

Aus der Abteilung Pädiatrie II mit Schwerpunkt Neuropädiatrie
(Prof. Dr. med. J. Gärtner)
im Zentrum Kinderheilkunde und Jugendmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Analyse des *PEX1*-Gens bei Patienten mit
Zellweger-Syndrom:
Identifikation einer neuen Deletion und Untersuchung
von Polymorphismen in der 5'-untranslatierten Region

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen
vorgelegt von

Jana Rabenau
aus
Eutin

Göttingen 2011

Dekan : Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin : Prof. Dr. med. J. Gärtner

II. Berichterstatterin : Prof. Dr. rer. nat. I. Bartels

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entdeckung und Funktion der Peroxisomen, Peroxisomenbiogenese	1
1.2	Peroxisomale Erkrankungen	3
1.3	Diagnose peroxisomaler Erkrankungen	5
1.4	Genetische Ursachen der Peroxisomenbiogenesedefekte und Genotyp- Phänotyp-Korrelation	8
1.5	Therapiemöglichkeiten	9
1.6	Polymorphismen der 5'-UTR und Transkriptionsstartpunkt im <i>PEX1</i> -Gen ..	10
1.7	Ziel der Arbeit	12
2	Patienten, Material und Methoden	13
2.1	Patienten mit Entwicklungsstörungen von Peroxisomen	13
2.2	Material	13
2.2.1	Geräte und Material	13
2.2.2	Chemikalien	15
2.2.3	Enzyme	17
2.2.4	Aufreinigungs- und Reaktionssystem (Kits).....	18
2.2.5	Antikörper	18
2.2.6	Bakterienstamm	19
2.2.7	Puffer und Lösungen	19
2.2.8	Medien für Zellkulturen.....	20
2.2.9	Medien für Bakterienkulturen	20
2.2.10	Plasmide	20
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	21
2.3.1	Isolierung von mRNA aus kultivierten Fibroblasten.....	21
2.3.2	Isolierung von genomischer DNA aus kultivierten Fibroblasten	22
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
2.3.4	Reverse Transkription von mRNA (cDNA-Synthese)	23
2.3.5	Polymerasekettenreaktion.....	23
2.3.5.1	<i>Long-range</i> -PCR.....	25
2.3.5.2	Allelspezifische PCR mit cDNA und gDNA	25
2.3.5.3	Expressionsanalyse mittels <i>real-time</i> -PCR	26
2.3.5.4	<i>5'-RACE</i>	28
2.3.6	DNA-Elektrophorese im Agarosegel.....	31

2.3.7	Reinigung von PCR Fragmenten	31
2.3.8	DNS-Sequenzierung und Sequenzanalyse	31
2.3.9	Klonierung von PCR-Fragmenten	33
2.4	Proteinbiochemische Methoden und indirekte Immunfluoreszenzfärbung ..	34
2.4.1	Isolierung von Gesamt-Protein aus Fibroblasten	34
2.4.2	Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA).....	34
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.4.4	Western Blot: Proteintransfer	35
2.4.5	Immunologische Detektion von Proteinen	36
2.5	Zellbiologische Methoden.....	36
2.5.1	Kultivierung von Hautfibroblasten.....	36
2.5.2	Gefrierkonservierung.....	37
2.5.3	Zellzahlbestimmung	37
2.5.4	Transiente Transfektion	37
2.5.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	38
3	Ergebnisse	40
3.1	5'-Polymorphismen bei <i>PEX1</i> -defizienten Patienten	40
3.2	Darstellung von <i>PEX1</i> -Protein durch Western Blotting.....	44
3.3	Genetische Untersuchung von zwei ZS-Patienten mit unbekannter zweiter Mutation	45
3.3.1	Klinischer Phänotyp der Patienten	45
3.3.2	Untersuchung der Komplementierung des PBD mit <i>PEX1</i>	48
3.3.3	Polymorphismenkonstellation bei G843D-heterozygoten Patienten....	51
3.3.4	Allelspezifische PCR für cDNS und gDNS	52
3.3.5	Deletionssuche mit <i>long-range-PCR</i>	55
3.3.6	Allelspezifische <i>real-time-PCR</i>	60
3.4	Analyse der 5'-Region der <i>PEX1</i> -mRNS	62
4	Diskussion	64
4.1	5'-Polymorphismen.....	65
4.1.1	Häufigkeit und allelische Verteilung.....	65
4.1.2	Zwei häufige <i>PEX1</i> -Mutationen und deren Bezug zu 5'- Polymorphismen.....	67
4.1.3	5'-Polymorphismen mit Einfluss auf klinischen Phänotyp?.....	69
4.2	Genetische Aufklärung von zwei <i>PEX1</i> -defizienten Patienten.....	73

4.2.1	Allelspezifische PCR und <i>real-time</i> -PCR	73
4.2.2	<i>Long-range</i> -PCR als diagnostisches Mittel zur Identifizierung einer großen Deletion im <i>PEX1</i> -Gen	75
4.3	5'- <i>RACE</i> zur Analyse des Transkriptionsstartpunkts der 5'- <i>PEX1</i> -mRNS....	79
5	Zusammenfassung	82
6	Anhang: Tabelle 10	84
7	Literaturverzeichnis	87

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
A	Ampere
AAA	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AS	Aminosäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	5'-Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninonsäure
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
-COOH	Carboxygruppen
CT	<i>cycle threshold</i>
Cu	Kupfer
Δ	Delta
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff zur DNS Detektion
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-Triphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin-5'-Triphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidin-5'-Triphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxynucleosid-5'-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Dideoxythymidin-5'-Triphosphat
DHA	Docosahexaensäure
DHCA	Dihydroxycholestanoinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynucleosid-5'-Triphosphat

DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	<i>et cetera</i>
Ex	Exon
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
gDNS	genomische Desoxyribonukleinsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
het	heterozygot
hom	homozygot
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRD	Infantile Morbus Refsum
KANL	Lysin-Alanin-Asparagin-Leucin
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LB	Luria Broth
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M	Molar, Mol/Liter
mA	Milliampere
min	Minuten
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mRNS	Boten (<i>messenger</i>)-Ribonukleinsäure

Mt	Mutante
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
O ₂	Sauerstoff
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
-OH	Hydroxylgruppe
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBD	Peroxisomenbiogenesedefekte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline Tween-20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PECI	Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase
PEX	Peroxin-Gen
PEX	Peroxin-Protein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PTS	<i>peroxisomal targeting signal</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction</i>
RCDP	Rhizomelia chondrodysplasia punctata
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunden
SKL	Serin-Lysin-Leucin
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
Sta	Status
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	<i>Tris-buffer-saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffer-saline-tween 20</i>

TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
THCA	Trihydroxycholestanoidsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoacetat
U	Unit (Einheit des enzymatischen Umsatzes)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLCFA	<i>very long chain fatty acids</i>
v/v	Volumenverhältnis
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht- zu Volumenverhältnis
X-ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZS	Zellweger-Syndrom
ZSS	Zellweger-Syndrom-Spektrum
%	Prozent

Verwendete Vorsilben für Potenzen der Zahl Zehn

p = pico = 1×10^{-12}

n = nano = 1×10^{-9}

μ = mikro = 1×10^{-6}

m = milli = 1×10^{-3}

k = kilo = 1×10^3

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A, Ala	Alanin
C, Cys	Cystein
D, Asp	Asparaginsäure
E, Glu	Glutaminsäure
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin

H, His	Histidin
I, Ile	Isoleucin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin
M, Met	Methionin
N, Asn	Asparagin
P, Pro	Prolin
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
S, Ser	Serin
T, Thr	Threonin
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
Y, Tyr	Tyrosin

Nukleinsäurecode

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biochemische Veränderungen bei Patienten mit peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen (ZSS, RCDP, X-ALD).	7
Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper.....	19
Tabelle 3: Mutationen und 5'-Polymorphismen im <i>PEX1</i> -Gen von 30 PBD-Patienten.	41
Tabelle 4: Verteilung der 5'-Polymorphismen in Bezug auf die Insertion c.2097_2098insT.	42
Tabelle 5: Verteilung der 5'-Polymorphismen in Bezug auf die Mutation G843D.	43
Tabelle 6: Allelische Verteilung der 5'-Polymorphismen, Mutation G843D und Deletion bei Patient ZS 26.	52
Tabelle 7: Häufigkeit und Verteilung der 5'-Polymorphismen im <i>PEX1</i> -Gen in Bezug zu der Insertion c.2097_2098insT.	67
Tabelle 8: Darstellung der bisher in der Literatur beschriebenen Deletionen/Insertionen.....	77
Tabelle 9: Darstellung der theoretisch möglichen Deletionen, die mit der in dieser Arbeit etablierten <i>long-range</i> -PCR nicht erfasst werden.....	78
Tabelle 10: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PEX1-Proteinmenge im Western Blot.	45
Abbildung 2: Komplementierung des Imports peroxisomaler Enzyme mit <i>PEX1</i> -cDNS bei Patient ZS 26.	50
Abbildung 3: Komplementierung des Imports peroxisomaler Enzyme mit <i>PEX1</i> -cDNS bei Patient ZS 8.	51
Abbildung 4: Sequenzierungen der gDNS und cDNS von Patient ZS 26 mit Darstellung der Mutation G843D (c.2528 G>A).	53
Abbildung 5: Allelspezifische PCR von gDNS und cDNS zur Charakterisierung des Genotyps im Bereich der Mutation G843D.	54
Abbildung 6: Schematische Darstellung des <i>PEX1</i> -Gens und der Position der PCR-Produkte, die für die Deletionsuntersuchung verwendet wurden.	56
Abbildung 7: Deletionsuntersuchung mittels <i>long-range</i> -PCR (Patient ZS 8 und ZS 26).	57
Abbildung 8: Deletion des Patienten ZS 26 und Auswirkung nach Transkription und Translation.	60
Abbildung 9: Allelspezifische <i>real-time</i> -PCR: Vergleich der Expressionsmengen der <i>PEX1</i> -cDNS des Wildtypallels (ohne G843D Mutation) und des Mutantenallels (mit G843D Mutation).	62
Abbildung 10: <i>PEX1</i> -5'-Region und Position der verwendeten Primerpaare in Bezug zu den 5'-Polymorphismen.	63

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Funktion der Peroxisomen, Peroxisomenbiogenese

»Lorenzos Öl« heißt ein Film, der die wahre Geschichte eines Kindes mit einer seltenen genetischen Erkrankung, der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (X-ALD), anschaulich darstellt. Das Kind leidet zunächst unter Gleichgewichtsstörungen und entwickelt im Verlauf einen schweren Hirnschaden, der zum Verlust fast aller motorischen und kognitiver Funktionen führt. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um einen Defekt eines peroxisomalen Proteins. Peroxisomen sind subzelluläre Strukturen mit zahlreichen Funktionen im Lipidstoffwechsel und in der Regulation reaktiver Sauerstoffspezies. Dieses Zellorganell wurde erstmals 1954 von Rhodin beschrieben. Mit Hilfe des Elektronenmikroskops beobachtete Rhodin in der Nierentubuluszelle der Maus zytoplasmatische Einschlüsse, die von einer singulären Membran umschlossen waren, welche er als »*microbodies*« bezeichnete (Rhodin 1954). Die Bezeichnung des Zellorganells als Peroxisom wurde erst im Jahr 1966 von dem belgischen Biochemiker Christian de Duve eingeführt (De Duve und Baudhuin 1966). Er konnte nachweisen, dass die Peroxisomen Oxidasen enthalten, die Wasserstoffperoxid (H_2O_2) produzieren. Durch die ebenfalls im Peroxisom enthaltene Katalase kann H_2O_2 weiter zu $2H_2O$ und O_2 abgebaut und damit entgiftet werden (Doenecke et al. 2005). Peroxisomen kommen in allen menschlichen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten vor (Lazarow und Moser 1995). Elektronenmikroskopisch findet man sie zahlreich in Leber und Niere. In den meisten Zellen sind die Peroxisomen rund und haben einen Durchmesser von 0,1-1 μm . Sie enthalten keine DNS oder Ribosomen. Alle peroxisomalen Matrixproteine werden von Genen im Nukleus der Zelle kodiert, an freien zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und posttranslational mit Hilfe von peroxisomalen Signalsequenzen in die Peroxisomen dirigiert (Gould und Valle 2000, Gould et al. 2001, Purdue und Lazarow 2001). Die von den *PEX*-Genen gebildeten Proteine werden auch als Peroxine bezeichnet. Für den Mechanismus des Matrixproteinimports spielen die zwei Peroxine *PEX5* und *PEX7* und die zwei *peroxisome targeting signals* (PTSs) PTS1 und PTS2 eine wesentliche Rolle. Bei PTS1 handelt es sich um ein Carboxy-terminales Tripeptid mit der Sequenzabfolge Serin-Lysin-Leucin, abgekürzt als SKL, oder Varianten davon

(Gould et al. 1989, Subramani 1992). Das PTS1 ist Teil des Carboxy-Terminus von mehr als 90 % der peroxisomalen Matrixenzyme. Das komplexere PTS2 wurde am Amino-Terminus einiger weniger Matrixproteine identifiziert (Swinkels et al. 1991). Das zytosolische Protein PEX5 dient als löslicher PTS1-Rezeptor für den Import der SKL-tragenden Matrixproteine (Dodt et al. 1995). Entsprechend dient das zytosolische Protein PEX7 als löslicher Rezeptor für die PTS2-tragenden peroxisomalen Matrixproteine (Braverman et al. 1997). PTS1/PEX5- bzw. PTS2/PEX7-Komplexe binden sich an PEX13, PEX14 und PEX17 an der peroxisomalen Membran und werden in die peroxisomale Matrix importiert. PEX5 bzw. PEX7 werden von PTS1 bzw. PTS2 dissoziiert und ins Zytosol zurücktransportiert (Lazarow 2003, Thoms und Erdmann 2006). PEX1 und PEX6 sind interagierende, Energie liefernde zytosolische ATPasen, die zur Familie der ATPasen vom AAA-Typ (*ATPases associated with various cellular activities*) gehören (Tamura et al. 1998). Diese Peroxine sind an einem späten Schritt des Matrixproteinimports beteiligt. PEX1 und PEX6 interagieren miteinander, wobei eine Überexpression des einen Peroxins eine milde *missense*-Mutation des anderen Peroxins ausgleichen kann (Geisbrecht et al. 1998, Tamura et al. 1998). *PEX1*- und *PEX6*-defiziente Zellen enthalten leere peroxisomale Membranstrukturen und haben einen deutlich reduzierten Gehalt an PEX5 (Weller et al. 2003). Zu den *PEX1*- und *PEX6*-Funktionen scheinen somit die Stabilisierung von PEX5 und die Regenerierung des PTS1-Rezeptors zu gehören.

Peroxisomale Signalsequenzen für Membranproteine und die Biogenese der peroxisomalen Membran sind bisher noch weniger gut verstanden. Das Endoplasmatische Retikulum spielt hier eine Rolle beim Transport peroxisomaler Membranproteine in die peroxisomale Membran (Ma und Subramani 2009). Peroxisomen können sowohl durch Teilung als auch durch Neubildung entstehen, wobei peroxisomale Vorstufen mit reifen Peroxisomen fusionieren (Hoepfner et al. 2005, Schrader und Fahimi 2006). Die Vermehrung von Peroxisomen geschieht durch Teilung. Neubildung findet ausschließlich in Abwesenheit präexistierender Peroxisomen statt (Motley und Hetteima 2007).

Die peroxisomale Matrix enthält mehr als 50 verschiedene Enzyme, die in vielen lebenswichtigen katabolen und anabolen Stoffwechselwegen involviert sind (Gould et al. 2001). Neben der Detoxifikation von durch Oxidasen produziertem Wasserstoffperoxid durch die peroxisomale Katalase gehören zu den katabolen

Stoffwechselwegen die β -Oxidation von langkettigen ($>C_{14-22}$) und sehr langkettigen ($>C_{24}$) Fettsäuren (VLCFAs), die β -Oxidation von Leukotrienen, der Abbau von Purinen und Aminosäuren und der Abbau von Pipecolin-, Phytan- und Pristansäure (Reddy und Mannaerts 1994, Wanders et al. 1995). Bei den anabolen Funktionen handelt es sich um Reaktionsschritte in der Biosynthese von Cholesterin, Plasmalogenen (Etherlipiden) und Gallensäuren (Wanders und Waterham 2006). Plasmalogene sind zerebrale und hepatische Phospholipide mit zentraler Bedeutung.

1.2 Peroxisomale Erkrankungen

Durch die Teilnahme der Peroxisomen an vielfältigen essentiellen Stoffwechselwegen ist es naheliegend, dass aus Defekten der Peroxisomenbildung oder einzelner peroxisomaler Proteine eine Reihe von Erkrankungen resultiert.

Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen werden in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I ist gekennzeichnet durch eine Biogenesestörung von Peroxisomen, bei der die Peroxisomen nicht oder nur sehr unvollständig gebildet werden. Es resultieren Defekte in mehreren oder allen Stoffwechselwegen mit peroxisomaler Beteiligung. Diese auch als Peroxisomenbiogenesedefekte (PBDs) bezeichneten Erkrankungen werden autosomal-rezessiv vererbt (Weller und Gärtner 2002, Weller et al. 2003). PBDs können durch Defekte in jedem einzelnen Schritt der Organellausbildung verursacht sein. Dazu zählen die Peroxisomenmembranbildung, die Erkennung von neu synthetisierten peroxisomalen Matrixproteinen sowie der peroxisomale Proteinimport (Rosewich et al. 2005). Zu den Erkrankungen der Gruppe I zählen das Zellweger-Syndrom (ZS), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und der infantile Morbus Refsum (IRD). Diese Erkrankungen werden in Anbetracht der gemeinsamen molekularen Erkrankungsursache als ein Kontinuum der klinischen Ausprägung angesehen und zusammenfassend auch als Zellweger-Syndrom-Spektrum (ZSS) bezeichnet. Dabei manifestieren sich bei den ZS-Patienten die schwersten klinischen und biochemischen Störungen, die sich in einer Überlebensdauer unter einem Jahr widerspiegeln, während NALD-Patienten und IRD-Patienten deutlich mildere phänotypische und biochemische Auffälligkeiten haben und mehrere Jahre überleben können (Gärtner 2007, Weller et al. 2003). Der Prototyp der Erkrankung der Gruppe I ist das Zellweger-Syndrom (Gould et al. 2001). Die Erkrankung wurde 1964 erstmals durch den Amerikaner Hans Ulrich Zellweger

an einem Zwillingsspaar entdeckt; Goldfischer et al. (1973) stellten als Erste fest, dass das 1964 beschriebene Zellweger-Syndrom (Bowen et al. 1964) auf das Fehlen von morphologisch detektierbaren Peroxisomen zurückzuführen ist. Es handelt sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit einer geschätzten Inzidenz von 1:100 000 – 1:200 000 in Europa (Gärtner und Roscher 2003). Phänotypisch fallen die Patienten durch faziale Dysmorphien mit einer hohen Stirn, einem tiefen und breiten Nasenrücken, Ohrmuscheldysplasien, einer Mikrognathie und einem hohen bogenförmigen Gaumen auf. Im Bereich der Augen sind Hypertelorismus, Epikanthus und leicht mongoloide Lidachsen auffällig. Bei Geburt haben die Kinder eine große Fontanelle und weite Schädelnähte. In augenärztlichen Untersuchungen können Katarakte, Hornhauttrübungen und Retinitis pigmentosa mit Optikusatrophy gefunden werden. Ein Hörverlust tritt bei Patienten mit einer längeren Überlebenszeit auf (Raymond und Moser 1997). Neurologisch zeigen die Patienten eine schwere Muskelhypotonie, Krampfanfälle, eine Hypo- und Areflexie, Trinkschwäche, Gedeihstörungen und eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung (Brosius und Gärtner 2002). Das Zellweger Syndrom wird auch als zerebrohepatorenales Syndrom bezeichnet. Dieser Begriff bezieht sich auf die typischen morphologischen Veränderungen im Nervensystem, in der Leber und den Nieren. So zeigt ein kraniales MRT möglicherweise Störungen der Hirnentwicklung mit Pachygyrie, perisylvischer Polymikrogyrie, Heterotopien sowie Leukodystrophien (Barkovich und Peck 1997, van der Knaap und Valk 1991, Weller et al. 2008). Eine Hepatomegalie mit Leberfibrose und -zirrhose ist häufig, außerdem finden sich renale Zysten (Raymond und Moser 1997). Röntgenaufnahmen der Knochen können eine frühzeitige Kalzifizierung der Patella zeigen.

Neben dem Zellweger-Spektrum, das 80 % der PBD-Patienten ausmacht, wird die Erkrankung Rhizomelia chondrodysplasia punctata (RCDP) zu den Peroxisomenbiogenesedefekten gezählt. Bei dieser Erkrankung tritt vor allem eine schwere skelettale Beteiligung mit Verkürzung der proximalen Extremitäten (Rhizomelie) auf. Katarakte und Ichthyosis sind weitere mögliche Symptome. Nur wenige Patienten überleben das erste Lebensjahr (Gärtner 2007, Weller et al. 2003). Aufgrund des Defektes in der Peroxisomenbildung fallen bei Patienten der Gruppe I nahezu alle oder alle peroxisomalen Stoffwechselfunktionen aus. Es ergeben sich Defekte in der peroxisomalen β -Oxidation mit Störungen beim Abbau der VLCFA, der Pipecolin- und Pristansäure und der Zwischenprodukte der Gallensäuresynthese. Ferner führen

Defekte in der peroxisomalen α -Oxidation zu einer Erhöhung der Phytansäure. Diese biochemischen Auffälligkeiten sind die Basis der ersten diagnostischen Schritte beim ZSS, die weiter unten beschrieben werden. RCDP-Patienten haben einen distinkten biochemischen Phänotyp, da nur die peroxisomalen Matrixenzyme mit PTS2 nicht importiert werden können (Weller et al. 2003). Es ergeben sich lediglich Störungen in der Plasmalogensynthese und der peroxisomalen α -Oxidation. Da die peroxisomale β -Oxidation intakt ist, tritt bei RCDP-Patienten keine erhöhte VLCFA-Konzentration auf.

In der Gruppe II liegt ein isolierter Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges bei ansonsten regelrechter Peroxisomenbildung und -funktion vor. Zu dieser Gruppe zählen die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD), β -Oxidationsdefekte, Morbus Refsum, Hyperoxalurie Typ I und die Glutarazidurie Typ III. Grundlage sind genetische Defekte einzelner peroxisomaler Enzyme oder assoziierter Proteine, wie beispielsweise Membrantransportproteine (Wanders et al. 2001). Die X-ALD ist die am besten charakterisierte Peroxisomenerkrankung und gleichzeitig die Häufigste. Die Inzidenz beträgt 1:17 000 Neugeburten, eingeschlossen Hemizygoten und symptomatische Heterozygoten (Auborg 2007). Durch die Mutation des ALD-Gens, das ein Transporterprotein in der Peroxisomenmembran kodiert, können VLCFA nicht mehr in den Peroxisomen abgebaut werden (Wanders und Waterham 2004). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind unvollständig aufgeklärt. Es resultiert eine Akkumulation der VLCFA, die vor allem zu einer Schädigung der weißen Hirnsubstanz, der Nebennierenrinde und der Hoden führt (Weller et al. 2003). Die Manifestation der Erkrankung ist unterschiedlich. Es lassen sich bei der X-ALD eine Vielzahl von Erkrankungsformen unterscheiden. Dazu zählen die kindliche cerebrale Form, die Adrenomyeloneuropathie, die einfache Addison-Variante, die asymptomatische Form, die spinozerebelläre Ataxie und die symptomatischen Überträgerinnen. Die schwerste und häufigste Verlaufsform ist die kindliche, zerebrale Form, die durch ein rasches Fortschreiten nach Erkrankungsbeginn charakterisiert ist und meist im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt zum Tode führt (Auborg 2007, Moser HW et al. 2001).

1.3 Diagnose peroxisomaler Erkrankungen

Zur biochemischen Diagnosestellung des Zellweger-Spektrums (Gruppe I) werden

die Bestimmung der VLCFA, der Pipecolin- und Pristansäure und die Bestimmung der Zwischenprodukte der Gallensäuresynthese im Plasma, die alle auf einen Defekt in der peroxisomalen β -Oxidation beruhen, herangezogen. Diese Metabolite können beim ZSS deutlich erhöht sein. Ein Fehler in der peroxisomalen α -Oxidation macht sich durch eine erhöhte Phytansäure im Plasma bemerkbar. Außerdem können die peroxisomalen Enzymaktivitäten der Plasmalogenbiosynthese vermindert sein, sodass bei Bestimmung der Plasmalogene in Erythrozyten diese Verminderung detektiert wird. Bei der RCDP zeigen sich neben den erhöhten Phytansäurewerten und dem erniedrigten Plasmalogen normale Werte für die VLCFA. Ferner ermöglicht die Bestimmung der Katalaseverteilung eine Differenzierung zwischen dem Zellweger-Spektrum, der RCDP und isolierten Defekten der peroxisomalen β -Oxidation. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung des Enzyms Katalase, welches durch ein PTS1 in die Peroxisomenmatrix transportiert wird, erlaubt die Differenzierung zwischen Bildungsstörungen der Peroxisomen (ZSS; diffuses Fluoreszenzmuster) und Defekten einzelner peroxisomaler Enzyme (RCDP, β -Oxidationsdefekt; Peroxisomen-spezifisches Fluoreszenzmuster). Die Diagnosestellung der X-ALD (Gruppe II) erfolgt anhand der Klinik, Bildgebung und biochemisch über den Nachweis einer erhöhten Konzentration an VLCFA. Dazu zählen die Bestimmung der Konzentration der Tetracoensäure (C24:0), der Hexacosansäure (C26:0) sowie deren Verhältnis zur Docasansäure (C22:0) (Moser AB et al. 1999). Die biochemischen Veränderungen der diagnostischen Marker werden in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Diagnose von peroxisomalen Erkrankungen basierte ursprünglich alleine auf der Bestimmung der klinischen und biochemischen Kriterien. Aufgrund der enormen genetischen Heterogenität und dem weiten klinischen Spektrum wird heutzutage die molekulargenetische Untersuchung der Erkrankungsursache mit in die Diagnosestellung eingeschlossen. Dies ist besonders bezüglich einer genetischen Beratung und einer möglichen Pränataldiagnostik sowie einer Beratung bezüglich der Prognose und zur Diagnosestellung bei unklaren biochemischen Ergebnissen wichtig. Die Diagnose kann nicht immer über die Bestimmung erhöhter VLCFA-Konzentrationen im Plasma gestellt werden, da es auch ZSS-Patienten gibt, deren VLCFA-Konzentration normal, aber in anderen Geweben wie Fibroblasten auffällig ist (Rosewich et al. 2006, Steinberg et al. 2006, Wanders und Waterham 2004).

Substrate des peroxisomalen Metabolismus	Probe	ZSS	RCDP	X-ALD
Peroxisomale β-Oxidation:				
VLCFA (C26:0; C26:0/C22:0 und C24:0/C22:0 Ratio)	Plasma, Fibroblasten	↑↑	normal	↑↑
Gallensäureintermediate (DHCA, THCA)	Plasma	↑↑	normal	normal
Pristansäure	Plasma	↑	normal	normal
Pipecolinsäure	Plasma	↑	normal	normal
Peroxisomale α-Oxidation:				
Phytansäure	Plasma	↑	↑↑	normal
Biosynthese:				
Plasmalogene	Erythrozyten, Fibroblasten, Gewebe	↓↓	↓↓	normal
Funktionelle Tests:				
Katalase-Import (PTS1 Enzyme)	Fibroblasten	↓↓	normal	normal

↑ = gesteigert ↑↑ = sehr gesteigert ↓↓ = sehr erniedrigt

Tabelle 1: Biochemische Veränderungen bei Patienten mit peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen (ZSS, RCDP, X-ALD).

Aufgrund des Defektes in der Peroxisomenbildung fallen bei Patienten der Gruppe I (ZSS) nahezu alle oder alle peroxisomale Stoffwechselfunktionen aus. Bei ZSS-Patienten ergeben sich Defekte in der peroxisomalen β -Oxidation, der peroxisomalen α -Oxidation und der Plasmalogenbiosynthese. In der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Fibroblasten von ZSS-Patienten kann kein Katalase-Import nachgewiesen werden. RCDP-Patienten haben einen distinkten biochemischen Phänotyp, da nur die peroxisomalen Matrixenzyme mit PTS2 nicht importiert werden können (Weller et al. 2003). Hier ergeben sich lediglich Störungen in der peroxisomalen α -Oxidation von Phytansäure und der Plasmalogensynthese. In der Gruppe II (X-ALD) liegt ein isolierter Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges bei ansonsten regelrechter Peroxisomenbildung und -funktion vor.

Im Jahr 2004 wurde ein 7-Schritte-Algorithmus für die Diagnosefindung aufgestellt, der auf der Sequenzierung von verschiedenen Exons sechs individueller *PEX*-Gene (*PEX1*, *PEX2*, *PEX6*, *PEX10*, *PEX12* und *PEX26*) beruht (Steinberg et al. 2004). 2009 folgte eine weitere diagnostische Strategie für die molekulare Diagnostik bei ZSS-Patienten (Krause et al. 2009). Patienten mit Verdacht auf ZSS werden zunächst biochemisch auf Erhöhung der VLCFA-Konzentration im Plasma und Erniedrigung der Plasmalogene in den Erythrozyten untersucht. Bei biochemischen Auffälligkeiten soll anschließend eine Sequenzanalyse für die zwei häufigsten Mutationen G843D und c.2097_2098insT im *PEX1*-Gen stattfinden. Für den Fall, dass ein Patient für eine dieser Mutationen heterozygot ist, wird das komplette *PEX1*-Gen sequenziert. Falls keine der beiden häufigen Mutationen im *PEX1*-Gen gefunden wird, empfiehlt sich, eine Hautbiopsie vorzunehmen und an kultivierten primären Haut-

fibroblasten eine Immunfluoreszenzanalyse durchzuführen. Lässt sich mithilfe einer Transfektion eines bekannten *PEX*-Gens die peroxisomale Lokalisation der Katalase wieder herstellen, so könnte anschließend eine Sequenzierung des korrigierenden *PEX*-Gens vorgenommen werden, um die Mutation zu identifizieren (Krause et al. 2009).

1.4 Genetische Ursachen der Peroxisomenbiogenesedefekte und Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die genetischen Grundlagen der Peroxisomenbiogenesedefekte sind heterogen. In den letzten Jahrzehnten konnten anhand von Komplementierungsstudien mit peroxisomendefizienten menschlichen Fibroblasten, chinesischen Hamsteroarialzellen und Hefezellen mindestens 13 verschiedene menschliche *PEX*-Gene identifiziert werden, die an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind (Steinberg et al. 2006). Anhand von Zellfusionsexperimenten wurden die Patienten in 13 sogenannte Komplementierungsgruppen eingeteilt. Der primäre genetische Defekt für alle diese Gruppen konnte mittlerweile geklärt werden. Im Gegensatz zu den ZSS-Patienten gehören die RCDP-Patienten ausschließlich der Komplementierungsgruppe 11 an und ihre Defekte resultieren ausschließlich aus Mutationen im *PEX7*-Gen (Purdue et al. 1997).

PEX1- Mutationen sind die häufigste Ursache für Peroxisomenbiogenesedefekte und sind für zwei Drittel der Patienten des Zellweger-Spektrums verantwortlich (Collins CS und Gould 1999, Reuber et al. 1997). *PEX1* liegt auf Chromosom 7q21-q22 und umfasst 24 Exons, die ein 4,4 kb großes Transkript ergeben (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997). *PEX1* kodiert das Peroxin 1, ein 147 kDa großes Protein, das zur Familie der ATPasen vom AAA-Typ gehört (Tamura et al. 1998). Wie oben beschrieben, ist *PEX1* am Matrixproteinimport beteiligt (Collins CS et al. 2000).

Bei den *PEX1*-Mutationen handelt es sich um *missense*-Mutationen, Insertionen, Deletionen, Spleißmutationen, *nonsense*-Mutationen und Duplikationen. Die meisten dieser *PEX1*-Mutationen sind über die zwei AAA-Kassetten mit den zwei funktionellen Proteindomänen D1 und D2 und den Walker-A- und -B-Motiven verteilt (Tamura et al. 1998). Häufige *PEX1*-Mutationen sind die *missense*-Mutation c.2528G>A, p.G843D in Exon15 (Portsteffen et al. 1997, Preuss et al. 2002, Reuber et al. 1997) und die Insertion c.2097_2098insT, p.I700YfsX42 (Collins CS und Gould 1999, Maxwell et al. 1999, Preuss et al. 2002, Steinberg et al. 2004, Walter et al.

2001). Jede dieser Mutationen macht etwa 30 % der mutierten Allele in der Komplementierungsgruppe 1 aus (Collins CS und Gould 1999). Das G843D-Allel zeigt verglichen mit dem Wildtypallel eine 15%ige Restimportaktivität für das peroxisomale Matrixenzym Katalase und wird aufgrund der Restfunktion eher mit einer milden phänotypischen Ausprägung im Zellweger-Spektrum assoziiert (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997). Die Insertion c.2097_2098insT verursacht eine Leserasterverschiebung mit einem frühzeitigem Stoppcodon und führt daher zu einem *nonsense*-vermittelten Abbau der *PEX1*-mRNS (Jacobsen und Peltz 1996). Diese Mutation ist eher mit dem schweren Phänotyp des Zellweger-Syndroms assoziiert (Collins CS und Gould 1999, Maxwell et al. 1999). Der peroxisomale Proteinimport fehlt in allen homozygoten c.2097_2098insT Zellen (Maxwell et al. 2002). Diese molekularen Unterschiede wirken sich auf das Überleben der Patienten aus. Homozygote Patienten mit dieser Insertion versterben in der Regel früher als Patienten, die *compound heterozygot* für beide Mutationen (G843D / c.2097_2098insT) sind (Maxwell et al. 1999). Für die Peroxisomenbiogenesedefekte ergibt sich somit eine Genotyp-Phänotyp-Beziehung (Gärtner 2003).

1.5 Therapiemöglichkeiten

Durch die bereits in der Fetalzeit entstandenen Fehlbildungen und Organschäden sind die postnatalen Therapiemöglichkeiten eingeschränkt. Meist finden nur symptomatische Maßnahmen Anwendung. Dazu gehören eine antikonvulsive, orthopädische und physiotherapeutische Therapie sowie eine Korrektur zur Minderung der Seh- und Hörstörungen. Diätetische Maßnahmen zur Senkung der Phytansäure- und VLCFA-Konzentrationen und durch Substitution der Mangelprodukte (Etherlipide, Urso- und Chenodesoxycholsäure etc.) konnten bei PBD-Patienten bisher keine nachweisbaren Erfolge erzielen (Maeda et al. 2002). Einige Patienten des Zellweger-Syndrom-Spektrums konnten jedoch von der Gabe von Docosahexaensäure (DHA) profitieren, indem sich bei manchen die Sehkraft und die psychomotorischen Fähigkeiten verbessert haben (Arai et al. 2008, Tanaka et al. 2007). Das nach dem unter Adrenoleukodystrophie leidenden Patienten Lorenzo Odone benannte Öl wurde von seinen Eltern als Therapieversuch initiiert. »Lorenzos Öl« ist ein Gemisch aus Oleinsäure und Erukasäure im Verhältnis 4:1. Lorenzos Öl senkt die VLCFA im

Plasma. Die Behandlung vermag die Progredienz bestehender neurologischer Symptome nicht zu verhindern, wohl aber möglicherweise zu verzögern (Moser HW et al. 2001). Die Knochenmarktransplantation bei X-ALD stellt den einzigen derzeit kurativen Therapieansatz einer peroxisomalen Erkrankung dar. Wird diese in einem sehr frühen Stadium neurologischer Auffälligkeiten durchgeführt, besteht eine Chance auf permanente Heilung (Shapiro et al. 2000).

1.6 Polymorphismen der 5'-UTR und Transkriptionsstartpunkt im PEX1-Gen

Genetische und phänotypische Variabilität sind seit vielen Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Manche genetische Variationen haben keinen Effekt auf den Phänotyp, andere können krankheitsverursachend oder genmodulierend mit unterschiedlicher Ausprägung sein. So tragen Sequenzvariationen im humanen Genom unter anderem zur Diversität des Menschen, zu individueller Krankheitsdisposition oder -resistenz und zu einer unterschiedlichen Reaktion auf Medikamente bei (Chakravarti 2001).

Als Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) werden spezifische Positionen im Genom bezeichnet, an denen Punktmutationen, entweder Nukleotidsubstitutionen, aber auch seltener Insertionen/Deletionen (Indel-Polymorphismen), auftreten. SNPs sind die häufigsten Sequenzvariationen, wobei davon ausgegangen wird, dass diese alle 200-1000 Basenpaare im menschlichen Genom auftreten und beim Menschen 90 % der genetischen Variation im Genom ausmachen (Collins FS et al. 1998). Meist sind diese Mutationen biallelisch, das heißt in nur zwei Nukleotidzuständen ausgeprägt. Sie kommen mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent innerhalb einer gegebenen Population vor (Kruglyak und Nickerson 2001). Da die kodierende DNS nur etwa 1,5 % des menschlichen Genoms ausmacht, kommen die meisten SNPs in nicht-kodierender DNS vor (Cichon et al. 2002). Sowohl SNPs in kodierenden Regionen können sich auf den Phänotyp auswirken, als auch SNPs in regulierenden Abschnitten der Gene, wo sie in Promoter-Sequenzen die Expression eines Gens oder in terminalen Bereichen die Stabilität eines Gentranskriptes verändern können. Desweiteren gibt es auch Sequenzvarianten, die das korrekte Spleißen eines Gentranskriptes in die reife, funktionelle Form der mRNS beeinträchtigen (Schneeberger und Mueller 2005).

Maxwell et al. (2005) führten als Teil einer Strategie zur Identifikation von nicht-ko-

dierenden Mutationen eine Analyse der 5'-UTR-Region des *PEX1*-Gens durch. Dabei wurden zwei neue 5'-UTR-Polymorphismen detektiert. *PEX1*-defiziente Patienten einer australischen Kohorte trugen eine Transition an Position c.-137 T>C und eine Transversion an Position c.-53 C>G. In allen Fällen kosegregierte die Transition mit der Transversion. Die häufige Mutation c.2097_2098insT kosegregierte ebenfalls mit den Polymorphismen. In einer Luciferase-Untersuchung zeigten Maxwell et al. (2005) den Effekt dieser beiden 5'-UTR-Polymorphismen auf die Genexpression. Sie stellten fest, dass der einzeln vorliegende c.-137 T>C-Polymorphismus, verglichen mit der Wildtypsequenz, die *PEX1*-Genexpression um etwa die Hälfte reduzierte, während der einzeln vorliegende c.-53 C>G-Polymorphismus die *PEX1*-Genexpression um annähernd 25 % erhöhte. Es war kein signifikanter Unterschied zu der *PEX1*-Genexpression der Wildtypsequenz zu erkennen, wenn beide Polymorphismen gleichzeitig vorlagen. Aufgrund dieser Ergebnisse folgerten Maxwell et al. (2005), dass Polymorphismen in der *PEX1*-5'-UTR-Region einen Einfluss auf die *PEX1*-Restfunktion haben könnten, wenn *PEX1*-Mutationen vorliegen, bei denen die *PEX1*-Funktion nicht komplett fehlt. Maxwell et al. (2005) vermuteten außerdem, dass Polymorphismen in der *PEX1*-5'-UTR-Region auch Auswirkungen auf Patienten mit Mutationen in anderen PEX-Proteinen haben könnten, die mit dem *PEX1*-Protein interagieren.

Maxwell et al. (2005) bezeichneten das physiologische Translationsstartcodon als ATG2 und das davon 138 bp stromaufwärts liegende ATG als ATG1. Der physiologische Translationsstartpunkt, initiiert vom ATG2, gilt als offiziell anerkannt (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997, Tamura et al. 1998). Das ATG2 kodiert als erstes Codon eines offenen Leserahmens auf der mRNA für die Aminosäure Methionin. Dem Startcodon ATG2 geht eine untranslatierte Region voraus. Über diese 5'-UTR-Region und den möglichen Transkriptionsstartpunkt der mRNA bestehen Uneinigigkeiten. Maxwell et al. (2005) beschrieben, dass es möglich ist, einen mRNA-Abschnitt mit einem Primer zu amplifizieren, der 108 bp 5' von ATG1, also 245 bp 5' von ATG2 bindet. Daraus folgerten sie, dass sich die 5'-UTR-Region der *PEX1*-mRNA noch stromaufwärts von ATG1 befinden muss und der Transkriptionsstartpunkt der 5'-mRNA 245 bp 5' vom ATG2 liegt. Die annotierte Sequenz aus der NCBI-Gendatenbank hingegen gibt an, dass die mRNA des *PEX1*-Gens an Position c.-96 beginnt (NCBI Reference Sequence: NM_000466.2). Einen Transkriptionsstartpunkt 5' von c.-96 kann es somit nach Angaben der Gendatenbank nicht geben.

1.7 Ziel der Arbeit

Zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der molekularen Ursache für die Entstehung der Peroxisomenbiogenesestörung bei zwei Patienten (ZS 8, ZS 26), bei denen jeweils nur eine heterozygote Mutation G843D nachgewiesen werden konnte. Eine zweite pathogene Mutation wurde nach vollständiger Sequenzierung der kodierenden Bereiche des *PEX1*-Gens im Vorfeld nicht gefunden. In beiden Fällen ließ sich die Mutation auf cDNS-Ebene im homozygoten Zustand nachweisen.

Zur weiterführenden diagnostischen Eingrenzung bei diesen ungeklärten *PEX1*-defizienten Patienten soll eine Deletionsuntersuchung für das *PEX1*-Gen und ferner eine allelspezifische *real-time*-PCR etabliert werden, um zugleich Aussagen über das *PEX1*-Expressionsmuster machen zu können.

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Konstellation c.-137 TC und c.-53 CC in einer Reporter-genuntersuchung eine reduzierte *PEX1*-Genexpression bedingt (Maxwell et al. 2005), soll zudem die allelische Verteilung dieser 5'-Polymorphismen in einem größeren Patientenkollektiv mit Mutationen im *PEX1*-Gen analysiert werden. Die Ergebnisse werden mit dem Schweregrad des Phänotyps korreliert.

Der *PEX1*-Transkriptionsstartpunkt wird mittels 5'-*RACE*-PCR und anschließender Klonierung festgelegt und mit den widersprüchlichen Ergebnissen in der Literatur verglichen.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten mit Entwicklungsstörungen von Peroxisomen

Insgesamt wurden 30 männliche und weibliche Patienten deutscher, türkischer, österreichischer und schweizer Herkunft mit dem klinischen Bild einer Entwicklungsstörung von Peroxisomen (PBD) untersucht. Die molekulargenetische Charakterisierung des *PEX1*-Gens erfolgte mit der aus kultivierten Fibroblasten isolierten mRNA oder gDNA der Patienten. Zur molekulargenetischen *PEX1*-Genanalyse der Eltern des Patienten ZS 26 wurde genomische DNA aus EDTA-Blut verwendet. Ein Votum der zuständigen Ethikkommission liegt vor. In Tabelle 3 sind 30 Patienten mit ihren bekannten *PEX1*-Mutationen angegeben.

2.2 Material

2.2.1 Geräte und Material

<u>Gerät / Material</u>	<u>Firma</u>
10 cm-Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
12 cm-Gewebekulturplatten	Greiner, Frickenhausen
96-Loch-Microtiterplatten	StarLab, Ahrensburg
Analysewaage Typ L2200P	Sartorius, Göttingen
Auslaufpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Brutschrank Typ 400 HY	Bachofer, Reutlingen
Deckgläser (24 x 48 mm)	Menzel, Braunschweig
DNA-Sequenzierer ABI AVANT 3100	Advanced Biolab, München
Fastblot B 43	Biometra, Göttingen
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
iQ 5 Cycler	BioRad, San Jose, USA
Kryoröhrchen (1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Luminescent Image Analyzer, Typ LAS-4000 mini	Fujifilm, Düsseldorf
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Mikropipetten (20, 100, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop, Binokular Stemi CV8	Zeiss, Göttingen
Mikroskop, Nikon, Typ Eclipse TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop, Typ Axio Imager M.1	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrowellenherd	Siemens, München
Mikrozentrifuge, Typ 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge, Typ MIKRO 200 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Mini-Protean Tetra Elektrophorese System	Bio-Rad, San Jose, USA
Multi-Mode Microplate Reader Typ S-HT	BioTek, Bad Friedrichshall
NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Pipettenspitzen mit Filter (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
RC-5 Superspeed Kühl-Zentrifuge	ThermoFisherScientific, Schwerte
Reaktionsgefäße (0.2, 1.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilmentwickler Optimax, Typ TR	MS Laborgeräte, Wiesloch
Schüttelinkubator, Typ Ecotron	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Spannungsgerät 2301 Macrodrive	LKB, Gräflingen
SS-34/GSA-Rotoren für Sorvall-Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sterile Schraubdeckelröhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischkühlzentrifuge, Typ ROTANTA/R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge, Typ Universal 320	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
UV-Transluminator Typ BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Vortex Genie 2	Bender&Hobbein, Zürich, Schweiz
Zellkulturinkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.2.2 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
BC Assay Reagent A	Interchim, Mannheim
BC Assay Reagent B	Interchim, Mannheim
BigDye	Qiagen, Hilden
BigDye Puffer	Qiagen, Hilden
Blotting Grade Blocker Milchpulver	Bio-Rad, San Jose, USA
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Brilliant Blue G-250	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coral Load PCR Puffer	Qiagen, Hilden
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories, Pasching
DMEM (low glucose)	PAA Laboratories, Pasching
dNTP-Set	PeqLab, Erlangen
dNTP-Mix	PeqLab, Erlangen
EDTA-Lösung (0,5 M)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Expand Long Template Enzyme Mix	Roche, Mannheim
Expand Long Template Puffer	Roche, Mannheim

FKS	PAA Laboratories, Pasching
Formamin	Carl Roth, Karlsruhe
Galactose	Carl Roth, Karlsruhe
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
GelRed	Biotium, Köln
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
iQSYBRGreen Supermix	Bio-Rad, San Jose, USA
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim
Magermilch	Bio-Rad, San Jose, USA
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, München
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
Orange G	PeqLab, Erlangen
Paraformaldehyd (4 %)	USB Corporation, Staufen
PCR Reaktionspuffer 10x	Qiagen, Hilden
PeqGOLD TriFast	PeqLab, Erlangen
pGEM-T-Easy	Promega, Mannheim
Ponceau S-Färbelösung	AppliChem, Darmstadt
ProLong Gold with DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
ProSieve Color Protein Markers	Lonza, Köln

Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette	Roche, Mannheim
Proteinladepuffer 4x (SDS-PAGE)	Carl Roth, Karlsruhe
Q-Solution (PCR)	Qiagen, Hilden
Rapid Ligationspuffer 2x	Promega, Mannheim
Roti-Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt
SDS-Lösung 20 %	Carl Roth, Karlsruhe
Sequenzierpuffer 5x	Applied Biosystems, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	PAA Laboratories, Pasching
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe

2.2.3 Enzyme

Material

Firma

Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
HotStar-Taq DNA Polymerase, 5 U/μl	Qiagen, Hilden
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, Hercules, USA
PeqGOLD TriFast	PeqLab, Erlangen
Prestained ProSieve Protein Marker	Lonza, Köln
Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten	Roche, Mannheim
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
RNase A, 10 mg/ml	Calbiochem, Frankfurt
RNase H	Invitrogen, Karlsruhe
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript III	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase, 3 U/μl	Promega, Mannheim
Taq DNA Polymerase, 5 U/μl	Qiagen, Hilden
Terminale Transferase	Roche, Mannheim

2.2.4 Aufreinigungs- und Reaktionssystem (Kits)

<u>Kitbezeichnung</u>	<u>Firma</u>
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
BCAssay for Protein quantitation Kit	Uptima, Montluçon
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP-Set	PeqLab, Erlangen
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
High Pure PCR Purification Kit	Roche, Mannheim
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad, Hercules, USA
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
pGEM-T Easy Vector System I	Promega, Mannheim
QiAMP DNA Kit (250)	Qiagen, Hilden
5'/3' RACE Kit, 2 nd Generation	Roche, Mannheim
SuperScript III First-Strand Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.2.5 Antikörper

Die folgenden primären und sekundären Antikörper wurden in dieser Arbeit für die Detektion von Proteinen im Western Blot und für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung verwendet. In der Tabelle 2 sind die Bezeichnung der Primär- und Sekundärantikörper, der Verwendungszweck, die eingesetzte Verdünnung und die Herkunft aufgeführt.

Bezeichnung	Antikörper gegen	Spezies	Anwendung (Verdünnung)	Herkunft
Primärantikörper				
Anti-PEX 1	PEX1	Maus	Western Blot (1:300)	Transduction Laboratory
Anti-Tubulin	Tubulin	Maus	Western Blot (1:10000)	Sigma
Anti-myc mono	MycTag	Maus	Immunfluoreszenz (1:500)	Clontech
Anti-PEX 14	PEX14	Kaninchen	Immunfluoreszenz (1:1000)	ProteinTech Group
Sekundärantikörper				
Anti-mouse HRP	Maus	Ziege	Western Blot (1:3000/1:50000)	Jackson ImmunoResearch
Anti-mouse Alexa 488	Maus	Esel	Immunfluoreszenz (1:2000)	Invitrogen
Cy3-anti rabbit	Kaninchen	Ziege	Immunfluoreszenz (1:200)	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper.

Übersicht der im Western Blot bzw. in der Immunfluoreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und ihre jeweilige Verdünnung.

2.2.6 Bakterienstamm

Name

E.coli BIOblue

Firma

Bioline, Köln

2.2.7 Puffer und Lösungen

Blockierlösung (Western Blot): 5 % Blotting Grade Blocker Milchpulver in PBS-T

Coomassie-Färbe-Lösung: 0,2 % Brilliant Blue G-250; 10 % Essigsäure; 30 % Isopropanol

Coomassie-Entfärbe-Lösung: 10 % Essigsäure; 20 % Isopropanol; 70 % H₂O

DEPC H₂O: 0,001 % DEPC in H₂O

5 x DNA-Ladepuffer (Orange G): 15 % Ficoll 400; 200 mM EDTA; 0,1 % Orange G

Lyse-Puffer: 50 mM Tris (pH 8.0); 100 mM EDTA; 0,5 % SDS

PBS: 140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM K₂HPO₄ (pH 7,4)

PBST: 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS

Ponceau S-Färbelösung: 15 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol; 0,25 % (w/v) Ponceau S

Proteinladepuffer 4x (SDS-Page): 160 mM Tris-HCl (pH 6,8); 140 mM SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,1 g Bromphenolblau; 40 mg/ml DTT

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat; 1 % (v/v) Nonidet P-40; 0,1 % (w/v) SDS

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-Base; 190 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Semidry Transferpuffer: 150mM Glycin; 25mM Tris-Base; 0,04 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol

TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 % (v/v) Eisessig; 1 mM EDTA (pH 8,0)

TBE: 90 mM Tris-Base; 90 mM Borsäure; 0,2 M EDTA (pH 8,0)

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl

TBST: TBS; 0,1 % (v/v) Tween-20

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

2.2.8 Medien für Zellkulturen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % (v/v) FBS; 2 mM L-Glutamin

Einfriermedium: 70 % (v/v) DMEM; 20 % (v/v) FBS; 10 % (v/v) DMSO

Trypsin / EDTA: 0,05 % (v/v) Trypsin; 0,53 mM (v/v) EDTA

2.2.9 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl

LB-Platten: LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar (bei Bedarf mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin)

2.2.10 Plasmide

Im Rahmen der transienten Transfektion wurden als Reporter für den peroxisomalen Proteinimport folgenden Plasmide eingesetzt:

pcDNA3-NmycPECI (Geisbrecht et al. 1999)

pcDNA3-NmycCatalase (Liu et al. 1999)

pBER 81 = pcDNA3-*PEX1* (Reuber et al. 1997).

PECI kodiert für ein Enzym, der Δ^3 , Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase von Peroxisomen (Geisbrecht et al. 1999). Für die Klonierung von PCR-Produkten im Rahmen der 5'-*RACE*-PCR wurde pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Mannheim) eingesetzt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von mRNS aus kultivierten Fibroblasten

Das peqGOLD TriFast, eine monophasische Lösung von Phenol und Guanidiniisothiocyanat, ist eine Weiterentwicklung der *single step*-RNS-Isolationsmethode von Chomczynski und Sacchi (1987). Während der Homogenisation bzw. Lyse der Zellen erhält peqGOLD TriFast die Integrität der RNS. Die Zellen werden lysiert und Zellbestandteile aufgelöst. Durch die Zugabe von Chloroform und die anschließende Zentrifugation wird die Lösung in drei Phasen separiert:

- eine wässrige, die RNS enthaltende Phase,
- eine Interphase, die DNS enthält,
- und eine organische Phenol/Chloroform-Phase, die die Proteine enthält.

Zur Lyse der Zellen wurden diese mithilfe von Trypsin/EDTA von einer 10 cm-Platte geerntet. Durch Zentrifugation wurde ein Zellsediment hergestellt und in drei Portionen aufgeteilt. Die Zellen wurden jeweils in 100 µl PBS resuspendiert und je Eppendorf-Röhrchen wurden 1,5 ml peqGOLD TriFast hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur mit zwischenzeitlichem Invertieren (komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe). Nach diesem Schritt konnte das Zellysate vor der Zugabe von Chloroform für mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden. Pro 1 ml eingesetztem peqGOLD TriFast wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben. Die Suspension wurde drei bis zehn min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasenseparation folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 12000 x g. Die RNS befindet sich ausschließlich in der wässrigen oberen Phase, die Interphase und die organische untere Phenol-Chloroform-Phase beinhalteten DNS und Proteine. Aus der wässrigen Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml eingesetztem peqGOLD TriFast die RNS in einer 15-minütigen Inkubation auf Eis präzipitiert. Anschließend wurde die präzipitierte RNS zehn Minuten und 12000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Das RNS-Sediment wies eine gelartige Konsistenz auf. Das RNS-Sediment wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol pro 1 ml peqGOLD TriFast gewaschen und zehn Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Anschließend wurde die RNS kurz luftgetrocknet, ohne sie dabei vollständig auszutrocknen, da dies die Löslichkeit stark beeinträchtigt hätte. Die RNS wurde in 100-150 µl DEPC-behandeltem Wasser zehn Minuten bei 60°C gelöst. Die RNS-Menge

wurde photometrisch quantifiziert. Dann wurde die RNS bei -80°C gelagert.

2.3.2 Isolierung von genomischer DNS aus kultivierten Fibroblasten

Für die Isolierung genomischer DNS wurden zwei Kulturflaschen (75 cm^2) mit zu Konfluenz kultivierten Fibroblasten mit Trypsin/EDTA aus der Flasche gelöst, mit Medium in zwei 15-ml-Falcons überführt und für 5 Minuten bei $500 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde in $800\ \mu\text{l}$ Lyse-Puffer aufgenommen und mit $50\ \mu\text{l}$ Proteinase K versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 55°C bei leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde $850\ \mu\text{l}$ Roti-Phenol hinzugegeben und die Mischung anschließend für drei Minuten stark geschüttelt, um eine ausreichende Phasenmischung zu erreichen. Nach dreiminütigem Zentrifugieren mit der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit wurde die obere, wässrige Phase abgenommen. Die Zugabe von Roti-Phenol und die folgenden Schritte wurden wiederholt bis zwischen wässriger und organischer Phase keine Interphase mehr erschien. Danach folgte die Zugabe von $85\ \mu\text{l}$ 3M Natriumacetat (pH 6.0) und $900\ \mu\text{l}$ 100%igem Ethanol bei Raumtemperatur. Nach vorsichtigem Invertieren fiel die DNS als Meduse aus. Um die DNS zu sedimentieren, wurde diese für 30 Sekunden bei $500 \times g$ zentrifugiert und das Ethanol vollständig abgenommen. Anschließend wurde das Sediment unter starkem Schütteln mit 70%igem Ethanol gewaschen, um das restliche Phenol zu entfernen. Nach einminütigem Zentrifugieren bei $500 \times g$ bei Raumtemperatur wurde das Ethanol vollständig abgenommen, die DNS kurz an der Luft getrocknet, in $50\text{--}100\ \mu\text{l}$ TE-Puffer resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 65°C gelöst. Die DNS wurde bei 4°C aufbewahrt. Genomische DNS aus EDTA-Blut wurde mit dem Dneasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch (NanoDrop ND-1000, PeqLab) durchgeführt. Dazu wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gemessen. Für die OD_{260} von 1,0 wurden folgende Referenz-Konzentrationen zugrunde gelegt:

- $50\ \mu\text{g/ml}$ für Doppelstrang-DNS
- $33\ \mu\text{g/ml}$ für Einzelstrang-Oligonukleotide
- $40\ \mu\text{g/ml}$ für RNS.

Die Reinheit einer DNS-Lösung konnte zusätzlich durch die Bestimmung der

optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm überprüft werden. Für reine DNS gilt:

- $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ (Sambrook et al. 1989).

Verunreinigungen der DNS durch Proteine sind an einer deutlichen Steigerung der Absorption bei 280 nm und an einem Quotienten $OD_{260}/OD_{280} < 1,8$ erkennbar.

2.3.4 Reverse Transkription von mRNS (cDNS-Synthese)

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus der isolierten mRNS komplementäre cDNS hergestellt werden. Diese spezifische, RNS-abhängige DNS-Polymerase benötigt den hier verwendeten Oligo(dT₂₀)-Primer als Startsequenz. Dieser Primer bindet bei der eukaryontischen mRNS an den typischen Poly-(A)-Schwanz (3'-Ende) und bildet den Initiationspunkt für die Reverse Transkriptase. Für die cDNS-Synthese wurde das SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) verwendet und bis zu 5 µg Gesamt-RNS eingesetzt. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

5 µM Oligo(dT₂₀)-Primer

1 mM dNTP-Mix

bis zu 5 µg Gesamt-RNS.

Für die Denaturierung der RNS und Anlagerung von Primer und dNTPs wurde der Reaktionsansatz für fünf Minuten bei 65°C und anschließend für eine Minute auf Eis inkubiert. Folgende Reagenzien wurden hinzugefügt:

10 % (v/v) 10 x RT-Puffer

5 mM MgCl₂

10 mM DTT

40 U RNase Inhibitor

200 U SuperScript III RT.

Die cDNS-Synthese wurde für 50 Minuten bei 50°C durchgeführt und anschließend zur terminalen Inaktivierung für fünf Minuten bei 85°C inkubiert. Die Hybrid-RNS-Entfernung erfolgte durch Zugabe von 1 µl RNase H bei einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C. Die synthetisierte cDNS wurde anschließend zur allelspezifischen PCR oder zur *real-time*-PCR eingesetzt. Die cDNS wurde bei -20°C gelagert.

2.3.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht durch selektive Amplifikation die

Vervielfältigung kleinster Mengen DNS für analytische Zwecke. Doppelsträngige DNS wird dabei hitzedenaturiert, so dass zwei kurze Oligonukleotide bei einer spezifischen Temperatur anlagern können, die dann von einer thermostabilen DNS-Polymerase bei 72°C verlängert werden (Extension). Die neu synthetisierten Stränge stehen in der nächsten Amplifikationsrunde ebenfalls als Matrize zur Verfügung. So wird die von den Oligonukleotiden eingerahmte Sequenz idealerweise exponentiell vermehrt. Die Amplifikation der genomischen DNS bzw. cDNS erfolgte mithilfe von genspezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von 18-31 Basenpaaren. Die Fragmentlänge der PCR-Produkte lag zwischen 180 Basenpaaren und 12 Kilobasen. Die Tabelle 10 zeigt die für die Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNS bzw. cDNS verwendeten Oligonukleotide.

Für eine PCR wurden folgende Komponenten bei einem Standardansatz von 50 µl eingesetzt:

10 % (v/v)	10 x PCR-Reaktionspuffer
0,2 mM	dNTP
400 nM	spezifische Oligonukleotide (Sinn-/Gegensinn)
10-500 ng	genomische DNS oder cDNS
1,0 U	HotStarTaq DNA-Polymerase.

Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt:

initiale Denaturierung der DNS und gleichzeitige Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase:

1x 95°C 15 Minuten

zyklische Amplifikation:

37x 95°C 30 Sekunden (Denaturierung)

63°C 30 Sekunden (Primeranlagerung)

72°C 45 Sekunden (Elongation)

finale Elongation:

1x 72°C 10 Minuten

Reaktionsstopp:

Abkühlung auf 4°C.

Die PCR wurde im Thermocycler T3000 (Biometra) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel analysiert.

2.3.5.1 **Long-range-PCR**

Die *long-range*-PCR lässt eine Amplifikation von PCR-Produkten bis 20 kb zu. Die Durchführung der *long-range*-PCR erfolgte mittels Expand Long Template PCR System der Firma Roche nach Herstellerangaben. Folgende Komponenten wurden eingesetzt:

10 % (v/v) Expand Long Template Puffer (Roche)
 0,5 mM dNTP Mix (Roche)
 500 nM spezifische Oligonukleotide (Sinn-und Gegensinn-Primer)
 10-500 ng genomische DNS
 3,75 U Expand Long Template Enzyme Mix

Endvolumen: 50 µl.

Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt:

initiale Denaturierung:

1x 94°C 2 Minuten

zyklische Amplifikation:

10x	94°C 10 Sekunden
	63°C 30 Sekunden
	68°C 45 Sekunden – 15 Minuten*
25x	94°C 15 Sekunden
	63°C 30 Sekunden
	68°C 45 Sekunden – 15 Minuten*

finale Elongation:

1x 68°C 7 Minuten

Abkühlung: 4°C unbegrenzte Zeit.

* Die Elongationszeit hängt von der Fragmentlänge ab: für 3 kb 2 Minuten, für 6 kb 4 Minuten, für 10 kb 8 Minuten, für 20 kb 15 Minuten.

2.3.5.2 **Allelspezifische PCR mit cDNS und gDNS**

Für die Durchführung der allelspezifischen PCR mit cDNS und genomischer DNS wurden die unter 2.3.5 gelisteten Komponenten benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 10 angegeben.

Wenn das 3'-Ende eines Primers aufgrund einer Punktmutation nicht an den Einzelstrang binden kann, so ist die Amplifikation inhibiert, da die Taq-Polymerase nur an einem hybridisierten 3'-OH-Ende verlängern kann (Lottspeich 2009). Für die allel-

spezifische PCR wurde dieser Umstand ausgenutzt und zwei unterschiedliche Sinn-Primer konstruiert. Es wurde ein Sinn-Wildtyp-Primer konstruiert, der am 3'-Ende dem Wildtyp G843G entsprach und ein Sinn-Mutanten-Primer, der am 3'-Ende der Mutation G843D entspricht. Bei den Gegensinn-Primern handelte es sich bei Einsatz der cDNS um den Primer Pec 6 rev kurz und bei Einsatz der gDNS um den Primer 488a kurz. Die Amplifikation der zu untersuchenden DNS fand in zwei getrennten PCR-Reaktionen für die Wildtyp- und Mutanten-Primer jeweils für gDNS und cDNS statt. So ließ sich der Genotyp (Wildtyp, heterozygot, homozygot mutant) charakterisieren. Für die Optimierung der Anlagerungs-Temperatur mit ausschließlich spezifischen Signalen wurden die Proben im Temperaturgradienten von 52°C bis 68°C getestet. Die optimale Anlagerungs-Temperatur, bei der der Wildtyp-Primer nur mit der Wildtyp-gDNS/cDNS bzw. der Mutanten-Primer nur mit der MutantengDNS/cDNS amplifiziert, ließ sich schließlich für genomische DNS bei 63°C und für cDNS bei 59°C bestimmen.

2.3.5.3 Expressionsanalyse mittels *real-time*-PCR

Bei der *real-time*-PCR wird die Akkumulation eines PCR-Produkts während der PCR-Reaktion detektiert, wodurch eine absolute oder relative Abschätzung der Menge der Ausgangs-cDNS und daher der Transkriptmenge eines bestimmten Gens möglich ist. Die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während der PCR-Zyklen erfasst werden. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert mit der DNS, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

In der frühen Phase der Amplifikation der PCR ist die Matrizenmenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, sub-optimal. In der späten Phase der Amplifikation steigt die Menge der Produkte (DNS, Pyrophosphat, Monophosphatnukleotide) derart an, dass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört werden. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der exponentiellen, mittleren Phase. Zu Beginn der exponentiellen Phase nimmt das Fluoreszenzsignal so stark zu, dass es aus dem Hintergrundrauschen hervortritt. Dieser Punkt wird als CT-Wert (cycle threshold) bezeichnet und ist abhängig von der Menge an cDNS-Kopien des zu untersuchenden Gens.

Die Spezifität der zur *real-time*-PCR verwendeten Oligonukleotide wurde überprüft, indem sie zunächst mit der zu untersuchenden cDNS in einer Standard-PCR (allelspezifische PCR) getestet wurden. Die *real-time*-PCR wurde dann mit dem iQ SYBR Green Supermix Kit (Bio-Rad) durchgeführt.

Die cDNS wurde aus 1 µg Gesamt-RNS aus Fibroblasten mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) synthetisiert. Als interne Kontrolle wurden Haushaltsgene (β -Aktin und HPRT) gewählt, die als konstitutiv exprimierte Gene unabhängig vom Zelltyp und äußeren Einflüssen gleichmäßig vorhanden sind.

Für die Amplifikation, die für die jeweilige Bedingung in Triplikaten durchgeführt wurde, wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

50 % (v/v)	iQSYBR Green Supermix
200 nM	Sinn-Primer: Wildtyp-Primer AS G843D wt F1 bzw. Mutanten-Primer AS G84D mt F1 (Anhang)
200 nM	Gegensinn-Primer: Pec 6 rev kurz
5 µl	1:40 verdünnte cDNS

Endvolumen: 25 µl.

Folgende Programmeinstellungen wurden für den iQ 5 Cyclyer (Bio-Rad) verwendet: (Die passende Anlagerungs-Temperatur für die Primer-Paare wurde bereits aus den Optimierungsversuchen der allelspezifischen PCR ermittelt und lag bei 59°C.)

	50°C	2 Minuten
	95°C	30 Sekunden
2 x	95°C	1 Minute
1 x	95°C	10 Minuten
39 x	95°C	30 Sekunden
	59°C	30 Sekunden
1 x	72°C	30 Sekunden
1 x	95°C	1 Minute
	10°C	Abkühlung.

Es wurde eine Verdünnungskurve angefertigt, um die Primer auf Spezifität zu testen. In den weiteren PCR-Ansätzen wurde die 1:40 verdünnte cDNS der Wildtyp-Kontrolle, der Patienten ZS 8 , ZS 26, ZS 27 (jeweils heterozygot für Mutation G843D) und der G843D-homozygoten Mutanten ZS 11 mit jeweils dem Sinn-Wildtyp-Primer (Wildtypreihe) und dem Sinn-Mutanten-Primer (Mutantenreihe) eingesetzt. Bei den Gegensinn-Primern handelte es sich bei Einsatz der cDNS um den Primer Pec 6

rev kurz und bei Einsatz der gDNS um den Primer 488a kurz.

Nach abgelaufener PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Reaktionsspezifität bestimmt werden konnte. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNS aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam von 50°C auf 95°C kontinuierlich erhöht. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNS von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere und unspezifische Produkte, ist eine Unterscheidung möglich. Ferner wurde die Produktspezifität der *real-time*-PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt.

Berechnung nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode:

Die relative Menge der Wildtyp-mRNS-Transkripte bzw. Mutanten-mRNS-Transkripte wurde anhand der delta-delta CT-Methode berechnet. Zunächst wurde der jeweilige CT-Wert des zu untersuchenden Patienten aus der Wildtypreihe bzw. Mutantenreihe von dem CT-Wert, der sich mit dem Haushaltsgen bei dem jeweiligen Patienten ergeben hat, subtrahiert. Bei diesem Wert handelt es sich um den Δ CT-Wert. Ebenso wurde für die Kontrollen (Wildtyp bzw. Mutant) der Δ CT-Wert errechnet. Der $\Delta\Delta$ CT-Wert ergab sich aus der Subtraktion dieser beiden Δ CT-Werte.

Zusammenfassend:

Δ CT = CT Zielgen (Patient: Mutantenreihe bzw. Wildtypreihe) – CT Haushaltsgen

$\Delta\Delta$ CT = Δ CT Patient – Δ CT Kontrolle

Relative Expression = $2^{-\Delta\Delta$ CT}

Die errechneten $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden in Prozentzahlen angegeben. Dabei wurde davon ausgegangen, dass der Wildtyp bei Einsatz des Wildtypprimers 100 % der entsprechenden Wildtyp-mRNS exprimiert und die Mutante bei Einsatz des Mutantenprimers 100 % Mutanten-mRNS exprimiert.

2.3.5.4 5'-RACE

Zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes der *PEX1*-mRNS wurde das 5'/3' *RACE* Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Eine 5'-*RACE*-PCR dient der Isolation und

Charakterisierung von 5'- und 3'- Regionen eukaryontischer mRNA und ist eine Abwandlung der RT-PCR. Bei der hier eingesetzten 5'-RACE-PCR wird mit einem internen Primer, der in Gegensinn-Richtung gerichtet ist und einer Reversen Transkriptase bis zum 5'-Ende der mRNA synthetisiert. Daraufhin wird mit einer terminalen Transferase das 3'-Ende der entstandenen cDNA polyadenyliert. Die einzelsträngige cDNA wird für eine PCR mit einem internen Gegensinn-Primer und dem oligo-dT-Ankerprimer eingesetzt. Bei zu geringer Produktmenge schließt sich eine geschachtelte PCR an, bei der das PCR-Produkt aus der ersten Amplifikation als Matrize für die zweite PCR dient. In dieser wird mit einem zweiten Primerpaar, das an Sequenzbereiche innerhalb dieser Matrize bindet, ein kürzeres cDNA-Fragment amplifiziert, welches kloniert und anschließend sequenziert wird.

cDNA-Einzelstrang-Synthese:

20 % (v/v) 5x cDNA Synthese-Puffer
 1 mM Desoxynukleotide
 625 nM spezifischer Primer
 0,2 – 2 µg Gesamt-RNA
 25 U Reverse Transkriptase
 Endvolumen: 20 µl.

Der Ansatz wurde zunächst für 60 Minuten bei 55°C inkubiert und zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase anschließend bei 85°C inkubiert. Es folgte die Aufreinigung der cDNA in einem Elutionsvolumen von 50 µl mittels High Pure PCR Purification Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben.

Polyadenylierung der Einzelstrang-cDNA:

19 µl gereinigte cDNA
 10 % (v/v) 10x Reaktions-Puffer
 0,2 mM dATP
 Endvolumen: 25 µl.

Der Ansatz wurde 3 Minuten bei 94°C inkubiert, auf Eis gekühlt und anschließend 1 µl Terminale Transferase (80 U/µl) hinzugegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37°C. Die Terminale Transferase wurde bei 70°C für 10 Minuten inaktiviert. Die *PEX1*-spezifische Kontroll-PCR nach der cDNA-Einzelstrang-Synthese und nach

der Polyadenylierung folgte nach Herstellerangaben des 5'/3' RACE Kit der Firma Roche.

Erste PEX1-spezifische PCR: Amplifizierung der poly(A)-cDNS:

5 µl poly(A)-cDNS
 750 nM oligo-dT-Ankerprimer
 250 nM spezifischer Primer
 200 nM Desoxynukleotide
 2,5 U Taq DNA Polymerase
 10 % (v/v) 10x PCR-Reaktions-Puffer
 Endvolumen: 50 µl.

Zweite PCR: Geschachtelte PCR:

1 µl amplifizierte Poly(A)-cDNS
 250 nM PCR-Ankerprimer
 250 nM spezifische Primer
 200 nM Desoxynukleotide
 2,5 U Taq DNA Polymerase
 10 % (v/v) 10x PCR-Reaktions-Puffer
 Endvolumen: 50 µl.

Temperaturprofil für die erste und zweite PCR:

1x 94°C 2 Minuten
 35x 94°C 15 Sekunden
 63°C 30 Sekunden
 72°C 40 Sekunden
 1x 72°C 7 Minuten.

Drei parallele Ansätze wurden mit folgenden spezifischen Primern durchgeführt:

	<u>cDNS-Einzelstrang-Synthese</u>	<u>Erste PCR</u>	<u>Zweite PCR</u>
A	SP1	SP2	Pec10 rev
B	SP3	SP1	SP2
C	SP2	Pex1ex2rev	Pec10 rev.

2.3.6 DNS-Elektrophorese im Agarosegel

Die durch PCR erhaltenen DNS-Fragmente können zu analytischen Zwecken durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt werden. Dabei wird die unterschiedliche Mobilität der negativ geladenen DNS ausgenutzt, die abhängig von der Molekülgröße, der Molekülform und der Agarosekonzentration des Gels ist. Für lineare doppelsträngige DNS-Fragmente besteht im elektrischen Feld über einen weiten Größenbereich der DNS eine lineare Abhängigkeit zwischen dem dekadischen Logarithmus der Fragmentlänge (in bp) und der relativen Wanderungsdistanz (in cm, bezogen auf die gesamte Wanderungsstrecke). Der direkt in die Gel-lösung gegebene Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen von Nukleinsäuren und kann im UV-Licht nachgewiesen werden. Die DNS wurde für analytische Zwecke in Agarosegelen mit 0,8-1,5 % Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Die DNS-Proben wurden mit 5x DNS-Ladepuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 50-100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die DNS-Fragmente unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und fotografiert (BioDoc Analyze, Biometra).

2.3.7 Reinigung von PCR Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels High Pure PCR Purification Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben. Die DNS bindet selektiv in Anwesenheit eines chaotropen Salzes an eine Glasfaser- oder Silica-Matrix. Anschließend wird die gebundene DNS durch eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten von noch vorhandenen Primern, Nukleotiden und Salzen gereinigt. Durch Zugabe eines Puffers mit niedriger Salzkonzentration wird die DNS anschließend eluiert (Vogelstein und Gillespie 1979).

2.3.8 DNS-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNS-Sequenzierung wurde mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Didesoxynukleotiden (ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP) nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Es wurde das Sequenzierungskit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing und sequenzspezifische Oligonukleotiden eingesetzt. Es kommt zum Abbruch der DNS-Synthese, sobald ein ddNTP eingebaut wird. Dies führt zur Erzeugung unterschiedlich langer Fragmente. Die Nukleotide zum Kettenab-

bruch werden in einem Verhältnis mit den Synthesebausteinen gemischt, so dass alle möglichen Fragmentgrößen in Folge des Kettenabbruchs nach einer statistischen Häufigkeit auftreten.

Ein Sequenzierungs-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

ca. 5 ng DNS je 100bp Produktlänge

20 % (v/v) 5x Cycle Sequencing Puffer

500 nM Oligonukleotid

10 % (v/v) BigDye

Endvolumen: 10 µl.

Die PCR-Reaktion wurde im Thermozykler mit 25 Wiederholungen des folgenden Programms durchgeführt:

Schritt 1: 96°C 10 sec

Schritt 2: 60°C 4 min.

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion erfolgte die Fällung der DNS-Fragmente mittels Ethanol-Präzipitation. Die Ethanol-Präzipitation diente zur Entfernung nicht eingebauter fluoreszenzmarkierter Terminatoren (ddNTPs). Sie erfolgte unter Zugabe von 64 % (v/v) Ethanol (100 %), 33 % (v/v) H₂O und 93 mM Na-Acetat-Lösung (pH 4,6) pro 10 µl Sequenzieransatz. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur bei 15000 x g zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (zwei Minuten, Raumtemperatur, 15000 x g). Das DNS-Sediment wurde fünf Minuten luftgetrocknet und anschließend in 10 µl Hi-Di Formamid resuspendiert. Zur Analyse der DNS-Fragmente wurden diese über ein Kapillarsystem elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die jeweils an ein bestimmtes Nukleotid gekoppelt waren, wurden durch einen Laser angeregt. Die verschiedenen Fluoreszenzsignale wurden durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzers ABI AVANT 3100 anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlängen identifiziert. Die Auswertung der Fluoreszenz-Signale und Sequenzgenerierung erfolgte mittels Data Collection Software 2.0 und der Sequencing Analysis Software Version 5.1. Die Sequenziererergebnisse wurden dann mit Referenzsequenzen mit Hilfe des Programms Laser Gene verglichen.

2.3.9 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die direkte Klonierung der aus den unterschiedlichen *RACE*-Ansätzen generierten PCR-Produkte erfolgte nach dem Prinzip der TA-Klonierung mit dem pGEM-T Easy Vector System I. Der linearisierte Vektor (pGEM-T Easy) dieses Kits trägt ein einzelnes 3'-Deoxythymidin. Die Taq-Polymerase besitzt eine matrizenunabhängige Aktivität, einzelne Nukleotide (dATPs) an das 3'-Ende von PCR-Produkten anzufügen. Diese Tatsache ermöglicht die TA-Klonierung. Das PCR-Produkt kann direkt nach der PCR ohne vorherigen Restriktionsverdau in den pGEM T-Easy Vektor ligiert werden. Die Ligation wird von dem Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert, wobei unter ATP-Verbrauch die Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe zweier DNS-Fragmente gebildet wird.

Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50 % (v/v)	2x Rapid Ligationspuffer
50 ng	pGEM-T Easy
1-3 µl	PCR-Produkt
3 U	T4-DNA-Ligase

Endvolumen: 10 µl.

Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 µl des Ligationsansatzes in chemisch kompetente Zellen transformiert. Bei der chemischen Transformation wird das DNS-Bakterien-Gemisch zunächst auf Eis inkubiert, was zur Anlagerung der DNS an die kompetenten Bakterien führt. Durch einen anschließenden Hitzeschock für 45-50 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad wird die DNS von den Bakterien aufgenommen. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde dem Transformationsansatz 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugesetzt und 90 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Für eine Farbselektion wurden vor dem Ausplattieren auf der Platte 100 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG ausgestrichen. Die weißen Kolonien, die das Insert enthielten, wurden analysiert.

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNS wurde das NucleoSpin Plasmid Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzierung der Plasmid-DNS erfolgte mit den Primern T7 und SP6.

2.4 Proteinbiochemische Methoden und indirekte Immunfluoreszenzfärbung

2.4.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Fibroblasten

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen wurde RIPA-Puffer verwendet. Nach der Herstellung des RIPA-Puffers wurde eine Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette (Roche) zugegeben, um endogene Proteasen zu hemmen. Zur Proteinextraktion wurden die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Zellen einer 10-cm-Schale wurden in 600 µl RIPA-Puffer mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in ein Reagenzgefäß überführt und durch repetitives Pipettieren homogenisiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation der Zellen in RIPA-Puffer bei 4°C wurden die unlöslichen Bestandteile durch einen Zentrifugationsschritt (14000 x g, 4°C, 15 Minuten) abgetrennt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCAssay for Protein quantitation-Kit bestimmt. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Proteinextrakte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Quantitative Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Alkalisches Kupfer (Cu II) wird von Proteinen proportional zu ihrer Konzentration zu Cu I reduziert. Dieses reduzierte Kupfer kann mit Hilfe der Bicinchoninsäure gemessen werden, da die beiden einen dunklen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm bilden. Die Extinktionszunahme ist direkt proportional zu einem Anstieg der Proteinkonzentration. Die Kupferreduktion wird durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindungen hervorgerufen. Die BCA-Proteinbestimmung zeichnet sich vor allem durch ihre Toleranz gegenüber Detergenzien aus. Die quantitative Proteinbestimmung wurde mit dem Kit BCAssay for Protein quantitation (Uptima) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als repräsentativer Standard diente das im Kit enthaltene Serum-Albumin mit einer Ausgangskonzentration von 2 mg/ml. Für die Proteinquantifizierung wurde eine BSA-Standardreihe von 0 bis 30 µg angesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte in einem Spektralphotometer über Extinktionsmessung bei 562 nm.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden

Proteine gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen größenabhängig (Molekulargewicht) aufgetrennt (Laemmli 1970). Es wurden Minigele in einer Gelelektrophorese-Kammer der Firma BioRad verwendet. Hierbei betrug die Laufstrecke im Sammelgel 0,5-1 cm und die des Trenngels ca. 6 cm. Die zu analysierenden Proteinproben wurden vor Auftragen auf das Gel mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrodenkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer versetzt. Die Proteinproben wurden nach ihrer Denaturierung in die Geltaschen pipettiert (je 20 µg Gesamt-Protein). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/Gel. Die Auftrennung konnte durch mitlaufende Protein-Molekulargewichtsstandards verfolgt werden. Die Gele wurden anschließend im Western Blot eingesetzt.

Es wurden SDS-Gele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 10 % verwendet. Die Sammelgele wurden mit einem Anteil von 5 % Polyacrylamid hergestellt.

Trenngelbestandteile für ein 10%iges Gel:

40 % (v/v) H₂O
 10 % (v/v) Acrylamidlösung
 0,38 M Tris-HCl (pH 8,8)
 0,1 % (v/v) SDS
 0,1 % (v/v) Ammoniumpersulfat
 0,04 % (v/v) TEMED.

Sammelgelbestandteile:

68 % (v/v) H₂O
 5 % (v/v) Acrylamidlösung
 0,13 M Tris-HCl (pH 6,8)
 0,1 % (v/v) SDS
 0,1 % (v/v) Ammoniumpersulfat
 0,1 % (v/v) TEMED.

2.4.4 Western Blot: Proteintransfer

Beim eingesetzten Semidry-Blotting-Verfahren wurden Whatman-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran (Whatman) mit Transferpuffer getränkt. Diese wurden in einer Blotapparatur (Biometra) so geschichtet, dass die Proteine aus dem Gel zur Anode wandern konnten und dabei auf der Membran haften blieben. Die Wanderung

zur Anode kommt durch das SDS zustande, das nach der Gelelektrophorese noch an die Proteine gebunden ist und ihnen so eine negative Ladung verleiht. Der Proteintransfer wurde in einer Semidry-Blot-Apparatur (Biometra) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und erfolgte eine Stunde mit 2 mA pro cm²-Gelfläche. Der Proteintransfer konnte im Anschluss durch eine reversible Färbung mit Ponceau S-Lösung überprüft werden.

2.4.5 Immunologische Detektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Primärantikörper in geeigneter Verdünnung (Tabelle 2) in Blockierlösung zwei Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Vor Zugabe der Sekundärantikörper wurde die Membran mehrmalig für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Der geeignete Sekundärantikörper wurde ebenfalls in Blockierlösung verdünnt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Die Membran wurde für 5 Minuten mehrmalig mit TBS-T gewaschen. Durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden die immunologisch markierten Proteine detektiert. Dazu wurde die Membran fünf Minuten bei Raumtemperatur mit Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) inkubiert, wobei das daraus entstandene Chemilumineszenzsignal mittels Luminescent Image Analyzer und der Software MultiGauge-Ver3.X (Fujifilm) analysiert oder auf Röntgenfilmen detektiert wurde.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von Hautfibroblasten

Die primären Hautfibroblasten wurden in DMEM (low glucose), das mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin supplementiert war, bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen etwa 3 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C bis zur Loslösung vom Kulturflaschenboden behandelt. Die gelösten Zellen wurden in serumhaltigem DMEM-Medium aufgenommen, durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und

bei 500 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und das Zellsediment in entsprechendem Volumen resuspendiert und auf die gewünschte Anzahl an Kulturflaschen aufgeteilt.

2.5.2 Gefrierkonservierung

Für die Kryokonservierung wurde das Sediment in 1ml Einfriermedium (70 % (v/v) DMEM, 10 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) FBS) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen zu je 1 ml überführt. Der Zusatz von DMSO dient den Zellen beim Einfriervorgang als Schutz gegen Eiskristalle. Die Kryoröhrchen wurden 24 Stunden bei -80°C in einem Styroporbehälter gelagert und zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff oder in eine -150°C Gefriertruhe (Sanyo) beführt.

2.5.3 Zellzahlbestimmung

Alle Zellzahlbestimmungen in einer Zellsuspension wurden mittels einer mit einem Deckglas verschlossenen Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die gezählte Zellzahl in einem 16 Gruppenquadrat umfassenden Großquadrat entsprach $x \text{ mal } 10^4$ Zellen pro ml.

2.5.4 Transiente Transfektion

Eukaryontische Zellen sind in der Lage, unverpackte exogene DNS aufzunehmen und zu exprimieren. Die Expression transfizierter DNS kann nur bis zu 72 Stunden nach der Transfektion nachgewiesen werden, da die Zellen die exogene DNS wieder abbauen. Versuche dieser Art werden daher als transiente Transfektion bezeichnet.

Die Transfektion von eukaryontischen Zellen erfolgte mittels Effectene Transfection Reagent Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Das Prinzip der Transfektion beruht auf der Kondensation der zu transfizierenden DNS mit Hilfe eines Verstärkers (*enhancer*) und definierten Pufferbedingungen (EC-Puffer). Das zugefügte Effectene-Reagenz (nicht-lipomales Lipid) assoziiert mit der kondensierten DNS. Es formt auf diese Weise spontan Mizellen gleicher Größe und Struktur, was zu einer besonders hohen und reproduzierbaren Transfektionseffizienz führen soll. Die mit DNS beladenen Phospholipidpartikel verschmelzen mit der Zellmembran und setzen die DNS ins Zellinnere frei. Von dort aus gelangt die DNS in den Zellkern, wo sie transkribiert wird. Anschließend erfolgt, ausgehend von der transkribierten RNS, eine Proteinexpression. Die Zellen wurden in 12-Loch-Platten transfiziert. Dazu wurden am Vortag

für 12-Loch-Platten 4×10^4 Zellen pro Loch ausgesät und die 12-Loch-Platten zuvor mit Deckgläschen bestückt. Um eine optimale Transfektionseffizienz der Zellen zu erzielen, sollten die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % gewachsen sein.

Als Reporter für den peroxisomalen Proteinimport wurden pro Konstrukt 0,3 µg der folgenden Plasmide eingesetzt:

pcDNA3-NmycPECI (Geisbrecht et al. 1999)

pcDNA3-NmycCatalase (Liu et al. 1999)

pBER 81 = pcDNA3-*PEX1* (Reuber et al. 1997).

Jedes Plasmid wurde mit 72 µl EC-Puffer versetzt, gut gemischt und anschließend je 2,4 µl des Verstärkers (*enhancer*) dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 2,4 µl Effectene-Reagenz bei 4°C hinzugefügt, der Ansatz gut durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den 12-Loch-Platten entfernt und die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend 800 µl Medium in jedes Well gegeben. Nach der 10-minütigen Inkubation wurde in jedes Reagenz 400 µl Medium hinzugegeben und nach dem Mischen in das entsprechende Loch pipettiert. Dann wurden die Zellen für 6 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend das Medium gewechselt. Zwei Tage später wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die 12-Loch-Platten zweimal mit PBS gewaschen, 30 Minuten lichtgeschützt mit 3 % Paraformaldehyd inkubiert und danach wieder zweimal mit PBS gewaschen.

2.5.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd 4 % wurden die Zellen gefärbt. Dazu wurden sie zunächst mit PBS und Triton-X-100 für 4 Minuten permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen eines Deckgläschens für 20 bis 30 Minuten mit dem in 50 µl PBS-Lösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Ein Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-IgG-Antikörper (anti-myc mono) wurde im Verhältnis 1:500, und ein weiterer Primärantikörper, ein Kaninchen-IgG-Antikörper (anti-PEX14) wurde im Verhältnis 1:1000 eingesetzt. Die Deckgläser wurden danach fünfmal mit PBS gewaschen, um nicht-gebundene Primärantikörper zu entfernen. Die mit entsprechendem Fluoreszenz-Farbstoff markierten Sekundärantikörper anti-TR rabbit (1:200) und anti-488 mouse (1:2000) wurden ebenso 20 bis 30 Minuten licht-

geschützt mit den Deckgläschen inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit PBS für fünf Minuten auf der Wippe gewaschen und auf einem Objektträger in ca. 8 μ l ProLong-Gold (Invitrogen) eingebettet. Fluoreszenz-Signale wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M.1 in Kombination mit einer CCD-Digitalkamera (Axio Cam HRm) und der Axio Vision LE4.5 Software von Zeiss analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 5'-Polymorphismen bei *PEX1*-defizienten Patienten

In einer australischen Kohorte von *PEX1*-defizienten Patienten wurden zwei neue 5'-UTR-Polymorphismen, eine Transition an Position c.-137 T>C und eine Transversion an Position c.-53 C>G, detektiert (Maxwell et al. 2005). In dieser Arbeit wurde die genomische DNS (gDNS) in der *PEX1*-5'-Region von 30 PBD-Patienten mit bekannten Mutationen im *PEX1*-Gen auf diese beiden Polymorphismen untersucht. Die Überprüfung dieser Polymorphismen sollte Aufschluss über deren Häufigkeit, über die Verteilung der Allele sowie über deren Bezug zu Mutationen im *PEX1*-Gen geben. Schließlich war geplant einen möglichen Einfluss der 5'-Polymorphismen auf die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu untersuchen.

Tabelle 3 stellt die Mutationen der 30 *PEX1*-defizienten Patienten sowie die 5'-Polymorphismen an Position c.-137 T>C und Position c.-53 C>G dar. Die *PEX1*-Mutationen in dieser Kohorte setzten sich aus Deletionen (11 von 60 Allelen), Insertionen (11 von 60 Allelen), einer Duplikation (ein Allel von 60 Allelen) sowie *missense*-Mutationen (31 von 60 Allelen) und *nonsense*-Mutationen (3 von 60 Allelen) zusammen. Die Substitution c.2528 G>A im Exon 15 (22 von 60 Allelen) und die Insertion c.2097_2098insT im Exon 13 (10 von 60 Allelen) waren am häufigsten, was sich mit Literaturdaten deckt. Bei drei der Patienten (ZS 8, ZS 14, ZS 26) konnte zunächst nur ein pathologisches Allel identifiziert werden.

Bezüglich der 5'-Polymorphismen war die wildtypische Sequenz an beiden Positionen (c.-137 TT und c.-53 CC) mit 43 % (13 von 30 Patienten) am häufigsten vertreten. Heterozygote Träger an beiden Positionen (c.-137 TC und c.-53 CG) gab es insgesamt zu 37 % (11 von 30 Patienten). Der 5'-Polymorphismus an Position c.-137 im heterozygoten Zustand mit Wildtyp-Sequenz an Position c.-53 (c.-137 TC und c.-53 CC) trat bei 10 % (3 von 30 Patienten) auf. Weitere 10 % der Patienten zeigten einen homozygoten Zustand an beiden Positionen (c.-137 CC und c.-53 GG). Wie oben beschrieben, traten diese 5'-Polymorphismen folglich in vier verschiedenen Konstellationen auf (Wildtyp-Sequenz an beiden Positionen, heterozygot oder homozygot für beide 5'-Polymorphismen, heterozygot für den Polymorphismus an Position c.-137 mit Wildtyp-Sequenz an Position c.-53).

Patient	Mutation	AS	Ex	Sta	Mutation	AS	Ex	Sta	c.-137 T>C	c.-53 C>G
ZS1	c.2226+2T>C	r.2072_2416del p.Ala691_Lys806 delinsGlu	Intron 13	hom					TT	CC
ZS2	c.274G>C	p.Val92Leu	3	hom					TT	CC
ZS3	c.2083_2085del	p.695del Met	13	hom					TT	CC
ZS4	c.3691_3694del	p.Gln1231fs	23	hom					TT	CC
ZS5	c.2383C>T	p.Arg795X	14	het	c.2584-2A>G	p.Val530ArgfsX34	Intron 15	het	TT	CC
ZS6	c.3038G>A	p.Arg1013His	20	het	c.3287C>G	p.Ser1096X	21	het	TT	CC
ZS7	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	c.274-1G>C	r.274_357del p.Val92_Leu119del	Intron 2	het	TT	CC
ZS8	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	2.Mutation?				TT	CC
ZS9	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TT	CC
ZS10	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TT	CC
ZS11	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TT	CC
ZS12	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TT	CC
ZS13	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TT	CC
ZS14	c.724G>A	p.Val242Ile	5	het	2.Mutation?				TC	CG
ZS15	c.94_96del	p.Pro32del	1	het	c.2981T>C	p.Leu994Pro	19	het	TC	CG
ZS16	c.911_912del	p.Ser304fsX2	5	het	c.2387T>C	p.Leu796Pro	14	het	TC	CG
ZS17	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TC	CG
ZS18	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	hom					TC	CG
ZS19	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	het	c.1952_1960dup	p.W653_M654ins TVW	12	het	TC	CG
ZS20	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	het	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	TC	CG
ZS21	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	het	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	TC	CG
ZS22	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	het	c.3037C>G	p.Arg1013G	20	het	TC	CG
ZS23	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	het	c.3124A>C	F 1042V		het	TC	CG
ZS24	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	het	c.2916delA	p.Gly973AlafsX16	18	het	TC	CG
ZS25	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	c.1439delT	p.Leu480TrpfsX2	7	het	TC	CC
ZS26	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	2. Mutation?				TC	CC
ZS27	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	c.2614C>T	p.Arg872X	16	het	TC	CC
ZS28	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	hom					CC	GG
ZS29	c.2097_2098insT	p.Ile700fs	13	hom					CC	GG
ZS30	c.2528G>A	p.Gly843Asp	15	het	c.249insT	p.Leu84SerfsX24	2	het	CC	GG

AS: Aminosäure, Sta: Status, Ex: Exon, het: heterozygot, hom: homozygot

Tabelle 3: Mutationen und 5'-Polymorphismen im *PEX1*-Gen von 30 PBD-Patienten.

Die Mutationen werden als Nukleotidveränderungen auf cDNS-Ebene (Mutation) sowie als Aminosäureveränderung auf Protein-Ebene (AS) dargestellt. Bei compound-heterozygoten Patienten werden beide Mutationen angegeben. Besonders häufig trugen die Patienten die Mutationen c.2528 G>A und c.2097_2098insT. Bei drei Patienten (ZS 8, ZS 14 und ZS 26) war das zweite krankheitsverursachende Allel zunächst unbekannt. Die 5'-Polymorphismen werden in den letzten beiden Spalten dargestellt und traten in vier verschiedenen Konstellationen auf: Wildtypsequenz an beiden Positionen (c.-137 TT/c.-53 CC), heterozygot (c.-137 TC/c.-53 CG) oder homozygot (c.-137 CC/c.-53 GG) für beide 5'-Polymorphismen, heterozygot für den 5'-Polymorphismus an Position c.-137 mit Wildtyp-Sequenz an Position c.-53 (c.-137 TC/c.-53 CC).

Die Verteilung der 5'-Polymorphismen ist in Bezug auf die zwei häufigsten Mutationen, die Insertion c.2097_2098insT (Tabelle 4) und die Substitution c.2528

G>A (Tabelle 5), dargestellt.

Es zeigte sich, dass kein Patient mit wildtypischer Sequenz an beiden Positionen (c.-137 TT und c.-53 CC) die Insertion c.2097_2098insT trug. Von elf an beiden Polymorphismen-Positionen heterozygoten Patienten (c.-137 TC und c.-53 CG), waren sechs heterozygot für die Insertion c.2097_2098insT. Die restlichen fünf Patienten trugen diese Insertion nicht. Die drei Patienten mit dem alleinigen heterozygoten Polymorphismus an Position c.-137 (c.-137 TC und c.-53 CC) wiesen ebenfalls keine Insertion c.2097_2098insT auf. Zwei von den drei für beide Polymorphismen homozygote Patienten (c.-137 CC und c.-53 GG) trugen die Insertion c.2097_2098insT im homozygoten Zustand. Es ergibt sich also, dass die Patienten mit heterozygoter Insertion c.2097_2098insT heterozygot an beiden 5'-Polymorphismen-Positionen waren bzw. die Patienten mit homozygoter Insertion c.2097_2098insT an beiden 5'-Polymorphismen-Positionen homozygot waren. Eine Korrelation zwischen der Insertion und den beiden 5'-Polymorphismen ist ersichtlich (Tabelle 4).

Anzahl der Patienten	c.-137 T>C Polym.	c.-53 C>G Polym.	c.2097_2098insT
13	TT	CC	--
5	TC ↓	CG ↑	--
6	TC ↓	CG ↑	het.
3	TC ↓	CC	--
1	CC ↓ ↓	GG ↑ ↑	--
2	CC ↓ ↓	GG ↑ ↑	hom.

het: heterozygot, hom: homozygot

↓ : *PEX1*-Promoteraktivität vermindert, ↓↓ : *PEX1*-Promoteraktivität stark vermindert

↑ : *PEX1*-Promoteraktivität erhöht, ↑↑ : *PEX1*-Promoteraktivität stark erhöht

Tabelle 4: Verteilung der 5'-Polymorphismen in Bezug auf die Insertion c.2097_2098insT.

Die Tabelle zeigt 30 PBD-Patienten bezüglich ihres Genotyps im Bereich der 5'-Polymorphismen c.-137 und c.-53, sowie deren Bezug zur Mutation c.2097_2098insT. 13 Patienten mit Wildtypsequenz an beiden Positionen (c.-137 TT/c.-53 CC) trugen keine Insertion. Bei elf Patienten mit beiden heterozygoten 5'-Polymorphismen (c.-137 TC/c.-53 CG) wiesen sechs davon die heterozygote Insertion auf. Drei Patienten mit heterozygotem 5'-Polymorphismus an Position c.-137 und Wildtyp-Sequenz an Position c.-53 (c.-137 TC/c.-53 CC) trugen keine Insertion. Bei drei Patienten mit beiden homozygoten 5'-Polymorphismen (c.-137 CC/c.-53 GG) trugen zwei davon die Insertion c.2097_2098insT im homozygoten Zustand. In einer Luciferase-Untersuchung zeigten Maxwell et al. (2005) den Effekt dieser beiden 5'-Polymorphismen auf die *PEX1*-Genexpression. Sie stellten fest, dass der c.-137 T>C-Polymorphismus, verglichen mit der Wildtypsequenz, die *PEX1*-Genexpression um etwa die Hälfte reduzierte, während der c.-53 C>G-Polymorphismus die *PEX1*-Genexpression um annähernd 25 % erhöhte. Traten beide 5'-Polymorphismen gleichzeitig auf, war kein signifikanter Unterschied zu der *PEX1*-Genexpression der Wildtyp-Sequenz zu erkennen. Bei der Angabe der Promoteraktivität mithilfe der Pfeile (↓/↑, ↓↓/↑↑) handelte es sich um eine Vorhersage gemäß der Untersuchungen von Maxwell et al. (2005).

Die Verteilung der 13 Patienten mit Wildtyp-Sequenz an beiden Positionen (c.-137 TT und c.-53 CC) bzw. der 11 Patienten mit den beiden heterozygoten 5'-Polymorphismen (c.-137 TC und c.-53 CG) war in Bezug auf die Mutation G843D

recht gleichmäßig (Tabelle 5). Sechs der Patienten mit Wildtyp-Sequenz an beiden Positionen (c.-137 TT und c.-53 CC) trugen keine G843D-Mutation, zwei waren G843D-heterozygot und fünf Patienten G843D-homozygot. Von den heterozygoten 5'-Polymorphismen-Trägern an beiden Positionen (c.-137 TC und c.-53 CG) hatten sieben Patienten keine G843D-Mutation, zwei waren heterozygote G843D-Träger und zwei weitere homozygot für G843D. Alle drei Patienten, die nur heterozygot für den Polymorphismus an Position c.-137 waren (c.-137 TC und c.-53 CC), trugen die Mutation G843D im heterozygoten Zustand. Ein für beide 5'-Polymorphismen homozygoter Patient (c.-137 CC und c.-53 GG), war ein heterozygoter G843D-Träger. Im Gegensatz zu der Insertion c.2097_2098insT, ist bei der Mutation G843D keine Korrelation zu den 5'-Polymorphismen zu erkennen (Tabelle 5).

Anzahl der Patienten	c.-137 T>C Polym.	c.-53 C>G Polym.	G843D
6	TT	CC	–
2	TT	CC	het
5	TT	CC	hom
7	TC ↓	CG ↑	–
2	TC ↓	CG ↑	het
2	TC ↓	CG ↑	hom
0	TC ↓	CC	–
3	TC ↓	CC	het
0	TC ↓	CC	hom
2	CC ↓ ↓	GG ↑ ↑	–
1	CC ↓ ↓	GG ↑ ↑	het
0	CC ↓ ↓	GG ↑ ↑	hom

het: heterozygot, hom: homozygot

↓ : *PEX1*-Promoteraktivität vermindert, ↓↓ : *PEX1*-Promoteraktivität stark vermindert

↑ : *PEX1*-Promoteraktivität erhöht, ↑↑ : *PEX1*-Promoteraktivität stark erhöht

Tabelle 5: Verteilung der 5'-Polymorphismen in Bezug auf die Mutation G843D.

Die Tabelle zeigt 30 PBD-Patienten bezüglich ihres Genotyps im Bereich der 5'-Polymorphismen c.-137 und c.-53, sowie deren Bezug zur Mutation G843D. Die Verteilung der 13 Patienten mit Wildtypsequenz für beide 5'-Polymorphismen (c.137 TT/c.-53 CC) bzw. der elf Patienten mit heterozygotem Zustand an beiden Positionen (c.-137 TC/c.-53 CG) war in Bezug auf die Mutation G843D recht gleichmäßig. Alle drei Patienten mit alleinigem heterozygoten 5'-Polymorphismus an Position c.-137 (c.-137 TC/c.-53 CC) trugen die Mutation G843D im heterozygoten Zustand. Von drei Patienten mit homozygotem 5'-Polymorphismus an beiden Positionen (c.-137 CC/c.-53 GG) trug nur einer die Mutation G843D im heterozygoten Zustand. Es ist keine Korrelation der 5'-Polymorphismen zu der Mutation G843D zu erkennen. In einer Luciferase-Untersuchung zeigten Maxwell et al. (2005) den Effekt dieser beiden 5'-Polymorphismen auf die *PEX1*-Genexpression. Sie stellten fest, dass der c.-137 T>C-Polymorphismus, verglichen mit der Wildtypsequenz, die *PEX1*-Genexpression um etwa die Hälfte reduzierte, während der c.-53 C>G-Polymorphismus die *PEX1*-Genexpression um annähernd 25 % erhöhte. Traten beide 5'-Polymorphismen gleichzeitig auf, war kein signifikanter Unterschied zu der *PEX1*-Genexpression der Wildtyp-Sequenz zu erkennen. Bei der Angabe der Promoteraktivität mithilfe der Pfeile (↓/↑, ↓↓/↑↑) handelte es sich um eine Vorhersage gemäß der Untersuchungen von Maxwell et al. (2005).

Hervorzuheben sind besonders die drei Patienten, bei denen das zweite krankheits-

verursachende Allel noch unbekannt blieb. Bei einem Blick auf deren Polymorphismenverteilung ließ sich erkennen, dass Patient ZS 14 heterozygot für beide 5'-Polymorphismen war (c.-137 TC und c.-53 CG). Patient ZS 8 wies die Wildtyp-Sequenz an beiden Positionen auf (c.-137 TT und c.-53 CC), während Patient ZS 26 nur den Polymorphismus an Position c.-137 mit wildtypischer Sequenz an Position c.-53 trug (c.-137 TC und c.-53 CC).

3.2 Darstellung von PEX1-Protein durch Western Blotting

Zur Untersuchung des Effekts der *PEX1*-Mutationen und eines möglichen Einflusses der 5'-Polymorphismen auf die *PEX1*-Proteinmenge wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Es wurde jeweils 20 µg Proteinextrakt aus kultivierten Hautfibroblasten von 17 *PEX1*-defizienten Patienten und zwei gesunden Probanden miteinander verglichen (Abbildung 1). Ein relativer Vergleich der Patienten untereinander war durch die Mitbeurteilung des Tubulin-Signals, das als Kontrolle für gleichmäßiges Laden der Proben verwendet wurde, möglich (Molekülmasse ca. 45 kDa). Das *PEX1*-Gen kodiert für ein Peroxin mit einer Molekülmasse von 147 kDa, welches sich in beiden Kontrollen in etwa gleicher Menge darstellte. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den Patienten mit *PEX1*-Mutationen kein oder ein sehr geringes Signal. Es wurden die fünf bekannten G843D-homozygoten Patienten (ZS 13, ZS 18, ZS 11, ZS 12, ZS 10) nebeneinander aufgetragen. Vier dieser Patienten trugen die Wildtyp-Sequenz an beiden Positionen (c.-137 TT und c.-53 CC) und ein Patient (ZS 18) trug beide 5'-Polymorphismen im heterozygoten Zustand (c.-137 TC und c.-53 CG). Bei Patient ZS 18 und ZS 11 ließ sich, wie auch in noch geringerem Maße bei Patient ZS 12, eine gerade noch nachweisbare Restmenge *PEX1*-Protein erkennen. Die Patienten ZS 1, ZS 15 und ZS 21 wiesen trotz unterschiedlicher *PEX1*-Mutationen und 5'-Polymorphismen eine ähnlich geringe Restmenge *PEX1*-Protein auf. Bei den beiden G843D-heterozygoten Patienten mit ungeklärter zweiter Mutation stellte sich bei Patient ZS 8 (c.-137 TT und c.-53 CC) im Vergleich zu Patient ZS 26 mit alleinigem heterozygotem 5'-Polymorphismus an Position c.-137 (c.-137 TC und c.-53 CC) geringfügig mehr Restmenge des *PEX1*-Proteins dar. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass alle *PEX1*-defizienten Patienten im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich verringerte oder nicht mehr nachweisbare *PEX1*-Proteinmenge hatten. Aufgrund der insgesamt sehr schwachen Signalstärke bei allen *PEX1*-defizienten Patienten lassen sich nur sehr beschränkt Aussagen über die geringen Unterschiede an

der Proteinmenge innerhalb dieser Patientengruppe treffen.

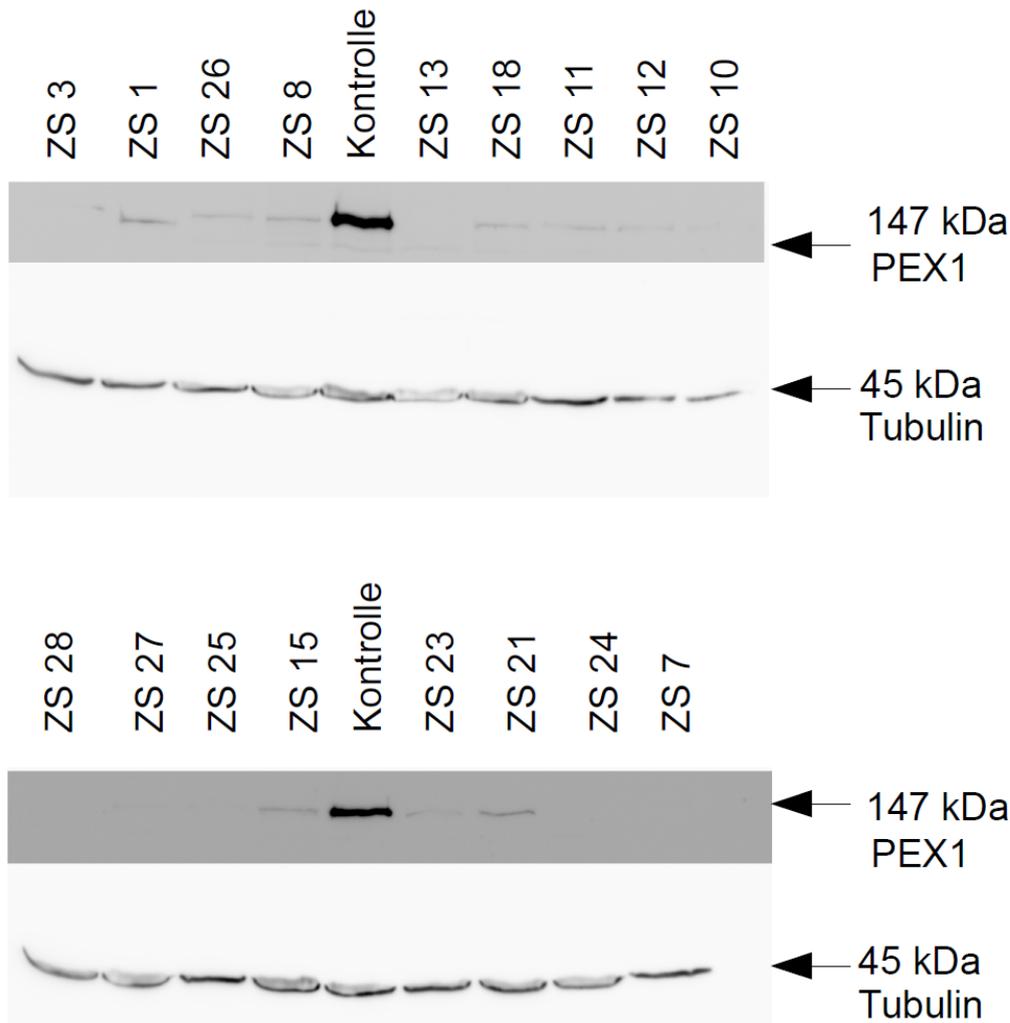


Abbildung 1: PEX1-Proteinmenge im Western Blot.

Für die Analyse des PEX1-Proteins im Western Blot wurde jeweils 20 µg Proteinextrakt aus kultivierten Hautfibroblasten von 17 *PEX1*-defizienten Patienten und zwei Kontrollen eingesetzt. Als Ladekontrolle diente das Tubulin mit einer Molekülmasse von 45 kDa. Das PEX1-Protein hat eine Molekülmasse von 147 kDa. Das Signal für das PEX1-Protein ist bei den zwei gesunden Kontrollen deutlich zu erkennen. Bei sämtlichen PBD-Patienten mit *PEX1*-Defizienz stellte sich kein oder ein sehr geringes Signal dar. Es zeigten sich auch keine verkürzten Fragmente.

3.3 Genetische Untersuchung von zwei ZS-Patienten mit unbekannter zweiter Mutation

3.3.1 Klinischer Phänotyp der Patienten

Die Anamnese und klinische Präsentation von zwei männlichen Patienten (ZS 8 und ZS 26) mit nur einer nachgewiesenen *PEX1*-Mutation wird im Folgenden näher beschrieben.

Patient ZS 8 wurde im April 2002 mit der für das Zellweger-Spektrum typischen

kraniofazialen Dysmorphie geboren. Er wies eine flache, hohe Stirn, einen tiefen und breiten Nasenrücken, Hypertelorismus, Epikanthus, eine Ohrmuscheldysplasie, Mikrognathie und einen hohen Gaumen auf. Weitere klinische Auffälligkeiten bei Geburt, die für das Zellweger-Spektrum weniger typisch sind, waren beidseitige Fußfehlstellungen im Sinne eines Pes equinovarus, ein Kryptorchismus und ein persistierender Ductus arteriosus. Cerebrale Krampfanfälle, eine schwere Muskelhypotonie, Ge-deihstörungen und Trinkschwäche traten bei diesem Jungen ebenfalls früh auf. Im Alter von vier Jahren bestand eine schwere Entwicklungsretardierung. Aufgrund von Schluckstörungen war seine Nahrungsaufnahme problematisch. Das Kind lag stets mit Größe und Gewicht deutlich unter dem 3. Perzentil. Aktives Sitzen konnte aufgrund der ausgeprägten Muskelhypotonie im Rumpfbereich und im proximalen Extremitätenbereich nicht erreicht werden. Aufrechtes Gehen war aufgrund der Fußfehlstellung nicht möglich. Der Patient erhielt regelmäßig Physiotherapie. Zudem machte sich in den Hörtests früh eine hochgradige Innenohrschwerhörigkeit bemerkbar. Bei Sehtests stellte sich heraus, dass der Patient unter einer starken Sehbeeinträchtigung aufgrund einer Optikusatrophie litt. Bei der ursächlichen biochemischen Abklärung zeigten sich erhöhte Werte von VLCFAs und erhöhte Phytansäurewerte. Es bestand der Verdacht auf eine peroxisomale Stoffwechselerkrankung. Gendiagnostisch konnte in der Sequenzierung der gDNS des Patienten ZS 8 eine G843D- heterozygote Mutation nachgewiesen werden. In der Sequenzierung der cDNS fiel auf, dass der Ausschlag an Position c.2528 das Wildtyp-Signal fast nicht abbildete. Eine zweite Mutation konnte trotz vollständiger Sequenzierung der kodierenden Bereiche und angrenzenden Intronbereiche der gDNS nicht identifiziert werden. Therapeutische Schritte wie Sehfrühförderung, Hörgeräteversorgung, Operation der Fußfehlstellung mit anschließender Physiotherapie wurden eingeleitet. Der weitere Verlauf des Patienten nach dem fünften Lebensjahr ist unbekannt.

Der männliche Patient ZS 26 kam im September 1994 in der 38. Schwangerschaftswoche mit peripartaler Asphyxie zur Welt. Er hatte ein Geburtsgewicht von 2150 g, eine Körperlänge von 45 cm und einen Kopfumfang von 33,5 cm. Der Patient hatte einen APGAR-Wert von 4/6/8, der Nabelschnur-pH-Wert betrug 7,3. Es fielen die folgenden Dysmorphiezeichen auf: Prominente Stirn, hoher, spitzer Gaumen, weite Fontanelle, Mikrophthalmie, Kryptorchismus, hypoplastische Zähne mit Gingivahyperplasie, eine überreitende vierte Zehe beidseits und eine Vierfingerfurche. Der Patient litt in den ersten Lebenswochen unter Atemstörungen und einer auffälligen

Trinkschwäche. Im Alter von vier Wochen fiel den Eltern ein zunehmendes Augenrollen und schrilles Schreien auf. Das Kind zeigte kaum Entwicklungsfortschritte. Ab dem dritten Lebensmonat wurde das Kind zunehmend durch Trink- und Gedeihstörungen, Leberfunktions-, Seh- und Hörstörungen und reduzierten Muskeltonus auffällig. Im Alter von acht Monaten erkrankte der Junge an einem hochfieberhaftem Infekt aufgrund einer viralen Meningitis. In Folge zeigte er Entwicklungsrückschritte, Hochziehen am Finger und Sitzen gingen wieder verloren. Gewicht, Länge und Kopfumfang waren bei Geburt und im 8. Lebensmonat unter dem 3. Perzentil. Neurologische Auffälligkeiten bestanden in ständiger psychomotorischer Unruhe mit Eigenstimulation und einer generalisierten Muskelhypotonie. Das Kind lauterte im Alter von zwei Jahren, zeigte aber keine Sprachentwicklung. Bei Verdacht auf eine peroxisomale Stoffwechselerkrankung folgte die Bestimmung ZSS-typischer, biochemischer Marker (VLCFA, Phytansäure/Pristansäure und Gallensäurevorstufen im Plasma). Die biochemischen Untersuchungen ergaben ein pathologisches Profil der VLCFA im Plasma des Patienten ZS 26. Die Hexacosansäure C26:0 mit einer Plasmakonzentration von 3,69 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0.45-1.32 $\mu\text{mol/l}$), die Ratio C24:0/C22:0 mit einem Wert von 1.45 (Referenz: 0.57-0.92) und die Ratio C26:0/C22:0 mit einem Wert von 0.21 (Referenz: <0.01-0.02) waren bei Patient ZS 26 deutlich erhöht. Sowohl im Plasma als auch in den Erythrozyten zeigte sich eine erheblich verminderte Konzentration der Docosahexaensäure (C22:6). Die Konzentrationen der Phytansäure mit 27.6 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0-9 $\mu\text{mol/l}$) und der Pristansäure mit 6 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0-2 $\mu\text{mol/l}$) waren im Plasma pathologisch erhöht. Die erhöhten Konzentrationen der Gallensäure-Zwischenprodukte THCA (Trihydroxycholestanoinsäure) mit 30 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0-0.1 $\mu\text{mol/l}$) und DHCA (Dihydroxycholestanoinsäure) mit 25 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0-0.1 $\mu\text{mol/l}$) wiesen auf eine Störung der Gallensäuresynthese hin. Ferner zeigten sich erhöhte Konzentrationen der Gallensäure mit 86,1 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0-6 $\mu\text{mol/l}$), und es lagen erhöhte Plasmakonzentrationen der Chenodeoxycholsäure mit 30 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0,7-10 $\mu\text{mol/l}$) und der Cholsäure mit 9 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0,1-4,7 $\mu\text{mol/l}$) vor. Normalerweise sind die Konzentrationen der primären Gallensäuren bei Zellweger-Patienten eher niedrig. Bei dem Patienten waren diese wahrscheinlich aufgrund einer gestörten Leberfunktion bzw. Gallensäureausscheidung erhöht. Die Plasmakonzentrationen der Phytansäure mit 27,6 $\mu\text{mol/l}$ (Referenz: 0-9 $\mu\text{mol/l}$) und der Pristansäure mit 6 $\mu\text{mol/l}$ (0-2 $\mu\text{mol/l}$)

waren erhöht. Im Labor fanden sich Zeichen einer Leberfunktionsstörung. Die Transaminasen waren deutlich erhöht mit einer AST von 236 U/l (bis 38 U/l) und ALT von 99 U/l (bis 41 U/l). Die Cholesterolverwerte von 57 mg/dl (140-240 mg/dl), Triglyceride von 45 mg/dl (50-250 mg/dl), LDL-Wert von 31 mg/dl (80-180 mg/dl) und HDL-Wert von 17 mg/dl (>35 mg/dl) lagen unterhalb des alters- und geschlechtsbezogenen Referenzintervalls.

Die Röntgenaufnahmen der Hand ergaben eine deutliche verzögerte Knochenkernentwicklung und Osteoporose. Eine exokrine Pankreasinsuffizienz mit Malabsorption und daraus folgender Rachitis und Vitamin-K-Mangel wurden festgestellt. Die Magnetresonanztomographie des Schädels war unauffällig. In der Sonographie des Abdomens war eine Hepatosplenomegalie zu erkennen. Okulär wurden pathologische visuell evozierte Potentiale, eine Retinopathie und eine Bulbusfehlstellung diagnostiziert. Ferner ließ sich links eine hochgradige Schwerhörigkeit und rechts eine an Taubheit grenzende Schwerhörigkeit feststellen. Gendiagnostisch konnte in der Sequenzierung der gDNS des Patienten ZS 26 eine heterozygote G843D-Mutation festgestellt werden. In der Sequenzierung der cDNS erschien, wie oben bei Patient ZS 8 beschrieben, ein weitgehend homozygoten Signal für die Mutante an Position c.2528. Auch bei diesem Patienten konnte zunächst keine zweite Mutation identifiziert werden. Im Alter von 2 Jahren wurde ein Therapieversuch mit DHA-angereichertem Nahrungsgranulat eingeleitet. Der durch die erhöhten Gallensäurewerte vermehrte Juckreiz wurde mit Ursodeoxycholsäure (Dosierung von 10mg/kg) behandelt. Im Rahmen einer Toxikose bei massiver Gastroenteritis verstarb der Junge im Alter von 2 ½ Jahren.

3.3.2 Untersuchung der Komplementierung des PBD mit *PEX1*

Bei einer Komplementierungsstudie wird eine wildtypische Kopie eines mutmaßlich inaktiven Gens in die betroffene Zelle eingebracht. Dies führt zur Wiederherstellung des gesunden Phänotyps, sofern der Defekt der Zelle ausgeglichen wird, also tatsächlich das richtige Gen eingebracht wurde. Entsprechend wurde für die beiden hier beschriebenen Patienten (ZS 26, ZS 8) untersucht, ob sich der Peroxisomenbiogenesedefekt durch Transfektion eines Expressionsplasmids für *PEX1* korrigieren ließ. Dies war notwendig, um auszuschließen, dass bei diesen Patienten ursächliche, homozygote Mutationen in einem anderen *PEX*-Gen der PBD zugrunde liegen. Die meisten Matrixproteine werden über die peroxisomale Ziel-Sequenz (PTS1), ein C-

terminales Tripeptid mit der Sequenz Serin-Lysin-Leucin-COOH (-SKL), oder über eine konservierte Variante, in das Peroxisom dirigiert. Die neu synthetisierten Proteine mit der PTS1-Signal-Sequenz binden PEX5, den PTS1-Rezeptor, der zwischen dem Zytoplasma und der Oberfläche des Peroxisoms zirkuliert (Dodt und Gould 1996). Im Fall von humaner Katalase, einem peroxisomalen Matrixprotein, besteht das PTS1 aus dem abgewandelten Carboxy-terminalen Tetrapeptid -KANL. Dieses vermittelt weniger effizient als das besser konservierte Tripeptid -SKL an anderen peroxisomalen Matrixenzymen den Transport von Katalase in das Peroxisom. Die Beurteilung des Imports von Katalase im Rahmen von Komplementierungsstudien erlaubt daher eine sensitive Untersuchung des Importvorgangs.

Fibroblasten der Patienten ZS 26 und ZS 8 wurden mit Expressionsplasmiden für das *PEX1*-Gen bzw. mit dem leeren Expressionsvektor ohne Insert (pcDNA3) transfiziert. Um die funktionellen Auswirkungen untersuchen zu können, wurden die Zellen mit den Plasmiden für PEX1 (pcDNA3-NmycPEX1 (Geisbrecht et al. 1999) und Katalase (pcDNA3-NmycCatalase (Liu et al. 1999) und pcDNA3-*PEX1* (Reuber et al. 1997)) transfiziert und anschließend mit einem gegen die myc-Epitopsequenz gerichteten Primärantikörper und einem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert. PEX1 kodiert für ein Enzym, der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase von Peroxisomen (Geisbrecht et al. 1999) und hat die Peroxisomen-Importsequenz -SKL. Die überexprimierten Proteine wurden bei intakter Peroxisomenbiogenese analog zu wildtypischer Katalase und PEX1 in die Peroxisomen importiert und zeigten dann in der Immunfluoreszenzmikroskopie grüne punktförmige, zytosolische Fluoreszenzmuster. Bei intaktem peroxisomalen Import ist das grüne Fluoreszenzsignal mit dem peroxisomalen Markerprotein PEX14 kolokalisiert, welches in den Experimenten durch rote Immunfluoreszenz dargestellt wurde. Bei Transfektion von Patientenfibroblasten mit dem Kontrollvektor pcDNA3 zeigte sich ein homogenes grünes Fluoreszenzsignal aus dem Zytoplasma der Zelle (Abbildung 2 und 3, A und C). Diese Beobachtung passt zu einem fehlenden Import von Katalase bzw. PEX1 in das Peroxisom. Eine Transfektion mit dem *PEX1*-kodierenden Expressionsplasmid führte in den Zellen beider Patienten durch die überwiegend intraperoxisomal gelegene Katalase bzw. PEX1 zu einem punktförmigen Muster in der Zelle (Abbildung 2 und 3, B und D). Dieselben Strukturen wurden durch einen Antikörper gegen das peroxisomale Membranprotein PEX14 detektiert, welcher durch einen rot fluoreszierenden

Sekundärantikörper visualisiert wurde. Diese Kolo­kalisierung spricht dafür, dass es sich bei den punktförmigen Strukturen um Peroxisomen handelt, in welche bei Kotransfektion von wildtypischem *PEX1* die grün markierten Reporterproteine importiert werden. Der intakte Import von peroxisomalen Proteinen wurde somit durch zwei Reporterproteine demon­striert. Transfektion mit *PEX1* erscheint ausreichend, um die Fibroblasten von ZS 26 und ZS 8 zu komplementieren und damit den wildtypischen Phänotyp wieder herzustellen.

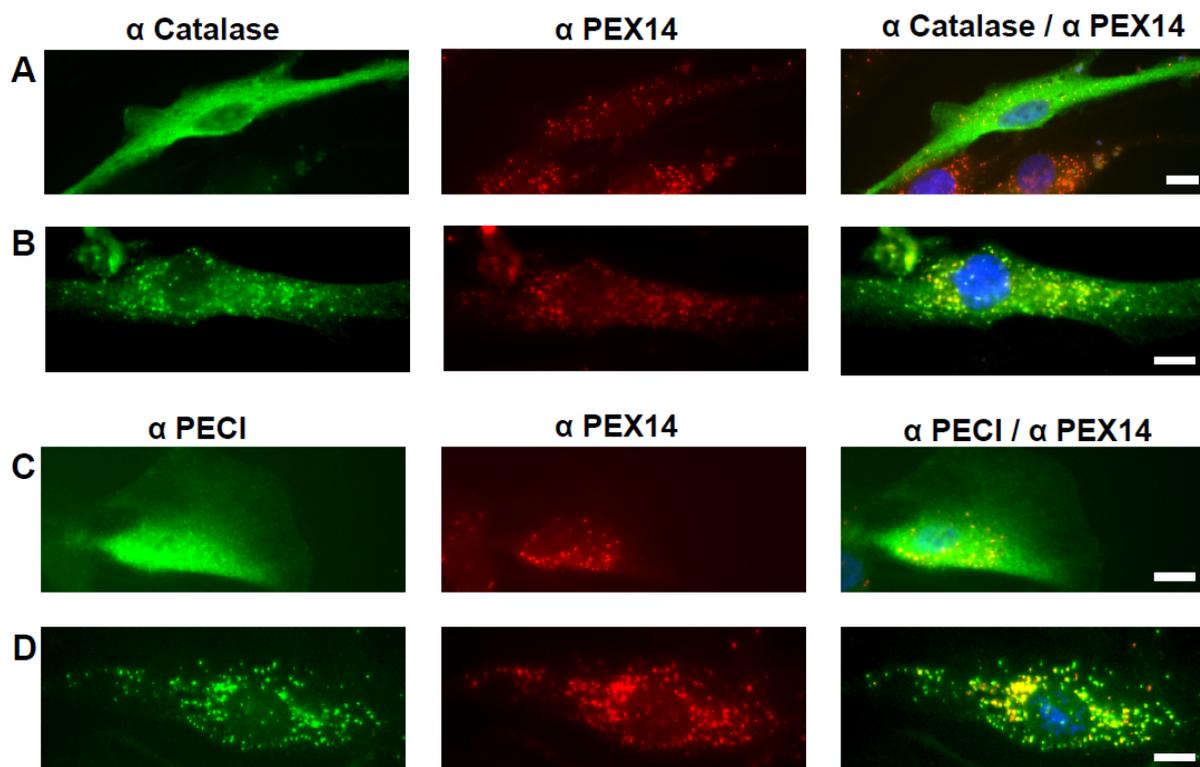


Abbildung 2: Komplementierung des Imports peroxisomaler Enzyme mit *PEX1*-cDNS bei Patient ZS 26.

Fibroblasten von Patient ZS 26 wurden mit Katalase-Expressionsplasmiden (pcDNA3-NmycCatalase, A und B) bzw. mit PEX1-Expressionsplasmiden (pcDNA3-NmycPEX1, C und D) transfiziert. Ein *PEX1*-Expressionsplasmid wurde kotransfiziert (pcDNA3-*PEX1*, B und D). Als Kontrolle wurde das gleiche Plasmid ohne Insert kotransfiziert (pcDNA3, A und C). Zur Proteindetektion wurde indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Bei Transfektion von Katalase oder PEX1 zusammen mit dem leeren Expressionsplasmid zeigt sich eine diffuse Anfärbung des gesamten Zytoplasmas (A und C). Bei Kotransfektion mit *PEX1*-cDNS konzentrieren sich beide Proteine auf punktförmige Strukturen im Zytoplasma (B und D). Diese Strukturen sind kongruent mit dem roten Fluoreszenzsignal von PEX14, ein peroxisomales Membranprotein (zweite Spalte), sodass eine Kolo­kalisierung vermutet werden kann (dritte Spalte, B und D). Der Import von Katalase bzw. PEX1 konnte bei Patient ZS 26 wieder hergestellt werden. Grün: Überexprimierte Katalase bzw. PEX1, Rot: Peroxisomales Membranprotein PEX14, Blau: DAPI-Zellkernfärbung, Weißer Balken: Größenmaßstab 10 µm.

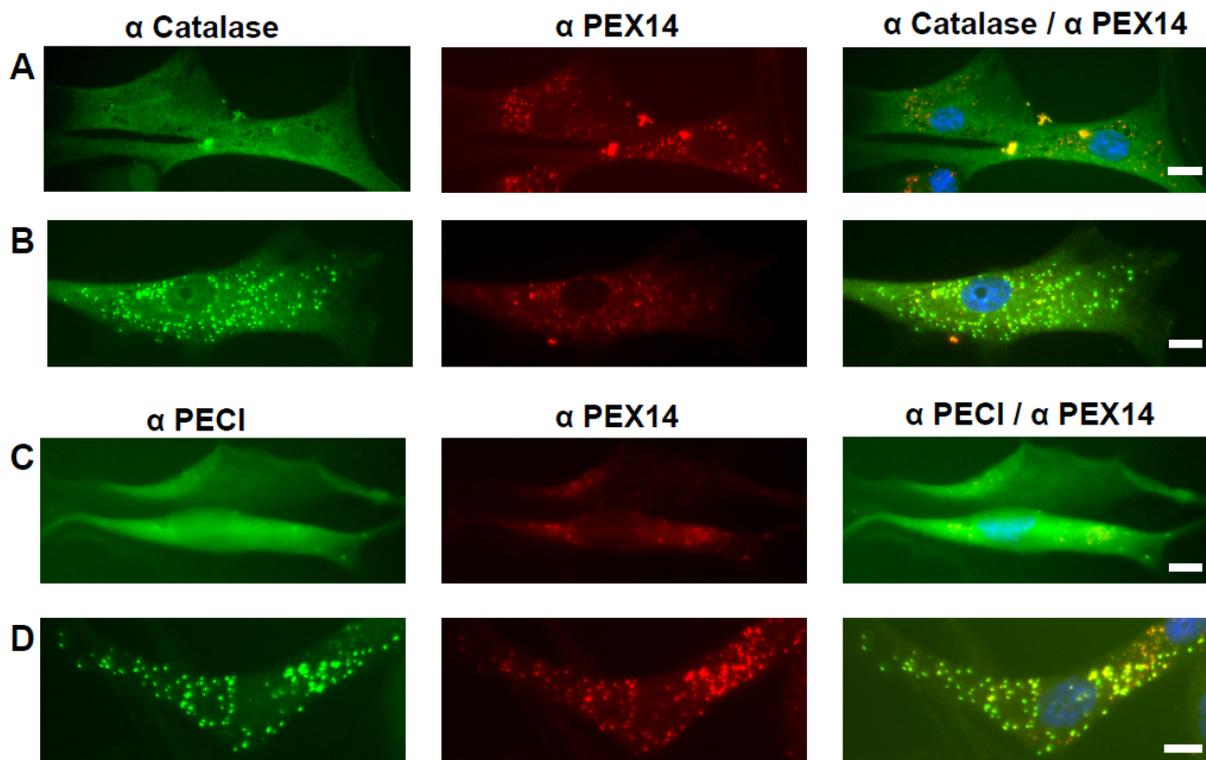


Abbildung 3: Komplementierung des Imports peroxisomaler Enzyme mit *PEX1*-cDNS bei Patient ZS 8.

Fibroblasten des Patienten ZS 8 wurden analog zu Patient ZS 26 (Abbildung 2) behandelt. Überexprimierte Katalase (A und B) und PECl (C und D) zeigten nur bei Kotransfektion von *PEX1* (B und D) deckungsgleiche Proteinverteilungsmuster mit dem peroxisomalen Marker PEX14. Offenbar funktioniert der peroxisomale Import dieser beiden Proteine auch hier nur in Anwesenheit von überexprimiertem PEX1, was auf eine Funktionsstörung des endogenen PEX1 schließen lässt. Grün: Überexprimierte Katalase bzw. PECl, Rot: Peroxisomales Membranprotein PEX14, Blau: DAPI-Zellkernfärbung, Weißer Balken: Größenmaßstab, 10 µm.

3.3.3 Polymorphismenkonstellation bei G843D-heterozygoten Patienten

Die Patienten ZS 8 und ZS 26 tragen die Mutation G843D-heterozygot. Die zweite Mutation war bei beiden Patienten unbekannt. Für Patient ZS 8 konnte jeweils die Wildtypsequenz an Position c.-137 und c.-53 festgestellt werden (c.-137 TT und c.-53 CC). Diese Konstellation hat laut Maxwell et al. (2005) keine Auswirkung auf die *PEX1*-Genexpression. Bei Patient ZS 26 wurde ein heterozygoter 5'-Polymorphismus an Position c.-137 mit Wildtypsequenz an Position c.-53 gefunden (c.-137 TC und c.-53 CC). Hier sollte überprüft werden, ob sich der heterozygote Polymorphismus an Position c.-137 in trans-Stellung zu der Mutation G843D befindet. Dieser könnte dann, zumindest theoretisch, zusammen mit der Mutation G843D krankheitsverursachend sein. Dazu sollte zunächst geklärt werden, in welcher allelischen Stellung sich die Mutation zu dem Polymorphismus c.-137 tatsächlich befindet. Hierzu wurde die Verteilung der 5'-Polymorphismen und der Mutation G843D bei beiden Elternteilen analysiert (Tabelle 6). Die Mutter des Patienten trägt die Mutation G843D

heterozygot. Der 5'-Polymorphismus an Position c.-137 liegt bei dem Vater im homozygotem Zustand vor. Die Mutter von Patient ZS 26 trägt an dieser Position die Wildtyp-Sequenz. Der Patient ZS 26 hat jeweils eine Veränderung von dem Vater bzw. der Mutter geerbt. Die Mutation G843D liegt in trans-Stellung zu dem Polymorphismus an Position c.-137 (Tabelle 6). Dies bedeutet, dass der 5'-Polymorphismus in trans-Stellung zu der Mutation G843D möglicherweise einen negativen Einfluss auf die *PEX1*-Genexpression des zweiten Allels haben könnte.

<u>Genvariante:</u>	<u>Polymorphismus:</u>		<u>Mutation:</u>	<u>Deletion:</u>	
		c.-137 T>C	c.-53 C>G	G843D	Exon 10,11,12
Vater	Allel 1:	C	C	Wildtyp	Deletion
	Allel 2:	C	C	Wildtyp	Wildtyp
Mutter	Allel 1:	T	C	Wildtyp	Wildtyp
	Allel 2:	T	C	G843D	Wildtyp
Kind ZS 26	Allel 1:	C	C	Wildtyp	Deletion
	Allel 2:	T	C	G843D	Wildtyp

Tabelle 6: Allelische Verteilung der 5'-Polymorphismen, Mutation G843D und Deletion bei Patient ZS 26.

Die Untersuchung der Eltern des Patienten ZS 26 ergab, dass der 5'-Polymorphismus an Position c.-137 und die Deletion vom Vater (Reihe 1) und die Mutation G843D von der Mutter vererbt wurde (Reihe 2). Daraus folgt, dass beim Patienten ZS 26 der 5'-Polymorphismus an Position c.-137 und die Deletion in trans-Stellung zu der Mutation G843D liegen (Reihe 3). Die Analyse der Eltern war informativ, da beide homozygot für verschiedene Ausprägungen des 5'-Polymorphismus an Position c.-137 sind.

3.3.4 Allelspezifische PCR für cDNS und gDNS

Die Analyse der Sequenzierungen der gDNS und cDNS der Patienten ZS 26 und ZS 8 zeigten Unterschiede in der Sequenz an der Position c.2528. Im Elektropherogramm der gDNS beider Patienten erschien die Mutation G843D im heterozygoten Zustand (Abbildung 4-A), während im Elektropherogramm der cDNS der Ausschlag an Position c.2528 das Wildtyp-Signal fast nicht abbildete (Abbildung 4-B). Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse mit gDNS und cDNS stellte sich die Frage, ob das Wildtypallel der cDNS in diesem Bereich bei Patient ZS 26 und ZS 8 möglicherweise deutlich unterrepräsentiert war.

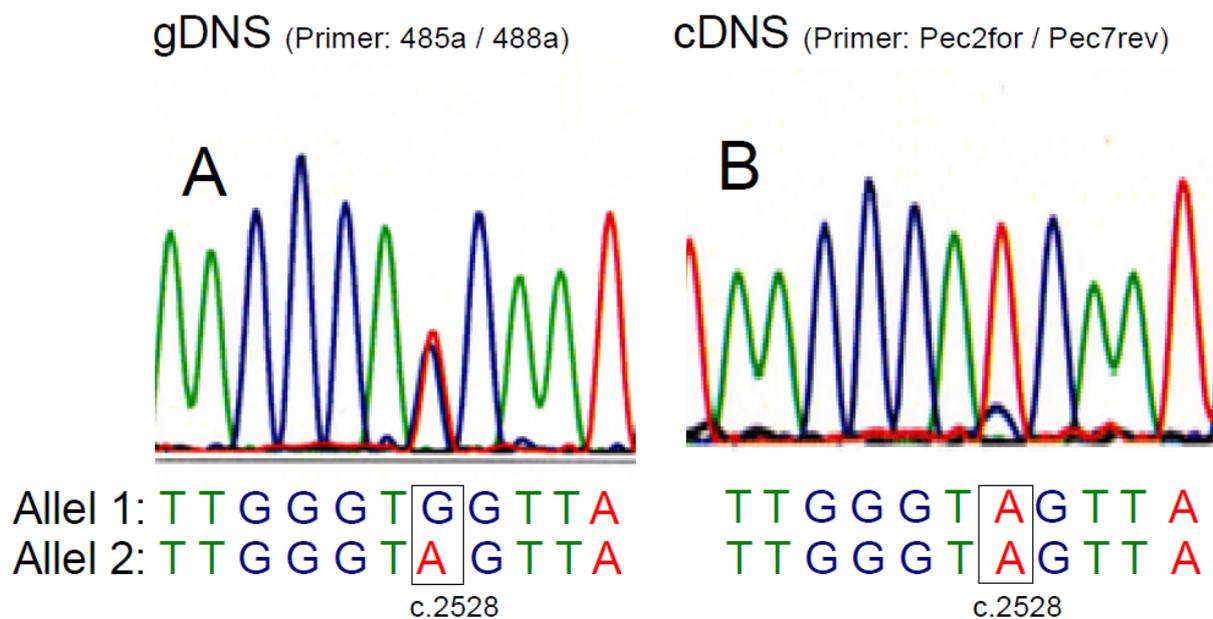


Abbildung 4: Sequenzierungen der gDNS und cDNS von Patient ZS 26 mit Darstellung der Mutation G843D (c.2528 G>A).

Gezeigt wird das Elektropherogramm, sowie darunter die abgeleitete gDNS-Sequenz bzw. cDNS-Sequenz des Patienten ZS 26. Position c.2528 ist durch eine Umrandung gekennzeichnet. In der Sequenzierung der gDNS war ein heterozygoten Signal an Position c.2528 zu erkennen (A), während in der Sequenzierung der cDNS ein weitgehend homozygoten Signal an Position c.2528 erschien (B).

Da die unterschiedlichen Signale in den Elektropherogrammen jedoch nicht quantitativ gedeutet werden können, wurde eine allelspezifische PCR durchgeführt, mit der geklärt werden sollte, ob die mRNA des Wildtypallels in diesem Bereich vorhanden ist und mithilfe einer PCR darstellbar ist.

Wenn das 3'-Ende eines Primers aufgrund einer Punktmutation nicht an den Einzelstrang binden kann (*mismatch*), so wird die Amplifikation inhibiert, da die Taq-Polymerase nur an einem hybridisierten 3'-OH-Ende verlängern kann (Lottspeich 2009). Für die allelspezifische PCR wurde dieser Umstand ausgenutzt. Es wurden zwei unterschiedliche Sinn-Primer konstruiert. Ein Primer entsprach am 3'-Ende der Wildtyp-Sequenz G843G, ein weiterer Primer entsprach am 3'-Ende der Mutante G843D (Tabelle 10). Die Amplifikation der zu untersuchenden DNS fand in zwei getrennten PCR-Gefäßen (Wildtyp-Primer bzw. Mutanten-Primer) und jeweils für gDNS und cDNS statt. Je nach Signalergebnis konnte festgestellt werden, ob die Mutante, der Wildtyp oder beide an Position c.2528 vorlagen. Nach Optimierung der allelspezifischen PCR zeigte sich nur ein spezifisches Signal bei Anwendung der gDNS/cDNS einer Wildtypkontrolle mit Wildtyp-Primer (Abbildung 5, Spur-1) bzw. bei Anwendung der gDNS/cDNS des G843D-homozygoten Patienten ZS 11 mit Mutanten-Primer (Abbildung 5, Spur-4). Bei Einsatz der gDNS der Patienten ZS 8 und ZS 26 trat so-

wohl mit Wildtyp-Primer als auch mit Mutanten-Primer ein in etwa gleichstarkes Signal auf. Das Signalverhalten sprach für einen heterozygoten Zustand, der sich auch bei den beiden G843D-heterozygoten Patienten ZS 27 und ZS 25 bestätigte. Bei dem Ein-satz der cDNS ergab sich ein unterschiedliches Ergebnis für die Patienten ZS 8 und ZS 26. Bei Patient ZS 8 bestätigte sich der Verdacht aus dem Elektropherogramm nicht. Ein gleichstarkes Signal bei Anwendung der cDNS mit Wildtyp- bzw. Mutanten-Primer war erkennbar. Bei der cDNS des Patienten ZS 26 hingegen zeigte sich ein starkes Signal mit dem Mutanten-Primer, ein Signal mit dem Wildtyp-Primer war nur sehr schwach nachzuweisen. Wie schon in den Elektropherogrammen angedeutet, lag auch in der allelspezifischen PCR ein eindeutiger Unterschied in der Menge von Wildtyp- und Mutantenallel bei der cDNS des Patienten ZS 26 vor. Die unterschiedliche Signalstärke der allelspezifischen PCR-Produkte der gDNS/cDNS des Patienten ZS 26 spiegelte wider, dass das Wildtypallel, welches nicht die Mutation G843D trug, scheinbar nur noch zu einem sehr geringen Anteil vorhanden war.

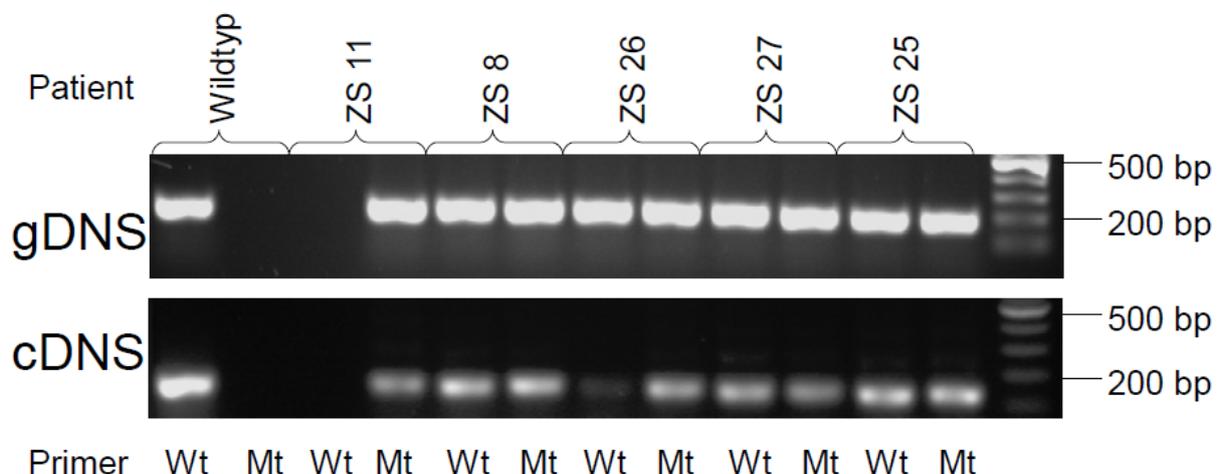


Abbildung 5: Allelspezifische PCR von gDNS und cDNS zur Charakterisierung des Genotyps im Bereich der Mutation G843D.

Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Produkten für gDNS (oben) und cDNS (unten) unter Verwendung von Primern, die spezifisch die Wildtypsequenz (Wt) oder die Mutantensequenz (Mt) der PCR nachweisen (siehe Methode 2.3.5.2). Bei einem Probanden (Wildtyp) ohne Mutation G843D (ganz links) zeigt sich eine Amplifikation mit Wildtyp-Primer, aber nicht mit Mutanten-Primer. Patient ZS 11 ist homozygot für G843D, entsprechend zeigt sich lediglich ein PCR-Signal bei Verwendung des Mutanten-Primers. Bei der cDNS des Patienten ZS 26 fiel das Signal mit dem Mutanten-Primer deutlich stärker aus, als das Signal mit dem Wildtyp-Primer. Alle weiteren G843D heterozygoten Patienten (ZS 8, ZS 27, ZS 25) hatten sowohl mit gDNS als auch mit cDNS ein gleichstarkes Signal bei Einsatz des Wildtyp-Primers bzw. Mutanten-Primers.

3.3.5 Deletionssuche mit *long-range*-PCR

Bei den Patienten, bei denen nicht eine zweite *compound*-heterozygote *PEX1*-Mutation gefunden wurde, wurde nach größeren Deletionen im zweiten Allel gesucht. Deletionen können bei der Amplifikation und Sequenzierung einzelner Exons entgehen, weil sich je nach Position und Größe der Deletion nur das nicht-deletierte Allel amplifizieren und sequenzieren lässt, wenn einer oder beide der Primer im Deletionsbereich bindet. Nachdem sich bei dem Patienten ZS 26 im Elektropherogramm der cDNS und in der allelspezifischen PCR gezeigt hatte, dass sich das Wildtypallel in dem Bereich der Position c.2528 nur sehr schwach nachweisen ließ, war insbesondere hier eine Deletionssuche naheliegend. Bezüglich einer größeren Deletion des zweiten Allels waren ferner die Patienten ZS 8 und ZS 14 mit bisher unbekannter zweiter Mutation interessant. Zur Untersuchung des Patienten ZS 14 fehlte eine ausreichende Menge gDNS. Mithilfe einer *long-range*-PCR sollten größere Sequenzverluste auf einem Allel detektiert werden.

Verschiedene Primerkombinationen ermöglichten eine Amplifikation größerer Sequenzabschnitte der gDNS. Es ließen sich bis zu 18,4 kilobasengroße Produkte amplifizieren, die mehrere Exons und Introns beinhalteten. Die Größe der Produkte und die Positionen der Primer wurden so gewählt, dass diese über das vollständige *PEX1*-Gen einschließlich der 5'- und 3'- Regionen Auskunft geben konnten. Die Abbildung 6 stellt das aus 24 Exons bestehende *PEX1*-Gen dar. Unter dem *PEX1*-Gen sind die Amplikons mit der Primerbezeichnung in Linien dargestellt. Größere Deletionen in einem amplifizierten Sequenzabschnitt würden sich durch eine Doppelbande in der Agarosegelelektrophorese darstellen. Anhand dieser Methode wurde die gDNS der Patienten ZS 8 und ZS 26 untersucht.

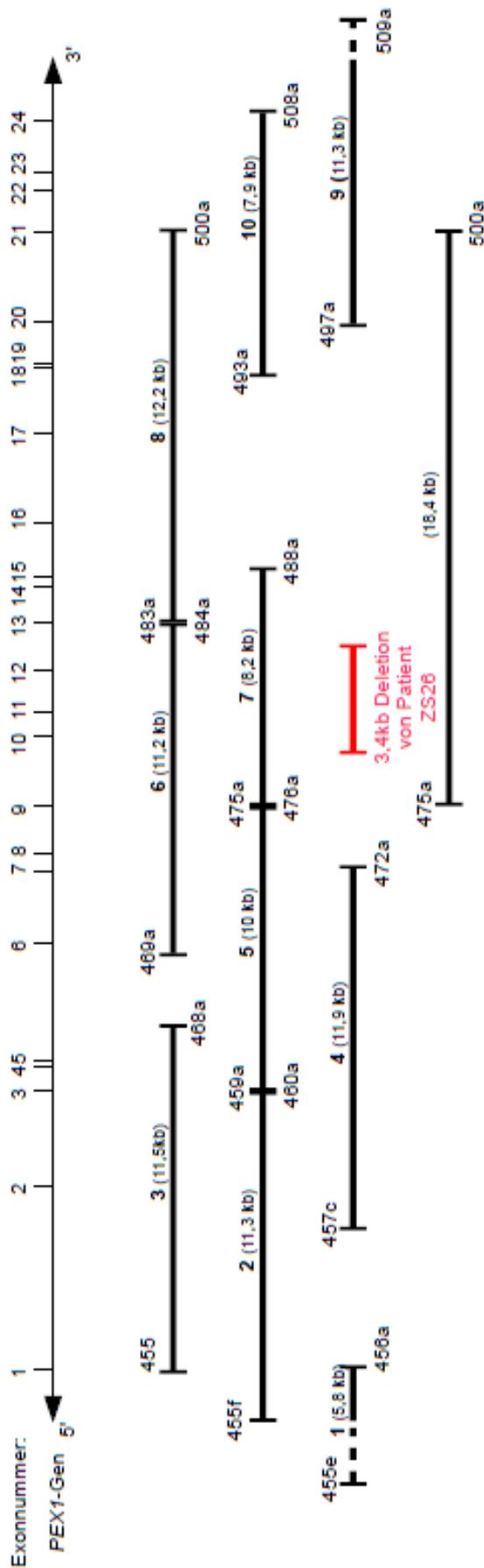


Abbildung 6: Schematische Darstellung des PEX1-Gens und der Position der PCR-Produkte, die für die Deletionsuntersuchung verwendet wurden.

Auf der Suche nach einer größeren Deletion in der gDNS der Patienten ZS 26 und ZS 8 wurde eine *long-range-PCR* durchgeführt. In der obersten Reihe ist das PEX1-Gen mit 24 Exons, den Introns sowie der 5'-und 3'-Region dargestellt. Unter dem PEX1-Gen sind die Amplikons mit der Primerbezeichnung (Sinn-Primer oben, Gegensinn-Primer unten) in Linien dargestellt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie mehrere Exons und Introns überspannten, um eine mögliche Deletion in einem dieser Fragmente zu detektieren. Es wurden Fragmente mit einer Produktgröße von bis zu 18,4 kb amplifiziert. Die Zahlen über den jeweiligen amplifizierten Fragmenten entsprechen den Produkten in den Spuren 1-10 in Bild A und B aus Abbildung 7 mit der jeweiligen Produktgröße in kb. Das größte Amplifikationsprodukt mit 18,4 kb ist nicht in der Gelelektrophorese dargestellt. In der gelelektrophoretischen Auftrennung dieser Produkte konnte eine größere Deletion anhand einer Doppelbande detektiert werden. In rot eingezeichnet ist die 3,4 kb große Deletion von Patient ZS 26, die zwischen den Primerpaaren 475a und 484a gefunden wurde und sich jeweils mit zwei verschiedenen Primerpaaren (Amplikon 6: 469a und 484a / Amplikon 7: 475a und 488a) als Doppelbande in der gelelektrophoretischen Auftrennung der *long-range-PCR* darstellte (Abbildung 7 B, Spur 6 und 7). Bei dem Patienten ZS 8 konnte mithilfe dieser Deletionsuche keine Deletion festgestellt werden.

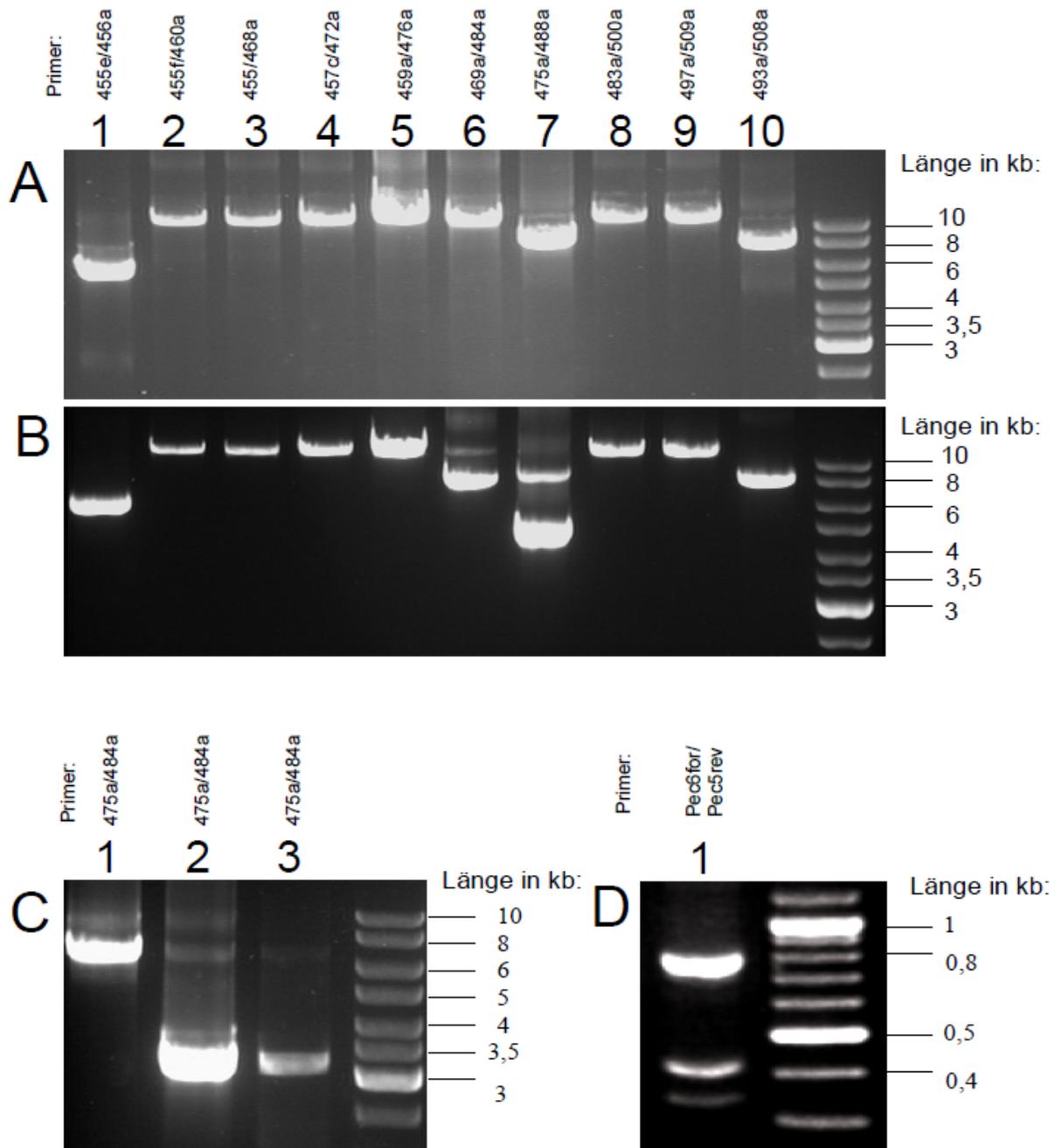


Abbildung 7: Deletionsuntersuchung mittels *long-range*-PCR (Patient ZS 8 und ZS 26).

Die Auftrennung von PCR-Produkten der gDNS des Patienten ZS 8 (A), der gDNS des Patienten ZS 26 (B), der gDNS der Eltern des Patienten ZS 26 (C) und der cDNS des Patienten ZS 26 (D) ist auf Agarosegelen dargestellt. Über jeder Spur ist die jeweilige verwendete Primer-Kombination angegeben. In der jeweils letzten Spur jedes Agarosebildes ist der DNS-Längenstandard in kb angegeben. Bei Patient ZS 8 ergab sich keine Doppelbande (A). Bei Einsatz der gDNS des Patienten ZS 26 stellte sich eine Doppelbande in Spur 6 und Spur 7 (B) dar. Diese Doppelbande zeigt eine Deletion von 3,4 kb an. Bild C zeigt eine *long-range*-PCR mit der gDNS der Eltern des Patienten ZS 26 (Spur 1=Mutter, Spur 2 =Vater, Spur 3=Kind ZS 26). Die verwendeten Primer 475a und 484a schließen die Deletion ein. Bei Vater (Spur 2) und Kind ZS 26 (Spur 3) ist das deletierte Allelfragment (3,3 kb) zusätzlich zu dem Wildtyp-Fragment (6,7 kb) zu erkennen. Der Vater ist also ebenfalls heterozygot für diese Deletion. Bei der Mutter (Spur 1) ist nur das PCR-Produkt der Wildtypsequenz amplifizierbar. Bei Einsatz der cDNS des Patienten ZS 26 zeigte sich eine Deletion von 400 bp (D).

In der PCR von Patient ZS 8 (Abbildung 7-A) zeigte sich keine Auffälligkeit. Im

Agarosegel war keine Doppelbande zu sehen und die Größe der Signale stimmte mit den jeweiligen erwarteten Produktgrößen überein. Der Einsatz von Kontroll-DNS bestätigte die erwartete Größe der Fragmente.

Bei Patient ZS 26 trat mit den Primern 475a und 488a eine Doppelbande im Gel auf (Abbildung 7-B, Spur-7). Das obere Signal lag bei 8,2 kb und entsprach der Größe des erwarteten Produktes. Das untere Signal war 4,8 kb groß (Differenz von 3,4 kb). Bei Einsatz der Primer 469a und 484a (Abbildung 7-B, Spur-6) ließ sich eine Doppelbande nur schwach erkennen. Das Signal des deletierten Allels (7,8 kb) stellte sich aufgrund der reduzierten Länge und damit bevorzugten Amplifikation stärker als das Signal des Wildtypfragments (11,2 kb) dar. Aus diesem PCR-Ergebnis ließ sich folgern, dass eine Deletion in der gDNS zwischen den Primern 475a und 484a (Größe des Sequenzabschnittes: 6,7 kb) vorliegen konnte. Mithilfe von weiteren PCR-Reaktionen wurde die Deletion weiter eingegrenzt. Fragmente, die weiterhin Doppelbanden im Gel zeigten, wurden mittels Sequenzierung untersucht.

Die Deletion wurde mit den stromaufwärts der Deletion bindenden Primern 475a (Intron 8), 476-1 (Intron 9), 476-2 (Intron 9) und 476-3 (Intron 9) und den stromabwärts der Deletion bindenden Primern 484a (Intron 13), 483-1 (Intron 12), 483-2 (Intron 12) und 483-3 (Intron 12) weiter charakterisiert. Die genaue Beschreibung der Deletion wurde anhand der Sequenzierungsergebnisse getroffen. Das Sequenzierungsergebnis ergab eine Deletion der Exons 10 bis 12. Die Deletion begann exakt an Position 20805 im Intron 9 und endete an Position 24642 im Intron 12. Es handelte sich dabei um einen Basenverlust, der 3838 bp groß war. Zusätzlich fand sich in dem deletierten Bereich die Insertion eines Bereichs aus Intron 16, der 395 bp groß war. Es handelte sich um eine Duplikation/Insertion, da diese Sequenzfolge hinter Exon 16 weiterhin regulär vorlag. Für dieses Ergebnis wurde zusätzlich auf die Primer 519b (Intron 15) und 490a (Intron 16) zurückgegriffen. Der Mutationsname der 3,4 kb großen Deletion lautet: g.20805_24642delins28829_29223 (NCBI Reference Sequence NC_000007.13) (den Dunnen und Antonarakis 2001).

Nachfolgend wurde eine PCR mit der gDNS der Eltern von Patient ZS 26 mit den Primern 475a und 484a durchgeführt. Die Deletion wurde von dem Vater des Patienten vererbt (Abbildung 7-C, Spur-2). Das deletierte Allel des Vaters zeigte ein starkes Signal mit der gleichen Fragmentgröße des deletierten Allels des Patienten ZS 26 (Abbildung 7-C, Spur-3). Die Produktgröße des Wildtypfragments betrug 6,7 kb und des deletierten Allels 3,3 kb, sodass die Differenz eine Deletion mit einer

Größe von 3,4 kb ergab. Bei der Mutter konnte eine Deletion ausgeschlossen werden (Abbildung 7-C, Spur-1). Die Sequenzierung bestätigte, dass Patient ZS 26 die Deletion vom Vater geerbt hat. In der sequenzierten gDNS des Vaters lag die Duplikation/Insertion wie beim Kind vor. Vater und Kind ZS 26 waren folglich beide heterozygote Träger der 3,4 kb großen Deletion. In der allelspezifischen PCR zeigte sich, dass bei Einsatz der cDNS des Patienten ZS 26 dieses Allel mit der Deletion (Wildtypallel) im Gegensatz zu dem Allel mit der Mutation G843D (Mutantenallel) nur sehr schwach nachzuweisen war.

Im Anschluss daran wurde die cDNS in dem Bereich der Deletion von Patient ZS 26 untersucht. Dazu wurden die zwei Primer Pec 6 for und Pec 5 rev für die cDNS-Amplifikation und cDNS-Sequenzierung eingesetzt. Diese Primer amplifizierten einen 830 bp großen Bereich, indem sich die Deletion des Patienten ZS 26 befand. In der Abbildung 7-D, Spur-1 war sowohl das Wildtypfragment mit einer Größe von 830 bp zu erkennen als auch das darunterliegende deletierte Allel mit einer Größe von etwa 430 bp. Das kürzeste sichtbare Fragment entsprach einem unspezifischen Produkt. Die erwartete Deletionsgröße bei Verlust der Exons 10, 11 und 12 in der cDNS betrug 400 bp und entsprach der Differenz der Produktgrößen von Wildtypallel und deletiertem Allel im Gel. Die Mutation g.20805_24642delins28829_29223 (NCBI Reference Sequence NC_000007.13) mit der Bezeichnung c.1671_2071del auf cDNS-Ebene führte zu p.Gly558PhefsX3 (den Dunnen und Antonarakis 2001). Wenn sich das Exon 9 direkt an das Exon 13 anschließt, ergibt sich eine Leserasterverschiebung, die auf Proteinebene zu dem Einbau eines Stoppkodons führt (Abbildung 8). Das verkürzte Protein hätte dann eine Molekülmasse von 61,6 kDa. Allerdings führt hier der Einbau eines vorzeitigen Stoppkodons zu einem *nonsense*-vermittelten mRNS-Abbau (Jacobsen und Peltz 1996).

Da in der gDNS des Patienten ZS 8 keine Deletion gefunden werden konnte, wurde dieser auf cDNS-Ebene genauer untersucht. Dazu wurden, ähnlich wie bei der Deletionsuntersuchung der gDNS, Primer-Paare ausgewählt, die größere Fragmente der cDNS amplifizierten. In der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte wurde auf Doppelbanden geachtet, aber keine für eine Deletion spezifischen Signale gefunden. Die Sequenzierung zeigte eine heterozygote Spleißvariante mit Fehlen von Exon 3, 4 und 5 an. Diese Spleißvariante mit Anschluss von Exon 2 an Exon 6 wurde auch bei weiteren gesunden Kontrollen gefunden und scheint daher physiologisch zu sein (Tabelle 10).

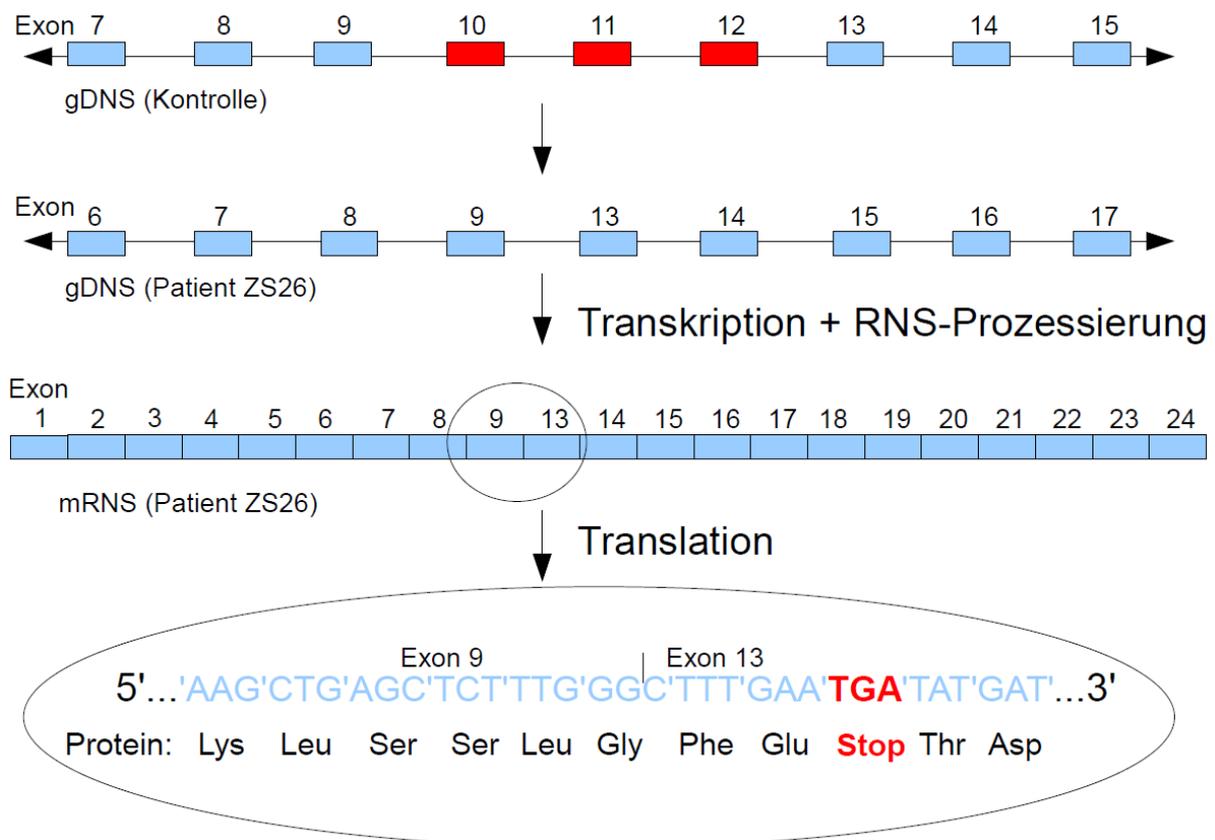


Abbildung 8: Deletion des Patienten ZS 26 und Auswirkung nach Transkription und Translation. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der *PEX1*-gDNS beim Wildtyp (Kontrolle) und bei Patient ZS 26. Die 3,4 kb große Deletion führt zum Verlust von Exon 10, 11 und 12, die auch auf mRNA-Ebene nachweisbar ist. Es kommt in der Folge zu einer Leserasterverschiebung ab Exon 13 mit einem frühzeitigem Stoppkodon drei Kodons stromabwärts. Das verkürzte *PEX1*-Protein hätte dann nur noch eine Molekülmasse von 61,6 kDa, jedoch wird die mRNA größtenteils *nonsense*-vermittelt abgebaut.

3.3.6 Allelspezifische *real-time*-PCR

Da sich die Repräsentation der Wildtyp-mRNA in dem Elektropherogramm und in der allelspezifischen PCR bei Patient ZS 8 unterschiedlich darstellte, sollten mithilfe der allelspezifischen *real-time*-PCR quantitative Angaben über die vorhandene Menge der Wildtyp-mRNA gemacht werden. Über die *real-time*-PCR wurde detektiert, wieviel Wildtyp-mRNA von Patient ZS 8 im Vergleich zu der Wildtypkontrolle, den Patienten ZS 26, ZS 27 (G843D-heterozygot) und Mutant ZS 11 (G843D-homozygot) exprimiert wurde. Außerdem sollte bei Patient ZS 26 untersucht werden, ob und in welchem Umfang die Deletion im Wildtypallel einen Einfluss auf die Menge der Wildtyp-mRNA hat. Mit dem Wildtypallel ist das Allel gemeint, welches nicht die Mutation G843D trägt. Es handelt sich gleichzeitig um jenes Allel, welches die 3,4 kb große Deletion trägt. Durch diese in Exon 10, 11 und 12 vorliegende Deletion scheint

es zu einem *nonsense*-vermittelten mRNA-Abbau vor der Position c.2528 (Exon 15) zu kommen.

Bei Einsatz der cDNS einer Wildtypkontrolle mit Wildtyp-Primer wurde bei einer 1:40 verdünnten cDNS ein CT-Wert von 30 erreicht. Alle Patienten mit der Mutation G843D hatten entsprechend einen CT-Wert größer 30. Das Produkt der Mutanten-cDNS (homozygot) lag mit einem CT-Wert von 34,5 somit 4,5 CT-Werte über dem Wildtyp CT-Wert. Das Produkt von Patient ZS 8 hob sich 1,2 CT-Werte, das von Patient ZS 26 hob sich 2,6 CT-Werte später ab. Ausgehend davon, dass der Wildtyp zu 100 % Wildtyp-mRNA exprimiert, wurden die anderen Patienten mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte vergleichend ausgewertet (Abbildung 9-A). Die homozygot mutante Kontrolle ZS 11 zeigte die unspezifische Amplifikation des Wildtyp-Primers an. Dieser Wert konnte von den Ergebnissen bei ZS 8, ZS 26 und ZS 27 abgezogen werden. Patient ZS 27 (G843D-heterozygot) zeigte 27 % des Wildtypallels, Patient ZS 8 exprimierte 17 % des Wildtypallel und Patient ZS 26 exprimierte nur noch 9 % der Wildtyp-mRNA (Abbildung 9-A). Hierbei handelte es sich um das Allel auf dem die Deletion von Exon 10, 11 und 12 gefunden wurde. Diese führt zu einer *nonsense*-Mutation in Exon 13. Für den Patienten ZS 8 war das Mutationsgeschehen auf diesem Allel weiterhin unbekannt.

Bei Einsatz von cDNS eines homozygoten Mutanten mit Mutanten-Primer ergab sich ein CT-Wert von 30,5. Ausgehend davon, dass die Mutante bei Einsatz des Mutanten-Primers 100 % Mutanten-mRNA exprimiert, wurden die anderen Patienten vergleichend ausgewertet (Abbildung 9-B). Patient ZS 27 exprimierte bis zu 150 % Mutanten-mRNA, Patient ZS 8 exprimierte 120 % und Patient ZS 26 exprimierte 80 % Mutanten-mRNA. Der Mutanten-Primer hat bezogen auf die mutante mRNA 3 % der Wildtyp-cDNS unspezifisch gebunden (Abbildung 9-B).

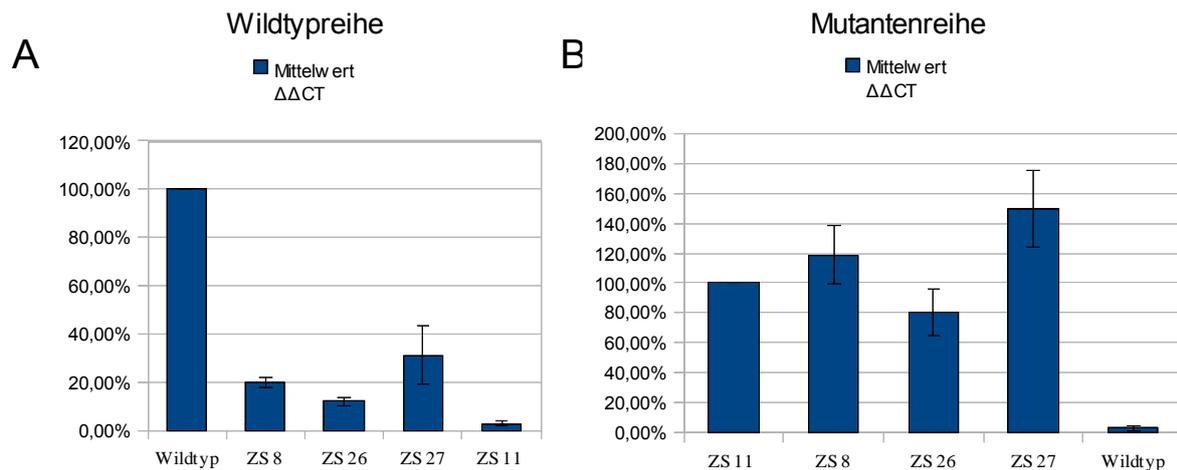


Abbildung 9: Allelspezifische *real-time*-PCR: Vergleich der Expressionsmengen der *PEX1*-cDNS des Wildtyppallels (ohne G843D Mutation) und des Mutantenallels (mit G843D Mutation).

Die relative Expression der Wildtyp-mRNS-Transkripte bzw. Mutanten-mRNS-Transkripte wurde anhand der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet (2.3.5.3). Bild A zeigt die relative Expressionsmenge des Transkriptes der Wildtyp-mRNS. Ausgehend davon, dass der Wildtyp bei Einsatz des Wildtyp-Primers 100 % Wildtyp-mRNS exprimiert, wurden die anderen Patienten vergleichend ausgewertet. Die *PEX1*-defizienten Patienten (ZS 8, ZS 26 und ZS 27) exprimierten deutlich weniger Wildtyp-mRNS als der Wildtyppatient. Bild B zeigt die relative Expressionsmenge des Transkriptes der Mutanten-mRNS. Die G843D-homozygote Mutante ZS 11 wurde bei Verwendung des Mutanten-Primers gleich 100 % gesetzt. Es zeigte sich eine vergleichbare Expressionsmenge der Mutanten-mRNS unter den G843D-tragenden Patienten (ZS 8, ZS 26 und ZS 27).

3.4 Analyse der 5'-Region der *PEX1*-mRNS

Im Rahmen der durchgeführten RT-PCR-Reaktionen fiel im Bereich der 5'-Region auf, dass mit Primern stromaufwärts von Position c.-137 keine Produkte amplifiziert werden konnten. Abbildung 10 stellt die Position der 5'-Polymorphismen in Bezug auf das ATG-Startcodon sowie der Primer zur Amplifikation der 5'-Region dar. Amplifikationen mit Primern stromaufwärts von Position c.-137 (455H, 455K, 455I, 455J) ergaben, im Gegensatz zu solchen mit Primern stromabwärts von Position c.-137 (455C, 455, 455G, 455E, 455F), keine PCR-Produkte. Mit dem am weitesten stromaufwärts bindenden Primer 455F ließ sich ein Genabschnitt bis zu 123 Basenpaare stromaufwärts des Translationsstartpunkts ATG des *PEX1*-Gens amplifizieren (Abbildung 10).

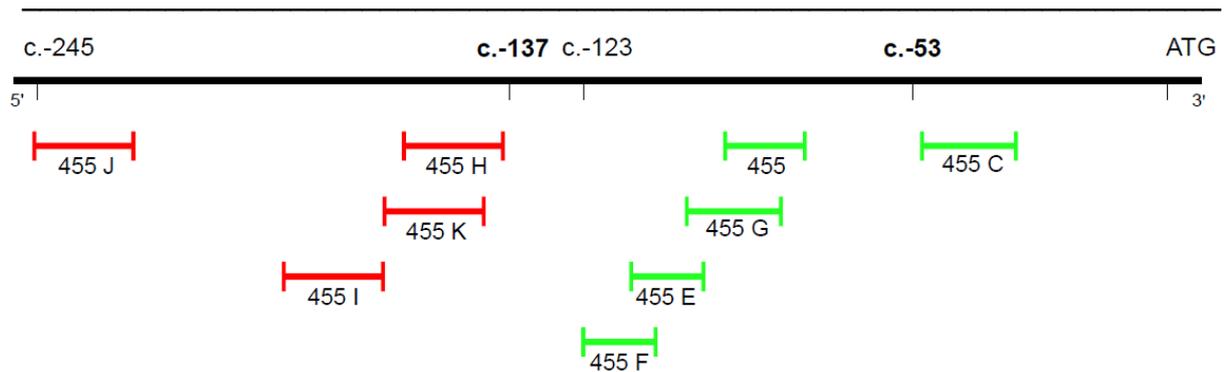


Abbildung 10: PEX1-5'-Region und Position der verwendeten Primerpaare in Bezug zu den 5'-Polymorphismen.

Die Lage der 5'-Polymorphismen in Bezug auf das ATG, sowie die Lage der Primer zur Amplifikation der 5'-Region der cDNS sind dargestellt. Stromabwärts von Position c.-137 können alle Primer an die cDNS binden und erzeugen ein positives Signal in der PCR (grün dargestellt). Stromaufwärts von Position c.-137 binden keine Primer mehr und das PCR-Ergebnis fällt negativ aus (rot dargestellt). Somit ließ sich mithilfe der PCR ein Genabschnitt bis zu 123 bp stromaufwärts vom PEX1-Startcodon ATG amplifizieren.

Dieses Ergebnis führte zu der Fragestellung, an welcher Position die mRNA des PEX1-Gens tatsächlich beginnt. Die annotierte Sequenz aus der NCBI-Gendatenbank (NCBI Reference Sequence: NM_000466.2) gibt an, dass an Position c.-96 des PEX1-Gens die mRNA beginnt. Maxwell et al. (2005) beschreiben, dass es möglich ist, einen mRNA-Abschnitt mit einem Primer zu amplifizieren, der 245 bp 5' vom Translationsstartpunkt ATG bindet. Zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes der PEX1-mRNA wurde ein 5'-RACE-Experiment durchgeführt. Hierzu wurde ein Gegen-sinn-Primer eingesetzt, der mithilfe der Reversen Transkriptase bis zum 5'-Ende der mRNA synthetisiert. Bei dem Ausgangsmaterial für das 5'-RACE-Experiment handelte es sich um aus Fibroblasten gewonnener RNA der Patientin ZS 27. Mit dieser Methode konnten ca. 20-25 Klone mit jeweils unterschiedlichen Ergebnissen detektiert werden. Einige davon zeigten an Position c.-53 den PEX1-Beginn an. Die vorderste 5'-Position, die in einem Klon gefunden wurde, war Position c.-120. Mittels 5'-RACE-PCR konnten keine weiteren Informationen stromaufwärts von Position c.-120 gewonnen werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden drei Themen behandelt:

- 5'-Polymorphismen bei *PEX1*-defizienten Patienten
 - Genetische Untersuchung von zwei G843D-heterozygoten *PEX1*-defizienten Patienten mit unklarer zweiter Mutation
 - Analyse der 5'-*PEX1*-mRNS.
- In einer Luciferase-Untersuchung stellten Maxwell et al. (2005) den Effekt der beiden 5'-Polymorphismen c.-137 T>C und c.-53 C>G auf die *PEX1*-Genexpression dar. Verglichen mit der Wildtyp-Sequenz reduzierte der einzeln vorliegende Polymorphismus c.-137 T>C die *PEX1*-Genexpression um etwa die Hälfte, während der einzeln vorliegende Polymorphismus c.-53 C>G die *PEX1*-Genexpression um annähernd 25 % erhöhte (Maxwell et al. 2005). Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob die beiden 5'-Polymorphismen bei PBD-Patienten einen Einfluss auf die *PEX1*-Genexpression und auf die Schwere des Phänotyps haben. Die in dieser Arbeit beobachteten Konstellationen der 5'-Polymorphismen, deren Häufigkeiten, deren Kosegregation und deren Bezug zu den *PEX1*-Mutationen G843D und c.2097_2098insT werden den Ergebnissen aus der Studie von Maxwell et al. (2005) gegenübergestellt. Die 5'-Polymorphismen-Konstellation (c.-137 TC/c.-53 CC) des G843D-heterozygoten Patienten ZS 26 mit unbekannter zweiter Mutation könnte nach Maxwell et al. (2005) zu einer verminderten *PEX1*-Genexpression führen. Anhand des Patienten ZS 26 wird diskutiert, ob womöglich der 5'-Polymorphismus c.-137 T>C in trans-Stellung zu der Mutation G843D das zweite krankheitsbedingende Allel darstellen könnte oder ob zumindest die *PEX1*-Expression dieses *PEX1*-Allels mit unbekannter Mutation vermindert wird.
- Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Klärung der molekularen Ursache für die Entstehung der Erkrankung bei zwei G843D-heterozygoten PBD-Patienten. Eine zweite pathogene Mutation im *PEX1*-Gen konnte bei den Patienten ZS 26 und ZS 8 nach vollständiger Sequenzierung der kodierenden Bereiche und angrenzenden Intronbereiche der gDNS nicht gefunden werden. In der Sequenzierung der cDNS stellte sich die Mutation G843D im *PEX1*-Gen im homozygoten Zustand dar. Es ging um die Frage, ob das Wildtypallel der cDNS bei beiden Patienten unterrepräsentiert ist und welcher molekulare Mechanismus sich dahinter verbirgt. Mithilfe einer

allelspezifischen PCR und einer *real-time*-PCR konnten bei beiden Patienten weitere Aussagen über die Mengenanteile der Wildtyp-mRNS (ohne G843D Mutation) und Mutanten-mRNS (mit G843D Mutation) getroffen werden. Die Ergebnisse der allelspezifischen *PEX1*-Expression und die möglichen Mutationsmechanismen bei den Patienten ZS 26 und ZS 8 werden näher erörtert. Bei Patient ZS 26 konnte eine zweite pathogene Mutation des *PEX1*-Gens, eine 3,4 kilobasengroße Deletion, mithilfe einer in dieser Arbeit etablierten *long-range*-PCR gefunden werden. Auf dessen Einsatz als diagnostisches Mittel zur Identifizierung einer großen Deletion wird hier näher eingegangen.

– Ein weiterer Teil dieser Arbeit beinhaltete die Untersuchung des Transkriptionstartpunktes der *PEX1*-mRNS. Maxwell et al. (2005) gehen von einer 5'-UTR mit einer Größe von 245 Basenpaare aus. In der NCBI-Gendatenbank wird der Beginn der *PEX1*-mRNS an Position c.-96 beschrieben. In dieser Arbeit konnte mit dem am weitesten stromaufwärts bindenden Primer 455F ein Bereich von c.-123 Basenpaare festgelegt werden. Mit einer 5'-RACE-PCR wurden in der Arbeit Klone detektiert, die an Position c.-120 den *PEX1*-mRNS-Beginn anzeigten. Mit der Kenntnis über den exakten Transkriptionsstartpunkt der *PEX1*-mRNS sollte die Frage geklärt werden, ob einer oder beide 5'-Polymorphismen Teil der Promoterregion oder Teil der 5'-UTR sind.

4.1 5'-Polymorphismen

4.1.1 Häufigkeit und allelische Verteilung

In der vorliegenden Arbeit wurden 30 Patienten der Komplementierungsgruppe 1 auf das Vorhandensein von 5'-Polymorphismen an den Positionen c.-137 T>C und c.-53 C>G, auf deren allelischen Verteilung und auf deren Bezug zu Mutationen im *PEX1*-Gen untersucht. Der Grund für diese Untersuchung basierte auf der Luciferase-Untersuchung von Maxwell et al. (2005), welche zeigte, dass die 5'-Polymorphismen an Position c.-137 und c.-53 einen Effekt auf die *PEX1*-Genexpression haben können. In dieser Untersuchung reduzierte der einzeln vorliegende c.-137 T>C-Polymorphismus, verglichen mit der Wildtypsequenz, die *PEX1*-Genexpression um etwa die Hälfte, während der einzeln vorliegende c.-53 C>G-Polymorphismus die *PEX1*-Genexpression um annähernd 25 % erhöhte (Maxwell et al. 2005). Bei gleichzeitigem

Auftreten dieser beiden 5'-Polymorphismen war kein signifikanter Unterschied zu der *PEX1*-Genexpression der Wildtypsequenz zu erkennen.

Die Sequenzierung der genomischen DNS aller 30 *PEX1*-defizienten Patienten zeigte, dass an den Positionen c.-137 und c.-53 vier verschiedene allelische Konstellationen auftreten können (Tabelle 7). Am häufigsten mit 43 % (13 von 30 Patienten) trat die wildtypische Sequenz an beiden Positionen auf (c.-137 TT und c.-53 CC). Am zweithäufigsten mit 37 % (11 von 30 Patienten) lagen beide 5'-Polymorphismen heterozygot vor (c.-137 TC und c.-53 CG). In der australischen Patientenkohorte von Maxwell et al. (2005) mit insgesamt 25 Patienten waren mit 64 % (16 von 25 Patienten) mehr Patienten an beiden Positionen c.-137 und c.-53 heterozygote Träger als wildtypische Sequenz-Träger mit 32 % (8 von 25 Patienten). In der vorliegenden Arbeit waren 10 % (3 von 30 Patienten) für beide 5'-Polymorphismen homozygot (c.-137 CC und c.-53 GG). In der australischen Patientenkohorte konnten 4 % (einer von 25 Patienten) mit dieser Konstellation detektiert werden. Maxwell et al. (2005) beschreiben, dass in allen Fällen die Transition c.-137 T>C mit der Transversion c.-53 C>G kosegregiert. In dieser Arbeit stellte sich analog zu Maxwell et al. (2005) heraus, dass die Transversion c.-53 nie ohne die Transition c.-137 auftritt. Wie von Maxwell et al. (2005) vorgeschlagen, spricht aus diesem Grund viel dafür, dass c.-53 C>G auf dem allelischen Hintergrund von c.-137 T>C entstanden ist. In dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass die Transition c.-137 auch unabhängig von der Transversion c.-53 auftritt. Dies beschreibt eine vierte, neue Konstellation, die in der Patientenkohorte von Maxwell et al. (2005) nicht beschrieben wurde. Dabei handelt es sich in dieser Arbeit um drei Patienten, bei denen ein heterozygoter Polymorphismus an Position c.-137 mit homozygoter Wildtyp-Sequenz an Position c.-53 gefunden wurde (c.-137 TC und c.-53 CC). Die Ergebnisse in der Luciferase-Untersuchung von Maxwell et al. (2005) legen nahe, dass bei dieser Konstellation durch das alleinige Auftreten des heterozygoten Polymorphismus c.-137 TC mit wildtypischer Sequenz c.-53 CC eine verminderte *PEX1*-Genexpression verursacht werden kann (4.1.3).

c.-137 T>C	c.-53 C>G	c.2097_2098insT	Arbeit (von 30 Pat.)	Maxwell 2005 (von 25 Pat.)
TT	CC	--	13	8
TC	CG	heterozygot	5	15
TC	CG	--	6	1
CC	GG	homozygot	2	1
CC	GG	--	1	--
TC	CC	--	3	--

Tabelle 7: Häufigkeit und Verteilung der 5'-Polymorphismen im *PEX1*-Gen in Bezug zu der Insertion c.2097_2098insT.

In der ersten und zweiten Spalte sind die 5'-Polymorphismen in ihren jeweiligen 4 Konstellationen (c.-137 TT/c.-53CC, c.-137 TC/c.-53 CG, c.-137 CC/c.-53GG, c.-137 TC/c.-53CC), sowie deren Bezug zu der Insertion c.2097_2098insT (dritte Spalte) angegeben. Verglichen werden die Ergebnisse der 30 PBD-Patienten aus dieser Arbeit (vierte Spalte) mit den Ergebnissen der 25 PBD-Patienten aus der Studie von Maxwell et al. (2005) (fünfte Spalte). In dieser Arbeit war die Konstellation c.-137 TT/c.-53 CC ohne Insertion bei 13 Patienten am häufigsten. In der Studie von Maxwell et al. (2005) war die Konstellation c.-137 TC/c.-53 CG mit heterozygoter Insertion bei 15 Patienten am häufigsten. Es fällt auf, dass die heterozygote Insertion nur mit den beiden heterozygoten 5'-Polymorphismen bzw. die homozygote Insertion nur mit den beiden homozygoten 5'-Polymorphismen auftritt. Ferner wurde die Konstellation c.-137 TC/c.-53 CC nur in dieser Arbeit bei drei Patienten gefunden.

4.1.2 Zwei häufige *PEX1*-Mutationen und deren Bezug zu 5'-Polymorphismen

Die häufigsten Mutationen im *PEX1*-Gen sind die *missense*-Mutation c.2528 G>A in Exon 15 und die Insertion c.2097_2098insT in Exon 13. Die häufigste in unserer Patientengruppe gefundene Mutation ist die *missense*-Mutation c.2528 G>A, p.G843D in Exon 15. Die Mutation G843D konnte bei 15 der 30 Patienten (sieben Homozygote, acht Heterozygote) bzw. bei 22 von 60 betroffenen Allelen (Allelfrequenz: 37 %) nachgewiesen werden (Tabelle 3). Eine ähnlich hohe Frequenz von G843D (25-40 %) wurde auch bei PBD-Patienten anderer Arbeitsgruppen gefunden (Collins CS und Gould 1999, Gärtner et al. 1999, Reuber et al. 1997, Steinberg et al. 2004, Walter et al. 2001). Die Patienten mit der Mutation G843D haben meist einen milderen klinischen Verlauf der Erkrankung, der wahrscheinlich durch die bei G843D-Allelen gefundene 15%-ige Restfunktion für den Import peroxisomaler Matrixproteinen erklärt werden kann (Reuber et al. 1997). Das mutierte *PEX1*-Protein scheint, wie bereits bei anderen *missense*-Mutationen als Folge beschrieben, gesteigert abgebaut zu werden (Bross et al. 1999). Der durch die Mutation resultierende Basenaustausch zwischen den zwei AAA-Kassetten verursacht teilweise eine *PEX1*-Proteinmissfaltung, die möglicherweise auch zu einer reduzierten Interaktion mit *PEX6* und damit zu einer reduzierten *PEX1*-Funktion im Allgemeinen führt (Walter et al. 2001). Diese am häufigsten in der Patientengruppe auftretende Mutation G843D

scheint nicht auf dem allelischen Hintergrund der 5'-Polymorphismen entstanden zu sein. G843D im heterozygoten Zustand tritt mit jeder der vier möglichen Konstellationen der 5'-Polymorphismen auf (Tabelle 5). Im homozygoten Zustand ist die Mutation G843D mit der wildtypischen Sequenz an beiden 5'-Positionen bzw. mit den an beiden Positionen heterozygoten 5'-Polymorphismen zu finden.

In der Literatur wurden zwei synonyme Polymorphismen im *PEX1*-Gen, auch in Bezug zu den Mutationen G843D und c.2097_2098insT, beschrieben. Bei dem ersten Polymorphismus, einer Transition c.2331 C>A in Exon 14, resultiert die Variation in einer synonymen Mutation G777G, da GGC und GGA beide für die Aminosäure Glycin kodieren (Preuss et al. 2002). Bei dem anderen Polymorphismus IVS11+142insAGAAATTTTAAGTCTT handelt es sich um eine 16 bp-Insertion in Intron 11 (Preuss et al. 2002). Es wurde eine Haplotyp-Assoziation dieser zwei Polymorphismen mit den zwei häufigsten Mutationen G843D und c.2097_2098insT beobachtet. Die Mutation G843D trat mit der GGA-Form des Polymorphismus G777G und dem Vorliegen der 16bp-Insertion auf. Im Gegensatz dazu war die Mutation c.2097_2098insT mit der GGC-Form von G777G und der Abwesenheit der 16bp-Insertion gekoppelt (Collins CS und Gould 1999, Preuss und Gärtner 2001, Preuss et al. 2002).

Die zweithäufigste in unserer Patientengruppe nachgewiesene Mutation ist die 1bp-Insertion c.2097_2098insT, p.I700YfsX42 in Exon 13, die bei 8 von 30 Patienten (zwei Homozygote, sechs Heterozygote) festgestellt werden konnte (Allelfrequenz: 17 %). Die Allelfrequenz in anderen Kohorten ist meist höher mit 30 % (Crane et al. 2005, Maxwell et al. 1999, Preuss et al. 2002, Walter et al. 2001, Steinberg et al. 2004). Die Insertion führt zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stop-Codon 41 Aminosäuren stromabwärts der Insertion und noch vor der zweiten ATP-Bindungsdomäne des *PEX1*-Gens (Collins CS und Gould 1999). Die Patienten mit der Insertion c.2097_2098insT sind durch einen schweren klinischen Verlauf gekennzeichnet. Es kommt durch den *nonsense*-vermittelten mRNA-Abbau zu einem kompletten Verlust der *PEX1*-Proteinfunktion und somit zu vollständig fehlendem Import von peroxisomalen Matrixproteinen in das Peroxisom (Walter et al. 2001, Maxwell et al. 2002). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die häufigste Polymorphismen-Konstellation c.-137 TT und c.-53 CC mit 43 % (13 von 30 Patienten), immer ohne die Insertion c.2097_2098insT auftritt. In der Studie von Maxwell et al. (2005) ist diese Konstellation mit 32 % (8 von 25 Patienten) nur die zweithäufigste, aber analog

zu dieser Arbeit immer ohne Insertion zu finden. In der Patientenkohorte von Maxwell et al. (2005) sind mit 64 % (16 von 25 Patienten) die beiden 5'-Polymorphismen im heterozygoten Zustand am häufigsten (c.-137 TC und c.-53 CG). Davon tragen 15 dieser Patienten die Insertion im heterozygoten Zustand und nur einem fehlt die Insertion. In dieser Arbeit gibt es im Vergleich dazu 37 % der Patienten mit der Konstellation c.-137 TC und c.-53 CG, die sowohl heterozygot für die Insertion sind (5 von 30 Patienten) als auch solche (6 von 30 Patienten), die keine Insertion tragen (Tabelle 7). Wenn die beiden 5'-Polymorphismen im homozygoten Zustand auftreten, zeigt sich bei einem Patienten von Maxwell et al. (2005) die Insertion c.2097_2098insT auch im homozygoten Zustand. Analog zu der Studie von Maxwell et al. (2005) konnte in dieser Arbeit an zwei Patienten gezeigt werden, dass die für die Insertion c.2097_2098insT homozygoten Patienten auch homozygot für beide 5'-Polymorphismen sind. Ein weiterer Patient ZS 30, der homozygot für beide 5'-Polymorphismen ist, trägt auf beiden Allelen andere Mutationen (c.2528 G>A / c.249insT). In dieser Arbeit konnte, wie bereits auch von Maxwell et al. (2005) beobachtet, eine Korrelation zwischen den beiden 5'-Polymorphismen und der Mutation c.2097_2098insT festgestellt werden. Alle Patienten mit heterozygoter (bzw. homozygoter) Mutation c.2097_2098insT wurden mit beiden 5'-Polymorphismen im heterozygoten (bzw. homozygoten) Zustand detektiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Maxwell et al. (2005) scheint die Mutation c.2097_2098insT auf dem allelischen Hintergrund beider 5'-Polymorphismen entstanden zu sein. Bei den ohnehin schon von der homozygoten Mutation c.2097_2098insT schwer betroffenen Patienten sollte in diesem Fall nach Maxwell et al. (2005) kein weiterer negativer Einfluss der beiden homozygoten 5'-Polymorphismen vorliegen. Dies erklärt sich über die beschriebene Tatsache, dass bei gleichzeitigem Vorliegen beider 5'-Polymorphismen der reduzierende Einfluss der Position c.-137 auf die *PEX1*-Genexpression durch die Position c.-53 mit einer erhöhten *PEX1*-Genexpression wieder ausgeglichen wird (Maxwell et al. 2005).

4.1.3 5'-Polymorphismen mit Einfluss auf klinischen Phänotyp?

Der G843D-heterozygote Patient ZS 26 mit zweiter unbekannter Mutation schien für weitere Untersuchungen interessant, da dieser Patient Träger des heterozygoten Polymorphismus an Position c.-137 mit wildtypischer Sequenz an Position c.-53 war (c.-137 TC und c.-53 CC). Die alleinige Transition an Position c.-137 könnte, wie in

den Luciferase-Untersuchungen von Maxwell et al. (2005) gezeigt, eine verminderte *PEX1*-Genexpression verursachen. Falls sich die Transition an Position c.-137 in trans-Stellung zu dem Allel mit der Mutation G843D befände, könnte diese theoretisch das zweite krankheitsbedingende Allel darstellen, oder zumindest die *PEX1*-Expression von diesem *PEX1*-Allel mit unbekannter Mutation vermindern. Anhand von Sequenzierungen der genomischen DNS der Eltern des Patienten ZS 26 im Bereich der beiden 5'-Polymorphismen und der Position c.2528 (Mutation G843D) konnte festgestellt werden, dass der 5'-Polymorphismus tatsächlich in trans-Stellung zu der Mutation liegt (Tabelle 6). Gegen eine Rolle des alleine auftretenden heterozygoten 5'-Polymorphismus an Position c.-137 (c.-137 TC/c.-53 CC) als das zweite krankheitsverursachende Allel bei ZS 26 spricht allerdings die folgende Überlegung: Die Allelfrequenz des Polymorphismus c.-137 T>C beträgt 18,9 % in der Population (Maxwell et al. 2005). Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz wären demnach 30,6 % der Patienten heterozygot für den Polymorphismus an Position c.-137 (c.-137 TC) und 3,6 % der Patienten homozygot für den Polymorphismus an Position c.-137 (c.-137 CC). Die Allelfrequenz des Polymorphismus c.-53 C>G beträgt 8,6 % in der Population (Maxwell et al. 2005). Homozygot für die Wildtyp-Sequenz an Position c.-53 (c.-53 CC) sind nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz 83,5 %. Daraus folgt, dass 25,6 % der Population die Konstellation c.-137 TC/c.-53 CC und 3 % der Population die Konstellation c.-137 CC/c.-53 CC tragen. Der alleine auftretende heterozygote bzw. homozygote Polymorphismus an Position c.-137 führt laut Maxwell et al. (2005) zu einer verminderten bzw. stark verminderten *PEX1*-Genexpression. Würde der 5'-Polymorphismus an Position c.-137 tatsächlich eine pathogene Mutation darstellen, müsste es deutlich mehr Erkrankte geben. Ausgehend von dieser Überlegung würde schon die Konstellation c.-137 CC und c.-53 CC mit einer Häufigkeit von etwa 3 % krankheitsverursachend sein. Bei der Berechnung der Häufigkeit dieser Konstellation muss beachtet werden, dass es aufgrund der Kopplung beider Positionen zu einer Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz kommt. Es liegt keine ideale Population vor, da bestimmte Genotypen, wie z.B. c.-137 TT/c.-53 CG, c.-137 TT/c.-53 GG, c.-137 TC/c.-53 GG, c.-137 CC/c.-53 CG, nicht existieren. Bei dem gesunden Vater des Patienten ZS 26 lässt sich direkt erkennen, dass der 5'-Polymorphismus keine krankheitsverursachende Mutation darstellt. Der Vater mit homozygoten 5'-Polymorphismus an Position c.-137 und homozygoter Wildtyp-Sequenz an Position c.-53 (c.-137 CC und c.-53 CC) und 3,4 kb großer Deletion wäre sonst ein

PBD-Patient (Tabelle 6). Ferner leiteten Maxwell et al. (2005) von in-vitro-Daten ab, dass bei einer Konstellation von c.-137 CC/c.-53 CC eine reduzierte *PEX1*-Expression von maximal 50 % vorlag. Demnach ist trotz einer gleichzeitig heterozygot vorliegenden Mutation im *PEX1*-Gen eine restliche *PEX1*-Aktivität zu vermuten.

Das Ergebnis des Western Blots zeigte bei verschiedenen Konstellationen von Mutationen und 5'-Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede in der *PEX1*-Proteinmenge (Abbildung 1). Alle *PEX1*-defizienten Patienten hatten im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich verringerte oder nicht mehr nachweisbare *PEX1*-Proteinmenge. Aufgrund der insgesamt sehr schwachen Signalstärke bei allen *PEX1*-defizienten Patienten lassen sich nur beschränkt Aussagen über die geringen Unterschiede an Proteinmenge innerhalb dieser Patientengruppe treffen. Es schien jedoch, dass diese Unterschiede unabhängig von den zugrundeliegenden Genotypen und 5'-Polymorphismen auftraten. Im Vergleich der vier G843D-homozygoten Patienten mit wildtypischer Sequenz an beiden 5'-Positionen (c.-137 TT und c.-53 CC) und einem G843D-homozygoten Patienten ZS 18 mit heterozygoten Polymorphismen an beiden 5'-Positionen (c.-137 TC und c.-53 CG) ließ sich kein Einfluss der 5'-Polymorphismen auf die *PEX1*-Proteinmenge erkennen. Diese Patienten waren allerdings keine optimalen Kandidaten für den Vergleich der *PEX1*-Proteinmenge, da die zuletzt genannte Konstellation der 5'-Polymorphismen (c.-137 TC und c.-53 CG) laut Maxwell et al. (2005) durch den ausgleichenden Charakter (c.-137 TC vermindert die *PEX1*-Genexpression und c.-53 CG erhöht die *PEX1*-Genexpression) keinen weiteren Einfluss auf die *PEX1*-Genexpression haben sollte. Ein besserer Vergleichskandidat wäre ein G843D-homozygoter Patient mit der Konstellation c.-137 TC und c.-53 CC gewesen, da hier laut Maxwell et al. (2005) ein vermindernder Einfluss auf die *PEX1*-Genexpression vorliegen müsste. Da es jedoch in unserer Kohorte keinen Patienten mit der zuletzt genannten Konstellation gab und alle Signale der *PEX1*-defizienten Patienten im Western Blot insgesamt nur sehr schwach ausgefallen waren, ist dieser bezüglich des Einflusses der 5'-Polymorphismen auf das *PEX1*-Genexpressionsmuster nur sehr beschränkt aussagekräftig.

In der Literatur wird beschrieben, dass der gleiche Genotyp bei *PEX1*-defizienten Patienten scheinbar zu einem unterschiedlichen klinischen Erkrankungsbild führen kann (Crane et al. 2005). Bei einem Vergleich von G843D-homozygoten Patienten entwickelten zwei von den Patienten einen klinischen Phänotyp, der schwerer als er-

wartet war, und ein weiterer G843D-homozygoter Patient war früh letal erkrankt (Poll-The et al. 2004). Diese Befunde wurden so interpretiert, dass zusätzlich zu dem *PEX1*-Genotyp andere unbekannte Faktoren, wie z.B. die 5'-Polymorphismen, den klinischen Phänotyp mitbestimmen können (Crane et al. 2005). Es wäre denkbar, dass eine veränderte *PEX1*-Genexpression aufgrund der Präsenz einer dieser Varianten der 5'-Polymorphismen in einem *PEX1*-defizienten Patienten die Rest-*PEX1*-Funktion beeinflussen könnte (Crane et al. 2005). Dies unter der Voraussetzung, dass eine andere coallelische Mutation die *PEX1*-Funktion nicht komplett unterbindet (Crane et al. 2005). Die 5'-Polymorphismen könnten auch bei Patienten mit Mutationen in anderen Peroxinen z.B. *PEX6*, das mit *PEX1* interagiert, einen Einfluss haben (Geisbrecht et al. 1998). Auch wenn die 5'-Polymorphismen nicht direkt krankheitsverursachend in Kontroll-Individuen sind, bleibt es möglich, dass sie zu der phänotypischen Heterogenität innerhalb des Zellweger-Spektrums beitragen (Crane et al. 2005). Wie hier dargestellt, kann die Entdeckung von vorher unerkannten Polymorphismen oder seltenen Varianten leicht zu einer inkorrekten Interpretation von molekularen Ergebnissen führen, wenn Polymorphismen als krankheitsauslösende Mutationen betrachtet werden (Steinberg et al. 2004). In einer Studie von Walter et al. (2001) wurde von einem Polymorphismus c.2088 C>G (p.I696M) berichtet, der womöglich eine krankheitsverursachende Mutation darstellen sollte. In den darauffolgenden Jahren wurde dieser Polymorphismus (p.I696M) jedoch auch bei Patienten gefunden, die bereits zwei krankheitsverursachende Mutationen im *PEX1*-Gen oder anderen *PEX*-Genen hatten (Steinberg et al. 2004). Der Polymorphismus p.I696M ist somit wahrscheinlich physiologisch (Crane et al. 2005).

Die Vermutung, dass der 5'-Polymorphismus die zweite krankheitsverursachende Mutation für den Patienten ZS 26 darstellt, wurde auch in dieser Arbeit nach der oben genannten Überlegung und nach Durchführung einer *long-range*-PCR verworfen. Bei Patient ZS 26 wurde eine zweite Mutation, eine 3,4 kb große Deletion, mit dieser Methode gefunden (Abbildung 6). In diesem Fall ist davon auszugehen, dass die Mutation G843D und die in trans-Stellung befindliche Deletion als *compound*-heterozygote Mutationen die Erkrankung bei Patient ZS 26 verursachen. Die Frage, ob die 5'-Polymorphismen möglicherweise einen krankheitsmodulierenden Einfluss haben könnten, bleibt jedoch offen.

4.2 Genetische Aufklärung von zwei *PEX1*-defizienten Patienten

4.2.1 Allelspezifische PCR und *real-time*-PCR

Nach Sequenzierung der cDNS und gDNS der beiden G843D-heterozygoten Patienten ZS 26 und ZS 8 fielen die Elektropherogramme an der Position c.2528 unterschiedlich aus. Es fiel auf, dass bei beiden Patienten im Elektropherogramm der gDNS ein heterozygoten Signal für die Mutation G843D erschien, während im Elektropherogramm der cDNS das Wildtyp-Signal an Position c.2528 nur sehr schwach abgebildet wurde (Abbildung 4). Eine quantitative Auswertung dieses Ergebnisses aus dem Sequenz-Elektropherogramm ist jedoch nicht zulässig. Anhand einer allelspezifischen PCR sollte daher detektiert werden, ob bei Einsatz der cDNS von beiden Patienten auch Wildtyp-cDNS vorliegt.

Das Ergebnis der allelspezifischen PCR mit der cDNS des Patienten ZS 26 ließ vermuten, dass eine sehr geringe Menge der Wildtyp-mRNS existiert, da hier ein Signal mit dem Wildtyp-Primer gerade noch nachweisbar war (Abbildung 5). Bei der Wildtyp-mRNS (ohne Mutation G843D) des Patienten ZS 26 handelt es sich hierbei um das Allel, welches die 3,4 kb Deletion trägt. Von dieser Deletion sind die Exons 10, 11 und 12 betroffen. Da diese Exons vor dem Bereich der Mutation an Position c.2528 im Exon 15 liegen, sollte die Amplifikation der cDNS an Position c.2528 insofern nicht direkt, allerdings indirekt über *nonsense*-vermittelten mRNS-Abbau (Jacobsen und Peltz 1996), betroffen sein. Da die Deletion in den Exons 10, 11 und 12 durch eine Leserasterverschiebung ein vorzeitiges Stoppkodon verursacht, wird die instabile mRNS abgebaut (*nonsense*-vermittelter mRNS-Abbau (Jacobsen und Peltz 1996)). Ob von einem vollständigen Wildtyp-mRNS-Abbau ausgegangen werden kann, ist nicht sicher, da sich in der allelspezifischen PCR noch ein sehr schwaches Wildtyp-Signal gezeigt hat (Abbildung 5). Neben der Hauptvariante der Deletion von Exon 10, 11 und 12 können auch andere Spleißprodukte entstehen, die über die Klonierung der cDNS nachzuweisen wären.

Mit der cDNS des Patienten ZS 8 konnte in der allelspezifischen PCR ein gleichstarkes Signal mit Mutanten-Primer als auch Wildtyp-Primer erzielt werden, was hinweist, dass ähnliche Mengenanteile von Wildtyp-mRNS und Mutanten-mRNS vorhanden sind (Abbildung 5). Zum Vergleich hatten alle anderen aus der Sequenzierung bekannten G843D-heterozygoten Patienten (ZS 27 und ZS 25) auch ein erwartungsgemäßes Signalverhalten mit dem Wildtyp- bzw. Mutanten-Primer (Abbildung 5). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Patienten ZS 8, ZS 27 und ZS 25

auch auf cDNS-Ebene heterozygot sind. Das Signal der gDNS/cDNS der Wildtyp-Kontrolle fiel nur mit dem Wildtyp-Primer bzw. das Signal mit der gDNS/cDNS des G843D-homozygoten Patienten ZS 11 fiel nur mit dem Mutanten-Primer positiv aus und diente jeweils als Kontrolle (Abbildung 5).

Nach diesen Erkenntnissen scheint die allelspezifische PCR für diagnostische Zwecke an einem großen Kollektiv gut einsetzbar zu sein, wenn es zunächst um die Fragestellung geht, ob an Position c.2528 in der gDNS bzw. cDNS die häufige Mutation G843D zu finden ist. So lässt sich an einem größeren Kollektiv nach einer PCR-Reaktion anhand des jeweiligen Signalausfalls mit Wildtyp- bzw. Mutanten-Primer das heterozygote oder homozygote Vorhandensein der Mutation G843D auf gDNS- und cDNS-Ebene feststellen. Deletionen und *nonsense*-Mutationen an einer anderen Position des *PEX1*-Gens können, wie bei Patient ZS 26 beschrieben, das Ergebnis jedoch beeinflussen.

Die Repräsentation der Wildtyp-mRNS des Patienten ZS 8 stellte sich in der Sequenzierung an Position c.2528 (Ausschlag an Position c.2528 bildet Wildtyp-Signal fast nicht ab) und in der allelspezifischen PCR (gleichstarkes Signal der cDNS mit Wildtyp- und Mutanten-Primer) unterschiedlich dar (Abbildung 4). Mithilfe der allelspezifischen *real-time*-PCR sollten quantitative Angaben über die vorhandene Menge der Wildtyp-mRNS gemacht werden. Über die *real-time*-PCR konnte detektiert werden, wieviel Wildtyp-mRNS von Patient ZS 8 im Vergleich zu der Wildtypkontrolle, den Patienten ZS 26, ZS 27 (G843D-heterozygot) und Mutant ZS 11 (G843D-homozygot) exprimiert wird. Der Patient ZS 27 (G843D-heterozygot) exprimierte 27 % des Wildtypallels, Patient ZS 8 noch 17 % des Wildtypallels und Patient ZS 26 exprimierte nur noch 9 % der Wildtyp-mRNS im Vergleich zu der Wildtypkontrolle (Abbildung 9).

Die Resultate aus der *real-time*-PCR mit Mutanten-Primer können nicht eindeutig interpretiert werden. Über die Expressionsmenge der Mutanten-mRNS des Patienten ZS 8 mit 120 %, des Patienten ZS 26 mit 80 % und des Patienten ZS 27 mit 150 % im Vergleich zu der Mutantenkontrolle (ZS 11) kann nur spekuliert werden (Abbildung 9). Es fällt auf, dass sowohl der G843D-heterozygote Patient ZS 27 mit *nonsense*-Mutation auf dem zweiten Allel, als auch der G843D-heterozygote Patient ZS 8 mit ungeklärter zweiter Mutation über 100 % Mutanten-mRNS exprimieren. An dieser Stelle lässt sich vermuten, dass das G843D-Allel, welches nicht vom *nonsense*-vermittelten RNS-Zerfall betroffen ist, möglicherweise kompensatorisch vermehrt

transkribiert oder stabilisiert wird.

Bei Patient ZS 8 ist aufgrund der geringen Expression der Wildtyp-mRNS von 17 % ein *nonsense*-vermittelter mRNS-Abbau aufgrund einer Deletion als genetischer Mechanismus möglich. Bei Patient ZS 8 wäre auch eine Mutation im Promoter denkbar, die aufgrund von spezifischen Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Genexpression haben könnte. Es zeigt sich, dass das relativ starke Signal in der nicht-quantitativen, allelspezifischen PCR der cDNS des Patienten ZS 8 mit dem Wildtyp-Primer nicht aussagekräftig ist, da dieser 17 %-ige Rest der Wildtyp-mRNS in der PCR sehr schnell exponentiell hochamplifiziert wird. Dadurch waren die Mengenunterschiede zwischen der Mutanten-mRNS und Wildtyp-mRNS auf dem Gel nicht mehr sichtbar, aber mithilfe der *real-time*-PCR besser quantifizierbar.

Bei Patient ZS 26 konnte mit einer Wildtyp-mRNS-Expression von 9 % gezeigt werden, dass die Deletion im Wildtypallel starken Einfluss auf die Menge der Wildtyp-mRNS hat. Bei Patient ZS 26 werden durch den Verlust der Exons 10, 11 und 12 die angrenzenden Exons 9 und 13 in Abfolge transkribiert. Dadurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die zu einem vorzeitigen Stoppkodon mit der Konsequenz eines instabilen mRNS-Transkripts führt (Abbildung 8). Die Auswirkungen des mRNS-Abbaus bei dem Patienten ZS 26 können unterschiedlich diskutiert werden. Mithilfe eines solchen *nonsense*-vermittelten mRNS-Abbaus lassen sich die potenziell letalen Auswirkungen eines verkürzten Polypeptids vermeiden, welche womöglich lebenswichtige Zellfunktionen beeinträchtigen (Jacobsen und Peltz 1996). Die Fähigkeit des NMD die phänotypische Schwere einer Reihe von Erkrankungen zu modulieren, hat das Interesse geweckt, diesen Abbauweg der mRNS möglicherweise als ein attraktives Ziel für therapeutische Manipulationen zu betrachten (Frischmeyer und Dietz 1999).

4.2.2 Long-range-PCR als diagnostisches Mittel zur Identifizierung einer großen Deletion im PEX1-Gen

Die klinischen Merkmale wie Dismorphiezeichen, Überlebensdauer, Muskelhypotonie, Krampfanfälle, psychomotorische Retardierung, Trinkschwäche, okuläre und skelettale Veränderungen, die bei den Patienten ZS 8 und ZS 26 auffielen, sprachen für eine Erkrankung des Zellweger-Spektrums. Biochemische Auffälligkeiten bei beiden Patienten, wie erhöhte VLCFAs, erhöhte Phytansäure- und Pristansäure und erhöhte Gallensäurezwischenprodukte (THCA und DHCA),

entsprachen einer generalisierten peroxisomalen Funktionsstörung. Die *PEX1*-Komplementierung bestätigte, dass bei den Patienten ZS 26 und ZS 8 ein Defekt im *PEX1*-Gen vorliegt. Der Phänotyp konnte bei beiden Patienten durch Komplementierung mit *PEX1* korrigiert werden (Abbildungen 2 und 3). Nach vollständiger Sequenzierung der kodierenden Bereiche und angrenzenden Intronbereiche der gDNS blieb bei diesen beiden G843D-heterozygoten Patienten zunächst ungeklärt, welche pathogene Mutation auf dem zweiten Allel im *PEX1*-Gen vorliegen könnte. Eine mögliche Erklärung könnte ein größerer Basenverlust auf dem Wildtypallel (ohne G843D-Mutation) sein, der zu einer instabilen mRNA führt, die dann frühzeitig abgebaut wird. In der allelspezifischen PCR der cDNS des Patienten ZS 8 wurden ähnliche Mengenanteile der Wildtyp-mRNA und Mutanten-mRNA gefunden. Um die Ursache einer pathogenen Mutation bei diesen Patienten zu finden, wäre eine Methode der Wahl die Durchführung einer MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Die im Jahr 2002 erstmals von Schouten et al. beschriebene MLPA-Methode ist ein Verfahren, mit dem Deletionen oder Insertionen einzelner oder mehrerer Exons nachweisbar sind. Beim Einsatz in der Routine lassen sich in einer einzigen Reaktion bis zu 40 verschiedene Genbereiche untersuchen (Schouten et al. 2002). Das Verfahren beruht auf der Hybridisierung von sequenzspezifischen Sonden mit genomischer DNA, gefolgt von einer Amplifikation der hybridisierten Sonden. Den Längenunterschied zwischen den verschiedenen Sonden nutzt man für die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Eine Durchführung der MLPA ist jedoch für das *PEX1*-Gen bisher nicht etabliert und MLPA-Sonden mit den spezifischen DNA-Bindungssequenzen für *PEX*-Gene zur Zeit noch nicht kommerziell erhältlich.

Durch die von uns alternativ verwendete *long-range*-PCR wurde bei dem Patienten ZS 26 eine 3,4 kb große Deletion gefunden. Der Nachteil dieser Methode im Vergleich zu der MLPA liegt darin, dass die Deletion nicht unbedingt erfasst wird. Nach Etablierung der *long-range*-PCR ist die Durchführung relativ unkompliziert. Das Allel mit der 3,4 kb großen Deletion des Patienten ZS 26 lag in trans-Stellung zu dem Allel mit der Mutation G843D. Die Mutation g.20805_24642delins28829_29223 (NCBI Reference Sequence NC_000007.13) im *PEX1*-Gen wurde hier erstmalig in dieser Größe bei einem PBD-Patienten gefunden. Die kleineren, bisher in der Literatur beschriebenen Deletionen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Zu den größten, bisher in der Literatur beschriebenen Deletionen gehören die 171 bp- Deletion

c.1900_2070del in Exon 12 (Rosewich et al. 2005) und die 190 bp- Deletion c.2227_2416del in Exon 13 (Preuss et al. 2002).

	Mutation	Exon	Referenz
1 bp-Deletion:	c.270delA	2	Yik et al. 2008
	c.904delG	5	Maxwell et al. 2002
	c.1840delA	11	Yik et al. 2008
	c.2730delA	18	Walter et al. 2001
	c.2916delA	18	Preuss et al. 2002
2 bp-Deletion:	c.782_783delAA	5	Yik et al. 2008
	c.788_789delCA	5	Walter et al. 2001
	c.911_912delCT	5	Rosewich et al. 2005
	c.1714_1715delCA	10	Yik et al. 2008
	c.2391_2392delTC	14	Maxwell et al. 2005
3 bp-Deletion:	c.2083_2085delATG	13	Rosewich et al. 2005
	c.3022_3024delCCT	19	Yik et al. 2008
4 bp-Deletion:	c.3691_3694delCAGT	23	Rosewich et al. 2005
	c.3693_3696delGTCA	23	Yik et al. 2008
5 bp-Deletion:	c.643_647delACCAA	5	Yik et al. 2008
	c.2085_2089delGATAA	13	Steinberg et al. 2004
	c.2814_2818delCTTTG	18	Preuss et al. 2002
171 bp-Deletion:	c.1900_2070del	12	Rosewich et al. 2005
190 bp-Deletion:	c.2227_2416del	13	Preuss et al. 2002
Deletionen/Insertionen:	c.434_448delTTGGGTTGATCAACAinsGCAA	4	Rosewich et al. 2005
	c.2537_2545delATGAAGTTAinsTCATGGT	15	Rosewich et al. 2005

Tabelle 8: Darstellung der bisher in der Literatur beschriebenen Deletionen/Insertionen.

Zu den bisher in der Literatur beschriebenen Mutationen gehören die 1 bp-, 2 bp-, 3 bp-, 4 bp-, 5 bp-Deletionen und Deletionen mit Insertionen. Zu den größten, bisher in der Literatur beschriebenen Deletionen gehören die 171 bp-Deletion und die 190 bp-Deletion (Spalte 1). Die Mutationen werden als Nukleotidveränderungen auf cDNS-Ebene (Spalte 2) im jeweiligen Exon (Spalte 3) mit Angabe der Referenz (Spalte 4) dargestellt.

Alle diese *nonsense*-Mutationen führen durch Leserasterverschiebung zu einem vorzeitigen Stoppkodon, so dass ein *nonsense*-vermittelter Zerfall der *PEX1*-mRNS folgt (Jacobsen und Peltz 1996, Maquat 1996) und/oder die *PEX1*-Proteinfunktion schwer gestört wird (Crane et al. 2005). Dieses Phänomen konnte auch bei dem Allel mit der 3,4 kb großen Deletion des Patienten ZS 26 beobachtet werden. So ließe sich erklären, warum das Wildtypallel in der allelspezifischen PCR bei der cDNS des Patienten ZS 26 deutlich unterrepräsentiert ist. Die Deletion stellt somit das zweite krankheitsverursachende Allel dar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Durchführung einer *long-range*-PCR als weiterführender diagnostischer Schritt bei jedem PBD-Patienten mit bisher zweiter ungeklärter Mutation erwogen werden sollte. So wird mit der in dieser Arbeit etablierten *long-range*-PCR, das komplette *PEX1*-Gen auf eine mögliche Deletion untersucht.

Da das Gen mit über 41,5 kb zu groß ist, mussten mehrere sich überschneidende Fragmente mit einer Größe von 5,8 kb bis 18,4 kb amplifiziert werden. Der methodische Ansatz kann in diesem Fall nicht alle denkbaren möglichen Deletionen einschließen (Abbildung 6). In der Tabelle 9 werden einige mögliche Deletionen dargestellt, die mithilfe dieser Methode nicht entdeckt werden würden. Um das Verfahren noch besser zu optimieren, müssten weitere Primer-Paare etabliert werden. Aufgrund unterschiedlicher DNS-Qualitäten war es jedoch nicht immer möglich mit jedem Primer-Paar verlässliche Signale zu erhalten.

1.Bruchpunkt 5' von	2.Bruchpunkt 3' von	Deletionslänge mind.
Primer 455f	Primer 456a	2 kb
Primer 457c	Primer 468a	6.5 kb
Primer 469a	Primer 476a	5 kb
Primer 475a	Primer 484a	6.7 kb
Primer 493a	Primer 500a	3.8 kb

Tabelle 9: Darstellung der theoretisch möglichen Deletionen, die mit der in dieser Arbeit etablierten *long-range*-PCR nicht erfasst werden.

In der Tabelle ist bei einem ersten Bruchpunkt 5' der aufgelisteten Primern und einem zweiten Bruchpunkt 3' der angegebenen Primer die jeweilige mögliche Mindest-Deletionslänge in kb angegeben. Liegt beispielsweise der erste Bruchpunkt 5' des Primers 455f und der zweite Bruchpunkt 3' des Primers 456a, hätte die Deletion mindestens eine Länge von 2 kb und würde nicht anhand einer Doppelbande auffallen. Jeweils einer der Bruchpunkte würde außerhalb der in der *long-range*-PCR generierten Fragmente liegen (siehe Abbildung 6).

Bei dem Patienten ZS 8 konnte mithilfe der *long-range*-PCR keine Deletion entdeckt werden. Ein Grund dafür wäre, wie oben beschrieben, dass ein Bruchpunkt einer möglichen Deletion bei Patient ZS 8 nicht in dem Fragmentabschnitt liegt, der von den zwei eingesetzten Primern festgelegt wird. Tritt dieser Fall ein, wird das Allel mit der Deletion nicht amplifiziert, da der Primer in dem deletierten Bereich nicht binden kann. Nur das gesunde Allel ohne die Deletion würde amplifiziert werden und es ließe sich somit keine Doppelbande in der Gelelektrophorese erkennen. Aufgrund dieser methodischen Einschränkungen ist es möglich, dass eine kleine oder auch größere Deletion bei Patient ZS 8 übersehen wurde. Andere, nicht auf eine Deletion zurückzuführende, Möglichkeiten für ein krankheitsverursachendes Allel bei Patient ZS 8 könnten Mutationen in intronischen Spleißsequenzen sein, die zu einem defekten Spleißen der prä-mRNS führen. Ferner wäre bei Patient ZS 8 eine Mutation im Promoter möglich, die aufgrund von spezifischen Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren einen negativen Einfluss auf die Genexpression haben könnte.

Auch wenn durch die erfolgreiche *PEX1*-Komplementierung davon ausgegangen werden kann, dass ein Defekt im *PEX1*-Gen vorliegt, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Mutationen in anderen *PEX*-Genen den klinischen Phänotyp zusätzlich beeinflussen (Yik et al. 2008).

4.3 5'-RACE zur Analyse des Transkriptionsstartpunkts der 5'-*PEX1*-mRNS

In den Experimenten von Maxwell et al. (2005) ließ sich eine Region bis zu 245 Basenpaare stromaufwärts vom physiologischen Translationsstartpunkt ATG der *PEX1*-mRNS amplifizieren. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit weder durch Einsatz der eigenen Primer, noch durch Einsatz des in der Studie von Maxwell verwendeten Primer (455J) bestätigt werden. Mit Primern, die stromaufwärts der Position c.-137 binden (455H, 455K, 455I, 455J), konnten keine PCR-Produkte erzielt werden (Abbildung 10). Mit dem am weitesten stromaufwärts bindenden Primer 455F ließ sich ein Genabschnitt bis zu 123 Basenpaare 5' des Translationsstartpunkts ATG des *PEX1*-Gens amplifizieren. In der Publikation von Maxwell et al. (2005) wird keine Maßnahme beschrieben, die eine Kontamination mit gDNS im PCR-Ansatz verhindert. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Primer von Maxwell et al. (2005), die stromaufwärts von Position c.-137 gebunden haben, durch Kontamination von gDNS in dem PCR-Ansatz bedingt sind. Die annotierte Sequenz aus der NCBI-Gendatenbank gibt wiederum an, dass die cDNS des *PEX1*-Gens an Position c.-96 beginnt (NCBI Reference Sequence: NM_000466.2). Um den Startpunkt der *PEX1*-Transkription experimentell zu überprüfen, wurde eine 5'-RACE-PCR mit anschließender Klonierung durchgeführt. Es wurden unter anderem Klone detektiert, die an Position c.-53 den *PEX1*-Beginn anzeigten. Die am weitesten stromaufwärts liegende Position, die in einem Klon gefunden wurde, war in der Sequenzierung an Position c.-120. Die in den Klonen gefundenen unterschiedlichen Positionen (c.-53 versus c.-120) könnten Ergebnis ausgeprägter Sekundärstrukturen der mRNS sein, die zu einer unvollständigen reversen Transkription im Reaktionsansatz führen. Mittels 5'-RACE-PCR konnten keine weiteren Informationen stromaufwärts von Position c.-120 gewonnen werden. Bei Kenntnis über den exakten Transkriptionsstartpunkt der *PEX1*-mRNS könnte die Rolle der *PEX1*-Polymorphismen an Position c.-137 und c.-53 besser bewertet werden. Somit bleibt weiterhin unklar, ob beide Polymorphismen tatsächlich in der 5'-UTR liegen und

damit transkribiert werden. Die 5'-UTR ist ein bestimmter Teil der DNS, der transkribiert, aber nicht translatiert wird. Dieser Bereich der mRNA, der sich von Transkriptionsstartpunkt bis zum Translationsstartkodon der kodierenden Region erstreckt, kodiert nicht für Proteine. Die durchschnittliche Länge der 5'-UTR von eukaryontischer mRNA beträgt 210 Nukleotide, die minimal gefundene Länge betrug 18 Nukleotide (Chatterjee und Pal 2009). Verschiedene regulatorische Sequenzen, die eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der mRNA-Translation haben, liegen in der 5'-UTR (Mignone et al. 2005). Dazu gehören Bindestellen für Proteine (*internal ribosome entry sites*), welche die Stabilität der mRNA oder deren Translation beeinflussen (Pickering und Willis 2005). Die 5'-UTR enthält auch regulatorische Elemente, die unabhängig von Proteinen arbeiten und Sequenzen, welche die Initiation der Translation einleiten (Mignone et al. 2005). Die Länge der 5'-UTR-Region einer mRNA, seine thermale Stabilität, der GC-Anteil, Sekundärstrukturen und viele stromaufwärts gelegene offene Leserahmen können ebenso die Translation beeinflussen (Chatterjee und Pal 2009). Die Länge der 5'-UTR hat Einfluss auf die Translations-Effektivität, indem sie bestimmt wieviel Energie ein navigierendes Ribosom benötigt um zu dem AUG-Startkodon durch einen hochstrukturierten 5'-UTR-Bereich zu gelangen (Chatterjee und Pal 2009). Verkürzungen oder Mutationen in der 5'-UTR führen aufgrund der gestörten Feinregulation oft zu beeinträchtigter Proteinsynthese (Chatterjee und Pal 2009).

Maxwell et al. (2005) gehen nach Detektion einer 245 bp großen 5'-UTR davon aus, dass beide 5'-Polymorphismen in der 5'-UTR liegen, somit transkribiert werden und dadurch die *PEX1*-Genexpression vermindern (c.-137 T>C) oder erhöhen (c.-53 C>G). In dieser Arbeit zeigt das 5'-*RACE*-Ergebnis, dass die 5'-UTR nur maximal 120 bp groß ist. Dies würde bedeuten, dass der Polymorphismus c.-137 T>C nicht Teil der 5'-UTR ist, nicht transkribiert wird und nur in der Promoterregion der genomischen DNS zu finden ist. Der 5'-Polymorphismus an Position c.-137 in der Promoterregion der genomischen DNS könnte trotzdem Einfluss auf die *PEX1*-Genexpression haben. Als Promoter wird eine Nukleotid-Sequenz auf der DNS bezeichnet, die die regulierte Expression eines Gens ermöglicht. Der Promoter bildet den Erkennungs- und Startpunkt für jede RNS-Polymerase und wird von Transkriptionsfaktoren aktiviert oder reprimiert (Burke et al. 1998). Der Promoter wird in drei Abschnitte eingeteilt. Ein absolut notwendiger Teil eines Promoters für die Transkription ist der Kern-Promoter, der sich maximal zwischen Position -37 und +32

erstreckt, wenn mit Null der Transkriptionsstartpunkt des Gens festgelegt ist (Burke et al. 1998). Bei einem möglichen Transkriptionsstartpunkt an Position c.-120, würde der 5'-Polymorphismus c.-137 T>C in dem Kern-Promoter liegen. Einige Sequenz-Motive, die spezifische Funktionen im Transkriptions-Prozess haben wie z.B. TATA-Box, Initiator, TFIIB Erkennungs-Element und ein stromabwärts gelegenes Kern-Promoter-Element (*downstream core promoter element*), liegen gewöhnlich in dem Kern-Promoter (Butler und Kadonaga 2002). Die TATA-Box ist 26-31 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts lokalisiert (Butler und Kadonaga 2002). Der Initiator erstreckt sich von Position -2 bis +4. Das TFIIB Erkennungs-Element liegt stromaufwärts zwischen Position -37 und -32 (Butler und Kadonaga 2002). Das DPE befindet sich stromabwärts an Position +28 und +32 (Butler und Kadonaga 2002). Ein weiteren Abschnitt des Promoters stellt der proximale Promoter zwischen Position -250 und +250 dar, welcher CAAT-Box, GC-Box oder CpG-Inseln enthalten kann und weitere spezifische Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren (Butler und Kadonaga 2002). Zu den genregulatorischen Abschnitten des Promoters gehören auch viele kbp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegende Nukleotid-Sequenzen, die dessen Expression fördern bzw. vermindern können (West et al. 2002). Die Frage, welche Rolle die 5'-Polymorphismen in der 5'-UTR oder im Promoter haben, bleibt offen, da der Transkriptionsstartpunkt des *PEX1*-Gens noch nicht exakt bestimmt werden konnte. Die annotierte Sequenz aus der Gendatenbank (c.-96), der letzte stromaufwärts bindende Primer 455F (c.-123) und die Ergebnisse aus der 5'-*RACE*-PCR (c.-120) weisen eher daraufhin, dass die 5'-UTR-Region des *PEX1*-Gens stromabwärts der Position c.-137 beginnt. Es kann allerdings nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die 5'-UTR über die Position c.-120 hinausreicht.

5 Zusammenfassung

Zentraler Gegenstand der Arbeit war die Klärung der molekularen Ursache für die Entstehung der Peroxisomenbiogenesestörung bei zwei Patienten (ZS 8, ZS 26), bei denen im Vorfeld jeweils nur eine heterozygote Mutation im *PEX1*-Gen, c.2528 G>A (G843D), nachgewiesen worden war. Ein Defekt im *PEX1*-Gen wurde mithilfe einer Komplementierungsstudie als kausal nachgewiesen. Bei Einsatz der cDNS des Patienten ZS 26 in einer allelspezifischen PCR war nicht eindeutig, ob der Patient die Mutation G843D-homozygot oder -heterozygot trägt. Mithilfe einer allelspezifischen *real-time*-PCR wurde eine deutlich unterrepräsentierte Wildtyp-mRNS quantifiziert. Unter Verwendung einer in dieser Arbeit etablierten *long-range*-PCR konnte im *PEX1*-Gen von Patient ZS 26 eine zweite pathogene Mutation entdeckt werden, eine Deletion von Exon 10,11 und 12 mit einer Länge von 3,4 kb, die sich ebenfalls beim Vater des Kindes nachweisen ließ (g.20805_24642delins28829_29223 (NCBI Reference Sequence NC_000007.13)). Diese Deletion führt zu einer Leserasterverschiebung der mRNS, einem resultierenden vorzeitigen Stoppkodon mit *nonsense*-vermittelten mRNS-Zerfall. In der allelspezifischen *real-time*-PCR des Patienten ZS 8 wurde ebenso eine reduzierte Wildtyp-mRNS Expression detektiert, aber in der etablierten *long-range*-PCR kein Hinweis für eine größere Deletion des zweiten Allels gefunden.

In einer Luciferase-Untersuchung stellten Maxwell et al. (2005) den Effekt der beiden 5'-Polymorphismen c.-137 T>C und c.-53 C>G auf die *PEX1*-Genexpression dar. Bei 30 *PEX1*-defizienten Patienten traten in unseren Untersuchungen vier mögliche Konstellationen der 5'-Polymorphismen auf: c.-137 TT/c.-53 CC (43 %), c.-137 TC/c.-53 CG (37 %), c.-137 CC/c.-53 GG (10 %) und c.-137 TC/c.-53 CC (10 %). Der 5'-Polymorphismus an Position c.-53 ist auf dem allelischen Hintergrund des 5'-Polymorphismus an Position c.-137 entstanden, welcher auch unabhängig von dem 5'-Polymorphismus c.-53 C>G gefunden wurde. Aus der Genotyp-Verteilung ließ sich ableiten, dass die 5'-Polymorphismen nicht primär krankheitsverursachend sein können. Patienten mit homozygoter (bzw. heterozygoter) Mutation c.2097_2098insT waren homozygot (bzw. heterozygot) für beide 5'-Polymorphismen. Eine Korrelation der 5'-Polymorphismen zu der Mutation G843D war nicht zu erkennen. Es bleibt daher weiterhin offen, ob die 5'-Polymorphismen krankheitsmodulierend sind.

Mit der Kenntnis über den exakten Transkriptionsstartpunkt der *PEX1*-mRNS sollte

die Frage geklärt werden, ob einer oder beide 5'-Polymorphismen des *PEX1*-Gens, c.-137 T>C und c.-53 C>G, Teil der Promoterregion oder Teil der 5'-UTR sind. Mit einer 5'-*RACE*-PCR wurden in der Arbeit Klone detektiert, die an Position c.-120 den *PEX1*-mRNS-Beginn anzeigten. Es kann somit nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die 5'-UTR über die Position c.-120 hinausreicht.

6 Anhang: Tabelle 10

Long-range PCR			
DNS	Name	forward-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS	455e	5'cttccctggttactctccaaaagc3'	63
gDNS	455f	5'gcttccctctgttgccctgtctgg3'	63
gDNS	455	5'cgatctcctccggctccg3'	63
gDNS	457c	5'tacagtgacctatgattgtgccagtgc3'	63
gDNS	459a	5'caccatccaaaacatacacacac3'	63
gDNS	469a	5'cctgcatggactgagacaactatgag3'	63
gDNS	475a	5'gatgggtacattgtattgtcaagggtg3'	63
gDNS	483a	5'gaaagagcgataccatacactgcacc3'	63
gDNS	497a	5'gtaggctgttggtacatttctcaac3'	63
gDNS	493a	5'ccagaaggcatgggtctaataaacacc3'	63
DNS	Name	reverse-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS	456a	5'ctctcagggacgcggcgggacac3'	63
gDNS	460a	5'gaatgaattggggccaggcacagt3'	63
gDNS	468a	5'gcttagataggttcaggccagagagg3'	63
gDNS	472a	5'tgcacccggccaaagatattttcaatac3'	63
gDNS	476a	5'ggattgtctctatcttcacgcctagct3'	63
gDNS	484a	5'catttggtgcatattgtgctagaggc3'	63
gDNS	488a	5'ccgtgtgagtcaacaaggttactgag3'	63
gDNS	500a	5'gccccacataattctcctggtggtg3'	63
gDNS	509a	5'cctttaaattcttcaacaagacaccctct3'	63
gDNS	508a	5'ggagctggatgtagtatagtagagg3'	63

Eingrenzen der Deletion:			
DNS	Name	forward-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS	477b	5'gggaaggcaaaattcagcattttttatagc3'	63
gDNS	476-1	5'gggtgtaggggataaccttg3'	Seq
gDNS	476-2	5'actctcactttgtcactcaggc3'	Seq
gDNS	476-3	5'gtgttaagattcctaaggagtctattagg3'	Seq
gDNS	479	5'ggttgccacaatgacag3'	Seq
gDNS	519b	5'cttgagctttttcatattttttttg3'	Seq
gDNS	487	5'ccagctaagatgatggc3'	Seq
gDNS	481a	5'catgtgatgaacaagttttgtgatggg3'	63
gDNS	519a	5'agctgctacttagtcatttctgttagac3'	63
gDNS	483a	5'gaaagagcgataccatacactgcacc3'	63
cDNS	Pec 5 for	5'tcagagccactagatcaaaaaaaattagg3'	63
cDNS	Pec 6 for	5'ctctgagtatagttcattctggg3'	63
cDNS	Pec 7 for	5'cctctcagcagatgattgggaga3'	63
cDNS	Pec 1 for	5'cccatgtggagagagttgactgtaaagc3'	63
cDNS	Pec 2 for	5'ggctagagattttacagtactgtgg3'	63
cDNS	455C	5'gggtccttgccggcgtagg3'	63
cDNS	465	5'cagttgactcatcatcag3'	55
cDNS	455D	5'agagcgacgctccgggacg3'	63
cDNS	507a	5'gatggctttccatattgttaacagga3'	63

DNS	Name	reverse-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS	482a	5'gtgtgtgtttgaggccctgatgg3'	63
gDNS	483-1	5'atgtacatctgagtcctgtcctg3'	Seq
gDNS	483-2	5'cactactctgtgtatacttctcgata3'	Seq
gDNS	483-3	5'ggactgggttactaatcttactactcg3'	Seq
gDNS	478a	5'gggtttatacgacatatggaaagcattc3'	63
gDNS	490a	5'cattcacaatgctatgcaaccaccacct3'	63
gDNS	486a	5'gtgtttccagctaagatgatggca3'	63
gDNS	492a	5'gctagaggacgtggattctctatttc3'	63
cDNS	Pec 5 rev	5'gacctgcagcatgtagctaaagaac3'	63
cDNS	Pec 6 rev	5'caggaatactgtgtatggccgcct3'	63
cDNS	Pec 7 rev	5'cagggtgtttatgtattggctctac3'	63
cDNS	Pec 1 rev	5'ccagcggctgtctatgcttgaatg3'	63
cDNS	Pec 3 rev	5'ctacagcagctactaccacct3'	63
cDNS	Pec 4 rev	5'ctcacagcctctgggacgc3'	63

Allelspezifische PCR			
DNS	Name	forward-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS/cDNS	AS G843D wt F1	5'gggttgggacaagattgg3'	63/59
gDNS/cDNS	AS G843D mt F1	5'tgggttgggacaagattga3'	63/59
		reverse-Primer	
cDNS	Pec 6 rev kurz	5'ggaatactgtgtatggcc3'	59
gDNS	488a kurz	5'ccgtgtgagcaacaagt3'	63

Real-time PCR			
DNS	Name	forward-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
cDNS	HPRT	5'tgacactggcaaaacaatgca3'	59
cDNS	β-Aktin	5'tcaccacactgtgccatctacga3'	59
		reverse-Primer	
cDNS	HPRT	5'ggcctttcaccagcaagct3'	59
cDNS	β-Aktin	5'cagcgaaccgctcattgccaatgg3'	59

5'-RACE			
DNS	Name	forward-Primer	Anlagerungs-Temperatur [°C]
cDNS	Oligo-dT-Anker	5'gaccacgcgtatcgatgtcgactttttttttttv3'	63
cDNS	PCR-Anker	5'gaccacgcgtatcgatgtcgac3'	63
cDNS	neo3/for	5'gattgcacgcaggttctccg3'	63
		reverse-Primer	
cDNS	neo1/rev	5'caggcatcgccatgggtcac3'	63
cDNS	neo2/rev	5'gctgctctgtcctgcagttc3'	63
cDNS	SP1	5'tctcccaatcatctgctgagagg3'	63
cDNS	SP2	5'gacaagataccacatgggaacatg3'	63
cDNS	SP3	5'ttgttaagggaacagcatgcag3'	63

Klonierung			
	Name	<i>forward-Primer</i>	Anlagerungs-Temperatur [°C]
	T7	5'taatacgactcactataggg3'	63
		<i>reverse-Primer</i>	
	SP6	5'attagtgacactatag3'	63

Polymorphismenuntersuchung			
DNS	Name	<i>forward-Primer</i>	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS	455b	5'cgtgcgaagattgatgaacgaggtg3'	63
		<i>reverse-Primer</i>	
gDNS	456b	5'gcccttctggtagtctctggatc3'	63

G843D-Untersuchung			
DNS	Name	<i>forward-Primer</i>	Anlagerungs-Temperatur [°C]
gDNS	485a	5'ctgctccatccccagacaactacc3'	63
		<i>reverse-Primer</i>	
gDNS	488a	5'ccgtgtgagtaacaagtgttactgag3'	63

Amplifikation eines Produktes mit Position c.-137 und G843D			
DNS	Name	<i>forward-Primer</i>	Anlagerungs-Temperatur [°C]
cDNS	455C	5'gggtccttgcggcgctagg3'	63
cDNS	455	5'cgatctctccggctccg3'	63
cDNS	455G	5'ggccgatcgatctctccgg3'	63
cDNS	455E	5'ccgcagggggcggggcc3'	63
cDNS	455F	5'agggggcggggccgag3'	63
cDNS	455H	5'ccactacaggcttacggcagg3'	63
cDNS	455K	5'ccaccactacaggcttacggc3'	63
cDNS	455I	5'gacagaagcttctgtcccac3'	63
cDNS	455B	5'cgtgcgaagattgatgaacgaggtg3'	63
cDNS	455J	5'tgcgtgcgaagattgatgaac3'	63
		<i>reverse-Primer</i>	
cDNS	Pec10 rev	5'gtggaaggcaggcattttagtgatcaagg3'	63
cDNS	PEX 1-Ex 2	5'cttgactctcaaatggggg3'	60

Seq: nur zum Sequenzieren eingesetzt

Tabelle 10: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Übersicht der verwendeten Primer für die *long-range*-PCR, für das Eingrenzen der Deletion, für die allelspezifische PCR, für die *real-time* PCR und für die 5'-*RACE*-PCR mit anschließender Klonierung. Ferner sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die Polymorphismenuntersuchung in der 5'-Region des *PEX1*-Gens und für die G843D-Untersuchung sowie für die Amplifikation eines Produktes stromauf- und abwärts von Position c.-137 angegeben.

7 Literaturverzeichnis

Arai Y, Kitamura Y, Hayashi M, Oshida K, Shimizu T, Yamashiro Y (2008): Effect of dietary Lorenzo's oil and docosahexaenoic acid treatment for Zellweger syndrome. *J Congenit Anom* 48, 180-182

Auborg P (2007): X-linked adrenoleukodystrophy. *J Ann Endocrinol* 68, 403-411

Barkovich AJ, Peck WW (1997): MR of Zellweger syndrome. *J Neuroradiol* 18, 1163–1170

Bowen P, Lee CSN, Zellweger H, Lindenberg R (1964): A familial syndrome of multiple congenital defects. *J Bull Johns Hopkins Hosp* 114, 402-414

Braverman N, Steel G, Obie C, Moser AB, Moser HW, Gould SJ, Valle D (1997): Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Nat Genet* 15, 369–376

Brosius U, Gärtner J (2002): Cellular and molecular aspects of Zellweger syndrome and other peroxisome biogenesis disorders. *J Cell Mol Life Sci* 59, 1058-1069

Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jørgensen MM, Bolund L, Gregersen N (1999): Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *J Hum Mutat* 14, 186-198

Burke TW, Willy PJ, Kutach AK, Butler JE, Kadonaga JT (1998): The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *J Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 75-82

Butler JE, Kadonaga JT (2002): The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *J Genes Dev* 16, 2583-2592

Chakravarti A (2001): Single nucleotide polymorphisms: ...to a future of genetic medicine. *J Nature* 409, 822 - 823

Chatterjee S, Pal JK (2009): Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *J Bio Cell* 101, 251-262

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *J Anal Biochem* 162, 156–159

Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM (2002): Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl* 99, 3091-3101

Collins CS, Gould SJ (1999): Identification of a common PEX1 mutation in Zellweger syndrome. *J Hum Mutat* 14, 45-53

Collins CS, Kalish JE, Morrell JC, McCaffery JM, Gould SJ (2000): The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p and pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *J Mol Cell Biol* 20, 7516–7526

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1998): A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *J Genome Res* 8, 1229-1231

Crane DI, Maxwell MA, Paton BC (2005): PEX1-Mutations in the Zellweger Spectrum of the Peroxisome Biogenesis Disorders. *J Hum Mutat* 26, 167-175

De Duve C, Baudhuin P (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *J Physiol Rev* 46, 323-357

Den Dunnen JT, Antonarakis SE (2001): Nomenclature for the description of human sequence variations. *J Hum Genet* 109, 121-124

Dotz G, Gould SJ (1996): Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* 135, 1763–1774

Dotz G, Braverman N, Wong C, Moser AB, Moser HW, Watkins P, Valle D, Gould SJ

(1995): Mutations in the PTS1 receptor gene, PXR1, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *J Nat Genet* 9, 115–125

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W: Stoffwechsel des Sauerstoffs; in: Karlsons Biochemie; 15. Auflage, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 2005, 185-200

Frischmeyer PA, Dietz HC (1999): Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *J Hum Mol Genet* 8, 1893-1900

Gärtner J (2003): Is there a phenotype/genotype correlation in peroxisome biogenesis disorders (PBDs)? *J Adv Exp Med Biol* 544, 59–65

Gärtner J: Erkrankungen des Nervensystems; in: Kinder- und Jugendmedizin; hrsg. v. Koletzko B; 13. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2007, 559-605

Gärtner J, Roscher A: Peroxisomale Krankheiten; in: Pädiatrie – Grundlagen und Praxis; hrsg. v. Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Schaub J, Spranger J; 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2003, 399-404

Gärtner J, Preuss N, Brosius U, Biermanns M (1999): Mutations in PEX1 in peroxisome biogenesis disorders: G843D and a mild clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis* 22, 311-313

Geisbrecht BV, Collins CS, Reuber BE, Gould SJ (1998): Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophie, and infantile Refsum disease. *J Proc Natl Acad Sci* 95, 8630-8635

Geisbrecht BV, Zhang D, Schulz H, Gould SJ (1999): Characterization of PECL1, a novel monofunctional Delta(3), Delta(2)-enoyl-CoA isomerase of mammalian peroxisomes. *J Biol Chem* 274, 21797-21803

Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I, Gerner LM (1973): Peroxisomal and mitochondrial defects in

cerebro-hepato-renal syndrome. *J Science* 182, 62-64

Gould SJ, Valle D (2000): Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *J Trends Genet* 16, 340-345

Gould SJ, Raymond GV, Valle D: The peroxisome biogenesis disorders; in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; McGraw-Hill, New York 2001, 3181-3219

Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989): A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108, 1657-1664

Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF (2005): Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *J Cell* 122, 85-95

Jacobson A, Peltz SW (1996): Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *J Annu Rev Biochem* 65, 693-739

Krause C, Rosewich H, Gärtner J (2009): Rational diagnostic strategy for Zellweger syndrome spectrum patients. *Eur J Hum Genet* 17, 741-748

Kruglyak L, Nickerson DA (2001): Variation is the spice of life. *J Nat Genet* 27, 234-236

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Nature* 227, 680-685

Lazarow PB (2003): Peroxisome biogenesis: advance and conundrums. *J Curr Opin Cell Biol* 15, 489-497

Lazarow PB, Moser HW: The peroxisome biogenesis disorders; in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; 7. Auflage, McGraw-Hill, New York 1995, 2287-2324

Liu Y, Björkman J, Urquhart A, Wanders RJ, Crane DI, Gould SJ (1999): PEX13 is mutated in complementation group 13 of peroxisome-biogenesis disorders. *J Hum Genet* 65, 621–634

Lottspeich F: Polymerkettenreaktion: Nukleinsäureanalytik; in: Bioanalytik; hrsg. v. Engels JW; 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009, 767

Ma C, Subramani S (2009): Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *J IUBMB Life* 61, 713-722

Maeda K, Kimura A, Yamato Y, Nittono H, Takei H, Sato T, Mitsubuchi H, Murai Z, Kurosawa T (2002): Oral bile acid treatment in two Japanese patients with Zellweger syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35, 227–230

Maquat LE (1996): Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *J Hum Genet* 59, 279-286

Maxwell MA, Nelson PV, Chin SJ, Paton BC, Carey WF, Crane DI (1999): A common PEX1 frameshift mutation in patients with disorders of peroxisome biogenesis correlates with the severe Zellweger syndrome phenotype. *J Hum Genet* 105, 38-44

Maxwell MA, Allen T, Solly PB, Svingen T, Paton BC, Crane DI (2002): Novel PEX1 mutations and genotype–phenotype correlations in Australasian peroxisome biogenesis disorder patients. *J Hum Mut* 20, 342–351

Maxwell MA, Leane PB, Paton BC, Crane DI (2005): Novel PEX1 coding mutations and 5' UTR regulatory polymorphisms. *J Hum Mut* 26, 279

Mignone F, Grillo G, Licciulli F, Iacono M, Liuni S, Kersey PJ, Duarte J, Saccone C, Pesole G (2005): UTRdb and UTRsite: a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 141-146

Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S und Moser HW (1999):

Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *J Ann Neurol* 45, 100-110

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers JM, Moser AB: X-linked adrenoleukodystrophy; in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; McGraw-Hill, New York 2001, 3257–3302

Motley AM, Hettema EH (2007): Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J Cell Biol* 178, 399-410

Pickering BM, Willis AE (2005): The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *J Semin Cell Dev Biol* 16, 39-47

Poll-The BT, Gootjes J, Duran M, De Klerk JB, Wenniger-Prick LJ, Admiraal RJ, Waterham HR, Wanders RJ, Barth PG (2004): Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients. *Am J Med Genet A* 126, 333-338

Portsteffen H, Beyer A, Becker E, Epplen C, Pawlak A, Kunau WH, Dodt G (1997): Human PEX1 is mutated in complementation group 1 of the peroxisome biogenesis disorders. *J Nat Genet* 17, 449-452

Preuss N, Gärtner J (2001): Two polymorphic mutations (c2331A>C and IVS11+142insAGAAATTTTAAGTCTT) in the human peroxin 1 gene (PEX1). *J Hum Mutat* 17, 353

Preuss N, Brosius U, Biermanns U, Muntau AC, Conzelmann E, Gärtner J (2002): PEX1 mutations in complementation group 1 of Zellweger spectrum patients correlate with severity of disease. *J Pediatr Res* 51, 706–714

Purdue PE, Lazarow PB (2001): Peroxisome biogenesis. *J Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 701-752

Purdue PE, Zhang JW, Skoneczny M, Lazarow PB (1997): Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *J Nat Genet* 15, 381– 384

Raymond GV, Moser HW: Clinical diagnosis and therapy of peroxisomal diseases; in: *Organelle Diseases*; hrsg. v. Applegarth DA, Dimmick JA, Hall JC; Chapman & Hall London 1997, 169–192

Reddy JK, Mannaerts GP (1994): Peroxisomal lipid metabolism. *J Annu Rev Nutr* 14, 343-370

Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D, Gould SJ (1997): Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *J Nat Genet* 17, 445-448

Rhodin J: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. PhD Dissertation, Aktiebolaget Godvil, Stockholm 1954

Rosewich H, Ohlenbusch A, Gärtner J (2005): Genetic and clinical aspects of Zellweger spectrum patients with PEX1 mutations. *J Med Genet* 42, 58

Rosewich H, Waterham HR, Wanders RJ, Ferdinandusse S, Henneke M, Hunneman D, Gärtner J (2006): Pitfall in metabolic screening in a patient with fatal peroxisomal beta-oxidation defect. *J Neuropediatrics* 37, 95– 98

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *A laboratory Manual*; in: *Molecular cloning*. 2.Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *J Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463–5467

Schneeberger C, Mueller MW (2005): Genetische Variation. Eine Einführung aus naturwissenschaftlicher Sicht. *J of prev med* 12, 52-57

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30, 57

Schrader M, Fahimi HD (2006): Growth and division of peroxisomes. *J Int Rev Cytol* 255, 237-290

Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaqué I, Peters C, Cowan M, Harris R, Blanche S, Bordigoni P, Loes D, Ziegler R, Crittenden M, Ris D, Berg B, Cox C, Moser HW, Fischer A, Aubourg P (2000): Long term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *J Lancet* 356, 713-718

Steinberg S, Chen L, Wei L, Moser AB, Moser HW, Cutting G, Braverman N (2004): The PEX gene screen: molecular diagnosis of peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger syndrome spectrum. *J Mol Genet Metab* 83, 252–263

Steinberg S, Dodt G, Raymond GV, Braverman NE, Moser AB, Moser HW (2006): Peroxisome biogenesis disorders. *J Biochim Biophys Acta* 1763, 1733– 1748

Subramani S (1992): Targeting of proteins into peroxisomal matrix. *J Membr Biol* 125, 99-106

Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S (1991): A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 10, 3255-3262

Tamura S, Okumoto K, Toyama R, Shimosawa N, Tsukamoto T, Suzuki Y, Osumi T, Kondo N, Fujiki Y (1998): Human PEX1 cloned by functional complementation on a CHO cell mutant is responsible for peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group I. *J Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4350-4355

Tanaka K, Shimizu T, Ohtsuka Y, Yamashiro Y, Oshida K (2007): Early dietary treatments with Lorenzo's oil and docosahexaenoic acid for neurological

development in a case with Zellweger syndrome. *J Brain Dev* 29, 586-589

Thoms S, Erdmann R (2006): Peroxisomal matrix protein receptor ubiquitination and recycling. *J Biochim Biophys Acta* 1763, 1620-1628

van der Knaap MS, Valk J (1991): The MR spectrum of peroxisomal disorders. *J Neuroradiology* 33, 30–37

Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *J Proc Natl Acad Sci USA* 76, 615–619

Walter C, Gootjes J, Mooijer PA, Portsteffen H, Klein C, Waterham HR, Barth PG, Epplen JT, Kunau WH, Wanders RJ, Dodt G (2001): Disorders of peroxisome biogenesis due to mutations in PEX1: phenotypes and PEX1 protein levels. *J Hum Genet* 69, 35–48

Wanders RJ, Waterham HR (2004): Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *J Clin Genet* 67, 107– 133

Wanders RJ, Waterham HR (2006): Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *J Annu Rev Biochem* 75, 295–332

Wanders RJ, Schutgens RB, Barth PG (1995): Peroxisomal disorders: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 726-739

Wanders RJ, Barth PG, Heymanns HS: Single peroxisomal enzyme deficiencies; in: *The metabolic and molecular base of inherited disease*; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; McGraw-Hill, New York 2001, 3219-3256

Weller S, Gärtner J (2002): Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen: Entwicklungsstörungen von Peroxisomen. *J Monatsschr Kinderheilkd* 150, 226-237

Weller S, Gould SJ, Valle D (2003): Peroxisome biogenesis disorders. *J Annu Rev Genomics Hum Genet* 4, 165-211

Weller S, Rosewich H, Gärtner J (2008): Cerebral MRI as a valuable diagnostic tool in Zellweger spectrum patients. *J Inherit Metab Dis* 31, 270–280

West AG, Gaszner M, Felsenfeld G (2002): Insulators: Many functions, many mechanisms. *J Genes Dev* 16, 271–288

Yik WY, Steinberg SJ, Moser AB, Moser HW, Hacia JG (2008): Identification of novel mutations and sequence variation in the Zellweger syndrome spectrum of peroxisome biogenesis disorders. *J Hum Mutat* 30, 467-480

Danksagung

Herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. med. J. Gärtner für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Neuropädiatrie in der Universitätsmedizin Göttingen anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Sabine Grønborg, Herrn Dr. rer. nat. Sven Thoms und Herrn Dr. rer. nat. Andreas Ohlenbusch für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung. Ihnen danke ich für die Mithilfe bei der Planung der Versuche, bei der Anleitung zum praktischen Arbeiten im Labor, bei der Auswertung der Ergebnisse bis hin zum Korrekturlesen der fertigen Arbeit. Ihre intensive Betreuung habe ich immer sehr zu schätzen gewusst. Ein herzliches Dankeschön an Jens Kaiser für seine Hilfsbereitschaft im Labor. Bei Herrn Dr. med. Rosewich bedanke ich mich für die Zurverfügungstellung einzelner Patientendaten.

Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für das gute Arbeitsklima danken.