

Aus der Abteilung für Neurogenetik
(Prof. K.- A. Nave, Ph.D.)
des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin
Göttingen

**Auswirkungen des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon auf Peroxisomen des
Gehirns im X-ALD-Mausmodell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Kirstin Sinnig

aus
Rostock

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. M. Sereda

Ko-Referent/in: PD Dr. Sven Thoms

Drittreferent/in: Prof. Dr. Rainer Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 19.06.2017

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	1
1.1 DAS NERVENSYSTEM.....	1
1.1.1 <i>Funktion und Aufbau des Nervensystems</i>	1
1.1.2 <i>Aufbau und Funktionsweise des Neurons</i>	2
1.1.3 <i>Aufbau und Funktionsweise von Myelin</i>	4
1.1.4 <i>Rolle der Neurogenetik</i>	6
1.2 DAS PEROXISOM	6
1.2.1 <i>Beschreibung des Peroxisoms</i>	6
1.2.2 <i>Historie</i>	7
1.2.3 <i>Evolution</i>	8
1.2.4 <i>Biogenese und Vermehrung</i>	8
1.2.5 <i>Proteine und Metabolitentransport</i>	10
1.2.6 <i>Metabolismus und Aufgaben des Peroxisoms</i>	12
1.2.7 <i>Wichtige peroxisomale Proteine</i>	14
1.3 PEROXISOM-PROLIFERATOR-AKTIVIERTE REZEPTOREN (PPARS).....	15
1.3.1 <i>Allgemeines</i>	15
1.3.2 <i>Wirkmechanismus</i>	16
1.3.3 <i>Vorkommen der Isoformen</i>	16
1.3.4 <i>Liganden</i>	17
1.4 PEROXISOMALE STOFFWECHSELERKRANKUNGEN	18
1.4.1 <i>Einteilung der peroxisomal-bedingten Stoffwechselerkrankungen</i>	18
1.4.2 <i>Entwicklungsstörungen von Peroxisomen</i>	18
1.4.2.1 <i>Zellweger-Syndrom</i>	19
1.4.2.2 <i>Neonatale Adrenoleukodystrophie</i>	19
1.4.3 <i>Isolierte Defekte</i>	19
1.5 X-ADRENOLEUKODYSTROPHIE	20
1.5.1 <i>Beschreibung der Krankheit</i>	20
1.5.2 <i>Therapieansätze</i>	23
1.5.2.1 <i>Diätetischer Ansatz: Lorenzos Öl</i>	23
1.5.2.2 <i>Stammzelltransplantation</i>	24
1.5.2.3 <i>Verminderung von oxidativem Stress</i>	24
1.5.2.4 <i>Frühdagnostik</i>	25
1.5.3 <i>Tierversuchsmodelle der X-ALD</i>	25

2. GEGENSTAND UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	28
3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 VERWENDETE MATERIALIEN	29
3.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	29
3.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i>	30
3.1.3 <i>Enzyme und Reaktionskomplettsysteme</i>	32
3.1.4 <i>Nukleinsäuren</i>	32
3.1.5 <i>Oligonukleotide</i>	32
3.1.6 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	33
3.1.7 <i>Geräte</i>	34
3.1.8 <i>Software</i>	34
3.2 METHODEN.....	35
3.2.1 <i>Handhabung und Analyse von Versuchstieren</i>	35
3.2.1.1 Zucht von Versuchstieren	35
3.2.1.2 Tierhaltung	35
3.2.1.3 Tierfütterung	35
3.2.1.4 Gewichtskontrolle.....	36
3.2.1.5 Verhaltenstests	36
3.2.1.5.1 Grid-Test.....	36
3.2.1.5.2 Rotarod-Test.....	36
3.2.1.6 Tötung von Versuchstieren und Probenentnahme.....	37
3.2.2 <i>Gewebeanalysen</i>	37
3.2.2.1 Isolation von RNA	37
3.2.2.2 Messung der Konzentration und Qualität der RNA.....	38
3.2.2.3 Copy-DNA-Synthese durch Reverse Transkription von RNA	38
3.2.2.4 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mit cDNA.....	40
3.2.2.4.1 Funktionsweise einer qRT-PCR	40
3.2.2.4.2 Schmelzkurvenanalyse	41
3.2.2.4.3 Reaktionsansatz und Amplifikationsprotokoll.....	41
3.2.2.4.4 Auswertung der Ergebnisse	42
3.2.2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	43
3.2.2.5.1 Myelinpräparation aus Hirngewebe.....	43
3.2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	43
3.2.2.5.3 SDS-Gelelektrophorese.....	44
3.2.3 <i>Statistik</i>	45
4. ERGEBNISSE	46
4.1. ANALYSE DER GEWICHTSKONTROLLE UND DER MOTORIKTESTS.....	46
4.1.1 <i>Normales Körpergewicht der mit PPAR-γ-Agonisten behandelten Mäuse</i>	46
4.1.2 <i>Unauffällige Motorik im Grid-Test</i>	47
4.1.3 <i>Rotarod-Test zeigt keine motorischen Verschlechterungen</i>	48

4.2 ANALYSE DER GENEXPRESSION MIT QRT-PCR.....	49
4.3 PROTEINMESSUNG MIT WESTERN BLOTS.....	59
5. DISKUSSION.....	64
5.1 PHÄNOTYPIERUNG UND SUBSTANZTOXIZITÄT.....	64
5.2 GENEXPRESSIONS- UND PROTEINLEVELVERÄNDERUNG.....	64
5.2.1 <i>Gesteigerte PMP70-Expression als Marker des Peroxisomen-Turnovers im Gehirn.....</i>	<i>64</i>
5.2.2 <i>PMP70-Genredundanz zu ALDP hat Auswirkungen auf die Proliferation und β-Oxidation von Peroxisomen..</i>	<i>66</i>
5.2.3 <i>Hochregulation oxidativer Stressgene als Kennzeichen erhöhter Stressprotektivität in Peroxisomen.....</i>	<i>67</i>
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	68
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
8. DANKSAGUNG.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Grafische Darstellung eines Neurons	3
Abb. 2 Graue und weiße Substanz	4
Abb. 3 Myelin und Oligodendrozyten	5
Abb. 4 Elektronenmikroskopische Querschnitte vom Peroxisom	7
Abb. 5 Polyribosom mit peroxisomalen Proteinen	9
Abb. 6 Modelle der Peroxisomenentstehung	10
Abb. 8 Wirkungsmechanismus von PPARs	16
Abb. 9 Pathologische Kennzeichen der X-ALD	23
Abb. 10 Messung der Fluoreszenzintensität bei qRT-PCR	41
Abb. 11 Entwicklung des Körpergewichts	46
Abb. 12 Auswertung des Grid-Tests	48
Abb. 13 Auswertung des Rotarod-Tests	49
Abb. 14 qRT-PCR-Messung der PMP70-Expression	51
Abb. 15 qRT-PCR-Messung der PEX14-Expression	52
Abb. 16 qRT-PCR-Messung der ACAA1-Expression	53
Abb. 17 qRT-PCR-Messung der ACOX1-Expression	54
Abb. 18 qRT-PCR-Messung der MFP2-Expression	55
Abb. 19 qRT-PCR-Messung der SOD1-Expression	56
Abb. 20 qRT-PCR-Messung der GPX1-Expression	57
Abb. 21 qRT-PCR-Messung der PEX11b-Expression	58
Abb. 22 Proteinkonzentration von PMP70 durch Western Blot	60
Abb. 23 Proteinkonzentration von ACAA1 durch Western Blot	62

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACAA1	Acetyl-Coenzym-A-Acyltransferase1
ACOX1	Acyl-Coenzym-A-Oxidase1
ALD	Adrenoleukodystrophie
ALDP	<i>adrenoleukodystrophie protein</i>
ALDRP	<i>adrenoleukodystrophie- related protein</i>
AMN	Adrenomyeloneuropathie
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	<i>copy DNA</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidphosphat
DTT	1,4-Dithiotreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii, et aliae
GPX1	Gluthationperoxidase1
HBSS	<i>Hank 's buffered salt solution</i>
HLA	<i>human Leukocyte Antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSZT	Hämatopoeitische Stammzelltransplantation
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i>
LCFA	<i>long chain fatty acid</i>
MFP2	<i>multifunctional protein2</i>
mk	monoklonal
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PEX	Peroxin
PFA	Paraformaldehyd
pk	polyklonal
PMP	peroxisomales Membranprotein
PNS	peripheres Nervensystem
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	<i>peroxisome proliferator response element</i>
PTS	<i>peroxisomal targeting signal</i>
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygene species</i>
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RXR	<i>retinoid-X-receptor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOD1	Superoxid-Dismutase1
TBS	<i>tri buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylendiamin
TZD	Thiazolidindione
VLCFA	<i>very long chain fatty acid</i>
WT	Wildtyp
X-ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ZNS	zentrales Nervensystem
ZS	Zellweger-Syndrom

1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1.1 Das Nervensystem

1.1.1 Funktion und Aufbau des Nervensystems

Welche Aufgabe hat das Nervensystem? Wie ist es aufgebaut, wie funktioniert es und was passiert, wenn es nicht perfekt funktioniert? Das Gehirn selektiert, sortiert und interpretiert eine sehr große Menge an Informationen. Diese Informationen bekommt der Mensch nicht nur aus seiner Umgebung geliefert, sondern das Nervensystem muss vor allem auch Informationen aus dem eigenen Körper weiterleiten und verarbeiten. Alle Körperfunktionen müssen kontinuierlich kontrolliert und reguliert werden, damit das innere Milieu aufrecht erhalten werden kann. Ebenso wird die Interaktion mit der äußeren Umwelt im Umgang mit anderen Menschen und Lebewesen durch Verhalten und Sprache gesteuert (Brodal 2010). Das Nervensystem filtert die wichtigsten Informationen aus allen eintreffenden heraus, speichert sie ab und generiert eine probate Antwort, zum Beispiel in Form einer Muskelbewegung. Kurz ausgedrückt, besteht die Hauptaufgabe des Nervensystems also darin, den Organismus adäquat an seine Umwelt anzupassen (Brodal 2010).

Den Grundbaustein des Nervensystems bilden Glia- und Nervenzellen. Die Nervenzelle (Neuron) ist Übermittler und Träger von neuronalen Informationen, während Gliazellen – als häufigste Zellart im Hirngewebe - die wichtige strukturelle Stabilität dieser Informationsübertragung liefern. Es gibt drei verschiedene Unterformen der Gliazellen: Astrozyten oder Astroglia, die mit ihren Zellausläufern zerebrale Blutgefäße und Ventrikeloberflächen bilden und beim Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, stellen die zahlenmäßig größte Gruppe der Gliazellen dar. Des Weiteren sind Oligodendrozyten die im zentralen Nervensystem vorkommenden Myelin-bildenden Zellen, während die so genannten Schwann-Zellen diese Aufgabe im peripheren Nervensystem übernehmen. Schließlich sind die Mikroglia die Makrophagen des zentralen Nervengewebes (Zettl und Mix 2004).

Nervenzellen können Signale über große Strecken schnell weiterleiten. Alle schätzungsweise über 100 Milliarden Nervenzellen bilden zusammen ein sehr kompliziertes und hoch organisiertes Netzwerk der Informationsverarbeitung. Der eigentlichen Kommunikation dienen dabei die so genannten Aktionspotentiale, also kleinste Spannungsunterschiede zwischen Extra- und Intrazellulärraum, die einen elektrischen Impuls bilden. Sie werden durch

Neurone generiert, weitergeleitet und aufgenommen. Auf diese Weise können Signale von Sinnesorganen bzw. deren Rezeptoren zum entsprechenden Hirnareal fortgeleitet und verarbeitet werden. Am Ende der Reizverarbeitung wiederum sitzen sogenannte Effektoren, die Muskeln oder Drüsen, die die geeignete Antwort auf einen Reiz liefern. Damit sind nicht nur willkürliche Arm- oder Beinbewegungen, sondern auch die Reaktionen unzähliger Kleinstmuskeln des Körpers gemeint, die sich der menschlichen Bewusstwerdung häufig entziehen: Das sind zum Beispiel alle Bereiche der Spracherzeugung, der Mimik, Atmung oder Gefäßmuskelweitung oder -verengung zur Regulation des Blutdrucks (Brodal 2010).

Anatomisch betrachtet setzt sich das Nervensystem aus dem zentralen Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, sowie aus dem peripheren Nervensystem (PNS) zusammen. Das PNS stellt die neuronale Verbindung zwischen ZNS und Rezeptoren und Effektoren der Peripherie dar. Beide Systeme können außerdem in autonomes und somatisches Nervensystem unterteilt werden. Das autonome Nervensystem oder auch viszerales Nervensystem funktioniert ohne bewusste Wahrnehmung und Steuerung, also unwillkürlich. Es kontrolliert sämtliche Organprozesse zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus durch Steuerung des Herzmuskels und der glatten viszeralen Muskulatur. Dagegen werden im somatischen Nervensystem Informationen aus der Umwelt, zum Beispiel bei den Sinneswahrnehmungen wie Hören, Sehen, Tastsinn usw. bewusst wahrgenommen. Das somatische Nervensystem kontrolliert außerdem die Steuerung der willkürlichen (quergestreiften) Muskulatur wie beispielsweise derjenigen der Gliedmaßen (Brodal 2010).

1.1.2 Aufbau und Funktionsweise des Neurons

Neurone oder Nervenzellen bestehen aus Zellkörper (Soma) sowie aus mehreren Zellausläufern (Dendriten) und einer langen Nervenfasern, dem Axon (Abb. 1). Mehrere kurze Dendriten vergrößern die Input-Oberfläche des Neurons, aber nur das Axon kann Nervenimpulse an andere Neurone oder Muskelzellen weiterleiten.

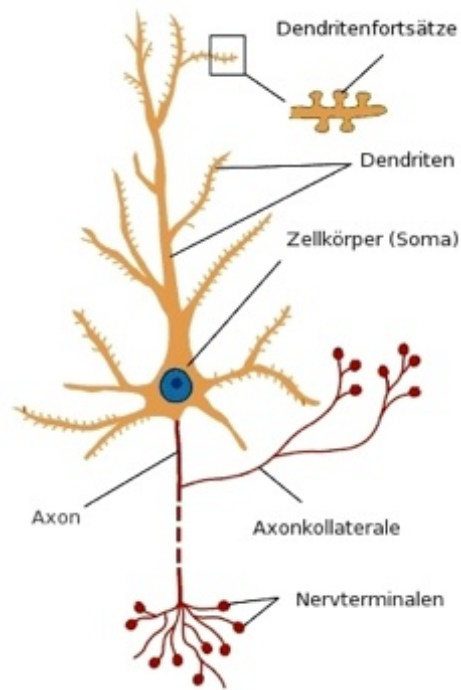


Abbildung 1. Grafische Darstellung eines Neurons. Zellkörper (Soma) mit Dendritenbaum und Axon (rot).

(modifiziert nach Brodal 2010, S. 6)

Nervenzellen haben die Eigenschaft, auf einen Stimulus mit der Generierung eines Nervenimpulses (Aktionspotential) zu antworten und diesen über weite Strecken weiterzuleiten. Das Aktionspotential resultiert aus der Verschiebung des Membranpotentials, das durch den Spannungsunterschied zwischen Extra- und Intrazellularraum einer Nervenzelle entsteht. Aufgrund der ungleichen Verteilung an positiv (Na^+ , K^+) und negativ (Cl^-) geladenen Partikeln innerhalb und außerhalb der Zelle entsteht ein Spannungsgefälle über der Zellmembran. Verantwortlich für das Ruhemembranpotential, das 60 mV beträgt, sind selektive Ionenkanäle entlang der Zellmembran. Durch die Öffnung der Kanäle strömen positiv geladene Ionen (vor allem Na^+) in die Zelle hinein. Dadurch erhält der Interzellularraum eine weniger negative Spannung, und es kann so bei ausreichend großer Depolarisierung durch die Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle ein Aktionspotential entstehen. Durch den Ausstrom an Kaliumionen wird der Membranabschnitt auf sein Ruhemembranpotential repolarisiert. Da Axone schlechte Leiter sind, muss die Erregung entlang des Axons immer wieder neu generiert werden. (Brodal 2010).

Der Kontaktbereich zwischen zwei Neuronen wird von einer Synapse gebildet. Hier werden chemische Signale, Neurotransmitter, von der Präsynapse ausgeschüttet, die den synaptischen Spalt per Diffusion passieren und so als Informationsübermittler an die Postsynapse dienen (Bloom 2001).

1.1.3 Aufbau und Funktionsweise von Myelin

Die Axone vieler Nervenzellen werden von einer fettreichen Isolationsschicht ummantelt, die Myelin genannt wird. Nervengewebe, das hauptsächlich aus myelinisierten Fasern besteht und nur wenige neuronale Somata enthält, erscheint makroskopisch weiß und wird folglich auch *weiße Substanz* genannt. Andere Bereiche enthalten vor allem neuronale Somata und Dendriten, sie erscheinen eher grau und werden als *graue Substanz* bezeichnet.

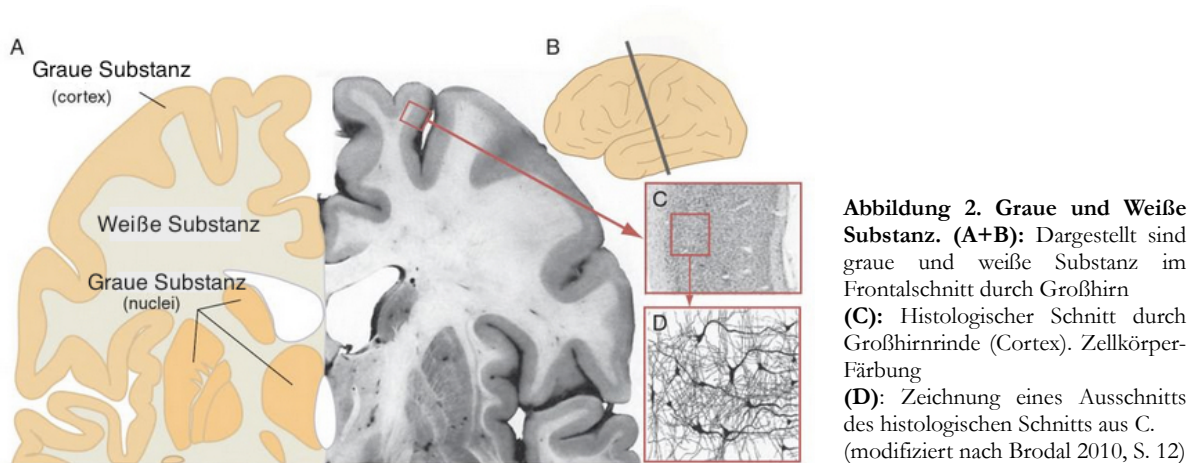


Abbildung 2. Graue und Weiße Substanz. (A+B): Dargestellt sind graue und weiße Substanz im Frontalschnitt durch Großhirn
(C): Histologischer Schnitt durch Großhirnrinde (Cortex). Zellkörperfärbung
(D): Zeichnung eines Ausschnitts des histologischen Schnitts aus C.
(modifiziert nach Brodal 2010, S. 12)

Myelinisierte Fasern besitzen eine weitaus höhere Nervenleitgeschwindigkeit als unmyelinisierte Axone. Dies wird dadurch ermöglicht, dass der Spannungsverlust durch umliegende Flüssigkeit vermindert wird, indem das Axon vom Myelin isoliert wird. So erreicht die Leitgeschwindigkeit von Aktionspotentialen bis zu 120 m/s, die Leitgeschwindigkeit von Axonen ohne Myelin nur etwa 1 m/s (Brodal 2010).

Gebildet wird das Myelin von speziellen Gliazellen. Diese myelinbildenden Zellen heißen im ZNS Oligodendrozyten und im PNS Schwann'sche Zellen. Während Schwann-Zellen durch konzentrische Extension ihrer Membran immer nur genau ein Axon ummanteln, ist ein Oligodendrozyt für die Myelinisierung von 30 bis 50 Axonen verantwortlich. Auch sie ummanteln die Axone in mehreren Lagen. Im Querschnitt erscheinen sie daher konzentrisch angeordnet (Abb. 3). Myelinsubstanz unterscheidet sich von der Zusammensetzung her von anderen Zellmembranen. Sie ist sehr reich an Cholesterin und Glykolipiden (Brodal 2010).

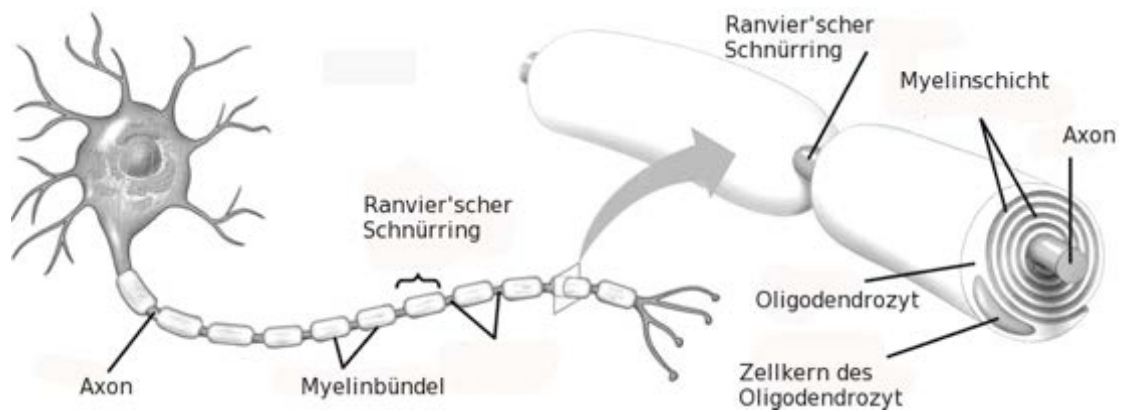


Abbildung 3. Myelin und Oligodendrozyten. Bildung des Myelins durch konzentrische Anordnung der Oligodendrozytenmembranen um ein Axon sowie der Ranvier'schen Schnürringe zwischen den Myelinabschnitten. (modifiziert nach Bloom 2001, S.53)

Im Längsschnitt fallen an myelinisierten Axonen die regelmäßigen Unterbrechungen in der Ummantelung auf, die als Ranvier'sche Schnürringe bezeichnet werden (Abb. 3). Sie kommen dadurch zustande, dass von einer Schwann'schen Zelle bzw. einem Oligodendrozytenfortsatz immer nur kurze Axonabschnitte, so genannte Internodien, ummantelt werden. Am Schnürring endet der myelinisierte Bereich durch einen Oligodendrozyten oder eine Schwann-Zelle. Nur an diesen Stellen hat das Axon Kontakt zur extrazellulären Flüssigkeit (EZF). Diese Struktur ermöglicht es, dass Ionen aus dem Nervimpuls durch die EZF von einem Myelinabschnitt zum anderen springen können. Das heißt, dass bei myelinisierten Fasern aufgrund der hohen Konzentration an spannungsabhängigen Natriumkanälen im Bereich der Schnürringe das Aktionspotential nur hier entsteht und dieser Reiz das Internodium zum nächsten Schnürring überspringt, um dort ein neues Aktionspotential auszulösen. Diese saltatorische Impulsfortleitung erhöht nochmals die Signalgeschwindigkeit um ein Vielfaches (Bloom 2001).

Stoffwechselerkrankungen, bei denen die Myelinbildung gestört ist, nennt man Leukodystrophien. Sie betonen die Wichtigkeit der weißen Substanz im Nervensystem. Das wohl bekannteste Beispiel für Krankheiten der weißen Substanz ist die Multiple Sklerose (MS), die vor allem junge Erwachsene betrifft und als unheilbar gilt. Obwohl die Ursache dieser Erkrankung noch nicht ganz geklärt ist, weiß man, dass neuronale Strukturen im Hirn durch Entzündungsprozesse demyelinisiert werden. In diesen Bereichen (so genannte *Plaques*) ist die Nervenfortleitung deutlich verlangsamt oder gar unterbrochen. Dies führt, häufig beginnend am optischen Nerv, zur schubweisen physischen und mentalen Degeneration der Patienten.

1.1.4 Rolle der Neurogenetik

An der Erforschung des Nervensystems arbeiten verschiedene wissenschaftliche Disziplinen. Im Bereich der Abteilung für Neurogenetik, an welcher diese Arbeit erstellt wurde, beschäftigt man sich mit Genen und dem Mechanismus ihrer Wechselwirkungen, die für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems von Bedeutung sind. Es handelt sich um ein wissenschaftliches Fachgebiet zwischen Neurowissenschaft und Genetik und basiert auf dem Beobachten von Verhalten und von Stoffwechselprozessen der neuronalen Systeme vor dem Hintergrund der genetischen Ausstattung bzw. auf Grundlage von Mutationen genetischen Materials. Solche Mutationen können teils drastische Folgen für die Lebensqualität von Individuen haben.

1.2 Das Peroxisom

1.2.1 Beschreibung des Peroxisoms

Peroxisomen gehören vermutlich zu den am wenigsten verstandenen Zellorganellen, die in eukaryotischen Lebewesen zu finden sind. Man vermutete zunächst, dass sie nur an der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt wären. Jedoch werden sie selbst nach 40 Jahren intensiver Forschung heutzutage noch als geheimnisvolle Zellorganellen betrachtet, weil immer weitere Stoffwechselwege aufgezeigt werden, an denen sie beteiligt sind (Gabaldon 2010).

Die für den Menschen wichtige Bedeutung dieser Organellen kann an den Krankheitsbildern bemessen werden, denen zum Beispiel das komplette Fehlen von Peroxisomen zugrunde liegt, wie dem tödlich verlaufenden Zellweger-Syndrom (Weller et al. 2003).

Bei Peroxisomen handelt es sich um etwa 0,5 μm große Zellorganellen, die von einer einfachen Membran umschlossen sind. Ihre Matrix ist dicht granulär; manchmal zeigen sie aufgrund der hohen Konzentration an Redoxenzymen wie Katalase und Uratoxidase in elektronenmikroskopischen Bildern eine kristalline Kernstruktur (de Hoop und Ab 1992; Alberts et al. 2003; Abb. 4).

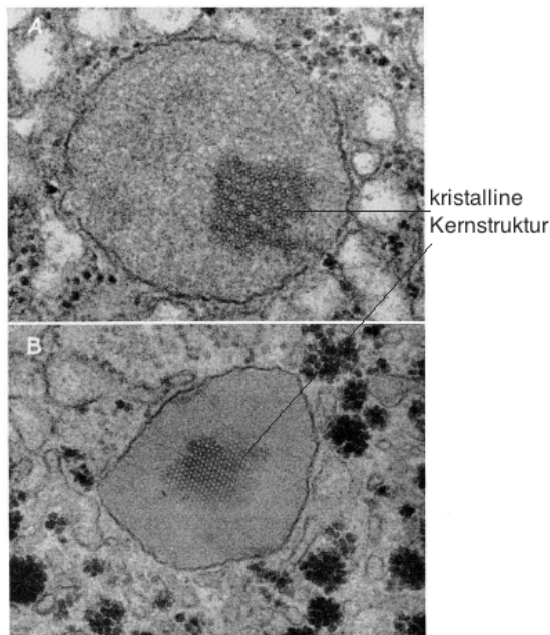


Abbildung 4. (A+B) Elektronenmikroskopische Querschnitte vom Peroxisom aus der Leber von einer Ratte (A) und einem Meerschweinchen (B).
 Die Kernstruktur erscheint kristallin und tubulär.
 (modifiziert nach de Duve und Baudhuin 1966, S. 333)

1.2.2 Historie

Zunächst mit dem Begriff der *Microbodies* versehen, wurden Peroxisomen im Jahr 1954 das erste mal von Rhodin erwähnt, der diese bis dahin völlig neue Zellstruktur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Nierenzellen in Mäusen erkennen konnte (de Hoop und Ab 1992). Zu einem neuen Zellorganell, das strukturell innerhalb der Zelle abgetrennt ist und besondere Funktionen besitzt, wurden Peroxisomen allerdings erst Jahre später von de Duve und seinem Team gezählt, als sie 1966 Peroxisomen aus Rattenleber isolieren und deren biochemische Eigenschaften analysieren konnten. Sie konnten Uricase (Uratoxidase), D-Aminosäureoxidase und Katalase in Peroxisomen detektieren und fanden heraus, dass sie an der Produktion und am Abbau von Wasserstoffperoxid beteiligt sind. Daher benannten sie die bis dahin als *Microbodies* bezeichneten Organellen in den heutigen Begriff der „Peroxisomen“ um (de Duve und Baudhuin 1966).

Später konnten Peroxisomen auch aus anderen Tierspezies erfolgreich extrahiert werden, so dass bekannt wurde, dass zwar die meisten peroxisomalen Proteine identisch sind, ihre speziellen metabolischen Aufgaben und insbesondere die in ihnen enthaltenen Enzyme sich jedoch in den verschiedenen Geweben sogar derselben Spezies unterscheiden können. Selbst morphologisch sind sie so unterschiedlich, dass sie irrtümlich für ein komplett neues Zellorganell gehalten wurden und sogar unterschiedlich benannt wurden (Gabaldon 2010). So wurden zum Beispiel in Trypanosomatida Peroxisomen gefunden, die glykolytische Reaktionen eingehen und daher „Glykosom“ genannt wurden (Michels et al. 2006).

1.2.3 Evolution

In den 60er Jahren ließen zunächst die frühesten Aufnahmen darauf schließen, dass Peroxisomen mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) nach der *Budding*-Theorie interagieren, woraufhin man sie dem Endomembransystem zuordnete (Purdue und Lazarow 2001). 1985 veröffentlichten Lazarow und Fujiki die Entdeckung, dass neue Peroxisomen durch Teilung von bereits existierenden Peroxisomen entstehen und dass deren Proteine an freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert und anschließend posttranslational importiert werden. So deuteten sie den Ursprung der Peroxisomen im Sinne der Endosymbiontentheorie, weil sich auch Mitochondrien und Chloroplasten - die bakteriellen Ursprungs sind - durch Teilung vermehren können und der Import ihrer Proteine posttranslational stattfindet (Lazarow und Fujiki 1985). De Duve jedoch war derjenige, welcher die Hypothese, wonach Peroxisomen durch Endosymbiose entstehen, im Jahr 1982 als erster postuliert und am meisten vorangetrieben und weiterentwickelt hat (Gabaldon 2010).

In den letzten Jahren wurde diese Theorie jedoch zunehmend angezweifelt. In den Fokus rückte wieder die ursprüngliche Idee, dass es eine enge Beziehung zwischen dem ER und der Biogenese der Peroxisomen geben muss. Experimente haben bewiesen, dass einige peroxisomale Membranproteine, so genannte PMPs, zuerst ein Targeting im ER unterlaufen müssen, bevor sie zum Peroxisomen gelangen (Tabak et al. 2003). Weiterhin wird berichtet, dass Mutanten von Hefen mit gar keinen Peroxisomen in der Lage sind, ganz neue Peroxisomen zu bilden, nachdem sie funktionell komplementiert wurden (Titorenko et al. 1997). Einige Wissenschaftler waren hiernach davon überzeugt, dass der Ursprung der peroxisomalen Membran im ER liegen müsse (Titorenko et al. 1997). Dennoch blieben Spekulationen über eine etwaige Beteiligung eines Endosymbionten am evolutionären Ursprung des Peroxisoms weiterhin bestehen (de Duve 2007).

1.2.4 Biogenese und Vermehrung

Der Vermehrungsprozess von Peroxisomen wurde demnach lange in der Wissenschaft debattiert. Die Diskussion stützt sich dabei auf zwei völlig unterschiedliche Annahmen: Die erste Theorie beinhaltet die Aussage, dass sich Peroxisomen – analog den Mitochondrien – durch Wachstum und Teilung vermehren (Lazarow 2003). Dagegen geht die zweite Theorie davon aus, dass sie *de novo* aus dem ER in einem Reifungsprozess neu entstehen (Tabak et al. 2003).

Hoepfner und sein Team konnten 2001 in fluoreszenzmarkierten Zeitrafferaufnahmen von *Saccharomyces Cerevisiae* belegen, dass neue Peroxisomen aus bereits existenten Peroxisomen

entstehen. Er beschrieb weiterhin, dass sich die Zahl der Peroxisomen vor jeder Zellteilung verdoppelt, so dass beide Tochterzellen wieder mit einer kompletten Peroxisomenpopulation ausgestattet sind (Hoepfner et al. 2001).

Matrixproteine werden bei der Teilung an freien Polyribosomen synthetisiert und posttranslational in bereits existierende Peroxisomen importiert. Membranproteine werden ebenso an freien Polyribosomen gebildet und auch posttranslational in bestehende Peroxisomenmembranen eingebracht. (Lazarow und Fujiki 1985; Abb. 5).

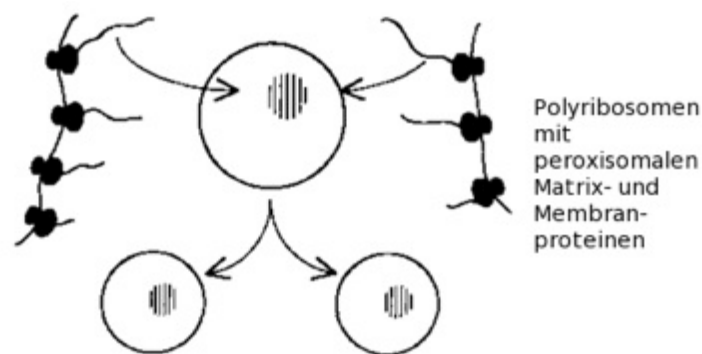


Abbildung 5. Polyribosomen mit peroxisomalen Proteinen. Dargestellt sind freie Polyribosomen, an denen peroxisomale Matrix- und Membranproteine synthetisiert und anschließend in bereits existierende Peroxisomen importiert werden. (modifiziert nach Lazarow und Fujiki 1985, S. 520)

Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass sich Peroxisomen durch einen Reifungsprozess auch neu aus dem ER bilden können. Dies zeigte das bereits angesprochene Phänomen, dass selbst komplett peroxisomenlose Mutanten nach funktioneller Komplementierung dazu fähig sind, neue Peroxisomen zu formen (Thoms und Erdmann 2003). Dieser Prozess beginnt mit der Abschnürung von Vorläufervesikeln aus dem ER, die dann untereinander oder mit einem bereits vorhandenen Peroxisomen zu einem reifen Peroxisom fusionieren. Motley und Hettema haben 2007 erkannt, dass sich Peroxisomen in Hefen nur dann *de novo* bilden, wenn es (temporär) gerade gar keine Peroxisomen in der Zelle gibt. Sind dagegen Peroxisomen vorhanden, so stellt das ER der Synthese Membrankomponenten bereit. In humanen Zellen scheint die *de novo*-Synthese jedoch auch unter Präsenz von Peroxisomen abzulaufen. Möglicherweise leistet die *de novo*-Synthese einen erheblichen Beitrag zur Peroxisomenproliferation (Hettema und Motley 2009).

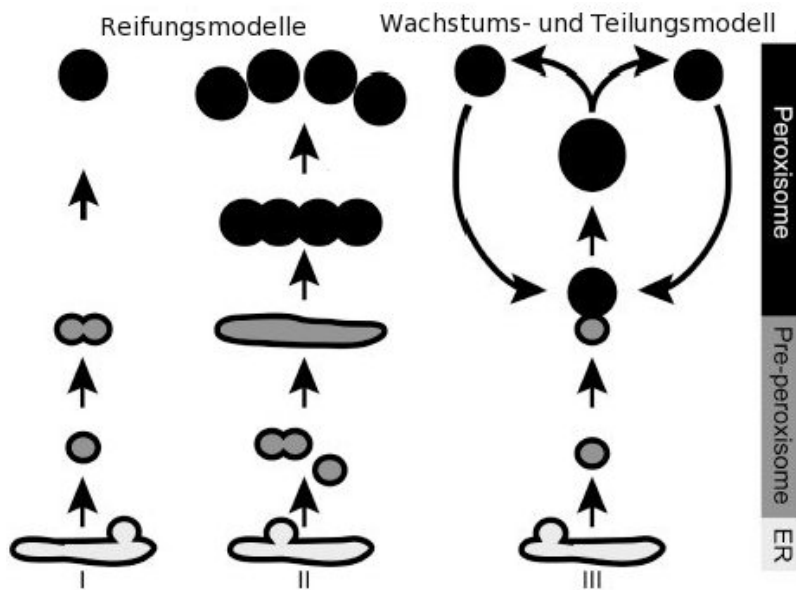


Abbildung 6. Modelle der Peroxisomenentstehung. Die ersten beiden Modelle zeigen die Vermutung, dass Peroxisomen de novo aus dem ER geformt werden. Peroxisomale Membranstrukturen aus dem ER (engl. *Preperoxisomes*) reifen demnach zu Peroxisomen heran. Das dritte Modell dagegen stellt die andere Herkunftshypothese dar, wonach sich Peroxisomen vermehren indem sie sich teilen. Das ER stellt diesem Prozess Lipide und Membranproteine in Form von präperoxisomalen Strukturen parat, die mit den Peroxisomen fusionieren.
(modifiziert nach Hetteema und Motley 2007, S. 400)

Der heutige Wissenstand legt also nahe, dass sich Peroxisomen sowohl durch Teilung als auch durch die *de novo*-Synthese vermehren. Das Endoplasmatische Retikulum ist offensichtlich aber an beiden Möglichkeiten der Vermehrung beteiligt, da hier die Membranbestandteile gebildet werden können (Hetteema und Motley 2009).

1.2.5 Proteine und Metabolitentransport

Da den Peroxisomen ein eigenes Genom fehlt, sind alle peroxisomalen Proteine von der zellulären DNA im Nucleus enkodiert. Luminale Proteine werden, wie bereits beschrieben, an freien Ribosomen im Zytosol synthetisiert und dann im gefalteten Zustand in das Peroxisom importiert. Die Proteine benötigen dazu entweder eine C-terminale Signalsequenz, das so genannte *peroxisome targeting signal type 1* (Peroxisomen-Zielsignal; PTS1), oder eine Aminoterminal-Seqenz (PTS2). Meistens besteht sie nur aus den drei Aminosäuren Serin, Lysin und Leuzin. Diese Sequenz wird dann erst im Zytosol von bestimmten peroxisomalen Biogenesefaktoren erkannt. Zu diesen Peroxinen gehört auch PEX5p, das die PTS1-Sequenzen nach Erkennung bindet und für die Translokation in das Peroxisom notwendig ist. An der Peroxisomenmembran dockt der PEX5p-PTS1-Protein-Komplex dann an dem Membranprotein PEX14 an und wird anschließend durch einen weiteren Proteinkomplex ins Innere des Organells transportiert. Bei Proteinen mit einer aminoterminalen Sequenz (PTS2) findet die Signalerkennung im Zytosol durch PEX7p statt. PEX18p erkennt daraufhin den

PEX7p-PTS2-Proteinkomplex und geleitet diesen zur peroxisomalen Membran, von wo aus er durch bestimmte Membranproteine in das Zellorganell eingeschleust wird (Fransen et al. 1998; Vladimir et al. 2001).

Durch Mutation von bestimmten PEX-Genen wie PEX5p und PEX7p kann es zu einem fehlerhaften peroxisomalen Proteinimport und schließlich zu peroxisomaler Dysfunktion kommen (Nyhan et al. 2011).

Entgegen ersten Annahmen, die Membran von Peroxisomen sei gegenüber kleinen Molekülen durchlässig, fand man später das Gegenteil heraus. Ein Hinweis darauf, dass die Membran eine geschlossene Struktur darstellen müsse, war die Entdeckung eines vom Zytosol unterschiedlichen intra-peroxisomalen pH-Wertes. Dieser konnte zunächst in Hefen und später auch in menschlichen Peroxisomen nachgewiesen werden (Nicolay et al. 1987; Dansen et al. 2000). Daraus wurde abgeleitet, dass es entsprechende Transportsysteme für peroxisomale Metabolite (z.B. für Fettsäuren) geben müsse, die diesen pH-Gradienten zwischen Peroxisom und Zytosol als treibende Kraft nutzen (van Roermund et al. 2004). Andererseits könnte der Gradient auch das Resultat dieser Metabolitentransporte sein (Palmieri et al. 2001).

Zu den Transportsystemen gehört u.a. die Familie von Membranproteinen mit dem Namen ABC-Transporter. Allen gemeinsam ist ihnen das Strukturelement der ATP-bindenden Kassette (von englisch: *ATP binding cassette*, ABC), durch dessen Bindung und Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) Energie erzeugt werden kann. Dadurch wird ermöglicht, Substrate aktiv, also gegen einen Konzentrationsgradienten über eine Zellmembran zu transportieren. Fehler in der Funktionsweise solcher Transporter können schwerwiegende Folgen haben. Als Beispiele sind die Erkrankungen der so genannten zystischen Fibrose (Mukoviszidose) und der Adrenoleukodystrophie (X-ALD) zu nennen (Dean 2002).

In der peroxisomalen Membran von Säugetieren kommen 4 unterschiedliche ABC-Halb-Transporter vor: Das Adrenoleukodystrophie-Protein (ALDP oder ABCD1), *ALD related protein* (ALDRP oder ABCD2), das 70kD peroxisomale Membranprotein (PMP70 oder ABCD3) und *PMP70 related protein* (PMP70R oder ABCD4). Sie sind aus zwei ähnlichen hydrophoben Hälften aufgebaut, die wiederum jeweils aus sechs Transmembran-Alpha-Helices und einer hydrophilen Nukleotid-bindenden Domäne bestehen. Beide Hälften werden bei ganzen Transportern von einem einzigen Gen kodiert; bei Halb-Transportern hingegen von zwei Genen. Halb-Transporter, wie ABCD1, müssen homo- oder heterodimerisieren, um einen ganzen ABC-Transporter bilden zu können. Die Funktion dieser 4 Transporter in

Säugetieren - vor allem im Vergleich zu Hefen - ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Versuche an Fibroblasten von ALD-Patienten ergaben eine verminderte β -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren (engl. *very long chain fatty acids*; VLCFA). Dies könnte darauf hindeuten, dass ABCD1 wahrscheinlich für die Einschleusung der VLCFAs in das Peroxisom verantwortlich ist (Kemp et al. 2012). PMP70 wird unterdessen mit dem Transport von LCFAs (engl. *long chain fatty acids*) in Zusammenhang gebracht (Wanders und Waterham 2006).

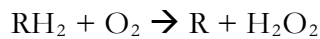
1.2.6 Metabolismus und Aufgaben des Peroxisoms

Peroxisomen sind in eine Vielzahl metabolischer Vorgänge involviert. So findet die β -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren (VLCFAs) ausschließlich in Peroxisomen statt. Darüber hinaus erfolgen hier eine Reihe oxidativer Stoffwechselvorgänge wie beispielsweise der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, der Glyoxylat-Stoffwechselweg und ein Teil des Aminosäurekatabolismus sowie des Pentosephosphatwegs. Der direkte peroxisomale Beitrag am Cholesterinstoffwechsel ist umstritten. Darüber hinaus sind Peroxisomen auch an der Bildung von Lipiden – insbesondere den Plasmalogenen, einer speziellen Gruppe von Phospholipiden, die in der Myelinscheide vermehrt vorkommen,- beteiligt (Wanders und Waterham 2006). Auf einige Aufgaben soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

In höheren Eukaryoten findet die β -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren sowohl im Mitochondrium als auch im Peroxisomen statt, während bei Hefen und Pflanzen allein die Peroxisomen dafür verantwortlich sind (Wanders und Waterham 2006). Der Grund dafür liegt im Fehlen der sehr langkettigen Acyl-CoA-Synthetase im Mitochondrium (Mannaerts und Veldhoven 1996). Bei der β -Oxidation werden die Alkylketten der Fettsäuren durch Reaktion mit Coenzym A schrittweise um zwei Kohlenstoff-Einheiten verkürzt, wobei immer eine Acetyl-CoA-Einheit entsteht (Alberts et al. 2003). Die kettenverkürzten VLCFAs können dann als langkettige Fettsäuren (LCFAs) den Mitochondrien zugeführt und dort vollständig oxidiert werden (Mannaerts und Veldhoven 1996). Dennoch unterscheiden sich die beiden β -Oxidationen hinsichtlich ihrer Funktionen (Wanders und Waterham 2006). Dies lässt sich vor allem an den klinisch unterschiedlichen Symptomen von mitochondrial oder peroxisomal bedingten Störungen der β -Oxidation erkennen (Rinaldo et al. 2002; Wanders 2004). Der Hauptunterschied der β -Oxidation zwischen beiden Organellen besteht in den unterschiedlichen Substraten sowie im Transport der Substrate und Produkte über die Organellenmembran: Kurze, mittellange und langkettige Fettsäuren werden nur im

Mitochondrium β -oxidiert. Die sehr langkettigen Fettsäuren können dagegen nur von Peroxisomen abgebaut werden - allen voran die Cerotinsäure (C26:0). Ins Mitochondrium gelangen die LCFAs über den Carnitin-Zyklus; kurze und mittellange Fettsäuren in ihrer protonierten Form können dagegen direkt in die Zellorganelle eingeschleust werden. Ins Peroxisomen gelangen die Fettsäuren wiederum vermutlich als Ester des Acyl-CoAs (van Veldhoven 2010).

Da bei oxidativen Stoffwechselfvorgängen im Peroxisom oft molekularer Sauerstoff als Co-Substrat gebraucht wird, entsteht bei diesen Reaktionen zusammen mit Wasserstoffatomen von bestimmten organischen Verbindungen (=R) sehr reaktives Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Alberts et al. 2003).



Hierfür verfügt das Peroxisom über eine Vielzahl von Enzymen, den so genannten Oxidasen, die Sauerstoff (O_2) zu Wasserstoffperoxid reduzieren können. H_2O_2 ist ein Zellgift im Zytoplasma, das Biomoleküle zerstören kann. So wird H_2O_2 noch im Peroxisom von Enzymen wie der Katalase unschädlich gemacht. Bei der Spaltung von Wasserstoffperoxid entstehen dann wieder Sauerstoff und Wasser (Wanders und Waterham 2006; Alberts et al. 2003):



Diese Eigenschaft von Peroxisomen stellte den initialen Hinweis dar, dass sie mit oxidativen Stoffwechselfvorgängen überhaupt in Verbindung stehen würden. Später fand man heraus, dass es neben den Wasserstoffperoxid bildenden peroxisomalen Enzymen auch noch andere reaktive Spezies gibt wie zum Beispiel die Superoxid-Anionen. Die Inaktivierung dieser erfolgt über die Superoxid-Dismutasen. Auch gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von intraperoxisomaler Entstehung von Stickstoffmonoxid-Spezies (NO). Zusammen mit den Superoxid-Anionen kann NO das hochreaktive Peroxynitrat bilden. Die letzte Gruppe der reaktiven Spezies in Peroxisomen bilden die Epoxid-Hydrolasen. Epoxide sind hochreaktive Moleküle endo- und exogener Herkunft. Hochgradig karzinogene und mutagene Stoffe werden erst dann aktiv, wenn sie in ihre Epoxid-Form überführt werden. Sie sind äußerst elektrophil und können daher sehr schnell mit nukleophilen Verbindungen wie ungesättigten Fettsäuren, DNAs, RNAs oder Proteinen eine Reaktion eingehen (Wanders und Waterham 2006).

Peroxisomen leisten durch die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoff- (engl. ROS = *reactive oxygen species*) sowie Stickstoffverbindungen (engl. RNS = *reactive nitrogen species*) einen erheblichen Beitrag zur Vermeidung von übermäßig gebildetem oxidativem Stress. Oxidativer Stress als Konsequenz von übermäßigen ROS- und RNS-Konzentrationen wird unter anderem als Ursache für den Alterungsprozess von Lebewesen angesehen. Es wird ebenso als möglicher Ko-Faktor bei der Entstehung von Entzündungen, zystischer Fibrose, Typ-2-Diabetes, Krebserkrankungen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer in Zusammenhang gebracht. ROS-Verbindungen sind allerdings nicht nur schädlich. Sie spielen offensichtlich auch als Mediator eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen und Signalwegen, wie zum Beispiel bei der Apoptose (Schrader und Fahimi 2006).

ROS allgemein stellen Radikale dar, die wie etwa das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) freie oder unpaare Elektronen besitzen. $O_2^{\cdot-}$ entsteht bei der Reduktion von Sauerstoff ($O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot-}$). Selbst das H_2O_2 wird zu den ROS gezählt, obwohl es gar kein unpaares Elektron aufweist und demzufolge kein Radikal ist. Die giftigste und am höchsten reaktive Form von Sauerstoff ist das Hydroxid-Radikal (OH^{\cdot}). Ähnlich den ROS beinhalten RNS radikale Spezies wie das Stickstoffmonoxid-Radikal (NO^{\cdot}). NO^{\cdot} und H_2O_2 sind deswegen viel weniger gefürchtet als OH^{\cdot} , weil sie membrangängig sind. Das heißt, sie können einfach durch diese Zellbarriere hinein- oder hinausdiffundieren und sind somit weniger reaktiv als OH^{\cdot} (Schrader und Fahimi 2006).

Es konnte interessanterweise auch gezeigt werden, dass der oxidative Stresslevel durch die Peroxisomen selbst - verursacht durch eine Hochregulation an peroxisomalen Proteinen und somit dem Vorhandensein von vermehrten Peroxisomen - erhöht sein kann. Dies fand man heraus, als man durch Gabe von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR)-Liganden vermehrt Peroxisomen zu finden waren. Dieser Zustand allerdings führte wahrscheinlich dazu, dass das antioxidative Limit der gesamten Zellen überschritten wurde und so kanzeröse Vorgänge ausgelöst wurden (Schrader und Fahimi 2006).

1.2.7 Wichtige peroxisomale Proteine

In der vorliegenden Studie wurden die Expressionsniveaus der Gene PMP70, PEX14, ACOX1, MFP2, ACAA1, SOD1, GPX1 und PEX11b überprüft. Das Gen PMP70 (ABCD3) kodiert für einen ABC-Transporter in der Peroxisomenmembran und hat wichtige Funktionen bezüglich des Metabolitentransports in das Zellorganell.

Ein weiteres Membranprotein mit dem Namen PEX14 wird vom gleichnamigen Gen transkribiert. PEX14 ist auch am Proteintransport ins Lumen von Peroxisomen beteiligt und ebenso in der peroxisomalen Membran anzutreffen, wobei sein C-terminales Ende in das Zytosol hinausragt und mit PTS1-Erkennungssequenzen und PEX5p interagiert.

Bei ACOX1 handelt es sich um das für das Protein Acyl-CoA-Oxidase1 kodierende Gen. Dieses Protein stellt das erste Enzym im Prozess der Betaoxidation dar. Ein Gendefekt kann zu pseudoneonataler Adrenoleukodystrophie mit erhöhtem VLCF-Level führen. Bei Veränderung des Expressionsniveaus kann die Betaoxidationsrate beeinflusst sein.

MFP2 (oder *D-bifunktionelles Protein*) steht für Multifunktionelles β -Oxidations-Protein und ist ebenso wie ACOX1 in der peroxisomalen β -Oxidation involviert. Das ACCA1-Gen trägt die Kodierung für das Protein mit dem Namen Acetyl-Coenzym-A-Acyltransferase1. Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der β -Oxidation in Peroxisomen. Ähnlich wie bei ACOX1 kann anhand dieses Markers ein Teil des Abbaus von überlangkettigen Fettsäuren überwacht werden.

SOD1 ist das Äquivalentgen für eine von drei Superoxid-Dismutasen, die bei der Elimination von oxidativem Stress eine große Rolle spielen, indem sie freie Superoxidradikale im Körper zerstören. So ist auch Gluthationperoxidase, durch GPX1 enkodiert, eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme des Körpers. Es kann das Zellgift Wasserstoffperoxid unschädlich machen. SOD1 und GPX1 sind Marker des oxidativen Stresslevels bzw. des Niveaus der antioxidativen Elevation.

PEX11b steht für engl. *peroxisomal biogenesis factor 11 beta*. PEX11b als Protein gehört zur PEX11-Familie. Delille et al. haben 2010 in ihrer Veröffentlichung postuliert, dass PEX11b als Mediator bei der Vermehrung und Teilung von Peroxisomen agiert. Das Expressionslevel von PEX11b ist somit ein Indikator für die Neuentstehung von Peroxisomen (Wanders et al. 2006; van Veldhoven 2010).

1.3 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

1.3.1 Allgemeines

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind eine Gruppe von nukleären Rezeptoren, die durch spezifische Liganden aktiviert als Transkriptionsfaktoren die Expression vieler Gene regulieren können. Sie wurden ursprünglich nur mit der Hochregulierung von hepatischen Peroxisomen bei Mäusen und Ratten in Verbindung

gebracht und wurden dementsprechend benannt (Issemann und Green 1990). Heute weiß man aber, dass PPARs auch an vielen anderen Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Es konnten Agonisten von PPARs synthetisiert werden, deren anti-inflammatorische und neuroprotektive Wirkung bewiesen wurden. Sie werden mittlerweile für die Behandlung von Arteriosklerose, Entzündungen, Hypercholesterinämie, Krebs, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson'sche Krankheit, Diabetes und Demyelinisierungsstörungen erforscht bzw. erfolgreich eingesetzt (Wu et al. 2009; Bordet et al. 2006).

1.3.2 Wirkmechanismus

PPAR α , PPAR β und PPAR γ stellen die drei bisher bekannten Isoformen dar. Sie binden mit Hilfe eines bestimmten Rezeptors (Retinoid-X-Rezeptor = RXR) nach der Aktivierung an eine spezifische DNA-Sequenz ihrer Zielgene, die englisch als *peroxisome proliferator response element* (PPREs) bezeichnet wird. Dadurch wird die Transkription dieser Zielgene induziert (Berger und Moller 2000).

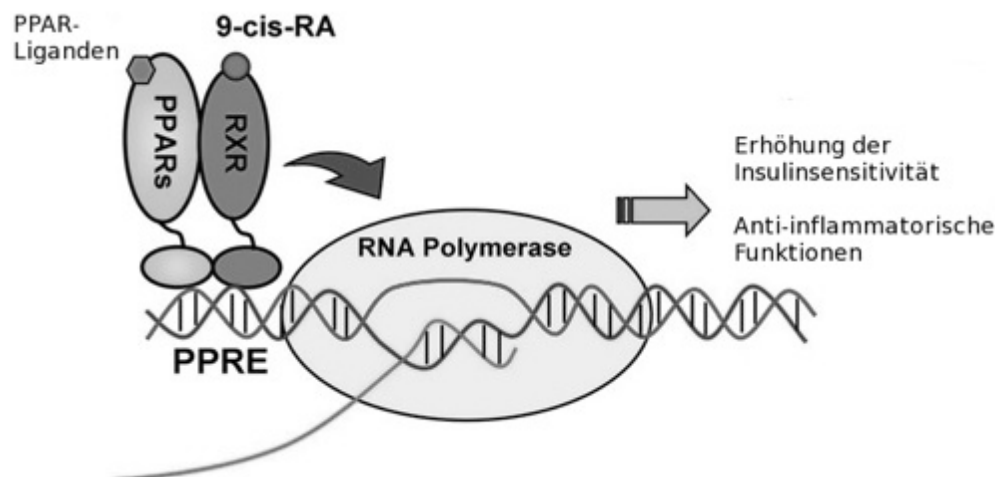


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von PPARs. Nach Bindung eines Liganden bildet die PPAR-Isoform mit dem Retinoid-X-Rezeptor ein Heterodimer. Das Dimer bindet daraufhin an das PPRE in der Promoterregion eines Zielgens. Diese Gene sind an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt, wie beispielsweise an der Insulin-Sensitivität und an antientzündlichen Vorgängen. (modifiziert nach Wu et al. 2009, S. 996)

1.3.3 Vorkommen der Isoformen

PPAR-Isoformen haben je nach ihrem gewebespezifischen Vorkommen und ihrer Liganden-Spezifität verschiedene physiologische Aufgaben. PPAR α beispielsweise spielt eine Rolle im Fettsäurestoffwechsel und findet sich vermehrt in Leber, der Niere und im Darmtrakt. Auch soll PPAR α beim Herunterregulieren von Entzündungsantworten beteiligt sein. Dagegen

kommt PPAR β ubiquitär vor, aber seine physiologische Funktion ist noch nicht vollends geklärt (Berger und Moller 2000).

PPAR γ ist bekannt als Regulator der Differenzierung von Adipozyten, der Fettsäurenspeicherung und des Glukose-Stoffwechsels. Von PPAR γ existieren nochmals zwei Isoformen, die je unterschiedliche Aufgaben ausüben und in verschiedenen Geweben vorkommen. PPAR γ 1 beispielsweise findet sich in allen Geweben außer im Muskel; PPAR γ 2 dagegen meist im Fettgewebe und im Intestinaltrakt (Berger und Moller 2000). Offenbar ist mittlerweile sogar von der Existenz einer dritten und vierten Unterformen die Rede, wobei PPAR γ 3 in Makrophagen und weißem Fettgewebe und PPAR γ 4 in Endothelzellen gefunden wurden [Tyagi et al. 2011]. Die PPAR γ -Isoformen unterscheiden sich vermutlich durch die Promotoren innerhalb desselben Gens und folglich ihrer unterschiedlichen RNA-Prozessierung (Fajas et al. 1997).

1.3.4 Liganden

Es gibt sowohl exogene als auch (natürliche) endogene Liganden für PPARs. Zu den natürlich im Körper vorkommenden Liganden gehören Fettsäuren und Eicosanoid-Derivate.

Ein exogener Agonist von PPAR α stellt die Gruppe der Fibrate dar. Bei der Gabe von Fenofibrat konnte eine erhöhte Anzahl an Peroxisomen in der Leber von Mäusen, Ratten und sogar Primaten festgestellt werden (Hess et al. 1965; Hoivik et al. 2004) Die erste Publikation für diese Erkenntnis stammt sogar aus den 60er Jahren durch Hess et al., die Ratten Clofibrat (CPIB = Ethyl- α -p-chlorphenoxyisobutytrat) verabreichten und sahen, dass sich die Zahl der *Microbodies* im Lebergewebe erhöhte. Mittlerweile wird Fenofibrat auch als Lipidsenker bei der Behandlung von Hypercholesterinämie eingesetzt (Berger und Moller 2000).

Bekannt synthetische Liganden von PPAR γ sind seit Mitte der 1990er Jahre die Insulin-Sensitizer Thiazolidindione (TZD). Zum zuerst erforschten TZD gehört das Troglitazon. Es folgten weiter Rosiglitazon und Pioglitazon. Vor allem Pioglitazon wird seit 2000 in Deutschland als orales Antidiabetikum in Kombination mit Metformin bei Diabetes mellitus vom Typ II erfolgreich verabreicht. Es erhöht die Insulin-Empfindlichkeit von Zellen in Leber, Muskel und Fettgewebe. Insulin ist dann wieder in der Lage, den Blutzuckerspiegel zu senken (Berger und Moller 2000).

Nach vorangegangenen Langzeitstudien veranlasste die staatliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten FDA (Food and Drug Administration) im Jahr 2010 die Prüfung von Actos® mit dem Inhaltsstoff Pioglitazon aufgrund des erhöhten Risikos zur Entstehung von Blasenkrebs (Deutsches Ärzteblatt 2010). 2011 initiierte

die Europäische Arzneimittelagentur die Überprüfung des Medikaments. Noch im selben Jahr forderte Frankreich nach der Durchführung einer Kohortenstudie, in der es zur erhöhten Inzidenz von Blasenkrebs gekommen war, die Marktrücknahme von Actos® (Afssaps – Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, 2011). Auch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) riet wenig später davon ab, Patienten neu auf ein pioglitazonhaltiges Medikament einzustellen (BfArM, 2011). 2012 wurde das europäische Risikobewertungsverfahren zu den pioglitazonhaltigen Arzneimitteln abgeschlossen. Es kam zu dem Ergebnis, dass - trotz der bestätigten Blasenkarzinominzidenz - das Nutzen-Risiko-Verhältnis des Medikaments für bestimmte Patienten insgesamt weiterhin positiv wäre. Risikogruppen, wie Patienten mit familiärem Blasenkrebsvorkommen oder früheren Blasenkrebserkrankungen, Pioglitazon dem BfArM zufolge nicht verschrieben werden sollen (BfArM, 2012).

1.4 Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen

1.4.1 Einteilung der peroxisomal-bedingten Stoffwechselerkrankungen

Peroxisomal-bedingte Krankheitsbilder stellen eine Gruppe von genetischen Störungen bei Menschen dar, bei welcher Peroxisomenfunktionen beeinträchtigt sind. Man kann sie entsprechend des Ausmaßes der peroxisomalen Funktionseinschränkung in zwei Unterklassen einteilen (Kemp et al. 2012): Das sind zum einen die peroxisomalen Entwicklungsstörungen und zum anderen die isolierten Defekte peroxisomaler Stoffwechselfvorgänge.

1.4.2 Entwicklungsstörungen von Peroxisomen

Die erste Untergruppe beinhaltet Störungen, bei denen die Biogenese des Peroxisoms gestört ist. Man nennt sie auch PBDs (= engl. *peroxisome biogenesis disorders*). Bei diesen Erkrankungen liegt eine Mutation in einem der 14 peroxisomalen Gene vor, die für Peroxine enkodieren. Peroxine sind an der Biogenese der Peroxisomen beteiligt. (Berger et al. 2015). Zu den PBDs zählen beispielsweise das Zellweger-Syndrom (ZS), bei dem das komplette Fehlen von Peroxisomen in Leber und Niere zugrunde liegt sowie die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und das Refsum-Syndrom (IRS). Diese drei Krankheiten werden auch zu den *Zellweger spectrum disorders* (ZSDs) zusammengefasst. (Wanders und Waterham 2005).

Den PBDs, bei denen es sich um Erkrankungen der Leber handelt, liegen auch gemeinsame klinische Kennzeichen zugrunde. Es handelt sich hierbei um Symptome der späten neurologischen Entwicklung, der Retinopathie und der Gehörlosigkeit in den ersten

Lebensmonaten (Wanders und Waterham 2005).

Das Grundproblem dieser Krankheiten ist der fehlerhafte Prozess des Proteinimports in die Matrix des Peroxisomens. Dies kann zum Fehlen von Peroxisomen oder zum Auftreten von leeren Membranvesikeln, sogenannter *peroxisomal ghosts*, führen, die lediglich peroxisomale Membranproteine enthalten (Thoms et al. 2009). In Fibroblasten dieser Patienten wurden diese so genannten *peroxisomal ghosts* oder leere peroxisomale Strukturen entdeckt. Diese enthielten zwar Membranproteine, aber keine Katalase oder andere Matrixproteine und sind somit funktionslos (Nyhan et al. 2011).

1.4.2.1 Zellweger-Syndrom

Das Krankheitsbild des ZS wurde erstmals in den 60er Jahren beschrieben, also zu einer Zeit, als man noch nicht viel über Peroxisomen wusste. 1973 waren Goldfischer et al. die ersten, die den Zusammenhang von ZS und Peroxisomen herstellen konnten, als sie in Hepatozyten und Nierentubulus-Zellen vergeblich nach Peroxisomen bei ZS-Patienten suchten. Es hat aber noch einmal 10 Jahre gedauert, bis der Zusammenhang klar geworden war. Brown et al. stellten dann fest, dass der Gehalt von VLCFAs in ZS-Patienten stark erhöht war. Zu diesem Zeitpunkt war den Wissenschaftlern nun bereits bewusst, dass Peroxisomen zur β -Oxidation in der Lage sind (Wanders und Waterham 2005). Neugeborene mit Zellweger-Syndrom leiden typischerweise an einer extremen allgemeinen Muskelhypotonie. Auch fehlen ihnen Muskeleigenreflexe. Die Patienten haben häufige Krampfanfälle, zeigen schwere psychomotorische Retardierung und multiple Gesichtsanomalien. Diagnostiziert wird das Syndrom unter anderem durch die erhöhte Konzentration von langkettigen Fettsäuren im Blut. Diese Diagnose kann auch pränatal gestellt werden. Die Prognose ist sehr schlecht: die meisten Patienten überleben das Säuglingsalter nicht (Pschyrembel 2007).

1.4.2.2 Neonatale Adrenoleukodystrophie

Die neonatale Form der Adrenoleukodystrophie folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang und betrifft Patienten noch vor dem 1. Lebensjahr. Sie leiden an kraniofazialen Missbildungen, Hyptonie, Krampfanfällen, psychomotorischer Retardierung und allgemeiner Degeneration. Im Gehirn der Betroffenen findet man auch Anzeichen von Demyelinisierung. Betroffene Kinder erreichen maximal das 6. Lebensjahr (Wanders et al. 1995).

1.4.3 Isolierte Defekte

Eine weitere Gruppe der peroxisomalen Störungen besteht aus den Krankheitsbildern, bei

denen einzelne peroxisomale oder enzymatische Proteine aufgrund eines Gendefekts fehlgebildet sind. Zu diesen Erkrankungen zählt auch der Gegenstand dieser Arbeit: die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie. Auf die Erkrankungen X-ALD wird im folgenden Kapitel dieser Arbeit ausführlich eingegangen werden.

1.5 X-Adrenoleukodystrophie

1.5.1 Beschreibung der Krankheit

Die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD) ist die häufigste peroxisomale Erkrankung. Die Häufigkeit der Krankheit (1:16.800 Erkrankte und Überträgerinnen in den USA) ist mit der von Phenylketonurie vergleichbar, welche die bekannteste und häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung darstellt (Klusman et al. 2003).

Adrenomyeloneuropathie (AMN) und die entzündliche, demyelinisierende, zerebrale Form der ALD bilden die zwei Hauptphänotypen der X-ALD (Nyhan 2011).

Der Name Adrenoleukodystrophie setzt sich wie folgt zusammen: *Adreno* steht für die Funktionseinschränkung der Nebennierenrinde, *leuko* für die Veränderungen in der weißen Substanz im Zentralen Nervensystem und *dystrophie* für die Degeneration dieses Gewebes (Klusmann et al. 2003).

Bei der ALD führen Mutationen im ABCD1-Gen zur fehlerhaften Funktionsweise des enkodierten Proteins ABCD1. Es kommt im Gehirn, vor allem in Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Endothelzellen, vor. Bis auf wenige Aufnahmen ist ABCD1 in Neuronen nicht zu finden. (Berger et al. 2015). Es gehört zu den ABC-Halbtransportern und hat eine molekulare Masse von 83 kDa. Die Fähigkeit dieses Proteins, Fettsäuren und/oder ATP zu binden, ist bei X-ALD-Patienten verändert (Klusmann et al. 2003). Dadurch wird die peroxisomale Transportfunktion des Proteins, also der Import aktivierter VLCFAs, und somit die erfolgreiche β -Oxidation von VLCFAs beeinträchtigt. Dies resultiert in der Akkumulation dieser Fettsäuren in Plasma, Serum und Gewebe. Betroffen sind vor allem die weiße Substanz des Gehirns und Rückenmarks, die Nebennierenrinde und das Hodengewebe (Klusman et al. 2003).

Die hohe Konzentration dieser gesättigten überlangkettigen Fettsäuren kann biochemisch bestimmt werden und dient neben dem klinischen Erscheinungsbild und der zerebralen Bildgebung (z.B. Magnetresonanztomographie = MRT) als Diagnosemöglichkeit der X-ALD. Der Ausprägungsgrad der Krankheit, die Art der Mutation im ALD-Gen sowie die

Konzentration der VLCFAs im Plasma korrelieren direkt jedoch nicht miteinander. Betroffene Familienmitglieder, die alle die gleiche Mutation im ALD-Gen haben, können völlig unterschiedliche klinische Ausprägungen zeigen (Klusmann et al. 2003).

Obgleich alle Patienten dieser einen Familie dieselbe Mutation haben, gibt es also dennoch keinen einheitlichen Phänotyp (Nyhan et al. 2011). Es wird deshalb vermutet, dass noch andere modifizierende Gene und Umweltfaktoren eine Rolle bei der Ausbildung der unterschiedlichen Phänotypen spielen müssen (Pujol et al. 2002).

Patienten mit zerebralem Phänotyp der ALD leiden unter rasch progressiver, entzündlicher Demyelinisierung in Gehirnstrukturen. Folgen sind starke kognitive und neurologische Beeinträchtigungen und früher Tod. Dieser Phänotyp tritt vor allem in der Kindheit (kindliche zerebrale Form = cALD, engl. *childhood/cerebral ALD*) und Adoleszenz (adoleszente und adulte zerebrale Form) auf, obgleich auch 20% der AMN-Patienten Symptome der zerebralen ALD im späteren Lebensabschnitt entwickeln. Je eher die Demyelinisierung im Gehirn auftritt, desto schneller schreitet die Krankheit voran (Kemp et al. 2012). Die demyelinisierenden Läsionen treten in bestimmten Hirnregionen bevorzugt auf: am Hinterende oder Knie des Corpus callosum und weitere Ausbreitung in die weiße Substanz des parieto-okzipitalen oder frontalen Lappens. Weitere Regionen, die initial betroffen sein können, sind die Pyramidenbahnen im Hirnstamm oder in der Capsula interna. Interessant ist, dass demyelinisierende Läsionen, die anfänglich gar nicht entzündlich bedingt sind, sich sehr langsam ausbreiten. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Patienten auch - außer einer milden kognitiven Dysfunktion - fast keine Symptome. Diese Phase wird dann von plötzlich auftretenden Entzündungserscheinungen abgelöst. Von nun an schreitet die Erkrankung mit zunehmender neurologischer Symptomatik sehr rasch voran (Kemp et al. 2012; Klusmann et al. 2003). Typische Symptome in der frühen Phase der Krankheit sind Verhaltensauffälligkeiten wie Unkonzentriertheit, emotionale Labilität, Hyperaktivität und Leistungsabfall in der Schule. Im späteren Verlauf kommen motorische Auffälligkeiten, Hör- und Sehstörungen und Demenz hinzu. Häufig ist die Insuffizienz der Nebennierenrinde (Morbus Addison) begleitend oder geht den neurologischen Symptomen voraus. Die Patienten sterben nach raschem Voranschreiten der Krankheit meist im 1. oder 2. Lebensjahrzehnt. Völlig asymptomatische Patienten sind sehr selten (Klusmann et al. 2003).

Adrenomyeloneuropathie (AMN) ist von beiden Phänotypen der X-ALD der am häufigsten vorkommende Typ. AMN unterscheidet sich grundlegend von der zerebralen Form und ist

durch eine vor allem nicht-entzündliche Axonopathie der peripheren Nerven und der Längsbündel des Rückenmarks charakterisiert. Sie führt längerfristig zu einer progressiven spastischen Paraplegie (Kemp et al. 2012).

Erste Symptome der AMN treten bei männlichen Patienten zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf. Die neurologische Symptomatik schreitet hier eher langsam voran. Die Diagnose kann meist nicht innerhalb von drei bis fünf Jahren nach Erstsymptomatik gestellt werden, es sei denn, es gab bereits andere Fälle von X-ALD innerhalb der Familie (Kemp et al. 2012). Häufig werden fälschlicherweise Diagnosen wie Multiple Sklerose (MS) oder Spastische Paraparese gestellt (Pujol et al. 2002).

Die betroffenen Männer berichten von einer Schwäche der unteren Extremitäten, Parästhesien, Impotenz und Blasen- und Mastdarmschwäche (Berger und Gärtner 2006). Bei 2/3 der Patienten tritt zusätzlich eine primäre Nebennierenrindeninsuffizienz („Addison-Krankheit“) auf, die zusammen mit einer Hyperpigmentierung der Haut und der Schleimhäute einhergeht. Betroffen sind insbesondere Zunge, Mundschleimhaut und Hände (Kemp et al. 2012; Klusmann et al. 2003).

Erstaunlicherweise zeigen auch einige heterozygote Frauen klinische Auffälligkeiten. Sie treten jedoch gegenüber Männern zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt auf. Typischerweise wird in der vierten oder fünften Lebensdekade von ersten Symptomen berichtet, die üblicherweise schwächer ausgebildet sind (Kemp et al. 2012).

20% der AMN-Patienten bekommen zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr zusätzlich die zerebrale demyelinisierende Form der ALD, die aber weit langsamer voranschreitet als bei den betroffenen Jungen. Sie kann nach Monaten oder gar Jahren der Progression sogar stagnieren. Sobald sie jedoch Entzündungscharakter zeigt, ist ihre Prognose ähnlich schlecht wie bei den jüngeren Patienten. Zerebrale Formen unter den weiblichen AMN-Betroffenen bilden die Ausnahme (Kemp et al. 2012).

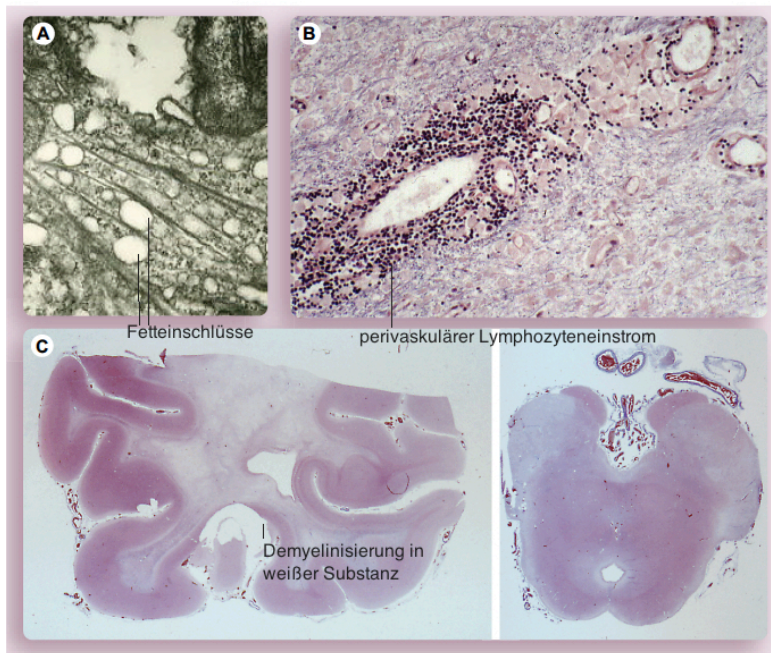


Abbildung 9.
Pathologische Kennzeichen der X-ALD. (A) zeigt elektronenmikroskopisch Fettschlüsse, bestehend aus VLCFAs im Gewebe von Nebennierenzellen. (B) stellt eine perivaskuläre Entzündungsreaktion, bestehend aus Lymphozyteneinstrom im Hirngewebe, von frühkindlicher X-ALD dar. (C) Zu sehen sind Demyelinisierungsprozesse links in der periventrikulären weißen Substanz und rechts in den Längsfasern des Rückenmarks. (modifiziert nach Semmler et al. 2008, S. 1368)

1.5.2 Therapieansätze

Leider gibt es bis heute keine kausale Therapie gegen die X-ALD. Die Patienten können bislang lediglich symptomatisch behandelt werden.

1.5.2.1 Diätetischer Ansatz: Lorenzo's Öl

Es wurde bereits ausgeführt, dass bei ALD-Patienten erhöhte Werte an sehr langkettigen Fettsäuren, den VLCFAs, vorliegen. Da dies ein entscheidender Faktor bei der Pathogenese der Krankheit sein könnte, beinhalten einige Therapieansätze, die Werte der Fettsäuren zu verringern bzw. eine VLCFA-reduzierte Diät einzuhalten. Da die Patienten nicht in der Lage sind, diese sehr langkettigen Fettsäuren abzubauen, kann die reine Diät demzufolge nicht erfolgreich sein. 1989 erlangte die Therapieform um das so genannte „Lorenzo's Öl“ (nach dem Patienten Lorenzo Odone benannt) Popularität durch einen Kinofilm, in dem zur Verabreichung dieses Öls in Kombination mit einer Ernährungsumstellung geraten wurde. Lorenzo's Öl besteht aus einer 4:1-Mischung aus Ölsäure und Erucasäure. Es handelt sich hierbei um einfach gesättigte Fettsäuren, die die Bildung von VLCFAs durch kompetitive Inhibition vermindern und somit den VLCFA-Level senken können (Semmler et al. 2008). Der Serumspiegel an VLCFAs kann somit innerhalb von 4 Wochen normalisiert werden (Rizzo et al. 1989). Dennoch gilt die klinische Wirksamkeit und Indikation seit der Entdeckung Ende der 80er Jahre immer noch als umstritten. Es gibt Berichte, in denen weder symptomatische noch asymptotische Patienten davon profitierten. Das heißt, die Krankheit verlief entweder genau so schnell oder bisher unauffällige Kinder erkrankten dennoch an X-

ALD (Aubourg et al. 1993; van Geel et al. 1999). Hingegen existieren ebenfalls Studien, die beispielsweise von einer geringeren Progression bzw. von einem geringeren Risiko, an X-ALD zu erkranken, berichten (Moser et al. 2005; Köhler und Sokolowski 2005). Die tatsächliche Effektivität dieser Therapie bleibt somit fraglich. Möglicherweise lässt sich der Ausbruch und der Krankheitsverlauf verzögern. Eine Heilung kann aber mit Lorenzos Öl nicht erzielt werden. Das Reagenz ist weder als Arznei- noch als Nahrungsmittel zugelassen.

1.5.2.2 Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltherapie (HSZT) gehört zu den aktuelleren und laut Berger et. al auch zu den wirksamsten Versuchen, der zerebralen kindlichen Form der Krankheit Einhalt zu gebieten. Am effektivsten wirkt die Therapie, wenn sie im frühen entzündlichen Stadium angewendet wird (Berger und Gärtner 2006). Leider ist immer noch nicht klar, ob die Zelltransplantation auch bei der AMN-Form Wirkung zeigt.

Bei der HSZT werden den Patienten Blutstammzellen aus dem Knochenmark oder der Nabelschnur zugeführt. Der Spender kann, wie beispielsweise bei den Leukämie-Therapien, ein anderes Individuum (allogene Transplantation) oder der Patient selbst (autologe Transplantation) sein. Schwerwiegende Komplikationen wie etwa eine Immunabwehrreaktion des Empfängerorganismus gegen die Fremdspende (*Graft-versus-Host-Reaktion*) können durch die Eigenspende bei der autologen Transplantation ausgeschlossen werden.

Cartier et. al gehören zu den führenden Forschungsgruppen auf dem Gebiet der HSZT bei Adrenoleukodystrophie. Sie veröffentlichten zuletzt 2012 eine Studie zu einer erfolgreich durchgeführten autologen Stammzelltherapie bei zwei Kindern, zu denen keine geeigneten (HLA-kompatiblen) Spender gefunden werden konnten (Cartier et al. 2012).

Die Stammzellen, die durch das CD34-Antigen erkannt werden (und deshalb auch *CD34-positive Zellen* genannt werden), werden den Patienten entnommen und können durch diese Antigenerkennung von anderen Knochenmark- und Blutzellen getrennt werden. Die restlichen Stammzellen werden bei der Myeloablation komplett zerstört. Anschließend konnten den CD34-positiven Zellen mit Hilfe eines lentiviralen Vektors, das erstaunlicherweise vom HIV-1-Virus abgeleitet wurde, ein intaktes ABCD1-Gen eingebaut und genetisch „repariert“ werden. Bei zwei Kindern konnte die Demyelinisierung im Gehirn erfolgreich gestoppt werden. Definitive Ergebnisse bei einer größeren Kohorte und nach längerer Beobachtungszeit bleiben jedoch abzuwarten (Cartier et al. 2012).

1.5.2.3 Verminderung von oxidativem Stress

Galea et. al haben 2012 durch die Fütterung von ABCD1-Knockout-Mäusen mit den

antioxidativen Substanzen α -Tocopherol (=Vitamin E), N-Acetylcystein (NAC; Bestandteil von Gluthation) und α -Liponsäure zeigen können, dass der oxidative Schaden, die axonale Degeneration sowie die Motorikverschlechterung rückgängig gemacht werden konnten. Dies zeigt, dass oxidativer Stress nicht nur bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder der Alzheimer-Erkrankung vermutlich eine bedeutende Rolle spielt, sondern offensichtlich ebenso bei X-ALD. Die Verminderung der oxidativen Stressfaktoren kann bei Mäusen zu einer Besserung des Krankheitsbilds führen (Galea et al. 2012).

1.5.2.4 Frühdiagnostik

Unabhängig davon, welche der beschriebenen dargestellten Therapieform zur Anwendung kommt, sollte sie zum geeigneten Zeitpunkt initiiert und unter einer sorgfältigen Kontrolle stattfinden. Menschen mit erhöhtem Risiko für X-ALD sollten daher so früh wie möglich diagnostiziert werden, beispielsweise mithilfe des Neugeborenen-Screenings. Die Kinder können dementsprechend frühzeitig und besser behandelt werden. Die Überwachung der Nebennierenfunktion sowie die rechtzeitige Hormonsubstitution können für das Überleben der Patienten entscheidend sein (Semmler et al. 2008). Semmler et al. sprechen sich auch trotz der ungenügenden Datenlage für die Behandlung mit Lorenzos Öl in Kombination mit einer entsprechenden Diät für alle Jungen mit X-ALD ab einem Alter von 1,5 Jahren aus.

1.5.3 Tierversuchsmodelle der X-ALD

Wissenschaftler haben verschiedene Tierversuchslinien zur Erforschung der ALD-Krankheit etabliert. Im Jahr 1997 haben gleich drei verschiedene Labore Tiermodelle veröffentlicht, dennoch kann keines der Modelle den gleichen Phänotyp wie bei Menschen wiedergeben, obwohl sie das identische Gen, das X-ALD Gen, betreffen. (Lu et al. 1997; Kobayashi et al. 1997; Forss-Petter et al. 1997) Die ältesten Mäuse der Gruppe Lu et al. zeigten mit 6 Monaten weder adrenale Insuffizienz noch zentralnervöse Defizite. Die Mäuse aller Tiermodelle erkrankten auch nicht an der zerebralen entzündlichen Form von ALD, sondern entwickeln eher periphere Symptomaten, die der AMN ähnlich sind (Semmler et al. 2008). So fand auch Pujol et al. 2002 in ihrer Tierversuchsstudie heraus, dass die ABCD1-/-Tiere erst ab einem Alter von etwa 15 Monaten erste neurologische Verhaltensauffälligkeiten zeigten. Diese korrelierten mit verminderter Nervenleitgeschwindigkeit und abnormalen Myelin- und Axonveränderungen im Rückenmarksgewebe und im N. Ischiadicus. Im Gehirn konnte dies nicht festgestellt werden, womit auch hier die Ähnlichkeit zum humanen AMN-Phänotyp gezeigt wurde.

ABCD1-Knockout Mäuse zeigten bei Lu et al. auch einen erhöhten VLCFA-Level im Gehirn

und in der Nebenniere, aber normale β -Oxidations-Raten. Menschen mit ALD hatten einen bis zu fünffach erhöhten C26:0-Wert im Plasma, während der Wert der Mäuse dieser Linie gar nicht erhöht war. Auch fiel die VLCFA-Akkumulation in Gehirn und Nebenniere weniger stark aus. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Mäuse ein an ungesättigten Fettsäuren reiches Futter bekommen haben. Der VLCFA-Spiegel wurde daher eventuell durch biochemische Inhibition niedrig gehalten (Lu et al. 1997). Die Tiere im Modell von Kobayashi et al. hingegen zeigten bis zum Alter von 12 Monaten keine klinischen Symptome. Darüber hinaus war der Level an C26:0-Fettsäure im Gehirn, Rückenmark, den Lungen und in den Nieren der Mäuse um 73 – 240 % erhöht (Kobayashi et al. 1997).

Die X-ALD-Tierlinie von Kassmann et al. unterdessen spiegelt ein geeigneteres Modell des humanen X-ALD-Phänotyps durch die Inaktivierung des Peroxin-5-Gens (Pex5) in Oligodendrozyten wider. PEX5p ist, wie bereits erläutert, ein zytosolischer Rezeptor von PTS-1-Proteinen, der für den Proteinimport in die Matrix verantwortlich ist. Die Mutanten dieses Tiermodells haben zu Beginn keinerlei Defizite. Später aber entwickeln sie zunehmenden Ataxien, zerebrale Demyelinisierung, Neuroinflammation und VLCFA-Akkumulation. Obwohl genetisch anders, ähnelt das konditionale PEX5p-Mausmodell klinisch und histologisch vielmehr der humanen X-ALD als ABCD1-defiziente Mäuse. Mäuse des Genotyps ABCD1^{-/-} und PEX5p-konditionale Knockout-Mäuse zeigen vergleichbar hohe VLCFA-Werte. Da ABCD1-KO Mäuse zwar auch diese Elevation aufweisen, jedoch keine Pathologie, wurde vermutet, dass die VLCFAs nicht der *primäre* Grund für die entzündliche Demyelinisierung sein können (Kassmann et al. 2007).

Es muss nunmehr ein weiterer, *sekundärer* Effekt für die Entwicklung der klinisch-biochemischen ALD-Symptomatik herausgefunden werden. Kassmann et al. entwickelten daher ein Zwei-Stufen-Modell der Krankheit. Hiernach degenerieren Peroxisomen in Oligodendrozyten und in Adrenalzellen erst zeitversetzt (d.h. nach mehr als 4 Jahren bei Menschen) zu unfunktionellen Zellorganellen, wobei andere Zelltypen weitgehend unversehrt bleiben. In Oligodendrozyten und adrenalen Drüsenzellen vermuten Kassmann et al. einen vermehrten Verlust peroxisomaler Funktionen, der wiederum die Funktionstüchtigkeit der gesamten Zelle beeinflusst. Daraufhin kommt es dann durch die oligodendrogliale Dysfunktion erst zur einer inflammatorischen Demyelinisierung und zu axonalem Sterben. Laut dieser Hypothese kann das Tiermodell dies nicht kopieren, da die Mäuse zu kurz leben, als dass der (sekundäre) peroxisomale Schaden zum Tragen kommen könnte. Auch bei den X-ALD-Patienten gibt es eine Zeitspanne von 5 bis 10 Jahren, in der erst nach Akkumulation dysfunktionaler glialer Peroxisomen der neurodegenerative Schaden und schließlich das

klinische Bild der Krankheit zum Tragen kommt (Kassmann et al. 2007). Auch andere Leukodystrophien zeigen einen sehr späten Phänotyp und könnten ebenso erklärt werden (Barth 2001).

2. GEGENSTAND UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bei X-ALD handelt es sich um die x-chromosomal vererbte Krankheit Adrenoleukodystropie, die durch Mutationen im ABCD1-Gen zu einer Dysfunktion des ABCD1-Membranproteins in Peroxisomen führt. Betroffene erleiden eine zunehmend mentale und motorische Degeneration durch eine Entmarkung der Nervenfasern. Da es bislang keine heilende Therapie gibt, sterben ALD-Patienten der zerebralen Form noch im Kindesalter.

In dieser Studie werden anhand eines Mausmodells die Auswirkungen einer medikamenteninduzierten Veränderung der Peroxisomen-Genese im Hirngewebe untersucht. Durch die vierwöchige Fütterung von Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptor PPAR γ -Agonist Pioglitazon soll der primäre Effekt der Krankheit durch Hochregulation der Peroxisomenzahl kompensiert werden. Der „Turnover“ der Zellorganellen soll angeregt werden, damit neue, weitgehend funktionstüchtige Peroxisomen entstehen. Diese sollen wiederum den sekundären Schaden, der zu einer Dysfunktion des gesamten Peroxisoms in myelinbildenden Gliazellen und somit zu einer inflammatorischen Demyelinisierung führt, vermeiden oder eingrenzen. Das soll zu einem verlangsamten Fortschreiten der Krankheit führen.

Die Grundlage dieser Arbeit wurde bereits in den 60er Jahren gelegt. Hess et al. haben 1965 nach Gabe von PPAR α -Agonist Clofibrat in Ratten gesehen, dass sich in der Leber der Tiere vermehrt Peroxisomen bildeten. In dieser Studie soll untersucht werden, ob Pioglitazon als Agonist von PPAR γ - denselben Effekt im Gehirn hat – speziell in myelinisierenden Zellen des Gehirns.

Neben Verhaltenstests wurden postmortal auch molekularbiologische Methoden zur Analyse der Ergebnisse angewandt. Die Resultate dieser Studie sollen einen Einblick zum Verständnis der Interaktion von Pioglitazon als PPAR γ -Ligand bei der Veränderung der Peroxisomenbiogenese im X-ALD-Tiermodell geben und können einen Beitrag zu einem möglichen neuen Therapieansatz der Krankheit leisten. Längerfristig soll eine spätere Nutzung der Studienergebnisse für die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten der X-ALD-Patienten angestrebt werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 30%	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Intern. Biotechnology Inc.
Chloroform	Merck
DTT (1,4-Dithiotreitol)	GibcoBRL
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Ethanol	Merck
Glutaraldehyd	Merck
Glycin	Merck
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver Instant Naturaflor	frema Reform
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Pferdeserum	Sigma-Aldrich
Pioglitazon	Takeda Pharma
Polyacrylamid	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Serva
Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich
Sucrose	Merck
Tris-HCl-Base	Sigma-Aldrich

3.1.2 Puffer und Lösungen

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung 10-fach konzentrierte Stammlösung, 1000 ml)

NaCl	100 g
KCl	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	7,2 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g

Dieses Gemisch mit H₂O auf 900 ml auffüllen; pH 7,2 mit 10 M NaOH-Lösung einstellen und dies wiederum auf 1000 ml mit H₂O auffüllen.

Zur Verwendung wurde die Stammlösung autoklaviert und mit 1:10 mit H₂O verdünnt eingesetzt (1x PBS)

Lösungen für SDS-Proteingele und Western Blotting:

TBS (10-fache Konzentration)

1370 mM NaCl

200 mM TrisCL, pH 7,4

TBS-T

0,01 % Tween20 in 1X TBS, pH 7,4

Laufpuffer (10-fache Konzentration)

250 mM Tris

1,92 M Glycin

10 % SDS

Blockierlösung

5 % Magermilchpulver

0,05 % Tween 20

in 1 x TBS

Transferpuffer (10-fache Konzentration)

390 mM Glycin

480 mM Tris-Base

20 % Methanol

Transferpuffer (10-fache Konzentration)

390 mM Glycin

480 mM Tris-Base

20 % Methanol (vor Gebrauch frisch hinzugefügt) in H₂O

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

192 mM Glycin

0,1 % SDS in H₂O

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

10 % SDS in H₂O

SDS-Probenpuffer

62,5 mM Tris/HCl pH 6,8

2,3 % SDS

10 % Glycerin

0,1 % Bromphenolblau

5 % β-Mercaptoethanol (frisch hinzugefügt) in H₂O

Trenngelpuffer

2 M Tris/HCl pH 8,8

10 % SDS in H₂O

Sammelgel (ergibt 2 Gele)

30 % Polyacrylamid 0,8 ml

Sammelgelpuffer 1,5 ml

H₂O 3,7 ml

APS 20 µl

TEMED 20 µl

Trenngel 10 % (2 Gele; 1,5 mm Dicke)

30 % Polyacrylamid	6,6 ml
Trenngelpuffer	5 ml
H ₂ O	8,4 ml
APS	100 µl
TEMED	20 µl

3.1.3 Enzyme und Reaktionskomplettsysteme

Enzyme:

Taq-DANN-Polymerase (5 U/ml)	Boehringer
DNase (RNase-free DNase Set)	Qiagen

Reaktionskomplettsysteme:

RNeasy Mini Kit	Qiagen
Superscript III RT	Invitrogen
Power Sybr® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
QiAzol ® Lysis Reagent 200ml	Qiagen

3.1.4 Nukleinsäuren

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer
--	------------

3.1.5 Oligonukleotide

Primeroligonukleotide wurden mit Hilfe der internetbasierten Software „Universal ProbeLibrary Assay Design Center“ der Firma Roche Applied Science entworfen und mit der Software „Oligo Analyzer“ (Teemu Kuulasmaa 2009) gegengeprüft und von F. Benseler (Abt. 501 des MPI Exp. Medizin, Göttingen) synthetisiert.

Primersequenzen für quantitative RT-PCR (5' → 3'):

β-Actin	sense CTTCCTCCCTGGAGAAGAGC
	antisense ATGCCACAGGATTCATAACC

PMP70 sense GGGAGAAGCAGACAATCCAC
(ABCD3) antisense CCGAAAGAAAATGAAATTATGTAGG

Pex14 sense CTCACTCCGCAGCCATACA
antisense AGCCAAGGCACCATAATCTC

ACOX1 sense GCCCAACTGTGACTTCCATC
antisense GCCAGGACTATCGCATGATT

MFP2 sense AACCCAGACACCTTCAGAGG
antisense GCCTATCTCCCCAAACACAA

SOD1 [Cu-Zn] sense CCATCAGTATGGGGACAATACA
antisense GGTCTCCAACATGCCTCTCT

GPX1 sense TTTCCCGTGCAATCAGTTC
antisense TCGGACGTACTTGAGGGAAT

ACAA1 sense AGAGACTGCCTGACTCCTATGG
antisense CTGCTTCTGCCGTGAAATG

PEX11b sense TTCGACAACTGGAGGGTCAT
antisense ACATCTGACAGGTGCACAGC

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe Latex	Hartmann
Einmalhandschuhe Nitril	Hartmann
Eppendorfgefäße	Eppendorf
Falconröhrchen, 15ml, 50ml	Becton & Dickinson
Kosmetiktücher	Wepa professional
Objektträger	Menzel-Gläser
PCR-Platten	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts

Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim
Trockeneis	Messer-Griesheim
Weichholzgranulateinstreu	Ssniff Spezialdiäten
Zentrifugenröhrchen	Beckmann

3.1.7 Geräte

7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Agarose Gelkammer mit Kämmen	MPI exp. Medizin
Feinwaage, digital	Heraeus Instruments
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick
Gewebehomogenisierer „Ultraturrax T8“	Agilent Technologies
Glaswaren	Schott
Laborwaage	Sartorius
Probenmischgerät „Vortexer“	Bender & Hobein
Magnetrührer	Omnilab
Mikroskop	Zeiss
PCR-Thermocycler „T3“	Biometra
Pipetten 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Reinstwasseranlage	Sartorius
Spannungsgeräte Elektrophorese	Amersham Pharmacia Biotech
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech
Thermomixer	Eppendorf
Tierkäfige	Tecniplast
Trocknungszentrifuge „Speed Vac“	Eppendorf
Zentrifuge „Laboratory Centrifuge 4K15“	Sigma Laborzentrifugen
Zentrifuge „Heraeus Biofuge 13“	Heraeus Instruments

3.1.8 Software

7500 Fast System SDS Software	Applied Biosystems
-------------------------------	--------------------

Excel Mac 2011	Microsoft Europe
Oligo Analyzer 1.1.2	Teemu Kuulasmaa
Universal Probe Library	Roche Applied Science
Word Mac 2011	Microsoft Europe
Prism 6	GraphPad

3.2 Methoden

3.2.1 Handhabung und Analyse von Versuchstieren

3.2.1.1 Zucht von Versuchstieren

In dieser Studie wurde ausschließlich männliche Mäuse der Linie KALD (transgene Tiere mit Knockout des ALD-Gens ABCD1 sowie Wildtypen) mit C57 BL6-Background aus der Zucht des MPI für Experimentelle Medizin verwendet. Die genotypische Herkunft der Tiere beruht auf den Untersuchungen von Forss-Petter et al. aus dem Jahr 1997. Sie wurden alle mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf genomische DNA (mittels Schwanzbiopsie) genotypisiert. Ein genehmigter Tierschutzantrag lag vor.

3.2.1.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen im Tierhaus des MPI für Experimentelle Medizin gehalten. Die Haltungsbedingungen wurden entsprechend der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde eingehalten.

Die Tiere wurden gruppenweise von 2 bis zu 4 Tieren in Makrolonkäfigen auf Weichholzgranulateinstreu gehalten, das zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu Futter und Wasserversorgung aus Trinkflaschen. Die Raumtemperatur lag bei 22 +/- 1 °C; die relative Luftfeuchtigkeit bei 55 +/- 10 %. Die Luftwechselrate lag bei 15-fach stündlich. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde von den Beleuchtungszeiten durch Kunstlicht von 5.30 bis 17.30 Uhr bestimmt.

3.2.1.3 Tierfütterung

36 Mäuse wurden in Gruppen von je 6 Tieren pro Genotyp und Pioglitazon-Konzentration eingeteilt. Es wurden drei verschiedene Dosen über 4 Wochen verabreicht, beginnend ab dem

zweiten Lebensmonat:

1. 75 mg/kg Futter - violett
2. 150 mg/kg Futter - braun
3. 300 mg/kg Futter - pink

Bei einem Durchschnittskonsum von 5 g Futter pro Tag kann gesagt werden, dass eine Maus jeweils 0,375 / 0,75 bzw. 1,5 mg Pioglitazonsubstanz pro Tag aufgenommen hat.

Hinzu kamen je 6 Tiere pro Genotyp, die ein Placebo (=Standard-Mausfutter) erhielten. Das Futter wurde von der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, hergestellt und gut voneinander unterscheidbar entsprechend farbmarkiert.

Insgesamt wurden 48 Tiere untersucht.

3.2.1.4 Gewichtskontrolle

Während der vierwöchigen Behandlung wurden die Tiere alle 3 Tage gewogen.

3.2.1.5 Verhaltenstests

Es wurden zwei verschiedene Verhaltenstests zur Überprüfung des motorischen Phänotyps durchgeführt. Sie fanden nach Beginn der Behandlung (ab der 9. Lebenswoche) einmal wöchentlich bis zur Tötung der Tiere statt.

3.2.1.5.1 Grid-Test

Die Tiere laufen auf einem 40 cm langen Gitter mit 1x1 cm Abstand zwei Strecken (einmal hin/einmal zurück). Gemessen wird, wie oft das Tier durch das Gitter rutscht. Dieser Test wurde pro Maus pro Messtag einmal durchgeführt.

3.2.1.5.2 Rotarod-Test

Beim Rotarod-Test werden die Mäuse auf einen rotierenden Stab gesetzt. Gemessen wird die Zeit, bis das Tier bei aufsteigender Geschwindigkeit vom Stab herunterfällt. Nach einer kurzen Phase (30 s) bei 4 rpm (*rounds per minute*) zum Eingewöhnen wird der Test gestartet. In den ersten 30 Sekunden beträgt die Umdrehungszahl 10 rpm, in den darauffolgenden 30

Sekunden 12 rpm und schließlich 20 rpm. Nach zwei Minuten gilt der Versuch als beendet. Dieser Test wurde pro Maus pro Messtag dreimal nacheinander durchgeführt. Zwischen den Tests lag eine Pause von einer Minute.

3.2.1.6 Tötung von Versuchstieren und Probenentnahme

Zur Probengewinnung wurden die Tiere im Alter von 12 Wochen durch zervikale Dislokation getötet. Es wurden folgende Gewebe entnommen:

- Beide Hemisphären (Großhirn), das Rückenmark, ein N. Ischiadicus sowie ein Teil der Leber wurden bei -80 °C gelagert.
- Ein Teil der Leber und 1/3 des Kleinhirns werden im Fixans nach „Karlsson und Schulz“ gelagert.
- Ein Teil der Leber, der andere N. Ischiadicus und 2/3 des Kleinhirns werden in 4 % PFA gelagert.
- Die Schwanzbiopsie jeder Maus wird zur Genotypisierung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Gewebeanalysen

3.2.2.1 Isolation von RNA

Für die Messung der Genexpression wurde Gesamt-RNA aus dem Großhirn isoliert. Hierfür wurde das Protokoll des Kits „RNeasy Mini Kit, Qiagen“ verwendet:

Ein halbes Gehirn ohne Bulbi und Kleinhirn wird zusammen mit dem Lyse-Reagenz „QIazol“ im Ultraturax homogenisiert. Das Lysat wird auf Eppendorf-Gefäße übertragen und mit Chloroform versehen (200 µl auf 1 ml QIazol). Nach dem Zentrifugieren (15' bei 13000 rpm) bilden sich zwei wässrige Phasen, von denen die obere vorsichtig in ein weiteres Gefäß überführt wird. Anschließend wird die identische Menge an 70%-igem Ethanol dazugegeben und das Gemisch auf RNeasy Spin-Säulen gegeben, an deren Filter durch Zentrifugation (15" bei 13000 rpm) die RNA gebunden wird. Anschließend wird mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nun wird der DNase-Mix (10 µl DNase + 70 µl RDD-Puffer pro Säule) für 15' aufgetragen. Es folgen weiteres Waschen mit 350 µl RW1-Puffer, 1' Zentrifugation, 500 µl RPE-Puffer, Zentrifugation, Erneuern der Sammelröhrchen, Trockenzentrifugation und schließlich das Lösen der RNA durch Gabe von 50 µl

RNase-freiem Wasser. Das Eluat enthält nun reine RNA in Lösung.

3.2.2.2 Messung der Konzentration und Qualität der RNA

Hierfür dient das UV-Spektrophotometer als Messinstrument. Die Konzentration von Nukleinsäuren kann mit Hilfe des Beer-Lambert'schen Gesetzes bestimmt werden. Dieses besagt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Lichtabsorption und der Konzentration einer Flüssigkeit gibt, indem die Intensität beim Durchtritt durch eine absorbierende Substanz abhängig von der Konzentration dieser Substanz abgeschwächt wird. Ein Spektrophotometer macht sich dieses Prinzip zur Messung einer DNA oder RNA-Konzentration zu Nutze. Im UV-Bereich absorbieren alle Atome Energie, da diese Frequenz hoch genug ist, um Photoionisation stattfinden zu lassen.

Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm dient hierbei als Indikator für die relative Reinheit und Qualität der gewonnenen RNA und sollte etwa zwischen 1,7 und 2 liegen. Zunächst wird ein Standard mit RNase-freiem Wasser in das Gerät gestellt und somit kalibriert. Danach wird die aufgereinigte RNA mit einer Verdünnung von 1:50 in einer Küvette vermessen.

3.2.2.3 Copy-DNA-Synthese durch Reverse Transkription von RNA

Die RNA enthält alle aus der DNA umgeschriebenen Transkriptionsabschnitte. Mittels einer Umkehrreaktion, die Reverse Transkription genannt wird, kann aus der RNA wiederum eine dazu komplementäre copy-DNA (cDNA) synthetisiert werden, die für die Genexpressionsanalyse in einer Polymerasekettenreaktion (siehe unten) weiter verwendet wird. Hierfür wird das Enzym Reverse Transkriptase benötigt, das mit Hilfe eines Primers, also eines kurzen komplementären DNA-Abschnitts, an die RNA binden kann.

In dem durchgeführten Experiment dienten als Primer oligo-dT Primer und Nonamer Primer (N9-Primer).

Durch den Einsatz von Primern können Richtung (*sense*) und Gegenrichtung (*antisense*) von Nukleinsäuren umgeschrieben werden. Sie markieren das jeweilige Ende der Zielsequenz. Richtung und Gegenrichtung sind hierbei bedingt durch den Aufbau von Nukleinsäuren. Sie haben ein 5'-Ende – benannt nach dem C5-Atom des Zuckers – und ein 3'-Ende. Nukleotidfolgen können vom 5' bis 3'-Ende (=sense) bzw. vom 3' bis 5'-Ende (=antisense) erstellt werden. Bei der Synthese wird die mit der RNA hybridisierten cDNA durch die

RNAse, die in der Superscript mit enthalten ist, in einen Einzelstrang zerlegt. Die cDNA kann nun für eine PCR verwendet werden. Bei der cDNA-Synthese werden alle Proben entsprechend ihrer Konzentration mit einer Masse von 1 µg eingesetzt. Der Rest der Flüssigkeit wird auf 2 µl aufgefüllt. Es werden das Kit und Protokoll von Invitrogen® benutzt.

In ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß werden pipettiert:

2 µl RNA

1 µl oligo-dT Primer, c = 0.6 pmol/µl

1 µl N9 Primer, c = 120 pmol/µl

Dann wird das Gefäß in einen Thermocycler überführt, in welchem die Proben bei 70 °C für 2 Minuten inkubieren. Danach werden sie wieder auf Eis gebracht und folgendes Gemisch hinzugefügt:

1,5 µl H₂O

2,0 µl 5x 1st strand buffer (250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)

1,0 µl 0,1M DTT

0,5 µl dNTPs 10mM

1,0 µl Superscript III 200U/µl

Sie werden vorsichtig durchmischt und erneut nach folgendem Programm in den Thermocycler überführt:

(Deckeltemperatur 65 °C)

25°C für 10'

50°C für 45'

55°C für 45'

Danach erfolgt das Zurücküberführen auf Eis und die Lagerung bei -80°C. Die erhaltende Konzentration entspricht 1000 ng/µl.

3.2.2.4 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mit cDNA

3.2.2.4.1 Funktionsweise einer qRT-PCR

Polymerasekettenreaktionen ermöglichen es, geringe Menge eines genau definierten DNA-Abschnitts mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase exponentiell so zu vervielfältigen, dass diese Menge gemessen werden kann. Bei der qRT-PCR wird die exakte Menge (daher „quantitativ“) der amplifizierten DNA-Produkte in Echtzeit mitgemessen. Bei jedem Zyklus wird dabei das gewünschte Transkript verdoppelt.

Insgesamt werden 40 Zyklen durchlaufen. Jeder Zyklus entspricht einer Abfolge von bestimmten Temperaturphasen. In der ersten Phase, der so genannten Denaturierungsphase, wird auf 95 °C erhitzt, um die Doppelstränge in Einzelstränge aufzuschmelzen. Danach wird wieder auf 65 °C heruntergekühlt. Anschließend folgt das *Annealing* oder Primerhybridisierung, in der sich die Primer an die DNA anlagern. Als drittes und letztes folgt die Phase der Elongation bei einer Temperatur von 72 °C. Hier repliziert die DNA-Polymerase beginnend an den Primer-Markierungen die DNA-Stränge, in dem sie die Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt.

Die Methode, mit der hier gearbeitet wurde, benutzt dabei den Farbstoff Sybr® -Green. Dieser Marker lagert sich (interkalierend) spezifisch an die DNA und sendet nach der Bindung ein fluoreszentes Signal aus, was proportional zur Menge der amplifizierten DNA-Abschnitte ins Verhältnis gesetzt werden kann. Die Quantifizierung erfolgt dabei nur in der exponentiellen Phase der PCR, da hier optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

Durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität während der PCR lässt sich dann diejenige Zyklenzahl bestimmen, bei der das Fluoreszenzsignal zehnfach stärker ist als das Hintergrundsignal. Diese Zyklusnummer wird als Ct-wert (*threshold-cycle*) bezeichnet und ist um so größer, je weniger DNA-Menge der Zielsequenz eingesetzt wurde.

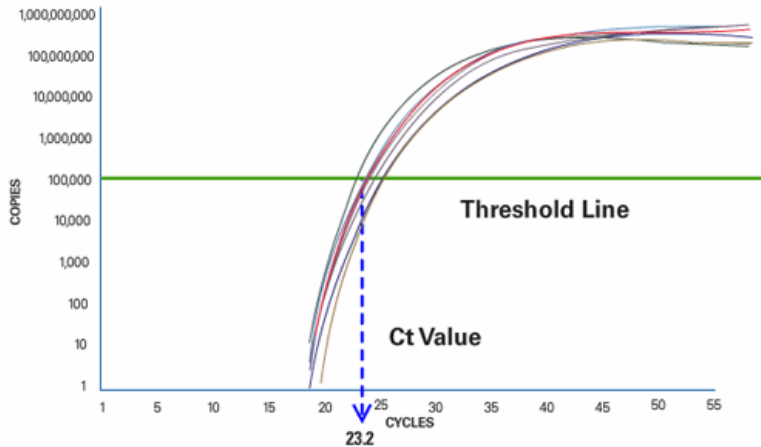


Abbildung 10. Messung der Fluoreszenzintensität bei qRT-PCR. Die Abbildung zeigt die Messung der Fluoreszenzintensität nach Anzahl der Kopien und nach Amplifikationszyklus. Die grüne Linie deutet auf die Schwelle (*Threshold Line*), bei der das eigentliche Messsignal das Hintergrundsignal um das Zehnfache überschritten hat. Dieser Zyklus entspricht dem Ct-Wert (*Ct Value*). [http://www.applied biosystems.com]

Der ermittelte Ct-Wert der Probe wird stets auf den Ct-Wert eines „Haushaltsgens“ (engl. *Housekeeping gene*) normalisiert. Dieser wird neben den zu qualifizierenden Genen mitamplifiziert. Es wird das Housekeeping-Gen ausgewählt, von welchem eine konstante Expressionsmenge in allen untersuchten Proben vorausgesetzt werden kann. Für diese Untersuchungen wurde das Zytoskelett-Protein β -Actin gewählt.

3.2.2.4.2 Schmelzkurvenanalyse

Ein Nachteil der Messung mit interkalierenden Farbstoffen ist die geringe Spezifität, da auch unspezifische PCR-Produkte (Primer-Dimere) den Farbstoff einlagern können. Dieses Problem kann man ausgleichen, indem man nach der PCR eine so genannte Schmelzkurvenanalyse durchführt. Dabei wird die nunmehr doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, indem unter Fluoreszenzmessung die Temperatur im Gerät langsam kontinuierlich erhöht wird. So zerfallen die spezifischen DNA-Amplifikate unter Fluoreszenzabsorption bei einer bestimmten Temperatur in zwei Einzelstränge. Diese Fluoreszenzabnahme kann detektiert werden. Unspezifische Amplifikate (wie Primer-Dimere) besitzen einen unterschiedlich hohen Schmelzpunkt. So sind sie unterscheidbar. Wenn nach dieser Analyse tatsächlich zwei Schmelzpunkte bestehen würden, könnten die Primer nicht benutzt werden und es müssten neue synthetisiert werden.

3.2.2.4.3 Reaktionsansatz und Amplifikationsprotokoll

Bei den konkret durchgeführten Messungen dieses Projekts wurde eine Konzentration von 5

ng/ μ l cDNA eingesetzt. Die Proben mussten dazu in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt werden.

Pipettierschema je Probe pro Well:

SYBR®-Green 5,0 μ l

Sense Primer 0,1 μ l

Antisense Primer 0,1 μ l

H₂O 0,8 μ l

cDNA 4,0 μ l

Bei folgendem Zyklenprotokoll:

10'	bei	95°C	}	40 Zyklen
15"	bei	95°C		
20"	bei	60°C		
40"	bei	72°C		

3.2.2.4.4 Auswertung der Ergebnisse

Zunächst wird aus dem Ct-Wert der Zielsequenz und dem Ct-Wert des Standard-Gens (hier: Actin) durch die Bildung ihrer Differenz der so genannte Δ Ct-Wert ermittelt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielsequenz}} - \text{Ct}_{\beta\text{-Actin}}$$

Eine Probengruppe der in der PCR amplifizierten Proben dient als relative Referenz (Kalibrator) – im konkreten Fall die Tiergruppe mit dem Placebo-Futter – und anhand dieser Referenz werden alle anderen behandelten Tiergruppen kalibriert. Dafür wird der $\Delta\Delta$ Ct-Wert hinzugezogen, der sich aus der Differenz der Δ Ct-Werte der Proben und der Δ Ct-Werte des Kalibrators errechnet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Ziel}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$$

Anhand des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes kann nun die Expression des Zielgens mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{mRNA-Konzentration} = 1,96^{-\Delta\Delta C_t}$$

Bei einer mRNA-Konzentration =1 wurde das Zielgen nicht verändert. Bei einem Wert <1 gehen wir von einer Herunter- und bei einem Wert von >1 von einer Hochregulation aus. Zur Analyse und Normalisierung der Ct-Rohdaten wurde hier die Software „Excel Mac 2011“ verwendet.

3.2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.5.1 Myelinpräparation aus Hirngewebe

Für die Präparation von Myelin aus Maushirngewebe wurde das Standardprotokoll nach Norton und Poduslo (1973) abgewandelt. Je ein halbes Gehirn in 0,32 M Sucrose (10 ml / 500 mg Gewebe) wird zusammen mit Protease-Inhibitoren im Ultra-Turrax homogenisiert. Von diesem Homogenat werden 5 ml auf 5 ml 0,85 M Sucrose geschichtet und (bei 75000 g, 30') zentrifugiert. Anschließend wird die Interphase mit dem Myelin abgenommen und durch Resuspension in destilliertem Wasser gewaschen (75.000 xg, 15'). Es wird nun erneut resuspendiert und zentrifugiert (15.000 xg, 15'). Die Myelinfraktion wird dadurch einem osmotischen Schock ausgesetzt. Dieser Schritt wird wiederholt. Dann wird das Pellet in 0,32 M Sucrose aufgenommen, auf 0,85 M Sucrose geschichtet und anschließend wieder zentrifugiert (75.000 xg, 30'). Die Interphase wird erneut in destilliertem Wasser aufgenommen und zentrifugiert (75.000, 15') um die Sucrose zu eliminieren. Schließlich wird das Pellet in einem kleinen Volumen sterilen PBS (100 μ l / Gehirn) aufgenommen.

3.2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Proteinbestimmung ist eine photometrische Methode, mit der man den Proteingehalt von Zellysaten quantitativ bestimmen kann. Hierfür werden im speziellen Fall 997 μ l gebrauchsfertiges Bradfordreagenz mit 3 μ l der Probe vermischt. Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wird eine Standardkurve aus Standardproteinlösungen vorbereitet. Hierfür benutzt man Lösungen mit 1-7 μ g / μ l BSA an Proteingehalt (zum

Kalibrieren als Proteinstandard) mit der gleichen Menge Bradfordreagenz und vermisst diese anschließend photometrisch.

3.2.2.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese hat man die Möglichkeit, Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen. Für Proteine geschieht dies auf einem 10%-igem Polyacrylamid-Gel in einem elektrischen Feld. Je nach Größe und Ladung bewegen sich die Moleküle dabei unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Kleine Moleküle bewegen sich dabei am schnellsten.

Gegossen werden die Gele mit Gießständen, Glasplatten und Kämmen. Zunächst wird das Trenngel gegossen, welches innerhalb von etwa 30' polymerisiert. Währenddessen wird es mit Isopropanol überschichtet, um die Oberflächen-spannung zu verkleinern und Blasenbildung zu vermeiden. Überschüssiges Isopropanol wird anschließend wieder mit Flies aufgenommen. Auf dieses Trenngel wird das Sammelgel gegossen, in welches ein „Kamm“ so gesteckt wird, dass dadurch 10 Ladetaschen im Gel entstehen. Nun setzt man die auspolymerisierten Gele in der Halterung der Gelelektrophoresekammern ein und füllt Zwischen- und Außenraum mit Laufpuffer (1x) auf. Das Beladen der Proben erfolgt zu 10 µg mit der identischen Menge Mercaptoethanol-Probenpuffer (2x), die für 10' bei 40°C und 55 rpm im Thermomixer gekocht werden. In eine Geltasche werden dann 5 µl des Proteinstandards als Marker geladen, bevor die Proben bei 80 V für 15' in das Gel laufen. Anschließend läuft die Elektrophorese bei 120 V für 90' weiter.

Primärantikörper:

- anti-Actin, monoklonal Maus (Chemicon) 1:2000
- anti-PMP70, polyklonal, Kaninchen (Abcam) 1:750
- Anti-ACAA1, polyklonal, Kaninchen (Abcam) 1:750

Sekundärantikörper:

- HRP-gekoppelter Antikörper, Ziege anti-Kaninchen (Dianova) 1:5000
- HRP-gekoppelter Antikörper, Ziege anti-Maus (Dianova) 1:5000

3.2.3 Statistik

Zur Analyse der Daten wurde das Programm „Excel-Mac 2011“ sowie „Graph Pad Prism“ verwendet. Die statistische Auswertung erfolgt für Gewichts- Motorikuntersuchungen mittels Varianzanalyse durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) bzw. einem abhängigen und unabhängigen Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Zur Analyse der Gewichtsveränderungen wurde die 1. Messung mit der jeweiligen am Ende des Versuchs verglichen. Für den Grid-Test und den Rotarod-Test wurde der Unterschied zwischen Woche 1 und Woche 4 erhoben. Beim Rotarod-Test wurde außerdem Durchschnitt der 3 erhobenen Zeiten pro Versuch ermittelt und der Unterschied zwischen Woche 2 und Woche 4 analysiert. Für die Datenerhebung der quantitativen Real-Time-PCRs wurde jeweils der Mittelwert der mRNA-Konzentrationen der 3 gemessenen Tiere berechnet.

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede ab $p < 0,05$ betrachtet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm „Graph Pad Prism6“ verwendet.

Für die Auswertung der Western Blots ist mit dem Zweistichproben-t-Test von Excel gearbeitet worden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Analyse der Gewichtskontrolle und der Motoriktests

In der vorliegenden Studie wurden zwei Verhaltenstests zur Überprüfung der Substanztoxizität anhand von motorischen Fähigkeiten durchgeführt. Darüber hinaus erfolgten Gewichtsmessungen im Abstand von drei Tagen.

4.1.1 Normales Körpergewicht der mit PPAR- γ -Agonisten behandelten Mäuse

Bei allen Wildtyp – und Knockout-Tieren konnte während der Behandlung mit Pioglitazon eine leichte Gewichtszunahme festgestellt werden [Abb. 11.b-d]. Besonders auffallend ist die Gewichtsentwicklung der ABCD1-Mäuse gegenüber den wildtypischen Tieren. Diese sind im Schnitt alle etwa zwei Gramm schwerer. Dieses Ergebnis trifft auch auf die unbehandelten Kontrollen zu [Abb. 11.a].

Insgesamt scheint damit auch die höchste Dosis von Pioglitazon keine toxischen Effekte auf die Tiere zu haben.

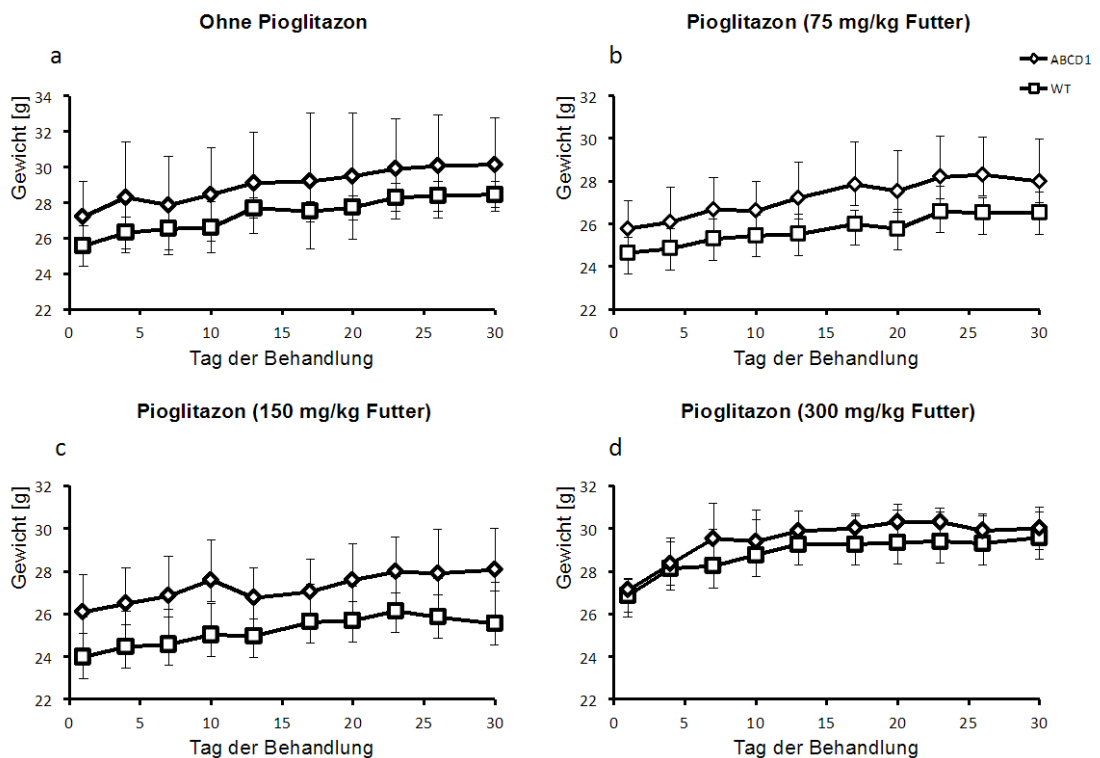


Abb. 11a-d. Entwicklung des Körpergewichts. Grafische Darstellung des Körpergewichts von Mäusen (n=6) während der 30 Tage langen Behandlung mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (b-d) des PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon. Der Agonist wurde den Tieren ab dem Alter von 2 Monaten im Futter verabreicht. Es ist auffällig, dass in allen Behandlungsgruppen ABCD1-Knockout-Mäuse ein höheres Gewicht als wildtypische Mäuse aufweisen. Die Gewichtsunterschiede sind bei sämtlichen Behandlungsgruppen nicht signifikant. Die Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als $SD \pm$ Mittelwert dargestellt.

4.1.2 Unauffällige Motorik im Grid-Test

Zur weiteren Toxizitätsüberprüfung wurde der Grid-Test angewandt. Eventuelle Motorikverschlechterungen dienten hierbei als Indikator für eine mögliche Dosisüberschreitung.

Alle Tiere fast jeder Gruppe sind im Durchschnitt 1 - 3 mal auf 100 cm Grid-Strecke zwischen die Gitter getreten [Abb. 12a-c]. Die mit 300 mg/kg Futter [Abb. 12d] behandelten Tiere hatten weniger Fehlritte als die Tiere mit den niedrigeren Dosiswerten. Vergleicht man alle behandelten (sowohl wildtypische als auch ABCD1-/-Tiere) mit den unbehandelten Tieren, so gibt es statistisch signifikante Unterschiede zur Gruppe mit der mittleren [Abb. 12c] und zur höchsten Dosis [Abb. 12d] ($p=0,04$). Nach der Veröffentlichung von Kassmann et al. 2007 wurden pathologische Motoriken in Form vom Ataxien ab drei Fehlversuchen auf der gleichen Distanz festgelegt. Somit konnten in der vorliegenden Studie keine motorischen Auffälligkeiten ermittelt werden. Die Dosis des PPAR-Agonisten ist damit mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht toxisch gewesen.

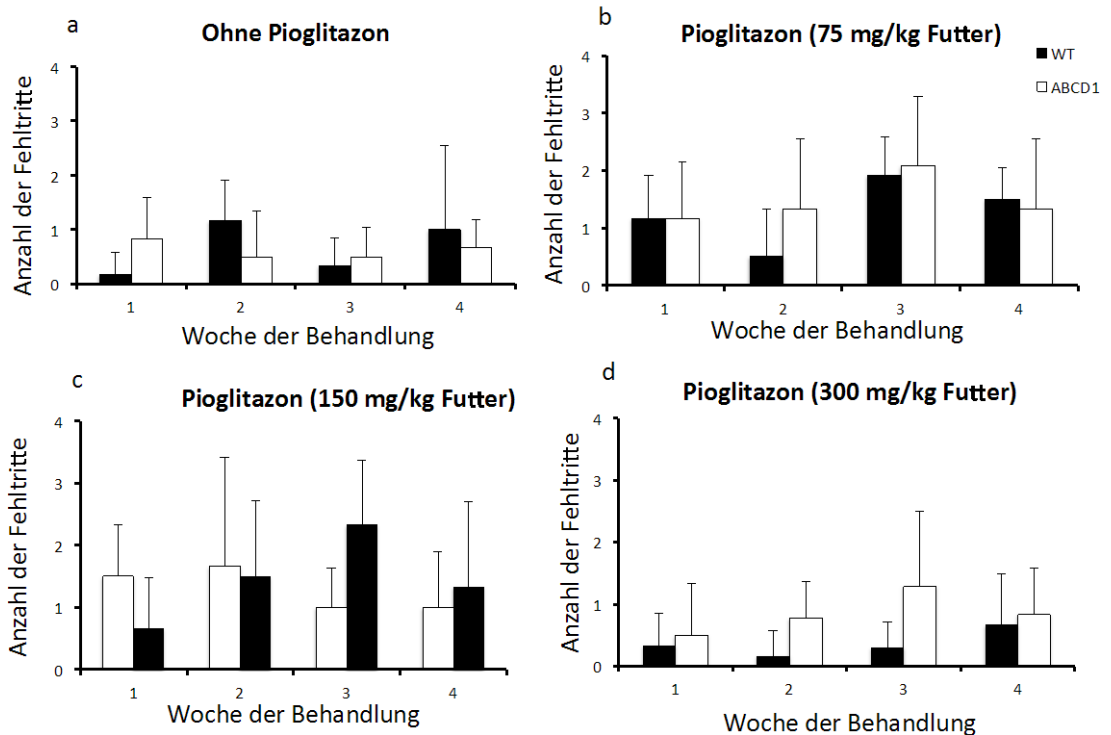


Abb. 12a-d. Auswertung des Grid-Tests. Grafische Darstellung des Grid-Tests von Mäusen ($n=6$) während der 30 Tage langen Behandlung mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (b-d) des PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon. Der Agonist wurde den Tieren ab dem Alter von 2 Monaten im Futter verabreicht. Es ist erkennbar, dass in allen Behandlungsgruppen ABCD1-Knockout-Mäuse und wildtypische Tiere im Durchschnitt etwa 1-3 mal auf 100 cm Teststrecke durch das Gitter getreten sind. Laut Kassmann et al. 2007 wird eine Pathologie der Motorik ab drei Fehlversuchen bewertet. Eine Motorikverschlechterung und damit Toxizität der Substanz in allen Konzentrationen kann hier somit nicht belegt werden. Vergleicht man die Gruppen statistisch untereinander, so waren signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Tieren (a) und welchen der mittleren Dosisverabreichung (c) ($p=0,04$) sowie welchen der höchsten Dosis (d) ($p=0,04$) festzustellen. Die Daten wurden mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT-Test) ausgewertet.

4.1.3 Rotarod-Test zeigt keine motorischen Verschlechterungen

Hier wurden die Ausdauer sowie die motorischen Fähigkeiten im Koordinationstest überprüft. Bei diesem Motoriktest zeigen die Versuchstiere üblicherweise ein Lernverhalten auf, der sich durch eine längere Verweildauer am Ende der Testreihe zeigt [Zhang et al. 2013]. Statistisch signifikante Ergebnisse, die diese trainierte Motorikverbesserung beweist, erhalten wir im Vergleich von Woche 1 zu Woche 4 sowohl bei den wildtypischen ($p=0,003$), als auch bei den ABCD1-/-Tieren ($p=0,001$). In der letzten Behandlungswoche war die Verweildauer von ABCD1-/-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen signifikant verringert ($p=0,01$) [Abb. 13a]. Vergleicht man nun im DUNNETT-Test alle behandelten (sowohl wildtypische als auch ABCD1-/-Tiere) mit den unbehandelten Tieren, so gibt es statistisch keine signifikanten

Unterschiede zur Gruppe mit der niedrigsten Dosis ($p=0,96$) [Abb. 13a], zur mittleren ($p=0,98$) [Abb. 13c] und zur höchsten Dosis [Abb. 13d] ($p=0,27$). Verschlechterungen hinsichtlich motorischer Fähigkeiten, können anhand der vorliegenden Rotarod-Test-Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Somit wurde gezeigt, dass weder die Gewichtsentwicklung, der motorische Koordinationstest noch der Ausdauertest darauf schließen lassen, dass die Tierbehandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon einen toxischen Effekt auf die Mäuse hatte.

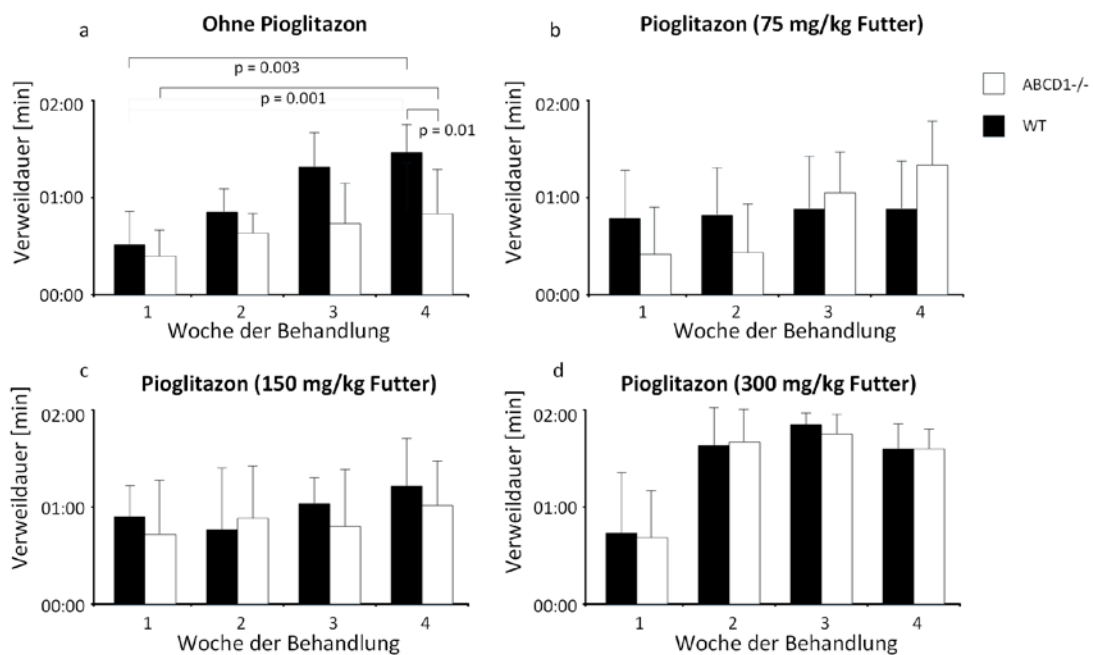


Abb. 13a-d. Auswertung des Rotarod-Tests. Grafische Darstellung des Rotarod-Tests von Mäusen ($n=6$) während der 30 Tage langen Behandlung mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen (b-d) des PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon. Der Agonist wurde den Tieren ab dem Alter von 2 Monaten im Futter verabreicht. Ein signifikantes Lernverhalten und somit Leistungssteigerung erhalten wir innerhalb der unbehandelten wildtypischen ($p=0,003$), als auch innerhalb der unbehandelten ABCD1-/-Tiergruppe ($p=0,001$) im abhängigen Zweistichproben-t-Test [Abb. 13a]. Am Ende der Testreihe (Woche 4) war die Verweildauer der Knockout-Mäuse auf dem Stab signifikant kürzer als die von wildtypischen Tieren ($p=0,01$, unabhängiger Zweistichproben-t-Test). Vergleicht man statistisch alle behandelten (sowohl wildtypische als auch ABCD1-/-Tiere) mit den unbehandelten Tieren, so gibt es statistisch keine signifikanten Unterschiede zur Gruppe mit der niedrigsten Dosis ($p=0,96$) [Abb. 13a], zur mittleren ($p=0,98$) [Abb. 13c] und zur höchsten Dosis ($p=0,27$) [Abb. 13d]. Diese Daten wurden mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

4.2 Analyse der Genexpression mit qRT-PCR

Bei der Untersuchung des Einflusses auf peroxisomale Stoffwechselwege wurden die im Folgenden beschriebenen Gene im Hirngewebe von Mäusen untersucht:

Das Gen PMP70 (ABCD3) und das Gen PEX14 kodieren beide für peroxisomale Membranproteine. Sie sind auch am Proteintransport ins Lumen von Peroxisomen beteiligt. Proteine der Gene ACAA1, ACOX1 und MFP2 sind in der peroxisomalen β -Oxidation involviert. SOD1 und GPX1 sind Marker des oxidativen Stresslevels bzw. des Niveaus der antioxidativen Elevation. PEX11b agiert als Mediator bei der Vermehrung und Teilung von Peroxisomen.

Es kam bei wildtypischen Tieren zu knapp signifikanten Veränderungen der PMP70-Expression nach Pioglitazonbehandlung ($p=0,05$ bei mittlerer und höchster Dosis) [Abb. 16b]. Erstaunlich ist, dass Knockout-Mäuse ohne Pioglitazon bereits eine deutliche Expressionssteigerung von PMP70 ($p=0,005$) zeigten [Abb. 14a].

Während die Expressionsergebnisse der Gene PEX14, ACAA1, ACOX1 sowie MFP2 nur zu keinen bzw. zu gering signifikanten Unterschieden führte, konnte bei den oxidativen Stressgenen SOD1 und GPX1 deutliche Resultate in der Expression festgestellt werden. Gegenüber unbehandelten Tieren war SOD1 bei den behandelten wildtypischen Tieren mit 300 mg Pioglitazon pro Kilogramm Futter signifikant stärker exprimiert worden ($p=0,01$) [Abb. 19b]. Unbehandelte Knockout-Mäuse zeigen bereits eine Tendenz der Expressionssteigerung des Gens gegenüber den wildtypischen Tieren ($p=0,005$) [Abb. 19a]. So konnte auch bei behandelten gegenüber unbehandelten Wildtyptieren eine stärkere GPX1-Expression ermittelt werden ($p=0,004$ bei der höchsten und $p=0,02$ bei der mittleren Dosis) [Abb. 20b]. Bei unbehandelten Knockout-Mäusen war gegenüber Wildtyptieren ebenfalls eine signifikante Tendenz der Hochregulation von GPX1 erkennbar ($p=0,005$) [Abb. 20a]. Die Messungen für PEX11b wiederum lieferten keine signifikante Veränderungen [Abb. 21a-c].

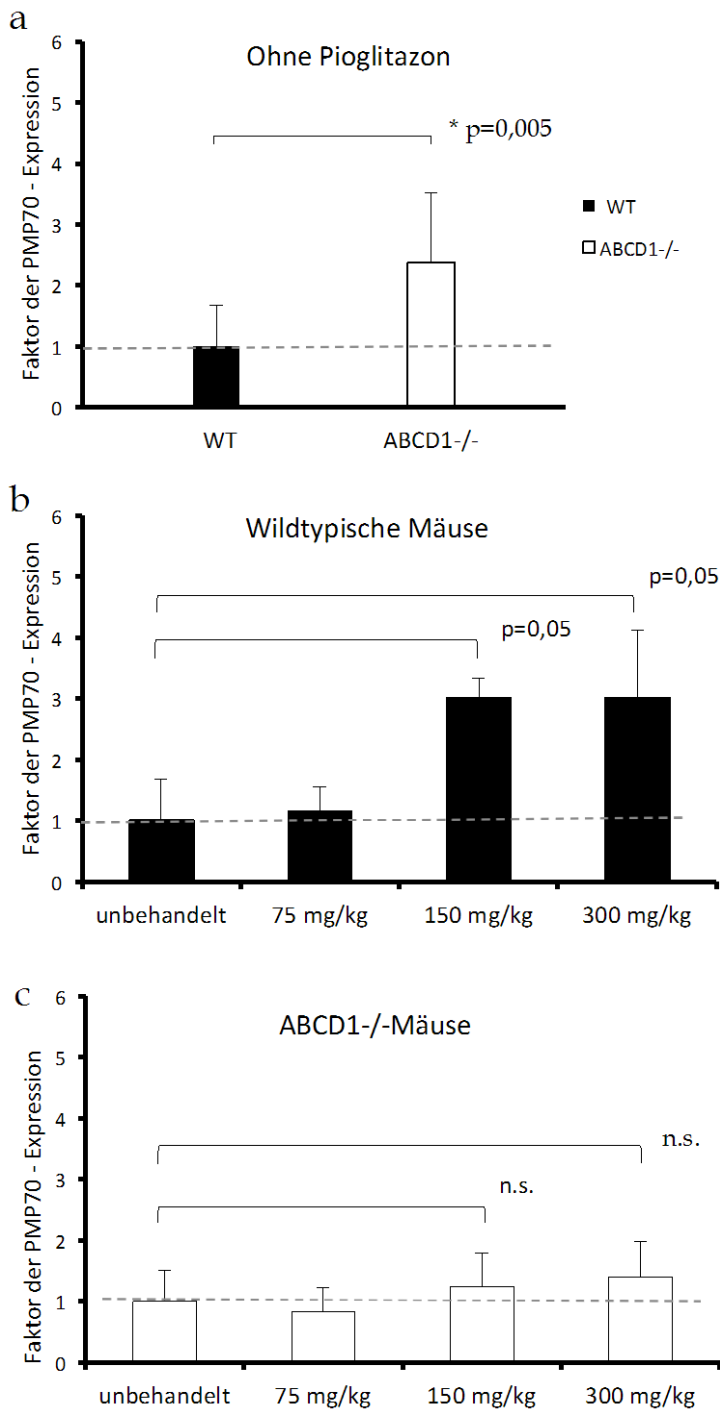


Abb. 14a-c. Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der PMP70-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen jeweils die Werte der mRNA-Konzentration nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta C_t}$. **(a)** Unbehandelte Knockout-Mäuse haben bereits eine deutliche signifikante Expressionsteigerung von PMP70 ($p=0,005$) im Vergleich zu unbehandelten Wildtypieren. **(b)** Gegenüber unbehandelten wildtypischen Tieren ist das Gen bei Tieren mit höchster Dosis signifikant stärker exprimiert worden ($p=0,01$). **(c)** Zu sehen sind die ABCD1^{-/-}-Tiere mit entsprechender Behandlung. Die Expression ist nicht signifikant erhöht. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

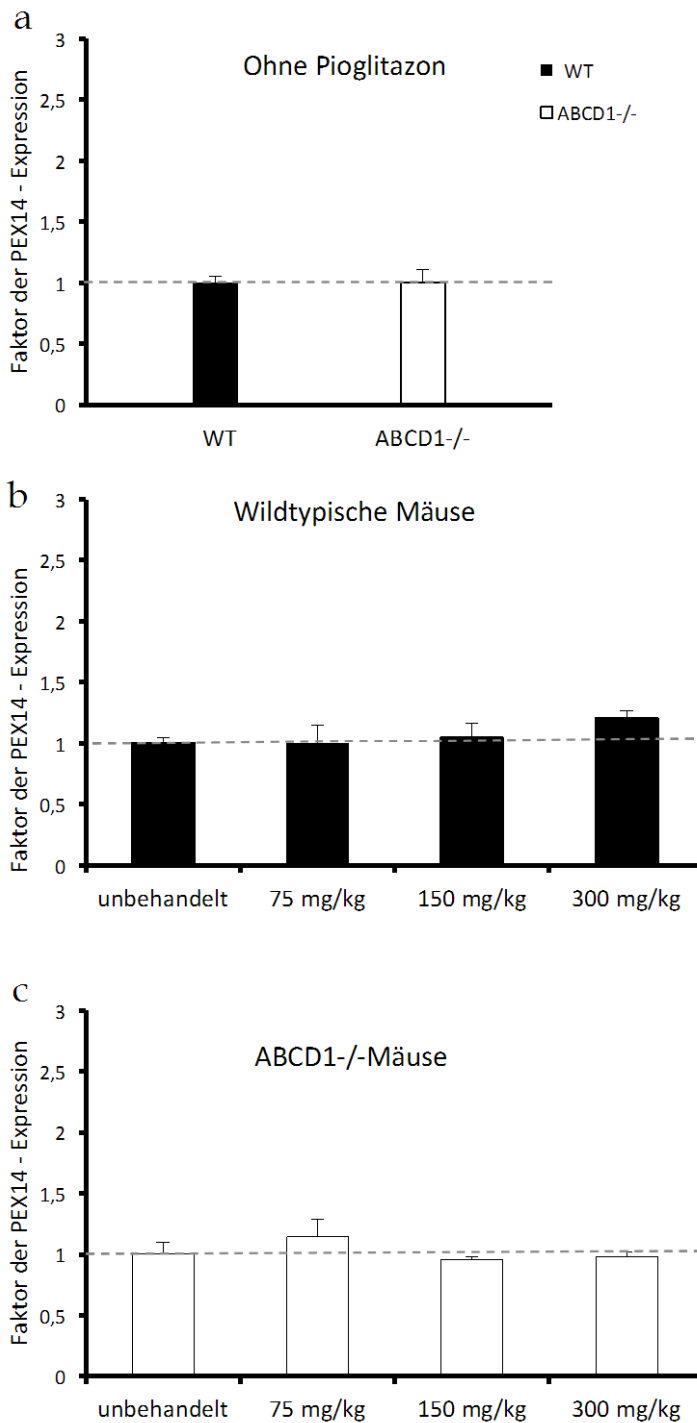


Abb. 15a-c. qRT-PCR zur Ermittlung der PEX14-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta Ct}$. **(a)** Dargestellt sind PEX14-Expressionsraten im Gehirn wildtypischer und Knockout-Mäuse ohne Behandlung mit Pioglitazon. Es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. **(b)** Bei Wildtypitieren mit Behandlung ist die Expression weitgehend unverändert. **(c)** Zwischen behandelten und unbehandelten Knockout-Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied der PEX14-Expression. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

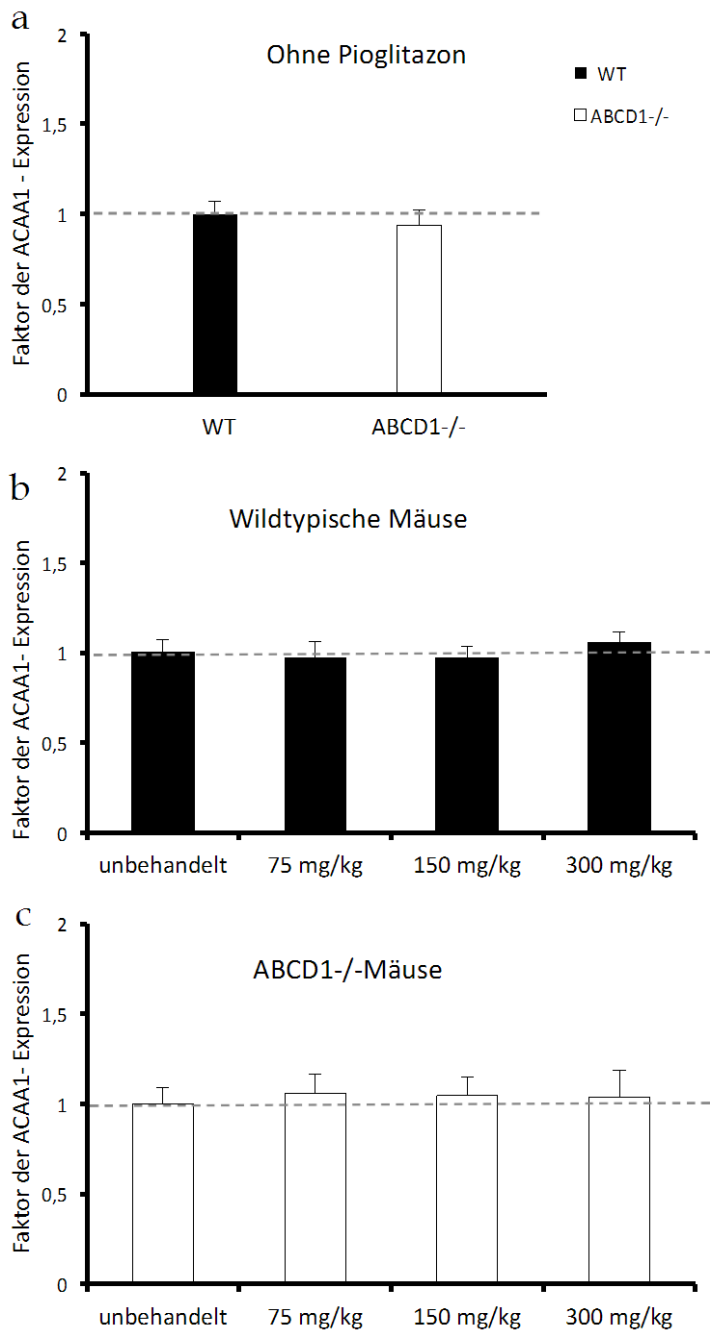


Abb. 16a-c. Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der ACAA1-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen jeweils die Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta C_t}$. **(a)** Dargestellt sind ACAA1-Expressionsraten im Gehirn wildtypischer und Knockout-Mäuse ohne Behandlung mit Pioglitazon. Es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. **(b)** Bei Wildtypitieren mit Behandlung ist die Expression weitgehend unverändert. **(c)** Zwischen behandelten und unbehandelten Knockout-Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied der ACAA1-Expression. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

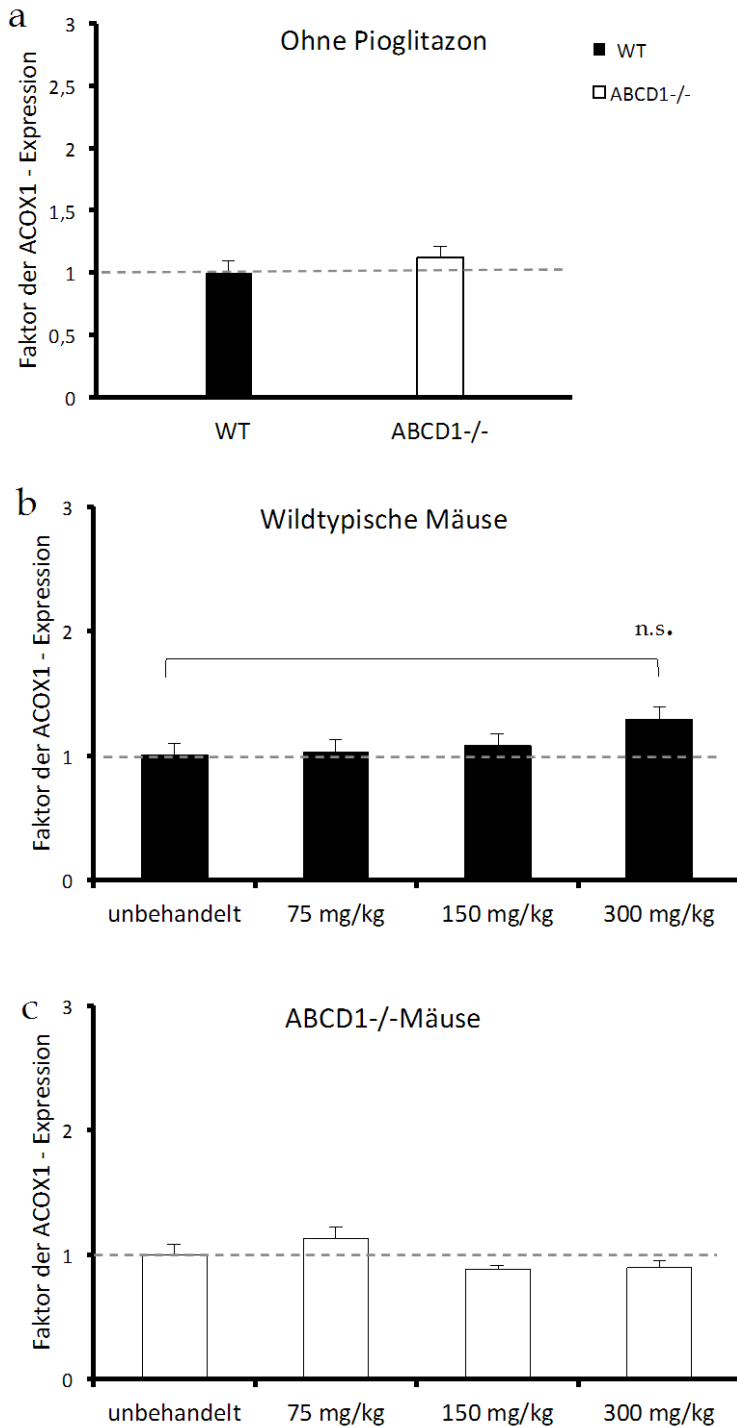


Abb. 17a-c. qRT-PCR zur Ermittlung der ACOX1-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta Ct}$. **(a)** Dargestellt sind ACOX1-Expressionsraten im Gehirn wildtypischer und Knockout-Mäuse ohne Behandlung mit Pioglitazon. Es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. **(b)** Bei Wildtypitieren mit Behandlung ist die Expression weitgehend unverändert. **(c)** Zwischen behandelten und unbehandelten Knockout-Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied der ACOX1-Expression. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

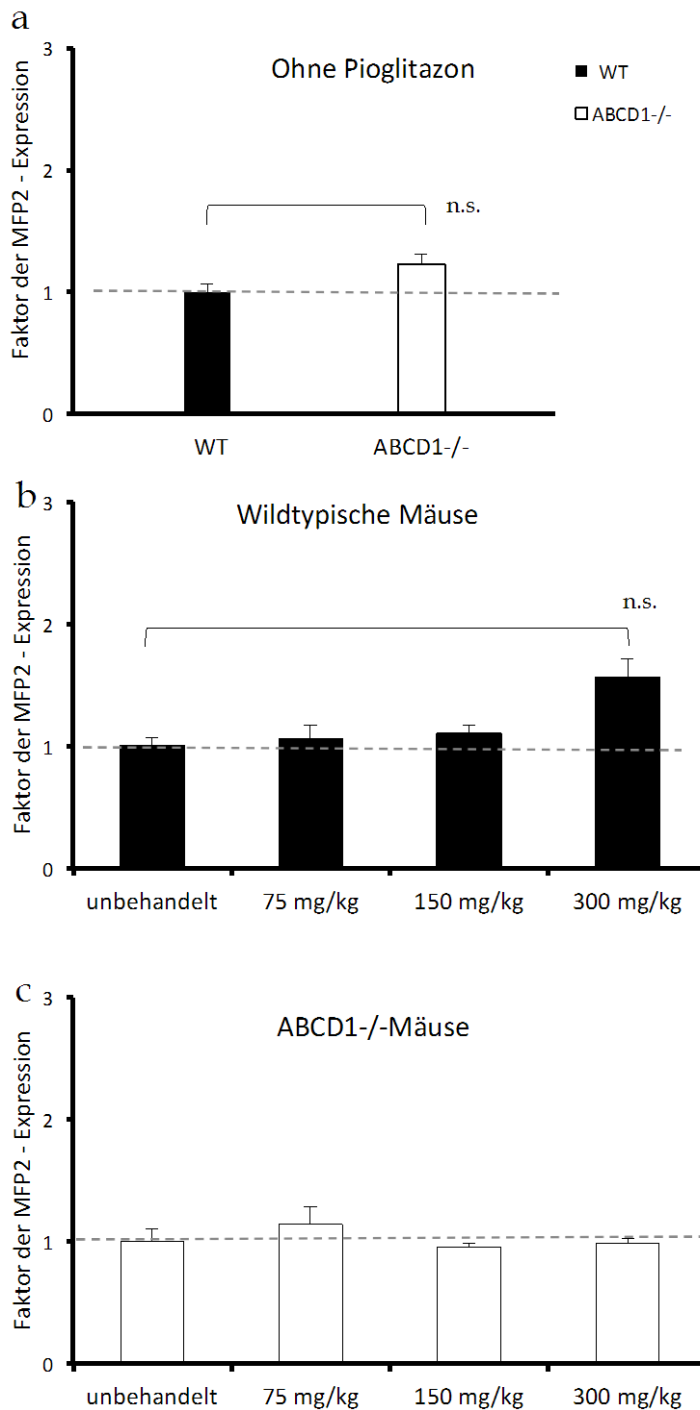


Abb. 18a-c. qRT-PCR zur Ermittlung der MFP2-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Bilder zeigen Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{\Delta\Delta Ct}$. **(a)** Dargestellt sind MFP2-Expressionsraten im Gehirn wildtypischer und Knockout-Mäuse ohne Behandlung mit Pioglitazon. Es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. **(b)** Bei Wildtypitieren mit Behandlung ist die Expression weitgehend unverändert. **(c)** Zwischen behandelten und unbehandelten Knockout-Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied der MFP2-Expression. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT).

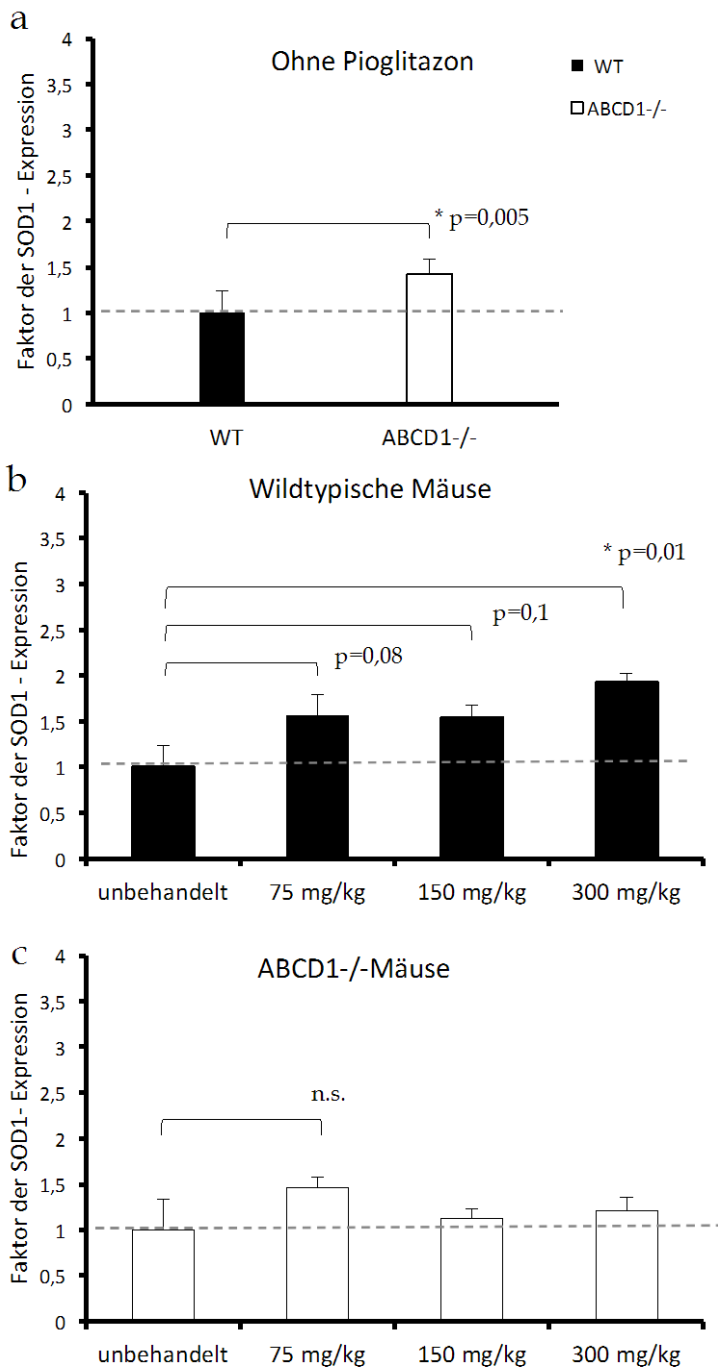


Abb. 19a-c. Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der SOD1-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen jeweils die Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta Ct}$. **(a)** Unbehandelte Knockout-Mäuse haben bereits eine deutliche signifikante Expressionsteigerung von SOD1 ($p=0,005$) im Vergleich zu unbehandelten Wildtypieren. **(b)** Gegenüber unbehandelten wildtypischen Tieren ist das Gen bei Tieren mit höchster Dosis signifikant stärker exprimiert worden ($p=0,01$). **(c)** Zu sehen sind die ABCD1^{-/-}-Tiere mit entsprechender Behandlung. Die Expression ist nicht signifikant erhöht. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

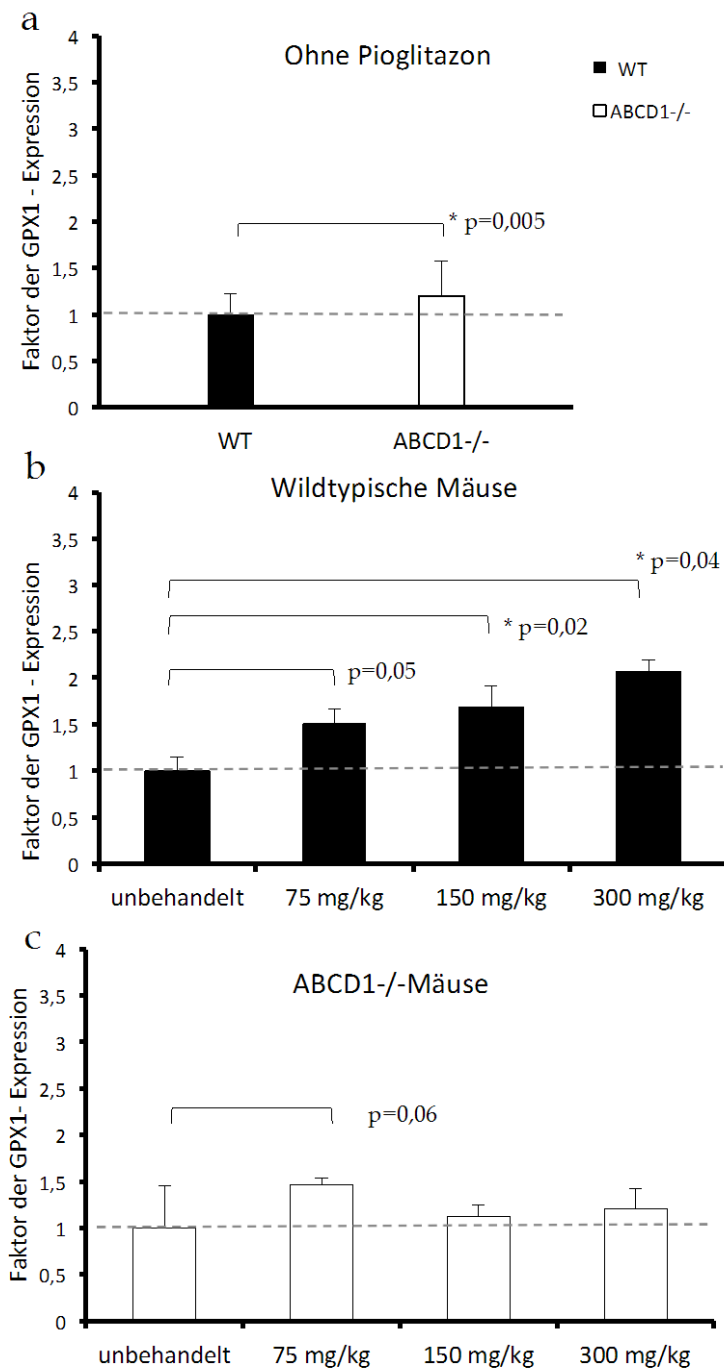


Abb. 20a-c. Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der GPX1-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen jeweils die Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta C_t}$. **(a)** Unbehandelte Knockout-Mäuse haben bereits eine deutliche signifikante Expressionsteigerung von GPX1 ($p=0,005$) im Vergleich zu unbehandelten Wildtypieren. **(b)** Gegenüber unbehandelten wildtypischen Tieren ist das Gen bei Tieren mit höchster Dosis signifikant stärker exprimiert worden ($p=0,04$). Auch bei mittlerer Dosis ist eine Signifikanz zu ermitteln ($p=0,02$) **(c)** Zu sehen sind die ABCD1-/-Tiere mit entsprechender Behandlung. Die Expression ist nicht signifikant erhöht ($p=0,06$). Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

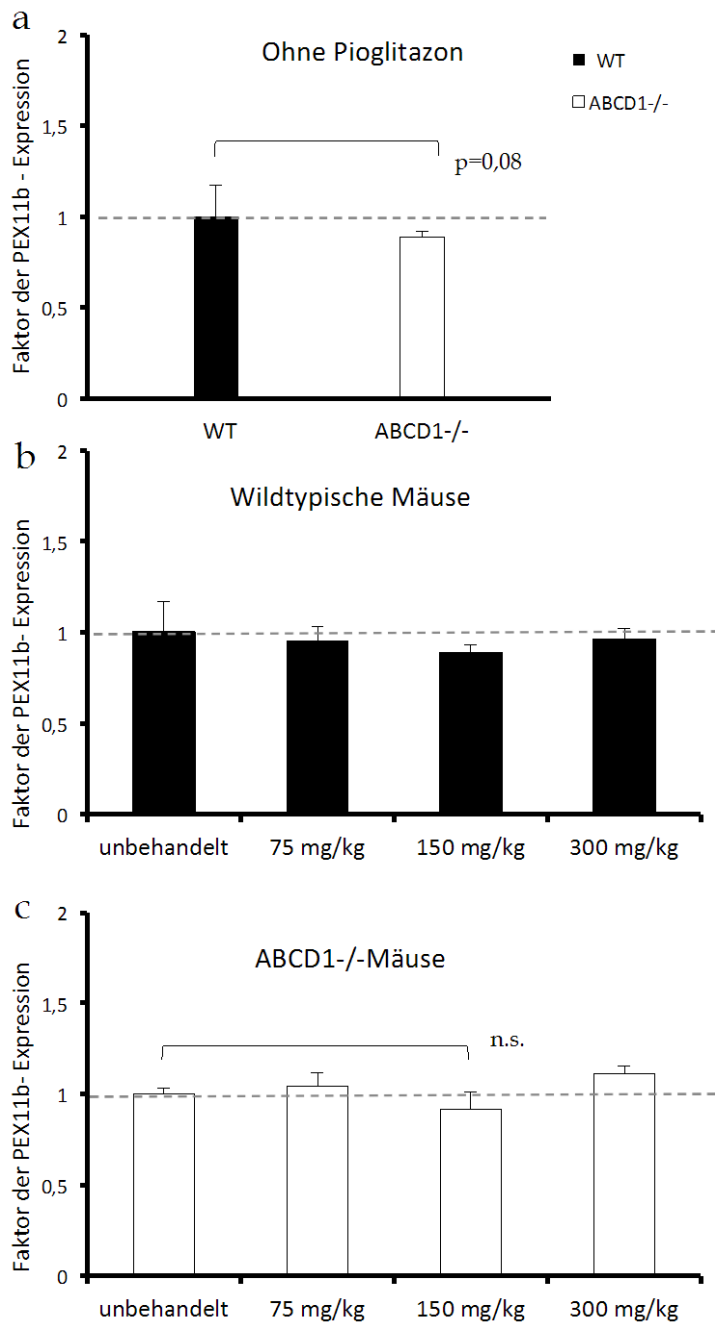


Abb. 21a-c. Quantitative RT-PCR zur Ermittlung der PEX11b-Expression im Gehirn von Mäusen (n=3). Die Abbildungen zeigen jeweils die Werte der mRNA-Konzentration, nach $c = 1,96^{-\Delta\Delta C_t}$. **(a)** Dargestellt sind PEX11b-Expressionsraten im Gehirn wildtypischer und Knockout-Mäuse ohne Behandlung mit Pioglitazon. Es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. **(b)** Bei Wildtypitieren mit Behandlung ist die Expression weitgehend unverändert. **(c)** Zwischen behandelten und unbehandelten Knockout-Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied der PEX11b-Expression. Die Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und mit einem multiplen Vergleichstest (DUNNETT) ausgewertet.

4.3 Proteinmessung mit Western Blots

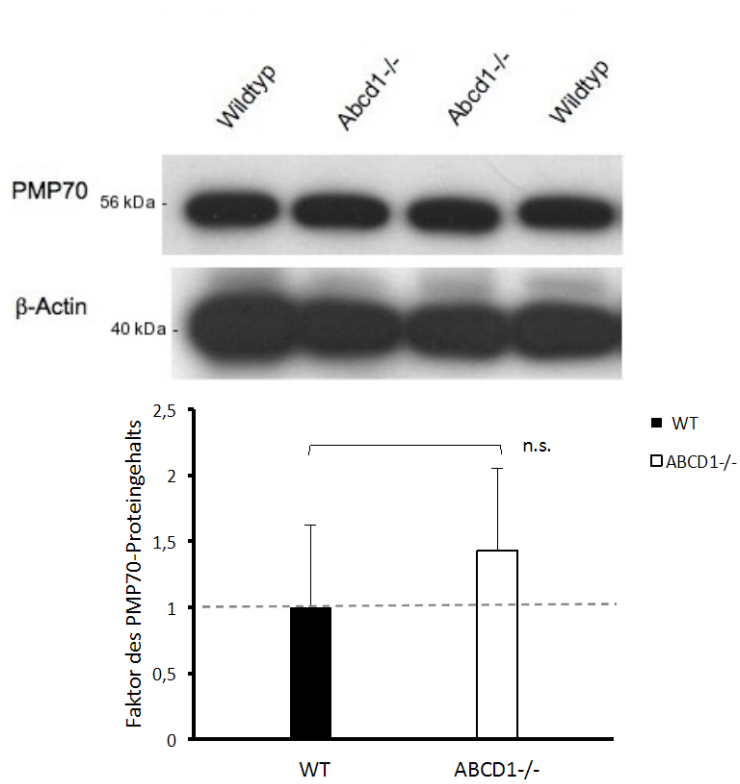
Für die Evaluation der Proteinniveaus wurden zwei Hirnlysate pro Gruppe auf die Gele aufgetragen. Zur Bewertung der Füllmengenunterschiede wurden *Reprobes* mit β -Actin vorgenommen. Untersucht wurden die Werte der Proteine PMP70, ACAA1 sowie β -Actin als Standardprotein.

Zwischen unbehandelten wildtypischen und ABCD1-/-Tieren war hinsichtlich der PMP70-Banden kein Unterschied erkennbar [Abb. 22a].

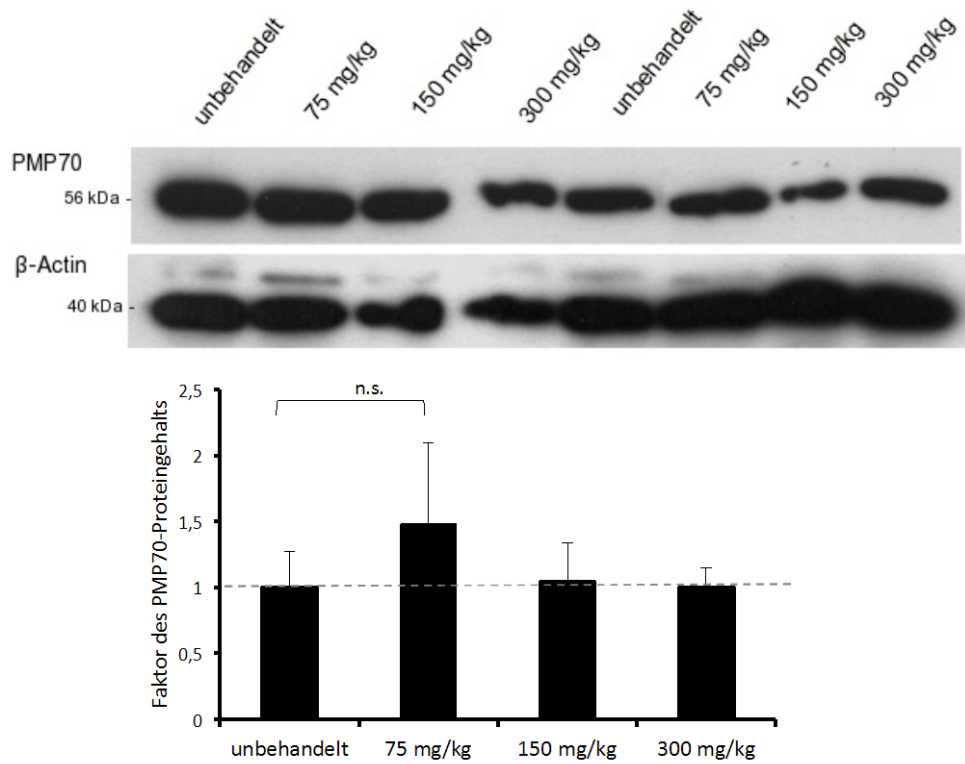
Bei der PMP70-Analyse der wildtypischen Tiere nach Behandlung mit Pioglitazon waren keine signifikanten Unterschiede, die auf die Behandlung zurückzuführen sind, nachweisbar [Abb. 22b]. Bei der PMP70-Messung der ABCD1-defizienten Mäusen nach Behandlung mit Pioglitazon war in der mittleren (150 mg/kg) eine etwas deutlichere PMP70-Bande zu erkennen als im Vergleich zu den unbehandelten Tieren [Abb. 22c]. Dieser Unterschied ist auch statistisch signifikant ($p=0,01$).

Bei der ACAA1-Proteinmessung der wildtypischen Mäuse nach Behandlung mit Pioglitazon kam es zu großen Schwankungen der Ergebnisse [Abb. 23a], so dass sich daraus keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des ACAA1-Proteingehaltes ableiten ließen. Unter den ABCD1-defizienten Tieren wiederum fielen die ACAA1-Banden der behandelten Knockout-Mäuse etwas schwächer als bei den unbehandelten Tieren aus. Das Ergebnis deckte sich mit der leichten Herunterregulation bei der quantitativen Real-Time-PCR. Statistisch wurde allerdings keine Signifikanz festgestellt.

a Unbehandelte Mäuse



b Wildtypische Mäuse nach Behandlung mit Pioglitazon



C ABCD1^{-/-}-Mäuse nach Behandlung mit Pioglitazon

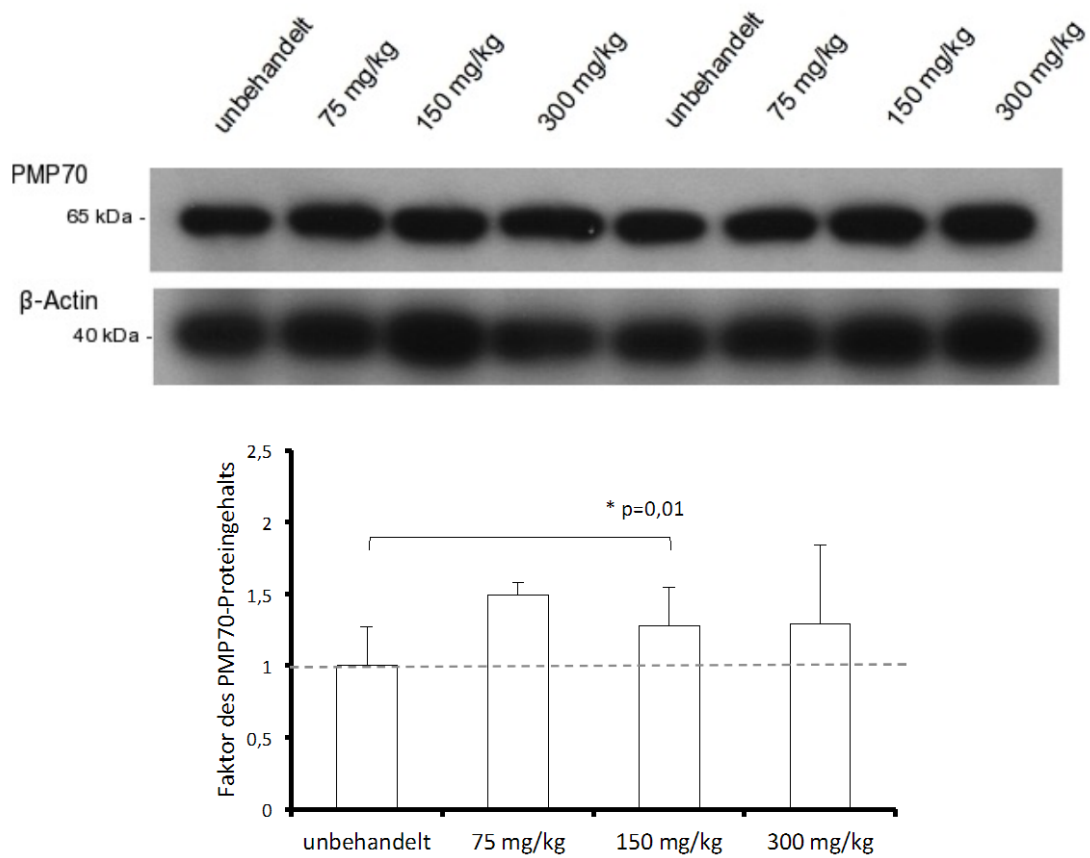
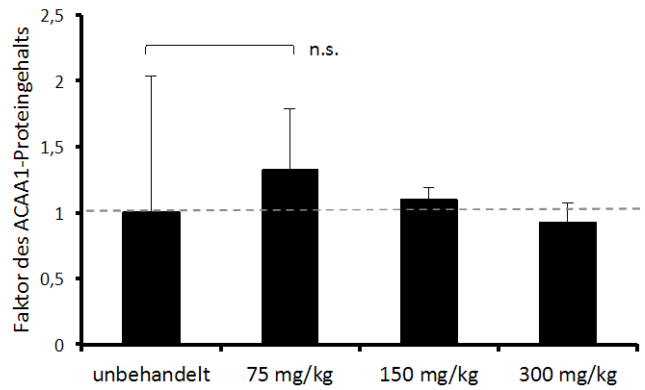
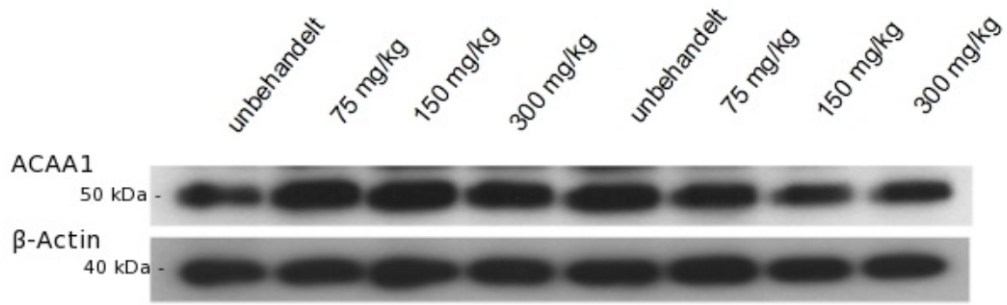


Abb. 22a-c. Messung der Proteinkonzentration von PMP70 durch Western Blot aus Hirnlysaten von Mäusen ohne Pioglitazon-Behandlung (a) sowie nach 30-tägiger Fütterung mit Pioglitazon in unterschiedlichen Konzentrationen (b-c).

Als Primärantikörper wurden Anti-PMP70 sowie Anti-Actin als Standard verwendet. **(a)** Zwischen unbehandelten wildtypischen und ABCD1^{-/-}-Tieren ist hinsichtlich der PMP70-Banden sowie nach statistischer Auswertung kein signifikanter Unterschied erkennbar. **(b)** Bei der PMP70-Analyse der wildtypischen Tiere nach Behandlung mit Pioglitazon sind keine signifikanten Unterschiede, die auf die Behandlung zurückzuführen sind, nachweisbar. **(c)** Dargestellt ist die PMP70-Messung bei den ABCD1-defizienten Mäusen nach Behandlung mit Pioglitazon. In der mittleren Konzentration (150 mg/kg) ist im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,01$). Alle Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und als $SD \pm$ Mittelwert dargestellt. Die Ergebnisse sind im Zwei-Stichproben-t-Test statistisch ausgewertet. Von jeder Probe wurde ein technisches Replikat geladen ($n=2$).

a Wildtypische Mäuse nach Behandlung mit Pioglitazon



b ABCD1^{-/-}-Mäuse nach Behandlung mit Pioglitazon

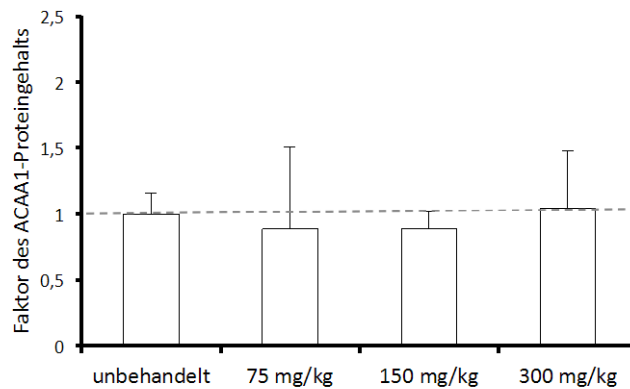
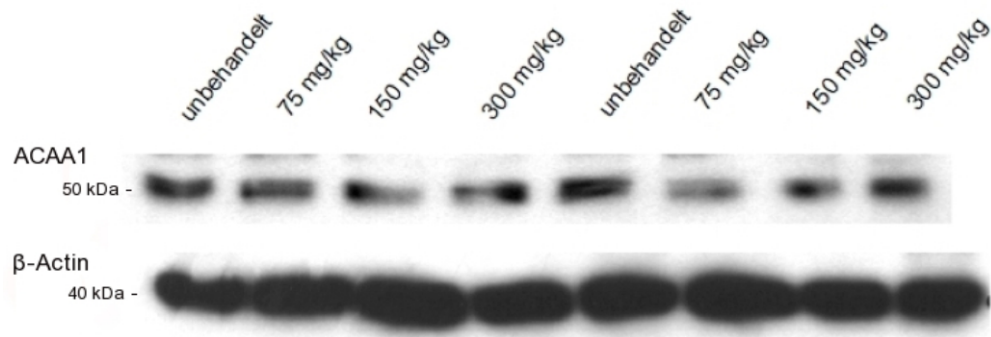


Abb. 23a-b. Messung der Proteinkonzentration von ACAA1 durch Western Blot aus Hirnlysaten von Mäusen nach 30-tägiger Fütterung mit Pioglitazon in unterschiedlichen Konzentrationen.

Als Primärantikörper wurden Anti-ACAA1 sowie Anti-Actin als Standard verwendet. **(a)** Bei der ACAA1-Analyse der wildtypischen Tiere nach Behandlung mit Pioglitazon sind keine signifikanten Unterschiede, die auf die Behandlung zurückzuführen sind, nachweisbar. **(b)** Dargestellt ist die ACAA1-Messung bei den ABCD1-defizienten Mäusen nach Behandlung mit Pioglitazon. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu unbehandelten Tieren festzustellen. Alle Daten sind auf die β -Actin-Werte normalisiert und als $SD \pm$ Mittelwert dargestellt. Die Ergebnisse sind im Zwei-Stichproben-t-Test statistisch ausgewertet. Von jeder Probe wurde ein technisches Replikat geladen ($n=2$).

5. DISKUSSION

5.1 Phänotypisierung und Substanztoxizität

Durch die Behandlung mit dem PPAR γ -Agonisten Pioglitazon in den Konzentrationen 75, 150 und 300 mg pro Kilogramm Futter konnten aufgrund der Motoriktests und der Gewichtsanalyse weder eine signifikante Veränderung der Motorikleistungen noch eine Gewichtsabnahme der Mäuse verzeichnet werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Wirkstoff hinsichtlich dieser Marker keinen toxischen Effekt auf die Versuchstiere hatte. Äußerst auffällig sind – unabhängig von der Behandlung mit Pioglitazon – die Unterschiede des Gewichts zwischen Wildtyp- und ABCD1-/-Tieren. Die Knockout-Mäuse sind um etwa 8 % schwerer als die Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen müssen zukünftig in einer längeren Verlaufskontrolle weiter betrachtet werden, um den Grund dieses Gewichtsunterschiedes zu analysieren.

Im Hinblick auf die Evaluation der Testmethoden waren Grid- und Rotarodtest bezüglich der Variabilität ausreichend. Weiterhin konnten bei der Durchführung dieser Testmethoden keine ungewöhnlichen Bewegungsmuster festgestellt werden. Dazu zählen Veränderungen wie Ataxien, Lähmungen usw. Unter Umständen sind die beiden Verfahren jedoch nicht sensitiv genug für motorische Schwächen, die durch die Verabreichung einer Substanz wie Pioglitazon hervorgerufen werden könnten.

In einem Anschlussprojekt müssen zusätzlich zu den Untersuchungen von Motorik und Gewicht weitere Kriterien zur Überprüfung der Toxizität betrachtet werden. Dazu zählen beispielsweise Analysen zur Tumorbildung und zu kognitiven Leistungen der Tiere. Betrachtet man die Toxizitätsüberprüfungen im Rahmen der vorliegenden Studie als eine Voraussetzung für ein solches Folgeprojekt, sind diese als gelungen anzusehen.

5.2 Genexpressions- und Proteinlevelveränderung

5.2.1 Gesteigerte PMP70-Expression als Marker des Peroxisomen-Turnovers im Gehirn

Das Gen PMP70 (ABCD3) kodiert für einen ABC-Transporter in der Peroxisomenmembran

und hat wichtige Funktionen bezüglich des Metabolitentransports in das Zellorganell. Die Untersuchung von PMP70-Expression ist von großem Interesse bezüglich der Peroxisomenerneuerungs- bzw. -proliferationsrate. Hierfür lieferte PMP70 als membranständiges Protein den geeigneten Testmarker.

Signifikante Veränderungen bei der Genexpression durch quantitative Real-Time-PCR wurden eindeutig festgestellt. PMP70 ist bereits vor der Behandlung mit Pioglitazon in Hirnen von ABCD1-/-Tieren vermehrt exprimiert, steigert sich nach der Medikamentenverabreichung bei den Wildtypen dann nochmals und erhöht sich schließlich nur noch geringfügig, aber signifikant, bei den Knockout-Mäusen [Abb. 14a-c]. Ein ähnliches Ergebnis konnte im proteinbiochemischen Verfahren dagegen nur bei den ABCD1-defizienten Tieren in der mittleren Dosisgruppe (150 mg/kg) ermittelt werden [Abb. 22c]. Bei allen anderen Gruppen wurden im Western Blot keine signifikanten Proteinsteigerungen festgestellt. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich zwar der Turnover der Peroxisomen erhöht hat, d.h. ältere Peroxisomen sind durch neue Peroxisomen ersetzt worden, dass sich aber die Gesamtzahl an Peroxisomen und somit der Absolutgehalt an PMP70-Proteinen nicht geändert hat.

Es war lange Zeit unklar, ob Pioglitazon als Wirksubstanz überhaupt die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann. Viele Jahre erwies sich der PPAR γ -Agonist als wirksames Medikament im Bereich der peripheren Organe und Gewebe. Doch dann entdeckte man, dass sich die PPAR-Agonisten und im Speziellen das Pioglitazon in vielen Studien als wirksame bluthirnschrankengängige Medikamente erwiesen hatten. Als Beispiel sei eine Studie von Culman et al. des Jahres 2012 erwähnt, in welcher den Ratten künstlich zerebrale Ischämien ähnlich einem Schlaganfall induziert wurden. In der Reperfusionphase wurde diesen Tieren Pioglitazon zugeführt. Die Autoren konnten zeigen, dass das Medikament besonders bei früher Verabreichung neuroprotektive Eigenschaften durch die Verminderung von postischämischer Entzündung und neuronaler Degeneration besaß (Culman et al. 2012).

Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon hirschrängig ist, da es in Hirngewebe zu einem Anstieg der PMP70-Expression geführt hat. Da sich diese Ergebnisse besonders bei ABCD1-/- geringer als bei Wildtypen darstellten, sollte zukünftig über eine eventuelle Dosissteigerung nachgedacht werden. Laut Maeshiba et al. aus dem Jahr 1997 überqueren nur ungefähr 18% dieses Wirkstoffes die Blut-Hirn-Schranke in Säugetieren (Maeshiba et al. 1997).

5.2.2 PMP70-Genredundanz zu ALDP hat Auswirkungen auf die Proliferation und β -Oxidation von Peroxisomen

Andere Wissenschaftler haben an einer abweichenden These bezüglich des PMP70-Proteins gearbeitet. Diese soll in dieser Diskussion vorgestellt werden, da sie für diese Ergebnisse auch zutreffen könnte. Netik et al. haben 1999 durch die Fütterung von Fenofibrat an ABCD1-/-defizienten Tieren eine Normalisierung der β -Oxidation in der Leber von Ratten beobachtet. Der Grund hierfür liegt in der Hochregulation der mRNAs von ALDRP und PMP70, die das unfunktionelle ALD-Gen ABCD1 in seiner Funktion möglicherweise ersetzen können. Die Funktion von ABCD2 bzw. ALDPR (engl. = *ALD-related protein*) ist redundant zur Funktion des ALD-Gens. Das heißt, ALDPR ist dem ALD-Gen funktionell sehr ähnlich und soll hiermit in der Lage sein, Stoffwechselfaufgaben zu übernehmen. Außerdem wurde dies auch ein Jahr zuvor (1998) von Kemp et al. im Gehirn nachgewiesen, indem sie ALDPR durch die Gabe von 4-Phenylbutyrat, welches dem Fenofibrat ähnlich ist, an ALD-Menschen und Mäusen hochregulierten. Sie konnten eine Peroxisomenproliferation sowie eine Verminderung der überlangkettigen Fettsäuren und eine Erhöhung der β -Oxidation beobachten. Darüber hinaus halten Berger et al. (2010) eine ABCD2-Induktion für eine mögliche pharmakologische Therapieform für ALD-Patienten, wenn die Induktion stark genug ist und krankheitsrelevante Zellen erreicht. In Makrophagen- und Mikrogliazellen könnten unter dem Einfluss von ABCD2 beispielsweise Entzündungsprozesse beeinflusst werden, vorausgesetzt das Medikament kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Auch bei der hier vorliegenden Studie sind eine solche Redundanz und Funktionsübernahme der Gene PMP70 und ABCD1 vorstellbar. So zum Beispiel sind möglicherweise die β -Oxidationsmarker der KO-Tiere anhand der MFP2- und ACOX1-Werte in der qRT-PCR vor Behandlung leicht herunterreguliert und nach Pioglitazon-Gabe wieder im normalen bis hochregulierten Bereich [Abb. 18b, 17b]. ACAA1 als alleiniges β -Oxidationsenzym wird indessen in unbehandelten Tieren hoch- und nach Behandlung leicht herunterreguliert [16a-c]. Laut der Publikation von van Veldhoven aus dem Jahr 2010 haben MFP2 und ACOX1 je eine PS1-Signalsequenz, während ACAA1 eine N-terminale PTS2-Sequenz besitzt. Somit ist der Unterschied in der Expression dieser Gene zumindest strukturell erklärbar. Möglicherweise werden Proteine mit PTS2-Anhang bei der PPAR-induzierten Genregulation weniger oder gar nicht berücksichtigt. Auch dieses sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Da Netik et al. die Aussage treffen, dass ALDRP das potenteste Ersatzgen für ALDP

darstelle, sollte in einer nächsten Studie auch die ALDRP-Expression nach Gabe von PPAR γ -Agonisten untersucht werden.

5.2.3 Hochregulation oxidativer Stressgene als Kennzeichen erhöhter Stressprotektivität in Peroxisomen

Analog zur vorliegenden Studie ist auch folgendes Projekt zu ähnlichen Ergebnissen gelangt: Gray et al. haben 2011 eine Untersuchung veröffentlicht, in welcher sie gezeigt haben, dass der PPAR α -Agonist Fenofibrat in Mäusen die Expression von PMP70 bzw. ABCD3 in kortikalen Neuronen anregen konnte. Diese Tiere wurden darüber hinaus durch Stickstoffmonoxid-Exposition oxidativem Stress ausgesetzt. Die Katalase-Aktivität war ebenso erhöht. Da Katalase und PMP70 in Peroxisomen zu finden sind, gehen die Autoren davon aus, dass dieses ein Indiz dafür ist, dass die Peroxisomenaktivität und -funktion angeregt wurden. Diese peroxisomale Funktionsverbesserung wird von Gray et al. als neuroprotektiver Schutz vor Entzündungsreaktionen in Hirngewebe betrachtet. Das geschieht zum einen durch den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies mit Katalase und zum anderen durch die Dämpfung der Mikroglia-Aktivität durch Fenofibrat, indem die Zellen an der Produktion von Stickstoffmonoxid gehindert werden (Gray et al. 2011).

In der vorliegenden Studie konnte durch den Einsatz des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon die Induktion von oxidativen Stressgenen bewiesen werden. GPX1 und SOD1 sind ebenso wie Katalase an der Beseitigung von reaktiven Spezies beteiligt. Durch die Hochregulation dieser Gene [Abb. 20a-c; 19a, c] in den im Rahmen der vorliegenden Studie behandelten Tieren kann von einem Aktivieren des Oxidativen-Stress-Schutzmechanismus ausgegangen werden. Diese antioxidative Schutzantwort fiel in ABCD1-/- Tieren gegenüber Wildtypmäusen geringfügiger aus [Abb. 20b, 19b]. Dafür zeigte sich bei ihnen aber auch schon ohne den Zusatz von Pioglitazon ein gesteigerter Stresslevel [20c, 19c]. Dieses Niveau konnte durch das Medikament noch weiter erhöht werden.

In der Studie von Gray et al. konnte der Anstieg der PMP70-Expression unterdessen nur in Anwesenheit der NO-Exposition festgestellt werden. Die Autoren postulieren so eine Koabhängigkeit von Fenofibrat-induzierter PMP70-Expression mit der Präsenz von Stress- und Entzündungsmediatoren.

Dass oxidativer Stress in der Pathologie-Kaskade von X-ALD eine große Rolle spielt, haben bereits mehrere wissenschaftliche Studien bewiesen. Fourcade et al. sowie Pujol haben 2015 bzw. nochmals 2016 eine mögliche Kaskade aufgezeigt. Ausgehend von einem hohen VLCFA-

Level durch den Verlust von ABCD1 kommt es zu einer vermehrten Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran, was letztendlich zu mitochondrialen Funktionsstörungen, zu einer verminderten Bildung von ATP, zu einem energetischen Problem und letztendlich möglicherweise zu axonalem Abbau und Neurodegeneration bei α -ALD führen könnte. Auch Kruska et al. (2015) widmeten sich diesem Zusammenhang und fanden heraus, dass es vor allem Astrozyten von ABCD1^{-/-}-Mäusen sehr sensitiv auf diese Pathologie reagieren.

Somit wird der Möglichkeit einer Verminderung des oxidativen Stresses eine immense Bedeutung beigemessen. Pioglitazon als ein möglicher Aktivator von ROS-Schutzmechanismen wurde auch zuletzt von Pilipovic et al. 2015 herausgearbeitet. Nach einer Einmaldosis von Pioglitazon an Mäusen mit Hirntrauma, die dadurch vermehrtem oxidativem Schaden ausgeliefert waren, konnte auch in diesen Tieren eine erhöhte Schutzantwort auf oxidativen Stress festgestellt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zielsetzung dieser Studie war es, durch eine vierwöchige Fütterung von Pioglitazon an Mäuse

den Beweis der Intoxizität des verabreichten Medikaments als Grundlage für eine Langzeitstudie zu erbringen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aus den Motoriktests und Gewichtsüberprüfungen kann von einer unschädlichen Dosis ausgegangen werden. Die Steigerung der Pioglitazonkonzentration soll Gegenstand eines nachfolgenden Projektes werden. Darüber hinaus muss über einen längeren Verabreichungs- und Beobachtungszeitraum nachgedacht werden. Nach Pujol et al. aus dem Jahr 2002 zeigen ABCD1-/-defiziente Mäuse erst nach 15 Monaten erste neurologische Auffälligkeiten. Tiere dieses Alters sollten zukünftig unter Pioglitazoneinfluss auf das Auftreten bzw. der Veränderbarkeit der Symptome überprüft werden.

Unter Berücksichtigung des erhöhten Blasenkarzinomvorkommens bei Menschen mit Pioglitazonverabreichung müssen auch weitere Toxizitätsmarker wie Indikatoren der Tumorbildung und kognitiven Leistungen im Rahmen von Nachfolgestudien in Betracht gezogen werden.

Auch hinsichtlich der ermittelten Gewichtsunterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen sind weitere Untersuchungen erforderlich. Diese liefern möglicherweise neue Erkenntnisse zur Pathologie der ALD-Erkrankung.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Veränderung der Peroxisomen-Genese im Hirngewebe durch Pioglitazon zu überprüfen. Eine Hochregulation der Peroxisomenzahl soll den primären Effekt der ALD-Krankheit kompensieren, damit der sekundäre Schaden, der zu einer Dysfunktion des gesamten Peroxisoms in myelinbildenden Gliazellen und somit zu einer inflammatorischen Demyelinisierung führt, vermieden oder eingegrenzt wird. Dank der Ergebnisse aus den qRT-PCR-Untersuchungen wurde die signifikante Hochregulation des PMP70-Gens in beiden Genotypen gezeigt. Dies könnte durchaus auf eine peroxisomale Proliferation hindeuten. Histologische Untersuchungen mit Peroxisomenzählungen im Hirngewebe sowie auch speziell innerhalb von myelinbildenden Oligodendrozyten müssen folgen. Erst dann kann die Veränderbarkeit der Peroxisomenzahl durch Pioglitazon eindeutig belegt werden. Die vorliegenden proteinbiochemischen Ergebnisse haben bisher kaum Veränderungen der PMP70-Proteingehalte im Hirngewebe zeigen können. Jedoch könnten sie den etwaigen Erfolg der Behandlung kaschieren, indem der Turnover der Peroxisomen angeregt wurde, jedoch aber die Gesamtzahl der Zellorganellen konstant geblieben ist. Auch hierüber werden immunhistochemische Untersuchungen mit speziellen Markern wie beispielsweise PEX11b weitere Erkenntnisse geben können.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Studie durch die Pioglitazon-Behandlung die Induktion der oxidativen Stressgene GPX1 und SOD1 belegt werden. Durch die

Hochregulation dieser Gene [Abb. 20a-c; 19a,c] in den im Rahmen dieser Untersuchung behandelten Tiere kann von einem Aktivieren des Oxidativen-Stress-Schutzmechanismus ausgegangen werden. Der konkrete Einfluss dieses Ergebnisses auf die Pathologie und den Fortschritt der ALD-Krankheit muss ebenso Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Erst nach längerfristiger Etablierung dieser Ergebnisse sowie nach Sicherstellung der Ungiftigkeit der verabreichten Substanzen über einen längeren Zeitraum könnte dieser Therapieansatz auch in einer Studie mit ALD-Patienten angewandt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Hrsg.): Molekularbiologie der Zelle. Übersetzung hrsg. v. Jaenicke L. 4. Auflage; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim 2003, 812-815

Aubourg P, Adamsbaum C, Lavallard-Rousseau MC, Rocchiccioli F, Cartier N, Jambaqué I, Jakobezak C, Lemaitre A, Boureau F, Wolf C, et al. (1993): A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenoleukodystrophy. *Nat Med* 4,1261-1268

Barth, P G (2001): Late onset white matter disease in peroxisome biogenesis disorder. *Neurol* 57,1949–1955

Berger J, Moller DE (2000): The Mechanisms of action of PPARs. *Ann Rev Med* 53,409-435

Berger J, Gärtner J (2006): X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1763(12),1721-1732

Berger J, Pujol A, Aubourg P, Forss-Petter S (2010): Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol* 20(4):845-856

Berger J, Dorninger F, Forss-Petter S, Kunze M (2015): Peroxisomes in brain development and function. *Biochim Biophys Acta* 4889(15):426-427

Bloom FE, Lazerson A, Nelson CA: Brain, Mind, and Behavior. 3. Auflage; Worth Publishers, Washington 2001, 53-54

Bordet R, Gelé P, Duriez P, Fruchart JC (2006): PPARs: a new target for neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(3),285–287

Brodal P: The Central Nervous System. 2. Auflage; Oxford University Press, New York 2010, III-VIII; 6-10; 20-35

Brooks SP, Dunetti SB (2009): Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10,519-529

- Brown FR 3rd, McAdams AJ, Cummins JW, Konkol R, Singh I, Moser AB, Moser HW (1982): Cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids. *Johns Hopkins Med J* 151(6),344-351
- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Bougnères P, Schmidt M, Kalle CV, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P (2012): Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol* 507,187-198
- Culman J, Nguyen-Ngoc M, Glatz T, Gohlke P, Herdegen T, Zhao Y (2012): Treatment of rats with pioglitazone in the reperfusion phase of focal cerebral ischemia: A preclinical stroke trial. *Exp Neurol* 238(2),243-253
- Dansen TB, Wirtz KW, Wanders RJA (2000): Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH. *Nat. Cell Biol* 2,51–53
- De Duve C (2007): The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat Rev Genet* 8(5),395-403
- De Duve C, Baudhuin P (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46(2),323-357
- De Hoop MJ, Ab G (1992): Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem J* 286(3),657–669
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001): The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *J Lipid Res* 42(7),1007-1017
- Delille HK, Agricola B, Guimaraes SC, Borta H, Lüers GH, Fransen M, Schrader M. (2010): Pex11 β -mediated growth and division of mammalian peroxisomes follows a maturation pathway. *J Cell Sci* 123(16),2750-2762
- Deutsches Ärzteblatt (2011): Diabetes: Pioglitazon geht wegen Krebsrisiko vom Markt. <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/46215>
- Engelen M, Kemp S, de Visser M, van Geel BM, Wanders RJ, Aubourg P, Poll-The BT (2012): X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis* 7,51
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC,

- Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997): The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 272(30),18779–18789
- Forss-Petter S, Werner H, Berger J, Lassmann H, Molzer B, Schwab MH, Bernheimer H, Zimmermann F, Nave KA. (1997): Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J Neurosci Res* 50(5),829-843
- Fourcade S, Ferrer I, Pujol A (2015): Oxidative stress, mitochondrial and proteostasis malfunction in adrenoleukodystrophy: A paradigm for axonal degeneration. *Free Radic Biol Med* 88(Pt A),18-29
- Fransen M, Terlecky SR, Subramani S (1998): Identification of a human PTS1 receptor docking protein directly required for peroxisomal protein import. *Proc Natl Acad Sci* 95(14),8087-8092
- Gabaldon T (2010): Peroxisome diversity and Evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1541),765-773
- Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A (2012): Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochim Biophys Acta* 1822(9),1475-1488
- Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I, Gartner LM (1973): Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 5,182(4107),62-64
- Gray E, Ginty M, Kemp K, Scolding N, Wilkins A. (2011): Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists protect cortical neurons from inflammatory mediators and improve peroxisomal function. *Eur J Neurosci* 33(8),1421-1432
- Guan Y, Breyer MD (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int* 60(1),14-30
- Hess R, Stäubli W, Riess W (1965): Nature of the hepatomegalic effect produced by Ethyl-Chlorophenoxy-Isobutyrate in the rat. *Nat* 208,856-858
- Hettema EH, Motley AM (2009): How peroxisomes multiply. *J Cell Sci* 122(Pt 14) 2331-2336
- Hoepfner D, van den Berg M, Philippsen P, Tabak HF, Hettema EH (2001): A role for Vps1p, actin,

and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* 155(6),979-990

Hoivik DJ, Qualls CW Jr, Mirabile RC, Cariello NF, Kimbrough CL, Colton HM, Anderson SP, Santostefano MJ et al. (2004): Fibrates induce hepatic peroxisome and mitochondrial proliferation without overt evidence of cellular proliferation and oxidative stress in cynomolgus monkeys. *Carcinogenesis* 25(9),1757-1769

Issemann I, Green S (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nat* 18;347(6294),645-650

Itoyama A, Honsho M, Abe Y, Moser A, Yoshida Y, Fujiki Y (2012): Docosahexaenoic acid mediates peroxisomal elongation, a prerequisite for peroxisome division. *J Cell Sci* 125(Pt 3),589-602

Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA (2007): Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 39(8),969-976

Kemp S, Wei HM, Lu JF, Braiterman LT, McGuinness MC, Moser AB, Watkins PA, Smith KD (1998): Gene redundancy and pharmacological gene therapy: Implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* 4(11),1261-1268

Kemp S, Berger J, Aubourg P (2012): X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta* 1822(9),1465-1474

Klusmann A, Dehmel T, Gärtner J (2003): X-chromosomale Adrenoleukodystrophie: Eine peroxisomale Stoffwechselerkrankungen der Gruppe II, *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 151(4),444-458

Kobayashi T, Shinnoh N, Kondo A, Yamada T (1997): Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 232(3),631-636

Koch J, Pranjić K, Huber A, Ellinger A, Hartig A, Kragler F, Brocard C (2010): PEX11 family members are membrane elongation factors that coordinate peroxisome proliferation and maintenance. *J Cell Sci* 123(Pt 19),3389-3400

Köhler W, Sokolowski P: Clinical phenotypes, diagnosis and treatment of adulthood X-linked

adrenoleukodystrophy. In: Berger J, et al., editors. Understanding and Treating Adrenoleukodystrophy. Present State and Future Perspectives. SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn 2005, 28–60

Kruska N, Schönfeld P, Pujol A, Reiser G (2015): Astrocytes and mitochondria from adrenoleukodystrophy protein (ABCD1)-deficient mice reveal that the adrenoleukodystrophy-associated very long-chain fatty acids target several cellular energy-dependent functions. *Biochim Biophys Acta* 1852(5),925-936

Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, Yano W, Ogata H, Tokuyama K, Takamoto I et al. (2006): Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 281(13),8748-8755

Lazarow PB (2003): Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* 15(4),489-497

Lazarow PB, Fujiki Y (1985): Biogenesis of Peroxisomes, *Ann Rev Cell Biology* 1,489-530

Lu JF, Lwler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW, Smith KD (1997): A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94,9366-9371

Maeshiba Y, Kiyota Y, Yamashita K, Yoshimura Y, Motohashi M, Tanayama S. (1997): Disposition of the new antidiabetic agent pioglitazone in rats, dogs, and monkeys. *Arzneimittelforschung* 47(1),29-35

Mannaerts GP, van Veldhoven PP (1996): Functions and Organization of Peroxisomal Beta-Oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 804,99-115

Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. (2006): Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763(12),1463-1477

Moser HW, Loes DJ, Melhem ER, Raymond GV, Bezman L, Cox CS, Lu SE (2000): X-Linked adrenoleukodystrophy: overview and prognosis as a function of age and brain magnetic resonance imaging abnormality. A study involving 372 patients. *Neuropediatrics* 5,227–239

Moser HW, Raymond GV, Lu SE, Muenz LR, Moser AB, Xu J, Jones RO, Loes DJ, Melhem ER, Dubey P, Bezman L, Brereton NH, Odone A (2005): Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil, *Arch Neurol* 62,1073–1080

Motley AM, Hetteema EH (2007) Yeast peroxisomes multiply by growth and division, *J Cell Biol* 178(3):399-410

Netik, A, Forss-Pette S, Holzinger A Molze B, Unterrainer G, Berger J. (1999): Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implication for therapy. *Hum Mol Genet* 8,907-913

Nicolay K, Veenhuis M, Douma AC, Harder W (1987): A ³¹P NMR study of the internal pH of yeast peroxisomes. *Arch Microbiol* 147,37–41

Nyhan WL, Barshop BA, Ozand PT: Atlas of Inherited Metabolic Diseases. 3. Auflage. Hodder Arnold; London 2011, 459-476

Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F, Erdmann R (2001): Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J* 20,5049–5059

Pilipović K, Župan Ž, Dolenc P, Mršić-Pelčić J, Župan G (2015): A single dose of PPAR γ agonist pioglitazone reduces cortical oxidative damage and microglial reaction following lateral fluid percussion brain injury in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2(59),8-20

Pschyrembel W: Klinisches Wörterbuch. 261. Auflage, de Gruyter-Verlag; Berlin 2007, 435-436

Pujol A (2016): Novel Therapeutic Targets and Drug Candidates for Modifying Disease Progression in Adrenoleukodystrophy. *Endocr Dev.* 30,147-160

Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL (2002): Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* 11(5),499-505

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

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ (2002): Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 64,477-502

Rizzo WB, Leshner RT, Odone A, Dammann AL, Craft DA, Jensen ME, Jennings SS, Davis S, Jaitly R, Sgro JA (1989): Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 39,1415–1422

Schmidt RF, Thews G, Lang F: Physiologie des Menschen. 28. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 324-425

Schrader M, Fahimi HD (2006): Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763(12),1755-1766

Semmler A, Köhler W, Jung HH, Weller M, Linnebank M (2008): Therapy of X-linked Adrenoleukodystrophy. *Expert Rev Neurother* 8(9),1367-1379

Shimozawa N, Tsukamoto T, Nagase T, Takemoto Y, Koyama N, Suzuki Y, Komori M, Osumi T, Jeannette G, Wanders RJ, Kondo N (2004): Identification of a new complementation group of the peroxisome biogenesis disorders and PEX14 as the mutated gene. *Hum Mutat* 23,552–558

Tabak HF, Murk JL, Braakmann I, Geuze HJ (2003): Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 4(8),512-518

Thoms S, Erdmann R (2003): Peroxisomenbiogenese. *Peroxine und Präimplete*, Biospektrum 3,269-271

Thoms S, Grønberg S, Gärtner J (2009): Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends Mol Med* 15(7),293-302

Titorenko VI, Ogrydziak DM, Rachubinski RA (1997): Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 17(9),5210-5226

Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S (2011): The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2(4),236–240

van Geel BM, Assies J, Haverkort EB, Koelman JH, Verbeeten B Jr, Wanders RJ, Barth PG (1999): Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *Neurol Neurosurg Psychiatry* 67,290–299

van Geel BM, Bezman L, Loes DJ, Moser HW, Raymond GV (2001): Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 49,186–194

- van Roermund CWT, De Jong M, Ijlst L, Van Marle J, Dansen TB (2004): The peroxisomal lumen in *Saccharomyces cerevisiae* is alkaline. *J Cell Sci* 117,4231–4237
- van Veldhoven P (2010): Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolisms, *J Lipid Res* 51(10),2863-2895
- Vladimir I, Rachubinski R, Rachubinski T (2001): The life cycle of the peroxisome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2,357-368
- Wanders RJ (2004): Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab* 83(1-2),16-27
- Wanders RJ, Waterham HR (2005): Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin Genet* 67(2),107-133
- Wanders RJ, Waterham HR (2006): Biochemistry of Mammalian Peroxisomes, Revisited. *Annu Rev Biochem* 75,295-332
- Wanders RJ, Schutgens RB, Barth PG (1995): Peroxisomal disorders: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(5),726-739
- Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR (2001): Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 29,250–267
- Weller S, Gould SJ, Valle D (2003): Peroxisome Biogenesis Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 4,165-211
- Wu J, Chen L, Zhang D, Huo M, Zhang X, Pu D, Guan Y (2009): Peroxisome proliferator-activated receptors and renal diseases *Front Biosci* 14,995-1009
- Zettl U, Mix E: *Bildgebung in der klinischen Neuroimmunologie*. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2004
- Zhang L, Chung SK, Chow BK (2013): The Knockout of Secretin in Cerebellar Purkinje Cells Impairs Mouse Motor Coordination and Motor Learning. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Dec 19. doi: 10.1038/npp.2013.344

8. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Celia Kassmann für das Überlassen des Dissertationsthemas, die sehr gute Betreuung und die wertvollen Anregungen während der gesamten Promotionszeit.

Ebenfalls danke ich den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern der Abteilung Neurogenetik des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin für die kompetente Betreuung im Labor.

