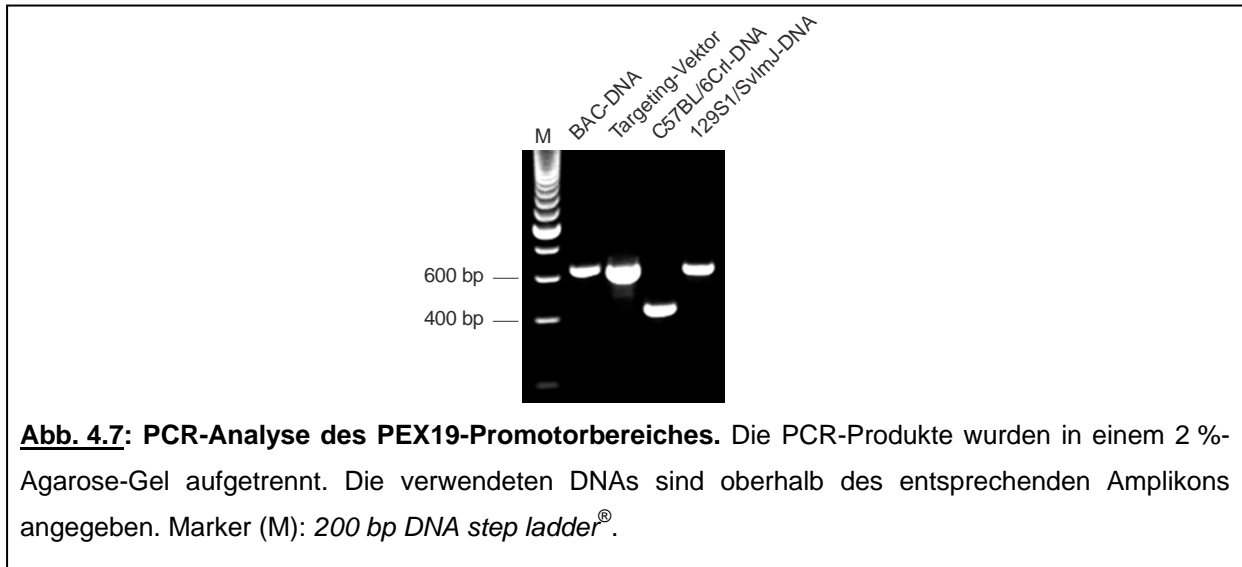
**Abb 4.5: Sequenzvergleich von Targetingvektor und Datenbanksequenz des PEX19-Gens.** Der Abschnitt, in dem sich Datenbanksequenz (AC074310) und die genomische PEX19-DNA des Mausstammes 129/SvJ (Targetingvektor) unterscheiden, ist dargestellt. Die fehlenden 208 Basen sind durch rote Striche angegeben.

Um zu überprüfen, ob der gefundene Unterschied tatsächlich auf Sequenzunterschieden der beiden Mausstämme 129/SvJ (BAC-DNA) und C57BL/6J (Datenbanksequenz) beruht, wurde daraufhin in der Datenbank nach der genomischen Sequenz für das PEX19-Gen des Mausstammes 129/SvJ gesucht. Bei dieser Datenbanksuche wurde nur ein einziger Datenbankeintrag (Y09047; Kammerer et al., 1997) gefunden. Für einen Sequenzvergleich wäre u. a. ein ca. 3600 bp großer Sequenzabschnitt (bis zur *HpaI*-Schnittstelle) der möglichen Promotorregion des PEX19-Gens nötig gewesen. Vom der 3'-Bereich der Promotorregion fehlten der Datenbanksequenz Y09047 jedoch ca. 2600 bp, die auch die zusätzlichen 208 Basen enthalten hätten (vgl. Abbildung 4.6). Somit konnte die Datenbanksequenz Y09047 auch nicht für den Sequenzvergleich eingesetzt werden.



**Abb. 4.6: Vergleich der genomischen Struktur des PEX19-Gens in den Mausstämmen 129/SvJ und C57BL/6J.** Die Abbildung zeigt Exon- und Intronbereiche des PEX19-Gens des Mausstammes C57BL/6J (oben), des Mausstammes 129/SvJ (mittig) und des PEX19-Targetingvektors (unten). Die einzelnen Exons (E) sind durch graue Balken mit den entsprechenden Bezeichnungen dargestellt. Die Neomycinresistenz-Kassette ist als grüne Box abgebildet. Die Größen der Exons bzw. Introns für die Datenbanksequenz AC74310 sind in „bp“ angegeben. Die Position der zusätzlichen Sequenz in der Promotorregion (gelbe Box) ist mit Pfeilen markiert.

Daraufhin wurden genomische DNA von 129S1/SvImJ- und C57BL/6JCrI-Mäusen sowie die DNAs von PEX19-Targetingvektor und BAC-Klon als Kontrolle mit den Primern Pex19ko-F5 und Pex19ko-R6 auf einen Größenunterschied hin überprüft. Durch diese PCR konnte nachgewiesen werden, dass sich der Promotorbereich des PEX19-Gens bei den Stämmen 129/SvJ und C57BL/6J tatsächlich unterscheidet (s. Abbildung 4.7). Die Größen der PCR-Produkte entsprachen den anhand der Sequenzen berechneten Größen. Ein Artefakt konnte ausgeschlossen werden.



## 4.2 Generierung chimärer PEX19-Mäuse

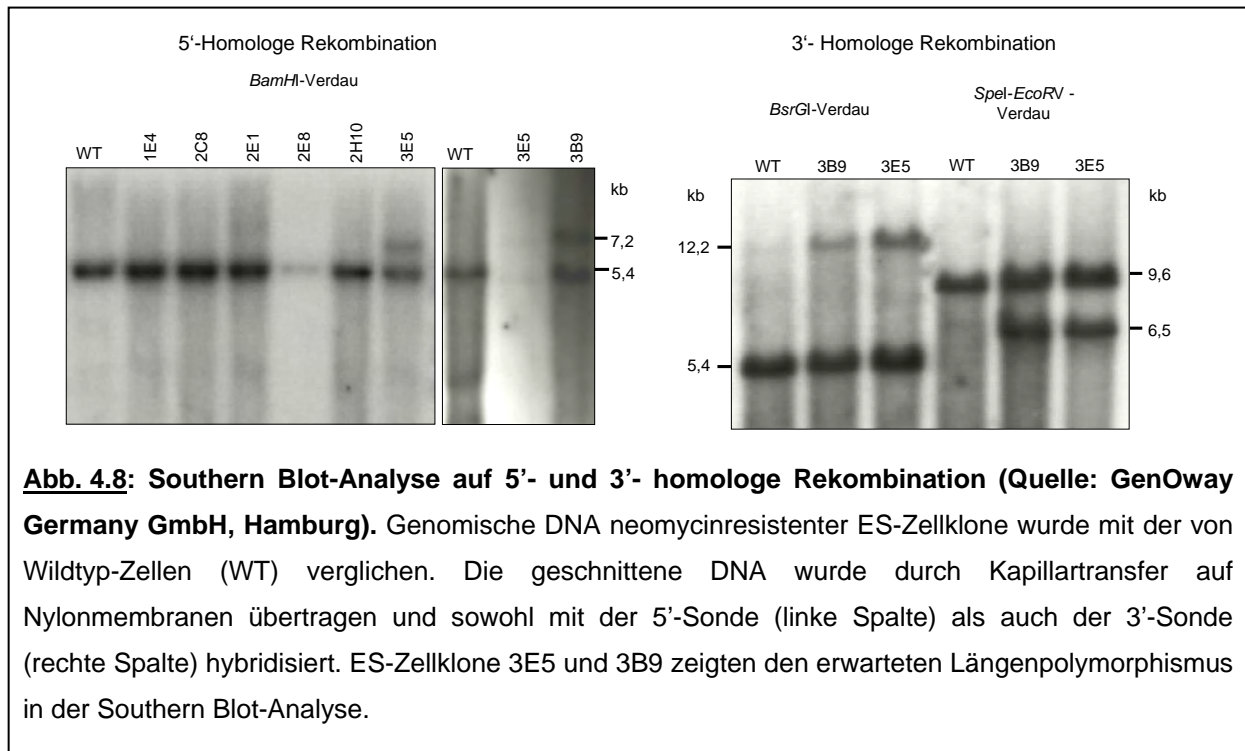
Für die Generierung chimärer Mäuse wurden murine, embryonale Stammzellen mit dem PEX19-Targetingvektor transfiziert und durch Zugabe von Geneticin (G418) und Ganciclovir (GANC) selektioniert. Aus den neomycinresistenten Zellklonen wurde DNA isoliert und mit Restriktionsenzymen geschnitten. Per Southern Blot wurden die Fragmentgrößen überprüft und damit die Klone ermittelt, die sowohl den 5'- als auch den 3'-Homologiebereich des Targetingkonstruktes korrekt ins Genom integriert hatten. Positive Zellklone wurden in Blastocysten injiziert und diese in den Uterus einer Amme transferiert. Chimäre Nachkommen wurden anhand der Fellzeichnung identifiziert. Alle Versuche zur Generierung der chimären PEX19-Mäuse wurden durch GenOway Germany GmbH (Hamburg) unter regelmäßiger gegenseitiger Absprache durchgeführt.

#### 4.2.1 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen wurden mit dem linearisierten PEX19-Targetingvektor elektroporiert. Nach 8 Tagen unter Selektionsbedingungen (s. o.) wurden ca. 530 neomycinresistente ES-Zellklone isoliert.

#### 4.2.2 Nachweis der homologen Rekombination

Durch Southern Blot-Analyse nach *Bam*HI-Verdau und Hybridisierung mit der 5'-Sonde wurde zunächst kontrolliert, bei welchen der ca. 530 neomycinresistenten ES-Zellklone der 5'-Homologiebereich des Targetingvektors an der richtigen Stelle in den PEX19-Locus integriert wurde (vgl. Tabelle 3.4 in Kapitel 3.8.3). Die Überprüfung ergab, dass zwei davon (3E5 und 3B9) zusätzlich zum Wildtyp-Allel auch das rekombinante Allel tragen (s. Abbildung 4.8). Diese beiden ES-Zellklone wurden daraufhin auf korrekte homologe Rekombination im 3'-Bereich durch Doppelverdau mit *Bsr*GI und *Spe*I und Hybridisierung mit der 3'-Sonde untersucht (vgl. Tabelle 3.4 in Kapitel 3.8.3). Bei beiden Klonen war auch der 3'-Homologiebereich korrekt rekombiniert (s. Abbildung 4.8).



Die beiden homolog rekombinierten ES-Zellklone 3E5 und 3B9 wurden erneut in Kultur genommen und für die Injektion in C57BL/6-Blastocysten vorbereitet.



### 4.2.3 Generierung chimärer Mäuse

Nach Blastocysteninjektion und Embryotransfer wurden insgesamt 25 Jungtiere geboren, von denen 13 Jungtiere starben und 12 Jungtiere von den Ammen aufgezogen wurden.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Blastocysteninjektionen und die daraus resultierenden Nachkommen.

**Tab. 4.1: Aufstellung über die Blastocysteninjektion und der daraus resultierenden Nachkommen**

ES-Zellklon 3B9	Amme Nr. 1	Amme Nr. 2	Amme Nr. 3
Anzahl implantierter Embryonen	10	10	10
Anzahl geborener Jungtiere	4	2	2
Anzahl aufzogener Jungtiere	3	-	1
Anzahl männlicher Chimären	2	-	1

ES-Zellklon 3E5	Amme Nr. 1	Amme Nr. 2
Anzahl implantierter Embryonen	11	11
Anzahl geborener Jungtiere	9	8
Anzahl aufzogener Jungtiere	4	4
Anzahl männlicher Chimären	4	1

Von ES-Zellklon 3B9 stammen drei, von ES-Zellklon 3E5 fünf männliche Chimären ab. Alle Tiere zeigten einen hohen Grad an Chimärität. Ungefähr die Hälfte der Nachkommen von ES-Zellklon 3E5 starb nach der Geburt. Außerdem waren die hoch-chimären Tiere im Wachstum deutlich hinter ihren Wurfgeschwistern zurück.

Die acht chimären Tiere wurden von GenOway Germany GmbH (Hamburg, D) zur weiteren Analyse übergeben und im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen untergebracht.

### 4.3. Aufbau von PEX19-defizienten Mauslinien

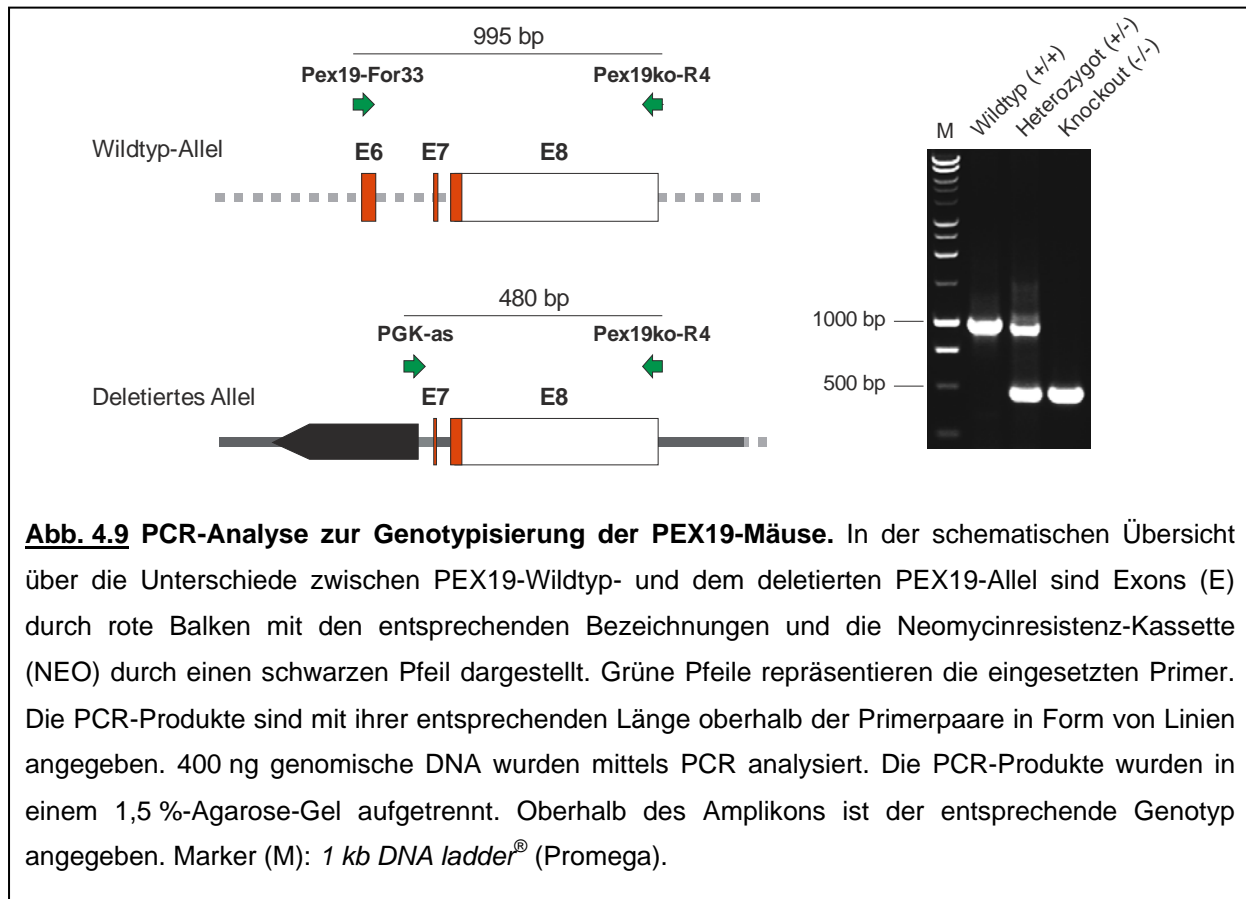
Zum Nachweis der Keimbahntransmission wurden die insgesamt acht männlichen PEX19-Chimären mit weiblichen Wildtyp-Mäusen verpaart, und die Nachkommen mit Hilfe einer PCR genotypisiert, durch die das rekombinante PEX19-Allel nachgewiesen wird. Für den Aufbau PEX19-defizienter Mauslinien (PEX19-KO-Mauslinien) wurden zwei Chimären ausgewählt, die heterozygote Nachkommen (PEX19 +/-) gezeugt hatten, und mit drei verschiedenen Inzuchtstämmen gekreuzt. Mit heterozygoten Nachkommen dieser Verpaarungen wurde die Zucht fortgesetzt.

#### 4.3.1 Genotypisierung mittels PCR

Für die Genotypisierung wurde die DNA aus einer Schwanzspitze der verschiedenen PEX19-Tiere mittels PCR auf die erfolgreiche Deletion des PEX19-Gens untersucht. Um zwischen dem PEX19-Wildtyp-Allel und dem rekombinanten PEX19-Allel unterscheiden zu können, wurden folgende Primer ausgewählt:

Wildtyp-Allel	Pex19-For33 / Pex19ko-R4
Mutiertes Allel	PGK-as / Pex19ko-R4

Die Größe der beiden Amplifikate wurde anhand der vorliegenden Sequenzen berechnet. Auf genomischer DNA amplifizieren die verwendeten Primerpaare wie berechnet eine 995 bp große Bande beim Wildtyp-Allel und eine 480 bp große Bande im Falle des rekombinanten PEX19-Allels (s. Abbildung 4.9). Daraus ergibt sich bei der Genotypisierung von Wildtyp-Mäusen nur eine einzelne Bande von 995 bp Länge, bei heterozygoten Mäusen zwei unterschiedliche Banden von 995 bp und 480 bp Länge und bei Knockout-Mäusen eine einzelne Bande von 480 bp Länge (vgl. Abbildung 4.9 und 4.10).

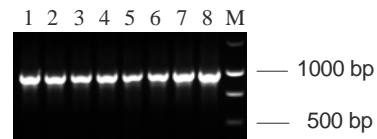
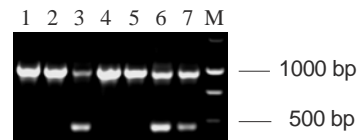
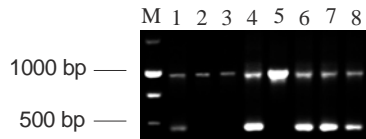
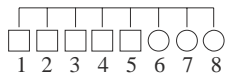
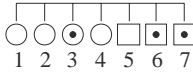
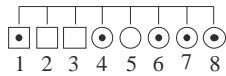
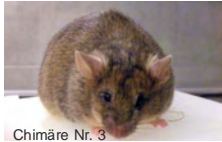
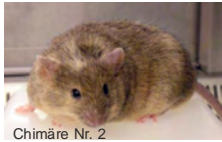
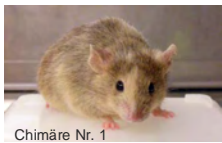


#### 4.3.2 Nachweis der Keimbahntransmission

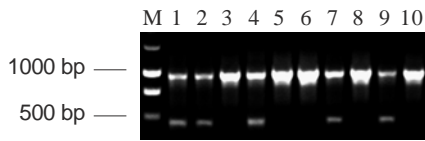
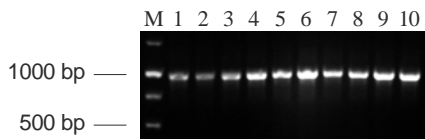
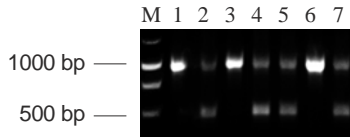
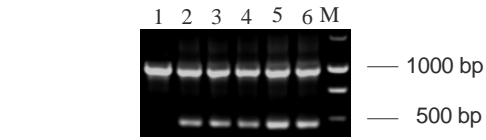
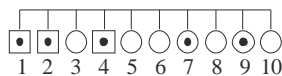
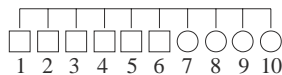
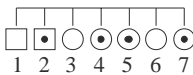
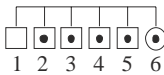
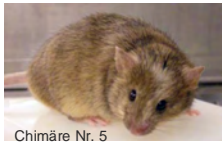
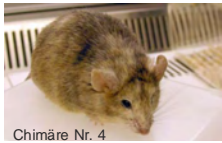
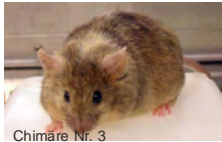
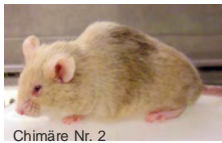
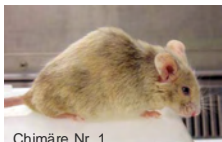
Alle chimären Männchen wurden mit Weibchen des Stammes C57BL/6JCrI verpaart. Für die Analyse wurden Schwanzbiopsien von allen Nachkommen genommen und zur Genotypisierung eingesetzt. Das Ergebnis der Genotypisierung ist in Abbildung 4.10. dargestellt.

Von den insgesamt drei Chimären, die aus der Stammzelle 3B9 abstammten, war bei Chimäre Nummer 3 keine transgene Keimzelle an der Spermatogenese beteiligt, so dass alle Nachkommen zwei Wildtyp-Allele trugen. Von den beiden anderen Chimären wurde jeweils ein verändertes Allel von transgenen Keimzellen weiterverbt. Von ES-Zellklon 3E5 stammten 5 Chimären ab, von denen offensichtlich Chimäre Nummer 3 infertil war, da sie auch nach Verpaarung mit mehreren Weibchen über einen längeren Zeitraum keine Nachkommen zeugte. Chimäre Nummer 4 vererbte kein mutiertes Allel, während die Chimären Nummer 1, 2 und 5 das veränderte Allel an ihre Nachkommen weitergaben.

Linie 129/BL6-PEX19<sup>tm3B9</sup>



Linie 129/BL6-PEX19<sup>tm3E5</sup>



**Abb. 4.10: Nachweis der Keimbahngängigkeit mittels PCR.** Neben der Abbildung der Chimäre ist die F1-Generation in Form eines Stammbaumes dargestellt. Die Zahlen dienen zur Identifizierung der Nachkommen und entsprechen den Zahlen über den PCR-Produkten; Marker (M): 1 kb DNA ladder (Promega). Weibliche Tiere werden durch Kreise, männliche durch Quadrate angezeigt. Symbole mit schwarzem Punkt bezeichnen heterozygote Tiere. Der Stammbaum gibt das Ergebnis der rechtsseitig abgebildeten Genotypisierung wieder (vgl. Abbildung 4.9). Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %-Agarose-Gel aufgetrennt.

Für den Aufbau der Zucht der Linie 129/BL6-PEX19<sup>tm3B9</sup> wurde Chimäre Nummer 1, für die der Linie 129/BL6-PEX19<sup>tm3E5</sup> wurde Chimäre Nummer 3 mit Wildtyp-Mäusen verschiedener Inzuchtstämme (C57BL/6JCrI, 129S1/SvImJ, BALB/cOlaHsd) verpaart. Die Bezeichnung der PEX19-Mauslinien gibt den Spenderstamm von Stammzellen (129) und Blastocysten (BL6), das mutierte Gen (PEX19) sowie den ES-Zellklon (3B9 bzw. 3E5) an. Das Kürzel „tm“ bedeutet, dass die Mäuse durch homologe Rekombination („*targeted mutation*“) generiert wurden.

Heterozygote Nachkommen (PEX19 +/-) wurden in jeder folgenden Generation entsprechend ihres Hintergrundes mit Tieren dieser Inzuchtstämme verpaart.

### 4.4 Charakterisierung der PEX19-defizienten Mauslinie 129/BL6-PEX19<sup>tm3B9</sup>

Anfangs wurden alle Nachkommen der Generation F1.1 der beiden Mauslinien 129/BL6-PEX19<sup>tm3B9</sup> und 129/BL6-PEX19<sup>tm3E5</sup> durch Immunfluoreszenzanalysen mit verschiedenen peroxisomalen Markerproteinen untersucht. Da sich die erzielten Ergebnisse nicht unterschieden, wurden alle weiteren Untersuchungen nur mit Nachkommen der Mauslinie 129/BL6-PEX19<sup>tm3B9</sup> durchgeführt.

Zunächst mussten die PEX19-Knockout-Mäuse (Pex19 KO-Mäuse) phänotypisch charakterisiert werden. Erwartet wurde eine stark reduzierte Lebenserwartung, so dass für eine proteinchemische Charakterisierung die bestehenden Protokolle so angepasst werden mussten, dass sie auch mit minimalen Ausgangsmengen an Lebermaterial repräsentative Ergebnisse lieferten. Hierfür wurden im Vorfeld alle wichtigen Faktoren mit Lebermaterial von Wildtypmäusen optimiert, um das besonders wertvolle Probenmaterial von den PEX19 KO-Mäusen ausschließlich für die Bestimmung, nicht aber für die Optimierung einzusetzen. Zum Besseren Verständnis wird die Vorgehensweise erklärt. Deshalb nehmen die verschiedenen Schritte der Optimierungen einen breiten Raum in Kapitel 4.4.3 ein.

Schließlich wurden aus den PEX19-Mäusen embryonale Fibroblasten isoliert, in Kultur genommen und durch Immunfluoreszenzanalysen untersucht.

#### 4.4.1 Phänotypische Analyse von PEX19 KO-Mäusen

Von 47 Würfen aus Verpaarungen heterozygoter PEX19-Tiere mit C57BL/6JCrI-Hintergrund der Generationen F1, N6 und N7 wurden insgesamt 357 Tiere genotypisch charakterisiert. Der Anteil an Wildtyp-Tieren entsprach 26 %, an heterozygoten Tieren 51 % und an PEX19-Knockout-Tieren (PEX19 KO-Tiere) 23 %. Die Verteilung erfüllte somit die Mendelschen Regeln.

Die PEX19 KO-Tiere zeigten im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern eine Entwicklungsretardierung, was sich in Größe und Gewicht widerspiegelte (s. Abbildung 4.11). So wogen neugeborene (P 0,5) Wildtyp-Tiere und heterozygote Tiere durchschnittlich 1,38 g bzw. 1,33 g, während ihre PEX19 KO-Wurfgeschwister nur ein Durchschnittsgewicht von 1,05 g erreichten. Es fiel auf, dass sich die neugeborenen PEX19 KO-Mäuse wenig bewegten und zu krampfartigen Zuckungen (C-förmiges, komplettes Zusammenziehen des Körpers) neigten. Außerdem konnten Wildtyp-Tiere bereits am ersten Tag auf ihre Pfoten gestellt werden, während die PEX19 KO-Geschwister immer umfielen. Weiterhin enthielt der Magen von PEX19 KO-Tieren wesentlich weniger Milch als der der übrigen Wurfgeschwister (s. Abbildung 4.11).

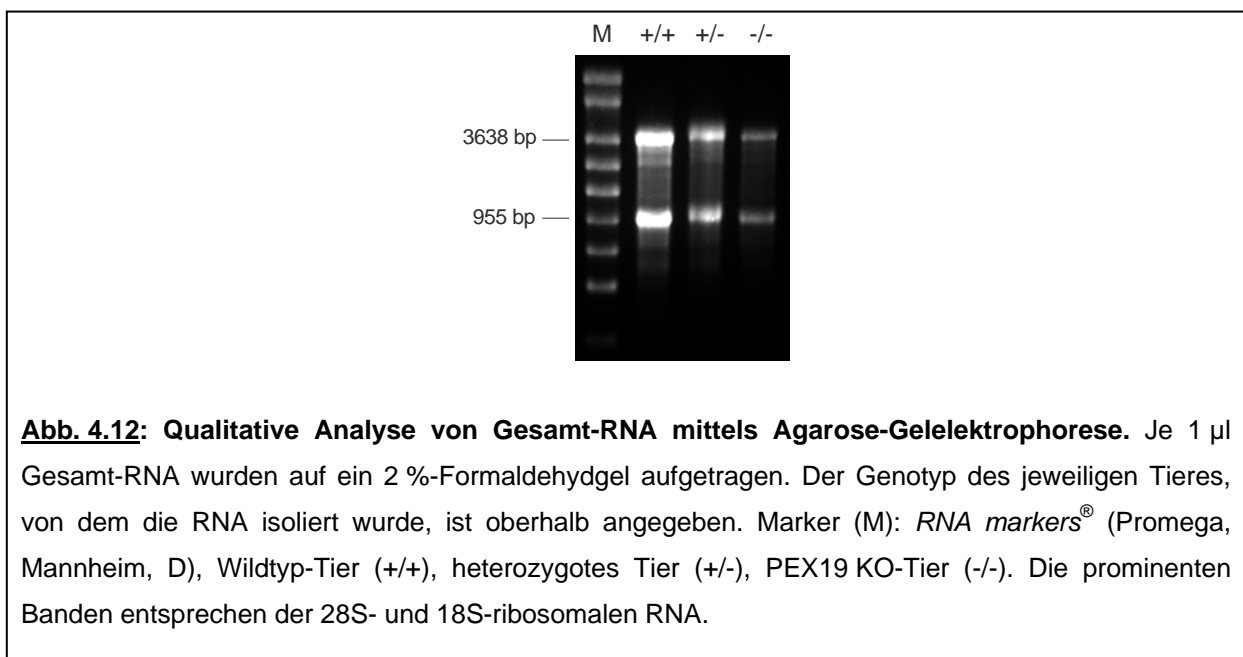


Erste Untersuchungen ergaben bereits, dass die Lebenserwartung der homozygoten PEX19 KO-Tiere im Vergleich zu den Wurfgeschwistern mit heterozygotem oder Wildtyp-Genotyp extrem herabgesetzt war. So starben fast alle PEX19 KO-Tiere innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt. Nur ein einziges Tier erreichte ein Alter von 11 Tagen (s. Abbildung 4.11). In diesem Alter war die retardierte Entwicklung, die generelle muskuläre Hypotonie sowie sehr starke Gangstörungen besonders deutlich zur erkennen.

Somit zeigten die PEX19 KO-Mäuse den gleichen starken Krankheitsphänotyp wie die entsprechenden menschlichen Zellweger-Patienten.

#### 4.4.2 Analyse des Gendefektes auf Transkriptionsebene

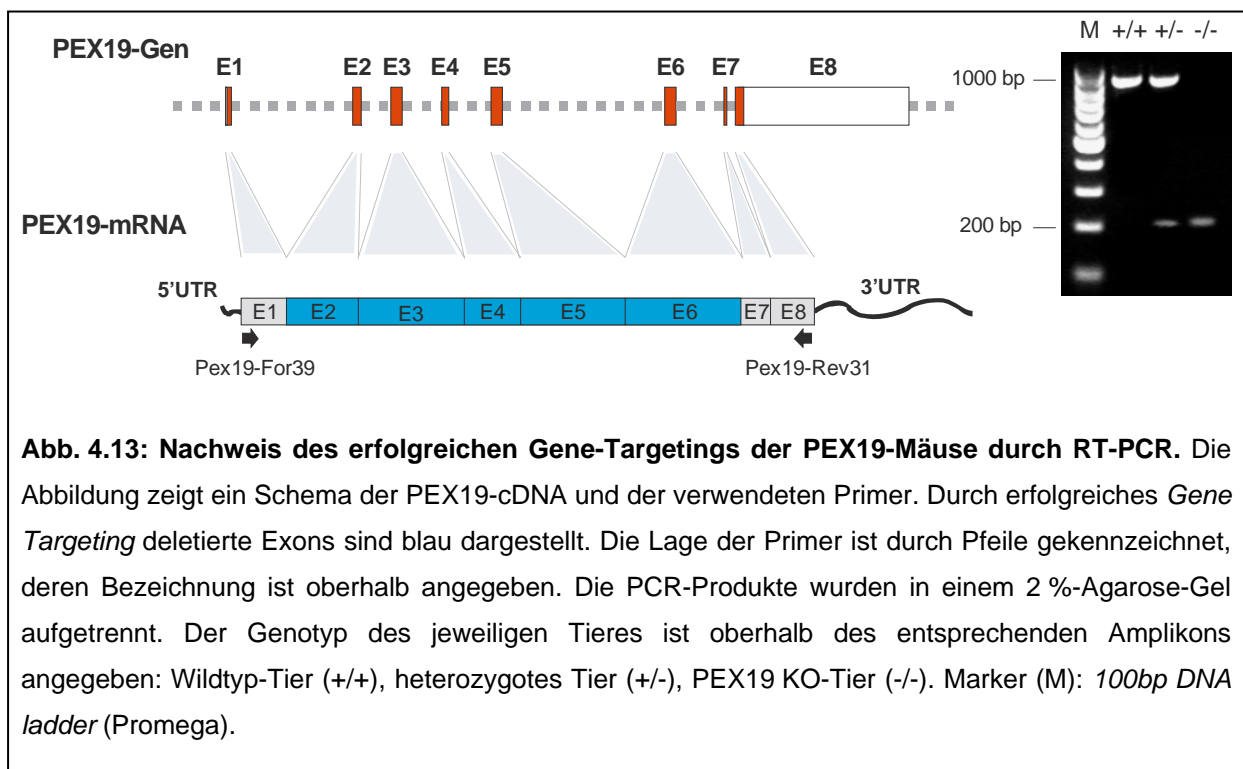
Von neugeborenen Tieren (P 0,5) der Generation N6.1 wurden die Lebern entnommen und die Gesamt-RNA unter Verwendung von *Trizol Reagent*<sup>®</sup> präpariert. Vor einem weiteren Einsatz wurde die Qualität der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. Abbildung 4.12).



Nur RNA-Präparationen, deren 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA deutlich zu erkennen und die kaum degradiert waren, wurden für die cDNA-Synthese und anschließende RT-PCR verwendet. Zusätzlich wies diese RNA bei der photometrischen Messung mindestens einen Reinheitsgrad von 1,8 auf.

Nach Isolierung von Gesamt-RNA und anschließender reverser Transkription der mRNA erfolgte der Nachweis der erfolgreichen Deletion des PEX19-Gen durch RT-PCR mit dem Primerpaar MmPex19-For39/ MmPex-Rev31.

Die Analyse von RNA der Wildtyp-Mäuse ergab nur eine einzelne Bande von ca. 900 bp Länge, die der Größe der translatierten Exonbereiche des PEX19-Gens entspricht. Da die Deletion der Exons 2 bis 6 zu einem verkürzten Amplikon führt, erhielt man bei heterozygoten Mäusen zusätzlich ein weiteres Transkript von 200 bp Länge. Im Fall der PEX19 KO-Mäuse, die kein Wildtyp-Allel mehr besitzen, war nur noch dieses kleinere Fragment nachweisbar. Somit konnte die genomische Modifikation auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden (s. Abbildung 4.13). Offensichtlich sind auch die „*Splice*“-Signale intakt geblieben.



Durch weitere RT-PCR-Analysen wurde überprüft, ob auch andere Gene, die bei der Peroxisomenbiogenese eine Rolle spielen, in ihrer Expression verändert sind. Dafür wurde pro Wurf Leber-RNA von je einem neugeborenen (P 0,5) Tier pro Genotyp in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde die cDNA-Menge so kalkuliert, dass alle RT-PCRs mit derselben cDNA durchgeführt werden konnten. Dies wurde insgesamt mit zwei Würfen durchgeführt. Als Referenz wurde zusätzlich die cDNA für ribosomale 28S-RNA amplifiziert.



Wie Abbildung 4.14 erkennen lässt, beeinflusst die genomische Manipulation des PEX19-Gens die Expression bei der Mehrheit der ausgesuchten Gene nicht. Weder ist die Expressionsrate der Transkripte der beiden Interaktionspartner von PEX19 bei der Membranbiogenese (PEX3, PEX16) verändert, noch zeigen die Transkripte für die beiden Matrixproteine Katalase und Thiolasase oder für den cytosolischen Rezeptor (PEX5) Unterschiede beim Vergleich der unterschiedlichen Genotypen.

Das Fehlen eines Amplikons für das PEX19-Transkript bei PEX19 KO-Tieren resultiert aus der Lage der verwendeten Primer. Der Reverse-Primer wurde so gewählt, dass er innerhalb von Exon 6 liegt, das bei KO-Tieren deletiert ist.

Lediglich die Transkription von PEX14, ABCD2 und SOD1 ist beim PEX19 KO-Tier im Vergleich zu den anderen Wurfgeschwistern erhöht, für ABCD1 dagegen verringert. Eine Ausnahme scheint bei PPAR $\gamma$  vorzuliegen. Dort ist beim heterozygoten Tier die Expression erhöht.

Die nachfolgende Analyse auf Proteinebene sollte letztendlich den Nachweis liefern, wie sich die genetische Modifikation auf DNA-Ebene auf das Vorkommen und die Verteilung verschiedener Markerproteine auswirkt.

Gen	Primer	RT-PCR			Funktion
		+/+	+/-	-/-	
PEX3	MmPex3-722F MmPex3-1090R				Membran- biogenese
PEX16	MmPex16-304F MmPex16-675R				
PEX19	MmPex19-445F MmPex19-831R				
PEX5	MmPex5-1477F MmPex5-1558R				Peroxine für Matrix- proteinimport
PEX14	MmPex14-For3 MmPex14-Rev3				
Katalase	MmKatalase-345F MmKatalase-716R				Matrix- proteine
Thiolase	$\alpha$ -Thiolase-556F $\alpha$ -Thiolase-936R				
ABCD1	ALDP-For2 ALDP-Rev2				ABC-Transporter
ABCD2	ABCD2-For3 ABCD2-Rev3				
ABCD3	MmPMP70-879F MmPMP70-1256R				
ABCD4	ABCD4-For3 ABCD4-Rev3				
PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$ -For2 PPAR $\alpha$ -Rev2				Transkriptions- faktoren
PPAR $\beta$	PPAR $\beta$ -For1 PPAR $\beta$ -Rev1				
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ -For2 PPAR $\gamma$ -Rev2				
SOD1	SOD1-For2 SOD1-Rev2				Abbau reaktiver Sauerstoffspezies
SOD2	SOD2-For2 SOD2-Rev2				
SOD3	SOD3-For1 SOD3-Rev1				
28S RNA	rRNA-For1 rRNA-Rev1				Referenz

**Abb. 4.14: RT-PCR Analyse der RNAs der genotypisch unterschiedlichen PEX19-Mäuse.** Die Abbildung zeigt jeweils einen Ausschnitt eines Agarosegels der unterschiedlichen RT-PCR Reaktionen auf Leber-RNA für neugeborene (P 0,5) Wildtyp- (+/+), heterozygote (+/-) und PEX19 KO-Mäuse (-/-). Die unterschiedlichen Transkripte sind anhand ihrer Funktion (rechte Spalte) in verschiedenen Gruppen zusammengefasst. Die für die RT-PCR Reaktion verwendeten Primer sind in der linken Spalte angegeben. Die Originalfotos der Agarosegele sind im Laborbuch abgelegt. Die Bandengrößen sind mit Größenmarkern verglichen worden und entsprachen der erwarteten Größe.

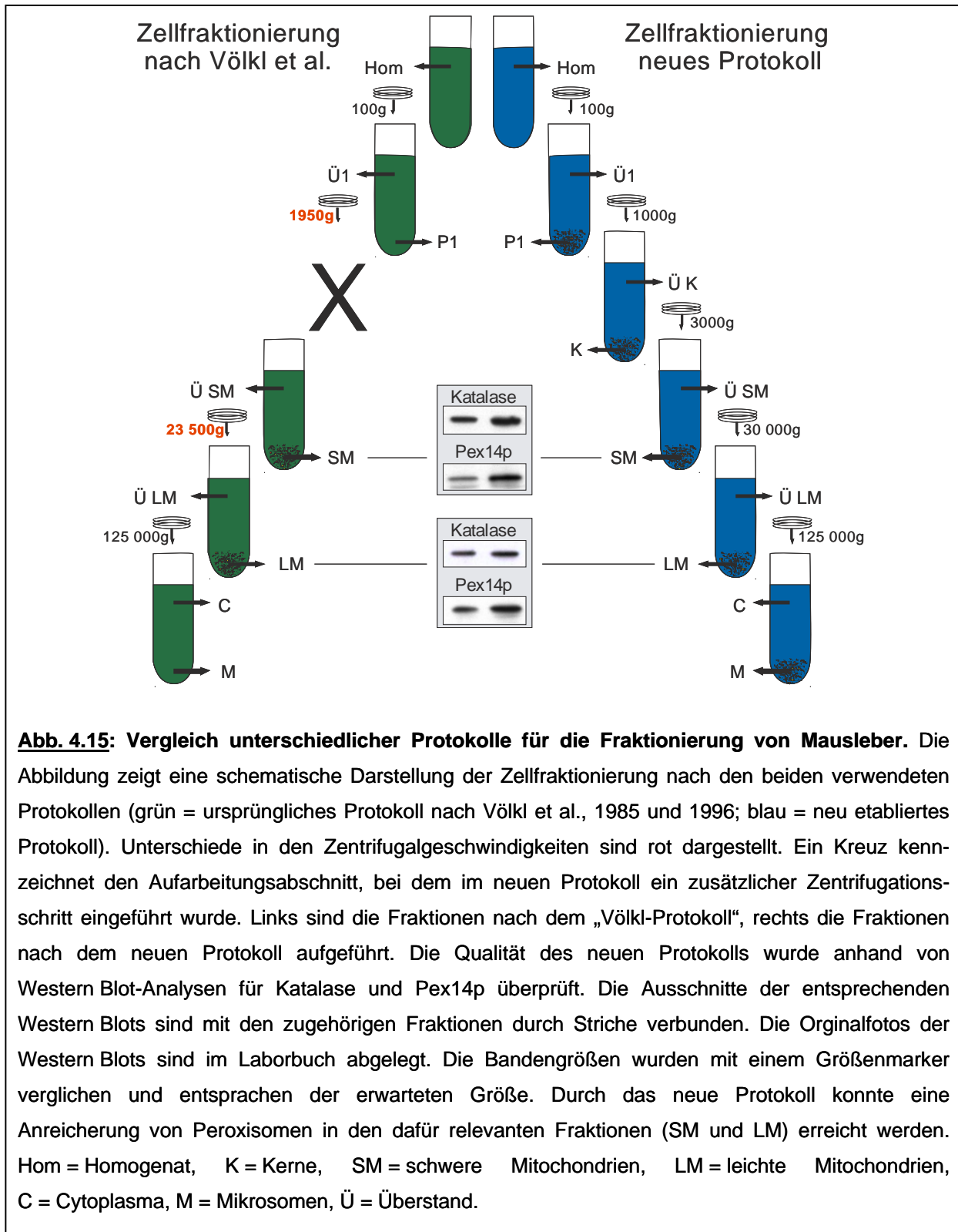
#### 4.4.3 Analyse des Gendefektes auf Proteinebene

Da die Methode der differentiellen Zellfraktionierung in Anlehnung an Völkl et al. (Völkl et al., 1985 und 1996) auf der Aufarbeitung von Lebern adulter Ratten basiert, musste die Methode modifiziert und ein neues Protokoll zur Auftrennung der Organellen aus der Leber neugeborener Mäuse (P 0,5) etabliert werden.

Es gelang zunächst, die Aufarbeitung mit Lebern adulter Mäuse an Stelle von Ratten nach Originalprotokoll nachzuvollziehen. Anschließend wurden die Zentrifugationsbedingungen so modifiziert, dass auch unter Einsatz geringerer Ausgangsmengen die gewünschte Auftrennung zu beobachten war. Anhand von Western Blot-Analysen mit Markerproteinen zur Charakterisierung der unterschiedlichen Fraktionen wurde ermittelt, welche Änderungen der ursprünglichen Protokolle erfolgen mussten.

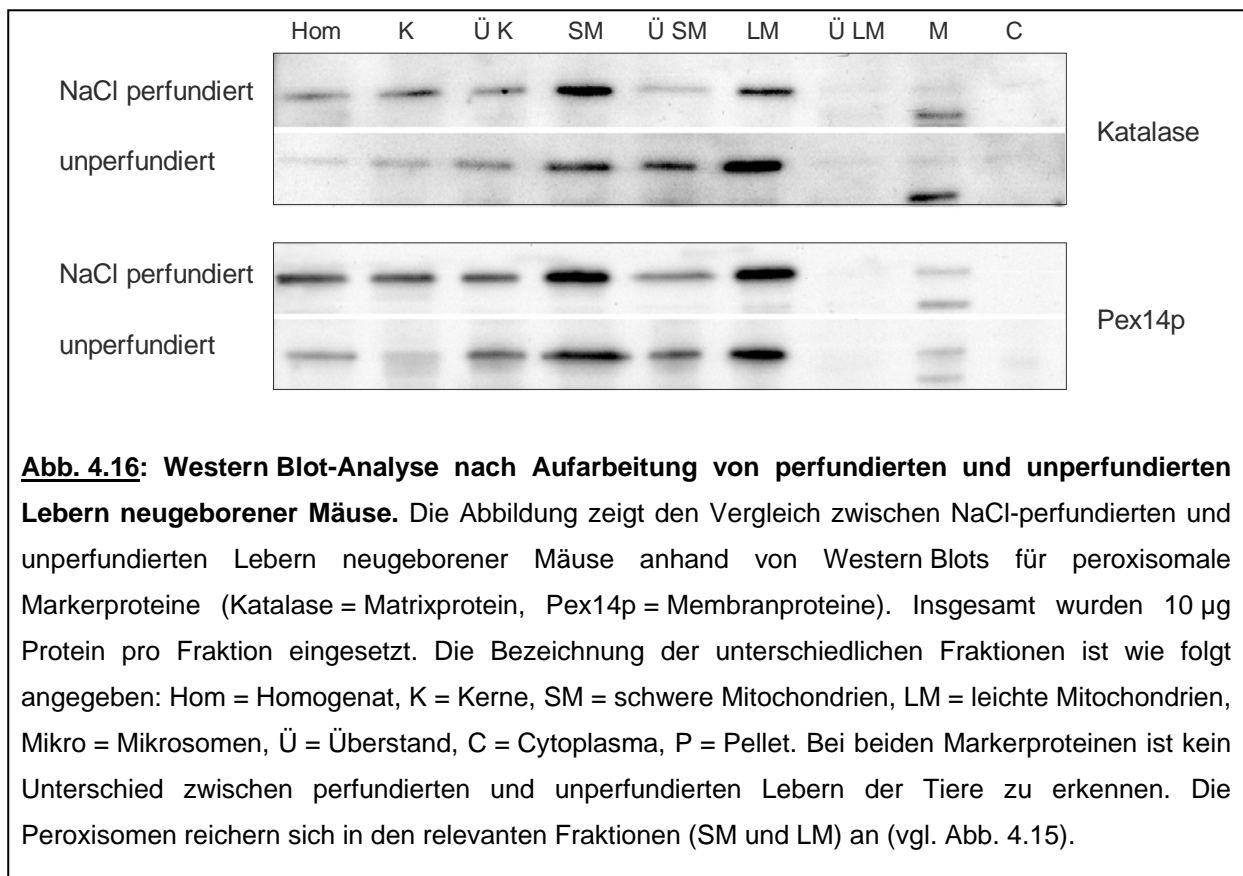
Abbildung 4.15 zeigt das letztendlich etablierte Protokoll im Vergleich. Western Blots mit Antikörpern gegen die peroxisomalen Proteine Katalase und Pex14p zeigten, dass für Mäuse im Vergleich zur ursprünglichen Vorschrift von Prof. Alfred Völkl (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) eine deutlich größere Anreicherung an Peroxisomen in den dafür relevanten Fraktionen (SM = schwere Mitochondrien, LM = leichte Mitochondrien) erzielt wurde. Offenbar war es zum einen von Bedeutung, einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt einzuführen, um die Zellkerne abzuzentrifugieren. Zum anderen führte die Erhöhung der Zentrifugalgeschwindigkeit für die Sedimentation der schweren und leichten Mitochondrienfraktion zu einer Anreicherung der Peroxisomen.

Aufgrund der eingeschränkten Lebenserwartung von PEX19 KO-Mäusen konnten keine Lebern von erwachsenen, sondern nur von neugeborenen (P 0,5) Tieren verwendet werden. Daher wurde im Anschluss überprüft, ob das für adulte Mäuse erarbeitete Protokoll auch zur Verarbeitung von Lebern neonataler Mäuse angewendet werden kann. Zusätzlich wurde untersucht, ob bei den neugeborenen Mäusen auf eine Perfusion verzichtet werden kann. Diese wird üblicherweise bei adulten Tieren eingesetzt, um die Blutzellen aus dem Lebergewebe zu spülen. Dadurch soll verhindert werden, dass der Katalasegehalt der Erythrozyten die Ergebnisse verfälscht.



**Abb. 4.15: Vergleich unterschiedlicher Protokolle für die Fraktionierung von Mausleber.** Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Zellfraktionierung nach den beiden verwendeten Protokollen (grün = ursprüngliches Protokoll nach Völkl et al., 1985 und 1996; blau = neu etabliertes Protokoll). Unterschiede in den Zentrifugalgeschwindigkeiten sind rot dargestellt. Ein Kreuz kennzeichnet den Aufarbeitungsabschnitt, bei dem im neuen Protokoll ein zusätzlicher Zentrifugations-schritt eingeführt wurde. Links sind die Fraktionen nach dem „Völkl-Protokoll“, rechts die Fraktionen nach dem neuen Protokoll aufgeführt. Die Qualität des neuen Protokolls wurde anhand von Western Blot-Analysen für Katalase und Pex14p überprüft. Die Ausschnitte der entsprechenden Western Blots sind mit den zugehörigen Fraktionen durch Striche verbunden. Die Originalfotos der Western Blots sind im Laborbuch abgelegt. Die Bandengrößen wurden mit einem Größenmarker verglichen und entsprachen der erwarteten Größe. Durch das neue Protokoll konnte eine Anreicherung von Peroxisomen in den dafür relevanten Fraktionen (SM und LM) erreicht werden. Hom = Homogenat, K = Kerne, SM = schwere Mitochondrien, LM = leichte Mitochondrien, C = Cytoplasma, M = Mikrosomen, Ü = Überstand.

Für die Vorversuche wurden Lebern neonataler Wildtyp-Mäuse „gepoolt“, so dass insgesamt 1 g Leber pro Aufarbeitung eingesetzt werden konnte. Diese Menge entspricht ungefähr dem Lebergewicht einer adulten Maus. Beim Vergleich peroxisomaler Marker für Matrix- (Katalase) und Membranproteine (PEX14p) lieferte die Western Blot-Analyse keinen nennenswerten Unterschied zwischen perfundierten und unperfundierten Lebern der Tiere (s. Abbildung 4.16). Es zeigte sich außerdem, dass es in Bezug auf die Zentrifugationsgeschwindigkeiten keinen wesentlichen Unterschied ergab, ob Lebern neugeborener (P 0,5) oder adulter Mäuse aufgearbeitet wurden. Eine Anreicherung der Peroxisomen über die nacheinander folgenden Fraktionen war deutlich zu erkennen.



**Abb. 4.16: Western Blot-Analyse nach Aufarbeitung von perfundierten und unperfundierten Lebern neugeborener Mäuse.** Die Abbildung zeigt den Vergleich zwischen NaCl-perfundierten und unperfundierten Lebern neugeborener Mäuse anhand von Western Blots für peroxisomale Markerproteine (Katalase = Matrixprotein, Pex14p = Membranproteine). Insgesamt wurden 10 µg Protein pro Fraktion eingesetzt. Die Bezeichnung der unterschiedlichen Fraktionen ist wie folgt angegeben: Hom = Homogenat, K = Kerne, SM = schwere Mitochondrien, LM = leichte Mitochondrien, Mikro = Mikrosomen, Ü = Überstand, C = Cytoplasma, P = Pellet. Bei beiden Markerproteinen ist kein Unterschied zwischen perfundierten und unperfundierten Lebern der Tiere zu erkennen. Die Peroxisomen reichern sich in den relevanten Fraktionen (SM und LM) an (vgl. Abb. 4.15).

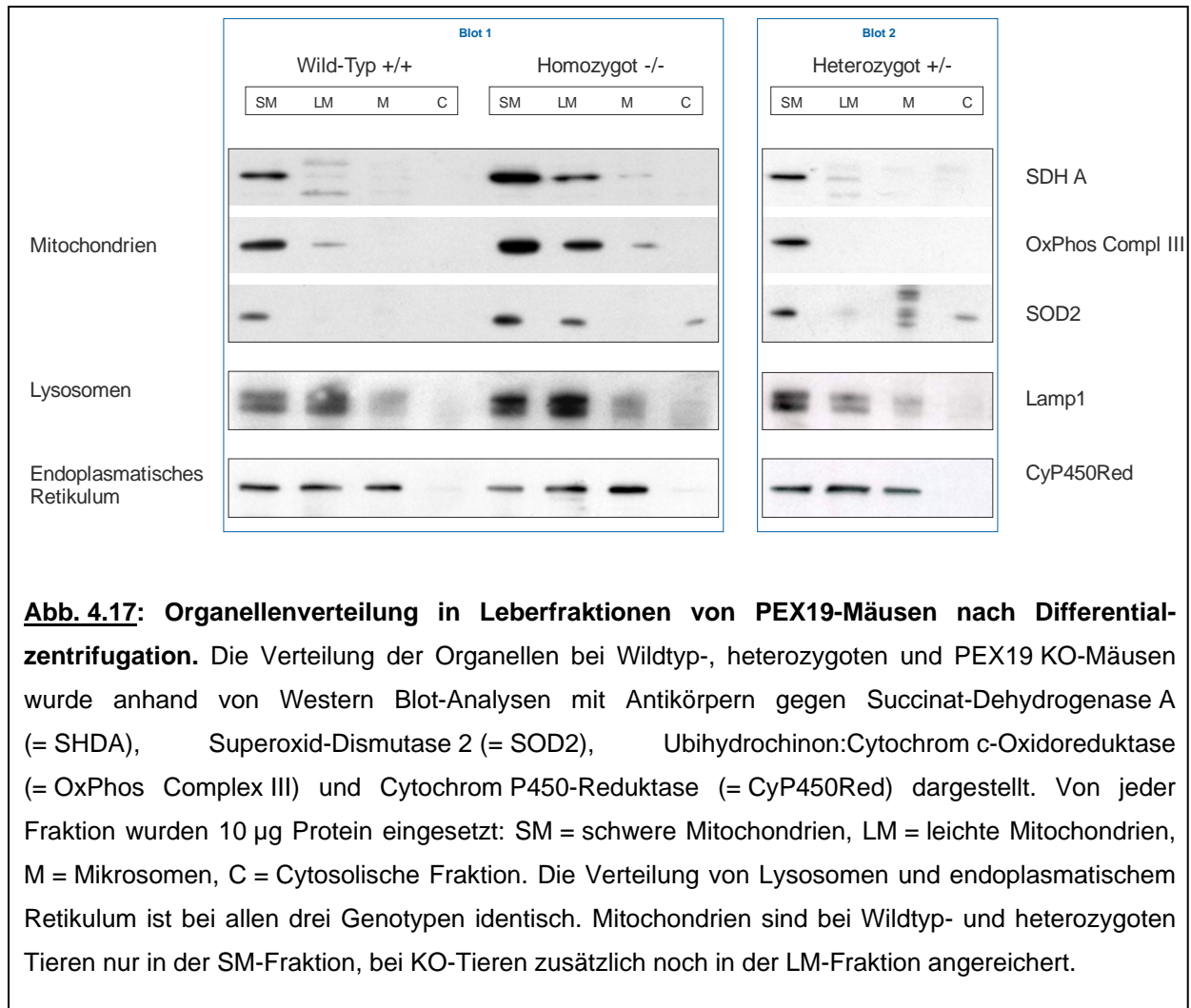
Zusätzlich zur geringen Lebenserwartung stellte die geringe Menge an Leber-Gewebe eines neugeborenen (P 0,5) Tieres ein Problem dar. Besonders bei PEX19 KO-Mäusen ist durch die Wachstumsretardierung das Lebergewicht deutlich geringer als bei Wildtyp- oder heterozygoten Mäusen. So beträgt das durchschnittliche Lebergewicht (MW ± SD) von KO-Tieren  $0,036 \pm 0,010$  g (13 Tiere) im Gegensatz zu  $0,054 \pm 0,009$  g (9 Tiere) bei Wildtyp- und  $0,041 \pm 0,017$  g (17 Tiere) bei heterozygoten Mäusen. Da bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von sieben Tieren erfahrungsgemäß mit höchstens zwei homozygoten Tieren zu rechnen war, war es wichtig, die Mindestmenge an Gewebe zu bestimmen, die zum einen eine ordnungsgemäße Durchführung der Methode gewährleistete und zum anderen noch

ausreichend Protein in den verschiedenen Fraktionen lieferte. Durch sukzessives Verringern der eingesetzten Lebermenge wurde ermittelt, dass eine Minimalmenge von ca. 0,1 g (entspricht ca. 3 Lebern neonataler Mäuse) für eine erfolgreiche Zellfraktionierung und Isolierung notwendig war.

Die Aufarbeitung von Lebern der PEX19-Mäusen verschiedener Genotypen wurde nach dem neu entwickelten Protokoll durchgeführt. Die unterschiedlichen Fraktionen von Wildtyp- und KO-Tieren wurden stets identisch behandelt und parallel auf demselben Blot aufgetragen, inkubiert und visualisiert. Diese Gleichbehandlung erlaubte es, Veränderung einzelner Proteine zwischen diesen beiden Genotypen nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu beurteilen. Wünschenswert wäre auch der qualitative Vergleich mit den Proben der heterozygoten Tiere gewesen. Dieser konnte jedoch nicht realisiert werden, da aufgrund der geringen Probenmengen von Wildtyp- bzw. KO-Tieren diese nicht auch noch zusätzlich mit Proben der heterozygoten Tiere „geblottet“ werden konnten. Daher kann im Folgenden bei heterozygoten Tieren nur eine Aussage über die qualitative, nicht aber über die quantitative Veränderung getroffen werden.

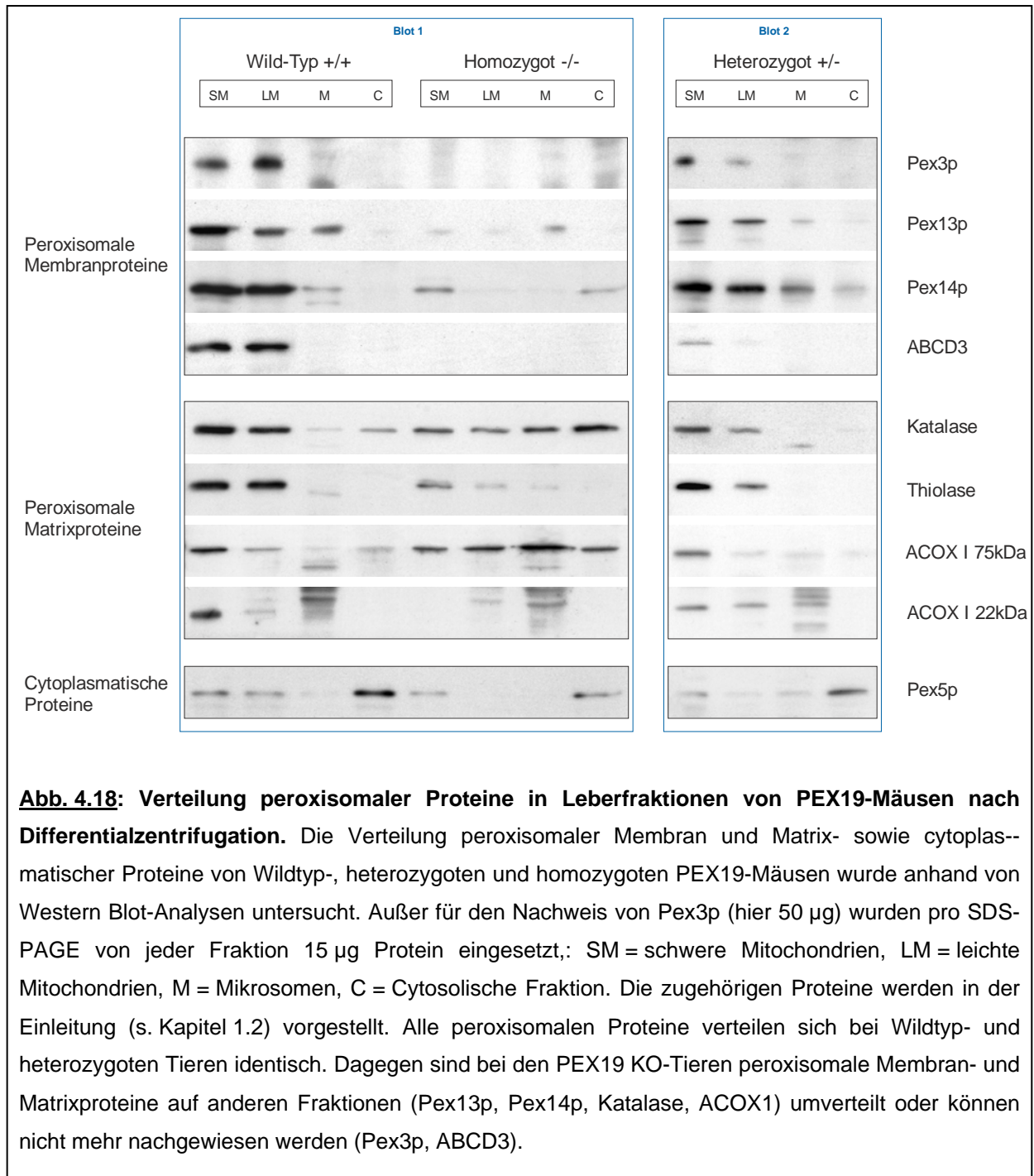
Die unterschiedlichen Fraktionen der Pex19-Mäuse wurden mit Markerproteinen für Mitochondrien (Komplex II der Atmungskette = SDHA, Superoxid-Dismutase 2 = SOD2, Komplex III der Atmungskette = OxPhos Complex III), aber auch für endoplasmatisches Retikulum (Cytochrom P450-Reduktase = CyP450Red) und Lysosomen (Lysosomen assoziiertes Membranprotein = Lamp1) charakterisiert.

Wie in Abbildung 4.17 gezeigt, verteilen sich Lysosomen und endoplasmatisches Retikulum bei den drei Genotypen identisch. Lysosomen sammeln sich in der schweren und leichten Mitochondrienfraktion, ein geringer Teil auch in der Mikrosomenfraktion an. Anteile des endoplasmatischen Retikulums sedimentierten in allen drei genannten Fraktionen. Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren war jedoch bei KO-Tieren der Anteil an Lysosomen in der leichten und von endoplasmatischem Retikulum in der Mikrosomenfraktion erhöht.



Im Gegensatz dazu reicherten sich Mitochondrien bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren eindeutig nur in der schweren, bei homozygoten KO-Tieren zusätzlich auch in der leichten Mitochondrienfraktion an. Dieser deutliche Unterschied wurde mit allen drei Antikörpern gegen mitochondriale Enzyme nachgewiesen und festigt daher diese Aussage. Zusätzlich konnte das Enzym SOD2 auch im Überstand von heterozygoten und KO-Tieren nachgewiesen werden. Insgesamt waren alle untersuchten mitochondrialen Proteine in den KO-Tieren gegenüber denen in den Wildtyp-Tieren stärker nachweisbar.

Wie Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen peroxisomale Membran- und Matrixproteine zeigten (vgl. Abbildung 4.18), reicherten sich Peroxisomen bei Wildtyp- und heterozygoten Tieren hauptsächlich in der schweren und leichten Mitochondrienfraktion an. Die Matrixenzyme Katalase und ACOX I (= Acyl-CoA-Oxidase I; 75kDa-Bande) waren in Wildtyp-Tieren in geringen Mengen auch in der cytosolischen Fraktion nachweisbar. Das cytoplasmatische Protein Pex5p war eindeutig in der cytosolischen Fraktion, in geringeren Mengen aber auch in den Fraktionen mit angereicherten Peroxisomen vorhanden.



Bei homozygoten KO-Tieren konnte eine Mislokalisierung peroxisomaler Proteine durch Umverteilung in den Hauptfraktionen gezeigt werden. So waren Membranproteine entweder nicht mehr nachweisbar (Pex3p, ABCD3) oder konnten anderen Fraktionen zugeordnet (Pex13p, Pex14p) werden. Besonders auffallend bei PEX19 KO-Tieren war, dass sowohl die Menge an Pex14p als auch an Pex13p im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren deutlich reduziert erschienen.



Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren befand sich Pex14p bei den KO-Mäusen in geringen Mengen auch in der cytosolischen Fraktion, wenn gleich deutlich mehr in der Fraktion der schweren Mitochondrien sedimentierte. Pex13p war dagegen hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion, geringfügig auch noch in der schweren und leichten Mitochondrienfraktion nachweisbar, während dieses Protein in Wildtyp-Tieren fast ausschließlich genau in diesen Fraktionen vorkommt.

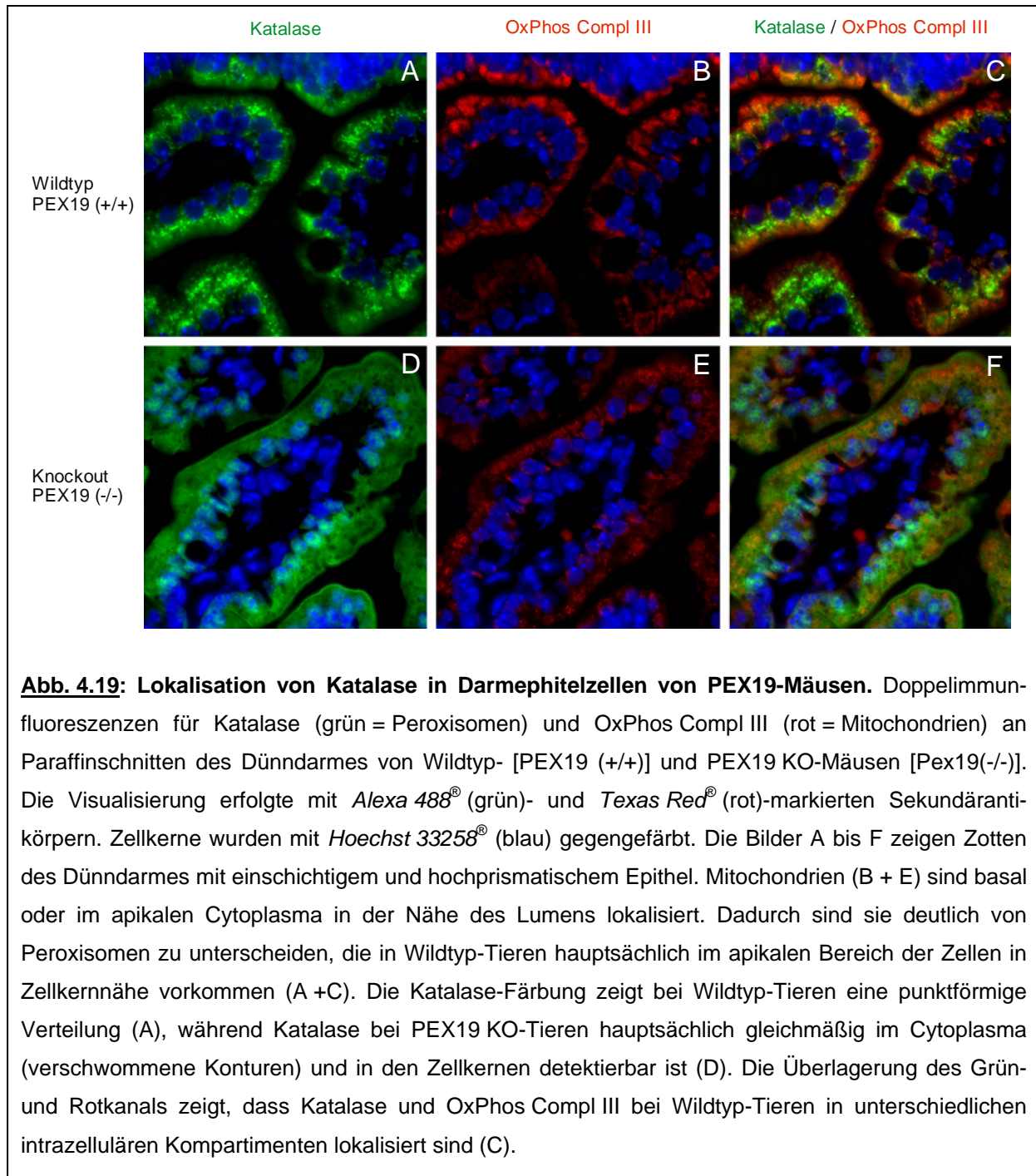
Die Matrixenzyme Katalase und ACOX I 75kDa waren bei den KO-Tieren wie erwartet in großer Menge in der cytosolischen Fraktion nachweisbar. Weiterhin fehlt die ACOX I 22kDa-Bande bei KO-Tieren. Auch Thiolase konnte nicht in der cytosolischen Fraktion nachgewiesen werden, dafür aber hauptsächlich in der schweren und auch in der leichten mitochondrialen Fraktion. Bei KO-Tieren war der cytoplasmatische Rezeptor Pex5p im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in geringerer Menge in der cytosolischen Fraktion und in noch geringerer Menge auch in der schweren, nicht aber in der leichten Mitochondrienfraktion oder der Mikrosomenfraktion nachzuweisen.

Die für homozygote PEX19 KO-Tiere aufgeführten Ergebnisse zu peroxisomalen Membran- und Matrixproteinen lassen eindeutig den Schluss zu, dass keine funktionsfähigen Peroxisomen mehr gebildet werden.

### 4.4.4 Nachweis der Peroxisomendefizienz

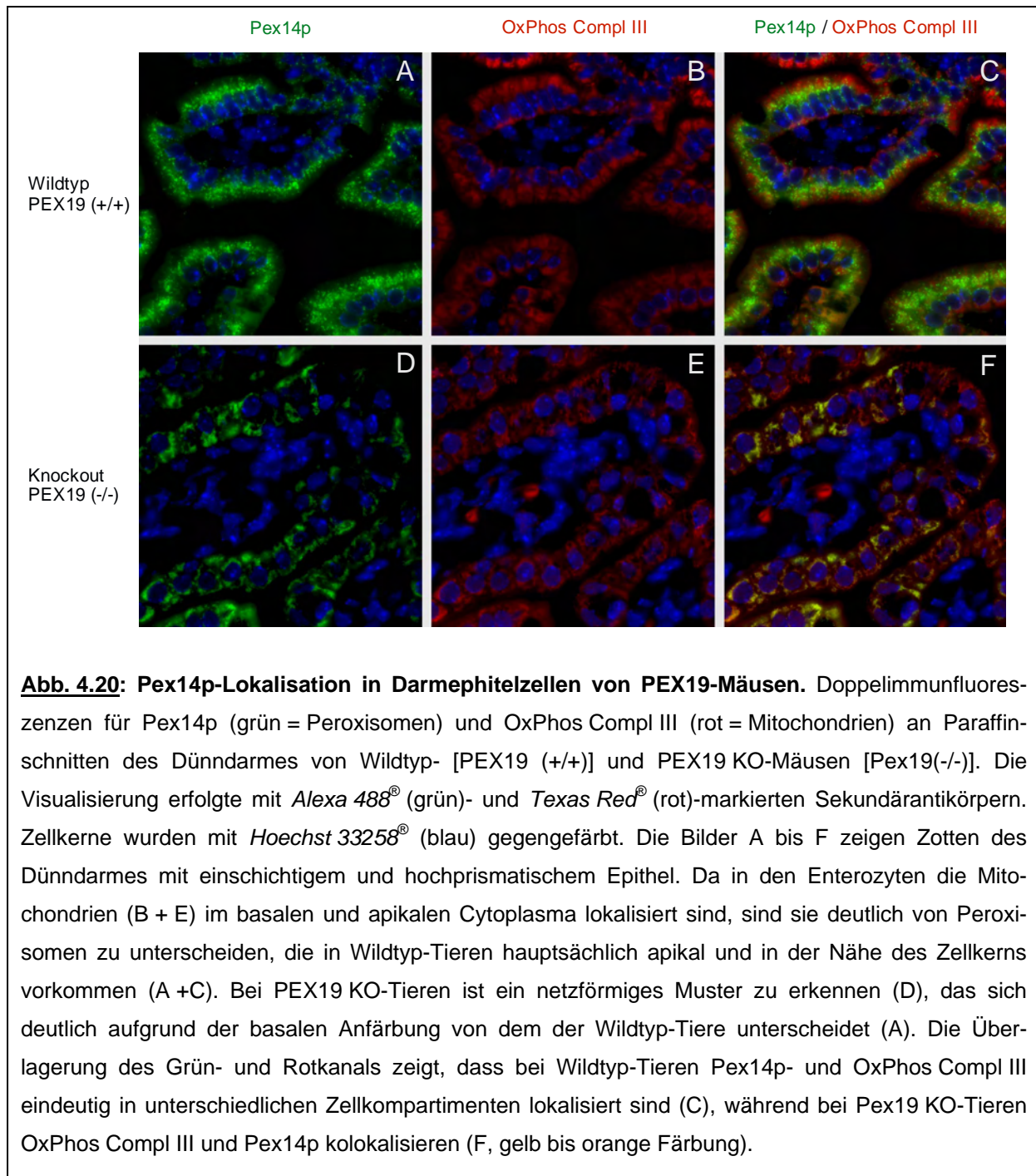
Die Verteilung von Katalase (s. Abbildung 4.19) und Pex14p (s. Abbildung 4.20) wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten von Wildtyp- und homozygoten KO-Tieren untersucht. Um die subzelluläre Verteilung der Mitochondrien im Vergleich zu zeigen, wurden die Schnitte für eine Doppelmarkierung zusätzlich noch mit einem mitochondrialen Antikörper (OxPhos Compl III = Ubihydrochinon:Cytochrom c-Oxidoreduktase) inkubiert.

Wie in den Abbildungen 4.19 und 4.20 zu sehen ist, zeigten Katalase- und Pex14p-Färbungen von Wildtyp-Tieren eine punktförmige Verteilung, wie sie für Peroxisomen typisch ist. In Doppelimmunfluoreszenzen waren Mitochondrien bei beiden Färbungen eindeutig als separate Organellen zu erkennen. Bei PEX19-defizienten Tieren zeigte Katalase dagegen sowohl eine gleichmäßige cytoplasmatische als auch eine nukleäre Lokalisation, während Pex14p noch immer in Form punkt- bzw. netzförmiger Strukturen zu erkennen war.

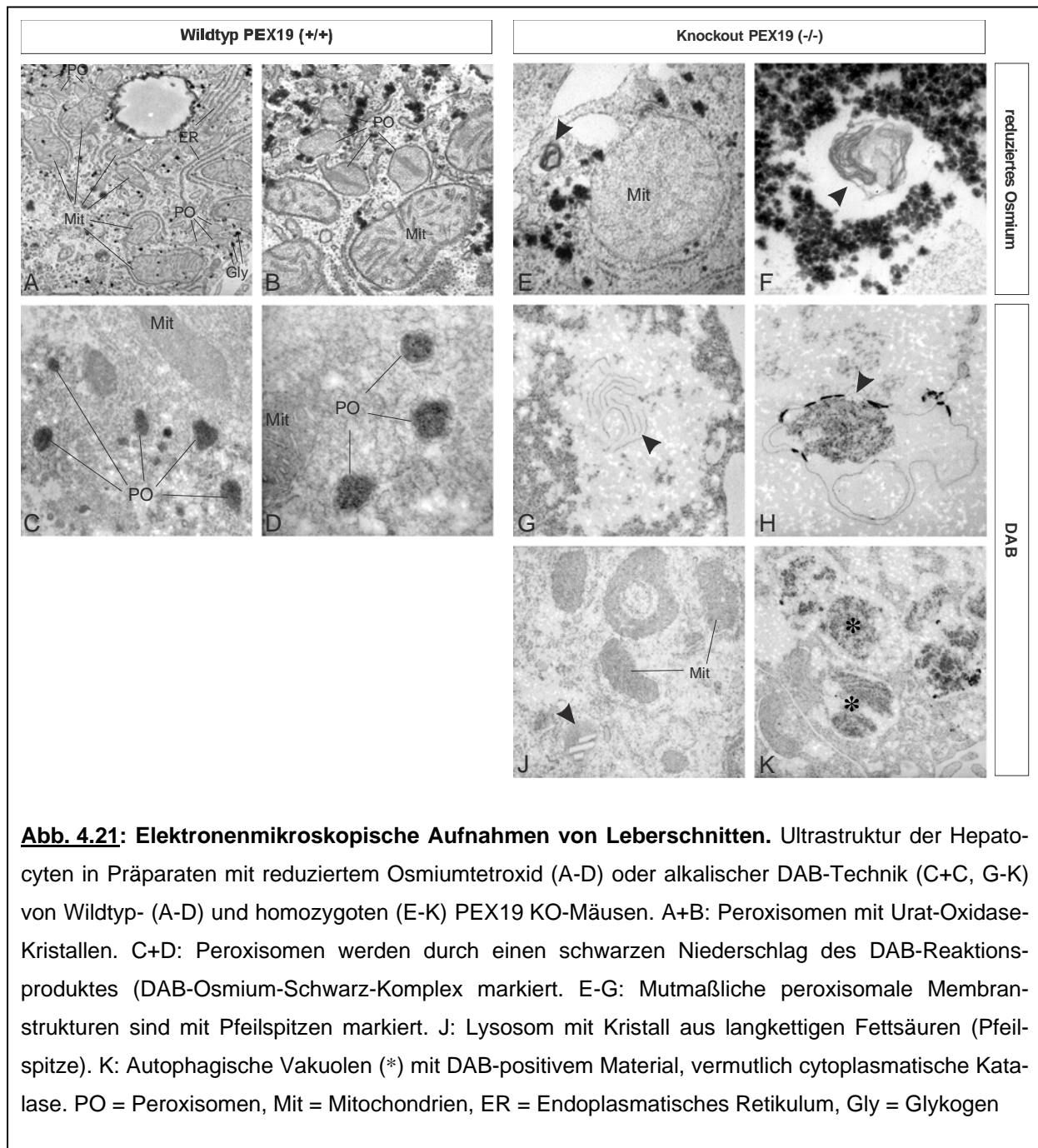


**Abb. 4.19: Lokalisation von Katalase in Darmepithelzellen von PEX19-Mäusen.** Doppelimmunfluoreszenzen für Katalase (grün = Peroxisomen) und OxPhos Compl III (rot = Mitochondrien) an Paraffinschnitten des Dünndarmes von Wildtyp- [PEX19 (+/+)] und PEX19 KO-Mäusen [Pex19(-/-)]. Die Visualisierung erfolgte mit *Alexa 488*<sup>®</sup> (grün)- und *Texas Red*<sup>®</sup> (rot)-markierten Sekundärantikörpern. Zellkerne wurden mit *Hoechst 33258*<sup>®</sup> (blau) gegengefärbt. Die Bilder A bis F zeigen Zotten des Dünndarmes mit einschichtigem und hochprismatischem Epithel. Mitochondrien (B + E) sind basal oder im apikalen Cytoplasma in der Nähe des Lumens lokalisiert. Dadurch sind sie deutlich von Peroxisomen zu unterscheiden, die in Wildtyp-Tieren hauptsächlich im apikalen Bereich der Zellen in Zellkernnähe vorkommen (A +C). Die Katalase-Färbung zeigt bei Wildtyp-Tieren eine punktförmige Verteilung (A), während Katalase bei PEX19 KO-Tieren hauptsächlich gleichmäßig im Cytoplasma (verschwommene Konturen) und in den Zellkernen detektierbar ist (D). Die Überlagerung des Grün- und Rotkanals zeigt, dass Katalase und OxPhos Compl III bei Wildtyp-Tieren in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind (C).

Dieses Muster unterschied sich jedoch von dem normalen Peroxisomenmuster der Wildtyp-Tiere. In Doppelimmunfluoreszenzen für Pex14p und OxPhos Compl III konnte belegt werden, dass Pex14p in KO-Tieren mit Mitochondrien kolokalisiert war. Auch anhand der morphologischen Untersuchungen konnte somit nachgewiesen werden, dass bei Pex19-defizienten Mäusen sowohl der Import von Membran- als auch von Matrixproteinen gestört ist.



Zum Nachweis der Peroxisomen-Defizienz wurden Ultradünnschnitte von Lebern neugeborener Wildtyp- und PEX19 KO-Mäuse elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Präparate waren einerseits mit reduziertem Osmium zur optimalen Darstellung von Membranen behandelt und wurden zum anderen mit Hilfe der alkalischen DAB-Methode und wässrigem Osmium zum selektiven Nachweis der Katalaseaktivität inkubiert.



**Abb. 4.21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Leberschnitten.** Ultrastruktur der Hepatocyten in Präparaten mit reduziertem Osmiumtetroxid (A-D) oder alkalischer DAB-Technik (C+D, G-K) von Wildtyp- (A-D) und homozygoten (E-K) PEX19 KO-Mäusen. A+B: Peroxisomen mit Urat-Oxidase-Kristallen. C+D: Peroxisomen werden durch einen schwarzen Niederschlag des DAB-Reaktionsproduktes (DAB-Osmium-Schwarz-Komplex) markiert. E-G: Mutmaßliche peroxisomale Membranstrukturen sind mit Pfeilspitzen markiert. J: Lysosom mit Kristall aus langkettigen Fettsäuren (Pfeilspitze). K: Autophagische Vakuolen (\*) mit DAB-positivem Material, vermutlich cytoplasmatische Katalase. PO = Peroxisomen, Mit = Mitochondrien, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Gly = Glykogen

In Wildtyp-Tieren konnten mit beiden Methoden intakte Peroxisomen in der Nähe von Glykogenfeldern (s. Abbildung 4.21 A-D) nachgewiesen werden, während dort in den Hepatocyten der PEX19-Knockout-Mäuse knäuelartige Lipid-Membranstrukturen gefunden wurden (s. Abbildung 4.21 E-H). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass DAB-reaktives Material, bei dem es sich wahrscheinlich um Katalase handelt, zum Teil an diese Membranstrukturen von außen angelagert war (s. Abbildung 4.21 H) oder in autophagischen Vakuolen abgebaut wurde (s. Abbildung 4.21 K). Des Weiteren wurden Kristalle sehr langkettiger Fettsäuren in Lysosomen gefunden (s. Abbildung 4.21 J). Mitochondrien wiesen meist eine normale Morphologie in PEX19-Knockout-Tieren auf

(s. Abbildung 4.21 J). Veränderungen von Cristae wurden nur vereinzelt gefunden (ohne Abbildung).

#### 4.4.5 Biochemische Analyse der Peroxisomenfunktion bei PEX19-Mäusen

Nach erfolgreichem Nachweis einer fehlerhaften Peroxisomenbiogenese in PEX19-defizienten Mäusen wurde nun untersucht, ob daraus messbare Änderungen der charakteristischen Metaboliten resultierten.

Wie in Tabelle 4.2 dargestellt, zeigte die Stoffwechselanalyse der Leitmetaboliten für Zellweger Syndrom bei PEX19-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp- und heterozygoten Tieren eine signifikante Reduktion von Plasmalogenen in allen Geweben. Gleichzeitig war eine Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren (> C:22) nachweisbar, bei denen sich in Abhängigkeit von der Kettenlänge der jeweiligen Fettsäure Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben ergaben. Während der C:26-Fettsäuregehalt in allen Geweben signifikant erhöht war, konnten für C:24-Fettsäuren eine signifikante Erhöhung nur für Lebergewebe nachgewiesen werden. Die Werte für C:22-Fettsäuren zeigten weder Unterschiede zwischen den Geweben noch zwischen den unterschiedlichen Genotypen. Die PEX19-Mutante wies keine Anreicherung für Phytansäure auf. Von Pristansäure, dem Abbauprodukt der Phytansäure nach  $\alpha$ -Oxidation wurden in der Leber signifikant mehr bei den Mutanten als bei Wildtyp- oder heterozygoten Tieren gemessen. Auch Palmitinsäure und Stearinsäure waren in allen Geweben der PEX19-Knockout-Mäuse gegenüber den beiden anderen Genotypen signifikant erhöht.

Die Ergebnisse der Lipidanalyse für die Vertreter der Omega-Fettsäuren ( $\omega$ -9,  $\omega$ -6 und  $\omega$ -3) brachte komplexe Veränderungen fast jeder Lipidklasse. Nur Nervensäure war in jedem der untersuchten Gewebe unverändert. Dagegen waren Ölsäure und Eicosapentaensäure in allen Geweben signifikant erniedrigt. In vier Fällen zeigten die untersuchten Fettsäuren in unterschiedlichen Geweben signifikante Veränderungen zwischen Wildtyp- und KO-Tieren, jedoch nicht zwischen heterozygoten und KO-Tieren (Erucasäure-Gehirn / Linolsäure-Leber /  $\gamma$ -Linolensäure-Gehirn / Arachidonsäure-Leber; vgl. Kapitel 7.2). Dagegen waren bei Linolsäure (Gehirn),  $\gamma$ -Linolensäure (Gehirn) und Arachidonsäure (Leber) die Werte signifikant verschieden für heterozygote und KO-Tiere, aber nicht signifikant für Wildtyp- und KO-Tiere (vgl. Kapitel 7.2). Die übrigen Vertreter dieser Fettsäuregruppen unterschieden sich je nach untersuchtem Gewebe in der Art der Veränderung. So war z.B. der Gehalt an Docosahexaensäure im Gehirn vermindert, in Leber und Vollblut hingegen erhöht.

**Tab. 4.2: Biochemische Charakterisierung peroxisomaler Dysfunktion des Fettstoffwechsels verschiedenen Geweben von PEX19-Mäusen.**

	Gehirn			Leber			Vollblut		
	Wildtyp	Heterozygot	Knockout	Wildtyp	Heterozygot	Knockout	Wildtyp	Heterozygot	Knockout
<b>ungesättigte Fettsäuren</b>									
C16:0 Palmitinsäure [Gew. %]	30,954 ± 1,425	31,254 ± 1,021	35,854 ± 0,804 *	21,194 ± 0,415	21,044 ± 0,602	23,260 ± 0,742 *	25,522 ± 3,641	26,094 ± 0,798	29,932 ± 0,988 *
C18:0 Stearinsäure [Gew. %]	15,640 ± 0,687	16,484 ± 0,367	17,406 ± 0,186 *	8,492 ± 0,799	10,510 ± 3,198	17,376 ± 0,732 *	10,860 ± 0,718	10,146 ± 0,705	13,350 ± 1,493 *
C22:0 Behensäure [µg/g]	6,650 ± 1,331	5,719 ± 1,843	6,080 ± 0,398	23,492 ± 3,724	21,779 ± 4,197	26,209 ± 3,854	16,398 ± 2,320	16,074 ± 3,478	15,288 ± 4,308
C24:0 Lignocerinsäure [µg/g]	8,073 ± 2,869	6,309 ± 2,578	9,203 ± 0,857	30,068 ± 4,632	27,657 ± 5,714	56,519 ± 10,798 *	32,840 ± 5,592	31,836 ± 8,029	36,474 ± 11,037
C26:0 Cervonsäure [µg/g]	1,047 ± 1,324	0,546 ± 0,418	2,230 ± 0,237 *	0,876 ± 0,152	0,750 ± 0,131	12,039 ± 2,869 *	1,134 ± 0,282	0,778 ± 0,234	6,308 ± 1,838 *
<b>verzweigte Fettsäuren</b>									
Phytansäure [µg/g]	0,120 ± 0,027	0,106 ± 0,013	0,137 ± 0,018	0,376 ± 0,086	0,352 ± 0,088	0,461 ± 0,054	0,033 ± 0,012	0,027 ± 0,006	0,020 ± 0,010
Pristansäure [µg/g]	0,018 ± 0,003	0,048 ± 0,068	0,015 ± 0,004	0,043 ± 0,009	0,041 ± 0,006	0,078 ± 0,007 *	0,058 ± 0,008	0,054 ± 0,009	0,054 ± 0,011
<b>ω-9 Fettsäuren</b>									
C18:1 Ölsäure [Gew. %]	16,248 ± 2,302	14,924 ± 1,181	12,300 ± 0,852 *	21,812 ± 0,700	18,014 ± 1,929	11,966 ± 0,925 *	17,160 ± 1,103	18,014 ± 1,929	11,966 ± 0,925 *
C20:1 Gadoleinsäure [Gew. %]	0,280 ± 0,021	0,288 ± 0,015	0,272 ± 0,015	0,182 ± 0,011	0,196 ± 0,022	0,200 ± 0,024	0,238 ± 0,036	0,252 ± 0,037	0,700 ± 0,394 *
C20:3 Mead'sche Säure [Gew. %]	0,354 ± 0,029	0,336 ± 0,030	0,604 ± 0,035 *	0,772 ± 0,036	0,770 ± 0,097	0,488 ± 0,091 *	0,920 ± 0,074	0,934 ± 0,040	0,834 ± 0,059 *
C22:1 Erucasäure [Gew. %]	0,032 ± 0,008	0,040 ± 0,007	0,048 ± 0,004 *	0,032 ± 0,004	0,043 ± 0,022	0,054 ± 0,019	0,210 ± 0,079	0,236 ± 0,109	0,552 ± 0,288 *
C24:1 Nervonsäure [Gew. %]	0,086 ± 0,026	0,088 ± 0,016	0,080 ± 0,0	0,296 ± 0,025	0,374 ± 0,146	0,412 ± 0,044	0,774 ± 0,107	0,754 ± 0,142	0,830 ± 0,078
<b>ω-6 Fettsäuren</b>									
C18:2 Linolsäure [Gew. %]	1,254 ± 0,426	0,880 ± 0,145	1,518 ± 0,045	18,428 ± 0,772	16,648 ± 3,211	14,114 ± 0,570	12,274 ± 0,580	12,786 ± 1,471	10,766 ± 0,438
C18:3 γ-Linolensäure [Gew. %]	0,106 ± 0,024	0,094 ± 0,019	0,132 ± 0,016	0,980 ± 0,071	0,862 ± 0,338	0,370 ± 0,039 *	0,508 ± 0,018	0,510 ± 0,046	0,242 ± 0,049 *
C20:2 Eicosadiensäure [Gew. %]	0,170 ± 0,023	0,136 ± 0,017	0,314 ± 0,035 *	0,464 ± 0,025	0,440 ± 0,059	0,358 ± 0,044 *	0,388 ± 0,036	0,382 ± 0,033	0,288 ± 0,026 *
C20:3 homo-γ-Linolensäure [Gew. %]	0,354 ± 0,029	0,366 ± 0,030	0,640 ± 0,035 *	0,772 ± 0,036	0,770 ± 0,097	0,488 ± 0,091 *	0,920 ± 0,74	0,934 ± 0,40	0,834 ± 0,059 *
C20:4 Arachidonsäure [Gew. %]	10,690 ± 0,446	10,978 ± 0,374	11,660 ± 0,251 *	10,622 ± 0,300	11,550 ± 2,167	9,628 ± 0,751	13,988 ± 1,403	13,130 ± 1,551	11,780 ± 1,145 *
C22:4 Docosatetraensäure [Gew. %]	2,248 ± 0,209	2,296 ± 0,189	1,428 ± 0,118 *	0,742 ± 0,080	0,762 ± 0,086	0,672 ± 0,165	1,412 ± 0,273	1,370 ± 0,221	1,854 ± 0,206 *
C22:5 Docosapentaensäure [Gew. %]	1,702 ± 0,242	1,720 ± 0,224	0,946 ± 0,030 *	1,098 ± 0,193	1,138 ± 0,222	1,086 ± 0,137	1,636 ± 0,168	1,650 ± 0,394	1,788 ± 0,230
<b>ω-3 Fettsäuren</b>									
C18:3 α-Linolensäure [Gew. %]	0,014 ± 0,009	0,010 ± 0,017	0,002 ± 0,004	0,386 ± 0,064	0,286 ± 0,151	0,178 ± 0,059 *	0,192 ± 0,026	0,200 ± 0,058	0,092 ± 0,023 *
C20:5 Eicosapentaensäure [Gew. %]	0,074 ± 0,009	0,076 ± 0,009	0,018 ± 0,008 *	0,366 ± 0,097	0,310 ± 0,069	0,066 ± 0,034 *	0,236 ± 0,036	0,204 ± 0,034	0,070 ± 0,028 *
C22:6 Docosahexaensäure [Gew. %]	9,976 ± 0,415	10,160 ± 0,308	7,936 ± 0,173 *	7,256 ± 0,098	8,094 ± 2,096	11,490 ± 0,714 *	4,146 ± 0,625	4,016 ± 0,264	4,894 ± 0,575 *
<b>Plasmalogen</b>									
Ratio C16:0-DMA / C16:0 **	0,073 ± 0,006	0,074 ± 0,005	n. d. *	0,009 ± 0,001	0,013 ± 0,006	n. d. *	0,040 ± 0,005	0,038 ± 0,004	0,002 ± 0,001 *
Ratio C18:0-DMA / C18:0 **	0,084 ± 0,008	0,082 ± 0,006	n. d. *	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,003	n. d. *	0,046 ± 0,007	0,046 ± 0,005	n. d. *

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte ± Standardabweichung von je 5 Tieren pro Genotyp dar. [Gew. %] = prozentualer Anteil der gemessenen Fettsäure an allen Fettsäuren, die mit dieser Methode bestimmt wurden. \*\* Quotient (Ratio) aus C:16- bzw. C:18-Dimethylacetate der Plasmalogene und ihrer korrespondierenden, gesättigten Fettsäure.

\* WT vs. KO signifikant verändert (p > 0,05).

Umgekehrt zeigten Mead'sche Säure, Eicosadiensäure, homo- $\gamma$ -Linolensäure erhöhte Werte im Gehirn und verminderte Werte in Leber und Vollblut. Insgesamt wird deutlich, dass bei Pex19 KO-Tieren der Gehalt an Omega-Fettsäuren am stärksten im Gehirn gegenüber den Wildtyp-Tieren verändert ist.

#### **4.5 Untersuchungen zur peroxisomalen Biogenese an PEX19-defizienten embryonalen Mausfibroblasten in Zellkultur**

Für zellbiologische Studien wurden aus Embryonen der PEX19-Mäuse Fibroblasten isoliert. Nach erfolgter Charakterisierung durch Immunfluoreszenzanalysen mit verschiedenen peroxisomalen Markerproteinen wurden die Pex19-MEFs für Komplementationsversuche verwendet.

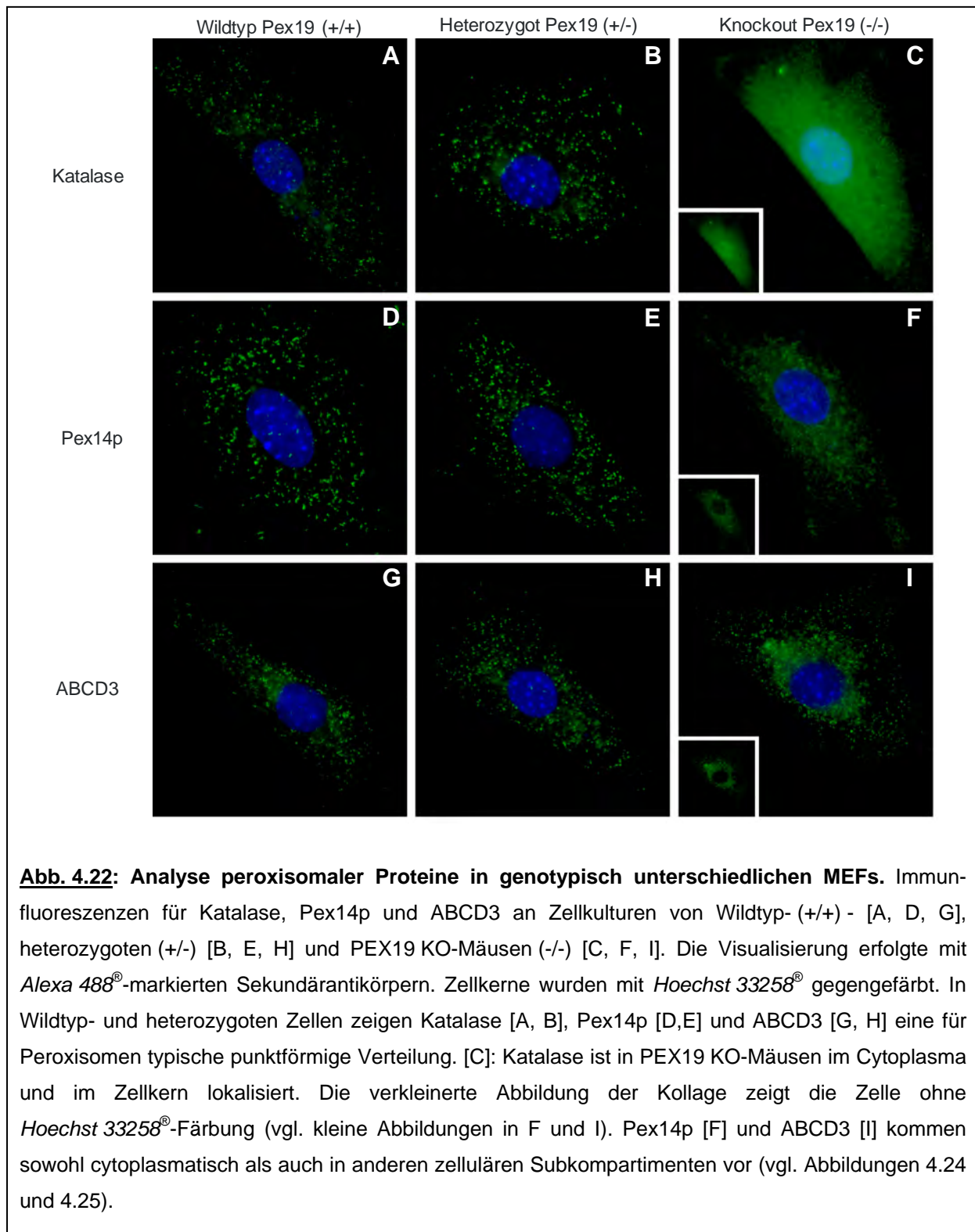
Ausgehend von einem durch Datenbanksuche ermittelten und kommerziell erworbenen cDNA-Klon, der die Wildtyp-cDNA von PEX19 enthielt, wurden für diese Komplementationsversuche verschiedene Expressionsvektoren kloniert, die Wildtyp- und genetisch modifizierte cDNAs enthielten. Durch transiente Transfektion der Vektoren in Pex19-defiziente MEFs wurden die funktionell notwendigen Anteile des Pex19p-Proteins, die für die Komplementation des genetischen Defekts essentiell sind, und der Zeitverlauf der Neuentstehung von Peroxisomen untersucht.

##### **4.5.1 Charakterisierung der PEX19-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (MEFs)**

Da unter anderem das Verhalten der peroxisomalen Proteine Katalase, Pex14p und ABCD3 während der Neubildung von Peroxisomen in PEX19-defizienten embryonalen Mausfibroblasten untersucht werden sollte, wurden diese Proteine in Mausfibroblasten vor Beginn der Komplementationsversuche zunächst durch Immunfluoreszenz mit entsprechenden Antikörpern für die oben genannten Proteine charakterisiert.

Katalase, Pex14p und ABCD3 zeigten in Wildtyp- und heterozygoten Zellen eine für Peroxisomen typisches punkt- bis stäbchenförmiges Verteilungsmuster (s. Abbildung 4.22 A+B, D+E, G+H). Katalase war in Fibroblasten der PEX19KO-Mäuse sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (s. Abbildung 4.22 C), während Pex14p und ABCD3 durch die Immunfluoreszenzfärbung sowohl cytoplasmatisch als auch in anderen zellulären Subkompartimenten nachgewiesen werden konnten (s. Abbildung 4.22 F+I). In Fibroblasten ähnelte

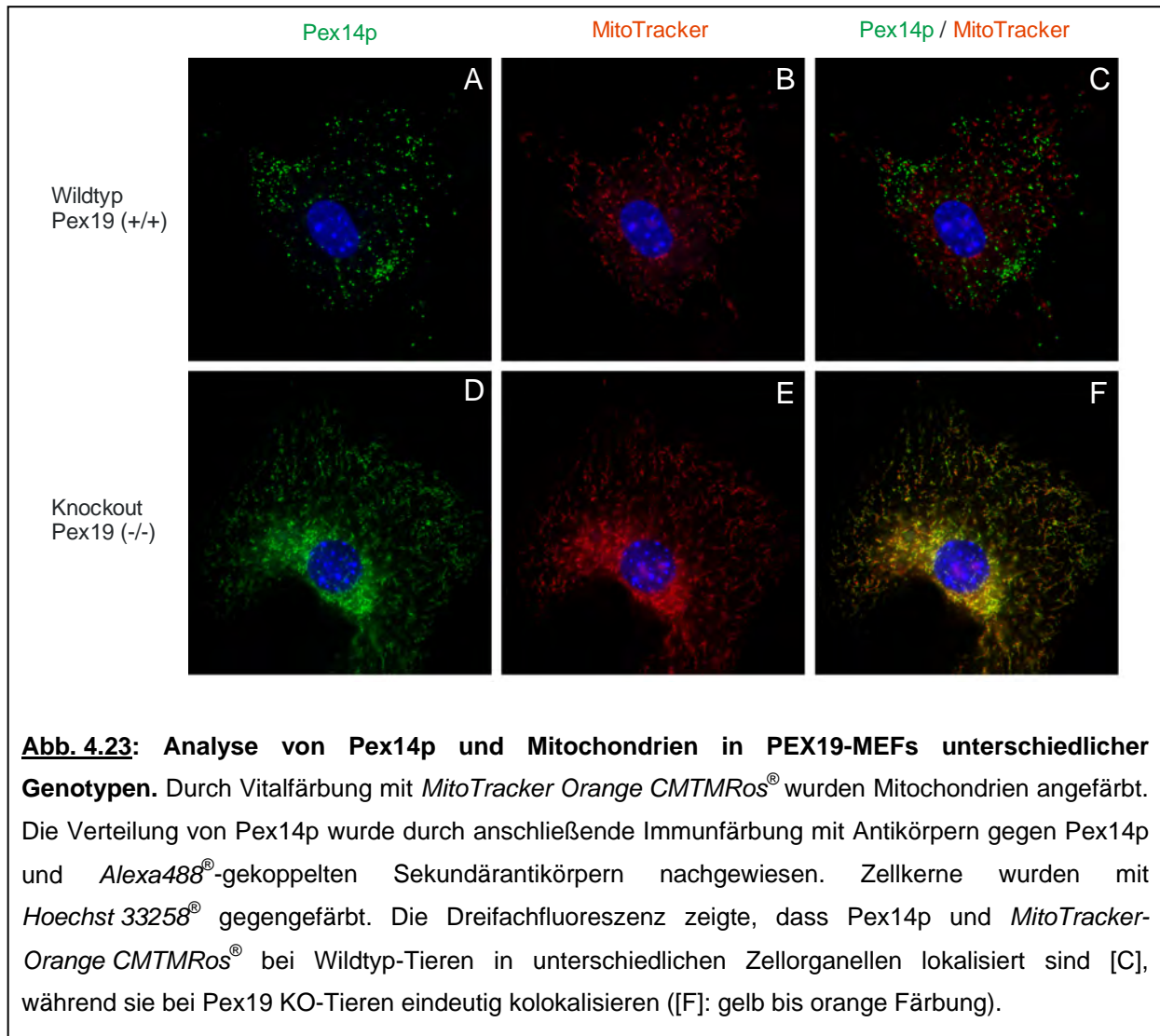
somit die Verteilung von Katalase und Pex14p der in Paraffinschnitten (vgl. Abbildungen 4.19 und 4.20).



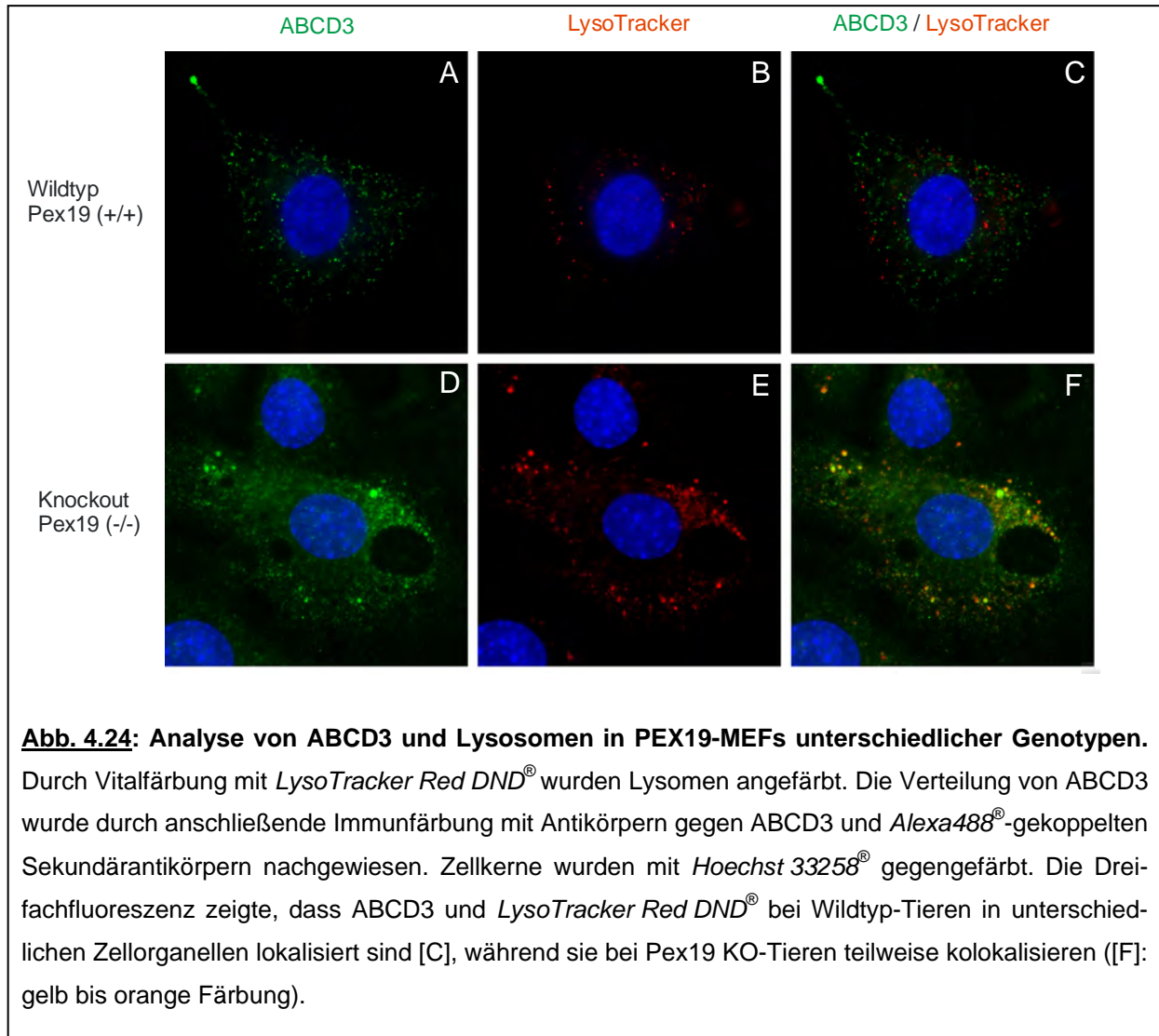
**Abb. 4.22: Analyse peroxisomaler Proteine in genotypisch unterschiedlichen MEFs.** Immunfluoreszenzen für Katalase, Pex14p und ABCD3 an Zellkulturen von Wildtyp- (+/+) - [A, D, G], heterozygoten (+/-) [B, E, H] und PEX19 KO-Mäusen (-/-) [C, F, I]. Die Visualisierung erfolgte mit *Alexa 488*<sup>®</sup>-markierten Sekundärantikörpern. Zellkerne wurden mit *Hoechst 33258*<sup>®</sup> gegengefärbt. In Wildtyp- und heterozygoten Zellen zeigen Katalase [A, B], Pex14p [D,E] und ABCD3 [G, H] eine für Peroxisomen typische punktförmige Verteilung. [C]: Katalase ist in PEX19 KO-Mäusen im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Die verkleinerte Abbildung der Kollage zeigt die Zelle ohne *Hoechst 33258*<sup>®</sup>-Färbung (vgl. kleine Abbildungen in F und I). Pex14p [F] und ABCD3 [I] kommen sowohl cytoplasmatisch als auch in anderen zellulären Subkompartimenten vor (vgl. Abbildungen 4.24 und 4.25).



Dass Pex14p in PEX19-defizienten Zellen ebenso wie auf Paraffinschnitten mit Mitochondrien kolokalisiert ist, wurde in Dreifachfluoreszenzen durch Inkubation der Zellen mit *MitoTracker CMTMRos*<sup>®</sup>, Immunfärbung mit Pex14p-Antikörpern und anschließender Zellkernfärbung nachgewiesen (s. Abbildung 4.23).



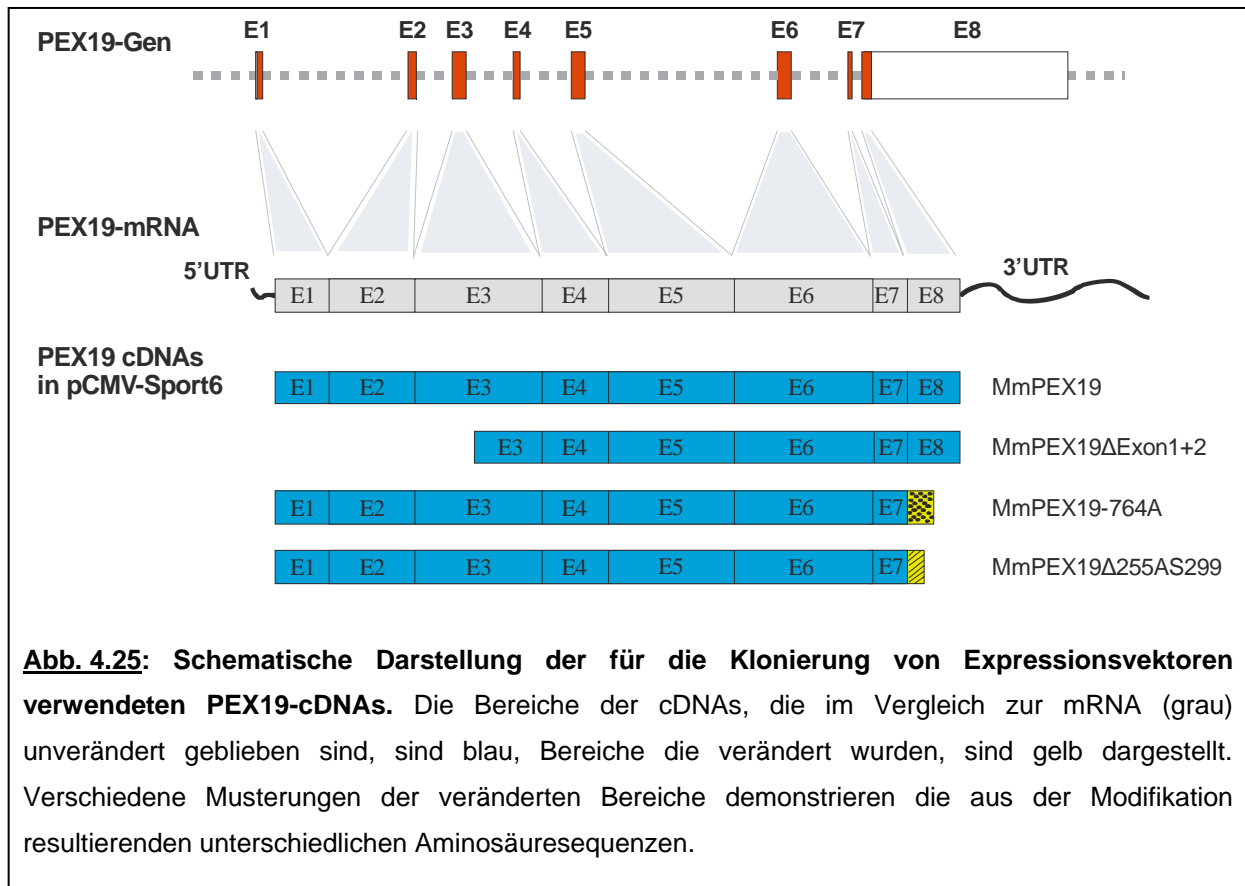
Parallel dazu wurden die KO-Zellen auch mit *LysoTracker Red DND*<sup>®</sup> behandelt und die Verteilung von ABCD3 in PEX19 KO-Fibroblasten durch anschließenden Immunfluoreszenznachweis charakterisiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass ABCD3 in KO-Tieren mit Lysosomen kolokalisiert (s. Abbildung 4.24 F). Außerdem zeigten die KO-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen eine vermehrte Bildung und Vergrößerung der Lysosomen (s. Abbildung 4.24, vgl. B+E).



#### 4.5.2 Klonierung von Expressionsvektoren

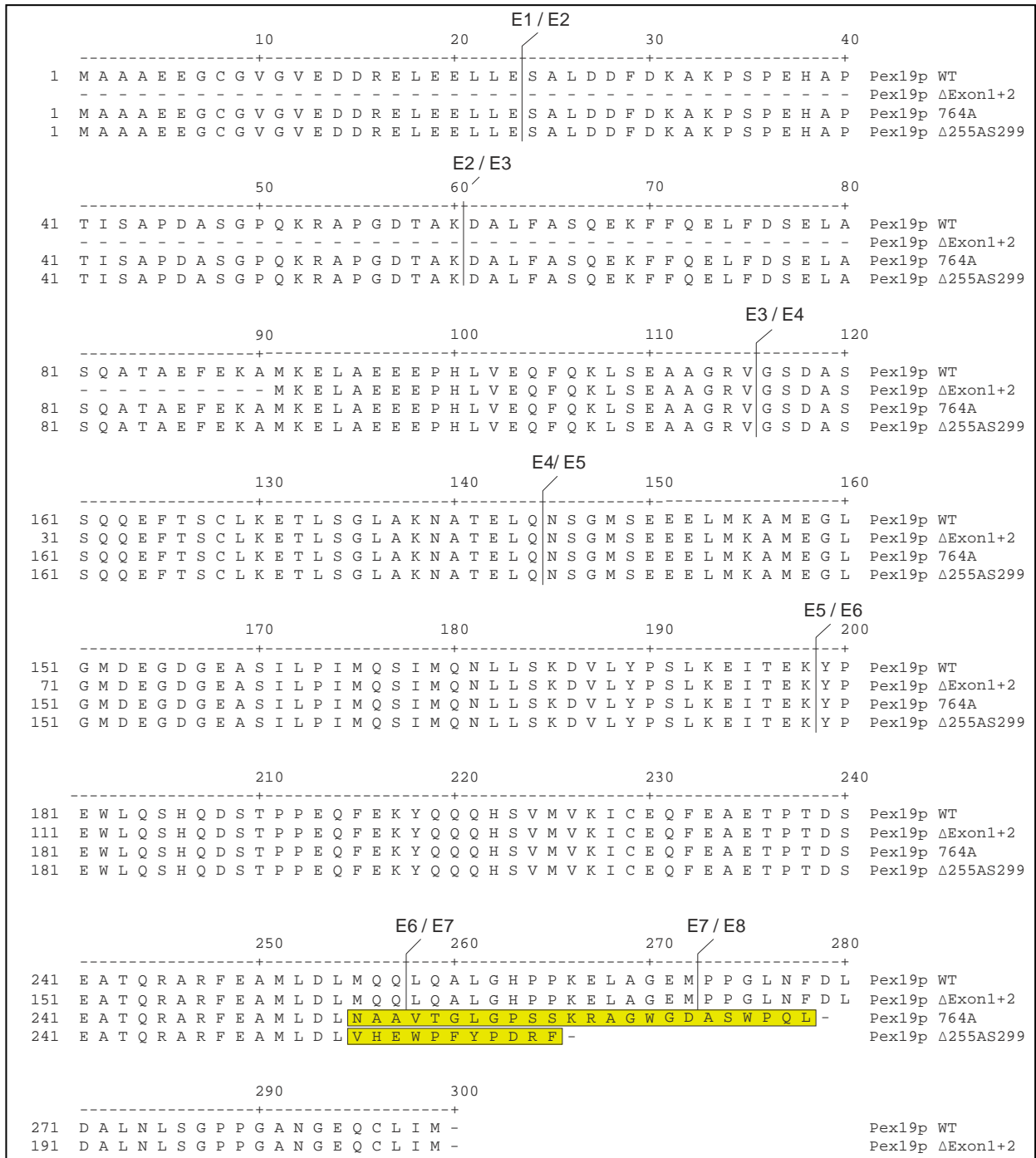
Für Komplementationsversuche in PEX19-defizienten embryonalen Mausfibroblasten wurden neben der Wildtyp-cDNA drei genetisch modifizierte cDNAs in den Expressionsvektor *pCI-neo*<sup>®</sup> (Stratagene, Amsterdam, NL) kloniert. Dazu wurde als Ausgangsmaterial ein Klon benötigt, der die Wildtyp-cDNA von PEX19 trägt. Mit Hilfe des frei verfügbaren BLAST-Programmes wurde die Datenbank des RZPDs (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin, D) mit der murinen cDNA-Sequenz von PEX19 (BC019767) nach geeigneten Klone durchsucht. Die Datenbankanalyse führte zur Identifizierung des Klones IRAKp96111541. Dieser wurde vom RZPD bezogen und wird in dieser Arbeit als pCMV-Sport6-MmPEX19 bezeichnet, da er sich aus dem Vektor *pCMV-Sport6*<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe; s. Kapitel 7.3.1.) und der murinen (Mm = *Mus musculus*) PEX19-cDNA zusammensetzt (vgl. auch Abbildung 4.27).

In Abbildung 4.25 sind die verschiedenen cDNA-Varianten schematisch dargestellt. Ihre unterschiedlichen Proteinsequenzen (vgl. Kapitel 7.1.2) wurden mit dem Programm *MegAlign*<sup>®</sup> (DNASTar-Package, Madison, Wi, Wisconsin) unter Verwendung der *ClustalW*<sup>®</sup> Methode (Thompson et al., 1994) analysiert und sind in Abbildung 4.26 gezeigt.

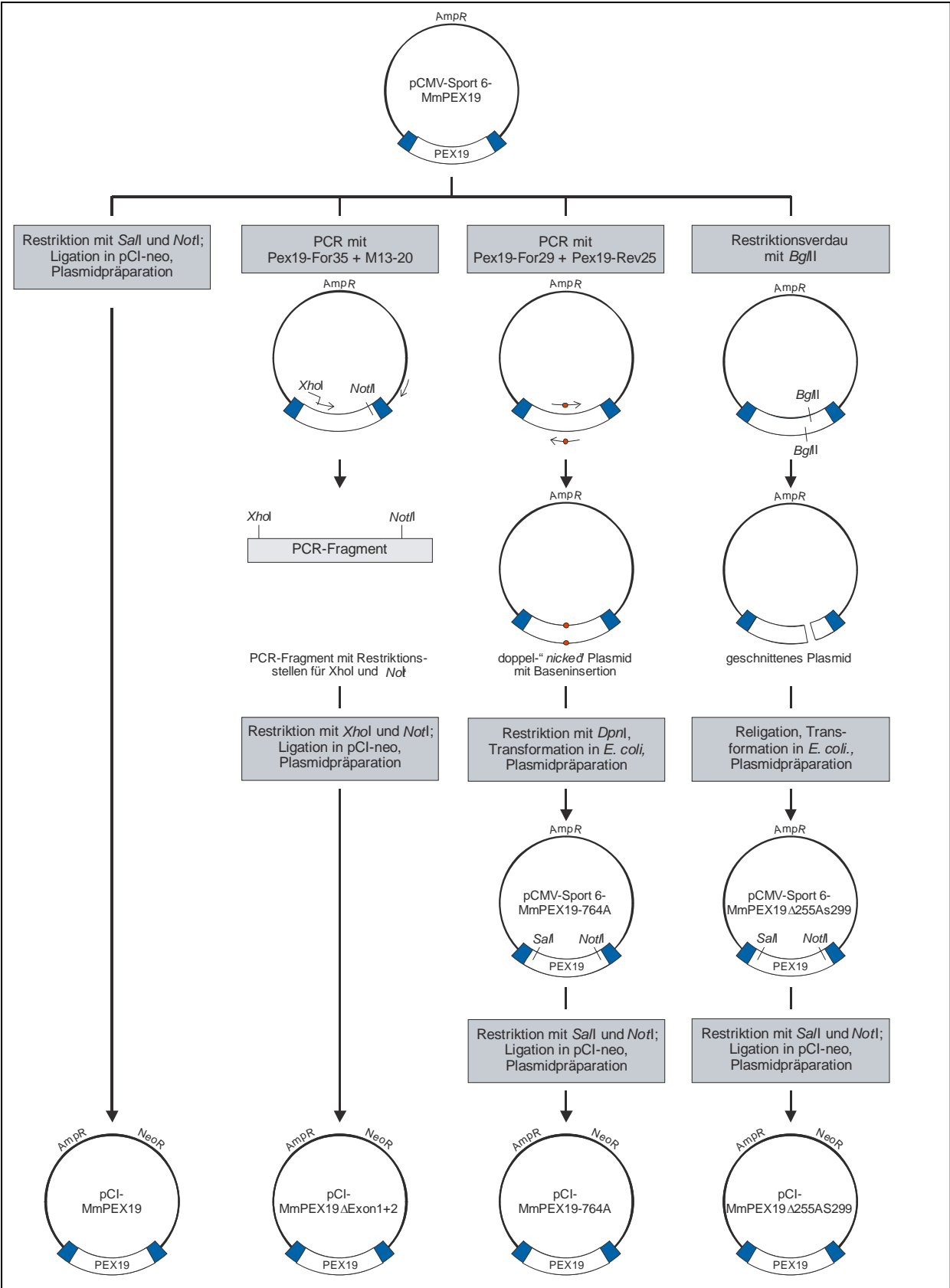


Alle Vektorkarten zu den nachfolgend beschriebenen Klonierungsschritten sind im Anhang angegeben (s. Kapitel 7.3). Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen (vgl. auch Abbildung 4.27):

Durch Amplifikation mit den Primern Pex19-For35 und M13-20 wurde das cDNA-Fragment für das Plasmid pCI-MmPEX19ΔExon1+2 erzeugt. Als Template diente das Plasmid pCMV-Sport6-MmPEX19. Durch den Primer Pex19-For35 wurde eine zusätzliche *XhoI*-Schnittstelle eingefügt, während die *NotI*-Schnittstelle im Ausgangsvektor bereits vorhanden war. Dadurch war eine Klonierung des PCR-Fragmentes nach *XhoI* / *NotI*-Verdau in den entsprechend vorbereiteten Vektor *pCI-neo*<sup>®</sup> möglich (s. Abbildung 4.27).



**Abb. 4.26 Vergleich der Pex19p-Proteinsequenzen.** Die Proteinsequenz der Wildtyp-cDNA von PEX19 (Pex19p WT) wird mit den Proteinsequenzen der genetisch modifizierten cDNAs (Pex19p ΔExon1+2, Pex19p 764A, Pex19p Δ255AS299) verglichen. Die Grenzen der Exons (E) sind durch Striche markiert. Der Proteinsequenz Pex19p ΔExon1+2 fehlen N-terminal 90 Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Bei den Proteinsequenzen Pex19p 764A und Pex19p Δ255AS299 wurde der C-terminale Bereich des Proteins im Vergleich zum Wildtyp-Protein verändert. Die Aminosäuren, die keine Homologie zu denen des Wildtyp-Proteins aufweisen, sind gelb markiert.



**Abb. 4.27: Klonierung von Expressionsvektoren.** Die Klonierungsschritte zur Herstellung verschiedener Expressionsplasmide sind graphisch dargestellt. Ausgehend von dem Plasmid pCMVSPORT6-MmPEX19 wurden Wildtyp- und drei genetisch modifizierte cDNA von PEX19 in den Expressionsvektor pCI-neo® (Stratagene, Amsterdam, NL) kloniert (vgl. auch Text).

Durch gerichtete Mutagenese mit den Primern Pex19-For29 und Pex19-Rev25 entstand aus dem Ursprungsplasmid pCMV-Sport6-MmPEX19 das Plasmid pCMV-Sport6-MmPEX19-764A (vgl. Kapitel 3.2.14).

Für das Plasmid pCMV Sport6-MmPEX19 $\Delta$ 255AS299 wurde das Plasmid pCMV-Sport6-MmPEX19 mit dem Enzym *Bgl*II geschnitten, das Hauptfragment (5323 bp) durch Isolierung aus einem Agarosegel aufgereinigt und anschließend religiert.

Das Ausgangsplasmid pCMV-Sport6-MmPEX19 sowie die Plasmide pCMV-Sport6-MmPEX19-764A und pCMV Sport6-MmPEX19 $\Delta$ 255AS299 wurden mit den Enzymen Sall / NotI geschnitten, die Fragmente (1935bp, 1936 bp bzw. 968 bp) durch Isolierung aus einem Agarosegel aufgereinigt und in den entsprechend vorbereiteten Vektor *pCI-neo*<sup>®</sup> kloniert (s. Abbildung 4.27).

Alle Expressionsplasmide wurden charakterisiert, anschließend sequenziert, und die Daten im Laborbuch hinterlegt. Die Expressionsplasmide wurden nachfolgend in Komplementationsversuchen eingesetzt.

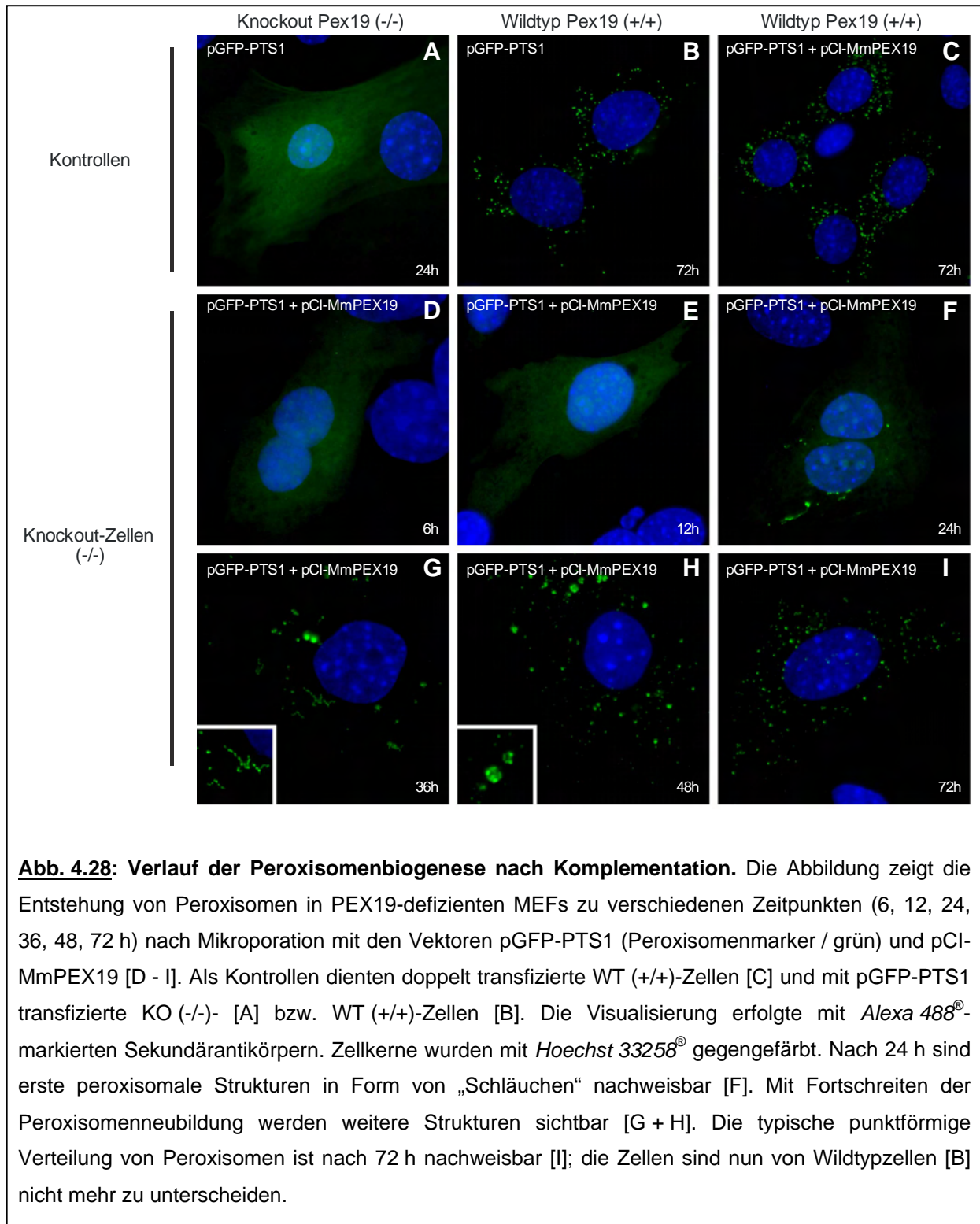
### **4.5.3 Komplementationsversuche zur funktionellen Analyse des PEX19-Proteins (Pex19p)**

Um die Funktionalität verschiedener Bereiche des PEX19-Proteins bei der Peroxisomenbiogenese zu untersuchen, wurden die Expressionsplasmide pCI-MmPEX19, pCI-MmPEX19 $\Delta$ Exon1+2, pCI-MmPEX19-764A und pCI-MmPEX19 $\Delta$ 255AS299 zusammen mit dem Plasmid pGFP-PTS1 (s. Kapitel 7.3.3) in MEFs der PEX19 KO-Mäuse mikroporiert. Die Transfektion des Plasmides pGFP-PTS1 führt dazu, dass die Zellen ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren, an das das peroxisomale Targeting-Signal „PTS1“ gekoppelt ist. Dieses Protein wird in die Peroxisomenmatrix importiert (vgl. Kapitel 1.2.1), und die Peroxisomen können nun durch die Grünfluoreszenz identifiziert werden. Die Zellkulturen wurden jeweils 24, 48, und 72 Stunden nach Mikroporation auf vorhandene Peroxisomen hin untersucht. Es zeigte sich, dass nur das „Wildtyp-Plasmid“ pCI-MmPEX19 die PEX19-Defizienz komplementierte (vgl. Abbildung 4.28 I). Keine der veränderten cDNAs konnte eine Neubildung von Peroxisomen induzieren. Die Daten wurden photographisch dokumentiert, werden aber hier aufgrund des negativen Resultates nicht gezeigt.

#### 4.5.4 Zeitlicher Verlauf der peroxisomalen Biogenese

Um den Zeitpunkt der Entstehung erster peroxisomaler Strukturen und den weiteren Verlauf der Peroxisomenneubildung möglichst genau charakterisieren zu können, wurden Pex19-defiziente Mausfibroblasten mit den Vektoren pCI-MmPEX19 und pGFP-PTS1 kotransfiziert und alle sechs Stunden nach Mikroperoration analysiert. Der zeitliche Verlauf wird in Abbildung 4.28 gezeigt. Zeitpunkte, die keine wesentliche Veränderung aufwiesen, wurden nicht dargestellt. Als Kontrollen wurden WT- und KO-Zellen mit dem Vektor pGFP-PTS1 transfiziert. Darüber hinaus sollte durch Transfektion der Vektoren pGFP-PTS1 und pCI-MmPEX19 bewiesen werden, dass die beobachteten Veränderungen nicht durch Überexpression des Vektors pCI-MmPEX19 entstehen.

Ungefähr 6 Stunden nach Mikroperoration wurde die Expression des GFP-PTS1-Signals durch schwache Fluoreszenz im Cytoplasma sichtbar (s. Abbildung 4.28 D). Die Verteilung des GFP-PTS1-Proteins in Cytoplasma und Zellkern war vergleichbar mit der Situation in KO-Zellen, die nur mit dem Peroxisomenmarker pGFP-PTS1 transfiziert wurden (s. Abbildung 4.28 A). Nach 12 (s. Abbildung 4.28 E) bzw. 18 Stunden konnten noch keine Veränderung beobachtet werden. Erste, durch GFP-PTS1 markierte, schlauchförmige Strukturen waren nach 24 Stunden nachweisbar (s. Abbildung 4.28 F). Parallel dazu reduzierte sich die Menge an SKL im Cytoplasma. Mit weiterem Fortschreiten der Peroxisomenneubildung (36 h und 48 h) wurden auch größere Peroxisomen sowie kettenförmige Aufreihungen kleiner Peroxisomen sichtbar (s. Abbildung 4.28 G + H), die offensichtlich durch Einschnürung aus den Peroxisomen-Schläuchen entstanden waren. 72 Stunden nach Mikroperoration zeigten die Zellen die typische punktförmige Verteilung von Peroxisomen und waren von „normalen“ Wildtyp-Zellen nicht mehr zu unterscheiden (s. Abbildung 4.28 I, vgl. Abbildung 4.28 I + B). Überexpression von pCI-MmPEX19 in WT-Zellen zeigte zu keiner Zeit bis zu den maximal untersuchten 72 Stunden nach Mikroperoration irgendwelche Unterschiede zu WT-Zellen (s. Abbildung 4.28 B), die nur mit dem Peroxisomenmarker pGFP-PTS1 transfiziert wurden (s. Abbildung 4.28 C). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die strukturellen Veränderungen in den KO-Zellen nicht durch Überexpression des Vektors pCI-MmPEX19 entstanden.

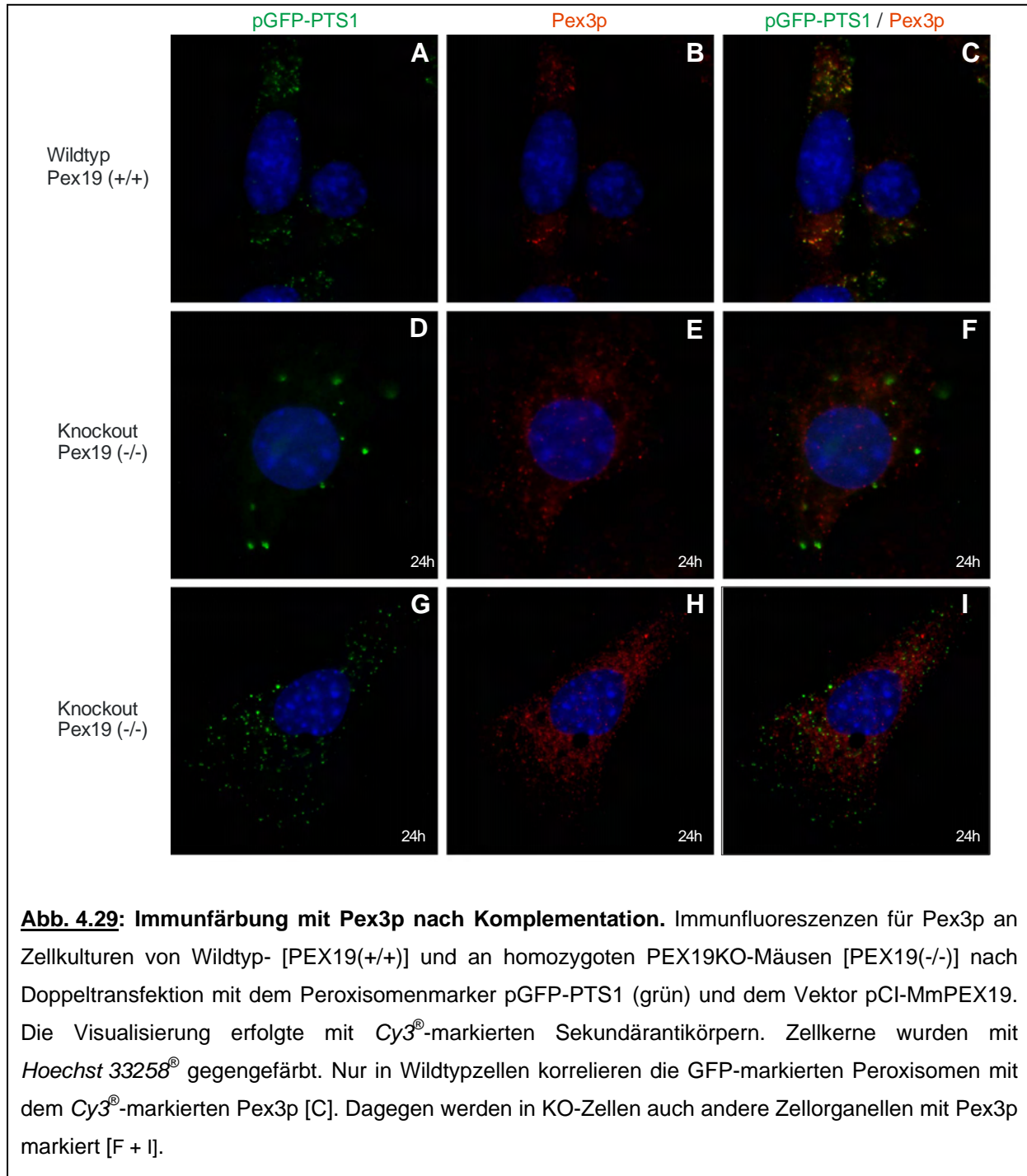


**Abb. 4.28: Verlauf der Peroxisomenbiogenese nach Komplementation.** Die Abbildung zeigt die Entstehung von Peroxisomen in PEX19-defizienten MEFs zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, 24, 36, 48, 72 h) nach Mikroporation mit den Vektoren pGFP-PTS1 (Peroxisomenmarker / grün) und pCI-MmPEX19 [D - I]. Als Kontrollen dienten doppelt transfizierte WT (+/+)-Zellen [C] und mit pGFP-PTS1 transfizierte KO (-/-)- [A] bzw. WT (+/+)-Zellen [B]. Die Visualisierung erfolgte mit *Alexa 488*<sup>®</sup>-markierten Sekundäntikörpern. Zellkerne wurden mit *Hoechst 33258*<sup>®</sup> gegengefärbt. Nach 24 h sind erste peroxisomale Strukturen in Form von „Schläuchen“ nachweisbar [F]. Mit Fortschreiten der Peroxisomenneubildung werden weitere Strukturen sichtbar [G + H]. Die typische punktförmige Verteilung von Peroxisomen ist nach 72 h nachweisbar [I]; die Zellen sind nun von Wildtypzellen [B] nicht mehr zu unterscheiden.

Bereits die ersten 24 Stunden reichten aus, um einen Eindruck über das zeitliche Auftreten der zu untersuchenden Proteine zu bekommen. Daher sind in den Abbildungen 4.29 und 4.30 keine Aufnahmen zum Zeitpunkt 36 h gezeigt.



Um zu untersuchen, wie der zeitliche Verlauf des Imports von Membran- und Matrixproteinen erfolgt, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Pex19-defiziente MEFs mit Katalase, Pex3p, Pex14p und ABCD3 durchgeführt. Die KO-Zellen wurden mit den Vektoren pGFP-PTS1 und pCI-MmPEX19 transfiziert. 24 und 36 h nach erfolgter Mikroporation wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die genannten Proteine inkubiert.

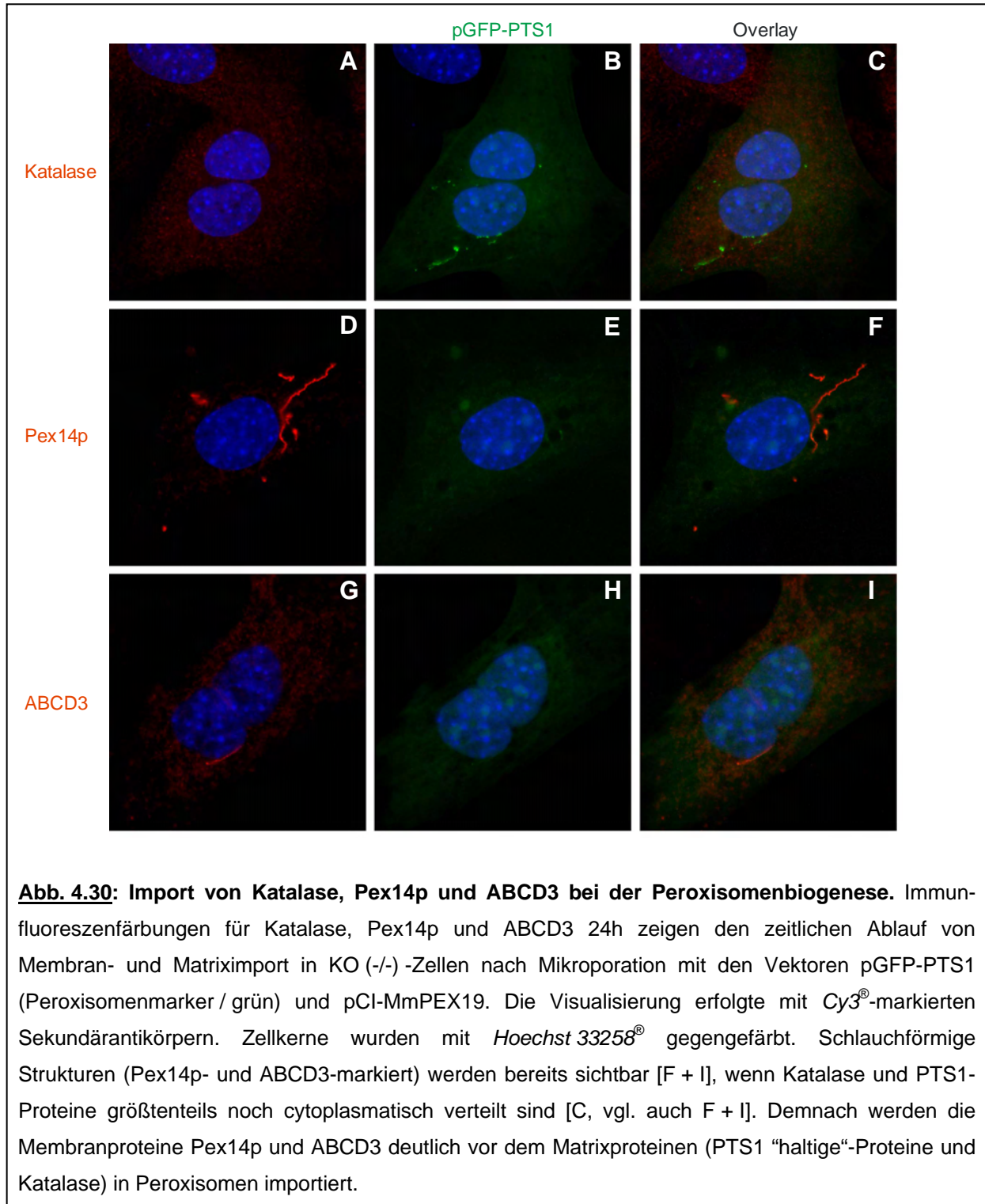


**Abb. 4.29: Immunfärbung mit Pex3p nach Komplementation.** Immunfluoreszenzen für Pex3p an Zellkulturen von Wildtyp- [PEX19(+/+)] und an homozygoten PEX19KO-Mäusen [PEX19(-/-)] nach Doppeltransfektion mit dem Peroxisomenmarker pGFP-PTS1 (grün) und dem Vektor pCI-MmPEX19. Die Visualisierung erfolgte mit Cy3<sup>®</sup>-markierten Sekundärantikörpern. Zellkerne wurden mit Hoechst 33258<sup>®</sup> gefärbt. Nur in Wildtypzellen korrelieren die GFP-markierten Peroxisomen mit dem Cy3<sup>®</sup>-markierten Pex3p [C]. Dagegen werden in KO-Zellen auch andere Zellorganellen mit Pex3p markiert [F + I].

Erwiesen sich erste Färbungen auf Wildtypzellen bei Pex3p noch als viel versprechend, so zeigte sich bei der Durchführung dieses Versuches, dass der verwendete Pex3p-Antikörper offensichtlich nicht zuverlässig eingesetzt werden konnte (s. Abbildung 4.29). In Wildtypzellen korrelierten die GFP-markierten Peroxisomen in weiten Bereichen noch mit dem Cy3<sup>®</sup>-markiertem Pex3p (s. Abbildung 4.29 A - C). Jedoch fiel bereits hier auf, dass der anti-Pex3p-Antikörper auch andere Organellen in den Zellen anfärbt. Als eines der ersten Proteine der Membranbiogenese sollte Pex3p in jedem Fall in Peroxisomen zu finden sein, die bereits Matrixproteine importiert haben. Wie die Überlagerung von Rot- und Grünkanal in KO-Zellen zeigte, konnten das punktförmige Muster von Pex3p nicht mit den GFP-markierten Peroxisomen zur Deckung gebracht werden (s. Abbildung 4.29 F + I). Demnach funktioniert der Antikörper nicht gut genug, um die gewünschte Fragestellung zu bearbeiten.

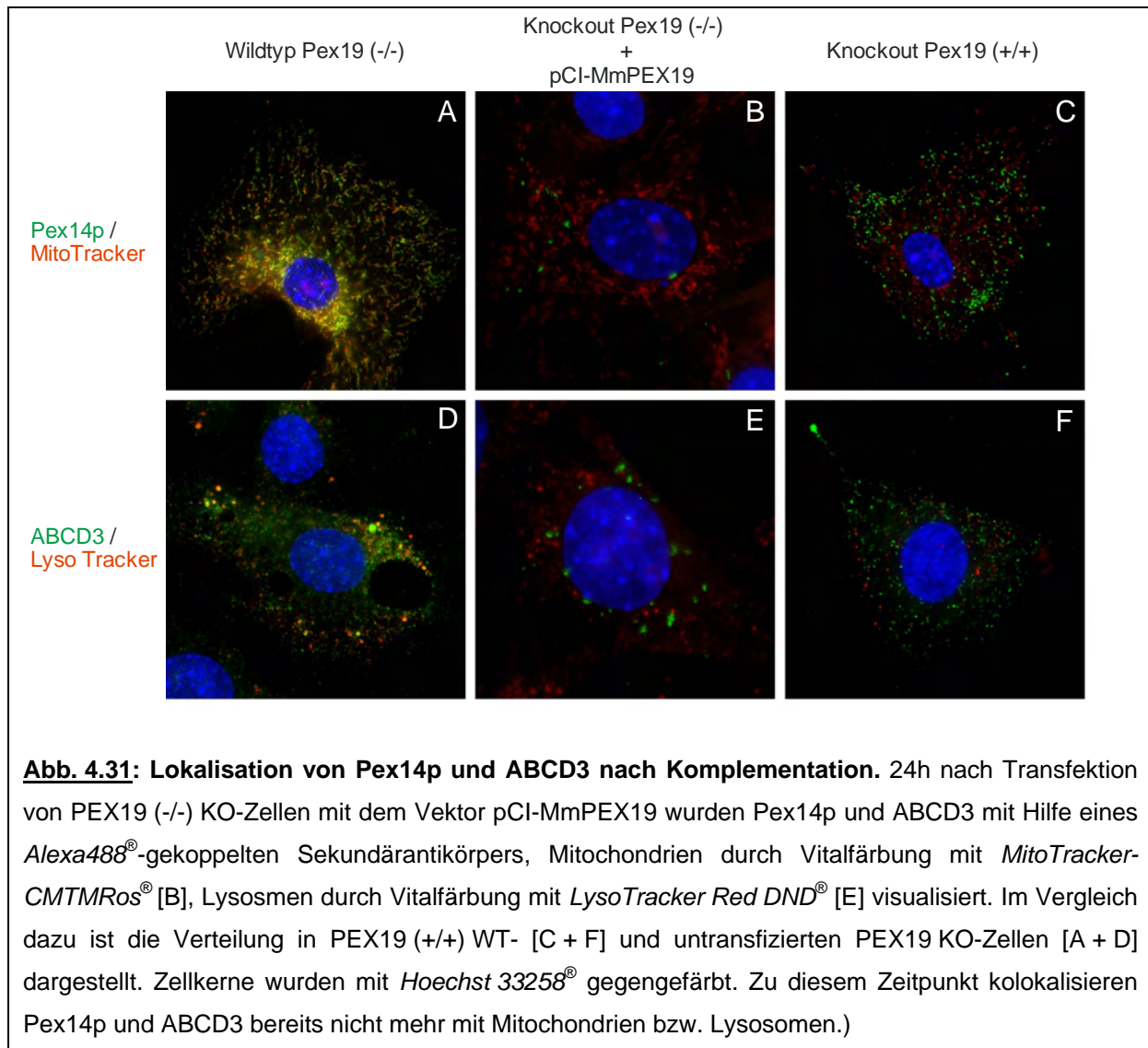
Die cytoplasmatische Verteilung von Katalase bei gleichzeitigem Auftreten GFP-PTS1-markierter Strukturen belegte (s. Abbildung 4.30 C), dass Katalase offensichtlich zu den später importierten Matrixproteinen gehört. Dagegen wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen Pex14p- bzw. ABCD3-markierte schlauchförmige Strukturen bereits sichtbar, wenn das GFP-PTS1-Signal noch cytoplasmatisch verteilt war (s. Abbildung 4.30 F + H).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Membranproteine Pex14p und ABCD3 deutlich vor den Matrixproteinen (PTS1 "haltige"-Proteine und Katalase) eingebaut werden. Beim Vergleich der Färbungen erschienen die gefundenen schlauchförmigen Strukturen beim Pex14p-Nachweis deutlich größer als bei dem für ABCD3. Daraus lässt sich schließen, dass ABCD3 zum gleichen Zeitpunkt in geringerer Menge in den Membranstrukturen vorhanden ist und erst nach Pex14p in die Membran eingebaut wird.



#### 4.5.5 Lokalisation von Katalase, Pex14p und ABCD3 während der Peroxisomenneubildung

Um die Lokalisation von ABCD3 und Pex14p zu Beginn der Peroxisomenneubildung zu untersuchen, wurden KO-Zellen mit dem Vektor pCI-MmPEX19 transfiziert (s. Abbildung 4.31).



**Abb. 4.31: Lokalisation von Pex14p und ABCD3 nach Komplementation.** 24h nach Transfektion von PEX19 (-/-) KO-Zellen mit dem Vektor pCI-MmPEX19 wurden Pex14p und ABCD3 mit Hilfe eines *Alexa488*<sup>®</sup>-gekoppelten Sekundärantikörpers, Mitochondrien durch Vitalfärbung mit *MitoTracker-CMTMRos*<sup>®</sup> [B], Lysosomen durch Vitalfärbung mit *LysoTracker Red DND*<sup>®</sup> [E] visualisiert. Im Vergleich dazu ist die Verteilung in PEX19 (+/+) WT- [C + F] und untransfizierten PEX19 KO-Zellen [A + D] dargestellt. Zellkerne wurden mit *Hoechst 33258*<sup>®</sup> gegengefärbt. Zu diesem Zeitpunkt kolokalisieren Pex14p und ABCD3 bereits nicht mehr mit Mitochondrien bzw. Lysosomen.)

Durch anschließende Doppelmarkierung für Pex14p und *MitoTracker-CMTMRos*<sup>®</sup> bzw. für ABCD3 und *LysoTracker Red DND*<sup>®</sup> konnte nach 24h bereits keine Kolokalisation der Proteine mit den entsprechenden Organellen mehr gezeigt werden. Um den Zeitpunkt zu dokumentieren, zu dem Pex14p bzw. ABCD3 bereits in Peroxisomen aber auch noch in Mitochondrien bzw. Lysosomen nachgewiesen werden können, müssen demnach die Proben deutlich früher nach Mikroporation analysiert werden.

## 5. Diskussion und Ausblick

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Für das Überleben einzelliger Organismen sind sie unter bestimmten Umweltbedingungen auch essentiell. So können peroxisomendefiziente Hefezellen zwar auf vielen Kohlenstoffquellen (z.B. Zucker, Aminosäuren) jedoch nicht auf Fetten oder Methanol wachsen (Elgersma & Tabak, 1996). Auch Säugetierzellen mit peroxisomalen Biogenesedefekten können in Zellkulturen vermehrt werden, wachsen jedoch besonders in höheren (fortgeschritteneren) Passagen schlechter als entsprechende Wildtypzellen. Die Bedeutung der Peroxisomen für die normale Funktion und das Überleben vielzelliger Lebewesen wird besonders bei deren komplettem Stoffwechsellausfall durch eine Reihe von schwerwiegenden, immer tödlich verlaufenden Erkrankungen des Menschen (PBDs = „*peroxisome biogenesis disorders*“) verdeutlicht (Wanders et al., 1995; Wanders & Tager, 1998; Gould & Valle, 2000). Zur Aufklärung peroxisomaler Defekte beim Menschen sind umfangreiche Kenntnisse über Funktion und Biogenese der Peroxisomen unumgänglich. Eine experimentelle Möglichkeit, die physiologische Funktion von Proteinen im Kontext des Organismus besser zu verstehen, bietet die Knockout-Technologie. Mit Hilfe des „*gene targeting*“ können z.B. bei Mäusen Gene gezielt modifiziert bzw. inaktiviert werden (Capecchi, 1989). Durch die Folgen, die der Gendefekt mit sich bringt, können Rückschlüsse auf die ursprüngliche Genfunktion gezogen werden. Um Untersuchungen zur Membranbiogenese von Peroxisomen und zur Funktion von Pex19p durchführen zu können, sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Knockout-Maus mit PEX19-Defekt hergestellt und charakterisiert werden. Abhängig vom Erfolg dieses Teilprojektes sollten zellbiologische und biochemische Studien die Rolle von Pex19p so weit wie möglich aufklären.

### 5.1 Die PEX19 KO-Maus

Die Herstellung einer sog. Knockout (KO)-Mausmutante ist ein aufwendiges und schwieriges Verfahren, für dessen erfolgreiche Durchführung verschiedene grundlegende Regeln beachtet werden müssen. In den folgenden Abschnitten werden die Konstruktion des PEX19-Targetingvektors, die Vor- und Nachteile der angewendeten Knockout-Technologie in Bezug auf die Generierung und Charakterisierung der PEX19 KO-Maus sowie der Aufbau der transgenen PEX19 KO-Mauslinie diskutiert.

### 5.1.1 Verwendung isogener DNA

Für die Konstruktion des PEX19-Targetingvektors wurde homologe DNA aus genomischen Banken verwendet, deren DNA isogen zu der DNA der ES-Zellen ist. Nach te Riele et al. (1992) wirkt sich eine Abweichung in der Homologie der Sequenzen negativ auf die Rekombinationsfrequenz aus, da in diesem Fall das DNA-„Mismatch“-Reparatursystem in Zellen die homologe Rekombination beeinträchtigt. Dieses System hat die Aufgabe, Basenfehlpaarungen aufzudecken und zu korrigieren, die als Fehler bei der DNA-Replikation auftreten (Modrich & Lahue, 1996; Kolodner, 1996). Würden „Mismatches“ zwischen der Sequenz des Vektors und der des „Target“-Lokus existieren, so wäre die Targetingfrequenz stark reduziert, besonders wenn keine ununterbrochene „perfekte“ Homologie bestünde. Zur Kontrolle wurden die beiden Homologiebereiche des PEX19-Targetingvektors, der DNA des Mausstammes 129/SvJ enthielt, sequenziert. Allerdings konnte zur Untersuchung flankierender Gene und zum Abgleich der 5'-Promotorregion und der 3'-Region nur die publizierte PEX19-Gensequenz des Mausstammes C57BL/6J (AC074310) verwendet werden. Dabei zeigte sich, dass bei dem Mausstamm 129/SvJ im Vergleich zum Mausstamm C57BL/6J in der möglichen Promotorregion des PEX19-Gens zusätzlich ein 208 bp großer Abschnitt enthalten ist. Demnach besteht in diesem Locus eine große Variation zwischen den beiden Mausstämmen.

Die anschließende BLASTN-Datenbanksuche ergab, dass diese 208 bp-Insertion mehrfach im Mausgenom vorkommt und dabei Sequenzähnlichkeiten von über 95% aufweist. Es könnte sich daher bei der zusätzlichen Sequenz um ein Transposon oder ein sog. bewegliches, repetitives Element handeln. Das Mausgenom besteht zu annähernd 20 % aus repetitiven Elementen, die man aufgrund ihrer Größe in LINEs (*long interspersed nuclear elements*) und SINEs (*short interspersed nuclear elements*) einteilt. Die bei Mäusen zu der Gruppe der SINEs gehörenden B1- (130 bp; Krayev et al., 1980) und B2-Elemente (190 bp; Krayev et al., 1982) wurden sowohl in den 5'- als auch den 3'-Bereichen von Strukturgenen in einem Abstand von 1 bis 7,5 kb gefunden (Lueders & Paterson, 1982). Manchen dieser repetitiven Sequenzen werden regulatorische Funktionen für die Genexpression zugeschrieben (Britten & Davidson, 1969; Davidson & Britten, 1979). Andere Autoren klassifizieren sie als „DNA-Müll“ (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). Bisher ist noch wenig über Aufgabe und Funktion dieser beweglichen, repetitiven Elemente bekannt. Da die 208 bp-Insertion offenbar keine deutlichen Auswirkungen auf die Expression von Pex19p in 129/SvJ-Mäusen hat, wurde auf eine weitere Untersuchung zur Promotorregulation verzichtet.

### 5.1.2 Konstruktion des Targetingvektors

Der in dieser Arbeit generierte PEX19-Targetingvektor wurde nach der sog. „*Replacement-Strategie*“ konstruiert. Sequenzanteile, die sich zwischen den homologen Armen des Vektors befinden, werden bei einer homologen Rekombination an Stelle der dort ursprünglich lokalisierten Sequenzen ins Genom integriert („*replacement*“). Sequenzen außerhalb der homologen Bereiche gehen dagegen verloren. Enthält der integrationsfähige Bereich bereits selbst Deletionen, so können chromosomale Gene gezielt deletiert werden.

Der PEX19-Targetingvektor enthielt etwa 3,7 kb des 5'- und etwa 2,3 kb des 3'-flankierenden Bereiches des PEX19-Gens, da für eine effiziente homologe Rekombinationsreaktion die Homologiebereiche eine Homologie von mindestens 5 kb bis höchstens 15 kb aufweisen sollten (Thomas & Capecchi, 1987; Hasty et al., 1991a, b). Außerdem enthielt der PEX19-Targetingvektor zusätzlich Selektionsmarkergene, die eine Anreicherung von homologen Rekombinanten erlauben. Der zur Konstruktion des PEX19-Targetingvektors eingesetzte Vektor *pKO Scrambler NTK 1908*<sup>®</sup> wies zur Positivselektion das bakterielle Neomycinresistenzgen (NEO) unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK-Promotors) und zur Negativselektion das Thymidinkinase-Gen (TK) unter der Kontrolle des MC1-Promotors (Mario Capecchi-Promotor 1) auf (siehe Kapitel 7.3.1).

Das Neomycinresistenzgen befand sich im PEX19-Targetingvektor zwischen den homologen Sequenzen des PEX19-Gens (s. Abbildung 4.3). Dieses Resistenzgen wird bei der Rekombination co-integriert und schützt so die ES-Zellen vor Geneticin (G418), einem in höheren Dosen auch für Säugetierzellen toxisch wirkenden Antibiotikum (Thomas & Capecchi, 1987). Somit konnten in Anwesenheit von G418 nur die Zellen wachsen, die das Neomycinresistenzgen in ihr Genom integriert hatten, unabhängig ob durch homologe oder nicht-homologe Rekombination (positive Selektion). Das Thymidinkinase-Gen wurde außerhalb der homologen Region des Targetingkonstrukts platziert, so dass es nach homologer Rekombination nicht erhalten bleibt, während es bei zufälliger Integration der DNA meist ebenfalls in das Genom eingebaut wird. Die Thymidinkinase (TK) phosphoryliert Nukleosid-Analoga wie z.B. Ganciclovir (GANC), die dadurch eine cytotoxische Wirkung erhalten (St Clair et al., 1984). Bei nicht-homologer Rekombination und gleichzeitiger Integration der Thymidinkinase würde in neu synthetisierte DNA eingebautes Ganciclovir zum Kettenabbruch bei der DNA-Replikation führen und dadurch schließlich den Zelltod (negative Selektion) einleiten (Mansour et al., 1988).

Wie von Capecchi (1994) beschrieben, ist die Linearisierung des Targetingvektors essentiell, weil nur linearisierte Vektoren zu einer homologen Rekombination führen. Deshalb wurde der fertige PEX19-Targetingvektor vor der weiteren Verwendung mit *NotI* linearisiert.

### 5.1.3. Generierung chimärer Mäuse

Mit Hilfe des konventionellen „*gene targeting*“ wurde ein Maus-Modell mit ubiquitärer Deletion des PEX19-Gens, d. h. ein konventioneller Knockout, generiert.

Die Transfektion des linearisierten Targetingvektors in embryonale Stammzellen (ES Zellen) der Maus führte zu 2 ES-Zellklonen, bei denen das PEX19-Gen genetisch modifiziert war. Diese beiden ES-Zellklone wurden erfolgreich in Blastocysten (frühe Mausembryonen) injiziert, die anschließend in scheinchwangere Leihmütter implantiert wurden. Aus den implantierten Embryonen entwickelten sich 8 männliche Chimären, die mit weiblichen C57BL/6JCrI-Wildtyptieren rückgekreuzt wurden. Anhand der Genotypisierung konnte nachgewiesen werden, dass die Manipulation des PEX19-Gens auf genomischer Ebene erfolgreich war, und dass von den insgesamt 8 Chimären nur 5 das veränderte Allel an ihre Nachkommen weitergaben.

Mit Hilfe der RT-PCR konnte bestätigt werden, dass das Fehlen der Exons 2 bis 6 auf genomischer Ebene auch zur Bildung eines verkürzten Transkriptes führt.

### 5.1.4 Vor- und Nachteile des konventionellen „*gene targetings*“ von PEX19

Die Methode des konventionellen „*gene targeting*“ führt bereits zu Beginn der embryonalen Entwicklung zur Inaktivierung eines Gens in allen Zellen eines Organismus. Demgegenüber ist beim konditionellen „*gene targeting*“ die genetische Modifikation auf eine bestimmte Zeit des Lebenszyklus oder auf einen bestimmten Gewebetyp beschränkt. Dies basiert darauf, dass durch die Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle eines entwicklungs- oder gewebespezifischen Promotors steht, die mit loxP-Sequenzen flankierten („gefloxten“) Bereiche des zu eliminierenden Gens aus dem Genom herausgeschnitten werden (Thomas & Capecchi, 1987). Kürzlich wurde von Perl et al. (2009) jedoch gezeigt, dass die auch Expression von Cre-Rekombinase für die betroffenen Zellen toxische Effekte haben kann.



Bei der Generierung der PEX19 KO-Maus wurde die Methode des konventionellen „*gene targeting*“ angewendet, weil sie für dieses Mausmodell entscheidende Vorteile gegenüber einem konditionellen (gewebe- oder entwicklungspezifischen) Knockout bietet. Durch die Inaktivierung des PEX19-Gens in allen Geweben ist der Phänotyp des Zellweger Syndroms in stärkster Ausprägung und in allen Zellen vorhanden. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass der KO-Phänotyp durch andere Zellen kompensiert oder abgeschwächt wird, wie z.B. bei der leberspezifischen PEX5 KO-Maus zu beobachten war (Dirkx et al., 2005). Da der Gendefekt bereits embryonal vorhanden ist, wird demzufolge außerdem ermöglicht, dass die für Zellweger Syndrom charakteristischen embryonalen Fehlbildungen (z.B. Migrationsstörungen im zentralen Nervensystem) nachweisbar sind.

Die bei der Generierung der Pex19 KO-Maus angewandte „Replacement“-Strategie könnte natürlich auch gewisse Nachteile beinhalten. So könnte durch das Einbringen von Selektionsmarkern die Regulation oder auch das korrekte Splicen des Zielgens gestört werden (Jacks et al., 1994, Carmeliet et al., 1996). Selektionsmarker stehen in der Regel unter der Kontrolle starker Promotoren. Diese können unter Umständen auch die Expression benachbarter Gene beeinflussen (Fiering et al., 1993; Olson et al., 1996). Sogar von Störungen der Expression von Genen in mehr als 100 kb Entfernung zu dem integrierten Gen ist berichtet worden (Pham et al., 1996). Hierdurch können phänotypische Veränderungen der Maus verursacht werden, die fälschlicherweise der angestrebten genetischen Modifikation zugeordnet werden. Dieser Nachteil tritt allerdings auch bei konditionellen Knockout-Mäusen auf, wenn zuvor eingefügte Resistenzmarker vor der tatsächlichen Generierung des Mausmodells nicht in der ES-Zellkultur durch transiente Cre-Expression eliminiert wurden.

Ein weiterer Nachteil des klassischen „*gene targetings*“ ist, dass Genfunktionen, die erst in späteren Entwicklungsstadien wichtig werden, durch frühe Defekte überspielt werden können. Auch ist es möglich, dass die Funktion des fehlenden Proteins durch die vermehrte Expression eines funktionell ähnlichen Proteins übernommen wird, und es daher zu nicht zu der Ausprägung des gewünschten Phänotypes kommt (Hanks et al., 1995). Im Fall der Pex19 KO-Maus existieren jedoch weitere Mausmodelle für Zellweger Syndrom, die durch Ausschalten des Matrixproteinimportes oder der Peroxisomenproliferation generiert wurden (Faust & Hatten, 1997; Baes et al., 1997; Maxwell et al., 2003; Brites et al., 2003; Li et al., 2002a, b). Diese können zum Vergleich gefundener Veränderungen herangezogen werden. Weiterhin sind auch Daten von humanen Patienten mit Zellweger Syndrom sowie Daten aus Biogenesestudien mit Hefen vorhanden, weshalb eine Fehlinterpretation der gefundenen

Veränderungen damit weitestgehend ausgeschlossen werden kann (Kunau, 1992, 1998; Gould et al., 2001).

Gelegentlich entsteht beim konventionellen „*gene targeting*“ von Genen, die bereits während der Embryonalentwicklung exprimiert werden, der Nachteil, dass die Lebensfähigkeit der genetisch veränderten Nachkommen *in utero* oder *post partum* vermindert ist. Daraus resultiert, dass möglicherweise kein mutierter Organismus vorhanden ist, an dem die Auswirkungen des Gendefekts untersucht werden können (Iredale, 1999; Bockamp et al., 2002). Obwohl mit dem Ausschalten des PEX19-Gens bereits in einem früheren Stadium der Peroxisomenentstehung eingegriffen wurde, so dass von den schwersten Störungen ausgegangen werden musste, wurden lebensfähige PEX19 KO-Mäuse geboren, die jedoch bereits wenige Stunden nach der Geburt starben. Diese geringe Überlebensdauer der Zellweger-Mäuse wurde bereits in Studien mit anderen Mausmodellen mit Zellweger Syndrom (Matrixproteinimportdefekt) beschrieben (Baes et al., 1997; Faust & Hatten, 1997; Maxwell et al., 2003; Brites et al., 2003). Um auszuschließen, dass bei der Pex19 KO-Mauslinie Nachkommen vermehrt bereits *in utero* sterben, wurde untersucht, ob sich die Genotypen der Jungtiere nach Mendelschen Regeln aufspalten. Hierbei würden Abweichungen vom 1:2:1 Verhältnis zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten PEX19-Tieren auf letale Effekte der Gendeletion *in utero* hinweisen. Von 47 Würfen aus Verpaarungen heterozygoter Tiere mit C57BL/6JCrI-Hintergrund der Generationen F1, N6 und N7 wurden insgesamt 357 Tiere genotypisch charakterisiert. Der Anteil an Wildtyp-Tieren entsprach 26 %, an heterozygoten Tieren 51 % und an homozygoten Tieren 23 %. Damit waren die Mendelschen Regeln erfüllt und es gab somit keine Hinweise auf ein frühes Absterben von Embryonen *in utero*.

Die PEX19 KO-Mäuse waren oftmals deutlich dehydriert, was vor allem bei den Tieren auftrat, die bereits während der Nacht geboren wurden. Wegen ihrer Trinkschwäche waren diese Tiere mit Flüssigkeit unterversorgt. Diese Situation erforderte zum einen eine neue, schnellere Methode der Genotypisierung, um zu vermeiden, dass die Tiere bereits während der zur Genotypisierung benötigten Zeit sterben. Zum anderen galt es, den neugeborenen Tieren ausreichend geeignetes Gewebe für die Genotypisierung zu entnehmen, ohne gegen das Tierschutzgesetz zu verstoßen. Gleichzeitig durfte aber auch die Lebenserwartung der homozygoten KO-Tiere durch die Biopsieentnahme nicht zusätzlich verkürzt werden. Denn durch die zusätzliche Belastung eines Blutverlustes, wie er bei einer Blutentnahme oder bei der regulären Entnahme von Schwanzbiopsien entsteht, würde die Lebenserwartung der dehydrierten Mäuse extrem verschlechtert werden. Daher wurden ca. 3 mm der

Schwanzspitze mit einem Elektrokauter abgetrennt, dessen heiße Drahtschlinge eine sofortige Blutstillung durch „Verschweißen“ der Wunde garantierte.

Grundsätzlich stellte die eingeschränkte Lebenserwartung von Pex19 KO-Mäusen ein enormes Problem dar. Die damit verbundene geringe Menge an Lebergewebe neonataler (P 0,5) Mäuse führte zum Beispiel dazu, dass das bestehende Protokoll der differentiellen Zellfraktionierung modifiziert werden musste, um diese Methode überhaupt durchführen zu können. Es wurde ein Protokoll etabliert, durch das es möglich wurde, eine Minimalmenge von ca. 0,1 g Lebergewebe neonataler Mäuse (P 0,5) erfolgreich in die Zellfraktionierung einzusetzen. Selbst diese geringe Menge Lebergewebe erhielt man nur, indem Gewebe mehrerer Tiere mit identischem Genotyp gemeinsam verarbeitet wurde.

### 5.1.5 Zucht in verschiedenen genetischen Hintergründen

Bei der Generierung genetisch veränderter Mäuse werden zur Identifizierung der transgenen Nachkommen (Chimären) neben molekulargenetischen Untersuchungen gerne ES-Zellen und Blastocysten aus Mausstämmen oder Mauslinien mit unterschiedlicher Fellfarbe genommen. Chimäre Tiere können dann bereits anhand der „gescheckten“ Fellfarbe identifiziert werden. Zur Etablierung einer transgenen Linie werden die Chimären mit nicht-transgenen Wildtyptieren verpaart. In der Regel werden dazu Inzuchtstämme verwendet, da man nach Rückkreuzung über zehn Generationen eine genetische Uniformität erhält. Der genetische Hintergrund ist im neu erstellten Stamm bis auf den Teil ausgetauscht, der den Transgenlocus enthält (Hogan et al., 1994; Overbeek, 1994).

Dass der genetische Hintergrund durchaus auch Einfluss auf die Ausprägung des Gendefektes hat, ist bereits von anderen Knockout-Modellen bekannt, wie zum Beispiel einem Modell für Morbus Parkinson (Perez & Palmiter, 2005). Auch bei dem PEX2 KO-Modell für Zellweger Syndrom wurde beobachtet, dass bei Verpaarung dieser Tiere mit dem Auszuchtstamm *Swiss Webster* die resultierenden Nachkommen weniger unter Hypotonie litten und sogar bis zu 36 Tagen überlebten, während die Nachkommen mit C57BL/6J-Hintergrund bereits wenige Stunden nach der Geburt starben (Faust, 2003; Keane et al., 2007).

Im Gegensatz zu den erwähnten Inzuchtstämmen werden Auszuchtstämme gerne bei Fragestellungen eingesetzt, bei denen die Ergebnisse über bestimmte physiologische und pathophysiologische Mechanismen auf den Menschen übertragen werden sollen. Hier

möchte man über eine höhere Variabilität zwischen den einzelnen Tieren verfügen. Diese Voraussetzung können zum einen durch die Verwendung von Auszuchtstämmen geschaffen werden, mit denen die Chimären zurückgekreuzt werden. Zum anderen ist es auch möglich, F<sub>2</sub>-Hybride aus Inzuchtstämmen zu verwenden, die man sich selbst züchtet. Um sich die Möglichkeiten von Uniformität und Variabilität offen zu halten, empfiehlt sich der Aufbau eines multivariaten Versuchsansatzes (Festing, 1980; Sprott, 1997). Aus diesem Grund wurden die PEX19-Chimären mit Tieren aus den Inzuchtstämmen C57BL/6JCrI, 129S1/SvImJ und BALB/cOlaHsd verpaart. Durch Verkreuzung von heterozygoten PEX19 - Mäusen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund ließen sich dann auch im Bedarfsfall F<sub>2</sub>-Hybride züchten. Die Charakterisierung der phänotypischen Veränderungen bei PEX19-Defizienz wurde wegen des großen experimentellen Aufwandes und der limitierten Haltungskapazitäten im zentralen Tierlabor der Universität (ZTL) jedoch nur mit PEX19-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6JCrI durchgeführt.

## **5.2 Charakterisierung der PEX19 KO-Maus mit C57BL6/JCrI-Hintergrund als neues Mausmodell für Zellweger Syndrom**

Um die PEX19 KO-Maus als ein neues Tiermodell für Zellweger Syndrom etablieren zu können, musste nachgewiesen werden, dass die PEX19-defizienten Tiere auch die entsprechenden Organdefekte sowie strukturellen- und metabolischen Veränderungen aufweisen, die für humane Zellweger-Patienten charakteristisch sind. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Dissertation unter diesem Aspekt diskutiert. Zusätzlich werden auch Vergleiche mit Studien der bisher beschriebenen konventionellen Mausmodelle für peroxisomale Biogeneseerkrankungen (PEX2: Faust & Hatten, 1997; PEX5: Baes et al., 1997; PEX7: Brites et al., 2003; PEX11: Li et al., 2002a, b; Pex13p: Maxwell et al., 2003) oder mit Ergebnissen aus Zellkulturen gezogen.

### **5.2.1 Nachweis peroxisomaler Membranstrukturen**

Ein grundlegendes Charakteristikum von humanen Patienten mit Zellweger Syndrom ist das Fehlen funktionsfähiger Peroxisomen (Goldfischer et al., 1973; Weller & Gärtner, 2002). Darüber hinaus ist aus früheren Studien bekannt, dass Fibroblasten von Zellweger Patienten, deren Membran- und Matrixproteinimport gestört ist, zwar keine funktionsfähigen Peroxisomen, aber peroxisomale Membranstrukturen aufweisen, die sog. „ghosts“ (Santos et

al., 1988 a und b; Yamasaki et al., 1999). Ausnahmen bilden humane Zellen mit defekter Synthese der peroxisomalen Proteine Pex3p, Pex16p und Pex19p, bei denen auch keine „ghosts“ nachweisbar waren (South & Gould, 1999; Matsuzono et al., 1999; Shimozawa et al., 2000, 2002). Im Gegensatz dazu wurden durch Immunfluoreszenzanalysen am Dekonvolutionsmikroskop in PEX3-defizienten Hefezellen (*P. pastoris*) peroxisomale Membranstrukturen identifiziert (Hazra et al., 2002).

Zum Nachweis der Peroxisomendefizienz wurden PEX19 KO-Mäuse mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und Antikörpern gegen die Markerproteine Katalase und Pex14p auf das Vorkommen von Peroxisomen untersucht. Mit beiden Antikörpern konnte an Paraffinschnitten und an embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) gezeigt werden, dass sowohl der Import von Membran- als auch von Matrixproteinen gestört ist. Beide Proteine wiesen nicht das typische punktförmige Muster der regelgerechten peroxisomalen Lokalisation auf, sondern waren in Cytoplasma und Zellkern (Katalase) oder in Mitochondrien (Pex14p) lokalisiert.

Um festzustellen, ob bei der PEX19 KO-Maus Membranreststrukturen („ghosts“) vorhanden sind, wurden Ultradünnschnitte von Lebern neugeborener Wildtyp- und PEX19 KO-Mäuse elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden in den Hepatozyten der PEX19 KO-Mäuse knäuelartige Membranstrukturen in der Nähe von Glykogenfeldern gefunden, an denen normalerweise reguläre Peroxisomen in Wildtyptieren lokalisiert wären (Baes et al., 1997; Baumgart et al., 2003). In ihrem Aussehen ähneln die in den PEX19 KO-Mäusen gefundenen „ghosts“ den komplexen Membranstrukturen, die bei PEX6-defizienten CHO-Zellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (Hashiguchi et al., 2002). Der Beweis, dass es sich bei den in Pex19 KO-Zellen gefundenen Membranstrukturen tatsächlich um peroxisomale Membranvorläufer handelt, ist jedoch äußerst schwierig (s. u.), da letztendlich alle Membranproteine mit Ausnahme der Typ II-PMPs von Pex19p zur Membran transportiert werden (s. u.). Zu diesen Typ II-PMPs gehören Pex3p und Pex16p, die nur in ganz geringer Menge in Wildtypzellen vorhanden sind (Rottensteiner et al., 2004).

Seit der Entdeckung der Peroxisomen 1954 durch Rhodin existieren mehrere Modelle über den Ablauf der Peroxisomenbiogenese (Rhodin, 1954). Zunächst wurde angenommen, dass Peroxisomen durch Abknospung vom endoplasmatischen Retikulum entstehen, da die Lipidzusammensetzung der Peroxisomen der des endoplasmatischen Retikulums ähnelte, und da das endoplasmatische Retikulum Ort der Lipidsynthese ist (DeDuve & Baudhuin, 1966). Die 1980 postulierte Hypothese über die Existenz eines „peroxisomalen Retikulums“ (Lazarow et al., 1980) wurde 1985 durch das von Lazarow und Fujiki vorgeschlagene

*growth and division* Modell ersetzt, wonach Peroxisomen durch Teilung von bereits existierenden Peroxisomen entstehen. Wachstum und Reifung der Tochterperoxisomen werden dann durch den Import spezifischer peroxisomaler Proteine erreicht (Lazarow & Fujiki, 1985). Nach derzeitiger Sicht vereint die peroxisomale Biogenese sowohl die Entstehung von Peroxisomen durch Teilung aus bestehenden Peroxisomen als auch die Möglichkeit einer Entstehung von Peroxisomen aus nicht peroxisomalen Membranstrukturen unbekannter Herkunft. In diesem Zusammenhang hatten verschiedene Arbeitsgruppen bereits in Überexpressionsstudien mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Analysemethoden gezeigt, dass neu gebildetes Pex3p oder Pex16p beim Fehlen peroxisomaler Strukturen im endoplasmatischen Retikulum angereichert werden (Höpfner et al., 2005; Kragt et al., 2005; Tam et al., 2005; Kim et al., 2006; Karnik & Trelase, 2007). Damit kam erneut eine Diskussion über eine Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums in der peroxisomalen Biogenese auf. Die meisten dieser Untersuchungen wurden jedoch an Zellkulturen durchgeführt, deren Zellen entweder manipuliert waren oder bei denen die Expression der untersuchten Proteine wesentlich über das natürliche Level angehoben wurde, um eine Detektion zu ermöglichen. Letzteres kann jedoch zu artifiziellen Ergebnissen besonders bei der Untersuchung von Membranproteinen führen, wie es bereits von anderen Autoren beschrieben wurde (Stroobants et al., 1999; Borgese et al., 2001). Die Möglichkeit, dass es sich bei der Anreicherung von Pex3p und Pex16p im endoplasmatischen Retikulum um eine Artefaktbildung durch Überexpression handelt, wird von Toro et al. (2007) unterstrichen, der an CHO-Zellen nachwies, dass peroxisomale Membranproteine nicht ins endoplasmatische Retikulum transportiert werden, wenn genügend peroxisomale Membranstrukturen („ghosts“) vorhanden sind. Seine Aussage wird durch Western Blot-Analysen von Zellfraktionen der PEX19 KO-Mäuse gestützt. Während Pex3p durch Western Blot-Analysen in den Zellfraktionen von Wildtyp-PEX19-Mäusen nachgewiesen werden konnte, fehlte es bei den PEX19 KO-Mäusen. Pex3p war bei den PEX19 KO-Mäusen in keiner Zellfraktion nachweisbar, d.h. auch nicht im endoplasmatischen Retikulum (Mikrosomenfraktionen). Dies legte die Vermutung nahe, dass Pex3p sofort degradiert wird, denn RT-PCR-Analysen hatten belegt, dass eine PEX3-mRNA gebildet wird. Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass ein geringer Teil von Pex3p in die wenigen Membranvorstufen eingebaut wird, die elektronenmikroskopisch an Glykogenfeldern detektiert werden konnten. Für den endgültigen Nachweis der Herkunft der Peroxisomenmembran müssen jedoch die bestehenden Methoden verfeinert werden und entsprechend gute Antikörper zur Verfügung stehen, was bisher noch nicht der Fall war. Von den zwei ausgetesteten Pex3p-Antikörpern war leider keiner gut genug. Es gelang, das nativ exprimierte Pex3p nur in Wildtyp- nicht aber in PEX19 KO-Fibroblasten nachzuweisen. Vermutlich liegt die vorhandene Proteinmenge von

Pex3p in PEX19-defizienten Zellen unter dem Detektionslimit der gängigen fluoreszenz-mikroskopischen Verfahren.

Obwohl gerade die Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums am Transport von peroxisomalen Membranproteinen intensiv untersucht wird, ist bisher nur wenig darüber bekannt, woher die Phospholipide der Peroxisomenmembran stammen. Peroxisomen besitzen keine Enzyme, um selbst die Lipide zu synthetisieren, die sie für ihr Wachstum und ihre Proliferation benötigen (Bishop & Bell, 1988; Zinser et al., 1991). Daher wurde angenommen, dass Lipide vom endoplasmatischen Retikulum über Vesikel zu den Peroxisomen transportiert werden (Höpfner et al., 2005; Schekman, 2005). Dies setzt jedoch einen engen Kontakt zwischen den Membranen beider Organellen voraus. Neuere Studien postulieren einen nicht-vesikulären Transfer der Lipide zwischen endoplasmatischem Retikulum und Peroxisomen durch Lipid-Transferproteine über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus (Raychaudhuri & Prinz, 2008). In den elektronenmikroskopischen Schnitten der PEX19 KO-Mäuse war eine direkte Verbindung der mutmaßlichen peroxisomalen „ghosts“ zum rauen endoplasmatischen Retikulum jedoch nicht vorhanden, sondern nur laterale Kontakte zum glatten endoplasmatischen Retikulum, die bereits bei Wildtyptieren (Rind, Ratten, Maus) nachgewiesen wurden (Zaar et al., 1987; Baumgart et al., 1989; Geuze et al., 2003). Die exakte Herkunft der gefundenen Membranstrukturen und deren Lipid- und Proteinzusammensetzung müssen in zukünftigen funktionellen Studien und ultrastrukturellen Serienschnittanalysen geklärt werden.

### **5.2.2 Mislokalisierung peroxisomaler Proteine in PEX19 KO-Mäusen**

Sowohl mit Western Blot-Analysen, als auch mit Immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte in PEX19 KO-Mäusen nachgewiesen werden, dass Katalase im Cytoplasma und im Zellkern mislokalisiert ist. Auch die Lokalisation der Matrixenzyme Acyl-CoA-Oxidase 1 (ACOX I) und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase wurde in Western Blot-Analysen untersucht. ACOX I, das Enzym des ersten Schrittes der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation, ist ein 75 kDa großes Protein, das nach dem Import in Peroxisomen proteolytisch in eine 22 kDa- und eine 53 kDa-Einheit gespalten wird (Miyazawa et al., 1989). In Zellen von Wildtyp- und heterozygoten PEX19-Mäusen konnten durch den hier verwendeten Antikörper für ACOX I sowohl das 75 kDa-Protein als auch die 22 kDa-Einheit detektiert werden. Dagegen fehlte in PEX19 KO-Mäusen die ACOX I 22kDa-Einheit, was darauf hindeutet, dass mislokalisierte ACOX I auch nicht in ihre Untereinheiten aufgespaltet wird. Die Verteilung von ACOX I auch auf andere Fraktionen resultierte hier

sicherlich aus der cytoplasmatischen Fehllokalisierung bei den PEX19 KO-Tieren. Dass manche Matrixenzyme (z.B. Katalase und ACOX I) in Wildtyp-Pex19-Tieren in geringen Mengen auch in der cytosolischen Fraktion (C) nachweisbar waren, beruht dagegen höchstwahrscheinlich auf der mechanischen Zerstörung der empfindlichen Peroxisomenmembran während der Isolierung und damit der Freisetzung der leicht löslichen Matrixproteine in den Überstand.

Im Gegensatz zu Katalase und ACOX I konnte das Matrixenzym 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, das dritte Enzym des ersten peroxisomalen  $\beta$ -Oxidationsweges, nicht im Cytoplasma von PEX19 KO-Tieren nachgewiesen werden, dafür aber hauptsächlich in der schweren und leichten mitochondrialen Fraktion und in geringen Mengen auch in der Mikrosomenfraktion. Offensichtlich ist es im Cytoplasma nicht stabil und wird schneller abgebaut als ACOX I oder Katalase. Der Nachweis von Thiolase in anderen Fraktionen könnte daher eher aus einer Assoziation mit anderen Zellorganellen von der cytoplasmatischen Seite her (über Pex5p, s. u.) oder durch die Aufnahme in autophagische Vakuolen resultieren.

Die hier beschriebenen Befunde für die Lokalisation von Matrixproteinen in PEX19 KO-Mäusen ähneln denen von PEX2-, PEX5-, und PEX13 KO-Tieren mit peroxisomaler Matrixproteindefizienz (Faust & Hatten, 1997; Baes et al., 1997; Maxwell et al., 2003). Dies spricht für die Spezifität des PEX19 KO-Modells.

Neben der Lokalisation der Matrixproteine war besonders das Schicksal peroxisomaler Membranproteine beim Fehlen ihres „Shuttle-Rezeptors“ Pex19p interessant. Die an PEX19 KO-Mäusen durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten, dass ABCD3 degradiert wurde, während Pex13p im endoplasmatischen Retikulum und Pex14p an Mitochondrien gebunden vorlagen. Die mitochondriale Lokalisation von Pex14p wurde darüber hinaus auch durch Immunfluoreszenzanalysen an Paraffinschnitten und in Zellkultur nachgewiesen. Zusätzlich konnte bei den Analysen in Zellkultur gezeigt werden, dass ABCD3 in Lysosomen abgebaut wird. Im Gegensatz dazu konnten bei KO-Mäusen mit peroxisomalem Matrixproteinimport oder Proliferationsdefekt (Faust & Hatten, 1997; Baes et al., 1997; Li et al., 2002a, b; Maxwell et al., 2003; Brites et al., 2003) keine Misslokalisierung peroxisomaler Membranproteine nachgewiesen werden, da deren Import durch die Mutation nicht betroffen war. Dagegen ist aus früheren Untersuchungen mit peroxisomendefizienten CHO-Zellen oder Fibroblasten-Kulturen von Patienten der verschiedenen Komplementationsgruppen für das Zellweger Syndrom-Spektrum bekannt, dass peroxisomale Membran- und auch Matrixproteine entweder zu anderen Organellen fehlgeleitet, abgebaut oder nicht prozessiert werden (Shimozawa et al., 1992; Tsukamoto et al., 1990; Okumoto et al., 1997; Tateishi et



al., 1997; Kinoshita et al., 1998; Otera et al., 1998; Tamura et al., 1998). Wie bei den PEX19 KO-Mäusen waren dann die Matrixenzyme in erster Linie im Cytoplasma nachweisbar. Analog zu der vorliegenden Arbeit hatten Untersuchungen an humanen PEX19-defizienten Fibroblasten gezeigt, dass ABCD3 degradiert wird, während Pex14p an Mitochondrien gebunden vorliegen (Sackstedter et al., 2000).

Neben der Verteilung peroxisomalen Membran- und Matrixproteinen wurde auch die Verteilung des cytoplasmatischen Rezeptors Pex5p untersucht. In Wildtypzellen ist Pex5p größtenteils cytoplasmatisch lokalisiert, jedoch ist auch eine geringe Menge dieses Proteins immer an der Außenseite der Peroxisomenmembran über die Bindung an den Dockingkomplex angeheftet (Eckert & Erdmann, 2001). Deshalb ist Pex5p auch in der schweren und der leichten Mitochondrienfraktion nachweisbar. Bei PEX19 KO-Tieren war Pex5p eindeutig im Cytoplasma, in geringen Mengen aber auch in der schweren Mitochondrienfraktion vorhanden. Da nachweislich Peroxisomen als Dockingpartner fehlen, ist eine Assoziation von Pex5p über Pex14p an Mitochondrien denkbar, wenn Pex14p in die Außenmembran der Mitochondrien integriert wäre. Möglicherweise sind deshalb auch AOX I und Thiolase über Pex5p an Mitochondrien gebunden.

### **5.2.3 Biochemische Veränderungen ausgesuchter Fettsäuren und von Plasmalogen bei PEX19 KO-Mäusen**

In Peroxisomen findet ein großer Teil des intrazellulären Lipidmetabolismus statt. Da Patienten mit Zellweger Syndrom keine funktionsfähigen Peroxisomen besitzen, zeigen sie entsprechende biochemische Auffälligkeiten dieser Stoffwechselwege. Die Konzentrationen verschiedener peroxisomenabhängiger Stoffwechsel-Metabolite weicht stark vom physiologisch normalen Bereich ab (Wanders, 2004; Wanders & Waterham, 2006). Die peroxisomale Dysfunktion führt beim Menschen unter anderem zur Senkung des Plasmalogenpiegels und zur Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFA) und Phytansäure im Serum. Diese Parameter werden üblicherweise bei einer diagnostischen Screening-Untersuchung bestimmt (Gärtner, 2004; Weller & Gärtner, 2002). Zusätzlich zu diesen Parametern wurden in dieser Dissertation die Werte für eine Auswahl mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Leber, Gehirn und Blut von PEX19-Mäusen aller Genotypen bestimmt. Dabei handelt es sich um die erste Analyse mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei neugeborenen Zellweger-Mäusen. Ähnliche Untersuchungen wurden nur in Langzeitstudien mit Mausmodellen für peroxisomale ABCD-Transporter durchgeführt (Fourcade et al., 2009)

Die homozygoten Pex19 KO-Mäuse zeigten die erwartete Akkumulation sehr langkettiger Fettsäuren, sowie die Reduktion der Plasmalogene. Dagegen wies die PEX19-Mutante keine Anreicherung von Phytansäure auf. Im Vergleich zu den Befunden der PEX19 KO-Mäuse wurde bei der PEX7 KO-Maus (P 0,5) eine leichte Erhöhung von Phytansäure nachgewiesen (Brites et al, 2003). Durch Fütterung mit einer speziellen phytolhaltigen Diät konnte jedoch bei 8-Wochen-alten PEX7 KO-Maus der Phytansäurespiegel drastisch erhöht werden. Weiterhin wurde bei leberspezifischen PEX5-KO-Mäusen (20 Wochen alt) eine zwanzigfache Erhöhung von Phytansäure beschrieben (Dirkx et al., 2005). Bei den beiden vorher genannten Mauslinien ist durch den PEX5- bzw. PEX7-Gendefekt die  $\alpha$ -Oxidation beeinträchtigt, so dass dies als Ursache für die fehlende Metabolisierung der Phytansäure angegeben wurde. Auch bei den Pex19 KO-Mäusen dürfte daher aufgrund der fehlenden Peroxisomen keine  $\alpha$ -Oxidation stattfinden. Die Ursache für den normalen Phytansäurespiegel bei der homozygoten PEX5 KO-Maus ist sicherlich im Alter der Tiere zu sehen. Für die Probenentnahme wurden die PEX19 KO-Tiere direkt nach der Geburt tierschutzgerecht getötet. Überschüssige Metabolite der Föten konnten bis zur Geburt über die Placenta abtransportiert werden. Offensichtlich kann damit eine Akkumulation von Phytansäure, nicht aber von sehr langkettigen Fettsäuren, verhindert werden.

Durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation werden die Zellen vor der Akkumulation von unlöslichen VLCFA geschützt. Fehlen Peroxisomen, können die Fettsäuren nicht abgebaut werden und müssen auf anderem Weg verstoffwechselt werden. Dies kann durch Phagozytose in Makrophagen geschehen, die abgestorbene Zellen entfernen. Akkumulation von Fettsäureestern in Form trilamellarer Kristalle in Makrophagen des Gehirns bei Patienten mit Adrenoleukodystrophie wurde bereits durch Johnson et al. (1976) elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Bei diesen Patienten kommt es bei der Demyelinisierung zum Abbau der Myelinscheiden durch Makrophagen und damit zur Akkumulation von VLCFA in deren Phagosomen mit lysosomalen Enzymen. Auch in elektronenmikroskopischen Präparaten von PEX19 KO-Mäusen wurden Lysomen mit Fettsäurekristallen in Hepatocyten gefunden. Nach der Hypothese von Powers (2001) könnten überschüssigen Fettsäuren, speziell VLCFA und Phytansäure, in Zellmembranen eingebaut werden. Eine Veränderung der Organellenmembran und ein damit verbundener Untergang von Zellorganellen scheint zu vermehrter Autophagozytose und zur vermehrten Bildung von großen Autophagosomen beizutragen (Baes et al. 1997; Li et al., 2002b). Auch der Abbau von kompletten Peroxisomen findet normalerweise in Lysosomen statt (Schrader & Fahimi, 2008), so dass bei vermehrtem Abbau peroxisomaler Membranproteinen auch ABCD3 in diesen Organellen nachgewiesen werden konnte, wie Western Blot-Analysen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von PEX19 KO-MEFs zeigten. Zusätzlich könnten durch Einlagerung von

VLCFA Plasmamembraneigenschaften verändert werden und dadurch besonders empfindliche Zellen absterben. Daher wurde bei Säugern die Akkumulation von VLCFA besonders während der Entwicklung des Gehirns als Grund für die für Zellwegerpatienten typischen Migrationsstörungen angegeben (Moser & Moser, 1996; Powers & Moser, 1998; Powers et al. 1999; Faust et al., 2001; Hulshagen et al., 2008). Besonders in Membranen des Myelins wurden für peroxisomale Krankheiten erhöhte VLCFA-Werte nachgewiesen. Deshalb wurde ein destabilisierender Effekt von VLCFA auf das Myelin für möglich gehalten, der eine Dys- oder Demyelinisierungen verursacht (Bizzozzerro, et. al., 1991; Ho et al., 1995; Powers et al., 2000). Untersuchungen verschiedener Mausmodelle zeigten jedoch, dass die neurologischen Defekte (Migrationsstörungen) nicht unbedingt an Akkumulation von VLCFA und die Dysfunktion der  $\beta$ -Oxidation gekoppelt sind (Li et al, 2002b; Baes et al., 2002b). Als weitere Gründe wurden die gestörte Etherphospholipidsynthese (Plasmalogene) sowie die Reduktion von Docosahexaensäure diskutiert (Janssen et al., 2003; Brites et al., 2009).

Biologische Membranen setzen sich aus Cholesterol, Glyco- und Phospholipiden zusammen. Bis zu 18 % der Gesamtmenge an Phospholipiden machen beim Menschen Plasmalogene aus, wobei ihre Zusammensetzung und Verteilung zell- und gewebespezifisch ist (Wanders & Waterham, 2006). Die Hälfte bis zwei Drittel der Ethanolamin-Phospholipide im gesamten Gehirn und 11-12 % der Myelinlipide sind Plasmalogene (Nagan & Zoeller, 2001). Da nicht nur bei peroxisomalen sondern auch bei anderen neurologischen Erkrankungen Veränderungen im Plasmalogengehalt gemessen wurden (z.B. Morbus Alzheimer; Ginsberg et al. 1995), wird angenommen, dass Plasmalogene die Nervenzellen vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) schützen (Zoeller et al., 1988; Brosche & Platt, 1998). Durch ihre Enoletherdoppelbindung an der Position C-1 sind sie sehr empfänglich für ungepaarte Elektronen von Radikalen, wodurch sie antioxidativ wirken können (Yavin & Gatt, 1972). Darüberhinaus sollen Plasmalogene noch an Membranfusionen sowie an Ionen-transport und Cholesterolefflux beteiligt sein (Farooqui & Horrocks, 2001). Vermutlich fungieren Plasmalogene auch als Quelle mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA) der  $\omega$ -3 oder  $\omega$ -6 Familie, die an der Position C-2 der Plasmalogene gebunden sind. Bei Patienten mit peroxisomalen Erkrankungen wurden daher nicht nur Veränderungen im Plasmalogengehalt, sondern auch in der Zusammensetzung der PUFA speziell im Gehirn gefunden (Martinez & Mougan, 1999). Charakteristisch war hier neben einer Erhöhung des Arachidonsäurespiegels und einer leichten Reduktion des Docosatetraensäuregehaltes die drastische Abnahme von Docosahexaensäure besonders im Gehirn, aber auch in Leber und Blut (Martinez, 1992; Martinez et al., 1994). Die gleichen Veränderungen wurden auch bei der biochemischen Analyse von Gehirnen der PEX19 KO-Mäusen gefunden. Die extreme

Reduktion der Docosahexaensäure wurde ebenfalls in PEX2- und PEX5 KO-Mäusen nachgewiesen (Faust et al., 2003; Janssen et al., 2000).

Neben den Plasmalogenen wird auch der Docosahexaensäure eine antioxidative Wirkung zugeschrieben (Sindelar et al., 1999; Yavin et al., 2002), deren Mangel in peroxisomendefizienten Zellen zu Erhöhung des oxidativen Stresses beitragen und damit Zelltod auslösen könnte. Eine damit verbundene Entzündungsreaktion z.B. im Gehirn, wie sie bereits für gehirnspezifische PEX5 KO-Mäuse beschrieben wurde (Kassmann et al., 2007), würde dazu führen, dass in Zellmembranen Phospholipasen A2 aktiviert werden. Diese setzen aus den Phospholipiden der Zellmembranen C20-Fettsäuren frei, die weiter zu Eicosanoiden metabolisiert werden (Irvine, 1982). Wichtige Bausteine in der Synthese der Eicosanoide sind die Arachidonsäure aus der  $\omega$ -6-Familie und die Eicosapentaensäure aus der  $\omega$ -3-Familie (Corey et al., 1980). Diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind essentiell beim Säugetier und müssen über die Nahrung zugefügt werden, da in tierischen Zellen nur einfach ungesättigte Fettsäuren synthetisiert werden können. Die Bildung der verschiedenen Derivate der  $\omega$ -3- bzw.  $\omega$ -6-Reihe aus Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure finden arbeitsteilig im endoplasmatischen Retikulum und in den Peroxisomen statt (Mimouni et al., 1991). Alle Syntheseschritte, die im endoplasmatischen Retikulum vollzogen werden, sind bei Peroxisomendefizienz nicht betroffen. Dies sollte durch die fehlende Nahrungszufuhr bei den PEX19-KO-Tieren zu einer Reduktion aller Vorstufen der Arachidonsäure (Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure, homo- $\gamma$ -Linolensäure) und zu einer Akkumulation von Arachidonsäure führen, da diese durch Peroxisomen nicht weiter abgebaut werden kann. Dies könnte die Werte für Arachidonsäure im Gehirn von PEX19 KO-Mäusen erklären, nicht aber die in Leber und Blut. Zu einer Senkung des Arachidonsäurespiegels in diesen Geweben könnte es durch unterschiedliche Metabolisierung der Arachidonsäure kommen. Aus Arachidonsäure können über Cyclooxygenasen Prostaglandine oder über 5-Lipoxygenasen Leukotriene gebildet werden (Samuelsson et al., 1987). Da Docosahexaensäure die Umwandlung von Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen hemmt (Austen, 1987), wird im Falle der PEX19 KO-Mäuse in der Leber wahrscheinlich nur der 5-Lipoxygenase-Weg beschritten. Damit käme es zur Ankurbelung der Leukotriensynthese. Da Leukotriene u. a. als Mediatoren bei inflammatorischen Prozessen fungieren (Samuelsson, 1987; Lewis et al., 1990), könnte ihre vermehrte Bildung Entzündungsreaktionen auslösen, was zu z.B. zu Leberzirrhose führen kann (siehe Kapitel 5.3).

Eicosapentaensäure wird als Vorstufe für Docosapentaensäure und Docosahexaensäure aus der  $\alpha$ -Linolensäure gebildet. Die ersten Schritte der Synthese von Eicosapentaensäure finden im endoplasmatischen Retikulum statt, die nachfolgenden Syntheseschritte von

Docosapentaensäure und Docosahexaensäure erfolgen in Peroxisomen (Ferdinandusse et al., 2001; Sprecher, 2000). Fehlen Peroxisomen, dann führt dies zwangsläufig zu reduzierten Docosapentaen- und Docosahexaensäurespiegeln wie bei den PEX19 KO-Mäusen im Gehirn. Auch bei humanen Patienten mit Zellweger Syndrom und bei PEX5 KO-Mäusen wurde ein deutlicher Mangel an Docosahexaensäure beschrieben (Martinez, 1992; Jansson et al., 2000). Wieso es bei Peroxisomendefizienz zu einer Anhäufung von Docosahexaensäure in Leber und Blut der homozygoten PEX19 KO-Mäuse kommt, ist hierdurch jedoch noch nicht geklärt.

Docosahexaensäure macht den größten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im adulten Gehirn aus (Sastry, 1985). Im Blut zirkulierende Docosahexaensäure wird daher bevorzugt vom Gehirn aufgenommen (Scott & Bazan, 1989). Es wird angenommen, dass der größte Teil von Docosahexaensäure im Gehirn aus der Nahrung oder aus der Synthese in der Leber stammt (Williard et al., 2001). Wie Studien mit PEX5 KO-Mäusen zeigten, ist das fetale Gehirn selbst für die Synthese von Docosahexaensäure aus den Vorstufen verantwortlich, die über die Placenta von der Mutter geliefert werden (Janssen et al., 2000). Der Mangel an Docosahexaensäure im Gehirn könnte dann zum gesteigerten Abbau von  $\alpha$ -Linolensäure in der Leber führen, wie er bei PEX19 KO-Mäusen nachweisbar war.

### 5.3 Auswirkung der Peroxisomendefizienz auf zelluläre Signalwege

Aufgrund ihrer zentralen Rollen im Abbau reaktiver Sauerstoffspezies und im Lipidkatabolismus kommt es durch das Fehlen von Peroxisomen u. a. nicht nur zu einer Akkumulation verschiedener Lipide und deren Derivate, sondern auch zu erhöhtem oxidativem Stress innerhalb der Zelle. Damit verbunden ist eine Aktivierung von Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs). Bisher wurden drei PPAR-Isotypen identifiziert ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), die von verschiedenen Genen kodiert und gewebespezifisch exprimiert werden (Michalik & Wahli, 1999). Zusätzlich zur Regulation von Genen des Lipidstoffwechsels konnte nachgewiesen werden, dass besonders PPAR $\alpha$ , aber auch PPAR $\gamma$  bei der Regulierung von Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen (Daynes & Jones, 2002; Gelman et al., 1999; Fruchart et al., 1999; Moraes et al., 2006).

Sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA), mehrfach ungesättigte Fettsäuren der verschiedenen Omega-Reihen (Ölsäure, Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure, Arachidonsäure,  $\gamma$ -Linolensäure), verzweigt-kettige Fettsäuren (Pristansäure), Leukotrien B<sub>4</sub> (aus Arachidon-

säuremetabolismus) aktivieren den Rezeptor PPAR $\alpha$  (Jedlitschky et al., 1991; Göttlicher et al., 1992; Yu et al., 1995; Forman et al., 1997; Xu et al., 1999). Gesteigerte Aktivierung von PPAR $\alpha$  führt u.a. zur Antagonisierung von NF- $\kappa$ B-vermittelten Signalwegen (Delerive et al., 1999) und damit verbunden zu einer Abnahme der Plasmakonzentration inflammatorisch wirkender Cytokine wie Interleukin (IL)-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Interferon (INF)- $\gamma$  (Madej et al., 1998; Staels et al., 1998). Auch PPAR $\gamma$  reguliert die Expression dieser Cytokine (zusätzlich auch IL-8), wobei speziell Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure sowie  $\gamma$ -Linolensäure als endogene Liganden nachgewiesen wurden (Marion-Latellier et al., 2008). Bei den PEX19 KO-Mäusen konnte in der Leber auf RNA-Ebene keine Erhöhung von PPAR $\alpha$  oder PPAR $\gamma$  nachgewiesen werden. Die entsprechenden Aktivatoren der beiden Rezeptoren sind zum Teil akkumuliert (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, VLCFA, Docosahexaensäure), aber auch reduziert (Ölsäure, Eicosapentaensäure, Arachidonsäure,  $\gamma$ -Linolensäure) oder unverändert (Pristansäure). Möglicherweise werden die verschiedenen PPAR-Isotypen in Abhängigkeit von der Bindung des jeweiligen Liganden unterschiedlich stark aktiviert. Auch ist bisher nichts darüber bekannt, welche physiologische Relevanz die Konzentration der verschiedenen Liganden hat. Die Ergebnisse für Arachidonsäure in Leber und Blut von PEX19 KO-Mäusen lassen vermuten, dass es zu einer Intensivierung inflammatorischer Prozesse über die vermehrte Ausschüttung von Leukotrien B<sub>4</sub> kommt. Diese Vermutung kann dadurch gestützt werden, dass humane Patienten mit Zellweger Syndrom immer eine chronische Entzündung der Leber mit Leberfibrose / -zirrhose entwickeln (Devchand et al., 1996). Nur weiterführende Studien mit Reporterassays können nähere Auskünfte über die Funktionalität unterschiedlicher Lipidgemische auf die Aktivität der verschiedenen PPAR-Familienmitglieder geben.

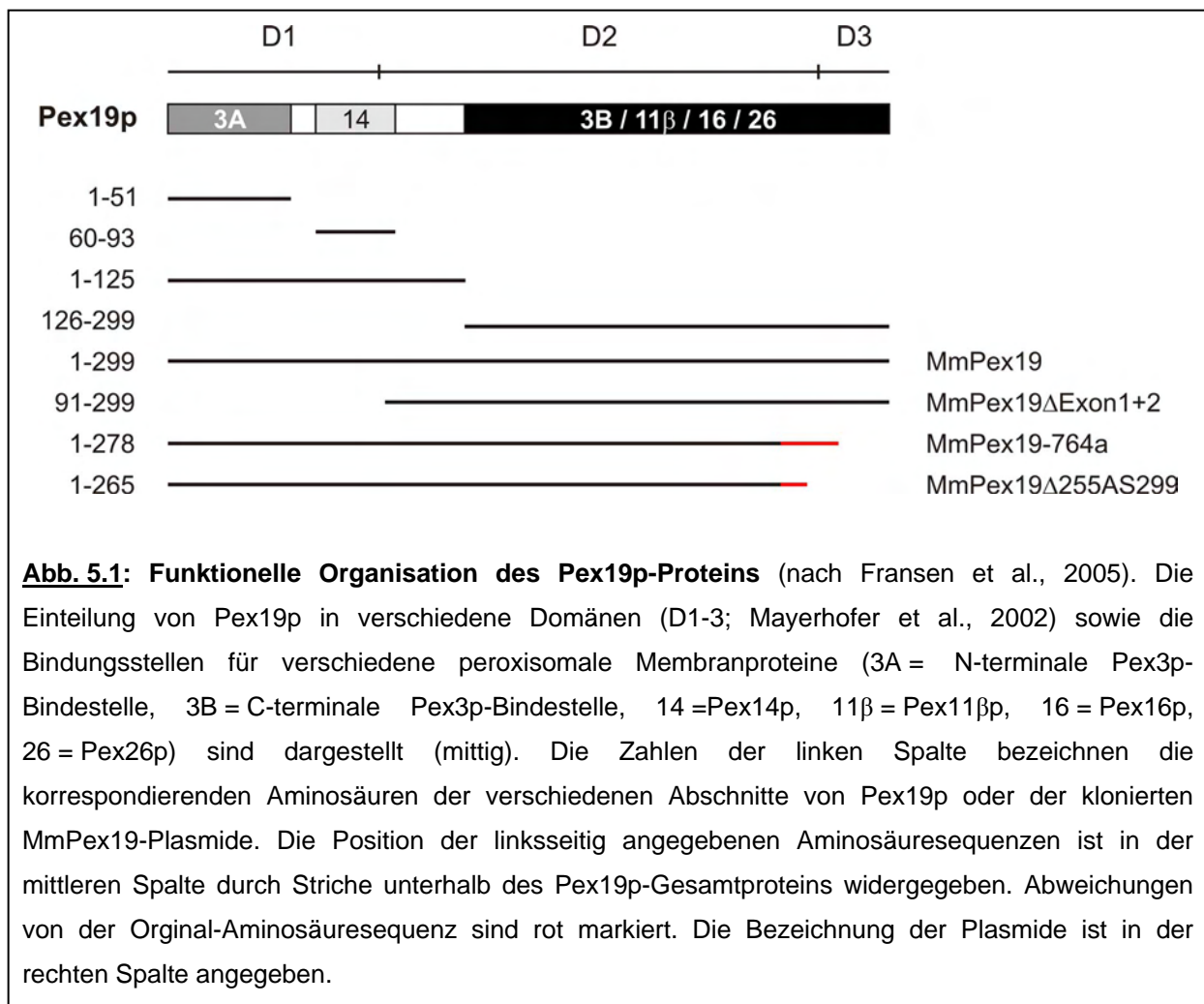
Neben dem Abbau von ROS durch peroxisomale Enzyme (z.B. Katalase) werden diese auch durch andere Enzyme in anderen zellulären Kompartimenten eliminiert. Zu diesen Enzymen gehören die Superoxid-Dismutasen (SODs), von denen drei Isoformen bei Säugern identifiziert wurden (Zelko et al., 2002). SOD1 oder Cu,Zn-SOD ist im Cytoplasma und in der Peroxisomenmatrix, SOD2 oder Mn-SOD in Mitochondrien und SOD3 extrazellulär lokalisiert. Von IL-6, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  ist bekannt, dass sie die Transkription von SOD2 induzieren (Visner et al., 1992; Dougall & Nick, 1991; Harris et al. 1991). Dagegen steigert zwar INF- $\gamma$  die Transkription von SOD3, jedoch wirken IL-6 und IL-8 repressorisch (Marklund, 1992). Die Expression von SOD1 wird dagegen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Arachidonsäure hochreguliert (Yoo et al., 1999a, b). Während bei PEX19 KO-Mäusen auf mRNA-Ebene eine leichte Steigerung für die Expression von SOD1 nachgewiesen werden konnte, zeigen SOD2 und SOD3 keine veränderten Werte im Vergleich zum Wildtyp. Ähnlich wie bei der Regulation der Cytokine ist auch hier nicht bekannt, welche kompetitiven Einflüsse die induzierende

Substanz und ihre Konzentration auf die Transkriptionsstärke haben. Im Fall von SOD2 ist zwar keine veränderte Expression auf RNA-Ebene aber eine erhöhte Proteinmenge im Western Blot bei den Pex19 KO-Mäusen nachzuweisen. Ähnliche Veränderungen wurden bereits für die PEX5 KO-Maus beschrieben. Dort wurde außerdem eine Verbindung zwischen erhöhter SOD2-Expression und degenerativen Veränderungen von Mitochondrien gezogen, die bei diesen Tieren gefunden wurden (Baumgart et al, 2001). Obwohl die PEX19 KO-Maus einen ähnlichen biochemischen und zellulären Phänotyp wie die PEX5 KO-Maus zeigt, sind elektronenmikroskopisch hier nur vereinzelt Veränderungen der Mitochondrien identifiziert worden. Da die homozygoten PEX19 KO-Mäuse direkt nach der Geburt perfundiert wurden, waren sie vermutlich noch nicht lange genug oxidativem Stress ausgesetzt, um Mitochondrienveränderungen zu entwickeln. Phänotypisch entsprechen diese daher 18,5-Tage alten homozygoten PEX5 KO-Mäusen, die auch noch kaum Mitochondrienveränderungen haben (Baumgart et al., 2001). Allerdings sprechen die Ergebnisse bei der PEX19 KO-Maus dafür, dass es zu einer Proliferation (Erhöhung von SOD2 in der leichten Mitochondrienfraktion), aber auch zur Zerstörung von Mitochondrien und der Freisetzung von SOD2 ins Cytoplasma kommt. Zusätzlich konnte SOD2 auch im Cytoplasma von heterozygoten Tieren nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist in sofern auffällig, da es sich beim Zellweger Syndrom um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung handelt. Demnach sollte es keine gravierenden Unterschiede zwischen Wildtyp- und heterozygoten PEX19-Tieren geben. Aber auch im Bereich der Fettsäurewerte wurden diesbezüglich Auffälligkeiten gefunden (Erucasäure, Linolsäure, Arachidonsäure,  $\alpha$ -Linolensäure). Möglicherweise sind diese Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass es auch bereits bei heterozygoten Tieren zur Auswirkungen des Gendefektes kommt. Versuche unserer Arbeitsgruppe mit Neuronenzellkulturen von Tieren mit PEX11 $\beta$ -Defekt lassen vermuten, dass heterozygote Zellen tatsächlich einen leichten Phänotyp in Bezug auf den ROS-Metabolismus aufweisen, der bisher übersehen wurde (unpublizierte Daten, persönliche Kommunikation mit Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt).

#### **5.4. Zellbiologische Studien mit PEX19-defizienten embryonalen Mausfibroblasten**

Pex19p ist ein hydrophiles, hauptsächlich cytoplasmatisch vorkommendes Protein, das ein breites Spektrum verschiedener Membranproteine bindet (Götte et al., 1998; Sacksteder et al., 2000; Snyder et al., 2000). Es spielt in der Entstehung von Peroxisomen eine zentrale Rolle (vgl. Kapitel 1.2).

Aus *in silico*-Analysen war bekannt, dass das humane Pex19p aus drei verschiedenen Domänen besteht, die sich in Bezug auf ihre Bindungseigenschaften für peroxisomale Membranproteine unterscheiden (siehe Abbildung 5.1): D1 (Aminosäuren 1-87), D2 (Aminosäuren 88-272) und D3 (Aminosäuren 273-299; Mayerhofer et al., 2002). Experimentelle Untersuchungen ergaben, dass Pex19p aus einer starren C-terminalen und einer flexiblen N-terminalen Domäne besteht (Shibata et al., 2004). Die N-terminale Domäne setzt sich aus einem Bereich zusammen, der mit Pex3p, und einem anderen, der mit Pex14p interagiert. An der C-terminalen Domäne binden alle bisher untersuchten Membranproteine außer Pex14p (Mayerhofer et al., 2002; Shibata et al., 2004; Fransen et al., 2005; Matsuzono & Fujiki, 2006; Matsuzono et al., 2006) über einen Abschnitt, der mit einer zweiten Bindestelle für Pex3p überlappt. Die N-terminale nicht aber die C-terminale Pex3p-Bindestelle wird für die Bindung von Pex19p an die peroxisomale Membran verantwortlich gemacht (Fransen et al., 2005; Fang et al., 2004). Die funktionelle Bedeutung der C-terminalen Pex3p-Bindestelle ist noch nicht geklärt.





Bisher wurden bei Mäusen noch keine Untersuchungen durchgeführt, welche funktionellen Anteile die verschiedenen Bereiche des Pex19p-Proteins an der peroxisomalen Membranbiogenese haben. Aus diesem Grund wurden Komplementationsversuche mit verschiedener Deletionsmutanten von Pex19p in peroxisomendefizienten PEX19 KO-MEFs durchgeführt. Zwei der Mutanten waren analog zu Pex19p-Varianten kloniert, die für den Menschen beschrieben wurden (Kammerer et al., 1997; Matsuzono et al., 1999).

Als erste modifizierte cDNA wurde die beim Menschen als Splice-Variante vorkommenden Form „PEX19 $\Delta$ Exon1+2“ hergestellt, bei der der N-terminale Teil des Proteins fehlt. Die Translation erfolgt über ein „in-frame“ Startcodon in Exon 3 (Kammerer et al., 1997). Als zweite Form wurde die Wildtyp-cDNA nach der von Matsuzono et al. (1999) für einen Patienten mit Zellweger Syndrom beschriebenen Mutation „PEX19-764A“ verändert. Durch Insertion eines Adenosins hinter Position 763 in der mRNA der Patienten kommt es zu einer Verschiebung der Aminosäuresequenz und damit zu einer vollständigen Veränderung des Leserasters (s. Kapitel 4.5.2, Abbildung 4.26). Die Aminosäuresequenz des Wildtyps wird durch 24 nicht mehr erkennbar verwandte Aminosäuren des C-terminalen Proteinbereiches ausgetauscht (s. Kapitel 4.5.2, Abbildung 4.26). Alternativ dazu wurden bei der dritten cDNA „PEX19 $\Delta$ 255AS299“ die letzten 44 Aminosäuren des Proteins durch 11 Aminosäuren ohne erkennbare Homologie ersetzt (s. Kapitel 4.5.2, Abbildung 4.26).

Die Deletionsmutante „PEX19 $\Delta$ Exon1+2“ komplementierte die Peroxisomendefizienz nicht. Ihr fehlt die N-terminale Bindestelle von Pex3p (siehe Abbildung 5.1). Diese Mutante kann daher zwar peroxisomale Membranproteine, nicht aber an die peroxisomale Membran binden. Vermutlich kommt es deshalb zu keinem Import von Membranproteinen in die peroxisomale Membran und damit auch zu keiner Komplementation der Peroxisomendefizienz bei PEX19 KO-MEFs. Auch die humane Variante dieses Proteins konnte die Peroxisomenbiogenese in humanen PEX19-defizienten Fibroblasten nicht wiederherstellen (Mayerhofer et al., 2002). Da es sich bei dieser Variante des Pex19p-Proteins um eine Splice-Variante handelt, die beim Menschen zusätzlich zum unveränderten Pex19p vorkommt, wird deren Fehlfunktion vermutlich durch das reguläre PEX19p kompensiert.

Die Deletionsmutanten „PEX19-764A“ und „PEX19 $\Delta$ 255AS299“ sind in dem Bereich verändert, der für die Bindung der peroxisomalen Membranproteine verantwortlich gemacht wird (s. Abbildung 5.1). Außerdem wurde durch die Mutation das Farnesylierungssignal entfernt. Beide Deletionsmutanten komplementierten die Peroxisomendefizienz nicht. Offensichtlich ist die Farnesylierung von Pex19p bei der Maus ähnlich wie in *S. cerevisiae* für

die Membranbindung verantwortlich (Götte et al., 1998). Dadurch können ähnlich wie bei der Mutante „PEX19ΔExon1+2“ keine Membranproteine importiert werden. Zusätzlich oder alternativ dazu könnte die Veränderung der C-terminalen Aminosäuresequenz zu einer Konformationsänderung des Pex19p-Proteins führen, das dadurch seine Kompetenz, die verschiedenen peroxisomalen Membranproteine zu binden, verliert.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die verschiedenen Proteinabschnitte von humanem und murinem Pex19p ähnliche Bedeutung für die peroxisomale Biogenese haben.

Neben funktionellen Analysen sollte durch zellbiologische Studien mit Primärkulturen von Fibroblasten der PEX19 KO-Mauslinie geklärt werden, wie peroxisomale Membranvesikel entstehen und wie der Import von Membran- und Matrixproteinen zeitlich verläuft. Die Herkunft der peroxisomalen Membranvesikel und somit eine eventuelle Verbindung von Peroxisomen mit dem endoplasmatischem Retikulum konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnten durch Komplementationsversuche der Ablauf der peroxisomalen Biogenese anhand verschiedener Markerproteine (Katalase, Pex14p, ABCD3) gezeigt werden. Wie bereits in morphologische Studien belegt wurde, ist auch bei der PEX19 KO-Maus das Wachstum und die Teilung der Peroxisomen ein mehrstufiger Prozess (Koch et al. 2003, 2004, 2005). Zunächst vergrößern sich die Peroxisomen durch sukzessiven Import von Matrix- und Membranproteinen (Lazarow & Fujiki, 1985). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zuerst die Membranproteine (Pex14p vor ABCD3) und dann die Matrixproteine importiert werden. Innerhalb der Matrixproteine wird Katalase nach den SKL-Proteinen in das Peroxisom eingeschleust. Zu dieser Reihenfolge kommt es vermutlich dadurch, dass Proteine mit der PTS1-Erkennungssequenz „SKL“ deutlich effektiver importiert werden als Katalase mit der PTS1-Erkennungssequenz „KANL“ (Koepeke et al., 2007). Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Komplementation der PEX19-defizienten Mausfibroblasten bewiesen, dass die Peroxisomen während ihres Wachstumsprozesses elongierte Tubuli bilden, die sich anschließend in kleinere Peroxisomen teilen („*beads on a string*“; Schrader et al., 1996). Der hier gezeigte Ablauf deckt sich mit den Aspekten der peroxisomalen Proliferation, die sich immer mehr etabliert haben (Schrader et al. 1996, 1998; Schrader & Fahimi, 2008).

## 5.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Knockout-Maus mit Defekt im PEX19-Gen generiert. Durch Vergleiche mit bereits publizierten Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die PEX19 KO-Maus ein neues Tiermodell für Zellweger Syndrom darstellt. Die Charakterisierung ist jedoch noch nicht komplett abgeschlossen. In Bezug auf den Fettsäurestoffwechsel stellen die Ergebnisse dieser Arbeit neue Grundlagen dar, da im Rahmen des Neugeborenen“*screening*“ keine Daten für essentielle Fettsäuren bei Patienten mit Zellweger Syndrom erhoben werden und somit Vergleichsdaten fehlen. Zusätzliche Untersuchungen zum Fettsäurestoffwechsel (Lipidomics), speziell der der essentiellen Fettsäuren, in Kombination mit Expressionsanalysen regulatorisch wirkender Gene würden tiefere Einblicke in die Verknüpfung der verschiedenen metabolischen Funktionen von Peroxisomen liefern, die an humanen Patienten zusätzlich noch verifiziert werden sollten.

Die Zucht der PEX19-Mäuse in verschiedene genetische Hintergründe ermöglicht außerdem Untersuchungen zur Auswirkung des Mausstammes auf die Überlebensdauer der Tiere. Sollten Unterschiede gefunden werden, so könnten mit Hilfe von cDNA-Arrays Gene identifiziert werden, die möglicherweise den unterschiedlichen Phänotyp der erkrankten Tiere bewirken. Vergleichende metabolische Analysen würden diese Untersuchungen ergänzen, um Hinweise auf die molekulare Pathogenese der Organveränderungen bei peroxisomalen Erkrankungen zu erhalten.

Des Weiteren sollte mit der Generierung der PEX19 KO-Maus ein Tiermodell zur Analyse der peroxisomalen Biogenese geschaffen werden. In ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen der PEX19 KO-Mäuse konnten Membranstrukturen im Bereich von Glykogenfeldern nachgewiesen werden, wo bei Wildtyptieren normalerweise funktionsfähige Peroxisomen lokalisiert sind. Bisher herrscht die gängige Meinung, dass bei Mutationen in den an der frühen Membranbiogenese beteiligten Genen (PEX3, Pex16, PEX19) auch keine peroxisomalen Membranstrukturen (ghosts) gebildet werden. Somit müssen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Membranstrukturen weiter charakterisiert werden. Es sollte dabei vor allem geklärt werden, welchen Ursprung diese Strukturen haben und ob es sich hierbei wirklich um „Prästrukturen“ der peroxisomalen Membranbiogenese handelt, aus denen reife Peroxisomen entstehen können. Dazu sollten Immunfärbungen mit Nanogold-markierten Sekundäntikörpern gegen die frühen, unabhängig von Pex19p transportierten Membranproteine (Pex3p, Pex16p), und gegen Markerproteine für das endoplasmatische Retikulum etabliert werden. Dies erfordert aber auch die eigene Herstellung von neuen, hochspezifischen Antikörpern gegen Pex3p und Pex16p, da sich bisher alle kommerziellen

oder durch Kollegen verfügbaren Antikörper als unbrauchbar erwiesen haben. Weiterhin sollten Kotransfektionsexperimente an PEX19 KO-MEFs mit niedrig exprimierten, regulierbaren Marker-Plasmiden für das endoplasmatische Retikulum und peroxisomalen Membranproteinen zum Nachweis der Entstehung der Peroxisomenmembran durchgeführt werden.

## 6. Literatur

- Aaij, C., and P. Borst (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*. 269:192-200.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-10.
- Angermüller, S., and H.D. Fahimi (1981). Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine. *Histochemistry*. 71:33-44.
- Angermüller, S., G. Bruder, A. Völkl, H. Wesch, and H.D. Fahimi (1987). Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur J Cell Biol*. 45:137-44.
- Antonenkov, V.D., P.P. Van Veldhoven, E. Waelkens, and G.P. Mannaerts (1997). Substrate specificities of 3-oxoacyl-CoA thiolase A and sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase purified from normal rat liver peroxisomes. Sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase is involved in the metabolism of 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates. *J Biol Chem*. 272:26023-31.
- Antonenkov, V.D., K. Croes, E. Waelkens, P.P. Van Veldhoven, and G.P. Mannaerts (2000). Identification, purification and characterization of an acetoacetyl-CoA thiolase from rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem*. 267:2981-90.
- Austen, K.F. 1987. The role of arachidonic acid metabolites in local and systemic inflammatory processes. *Drugs*. 33 Suppl 1:10-7.
- Baes, M., P. Gressens, E. Baumgart, P. Carmeliet, M. Casteels, M. Fransen, P. Evrard, D. Fahimi, P.E. Declercq, D. Collen, P.P. van Veldhoven, and G.P. Mannaerts (1997). A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet*. 17:49-57.
- Baes, M., S. Huyghe, P. Carmeliet, P.E. Declercq, D. Collen, G.P. Mannaerts, and P.P. Van Veldhoven (2000). Inactivation of the peroxisomal multifunctional protein-2 in mice impedes the degradation of not only 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates but also of very long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 275:16329-36.
- Baes, M., M. Dewerchin, A. Janssen, D. Collen, and P. Carmeliet (2002). Generation of Pex5-loxP mice allowing the conditional elimination of peroxisomes. *Genesis*. 32:177-8.
- Baudhuin, P., H. Beaufay, and C. De Duve (1965a). 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*. 26:219-43.
- Baudhuin, P., M. Mueller, B. Poole, and C. De Duve (1965b). Non-Mitochondrial Oxidizing Particles (Microbodies) in Rat Liver and Kidney and in Tetrahymena Pyriformis. *Biochem Biophys Res Commun*. 20:53-9.
- Baumgart, E., A. Völkl, T. Hashimoto, and H.D. Fahimi (1989). Biogenesis of peroxisomes: immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. *J Cell Biol*. 108:2221-31.
- Baumgart, E., J.C. Vanhooren, M. Fransen, P.P. Van Veldhoven, and G.P. Mannaerts (1996a). Mammalian peroxisomal acyl-CoA oxidases. II. Molecular characterization of rat trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *Ann N Y Acad Sci*. 804:676-7.
- Baumgart, E., J.C. Vanhooren, M. Fransen, G.P. Mannaerts, and P.P. Van Veldhoven (1996b). Mammalian peroxisomal acyl-CoA oxidases. III. Molecular characterization of human branched chain fatty acyl-CoA oxidase. *Ann N Y Acad Sci*. 804:678-9.
- Baumgart, E., J.C. Vanhooren, M. Fransen, F. Van Leuven, H.D. Fahimi, P.P. Van Veldhoven, and G.P. Mannaerts (1996c). Molecular cloning and further characterization of rat peroxisomal trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *Biochem J*. 320 ( Pt 1):115-21.

- Baumgart, E., I. Vanhorebeek, M. Grabenbauer, M. Borgers, P.E. Declercq, H.D. Fahimi, and M. Baes (2001). Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *Am J Pathol.* 159:1477-94.
- Baumgart, E., H.D. Fahimi, H. Steininger, and M. Grabenbauer (2003). A review of morphological techniques for detection of peroxisomal (and mitochondrial) proteins and their corresponding mRNAs during ontogenesis in mice: application to the PEX5-knockout mouse with Zellweger syndrome. *Microsc Res Tech.* 61:121-38.
- Biardi, L., and S.K. Krisans (1996). Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. *J Biol Chem.* 271:1784-8.
- Birboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Birboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-55.
- Bishop, W.R., and R.M. Bell (1988). Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol.* 4:579-610.
- Bizzozero, O.A., G. Zuniga, and M.B. Lees (1991). Fatty acid composition of human myelin proteolipid protein in peroxisomal disorders. *J Neurochem.* 56:872-8.
- Bjorkman, J., I. Tonks, M.A. Maxwell, C. Paterson, G.F. Kay, and D.I. Crane (2002). Conditional inactivation of the peroxisome biogenesis Pex13 gene by Cre-loxP excision. *Genesis.* 32:179-80.
- Bockamp, E., M. Maringer, C. Spangenberg, S. Fees, S. Fraser, L. Eshkind, F. Oesch, and B. Zabel (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics.* 11:115-32.
- Borgese, N., I. Gazzoni, M. Barberi, S. Colombo, and E. Pedrazzini (2001). Targeting of a tail-anchored protein to endoplasmic reticulum and mitochondrial outer membrane by independent but competing pathways. *Mol Biol Cell.* 12:2482-96.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Braman, J., C. Papworth, and A. Greener (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol.* 57:31-44.
- Braun, A., S. Kammerer, W. Weissenhorn, E.H. Weiss, and H. Cleve (1994). Sequence of a putative human housekeeping gene (HK33) localized on chromosome 1. *Gene.* 146:291-5.
- Braverman, N., G. Dodt, S.J. Gould, and D. Valle (1998). An isoform of pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Hum Mol Genet.* 7:1195-205.
- Breidenbach, R.W., and H. Beevers (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 27:462-9.
- Brites, P., A.M. Motley, P. Gressens, P.A. Mooyer, I. Ploegaert, V. Everts, P. Evrard, P. Carmeliet, M. Dewerchin, L. Schoonjans, M. Duran, H.R. Waterham, R.J. Wanders, and M. Baes (2003). Impaired neuronal migration and endochondral ossification in Pex7 knockout mice: a model for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Hum Mol Genet.* 12:2255-67.
- Brites, P., P.A. Mooyer, L. El Mrabet, H.R. Waterham, and R.J. Wanders (2009). Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. *Brain.* 132 (Pt2):482-92
- Britten, R.J., and E.H. Davidson (1969). Gene regulation for higher cells: a theory. *Science.* 165:349-57.
- Brosche, T., and D. Platt (1998). The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage. *Exp Gerontol.* 33:363-9.
- Brosius, U., and J. Gärtner (2002). Cellular and molecular aspects of Zellweger syndrome and other peroxisome biogenesis disorders. *Cell Mol Life Sci.* 59:1058-69.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112:195-203.

- Capecchi, M.R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5:70-6.
- Capecchi, M.R. (1994). Targeted gene replacement. *Sci Am.* 270:52-9.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 380:435-9.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.
- Clarke, S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem.* 61:355-86.
- Cook, H.W., S.E. Thomas, and Z. Xu (1991). Essential fatty acids and serine as plasmalogen precursors in relation to competing metabolic pathways. *Biochem Cell Biol.* 69:475-84.
- Cooper, T.G., and H. Beevers (1969). Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J Biol Chem.* 244:3507-13.
- Corey, E.J., H. Niwa, J.R. Falck, C. Mioskowski, Y. Arai, and A. Marfat (1980). Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 6:19-25.
- Croes, K., M. Casteels, S. Asselberghs, P. Herdewijn, G.P. Mannaerts, and P.P. Van Veldhoven (1997). Formation of a 2-methyl-branched fatty aldehyde during peroxisomal alpha-oxidation. *FEBS Lett.* 412:643-5.
- Dacremont, G., and G. Vincent (1995). Assay of plasmalogens and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in erythrocytes and fibroblasts. *J Inherit Metab Dis.* 18 Suppl 1:84-9.
- Das, A.K., S. Horie, and A.K. Hajra (1992). Biosynthesis of glycerolipid precursors in rat liver peroxisomes and their transport and conversion to phosphatidate in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 267:9724-30.
- Davidson, E.H., and R.J. Britten (1979). Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. *Science.* 204:1052-9.
- Daynes, R.A., and D.C. Jones (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2:748-59.
- De Duve, C., and P. Baudhuin (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 46:323-57.
- Deliverie, P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, J.C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman, and B. Staels (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 274:32048-54.
- Delille, H.K., and M. Schrader (2008). Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p. *J Biol Chem.* 283:31107-15.
- Devchand, P.R., H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez, and W. Wahli (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 384:39-43.
- Dirkx, R., I. Vanhorebeek, K. Martens, A. Schad, M. Grabenbauer, D. Fahimi, P. Declercq, P.P. Van Veldhoven, and M. Baes (2005). Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology.* 41:868-78.
- Distel, B., R. Erdmann, S.J. Gould, G. Blobel, D.I. Crane, J.M. Cregg, G. Dodt, Y. Fujiki, J.M. Goodman, W.W. Just, J.A. Kiel, W.H. Kunau, P.B. Lazarow, G.P. Mannaerts, H.W. Moser, T. Osumi, R.A. Rachubinski, A. Roscher, S. Subramani, H.F. Tabak, T. Tsukamoto, D. Valle, I. van der Klei, P.P. van Veldhoven, and M. Veenhuis (1996). A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol.* 135:1-3.
- Doolittle, W.F., and C. Sapienza (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature.* 284:601-3.

- Dougall, W.C., and H.S. Nick (1991). Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology*. 129:2376-84.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-45.
- Dynan, W.S. (1986). Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* 2:196-197
- Eckert, J.H., and R. Erdmann (2003). Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 147:75-121.
- Elgersma, Y., and H.F. Tabak. 1996. Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning. *Biochim Biophys Acta.* 1286:269-83.
- Elgersma, Y., A. Vos, M. van den Berg, C.W. van Roermund, P. van der Sluijs, B. Distel, and H.F. Tabak (1996). Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal 1 in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 271:26375-82.
- Ezaki, T. (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron.* 31:639-49.
- Fahimi, H.D. (1969). Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol.* 43:275-88.
- Fan, C.Y., J. Pan, R. Chu, D. Lee, K.D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, N. Maeda, and J.K. Reddy (1996a). Targeted disruption of the peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase gene: generation of a mouse model of pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 804:530-41.
- Fan, C.Y., J. Pan, R. Chu, D. Lee, K.D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, N. Maeda, and J.K. Reddy (1996b). Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem.* 271:24698-710.
- Fan, C.Y., J. Pan, N. Usuda, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, and J.K. Reddy (1998). Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem.* 273:15639-45.
- Fang, Y., J.C. Morrell, J.M. Jones, and S.J. Gould (2004). PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol.* 164:863-75.
- Farooqui, A.A., and L.A. Horrocks (2001). Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist.* 7:232-45.
- Faust, P.L., and M.E. Hatten (1997). Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J Cell Biol.* 139:1293-305.
- Faust, P.L., H.M. Su, A. Moser, and H.W. Moser (2001). The peroxisome deficient PEX2 Zellweger mouse: pathologic and biochemical correlates of lipid dysfunction. *J Mol Neurosci.* 16:289-97; discussion 317-21.
- Faust, P.L. (2003). Abnormal cerebellar histogenesis in PEX2 Zellweger mice reflects multiple neuronal defects induced by peroxisome deficiency. *J Comp Neurol.* 461:394-413.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, P.A. Mooijer, Z. Zhang, J.K. Reddy, A.A. Spector, and R.J. Wanders (2001). Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res.* 42:1987-95.
- Ferrer, I., J.P. Kapfhammer, C. Hindelang, S. Kemp, N. Troffer-Charlier, V. Broccoli, N. Callyzot, P. Mooyer, J. Selhorst, P. Vreken, R.J. Wanders, J.L. Mandel, and A. Pujol (2005). Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Hum Mol Genet.* 14:3565-77.
- Festing, M.F. (1980). The choice of animals in toxicological screening: inbred strains and the factorial design of experiment. *Acta Zool Pathol Antverp:*117-31.



- Fiering, S., C.G. Kim, E.M. Epner, and M. Groudine (1993). An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: analysis of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8469-73.
- Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4312-7.
- Forss-Petter, S., H. Werner, J. Berger, H. Lassmann, B. Molzer, M.H. Schwab, H. Bernheimer, F. Zimmermann, and K.A. Nave (1997). Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J Neurosci Res.* 50:829-43.
- Foulon, V., V.D. Antonenkov, K. Croes, E. Waelkens, G.P. Mannaerts, P.P. Van Veldhoven, and M. Casteels (1999). Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during alpha-oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10039-44.
- Fourcade, S., M. Ruiz, C. Camps, A. Schluter, S.M. Houten, P.A. Mooyer, T. Pampols, G. Dacremont, R.J. Wanders, M. Giros, and A. Pujol (2009). A key role for the peroxisomal ABCD2 transporter in fatty acid homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:E211-21.
- Fransen, M., Brees, C., Vastiau, I., Mannaerts, G.P., and P.P. van Veldhoven (2002). Functional studies of human Pex19p: Import Receptor, Membrane Insertion Factor, or Chaperone for Peroxisomal Membrane Proteins? *Mol. Biol. Cell, Supplements*, 13, 130a-131a.
- Fransen M., Vastiau I., Brees C., Brys V., Mannaerts G.P., and P.P. Van Veldhoven (2005). Analysis of Human Pex19p's Domain Structure by Pentapeptide Scanning Mutagenesis. *J Mol Biol.* 346(5):1275-86.
- Fruchart, J.C., P. Duriez, and B. Staels (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 10:245-57.
- Fujiki, Y., R.A. Rachubinski, and P.B. Lazarow (1984). Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:7127-31.
- Gärtner, J. (2003). Is there a phenotype/genotype correlation in peroxisome biogenesis disorders (PBDs)? *Adv Exp Med Biol.* 544:59-65.
- Gärtner J. (2004): Peroxisomale Erkrankungen. In: Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie, G.F. Hoffmann, A.J. Grau, ed. Georg Thieme Verlag.
- Gearing, K.L., M. Gottlicher, M. Teboul, E. Widmark, and J.A. Gustafsson (1993). Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1440-4.
- Gelman, L., J.C. Fruchart, and J. Auwerx (1999). An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 55:932-43.
- Geuze, H.J., J.L. Murk, A.K. Stroobants, J.M. Griffith, M.J. Kleijmeer, A.J. Koster, A.J. Verkleij, B. Distel, and H.F. Tabak (2003). Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell.* 14:2900-7.
- Giloh, H., and J.W. Sedat. 1982. Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science.* 217:1252-5.
- Ginsberg, L., S. Rafique, J.H. Xuereb, S.I. Rapoport, and N.L. Gershfeld (1995). Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 698:223-6.
- Girzalsky, W., L.S. Hoffmann, A. Schemenewitz, A. Nolte, W.H. Kunau, and R. Erdmann (2006). Pex19p-dependent targeting of Pex17p, a peripheral component of the peroxisomal protein import machinery. *J Biol Chem.* 281:19417-25.

- Glover, J.R., D.W. Andrews, S. Subramani, and R.A. Rachubinski (1994). Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo. *J Biol Chem.* 269:7558-63.
- Goldfischer, S., C.L. Moore, A.B. Johnson, A.J. Spiro, M.P. Valsamis, H.K. Wisniewski, R.H. Ritch, W.T. Norton, I. Rapin, and L.M. Gartner (1973). Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science.* 182:62-4.
- Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 64:915-25.
- Götte, K., W. Girzalsky, M. Linkert, E. Baumgart, S. Kammerer, W.H. Kunau, and R. Erdmann (1998). Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol.* 18:616-28.
- Göttlicher, M., E. Widmark, Q. Li, and J.A. Gustafsson. 1992. Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4653-7.
- Gould, S.J., G.A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson, and S. Subramani (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol.* 108:1657-64.
- Gould, S.J., and D. Valle (2000). Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet.* 16:340-5.
- Gould, S. J., Raymond, G. V. & Valle, D. (2001). The Peroxisome Biogenesis Disorders. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, pp. 3181-3215. Edited by C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly & D. Valle. New York: McGraw-Hill.
- Gould, S.J., and C.S. Collins (2002). Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:382-9.
- Hänsel R. und O. Sticher (2006): Lipide. In:Pharmakognosie-Phytopharmazie, *Springerverlag*
- Hajra, A.K. (1997). Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1348:27-34.
- Hajra, A.K., and J.E. Bishop (1982). Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 386:170-82.
- Hancock, J.F., A.I. Magee, J.E. Childs, and C.J. Marshall (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell.* 57:1167-77.
- Hanker, J.S. (1979). Osmiophilic reagents in electronmicroscopic histochemistry. *Prog Histochem Cytochem.* 12:1-85.
- Hanks, M., W. Wurst, L. Anson-Cartwright, A.B. Auerbach, and A.L. Joyner (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science.* 269:679-82.
- Harris, C.A., K.S. Derbin, B. Hunte-McDonough, M.R. Krauss, K.T. Chen, D.M. Smith, and L.B. Epstein (1991). Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol.* 147:149-54.
- Hashiguchi, N., T. Kojidani, T. Imanaka, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, E. Baumgart, S. Yokota, T. Tsukamoto, and T. Osumi (2002). Peroxisomes are formed from complex membrane structures in PEX6-deficient CHO cells upon genetic complementation. *Mol Biol Cell.* 13:711-22.
- Hashimoto, T. (1982). Individual peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Ann N Y Acad Sci.* 386:5-12.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, C. Chang, and A. Bradley (1991a). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 11:4509-17.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley (1991b). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 11:5586-91.
- Hawkes, R., E. Niday, and J. Gordon (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem.* 119:142-7.
- Hayat, M.A. (1970). Principles and techniques of electron microscopy. In: Biological applications. Vol. I *Van Nostrand Reinhold Company, New York*

- Hazra, P.P., I. Suriapranata, W.B. Snyder, and S. Subramani (2002). Peroxisome remnants in pex3delta cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes. *Traffic*. 3:560-74.
- Heiland, I., and R. Erdmann (2005). Topogenesis of peroxisomal proteins does not require a functional cytoplasm-to-vacuole transport. *Eur J Cell Biol*. 84:799-807.
- Heimer, G.V., and C.E. Taylor (1974). Improved mountant for immunofluorescence preparations. *J Clin Pathol*. 27:254-6.
- Hertz, R., I. Berman, D. Keppler, and J. Bar-Tana (1996). Activation of gene transcription by prostacyclin analogues is mediated by the peroxisome-proliferators-activated receptor (PPAR). *Eur J Biochem*. 235:242-7.
- Hettema, E.H., W. Girzalsky, M. van Den Berg, R. Erdmann, and B. Distel (2000). *Saccharomyces cerevisiae* pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins. *EMBO J*. 19:223-33.
- Ho, J.K., H. Moser, Y. Kishimoto, and J.A. Hamilton (1995). Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest*. 96:1455-63.
- Hoepfner, D., D. Schildknecht, I. Braakman, P. Philippsen, and H.F. Tabak (2005). Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*. 122:85-95.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. and Lacy, E. (1994). In: *Manipulating The Mouse Embryo - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York 11803-2500, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Honsho, M., S. Tamura, N. Shimozawa, Y. Suzuki, N. Kondo, and Y. Fujiki (1998). Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet*. 63:1622-30.
- Honsho, M., T. Hiroshige, and Y. Fujiki (2002). The membrane biogenesis peroxin Pex16p. Topogenesis and functional roles in peroxisomal membrane assembly. *J Biol Chem*. 277:44513-24.
- Honsho, M., Y. Yagita, N. Kinoshita, and Y. Fujiki (2008). Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments. *Biochim Biophys Acta*. 1783:1857-65.
- Huhse, B., P. Rehling, M. Albertini, L. Blank, K. Meller, and W.H. Kunau (1998). Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J Cell Biol*. 140:49-60.
- Hulshagen, L., O. Krysko, A. Bottelbergs, S. Huyghe, R. Klein, P.P. Van Veldhoven, P.P. De Deyn, R. D'Hooge, D. Hartmann, and M. Baes (2008). Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration. *J Neurosci*. 28:4015-27.
- Hung, T., K. Mak, and K. Fong (1990). A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 18:4953.
- Huyghe, S., H. Schmalbruch, L. Hulshagen, P.V. Veldhoven, M. Baes, and D. Hartmann (2006a). Peroxisomal multifunctional protein-2 deficiency causes motor deficits and glial lesions in the adult central nervous system. *Am J Pathol*. 168:1321-34.
- Huyghe, S., H. Schmalbruch, K. De Gendt, G. Verhoeven, F. Guillou, P.P. Van Veldhoven, and M. Baes (2006b). Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology*. 147:2228-36.
- Imanaka, T., G.M. Small, and P.B. Lazarow (1987). Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. *J Cell Biol*. 105:2915-22.
- Iredale, J.P. (1999). Demystified ... gene knockouts. *Mol Pathol*. 52:111-6.
- Irvine, R.F. (1982). How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J*. 204:3-16.

- Issemann, I., and S. Green (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347:645-50.
- Jacks, T., T.S. Shih, E.M. Schmitt, R.T. Bronson, A. Bernard, and R.A. Weinberg (1994). Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet*. 7:353-61.
- Jakobs, B.S., and R.J. Wanders (1995). Fatty acid beta-oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 213:1035-41.
- James, G.L., J.L. Goldstein, R.K. Pathak, R.G. Anderson, and M.S. Brown (1994). PxF, a prenylated protein of peroxisomes. *J Biol Chem*. 269:14182-90.
- Janssen, A., M. Baes, P. Gressens, G.P. Mannaerts, P. Declercq, and P.P. Van Veldhoven (2000). Docosahexaenoic acid deficit is not a major pathogenic factor in peroxisome-deficient mice. *Lab Invest*. 80:31-5.
- Janssen, A., P. Gressens, M. Grabenbauer, E. Baumgart, A. Schad, I. Vanhorebeek, A. Brouwers, P.E. Declercq, D. Fahimi, P. Evrard, L. Schoonjans, D. Collen, P. Carmeliet, G. Mannaerts, P. Van Veldhoven, and M. Baes (2003). Neuronal migration depends on intact peroxisomal function in brain and in extraneuronal tissues. *J Neurosci*. 23:9732-41.
- Jedd, G., and N.H. Chua (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol*. 2:226-31.
- Jedlitschky, G., M. Huber, A. Volkl, M. Muller, I. Leier, J. Muller, W.D. Lehmann, H.D. Fahimi, and D. Keppler (1991). Peroxisomal degradation of leukotrienes by beta-oxidation from the omega-end. *J Biol Chem*. 266:24763-72.
- Johnson, A.B., H.H. Schaumburg, and J.M. Powers (1976). Histochemical characteristics of the striated inclusions of adrenoleukodystrophy. *J Histochem Cytochem*. 24:725-30.
- Jones, J.M., J.C. Morrell, and S.J. Gould (2004). PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol*. 164:57-67.
- Kammerer, S., N. Arnold, W. Gutensohn, H.W. Mewes, W.H. Kunau, G. Hofler, A.A. Roscher, and A. Braun (1997). Genomic organization and molecular characterization of a gene encoding HsPXF, a human peroxisomal farnesylated protein. *Genomics*. 45:200-10.
- Karnik, S.K., and R.N. Trelease (2007). Arabidopsis peroxin 16 trafficks through the ER and an intermediate compartment to pre-existing peroxisomes via overlapping molecular targeting signals. *J Exp Bot*. 58:1677-93.
- Karnovsky, M.J. (1971). Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J Cell Biol* 51: 146A
- Kashiwayama, Y., K. Asahina, H. Shibata, M. Morita, A.C. Muntau, A.A. Roscher, R.J. Wanders, N. Shimozawa, M. Sakaguchi, H. Kato, and T. Imanaka (2005). Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome. *Biochim Biophys Acta*. 1746:116-28.
- Kassmann, C.M., C. Lappe-Siefke, M. Baes, B. Brugger, A. Mildner, H.B. Werner, O. Natt, T. Michaelis, M. Prinz, J. Frahm, and K.A. Nave (2007). Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet*. 39:969-76.
- Kato, K., A.D. Cox, M.M. Hisaka, S.M. Graham, J.E. Buss, and C.J. Der (1992). Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6403-7.
- Keane, M.H., H. Overmars, T.M. Wikander, S. Ferdinandusse, M. Duran, R.J. Wanders, and P.L. Faust (2007). Bile acid treatment alters hepatic disease and bile acid transport in peroxisome-deficient PEX2 Zellweger mice. *Hepatology*. 45:982-97.
- Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, and W. Wahli (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2160-4.

- Kim, P.K., R.T. Mullen, U. Schumann, and J. Lippincott-Schwartz (2006). The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol.* 173:521-32.
- Kinoshita, N., K. Ghaedi, N. Shimosawa, R.J. Wanders, Y. Matsuzono, T. Imanaka, K. Okumoto, Y. Suzuki, N. Kondo, and Y. Fujiki (1998). Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants are defective in biogenesis of peroxisomal membrane vesicles (Peroxisomal ghosts), representing a novel complementation group in mammals. *J Biol Chem.* 273:24122-30.
- Klein, A.T., M. van den Berg, G. Bottger, H.F. Tabak, and B. Distel (2002). *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p. *J Biol Chem.* 277:25011-9.
- Kobayashi, T., N. Shinnoh, A. Kondo, and T. Yamada (1997). Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 232:631-6.
- Koch, A., M. Thiemann, M. Grabenbauer, Y. Yoon, M.A. McNiven, and M. Schrader (2003). Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem.* 278:8597-605.
- Koch, A., G. Schneider, G.H. Luers, and M. Schrader (2004). Peroxisome elongation and constriction but not fission can occur independently of dynamin-like protein 1. *J Cell Sci.* 117:3995-4006.
- Koch, A., Y. Yoon, N.A. Bonekamp, M.A. McNiven, and M. Schrader (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 16:5077-86.
- Koepke, J.I., K.A. Nakrieko, C.S. Wood, K.K. Boucher, L.J. Terlecky, P.A. Walton, and S.R. Terlecky (2007). Restoration of peroxisomal catalase import in a model of human cellular aging. *Traffic.* 8:1590-600.
- Kolodner, R. (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev.* 10:1433-42.
- Kragt, A., T. Voorn-Brouwer, M. van den Berg, and B. Distel (2005). Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a *Saccharomyces cerevisiae* pex3Delta strain. *J Biol Chem.* 280:34350-7.
- Krayev, A.S., D.A. Kramerov, K.G. Skryabin, A.P. Ryskov, A.A. Bayev, and G.P. Georgiev (1980). The nucleotide sequence of the ubiquitous repetitive DNA sequence B1 complementary to the most abundant class of mouse fold-back RNA. *Nucleic Acids Res.* 8:1201-15.
- Krayev, A.S., T.V. Markusheva, D.A. Kramerov, A.P. Ryskov, K.G. Skryabin, A.A. Bayev, and G.P. Georgiev (1982). Ubiquitous transposon-like repeats B1 and B2 of the mouse genome: B2 sequencing. *Nucleic Acids Res.* 10:7461-75.
- Krisans, S.K. (1992). The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7:358-64.
- Krisans, S.K. (1996). Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 804:142-64.
- Kuhn, R., K. Rajewsky, and W. Muller (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science.* 254:707-10.
- Kunau, W.H., S. Buhne, M. de la Garza, C. Kionka, M. Mateblowski, U. Schultz-Borchard, and R. Thieringer (1988). Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem Soc Trans.* 16:418-20.
- Kunau, W.H. (1992). Peroxisomal biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Clin Biol Res.* 375:9-18.
- Kunau, W.H. (1998). Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Curr Opin Microbiol.* 1:232-7.
- Kwan, K.M. (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis.* 32:49-62.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lambkin, G.R., and R.A. Rachubinski (2001). *Yarrowia lipolytica* cells mutant for the peroxisomal peroxin Pex19p contain structures resembling wild-type peroxisomes. *Mol Biol Cell.* 12:3353-64.

- Lametschwandtner, G., C. Brocard, M. Fransen, P. Van Veldhoven, J. Berger, and A. Hartig (1998). The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem.* 273:33635-43.
- Lazarow, P.B., and C. De Duve (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:2043-6.
- Lazarow, P. B., H. Shio, and M. Robbi (1980). Biogenesis of peroxisomes and the peroxisome reticulum hypothesis. In 31 st. Mosbach Colloquium: Biological Chemistry of Organelle Formation. T. Bucber, W. Sebald, and H. Weiss, editors. Springer-Vedag New York, Inc., New York. 187-206.
- Lazarow, P.B., M. Robbi, Y. Fujiki, and L. Wong (1982). Biogenesis of peroxisomal proteins in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 386:285-300.
- Lazarow, P.B., and Y. Fujiki (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol.* 1:489-530.
- Lazarow, P.B., and H.W. Moser (1995). Disorders of peroxisome biogenesis. IN: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., Hrsg., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Chapter 71, 2287–2324. McGraw-Hill, New York, Issue 7
- Lee, T.C. (1998). Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim Biophys Acta.* 1394:129-45.
- LeGendre, N. (1990). Immobilon-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. *Biotechniques.* 9:788-805.
- LeHir, M., V. Herzog, and H.D. Fahimi (1979). Cytochemical detection of catalase with 3,3'-diaminobenzidine. A quantitative reinvestigation of the optimal conditions. *Histochemistry.* 64:51-66.
- Lewis, R.A., K.F. Austen, and R.J. Soberman (1990). Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med.* 323:645-55.
- Li, X., E. Baumgart, G.X. Dong, J.C. Morrell, G. Jimenez-Sanchez, D. Valle, K.D. Smith, and S.J. Gould (2002a). PEX11alpha 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.* 22:8226-40.
- Li, X., E. Baumgart, J.C. Morrell, G. Jimenez-Sanchez, D. Valle, and S.J. Gould. 2002b. PEX11 beta deficiency is lethal and impairs neuronal migration but does not abrogate peroxisome function. *Mol Cell Biol.* 22:4358-65.
- Li, X., and S.J. Gould (2002). PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol.* 156:643-51.
- Li, X., and S.J. 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(19):17012-20.
- Lombard-Platet, G., S. Savary, C.O. Sarde, J.L. Mandel, and G. Chimini (1996). A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1265-9.
- Lovelock, J.E., and M.W. Bishop. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature.* 183:1394-5.
- Lueders, K.K., and B.M. Paterson (1982). A short interspersed repetitive element found near some mouse structural genes. *Nucleic Acids Res.* 10:7715-29.
- Luft, J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol.* 9:409-14.
- Madej, A., B. Okopien, J. Kowalski, M. Zielinski, J. Wysocki, B. Szygula, Z. Kalina, and Z.S. Herman (1998). Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 36:345-9.
- Maniatis T., Fritsch E.F., and J. Sambrook (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York

- Mannaerts, G.P., P.P. Van Veldhoven, and M. Casteels (2000). Peroxisomal lipid degradation via beta- and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys.* 32 Spring:73-87.
- Mansour, S.L., K.R. Thomas, and M.R. Capecchi. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.* 336:348-52.
- Marion-Letellier, R., M. Butler, P. Dechelotte, R.J. Playford, and S. Ghosh (2008). Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells--potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation. *Am J Clin Nutr.* 87:939-48.
- Marklund, S.L. (1992). Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem.* 267:6696-701.
- Martinez, M. (1992). Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders. *Brain Res.* 583:171-82.
- Martinez, M., I. Mougan, M. Roig, and A. Ballabriga (1994). Blood polyunsaturated fatty acids in patients with peroxisomal disorders. A multicenter study. *Lipids.* 29:273-80.
- Martinez, M., and I. Mougan (1999). Fatty acid composition of brain glycerophospholipids in peroxisomal disorders. *Lipids.* 34:733-40.
- Masoud, S.A., L.B. Johnson, and F.F. White (1992). The sequence within two primers influences the optimum concentration of dimethyl sulfoxide in the PCR. *PCR Methods Appl.* 2:89-90.
- Masters, C.J. (1996). Cellular signalling: the role of the peroxisome. *Cell Signal.* 8:197-208.
- Matsuzono, Y., N. Kinoshita, S. Tamura, N. Shimozawa, M. Hamasaki, K. Ghaedi, R.J. Wanders, Y. Suzuki, N. Kondo, and Y. Fujiki (1999). Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2116-21.
- Matsuzono, Y., and Y. Fujiki. (2006). In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p. *J Biol Chem.* 281:36-42.
- Matsuzono, Y., T. Matsuzaki, and Y. Fujiki. (2006). Functional domain mapping of peroxin Pex19p: interaction with Pex3p is essential for function and translocation. *J Cell Sci.* 119:3539-50.
- Maxwell, M., J. Bjorkman, T. Nguyen, P. Sharp, J. Finnie, C. Paterson, I. Tonks, B.C. Paton, G.F. Kay, and D.I. Crane (2003). Pex13 inactivation in the mouse disrupts peroxisome biogenesis and leads to a Zellweger syndrome phenotype. *Mol Cell Biol.* 23:5947-57.
- Mayerhofer P.U., Kattenfeld T., Roscher A.A., and A.C Muntau (2002). Two splice variants of human PEX19 exhibit distinct functions in peroxisomal assembly. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(5):1180-6
- McBride, L.J., S.M. Koepf, R.A. Gibbs, W. Salser, P.E. Mayrand, M.W. Hunkapiller, and M.N. Kronick (1989). Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin Chem.* 35:2196-201.
- Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell, and S. Falkow (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 127:1529-37.
- Michalik, L., and W. Wahli (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol.* 10:564-70.
- Mihalik, S.J., A.M. Rainville, and P.A. Watkins (1995). Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver peroxisomes. Production of alpha-hydroxyphytanoyl-CoA and formate is enhanced by dioxygenase cofactors. *Eur J Biochem.* 232:545-51.
- Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.

- Mimouni, V., E.N. Christiansen, J.P. Blond, L. Ulmann, J.P. Poisson, and J. Bezard (1991). Elongation and desaturation of arachidonic and eicosapentaenoic acids in rat liver. Effect of clofibrate feeding. *Biochim Biophys Acta*. 1086:349-53.
- Miura, S., I. Kasuya-Arai, H. Mori, S. Miyazawa, T. Osumi, T. Hashimoto, and Y. Fujiki (1992). Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions in vitro as a minimal peroxisome-targeting signal. *J Biol Chem*. 267:14405-11.
- Miyazawa, S., S. Furuta, T. Osumi, T. Hashimoto, and N. Ui (1981). Properties of peroxisomal 3-ketoacyl-coA thiolase from rat liver. *J Biochem*. 90:511-9.
- Miyazawa, S., T. Osumi, T. Hashimoto, K. Ohno, S. Miura, and Y. Fujiki (1989). Peroxisome targeting signal of rat liver acyl-coenzyme A oxidase resides at the carboxy terminus. *Mol Cell Biol*. 9:83-91.
- Modrich, P., and R. Lahue (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 65:101-33.
- Moraes, L.A., L. Piqueras, and D. Bishop-Bailey (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*. 110:371-85.
- Morgan, J.M., H. Navabi, K.W. Schmid, and B. Jasani. 1994. Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol*. 174:301-7.
- Morrison, D.A. (1977). Transformation in Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol*. 132:349-51.
- Moser, H.W. (1987). New approaches in peroxisomal disorders. *Dev Neurosci*. 9:1-18.
- Moser H.W., and A.B. Moser (1991). Measurements of saturated very long chain fatty acids in plasma". IN: *Hommes FA, ed. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York. Wiley-Liss, 177-191.
- Moser, H.W., and A.B. Moser. (1996). Very long-chain fatty acids in diagnosis, pathogenesis, and therapy of peroxisomal disorders. *Lipids*. 31 Suppl:S141-4.
- Müller, W.H., T.P. van der Krift, A.J. Krouwer, H.A. Wosten, L.H. van der Voort, E.B. Smaal, and A.J. Verkleij (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J*. 10:489-95.
- Mullis, K.B., and F.A. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-50.
- Muntau AC, Holzinger A, Mayerhofer PU, Gartner J, Roscher AA, and S. Kammerer (2000). The human PEX3 gene encoding a peroxisomal assembly protein: genomic organization, positional mapping, and mutation analysis in candidate phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 268(3):704-10.
- Muntau, A.C., A.A. Roscher, W.H. Kunau, and G. Dodt (2003a). The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. *Eur J Cell Biol*. 82:333-42.
- Muntau, A.C., A.A. Roscher, W.H. Kunau, and G. Dodt (2003b). Interaction of PEX3 and PEX19 visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Adv Exp Med Biol*. 544:221-4.
- Nagan, N., and R.A. Zoeller (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res*. 40:199-229.
- Nenicu, A., G.H. Luers, W. Kovacs, M. David, A. Zimmer, M. Bergmann, and E. Baumgart-Vogt (2007). Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod*. 77:1060-72.
- Netik, A., S. Forss-Petter, A. Holzinger, B. Molzer, G. Unterrainer, and J. Berger (1999). Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet*. 8:907-13.
- Neumann, E., and K. Rosenheck (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J Membr Biol*. 10:279-90.



- Okumoto, K., A. Bogaki, K. Tateishi, T. Tsukamoto, T. Osumi, N. Shimozawa, Y. Suzuki, T. Orii, and Y. Fujiki (1997). Isolation and characterization of peroxisome-deficient Chinese hamster ovary cell mutants representing human complementation group III. *Exp Cell Res.* 233:11-20.
- Olson, E.N., H.H. Arnold, P.W. Rigby, and B.J. Wold (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell.* 85:1-4.
- Opperdoes, F.R., and P. Borst (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* 80:360-4.
- Orgel, L.E., and F.H. Crick (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature.* 284:604-7.
- Osumi, T. (1993). Structure and expression of the genes encoding peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Biochimie.* 75:243-50.
- Otera, H., K. Okumoto, K. Tateishi, Y. Ikoma, E. Matsuda, M. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Osumi, K. Ohashi, O. Higuchi, and Y. Fujiki (1998). Peroxisome targeting signal type 1 (PTS1) receptor is involved in import of both PTS1 and PTS2: studies with PEX5-defective CHO cell mutants. *Mol Cell Biol.* 18:388-99.
- Otera, H., T. Harano, M. Honsho, K. Ghaedi, S. Mukai, A. Tanaka, A. Kawai, N. Shimizu, and Y. Fujiki (2000). The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p. *J Biol Chem.* 275:21703-14.
- Overbeek, P.A. (1994). In: Transgenic Animal Technology, A Laboratory Handbook, *Pinkert, C.A. ed., Academic Press Inc., San Diego, CA*
- Paltauf, F. (1994). Ether lipids in biomembranes. *Chem Phys Lipids.* 74:101-39.
- Perez, F.A., and R.D. Palmiter (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2174-9.
- Perl, A.K., L. Zhang, and J.A. Whitsett (2009). Conditional expression of genes in the respiratory epithelium in transgenic mice: cautionary notes and toward building a better mouse trap. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 40:1-3.
- Pham, C.T., D.M. MacIvor, B.A. Hug, J.W. Heusel, and T.J. Ley (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13090-5.
- Platta, H.W., and R. Erdmann (2007a). Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol.* 17:474-84.
- Platta, H.W., and R. Erdmann (2007b). The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett.* 581:2811-9.
- Powers, J.M., and H.W. Moser (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol.* 8:101-20.
- Powers, J.M., T.P. Kenjarski, A.B. Moser, and H.W. Moser (1999). Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol.* 98:129-34.
- Powers, J.M., D.P. DeCiero, M. Ito, A.B. Moser, and H.W. Moser. (2000). Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59:89-102.
- Powers, J.M. (2001). Normal and defective neuronal membranes: structure and function: neuronal lesions in peroxisomal disorders. *J Mol Neurosci.* 16:285-7; discussion 317-21.
- Pujol, A., C. Hindelang, N. Callizot, U. Bartsch, M. Schachner, and J.L. Mandel (2002). Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet.* 11:499-505.
- Purdue, P.E., S.M. Castro, V. Protopopov, and P.B. Lazarow (1996). Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel C-terminal peroxisomal targeting sequence. *Ann N Y Acad Sci.* 804:775-6.
- Purdue, P.E., and P.B. Lazarow (2001). Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:701-52.

- Qi, C., Y. Zhu, J. Pan, N. Usuda, N. Maeda, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, T. Hashimoto, and J.K. Reddy (1999). Absence of spontaneous peroxisome proliferation in enoyl-CoA Hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse liver. Further support for the role of fatty acyl CoA oxidase in PPARalpha ligand metabolism. *J Biol Chem.* 274:15775-80.
- Rachubinski, R.A., and S. Subramani (1995). How proteins penetrate peroxisomes. *Cell.* 83:525-8.
- Rajewsky, K., H. Gu, R. Kuhn, U.A. Betz, W. Muller, J. Roes, and F. Schwenk (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest.* 98:600-3.
- Raychaudhuri, S., and W.A. Prinz (2008). Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15785-90.
- Reddy, J.K., S.K. Goel, M.R. Nemali, J.J. Carrino, T.G. Laffler, M.K. Reddy, S.J. Sperbeck, T. Osumi, T. Hashimoto, N.D. Lalwani, and et al. (1986). Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:1747-51.
- Reddy, J.K., and G.P. Mannaerts (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 14:343-70.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17:208-12.
- Rhodin, J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed peroxisomal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Dissertation, Aktiebolaget Godvil, Stockholm.*
- Richardson, K.C., L. Jarett, and E.H. Finke (1960). Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35:313-23.
- Rodemer, C., T.P. Thai, B. Brugger, K. Gorgas, and W. Just. (2003a). Targeted disruption of ether lipid synthesis in mice. *Adv Exp Med Biol.* 544:355-68.
- Rodemer, C., T.P. Thai, B. Brugger, T. Kaercher, H. Werner, K.A. Nave, F. Wieland, K. Gorgas, and W.W. Just. (2003b). Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet.* 12:1881-95.
- Rottensteiner, H., A. Kramer, S. Lorenzen, K. Stein, C. Landgraf, R. Volkmer-Engert, and R. Erdmann (2004). Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Mol Biol Cell.* 15:3406-17.
- Sacksteder, K.A., and S.J. Gould (2000). The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet.* 34:623-652.
- Sacksteder, K.A., J.M. Jones, S.T. South, X. Li, Y. Liu, and S.J. Gould (2000). PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis. *J Cell Biol.* 148:931-44.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-4.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.
- Salinovich, O., and R.C. Montelaro (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 156:341-7.
- Samuelsson, B. 1987. An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Drugs.* 33 Suppl 1:2-9.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.
- Santos, M.J., T. Imanaka, H. Shio, and P.B. Lazarow (1988a). Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem.* 263:10502-9.

- Santos, M.J., T. Imanaka, H. Shio, G.M. Small, and P.B. Lazarow (1988b). Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome--aberrant organelle assembly. *Science*. 239:1536-8.
- Sastry, P.S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res*. 24:69-176.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*. 14:381-92.
- Savolainen, K., T.J. Kotti, W. Schmitz, T.I. Savolainen, R.T. Sormunen, M. Ilves, S.J. Vainio, E. Conzelmann, and J.K. Hiltunen (2004). A mouse model for alpha-methylacyl-CoA racemase deficiency: adjustment of bile acid synthesis and intolerance to dietary methyl-branched lipids. *Hum Mol Genet*. 13:955-65.
- Schaffer, J.E., and H.F. Lodish (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 79:427-36.
- Schekman, R. (2005). Peroxisomes: another branch of the secretory pathway? *Cell*. 122:1-2.
- Schliebs, W., and W.H. Kunau (2006). PTS2 co-receptors: diverse proteins with common features. *Biochim Biophys Acta*. 1763:1605-12.
- Schmidt, A., R.L. Vogel, K.M. Witherup, S.J. Rutledge, S.M. Pitzenberger, M. Adam, and G.A. Rodan (1996). Identification of fatty acid methyl ester as naturally occurring transcriptional regulators of the members of the peroxisome proliferator-activated receptor family. *Lipids*. 31:1115-24.
- Schnaitman, C.A. (1971). Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of Escherichia coli. *J Bacteriol*. 108:553-63.
- Schrader, M., J.K. Burkhardt, E. Baumgart, G. Luers, H. Spring, A. Volkl, and H.D. Fahimi (1996). Interaction of microtubules with peroxisomes. Tubular and spherical peroxisomes in HepG2 cells and their alterations induced by microtubule-active drugs. *Eur J Cell Biol*. 69:24-35.
- Schrader, M., K. Krieglstein, and H.D. Fahimi (1998). Tubular peroxisomes in HepG2 cells: selective induction by growth factors and arachidonic acid. *Eur J Cell Biol*. 75:87-96.
- Schrader, M. (2006). Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. *Biochim Biophys Acta*. 1763:531-41.
- Schrader, M., and H.D. Fahimi. 2008. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol*. 129:421-40.
- Schutgens, R.B., H.S. Heymans, R.J. Wanders, H. van den Bosch, and J.M. Tager (1986). Peroxisomal disorders: a newly recognised group of genetic diseases. *Eur J Pediatr*. 144:430-40.
- Scott, B.L., and N.G. Bazan (1989). Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:2903-7.
- Seedorf, U., M. Raabe, P. Ellinghaus, F. Kannenberg, M. Fobker, T. Engel, S. Denis, F. Wouters, K.W. Wirtz, R.J. Wanders, N. Maeda, and G. Assmann (1998). Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev*. 12:1189-201.
- Shi, S.R., M.E. Key, and K.L. Kalra (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 39:741-8.
- Shi, S.R., R.J. Cote, and C.R. Taylor (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem*. 45:327-43.
- Shibata, H., Y. Kashiwayama, T. Imanaka, and H. Kato (2004). Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins. *J Biol Chem*. 279:38486-94.
- Shimozawa, N., T. Tsukamoto, Y. Suzuki, T. Orii, and Y. Fujiki (1992). Animal cell mutants represent two complementation groups of peroxisome-defective Zellweger syndrome. *J Clin Invest*. 90:1864-70.
- Shimozawa, N., Y. Suzuki, Z. Zhang, A. Imamura, K. Ghaedi, Y. Fujiki, and N. Kondo (2000). Identification of PEX3 as the gene mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures. *Hum Mol Genet*. 9:1995-9.

- Shimozawa, N., T. Nagase, Y. Takemoto, Y. Suzuki, Y. Fujiki, R.J. Wanders, and N. Kondo (2002). A novel aberrant splicing mutation of the PEX16 gene in two patients with Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 292:109-12.
- Sindelar, P.J., Z. Guan, G. Dallner, and L. Ernster (1999). The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 26:318-24.
- Small, G.M., L.J. Szabo, and P.B. Lazarow (1988). Acyl-CoA oxidase contains two targeting sequences each of which can mediate protein import into peroxisomes. *EMBO J.* 7:1167-73.
- Smith, J.J., R.K. Szilard, M. Marelli, and R.A. 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.* 17:2511-20.
- Smith, L.M., J.Z. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C.R. Connell, C. Heiner, S.B. Kent, and L.E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 321:674-9.
- Snyder, W.B., A. Koller, A.J. Choy, M.A. Johnson, J.M. Cregg, L. Rangell, G.A. 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.* 10:4005-19.
- Snyder, W.B., A. Koller, A.J. Choy, and S. Subramani (2000). The peroxin Pex19p interacts with multiple, integral membrane proteins at the peroxisomal membrane. *J Cell Biol.* 149:1171-8.
- South, S.T., and S.J. Gould (1999). Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol.* 144:255-66.
- Sprecher, H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 1486:219-31.
- Sprott, R.L. (1997). Mouse and rat genotype choices. *Exp Gerontol.* 32:79-86.
- St Clair, M.H., W.H. Miller, R.L. Miller, C.U. Lambe, and P.A. Furman (1984). Inhibition of cellular alpha DNA polymerase and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by the triphosphate of BW759U. *Antimicrob Agents Chemother.* 25:191-4.
- Staels, B., W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebret, I.P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J.C. Fruchart, J. Najib, J. Maclouf, and A. Tedgui (1998). Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* 393:790-3.
- Strachan, T., und A.P. Read (1996). Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.*
- Stroobants, A.K., E.H. Hetteema, M. van den Berg, and H.F. Tabak (1999). Enlargement of the endoplasmic reticulum membrane in *Saccharomyces cerevisiae* is not necessarily linked to the unfolded protein response via Ire1p. *FEBS Lett.* 453:210-4.
- Swinkels, B.W., S.J. Gould, A.G. Bodnar, R.A. Rachubinski, and S. Subramani (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* 10:3255-62.
- Swinkels, B.W., S.J. Gould, and S. Subramani (1992). Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett.* 305:133-6.
- Tam, Y.Y., A. Fagarasanu, M. Fagarasanu, and R.A. Rachubinski (2005). Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 280:34933-9.
- Tamura, S., K. Okumoto, R. Toyama, N. Shimozawa, T. Tsukamoto, Y. Suzuki, T. Osumi, N. Kondo, and Y. Fujiki (1998). Human PEX1 cloned by functional complementation on a CHO cell mutant is responsible for peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4350-5.
- Tateishi, K., K. Okumoto, N. Shimozawa, T. Tsukamoto, T. Osumi, Y. Suzuki, N. Kondo, I. Okano, and Y. Fujiki (1997). Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants defective in peroxisome biogenesis represent two novel complementation groups in mammals. *Eur J Cell Biol.* 73:352-9.

- te Riele, H., E.R. Maandag, and A. Berns (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:5128-32.
- Teorell, T., und E. Stenhagen (1938): Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2,0-12,0. *Biochem Z* 299: 416-419
- Thomas, K.R., and M.R. Capecchi (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51:503-12.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22:4673-80.
- Titorenko, V.I., and R.A. Rachubinski (2001). The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:357-68.
- Toro, A., C. Arredondo, G. Cordova, C. Araya, J.L. Palacios, A. Venegas, M. Morita, T. Imanaka, and M.J. Santos (2007). Evaluation of the role of the endoplasmic reticulum-Golgi transit in the biogenesis of peroxisomal membrane proteins in wild type and peroxisome biogenesis mutant CHO cells. *Biol Res*. 40:231-49.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4.
- Tsukamoto, T., S. Yokota, and Y. Fujiki (1990). Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants defective in assembly of peroxisomes. *J Cell Biol*. 110:651-60.
- Tsukamoto, T., S. Hata, S. Yokota, S. Miura, Y. Fujiki, M. Hijikata, S. Miyazawa, T. Hashimoto, and T. Osumi (1994). Characterization of the signal peptide at the amino terminus of the rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase precursor. *J Biol Chem*. 269:6001-10.
- Tugwood, J.D., I. Issemann, R.G. Anderson, K.R. Bundell, W.L. McPheat, and S. Green (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J*. 11:433-9.
- Uchida, Y., N. Kondo, T. Orii, and T. Hashimoto (1996). Purification and properties of rat liver peroxisomal very-long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biochem*. 119:565-71.
- Uchiyama, A., T. Aoyama, K. Kamijo, Y. Uchida, N. Kondo, T. Orii, and T. Hashimoto (1996). Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem*. 271:30360-5.
- Van Ael, E., and M. Fransen (2006). Targeting signals in peroxisomal membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1763:1629-38.
- van den Bosch, H., R.B. Schutgens, R.J. Wanders, and J.M. Tager (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem*. 61:157-97.
- van den Bosch, H, and E.C. de Vet (1997). Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase. *Biochim Biophys Acta*. 1348(1-2). 35-44. Review.
- van der Klei, I.J., and M. Veenhuis (2006). PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochim Biophys Acta*. 1763:1794-800.
- Van Veldhoven, P.P., and G.P. Mannaerts (1999). Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Adv Exp Med Biol*. 466:261-72.
- Vanhooren, J.C., E. Baumgart, M. Fransen, G.P. Mannaerts, and P.P. Van Veldhoven (1996). Mammalian peroxisomal acyl-CoA oxidases. I. Molecular characterization of rat pristanoyl-CoA oxidase. *Ann N Y Acad Sci*. 804:674-5.
- Vastiau, I.M., E.A. Anthonio, M. Brams, C. Brees, S.G. Young, S. Van de Velde, R.J. Wanders, G.P. Mannaerts, M. Baes, P.P. Van Veldhoven, and M. Fransen (2006). Farnesylation of Pex19p is not essential for peroxisome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*. 63:1686-99.

- Verhoeven, N.M., D.S. Schor, H.J. ten Brink, R.J. Wanders, and C. Jakobs (1997). Resolution of the phytanic acid alpha-oxidation pathway: identification of pristanal as product of the decarboxylation of 2-hydroxyphytanoyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun.* 237:33-6.
- Verhoeven, N.M., C. Jakobs, G. Carney, M.P. Somers, R.J. Wanders, and W.B. Rizzo (1998). Involvement of microsomal fatty aldehyde dehydrogenase in the alpha-oxidation of phytanic acid. *FEBS Lett.* 429:225-8.
- Visner, G.A., S.E. Chesrown, J. Monnier, U.S. Ryan, and H.S. Nick (1992). Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 188:453-62.
- Völkl, A., and H.D. Fahimi (1985). Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats. *Eur J Biochem.* 149:257-65.
- Völkl, A., E. Baumgart, and H.D. Fahimi (1988). Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J Histochem Cytochem.* 36:329-36.
- Völkl, A., Baumgart, E., and H.D. Fahimi (1996). Isolation and characterization of peroxisomes. In: Subcellular Fractionation: A Practical Approach (Editoren: Graham, J. und Rickwood, D.) *Oxford University Press, Oxford, U. K.*, 143–167
- Vogelstein B., and D. Gillespie (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619
- Wanders, R.J., H.S. Heymans, R.B. Schutgens, P.G. Barth, H. van den Bosch, and J.M. Tager (1988). Peroxisomal disorders in neurology. *J Neurol Sci.* 88:1-39.
- Wanders, R.J., S. Denis, C.W. van Roermund, C. Jakobs, and H.J. ten Brink (1992). Characteristics and subcellular localization of pristanoyl-CoA synthetase in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1125:274-9.
- Wanders, R.J., R.B. Schutgens, P.G. Barth, J.M. Tager, and H. van den Bosch (1993). Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: a biochemical approach. *Biochimie.* 75:269-79.
- Wanders, R.J., R.B. Schutgens, and P.G. Barth (1995). Peroxisomal disorders: a review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54:726-39.
- Wanders, R.J. (1999). Peroxisomal disorders: clinical, biochemical, and molecular aspects. *Neurochem Res.* 24:565-80.
- Wanders, R.J., and J.M. Tager (1998). Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol Aspects Med.* 19:69-154.
- Wanders, R.J. (2004). Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab.* 83:16-27.
- Wanders, R.J., and H.R. Waterham (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem.* 75:295-332.
- Waring, M.J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol.* 13:269-82.
- Watkins, P.A., A.E. Howard, and S.J. Mihalik (1994). Phytanic acid must be activated to phytanoyl-CoA prior to its alpha-oxidation in rat liver peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 1214:288-94.
- Watkins, P.A., A.E. Howard, S.J. Gould, J. Avigan, and S.J. Mihalik (1996). Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J Lipid Res.* 37:2288-95.
- Weller, S., Gärtner J. (2002). Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen. Entwicklungsstörungen von Peroxisomen. IN: *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2, Springerverlag
- Williard, D.E., S.D. Harmon, T.L. Kaduce, M. Preuss, S.A. Moore, M.E. Robbins, and A.A. Spector (2001). Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J Lipid Res.* 42:1368-76.
- Woronin, M. (1864). Zur Entwicklungsgeschichte der *Ascobolus pulcherrimus* Cr. und einiger Pezizien. *Abh. Senkenb. Naturforsch.* 5, 333–344

- Xu, H.E., M.H. Lambert, V.G. Montana, D.J. Parks, S.G. Blanchard, P.J. Brown, D.D. Sternbach, J.M. Lehmann, G.B. Wisely, T.M. Willson, S.A. Kliewer, and M.V. Milburn (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*. 3:397-403.
- Yamamoto, K., and H.D. Fahimi (1987). Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogeneous segments. *J Cell Biol*. 105:713-22.
- Yamasaki, M., N. Hashiguchi, C. Fujiwara, T. Imanaka, T. Tsukamoto, and T. Osumi (1999). Formation of peroxisomes from peroxisomal ghosts in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant upon complementation by protein microinjection. *J Biol Chem*. 274:35293-6.
- Yang, X., P.E. Purdue, and P.B. Lazarow (2001). Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *Eur J Cell Biol*. 80:126-38.
- Yavin, E., and S. Gatt (1972). Oxygen-dependent cleavage of the vinyl-ether linkage of plasmalogens. 1. Cleavage by rat-brain supernatant. *Eur J Biochem*. 25:431-6.
- Yavin, E., A. Brand, and P. Green (2002). Docosahexaenoic acid abundance in the brain: a biodevice to combat oxidative stress. *Nutr Neurosci*. 5:149-57.
- Yoo, H.Y., M.S. Chang, and H.M. Rho (1999a). The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem*. 274:23887-92.
- Yoo, H.Y., M.S. Chang, and H.M. Rho (1999b). Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene*. 234:87-91.
- Yu, K., W. Bayona, C.B. Kallen, H.P. Harding, C.P. Ravera, G. McMahon, M. Brown, and M.A. Lazar (1995). Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem*. 270:23975-83.
- Zaar, K., A. Völkl, and H.D. Fahimi (1987). Association of isolated bovine kidney cortex peroxisomes with endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 897:135-42.
- Zaar, K., A. Völkl, and H.D. Fahimi. 1991. Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: identification with L-alpha-hydroxyacid oxidase B. *J Cell Biol*. 113:113-21.
- Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Fols (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 33:337-49.
- Zhou, C., Y. Yang, and A.Y. Jong (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*. 8:172-3.
- Zimmermann, U., G. Pilwat, and F. Riemann (1974). Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J*. 14:881-99.
- Zinser, E., C.D. Sperka-Gottlieb, E.V. Fasch, S.D. Kohlwein, F. Paltauf, and G. Daum (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 173:2026-34.
- Zoeller, R.A., and C.R. Raetz (1986). Isolation of animal cell mutants deficient in plasmalogen biosynthesis and peroxisome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:5170-4.
- Zoeller, R.A., O.H. Morand, and C.R. Raetz (1988). A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem*. 263:11590-6.

## 7. Anhang

### 7.1 Sequenzen

#### 7.1.1 Sequenzierter Bereich des PEX19-Targetingvektors

5'-Homologiebereich von PEX19 →

```

CGCCGCCGGACGAACTAACCTGACTACGGACCGGTAAAACGACGGCCAGTGTTAACAAAACCATTCCTCATAGACATTGTCT
GAGGTCCTTCCTCCAGGGGATTCTAGATGGTGTCAAATTGATGGAATATCTCAATTGTGAGAGTGTGCTGCTTCTAAGAATA
ATTGCATAAATGATGTATTTATTATTCCTTTGATTTAAAAACATAATACAGGCCAGCCTGGTAGCTCCATCTGTTCTAGCA
CTTACAAGATGGAAATATGGTCAAGGGTTCGAGACCAGCCATGCATGGTGGCACATGCCTTTAATCCCAGCAGCTGGACGACA
GAATTCAGACCAACCTGGTCTGTCTACATAGTGGTCCAATGGCTACACAGTGAGACTCAAAAATGAAAAGCTCAAGACAAG
GGACTGGCGAGGTGGCTCAGCAGCAGTTAAGAACACTGGCTGTTCTTCCAGAGTTC AATTCCCAGCACCCACATGGTTACTC
ATAACAATCCATAACTTCCGTTCCATGAGATCTAACTCACTTTTTCTGGTGAACGCAGGTA CTGCATGCACATGGTACACAGAT
CTACATACAGTAACACCAAAAACATTCATATACAAAAATACCACCTTTCTAAACCTAGGATAACTTCAGCTAGTTTCAGGGTTA
GCCTGAATGACCTTATCTCAAAAAAAAAAAAAACAAAAACAAAACAAAAACAGGCTAGTGAGGTGGCTCAGCAGTTAAGA
GCAAGTATTGTACTTCAGAGGGCCTGGGTTGAGTTCCCATCACCCAGCAAGGTGGCTCACAACCACCTGTAATGCCAGCTT
CATGGGATCTGATGTTTTCTTCTGGCTTTCATGAGCGCCTGCACCTTATGTCCACAAATGCACATACTGCACATAAAATACA
ACTGCACATAAAATCAACTGCACATAAAATGCACAGCTGGAGACAGCTCCATTGGGAGGGTGTGGCCTAGTATGGCAGGGTTC
TGGACTTAGTTCCCAGTACGACATATGGCATTCCACCCTTTCTTAAAAATAGATAAGTGCAGACATTTTATTTAGTTACTGG
TGATTGAACCTGGGGTTTTGCACATGATAGGCAAGTATCTACTATTGAGCTCTCTATAGCCACAGGAAAAGATGTTCAAAA
TATGTATTGGTTTTCTTTGTGTTTTCTTTATACAGCTTCTCCTAGAGCCTCGACTGGCCTTGAACCTGACCTTGAATTTTTAATCT
TCCAGTCTCCCAGCTCCTTAGTGCTGAAATTA CTGAAATTTTTTCATTTTTAATCCATTTTTAAATCCTTTTCCTTTTTCTTTTTCT
TTTTCTTTCTTTTTTTTTTAATTAATTTATTTATTTGTAATATGTAAGTACACTGTAGCTGTCTTCAGACACTCAAGAAGGAGT
CAGATCTCGTTATGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAACTCAGGACCTTTGGAAGAGCAATCAGTCGGTGCTCTTAAACA
CTGAGCCATCTCACCAGCCCCTTTCTTTTTTCAACTGATAATATATCCGTGAAGTTCAGACACCAGTCTTTAGACCTTTACTG
TCAGGCCAGTGACGTGGCGTAGGAAGTAAGGGCACTTTGAGGTCATGACTGACAACCTGAGTTTGATCATGGAGATCCGCATG
GTGGGAGGAGAGAACTTGCTCCCCAGGCAGCACATGACCTCCACACAAGCATCATCGTGTGTAGGCACCATTCCACCTATAC
ACTCACAATTACTGCCAGTGGTGGTGGCACACGCCTTTAATCCCAGCGCTAGGGAGGCAGAGGCCAACTGATGTCTGAGTAT
GAGGCAGCCTGGTCTACAGAATGAGTTCTAGGACAACCAGGGCTACACAGAGAAACCCTGTCTCAGAGGAAAAAAATCAAAA
CAAACCCAAAAAATAACTGCCTTGTGTATCTTTTTCTGAGCCACTCAGTTCCCTATTAGTTTTCCCAAACAGGTAAC TACT
TACCAGTTTCCTTATGGCCTTCAAAAAGTATATATTTATAAGTATATCACTGTGTTTTTCCCACCTTCTTTTATACATGAC
AGGAACATAATCTTTTTTTTTTTTTAATTCAAGACATTTTAAAGTTTTGTATGTGTGTTGTGTGTTTAGGTTTTCTCATAGT
ATCTGGGTATTTATGCTGATTATCAGCATTGCTGCAATGAGTAACTGGAACATACATTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGGGG
GGGGGGGGAAATGTCCCTGACTGAGGAGGAAAAGCTGCTCCAAAGAGCACAGGACTTTAGTGTTTTTCAGATTTAAGAGTTGC
TTTTCTAAATATAATCCTCAAAC TAAGACTGCTTTCTCAAAAATGTGTATATTACGGGAATATTTTTCTTAAAGTTTTATACATT
CTTCCTTCAAGGTCAGGCAAGAATCTGGCACAGCAATTCACAGCCATAATTCCGATTCTTGAAGGTTAAAGCAGAACAATTG
GCTAAAGAGCAAGATGCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATATCATGGTGGTTAAAGAGATGGCTTAGCTGTTTAGAGCA
AAGACTGTTCTTGCAGAGGACTCAGTTAGTTTTCCAGCACCCACATCTGGTGGCTGCCAACCCACTATTGCTCTAGCTCCAAA
GGGATTTGCCACTTCTTGCCAGCTGAATAGAAAAGAGAGACAGGGCTGGTGAGATGGCTCAGTGGGTAAGAGCATCCGACTGC
TCTTCCGAAGGTCTGAAGTTCAAATCCCAGCAACCACATGGTGGCTCACAACCATCCGTAATGAGATCTGACTCCCTCTTCTG
GAGTGTCTGAAGACAGCTCAGTGTACTTATATACAATAAAAAATAAATAAATAAATCTTTAAAAAAAAGAAAAGAGAGAC
AGGTGTGGTGGTACACGATTTAATGCCACCACCCTCGAGGCAGAGTCAAGAGTATTTTTTTCGTTCAAGGCCAGCCTGGTCT
ACAGAGTTCAGGAAAGCCAAGGCTACATACAGAACATTCCTCGATAAAAACAAAAACAAGACAATCCCCCCCACACACAAAGAA

```



AACTGAAAGAAATGATTCAAAGAAAGAATGCTTGTTTTTTAATCTGCTTAAGTAACATCTGTGTTTTCCAATTCTATCTCCAGT  
 CAACCTCTACAGGTAGGACCATCCCTGGTCCACTTGTAGATTTCACTGTGCTCAGCACGATTGTATACAACAGTAGATGCTCA  
 TTATACGCTAAAAATAAATTGGATGATCTTTGTTTTATCTGTTTTGTGTATATGTCAAGGAGCATATTCGGAGGTCAGAGCCAG  
 CACATGATAGACATCTCTCCTACCAGTGTGCTTTGAGGATGAAACCAAGGTTGCTTCAATTTGGCAATCTGTCTCAAGCGA  
 AAAATGCTCGTTTTAATAGCTTCGTATTTAGCTGAGCCCTGTGCTGTAATCTCTGTCTTGGGAGGTGGAGACAGTAGGATT  
 AGAAAACCTGCCTGAAAACAAAACCCAGATTAAAGATTCAGGTTAAAGATGGGGCAAGCAAAAACGCAATAAACCTCCAC  
 CCCTTCTGACCCGCCCCACAATACAGCTGGGCCTCATGGGTCAAGTAGTTTGAAGTGGAGACGGGAAGGGAGA  
 CCCGATTTCTGGACCAGCTTGAGCAATCTATCTAGTTCAAGGCAAACCCGCTGTGGCTCTGTAGCTCCAGTAGCCGAGTGCTT  
 GCTTAATACGTGCAAGAACCTAGGTTTGGAGGCCAACCAAGAAAAAACAACAAAACAAAACAAAACCCAGTCTCCTGTCCCT  
 TTAAAAATGGCGGTCTGACAGGTAGGACGATATTATGGCTGCTCAAGTCATGAGGGCGGGGTTGGGGCGGGCATGTGGTG  
 GCGCCAGTGGTTCCACTCCTACGGCAAGTGGGAGGCAGTAAGATGGCGGCTGCTGAGGAAGGTTGCGGTGTGGGGTCGAAG  
 ACGACCGGGAACCTGGAGGAGCTTCTGAAAAGTAAGAGTGCACGATGGGAAAGACCAGAAGTATCGGGGAGAGGATCTTCTAGG  
 ATCGATTCTAGGAATTCTCTAGCTCGAGGGGCGCGCCCCAGCTGGTCTTTCCGCTCAGAAGCCATAGAGCCCACCGCATC  
 CCCAGCATGCCTGCTATTGTCTTCCAATCCTCCCCCTGCTGTCTGCCCCACCCACCCCCAGAATAGAATGACACCTAC  
 TCAGACAATGCGATGCAATTTCCCTCATTTTATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGTCAGGAAGGCACGGGG  
 GAGGGCAAAACAACAGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGAGAATTGATCCCTCAGAA  
 GAACTCGTCAAGAAGCGATAGAAGGCATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCAGGAGGAAGCGGTCAGCCC  
 ATTCGCCGCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGATCCGCCACACCCAGCCGGCCACAG  
 TCGATGAATCCAGAAAAGCGCCATTTCCACCATGATATTGGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACAGACGAGATCCTCGCC  
 GTCGGGCATGCGCGCCTTGGCCGGAACAGTTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATTGA  
 CAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGC  
 GTATGCAGCCGCGCATTCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGG  
 CACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCCTTCAGTGACAACGTGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTGTGGCCA  
 GCCACGATAGCCGCGCTGCTCCTGTCAGTTCATTAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAGAACCGGGCGCCCC  
 TGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCTATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCA  
 AGCGGCCGGAACCTGCGTGAATCCATCTTGTTCATAGGCCGATCCCATATTGGCTGCAGGTCGAAAGGCCCGGAGATGAG  
 GAAGAGGAGAACAGCGCGGACAGTGCCTTTTGAAGCGTGCAGAAATGCCGGCTTCCGGAGGACCTTCGGGCGCCCGCCC  
 GCCCTGAGCCCGCCCTGAGCCCGCCCCGACCCACCCCTTCCCAGCCTCTGAGCCAGAAAGCGAAGGAGCCAAAGCTGC  
 TATTGGCCGCTGCCCAAAGGCCACCCGCTTCCATTGCTCAGCGGTGCTGTCCATCTGCACGAGACTAGTGAGACGTGCTAC  
 TTCCATTTGTACGTCTGACGACGCGAGCTGCGGGGCGGGGGAACTTCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAGGTGGCGCA  
 AGGGGCCACCAAGAACGGAGCCGTTGGCGCTACCGGTGGATGTGGAATGTGTGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGCGC  
 CAAGTGCCAGCGGGCTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTGGGAAAAGCGCCTCCCTACCCGGTAGGGCGCGCCGGG

.....

3'-Homologiebereich von PEX19 →

ATCCAAGCTTACCATGGGAGACGTACCCGGTTCTAGCCTGATTTTTTTGTTGCTTTTGTGTTTTCTGGGACTTTTCCTTTT  
 TTTTTTTTTTTTTTAATCTTATTCTTTCCGTTTTCTAGTTACAGGCCTTGGGCCATCTCCAAAAGAGCTGGCTGGGGAGA  
 TGGTGAGTTTGTCTTCTGTATTTTAACCCAGTTTTCAGTTTGCAGACGCCAGTAATCCTTAGGTAATCCATATAGGGTGATCA  
 CTGTGGCTGCTAGGGACAGACCTTCAAGAGCTCTGACTTGAAATATGAGTGATTGTCTCAGTCCCTTTGTCTTCTCCAGCC  
 TCCTGGCCTCAACTTTGACCTGGATGCTCTCAATCTGTCGGGCCCCCAGGTGCTAATGGCGAACAGTGTCTGATCATGTGAA  
 ACACAGCACAGTTTCTCCCTGAGCCCCAGCCGTGGGGAACATCTGGAGTCAACAGAGTCACTGGGAACTGAGGCAGGAGTAT  
 CATCTGTGGGAGCTGGCTGCCCCACCCACTCTCCATCCATTCAAGACTGTGCCATACCAGCTGATCTGTAGGCCTTTTCT  
 ATGAGTCTACTCCATCAGGGTTTCTGCTGTTAGAAACAGGCCAATTATCTGCCAGGTGAAGGAAGGCATCCCTTGTGGGGCA  
 TTTCACTTCTTCCACTCCCCAAATAATGTTACACATGGCAGTACTCATGTTCCCCTTGATTCCCAGGGACGTCGCGCCTTGT  
 TTCTCCTCCCTCTCTGTGCTGGGGAGGAGGAGCTGAGTCTGACTCTGTGCTCCTGTTAGGCAGGGCCTCTGGGAAGAGGAG  
 AAATGTAGCCTGAGCTGGGGCTGGAGGCTGGTCACCGCATATCCTTGCCTTCTTTGGAAATCTCTTAAAGGAAAGGAATTTT  
 GCACTTAGCCATGGTGGGTTGGAAGCAAAGCCTTGGGCTTTTCTGTCCTTAGGTGCTGAGCCCCAATCCCCCTTCTCCTCT

GAGAACTCATGTTGCTGCCCTGGTTCTTTCTACAGCTCTGGGATTTAGGGGAGCCAACCTCTTGGCCTTCCTTTGCTCCCTGA  
CTGTCCTTACGTCCTCTCTGTTTAGAGTCTTATTTATTTCTGCCCTTTTAAACCAGTGTGTGATGGATGAAGCCAATCTTGT  
TCCTTTCATCTAGTACCTGGACCATTCTCCCTAGACCCTTGCCTTCTCCCTGGCCAACACATACTTGACGTGTCAGATCTGG  
TACATGAATGGCCATTCTACCCAGATAGGTTTTAGCTTATATATAGGACATCAGATTCCTTGGAAATCCTTGGTTTCCAGGAAGGT  
GCTTGGAAAGGGGTGTAGCCAGAAATATTTTTCCCTGCGAGCCCTATGGGGTAGTATCTAATAAATATTTCTGAGCAAGTGTG  
TGGGTATTTTTTTCATCCAGGTCTATTTCTAATCTTCCCTAGTTTTCTATAAACTGCAGAGTGAGATGTGTAGGAGATGGATAG  
TTCTGTATAGTGTGTAGGCTCTACCATGGCCCAGCCCTCCAGCTCAGCAAAGAATACTGTCTTCGTCTCCTTGGCACTTA  
TTTCAGTCTTAACATTTTACGATATAGCTGATGTTAGTGATTGATATATTGTCAACATGTTTTCTAAATATCTAACCTTTGAA  
TCGACCTGCTTTTTTTCACAGTGGTTCTAAGCACCATGGTTGCCATATATTTTATGGATATTCTTTTAGGCCACCTAGCTAGTTC  
ACTTGGAAAATAACGTTTTTAAAAATATATTTTTTATTTATTTCTTTTGGAAATTTATACATGTATACAATGTATCCTGATCATAT  
CCACCCTCCCACCCACCCACCCACCCACCTGCTGAAAATAACTTTGGCAAGAAGAAATTCACATTTATCATTTTGGATC  
ACTTCGAGTTTGTAAACATCATTTCCCTGGGCTAAAACCACATTTAAGGATGCAACATATTCTATGAAATGTGCTTGGCGCC  
TCGGTCTGGGAACCTCCAGCCAGCACAGCTTATCAAACGGAAGACTCGGGGTCTGAATTTGAGACTCCTCCATGCGCTGAGG  
AAGGGAAAATGAATGTACCAGCTGATCTGTGGTGTAGTGGGGTCTGAATTGCCAATATTTTATTGATGCTCCTGACAAAAG  
CTTGACAAGGACAGGTGAGGAGACAGGAACAGGAATGATCGGCCCTTGGAACTGTTCTCATTTGCCATGTGCCCCAACTTTAT  
TCTCATTTCTGCTGTGTAGTCTGTGTGCCACCATGTTTTATTTTCAAGACTTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTTAATTTGGTTGA  
AAATGAGCAAGTTGACCTTGGGTGGACTTTTTTCTAAATACCATTGAATTACTCTGGGACTTAGAGCTGAATAAAACCTG  
GTACCCTAGACCGCGCTAGACCCGGGGGGTTCGACGCGGCCGCCATGGTCATAGCTGTTTGGACGTCAGGTGGCACTTTTCGG  
GAAAATGTGCGCGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATA  
AATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGATGATGATTAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTT  
GCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC  
GAACTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCT  
GCTATGTGGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGG  
TTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGT  
GATAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCA  
TGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAA  
TGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCG  
GATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGG  
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACGTTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA  
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCA  
TATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA  
AATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTTTTC  
TGGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGTGGTTTGTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT  
TTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAA  
GAACTCTGTAGACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGTCTTA  
CCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTG  
GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGA  
CAGGTATCCGGTAAGCGGAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTC  
CTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTGCTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC  
AACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCTTTTTGCGGACCGTAGAGTCGAGCAGTGTGGTTTTCAAGAGGAAGCAAAAAGCCTC  
TCCACCCAGGCTGGAAATGTTTTCCACCAATGTGAGCAGTGTGGTTTTGCAAGAGGAAGCAAAAAGCCTCTCCACCCAGGCC  
TGGAATGTTTTCCACCAATGTGAGCAAAACCCCGCCAGCGTCTTGTCAATTGGCGAATGGAACACGCAGATGCAGTCGGGGC  
GGCGCGTCCAGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCTCGAACACCGAGCGACCTGACGCGACCCGCTTAAC  
AGCGTCAACAGCGTCCGCACATCTTGGTGGCGTGAAACTCCCGCACCTCTTCCGCCAGCGCCTTGTAGAAGCGCGTATGGCT  
TCGTACCCCGGCCATCAGCACGCGTCTGCGTTGACCAGGCTGCGCGTTCTCGCGCCATAGCAACCGAGTACGGCGTTGCG  
CCCTCGCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCCGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTTATATAGACGGTCCCC  
ACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTGCGCGACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATG

ACTTACTGGCGGGTGTCTGGGGGCTTCCGAGACAATCGGAACATCTACACCACACAACACCGCCTTGACCAGGGTGAGATATC  
GGCCGGGGACGCGGGCGGTGGTAATGACAAGCGCCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATACCGTGACCGACGCCGTTCTGGCTC  
CTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCGCCCCCGGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCC  
CTCCTGTGTACCCGGCCGCGGATACCTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGTGGCGTTTCGTGGCCCTCATCCCGCC  
GACCTTGCCCGGCACAAACATCGTGTGGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCTGGCCAAACGCCAGCGCCCCG  
GCGAGCGGCTTGACCTGGCTATGCTGACCGCGATTCCGCCGCTTTACGGGCTGCTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGGGC  
GGCGGGTCTGTGGCGGGAGGATTGGGGACAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGGG  
CCCACGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCCTGTTTCGGGGCCCCGAGTTGCTGGCCCCAACGGCGACCTGTACAACG  
TGTTTGCCTGGGCTTGGACGTCTTGGCCAAACGCCTCCGTCCCATGCACGTCTTTATCTGGATTACGACCAATCGCCCGCC  
GGCTGCCGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGATCCAGACCCACGTACCACCCCAGGCTCCATACCGACGATCTG  
CGACCTGGCGCGCACGTTTGCACGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCT  
ATGTCGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGC  
ACTCTGTGATAACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTTCTTCTTTTCCCCACCCCAAGTTCTG  
GGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGCGGACGGCCTGCCATAGCCACGGGCCCGTGGGTTAGGGACGGGGTCCCC  
CATGGGAATGGTTTATGGTTTCGTGGGGTTATTATTTGGGCGTTGCGTGGGGTCAGTCCACGACTGGACTGAGCAGACAGA  
CCCATGGTTTTTGGATGGCCTGGGCATGGACCGCATGTACTGGCGGACACGAACACCGGGCGTCTGTGGCTGCCAAACACCC  
CCGACCCCAAAAACCACCGCGGGATTTCTGG

## 7.1.2 Proteinsequenzen

### Pex19p (Wildtyp)

MAAAEEGCGVGVEDDRELEELLEESALDDFDKAKPSPEHAPTI SAPDASGPQKRAPGDTAKDALFASQEKFFQELFDSELASQA  
TAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQKLSAAGR VGS DASSQQEFTSCLKETLSGLAKNATELQNSGMSE EELMKAMEGLGMDEGD  
GEASILPIMQSIMQNLLSKDVL YPSLKEITEKYPEWLQSHQDSTPPEQFEKYQQQH SVMVKICEQFEAETPTDSEATQRARFE  
AML DLMQQLQALGHPPKELAGEMPPGLNF DL DALNLSGPPGANGEQCLIM

### Pex19p $\Delta$ Exon1+2

MKELAE EEPHLVEQFQKLSAAGR VGS DASSQQEFTSCLKETLSGLAKNATELQNSGMSE EELMKAMEGLGMDEGDGEASILP  
IMQSIMQNLLSKDVL YPSLKEITEKYPEWLQSHQDSTPPEQFEKYQQQH SVMVKICEQFEAETPTDSEATQRARFEAML DLMQ  
QLQALGHPPKELAGEMPPGLNF DL DALNLSGPPGANGEQCLIM

### Pex19p-764A

MAAAEEGCGVGVEDDRELEELLEESALDDFDKAKPSPEHAPTI SAPDASGPQKRAPGDTAKDALFASQEKFFQELFDSELASQA  
TAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQKLSAAGR VGS DASSQQEFTSCLKETLSGLAKNATELQNSGMSE EELMKAMEGLGMDEGD  
GEASILPIMQSIMQNLLSKDVL YPSLKEITEKYPEWLQSHQDSTPPEQFEKYQQQH SVMVKICEQFEAETPTDSEATQRARFE  
AML DLNAAVTGLGPSK RAGWDASWPQL

### Pex19p $\Delta$ 255As299

MAAAEEGCGVGVEDDRELEELLEESALDDFDKAKPSPEHAPTI SAPDASGPQKRAPGDTAKDALFASQEKFFQELFDSELASQA  
TAEFEKAMKELAE EEPHLVEQFQKLSAAGR VGS DASSQQEFTSCLKETLSGLAKNATELQNSGMSE EELMKAMEGLGMDEGD  
GEASILPIMQSIMQNLLSKDVL YPSLKEITEKYPEWLQSHQDSTPPEQFEKYQQQH SVMVKICEQFEAETPTDSEATQRARFE  
AML DLVHEWPFYPDRF

## 7.2 Statistische Auswertung der biochemischen Daten

### 7.2.1 Gesättigte Fettsäuren

#### C16:0 Palmitinsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	31.254	1.021	29.986	32.522	0.0001
	Mutante	5	35.854	0.804	34.855	36.853	
	Wildtyp	5	30.954	1.425	29.184	32.724	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	21.044	0.602	20.297	21.791	0.0001
	Mutante	5	23.260	0.742	22.339	24.181	
	Wildtyp	5	21.194	0.415	20.679	21.709	0.0002
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	26.094	0.798	25.104	27.084	0.0184
	Mutante	5	29.932	0.988	28.705	31.159	
	Wildtyp	5	25.522	3.641	21.001	30.043	0.0087

#### C17:0 Margarinsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.086	0.011	0.072	0.100	0.1338
	Mutante	5	0.096	0.011	0.082	0.110	
	Wildtyp	5	0.094	0.005	0.087	0.101	0.7533
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.220	0.037	0.174	0.266	0.0004
	Mutante	5	0.312	0.037	0.266	0.358	
	Wildtyp	5	0.194	0.005	0.187	0.201	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.244	0.053	0.178	0.310	0.0058
	Mutante	5	0.322	0.029	0.285	0.359	
	Wildtyp	5	0.288	0.019	0.264	0.312	0.1701

#### C18:0 Stearinsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	16.484	0.367	16.029	16.939	0.0083
	Mutante	5	17.406	0.186	17.175	17.637	
	Wildtyp	5	15.640	0.687	14.787	16.493	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	10.510	3.198	6.539	14.481	0.0001
	Mutante	5	17.376	0.732	16.468	18.284	
	Wildtyp	5	8.492	0.799	7.500	9.484	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	10.146	0.705	9.271	11.021	0.0004
	Mutante	5	13.350	1.493	11.496	15.204	
	Wildtyp	5	10.860	0.718	9.968	11.752	0.0026

## C20:0 Arachinsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.076	0.009	0.065	0.087	0.0003
	Mutante	5	0.126	0.023	0.097	0.155	
	Wildtyp	5	0.078	0.011	0.064	0.092	0.0004
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.102	0.040	0.052	0.152	0.0001
	Mutante	5	0.390	0.042	0.338	0.442	
	Wildtyp	5	0.072	0.008	0.062	0.082	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.192	0.033	0.150	0.234	0.0001
	Mutante	5	0.364	0.044	0.309	0.419	
	Wildtyp	5	0.218	0.011	0.204	0.232	0.0001

## C22:0 Behensäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	5.719	1.843	3.431	8.007	0.6756
	Mutante	5	6.080	0.398	5.586	6.575	
	Wildtyp	5	6.650	1.331	4.998	8.303	0.5117
Leber	Heterozygotes Tier	5	21.779	4.197	16.568	26.991	0.1000
	Mutante	5	26.209	3.854	21.425	30.994	
	Wildtyp	5	23.492	3.724	18.868	28.117	0.2958
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	16.074	3.478	11.755	20.393	0.7176
	Mutante	5	15.288	4.038	10.274	20.302	
	Wildtyp	5	16.398	2.320	13.518	19.278	0.6105

## C24:0 Lignocerinsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	6.309	2.578	3.108	9.509	0.0679
	Mutante	5	9.203	0.857	8.138	10.267	
	Wildtyp	5	8.073	2.869	4.511	11.635	0.4486
Leber	Heterozygotes Tier	5	27.657	5.714	20.562	34.751	0.0001
	Mutante	5	56.519	10.798	43.111	69.926	
	Wildtyp	5	30.068	4.632	24.316	35.819	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	31.836	8.029	21.867	41.805	0.4060
	Mutante	5	36.474	11.037	22.770	50.178	
	Wildtyp	5	32.840	5.592	25.897	39.783	0.5126

## C26:0 Cervonsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.546	0.418	0.026	1.065	0.0071
	Mutante	5	2.230	0.237	1.936	2.524	
	Wildtyp	5	1.047	1.342	-0.619	2.713	0.0422
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.750	0.131	0.587	0.912	0.0001
	Mutante	5	12.039	2.869	8.476	15.602	
	Wildtyp	5	0.876	0.152	0.687	1.065	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.778	0.234	0.488	1.068	0.0001
	Mutante	5	6.308	1.838	4.025	8.591	
	Wildtyp	5	1.134	0.282	0.784	1.484	0.0001

## 7.2.2 Einfach ungesättigte Fettsäuren

## C16:1 Palmitoleinsäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	3.232	0.115	3.089	3.375	0.0002
	Mutante	5	3.992	0.297	3.623	4.361	
	Wildtyp	5	3.208	0.247	2.902	3.514	0.0002
Leber	Heterozygotes Tier	5	1.770	0.530	1.113	2.427	0.5734
	Mutante	5	1.650	0.140	1.476	1.824	
	Wildtyp	5	2.020	0.149	1.835	2.205	0.0996
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	2.108	0.169	1.898	2.318	0.0693
	Mutante	5	1.824	0.273	1.485	2.163	
	Wildtyp	5	2.026	0.221	1.751	2.301	0.1814

C18:1 Ölsäure ( $\omega$ -9)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	14.924	1.181	13.457	16.391	0.0217
	Mutante	5	12.300	0.852	11.242	13.358	
	Wildtyp	5	16.248	2.302	13.389	19.107	0.0019
Leber	Heterozygotes Tier	5	20.132	3.309	16.024	24.240	0.0004
	Mutante	5	13.658	1.273	12.078	15.238	
	Wildtyp	5	21.812	0.700	20.943	22.681	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	18.014	1.929	15.618	20.410	0.0001
	Mutante	5	11.966	0.925	10.818	13.114	
	Wildtyp	5	17.160	1.103	15.791	18.529	0.0001

C20:1 Gadoleinsäure ( $\omega$ -9)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.288	0.015	0.270	0.306	0.2281
	Mutante	5	0.272	0.023	0.244	0.300	
	Wildtyp	5	0.280	0.021	0.254	0.306	0.5373
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.196	0.022	0.169	0.223	0.7573
	Mutante	5	0.200	0.024	0.170	0.230	
	Wildtyp	5	0.182	0.011	0.168	0.196	0.1802
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.252	0.037	0.206	0.298	0.0130
	Mutante	5	0.700	0.394	0.211	1.189	
	Wildtyp	4	0.238	0.036	0.180	0.295	0.0149

C20:3 Mead'sche Säure ( $\omega$ -9)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.336	0.030	0.299	0.373	0.0001
	Mutante	5	0.604	0.035	0.560	0.648	
	Wildtyp	5	0.354	0.029	0.318	0.390	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.770	0.097	0.649	0.891	0.0001
	Mutante	5	0.488	0.091	0.375	0.601	
	Wildtyp	5	0.772	0.036	0.728	0.816	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.934	0.040	0.885	0.983	0.0206
	Mutante	5	0.834	0.059	0.761	0.907	
	Wildtyp	5	0.920	0.074	0.827	1.013	0.0408

C22:1 Erucasäure ( $\omega$ -9)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.040	0.007	0.031	0.049	0.0888
	Mutante	5	0.048	0.004	0.042	0.054	
	Wildtyp	5	0.032	0.008	0.022	0.042	0.0030
Leber	Heterozygotes Tier	4	0.043	0.022	0.007	0.078	0.3272
	Mutante	5	0.054	0.019	0.030	0.078	
	Wildtyp	5	0.032	0.004	0.026	0.038	0.0616
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.236	0.109	0.101	0.371	0.0184
	Mutante	5	0.552	0.288	0.195	0.909	
	Wildtyp	5	0.210	0.079	0.112	0.308	0.0121

C24:1 Nervonsäure ( $\omega$ -9)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.088	0.016	0.068	0.108	0.4908
	Mutante	5	0.080	0.000			
	Wildtyp	5	0.086	0.026	0.054	0.118	0.6037
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.374	0.146	0.193	0.555	0.5130
	Mutante	5	0.412	0.044	0.357	0.467	
	Wildtyp	5	0.296	0.025	0.265	0.327	0.0620
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.754	0.142	0.577	0.931	0.3055
	Mutante	5	0.830	0.078	0.733	0.927	
	Wildtyp	5	0.774	0.107	0.641	0.907	0.4456

## 7.2.3 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

C18:2 Linolsäure ( $\omega$ -6)

a182							
Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.880	0.145	0.699	1.061	0.0022
	Mutante	5	1.518	0.045	1.462	1.574	
	Wildtyp	5	1.254	0.426	0.726	1.782	0.1357
Leber	Heterozygotes Tier	5	16.648	3.211	12.661	20.635	0.0606
	Mutante	5	14.114	0.570	13.406	14.822	
	Wildtyp	5	18.428	0.772	17.469	19.387	0.0042
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	12.786	1.471	10.960	14.612	0.0055
	Mutante	5	10.766	0.438	10.223	11.309	
	Wildtyp	5	12.274	0.580	11.554	12.994	0.0270

C18:3  $\gamma$ -Linolensäure ( $\omega$ -6)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.094	0.019	0.070	0.118	0.0118
	Mutante	5	0.132	0.016	0.112	0.152	
	Wildtyp	5	0.106	0.024	0.076	0.136	0.0651
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.862	0.338	0.442	1.282	0.0022
	Mutante	5	0.370	0.039	0.321	0.419	
	Wildtyp	5	0.980	0.071	0.892	1.068	0.0004
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.510	0.046	0.452	0.568	0.0001
	Mutante	5	0.242	0.049	0.182	0.302	
	Wildtyp	5	0.508	0.018	0.486	0.530	0.0001

C20:2 Eicosadiensäure ( $\omega$ -6)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.136	0.017	0.115	0.157	0.0001
	Mutante	5	0.314	0.035	0.270	0.358	
	Wildtyp	5	0.170	0.023	0.141	0.199	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.440	0.059	0.367	0.513	0.0136
	Mutante	5	0.358	0.044	0.304	0.412	
	Wildtyp	5	0.464	0.025	0.433	0.495	0.0029
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.382	0.033	0.341	0.423	0.0006
	Mutante	5	0.288	0.026	0.256	0.320	
	Wildtyp	5	0.388	0.036	0.343	0.433	0.0003

C20:3 homo-  $\gamma$ -Linolensäure ( $\omega$ -6)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.336	0.030	0.299	0.373	0.0001
	Mutante	5	0.604	0.035	0.560	0.648	
	Wildtyp	5	0.354	0.029	0.318	0.390	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.770	0.097	0.649	0.891	0.0001
	Mutante	5	0.488	0.091	0.375	0.601	
	Wildtyp	5	0.772	0.036	0.728	0.816	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.934	0.040	0.885	0.983	0.0206
	Mutante	5	0.834	0.059	0.761	0.907	
	Wildtyp	5	0.920	0.074	0.827	1.013	0.0408

C20:4 Arachidonsäure ( $\omega$ -6)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	10.978	0.374	10.513	11.443	0.0122
	Mutante	5	11.660	0.251	11.349	11.971	
	Wildtyp	5	10.690	0.446	10.136	11.244	0.0013
Leber	Heterozygotes Tier	5	11.550	2.167	8.860	14.240	0.0420
	Mutante	5	9.628	0.751	8.696	10.560	
	Wildtyp	5	10.622	0.300	10.249	10.995	0.2620
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	13.130	1.551	11.204	15.056	0.1469
	Mutante	5	11.780	1.145	10.358	13.202	
	Wildtyp	5	13.988	1.403	12.246	15.730	0.0261



C22:4 Docosatetraensäure ( $\omega$ -6)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	2.296	0.189	2.061	2.531	0.0001
	Mutante	5	1.428	0.118	1.281	1.575	
	Wildtyp	5	2.248	0.209	1.988	2.508	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.762	0.086	0.655	0.869	0.2467
	Mutante	5	0.672	0.165	0.467	0.877	
	Wildtyp	5	0.742	0.080	0.643	0.841	0.3622
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	1.370	0.221	1.096	1.644	0.0069
	Mutante	5	1.854	0.206	1.598	2.110	
	Wildtyp	5	1.412	0.273	1.074	1.750	0.0116

C22:5 Docosapentaensäure ( $\omega$ -6)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	1.720	0.224	1.442	1.998	0.0001
	Mutante	5	0.946	0.030	0.908	0.984	
	Wildtyp	5	1.702	0.242	1.402	2.002	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	1.138	0.222	0.862	1.414	0.6692
	Mutante	5	1.086	0.137	0.915	1.257	
	Wildtyp	5	1.098	0.193	0.858	1.338	0.9212
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	1.650	0.394	1.161	2.139	0.4519
	Mutante	5	1.788	0.230	1.502	2.074	
	Wildtyp	5	1.636	0.168	1.428	1.844	0.4086

C18:3  $\alpha$ -Linolensäure ( $\omega$ -3)

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.010	0.017	-0.012	0.032	0.2948
	Mutante	5	0.002	0.004	-0.004	0.008	
	Wildtyp	5	0.014	0.009	0.003	0.025	0.1263
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.286	0.151	0.098	0.474	0.1163
	Mutante	5	0.178	0.059	0.104	0.252	
	Wildtyp	5	0.386	0.064	0.307	0.465	0.0068
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.200	0.058	0.128	0.272	0.0009
	Mutante	5	0.092	0.023	0.064	0.120	
	Wildtyp	5	0.192	0.026	0.160	0.224	0.0016

C20:5 Eicosapentaensäure ( $\omega$ -3)

a205

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.076	0.009	0.065	0.087	0.0001
	Mutante	5	0.018	0.008	0.008	0.028	
	Wildtyp	5	0.074	0.009	0.063	0.085	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.310	0.069	0.224	0.396	0.0002
	Mutante	5	0.066	0.034	0.024	0.108	
	Wildtyp	5	0.366	0.097	0.246	0.486	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.204	0.034	0.161	0.247	0.0001
	Mutante	5	0.070	0.028	0.035	0.105	
	Wildtyp	5	0.236	0.036	0.191	0.281	0.0001

C22:6 Docosahexaensäure ( $\omega$ -3)

a226

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	10.160	0.308	9.777	10.543	0.0001
	Mutante	5	7.936	0.173	7.722	8.150	
	Wildtyp	5	9.976	0.415	9.461	10.491	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	8.094	2.096	5.491	10.697	0.0012
	Mutante	5	11.490	0.714	10.603	12.377	
	Wildtyp	5	7.256	0.098	7.135	7.377	0.0002
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	4.016	0.264	3.689	4.343	0.0213
	Mutante	5	4.894	0.575	4.180	5.608	
	Wildtyp	5	4.146	0.652	3.337	4.955	0.0436

## 7.2.4 Verzweigt-kettige Fettsäuren

## Phytansäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.106	0.013	0.090	0.122	0.0329
	Mutante	5	0.137	0.018	0.115	0.159	
	Wildtyp	5	0.120	0.027	0.085	0.154	0.2031
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.352	0.088	0.243	0.462	0.0466
	Mutante	5	0.461	0.054	0.394	0.528	
	Wildtyp	5	0.376	0.086	0.270	0.483	0.1095
Vollblut	Heterozygotes Tier	3	0.027	0.006	0.012	0.041	0.4198
	Mutante	3	0.020	0.010	-0.005	0.045	
	Wildtyp	3	0.033	0.012	0.005	0.062	0.1340

## Pristansäure

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.048	0.068	-0.037	0.133	0.2114
	Mutante	5	0.015	0.004	0.010	0.020	
	Wildtyp	5	0.018	0.003	0.015	0.021	0.9065
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.041	0.006	0.034	0.049	0.0001
	Mutante	5	0.078	0.007	0.069	0.087	
	Wildtyp	5	0.043	0.009	0.031	0.055	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.054	0.009	0.043	0.065	1.0001
	Mutante	5	0.054	0.011	0.040	0.068	
	Wildtyp	5	0.058	0.008	0.048	0.068	0.5250

## 7.2.5 Plasmalogene

### Ratio C16:0-DMA/C16:0

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.074	0.005	0.068	0.080	0.0001
	Mutante	5	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Wildtyp	5	0.073	0.006	0.065	0.081	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.013	0.006	0.005	0.021	0.0002
	Mutante	5	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Wildtyp	5	0.009	0.001	0.008	0.011	0.0019
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.038	0.004	0.033	0.043	0.0001
	Mutante	5	0.002	0.001	0.001	0.002	
	Wildtyp	5	0.040	0.005	0.034	0.045	0.0001

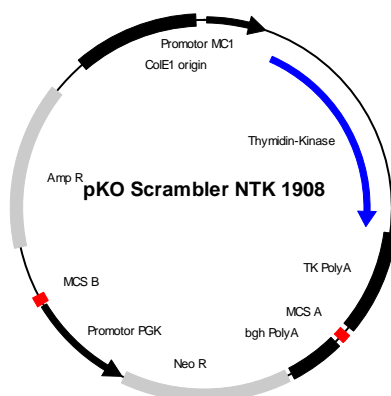
### Ratio C18:0-DMA/C18:0

Organ	Maustyp	n	Mittel	Std Dev	95%-KI_u	95%-KI_o	p
Gehirn	Heterozygotes Tier	5	0.082	0.006	0.075	0.090	0.0001
	Mutante	5	0.000	0.000	-0.000	0.000	
	Wildtyp	5	0.084	0.008	0.074	0.093	0.0001
Leber	Heterozygotes Tier	5	0.014	0.003	0.010	0.017	0.0001
	Mutante	5	0.000	0.000	-0.000	0.000	
	Wildtyp	5	0.013	0.001	0.011	0.014	0.0001
Vollblut	Heterozygotes Tier	5	0.046	0.005	0.040	0.052	0.0001
	Mutante	5	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Wildtyp	5	0.046	0.007	0.037	0.055	0.0001

## 7.3 Plasmidkarten

### 7.3.1 Vektoren

#### *pKO Scrambler NTK 1908 (Stratagene, Amsterdam, NL)*

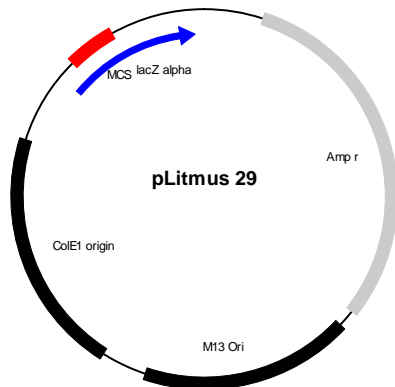


#### Scrambler A

*HpaI*      *BglII*      *Clal*      *EcoRI*      *XhoI*  
 2031 AGTGTAACT CTAGGAGATC TTCTAGGATC GATTCTAGGA ATTCTCTAGC TCGAGGGGCG

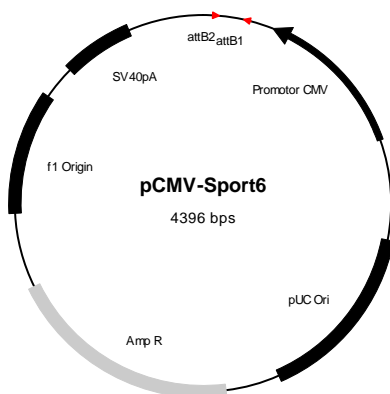
#### Scrambler B

*BamHI*      *HindIII*      *KpnI*      *SacII*      *SmaI*  
 3711 CGCCGGGATC CCTAGAAAGC TTCCTAGAGG TACCCTAGAC CGCGGCTAGA CCCGGGGGGG  
*SalI*      *NotI*  
 3781 TCGACGCGGC CGCCATGGTC

*pLitmus29 (New England Biolabs, Frankfurt)*

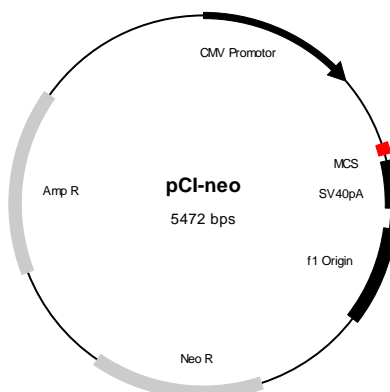
```

                SpeI   KpnI   SacI           XbaI   AgeI
2441 AAGCTACGTA ATACGACTCA CTAGTGGGTA CCAGAGCTCC CTAGGTTCTA GAACCGGTGA
      AatII  NcoI   HindIII BamHI  EcoRV  PstI   EcoRI  XhoI   BsiMI
2501 CGTCTCCCAT GGTGAAGCTT GGATCCACGA TATCCTGCAG GAATTCCTCG AGACCGTACG
      BssHI  NsiI   BglII           StuI
2561 TGC GCGCAA TGCATCCAGA TCTCCCTCT AGTCAAGGCC TTAAGTGAGT CGTATTACGG
      PvuII
2621 ACTGGCCGTC GTTTTACAAC
  
```

*pCMV-Sport 6 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)*

```

                T7 promoter/priming site   attB2   Mlu I
6   GCCTAGCTTA TAATACGACT CACTATAGGG ACCACTTTGT ACAAGAAAGC TGGGTACGG
      Hind III  Ape I Xho I   Xba I   Not I           Mlu I*
66  TAAGCTTGGG CCCCTCGAGG GATACTCTAG AGCGGCCGCC C cDNA insert CCGACGCGTG
      Sal I     EcoR V  Sma I EcoRI           Kpn I   attB1
      114 Sp6 promoter/priming site
178 TCTATAGTGT CACCTAAATA GGCCTAAT
  
```

*pCI-neo (Promega, Mannheim)*

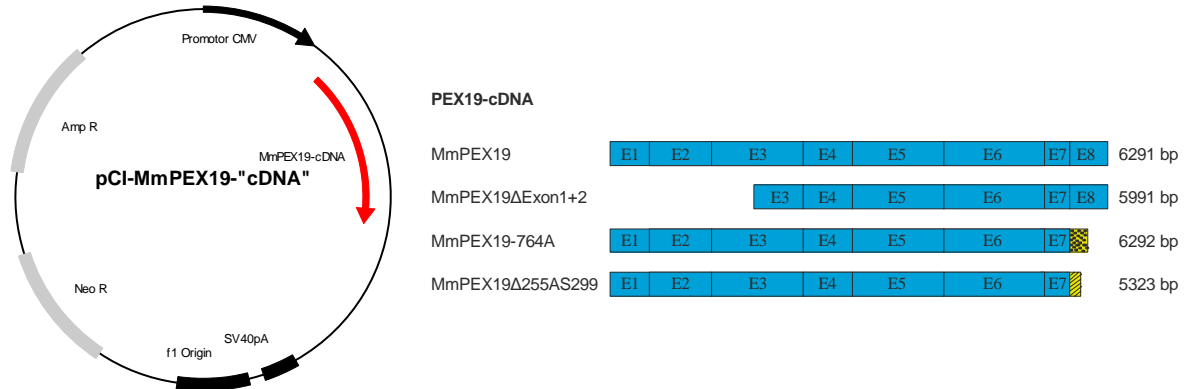
```

                T7 Transcription Start
5' ... TAATACGACTCACTATAGGCTAGCCTCGAGAATTCACGCGTGGT
      T7 Promoter   NheI   XhoI   EcoRI   MluI

                T3 Transcription Start
ACCTTAGAGTCGACCCGGGCGGCCGCTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATG ... 3'
      XbaI   AccI Sall   SmaI   NotI           T3 Promoter
  
```

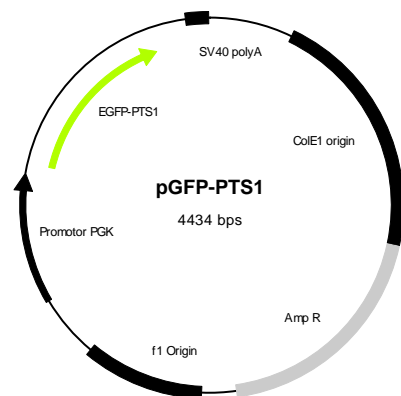
### 7.3.2 Expressions-Klone aus Klonierung mit pCI-neo

*pCI-MmPex19* \*\*\*

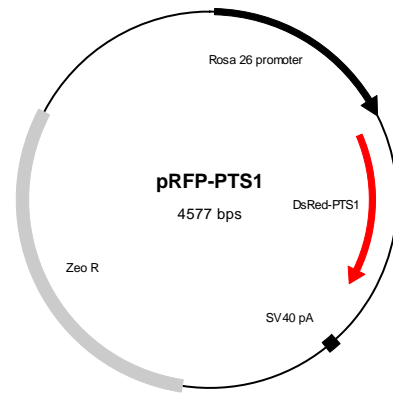


### 7.3.3 Organellenmarker (Peroxisomen)

*pGFP-PTS1*



*pRFP-PTS1*



Diese Plasmide wurden mir von Herrn PD Dr. Georg H. Lüers (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

## 8. Danksagungen

*An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:*

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Kröger für die Bereitschaft, die Betreuung für den Fachbereich Biologie und Chemie zu übernehmen. Danke für die gewährte Unterstützung, für die Korrektur meiner Dissertationsarbeit sowie die vielen konstruktiven Gespräche!

Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt danke ich für die Überlassung des Themas sowie aller Ergebnisse, die ich im Zuge meiner Forschungsarbeiten während meiner Anstellung am Institut für Anatomie und Zellbiologie in ihrer Arbeitsgruppe erzielt habe. Außerdem danke ich ihr für ihre gewährte Unterstützung und Ihre fachliche Beratung. Ebenso möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir die Fort- und Weiterbildung zur Fachwissenschaftlerin für Versuchstierkunde ermöglicht hat.

Herrn Dr. Jürgen Okun danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich der Lipiddiagnostik und für das mehrfache, sehr sorgfältige Lesen und Korrigieren meiner Dissertation sowie für seine Hilfestellungen, die über das Fachliche hinausgingen.

Bei Herrn Dr. Georg Luers, Andrea Cordes und Eva Borger möchte ich mich für eine wunderschöne und lehrreiche Zeit in Marburg, für die stetige Gesprächsbereitschaft und die großartige Unterstützung im Bereich der Zellkultur bedanken. Ihr habt wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Herrn Dr. Dr. Klaus-Peter Valerius danke ich für die Einführung in das tierexperimentelle Arbeiten. Beim Erlernen der nötigen Techniken war er mir eine große Hilfe.

Herrn Kay-Martin Hanschmann danke ich für die statistische Auswertung meiner Daten sowie für seine geduldigen Erklärungen.

Bei Andrea Klein, Magdalena Gottwald, Bianca Pfeiffer, Susanne Pfreimer und Elke Richter möchte ich mich für die Einführung in die benötigten Techniken, für die gute Zusammenarbeit und Kameradschaft, für die anregenden und hilfreichen Gespräche, Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen bei den „großen Experimenten“ bedanken.

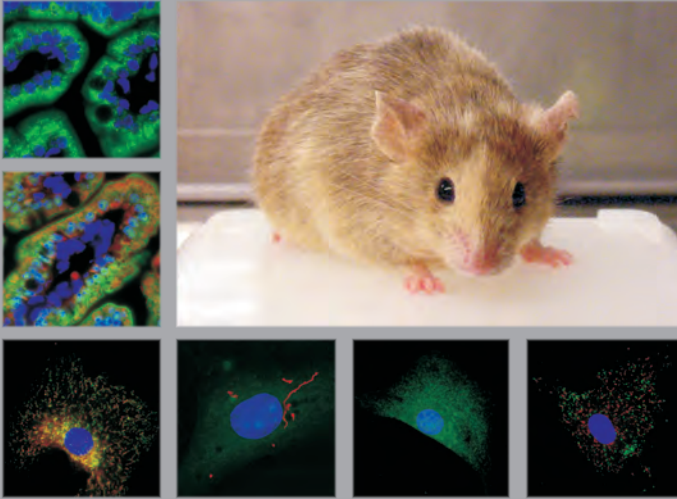
Elke Richter und Magdalena Gottwald danke ich besonders für ihre nächtliche Unterstützung. Ohne Euch alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Allen übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Medizinische Zellbiologie am Institut für Anatomie und Zellbiologie danke ich für die gemeinsame, sehr erfahrungsreiche Zeit in Gießen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für seine Großzügigkeit und Unterstützung bedanken. Während meiner Anstellung an seinem Institut hat er mir die Möglichkeit gegeben, weiter an meiner Dissertation zu schreiben. Außerdem danke ich ihm für die Hilfe und die unterstützenden Kommentare zur Ausführung meines Disputationsvortrages. Danke auch für die leider viel zu kurze, aber tolle Zeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie!

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Helga und Helmut Beck, meinen Brüdern, Thomas und Heiko Beck, meiner Schwägerin, Martina Beck, und allen Freunden und Bekannten für die Unterstützung, die Toleranz, das Verständnis, den Zuspruch und den gewährten Beistand während allen Phasen meiner Arbeit .

Von ganzem Herzen möchte ich meinem Lebensgefährten, Michael Dosch, danken, der mich gerade in den letzten beiden Jahren meiner Dissertation durch eine nicht immer einfache Zeit begleitet hat. Er ist jederzeit für mich da gewesen, hat mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und hat mich immer wieder liebevoll ermutigt und bedingungslos unterstützt. Danke für Dein unendliches Verständnis und Deine großartige Motivation! Sehr, sehr, sehr.



*edition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5571-3



9 783835 195371 4