

Aus der Abteilung Neurogenetik

(Leiter: Prof. K.-A. Nave, PhD)

des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen

**Analyse der Auswirkungen des PPAR $\alpha$ -Liganden Fenofibrat  
auf Abcd1-defiziente Mäuse**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Johannes Linßen**

aus Mülheim an der Ruhr

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Prof. Dr. Rainer Mausberg (Promotor-Vertretung)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Sereda

2. Berichterstatter/in: PD Dr. Sven Thoms

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, 14.07.2014

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Myelin und Gliazellen .....	5
1.2 Leukodystrophien .....	7
1.2.1 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie .....	8
1.2.2 Mausmodelle der X-chromosomale Adrenoleukodystrophie .....	8
1.3 Peroxisomen .....	9
1.3.1 Metabolismus.....	10
1.3.2 Biogenese.....	11
1.3.4 Proliferation .....	13
1.3.5 Proteinimport.....	15
1.3.6 Membranproteine.....	16
1.4 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren .....	17
1.4.1 Effekte der PPAR-Stimulierung auf Peroxisomen.....	18
1.4.2 Isoformen .....	18
1.4.2.1 PPAR $\alpha$ .....	18
1.4.2.2 PPAR $\beta/\delta$ .....	19
1.4.2.3 PPAR $\gamma$ .....	20
1.5 Zielsetzung.....	21
<b>2. Material.....</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.2 Puffer und Lösungen.....	24
2.3 Enzyme, Reaktionskomplettsysteme und Antikörper .....	26
2.4 Nukleinsäuren .....	27
2.5 Oligonukleotide .....	27
2.6 Verbrauchsmaterialien .....	28
2.7 Geräte .....	29
2.8 Software .....	30
<b>3. Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.1 Mausbehandlung.....	30
3.1.1 Gittertest (engl. „Gridtest“) .....	31
3.1.2 Rotierender-Stabtest (engl. „Rotarodtest“)... ..	31
3.2 Proteinbiochemische Methoden .....	31
3.2.1 Myelinpräparation aus Gehirnen .....	31
3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	32
3.2.3 SDS-Gelelektrophorese .....	32
3.2.4 Western Blotting und Proteinnachweis.....	33
3.3 Gewebeanalysen .....	35
3.3.1 Isolation von RNA .....	35
3.3.2 Messung der Konzentration und Qualität der RNA.....	36
3.4 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription von RNA.....	36
3.5 qRT-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit cDNA .....	38
3.5.1 Funktionsweise einer qRT-PCR .....	38
3.5.2 Schmelzkurvenanalyse.....	39
3.5.3 Reaktionsansatz und Amplifikationsprotokoll.....	40
3.5.4 Auswertung der Ergebnisse .....	40
3.6 Statistik.....	41

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1 Gewichtszunahme und motorische Leistung der Mäuse nach Fenofibratbehandlung....	43
4.2.1 Peroxisomale Membranproteine .....	47
4.2.3 Anti-oxidative Enzyme.....	58
4.3 Abundanz peroxisomaler Proteine im Gehirn von Mäusen .....	61
4.3.1 Vergleich unbehandelter Abcd1-defizienter und wildtypischer Mäuse .....	61
4.3.2 Effekt der Fenofibratbehandlung auf wildtypische Mäuse .....	63
4.3.3 Effekt der Fenofibratbehandlung auf Abcd1-defiziente Mäuse .....	64
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>66</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>74</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
<b>8. Abkürzungen</b> .....	<b>92</b>
<b>9. Lebenslauf</b> .....	<b>93</b>

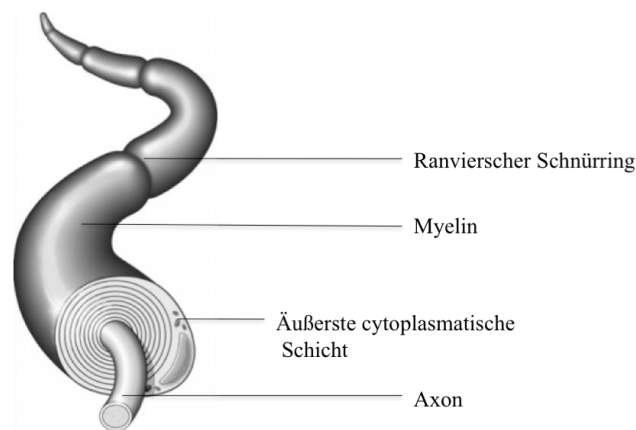
### **1. Einleitung**

#### 1.1 Myelin und Gliazellen

Das Nervensystem ist der wichtigste Bestandteil des Organismus, um Informationen aus der Umwelt und dem eigenen Körper aufzunehmen und auf diese zu reagieren.

Bestandteile des Nervensystems sind Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen. Das Neuron ist der Zellkörper, der die elektrischen Impulse generiert und diese über seine langen Fortsätze, die Axone (Fasern), weiterleitet oder blockiert. Gliazellen hingegen haben Stütz-, Schutz- und Isolierfunktion und sind nicht direkt an der Erregungsleitung beteiligt. Im Gegensatz zu Neuronen können sich Gliazellen auch postnatal teilen. Im peripheren Nervensystem (PNS) sind Gliazellen im wesentlichen Schwann-Zellen [Armati und Mathey 2014], im zentralen Nervensystem (ZNS) Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikroglia [Lundgaard et al. 2013].

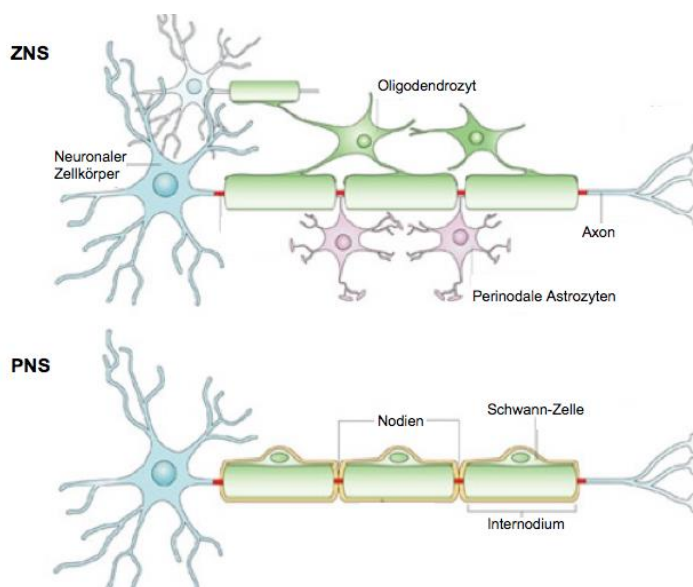
Um eine schnelle Fortleitung des elektrischen Impulses zu gewährleisten, müssen Axone elektrisch isoliert sein. Schwann-Zellen im PNS und Oligodendrozyten im ZNS bilden die Myelinscheide um einen Teil der Nervenfasern. Dies ist für die elektrische Isolation wichtig. Eine Schwann-Zelle umhüllt das Axon eines Neurons. Die benachbarte Schwann-Zelle schließt sich nicht direkt an, sondern ist durch einen kleinen Zwischenraum getrennt. Dieser Zwischenraum wird Ranvier-Schnürring oder Nodus genannt und ermöglicht die saltatorische Erregungsleitung [Frankenhauser und Schneider 1951]. Durch diese streckenweise Isolation des Axons (sog. Internodien) verringert sich die Membranlängskonstante (Abb. 1). Erst dadurch werden Nervenleitgeschwindigkeiten von über 100 m/s möglich.



**Abb. 1: schematische Darstellung eines myelinisierten Axons**

(© 2011 Nucleus Medical Media, Inc.)

Oligodendrozyten im ZNS dagegen sind in der Lage, durch lange Zellfortsätze mehrerer eng benachbarte Neurone zu myelinisieren (Ab. 2) [Rassow et al. 2008]. Neben der myelinisierenden Funktion der Oligodendrozyten, deuten neuere Studien auf ihre Bedeutung im Energiemetabolismus von Neuronen hin [Appikatla et al. 2014]. So wird vermutet, dass Oligodendrozyten den Glykolysemetabolit Lactat verstoffwechseln und daraus Lipide erzeugen, die wahrscheinlich für den Myelinaufbau verwendet werden [Rinholm et al. 2011]. Außerdem wird den Oligodendrozyten, unabhängig von der Myelinisierung, eine Rolle für die Integrität der Axone zugeschrieben. Ein Mausmodell, in dem die Peroxisomenfunktion zelltypspezifisch in Oligodendrozyten ausgeschaltet ist, zeigt den progressiven Verlust von Axonen, der zeitgleich mit einer Demyelinisierung verläuft [Kassmann et al. 2007].



**Abb. 2: Gliazellen**

Oligodendrozyten im ZNS und Schwann-Zellen im PNS umwickeln Axone mit Membranfortsätzen, welche, nach Kompaktierung, Myelin bilden. Während Oligodendrozyten mehrere Axone myelinisieren können, bilden Schwann-Zellen immer nur das Internodium eines Axons [Poliak und Peles 2003, S. 973].

Der deutsche Arzt und Physiologe Gabriel Gustav Valentin formulierte bereits im Jahre 1836 die These von einer Koexistenz erregbarer und nicht erregbarer Elemente im menschlichen Gehirn, wobei er Gliazellen zu den Nichterregbaren zählte.

Astrozyten sind die häufigsten Zellen im ZNS und stellen die Verbindung zwischen Neuronen und Blutgefäßen dar. Zu ihren Aufgaben zählen der Transport vieler Stoffe und die Kontrolle der Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit. Durch Endozytose können Astrozyten verschiedene Partikel und Stoffe aufnehmen. Ependymzellen sind für die Synthese des Epithels zuständig, welches die Hohlräume des ZNS auskleidet. Die meisten Ependymzellen tragen Kinozilien (Flimmerhärchen). Mikroglia werden die Makrophagen des Gehirns genannt. Da, außer bei Entzündungen, keine anderen Leukozyten im Gehirn vorkommen, stellen sie das Immunsystem im gesunden Gehirn dar [Trepel 2011].

### 1.2 Leukodystrophien

Das Wort Leukodystrophie lässt sich aus dem Griechischen ableiten und bedeutet „Mangel an weißer Substanz“ (leukos = weiß, dys = schlecht, trophe = wachsen). Mit diesem Begriff werden neurodegenerative Erkrankungen bezeichnet, bei der die weiße Substanz des Gehirns betroffen ist. Der Begriff „weiße Substanz“ bezeichnet myelinreiche Bereiche des Gehirns, die aufgrund des hohen Lipidgehalts weiß erscheinen. Leukodystrophien sind durch eine De- oder Dysmyelinisierung gekennzeichnet. Myelinisierte Axone sind gebündelt und können zentral im Gehirn lokalisiert werden. Die Zellkörper der Neurone befinden sich hauptsächlich in der Peripherie des Gehirns und bilden dort die graue Substanz.

Bei Leukodystrophien kommt es durch genetisch bedingte Stoffwechseleränderungen zum Abbau des Myelins und somit der weißen Substanz des Gehirns. Betroffene Personen sind in motorischer und auch sensorischer Nervenfunktion eingeschränkt. Einige bekannte Leukodystrophien sind die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (Addison-Schilder-Syndrom), die Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit, Morbus Krabbe, metachromatische Leukodystrophie und die Alexander-Krankheit [Vanderver et al. 2014; Numata et al. 2014].

### 1.2.1 X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

Die X-chromosomal gekoppelte Adrenoleukodystrophie (X-ALD) gehört zu den peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen. Ihr liegt eine Mutation im Abcd1-Gen zugrunde, welches einen Transmembrantransporter von Peroxisomen kodiert [Berger und Gärtner 2006]. Es gibt Hinweise auf eine Rolle des Proteins bei dem Transport aktivierter "überlangkettiger" Fettsäuren aus dem Zytosol in das peroxisomale Lumen [van Roermund und Visser 2008]. Als Folge der Mutation im Abcd1-Gen werden Ansammlungen überlangkettiger Fettsäuren in allen Geweben beobachtet [Kassmann et al 2014]. Aktuell sprechen Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppe auch dafür, dass das ABCD2-Gen als Ziel pharmakologischer Therapien der X-ALD in Frage kommt [Weber et al. 2014].

Die X-ALD lässt sich in verschiedene klinische Phänotypen unterteilen. Bei etwa der Hälfte der Patienten tritt eine zerebrale ALD (cALD) auf, die schon im Kindesalter mit stark fortschreitender inflammatorischer Demyelinisierung einhergeht und innerhalb weniger Jahre zum Tod führt. Bei der Form der Adrenomyeloneuropathie (AMN) kommt es erst im adulten Alter zum Krankheitsausbruch. Diese Form zeichnet sich durch einen deutlich milderen Phänotyp und langsames Fortschreiten aus und führt in der Regel nicht zum Tod [Kemp et al. 2012].

### 1.2.2 Mausmodelle der X-chromosomale Adrenoleukodystrophie

Forss-Petter et al. und Lu et al. zeigten 1997, dass ALDP-defiziente Mäuse (ALDP=Abcd1) sich normal entwickelten und bis zum 6. Lebensmonat keine klinischen Symptome der X-ALD zeigten [Forss-Petter et al. 1997]. Analysen der Gewebe dieser Tiere ergaben allerdings eine Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA) und eine verminderte  $\beta$ -Oxidation [Lu et al. 1997]. Dabei war die PMP70-Konzentration (peroxisomales Membranprotein) in Leber, Lunge und Nieren normal. Kobayashi beobachtete sogar einen klinisch unauffälligen Phänotyp bis zum 12. Lebensmonat [Kobayashi et al. 1997]. Erst bei älteren ALDP-defizienten Mäusen wurden neurologische Symptome und verlängerte Nervenleitgeschwindigkeiten festgestellt, allerdings nur im peripheren Nervensystem. Diese Mausmodelle entsprachen also eher



dem Verlauf der Adrenomyeloneuropathie (AMN) [Pujol et al. 2002]. Kassmann et al. zeigten 2007, dass sich die zerebrale Neurodegeneration der X-ALD möglicherweise erst aufgrund eines sekundären, umfassenden Funktionsverlust des Peroxisoms etabliert. Dies wurde vermutet, weil ABCD1-defiziente Mäuse auch in hohem Alter keine zerebrale Pathologie aufwiesen. Schaltete man in Mäusen hingegen das komplette Peroxisom in myelinbildenden Zellen aus (PEX5-defiziente Mäuse), so zeigten diese Mäuse vergleichsweise früh eine entzündliche Demyelinisierung, ähnlich den Symptomen der X-ALD [Kassmann et al. 2007]. Peroxisomen scheinen eine Schutzfunktion für myelinbildende Zellen ausüben zu können. Es wurde gezeigt, dass Peroxisomen in der Myelinscheide in der paranodalen Zone, nahe des *Ranvierschen* Schnürrings (Nodus) vorkommen. In älteren Mäusen in denen die komplette Peroxisomenfunktion ausgeschaltet wurde (PEX5-defiziente Mäuse), konnten vesikelgefüllte Schwellungen in dieser paranodalen Region festgestellt werden [Kassmann et al. 2011]. Diese Ergebnisse zeigten, dass funktionelle Peroxisomen eine wichtige Rolle für die axonale Integrität von Nerven haben [Kassmann et al. 2014].

### 1.3 Peroxisomen

Im Jahre 1954 beobachtete der schwedische Wissenschaftler J. Rhodin bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Mäusenieren kleine zytoplasmatische Körper, umgeben von einer einzelnen Membran mit fein granulierter Matrix. Diese nannte er „Microbodies“ [Rouiller und Bernhard 1956]. 1966 beschrieben u.a. de Duve und Badhuin Microbodies als den Ort in der Leber, an dem Peroxidauf- und -abbau stattfinden, woraufhin die Umbenennung in Peroxisomen erfolgte [de Duve und Badhuin 1966].

Peroxisomen sind Zellorganellen der eukaryotischen Zelle. Sie besitzen die oxidativen Enzyme Oxidase und Katalase, welche  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  und  $O_2$  abbauen. Ohne diese wichtige Funktion würden sich vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen ansammeln, was zu einer Erhöhung des oxidativen Stresslevels führt. Reaktive Sauerstoffspezies können Lipide und Proteine oxidieren und sie somit schädigen. Diese Vorgänge wirken sich bis auf die DNA aus. Der oxidative Stress ist mitverantwortlich für den Alterungsprozess der Zelle. Ihm wird weiter die Beteiligung an einer Vielzahl von

Erkrankungen zugeschrieben, so auch an neurodegenerativen Krankheiten wie *Morbus Parkinson* [Madathil et al. 2013].

Neben dieser wichtigen Funktion sind Peroxisomen essentiell an der Spaltung von langkettigen Fettsäuren ( $\beta$ -Oxidation) beteiligt [Wanders und Waterham 2006]. Eine biosynthetisch wichtige Funktion ist der erste Schritt der Biosynthese von Plasmalogenen (Etherlipide), die häufigsten Phospholipide in den Myelinscheiden der Nervenzellen [Yanagihara und Cumings 1969].

Aufgrund ihrer wichtigen Funktionen können Peroxisomen schnell ihre Form und Anzahl auf entsprechende Situationen im Organismus anpassen [Smith und Aitchison 2013].

### 1.3.1 Metabolismus

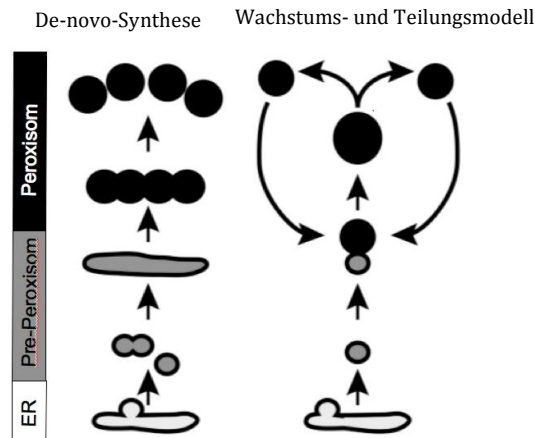
Am Lipidmetabolismus ist etwa die Hälfte aller peroxisomalen Enzyme beteiligt. Bei katabolen Stoffwechselfvorgängen spielt die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, überlangkettigen Fettsäuren, langkettigen Dicarboxyl-Acyl-CoA, Xenobiotika und der Cholesterinseitenketten eine wichtige Rolle. Weiterhin gehören zum peroxisomalen Katabolismus der Auf- und Abbau von  $H_2O_2$  durch Oxidasen und das Enzym Katalase [de Duve 1966]. Außerdem sind Peroxisomen die einzigen Zellorganellen, in denen die  $\alpha$ -Oxidation stattfindet [Wanders und Waterham 2006].

Zu den anabolen Vorgängen zählen die Synthese von Cholesterin, Isoprenoiden und Gallensäure, die bei der Spaltung von Cholesterin während der  $\beta$ -Oxidation entsteht [Pedersen und Gustafsson 1980; Krisans 1992].

Eine weitere wichtige Funktion der Peroxisomen besteht in der Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies [Reddy und Mannaerts 1994; Gray et al. 2012]. Neben der Katalase enthalten Peroxisomen Glutathion-Peroxidase, Superoxiddismutase und Epoxid-Hydrolasen. Insgesamt enthalten menschliche Peroxisomen etwa 90 unterschiedliche Proteine, von denen etwa 50 in den Metabolismus eingebunden sind [Schrader und Fahimi 2006].

### 1.3.2 Biogenese

In ersten Modellvorstellungen der Peroxisomenbiogenese ging man davon aus, dass Peroxisomen aus Abschnürungen vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen [Novikoff und Shin 1978]. Diese Annahme beruhte auf der Tatsache, dass die Forscher Peroxisomen häufig in der Nähe des Endoplasmatischen Retikulums beobachten konnten. Erst 1982 stellte Fujiki fest, dass ER und Peroxisomen eine unterschiedliche Phospholipid- und Membranzusammensetzungen aufweisen und daher vermutlich nicht auseinander hervorgehen [Fujiki et al. 1982]. Bodnar zeigte 1991, dass einige peroxisomale Membran- und Matrixproteine an Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert werden und erst posttranslational in das Peroxisom integriert werden [Bodnar und Rachubinski 1991]. Später ging man davon aus, dass die Teilung nach posttranslationalem Import von Membran- und Matrixproteinen existierender Peroxisomen zur Proliferation führt [Lazarow und Fujiki 1985]. Dieses Modell wurde bis heute um einige Aspekte erweitert. Das aktuelle Modell geht von der Beteiligung des ER an der peroxisomalen Biogenese durch Akkumulation peroxisomaler Membranproteine im ER [Thoms et al. 2012] und der Proliferation von Endomembranen durch Überexpression peroxisomaler Membranproteine aus [Elgersma und Tabak 1996]. Somit kann die Peroxisomenbiogenese in 3 Abschnitte unterteilt werden: Zuerst die Membranbildung, bei der die Lipide und Membranproteine in die peroxisomale Membran inkorporieren. Im Anschluss folgt der Import der peroxisomalen Matrixproteine, bei dem das Peroxisom wächst. Zuletzt findet die Teilung des reifen Peroxisoms statt [Van der Zand et al. 2012] (Abb. 3).



**Abb. 3: Modelle der Peroxisombiogenese**

De-novo-Synthese (links): Bei der de-novo-Synthese knospen präperoxisomale Vesikel vom ER, importieren peroxisomale Matrixproteine und entwickeln sich zu reifen Peroxisomen. Wachstums- und Teilungsmodell (rechts): Beim semiautonomen Wachstums- und Teilungsmodell verschmelzen reife Peroxisomen mit vom ER stammenden Vesikeln, wodurch sie wachsen. Anschließend folgt ihre Teilung [Motley und Hetteema 2007, S. 401].

### 1.3.3 De-novo-Synthese

Die Mehrzahl der an der Peroxisomenbiogenese beteiligten Proteine wird als PEX-Proteine bezeichnet. Es wurde beobachtet, dass das Fehlen von funktionsfähigen PEX3-, PEX16- oder PEX19-Proteinen die Abwesenheit jeglicher Peroxisomen oder peroxisomaler Proteine zur Folge hat. Daraus schlussfolgerte man, dass diese drei Proteine essentiell für die Biogenese von Peroxisomen sind [Shimozawa et al. 2004]. Weiter konnte gezeigt werden, dass durch Transfektion des jeweilig fehlenden Proteins in Mutanten, wieder funktionelle Peroxisomen gebildet werden [South und Gould 1999]. Die drei PEX-Proteine sind generell in die frühen Stadien der Peroxisomenbiogenese eingebunden, PEX19 wird eine Bedeutung beim peroxisomalen Membranprotein (PMP)-Markieren (engl. „targeting“) zugeschrieben, es kommt sowohl im Peroxisom als auch im Zytoplasma vor und bindet peroxisomale Membranproteine (PMPs) [Heiland und Erdmann 2005].

Der Import von PMPs einschließlich PEX16 [Sacksteder und Gould 2000] ist von PEX19 abhängig [Jones et al. 2004]. Das integrale Membranprotein PEX16 führt bei fehlender Expression zur Abwesenheit funktioneller Peroxisomen und dem Zellweger-Phänotyp. Folglich scheint PEX16 eine ausschlaggebende Rolle in der Peroxisomenbiogenese zu spielen, wenn auch seine genaue Funktion bisher ungeklärt bleibt. Einige Vermutungen gehen in die Richtung, dass PEX16 PEX3 vorgeschaltet ist und eine Rolle als Membrantranslokator-Komponente spielt [Honosho et al. 1998].

PEX3 ist ein peroxisomales Membranprotein, welches mit PEX19 interagiert und Komplexe von PEX19 und neu synthetisierten PMPs rekrutiert [Heiland und Erdmann 2005]. Fang zeigte 2004, dass es essentiell für den PEX19-abhängigen PMP-Import ist [Fang et al. 2004].

Das endoplasmatische Retikulum wurde lange als Ort der Synthese von PEX-Proteinen vermutet, da das Peroxisomenaufkommen in diesem Bereich erhöht ist [Novikoff und Shin 1978]. Dass deren Biogenese in Form von Neusynthese wirklich dort stattfindet, konnten später Tabak et al. 2003 nachweisen. In Pflanzen zeigte man in diskreten Regionen des ER ein konstantes PEX16 Expression [Kim PK et al. 2006] und auch PEX3 lokalisierte man mittels PEX3-GFP-Konstruktes in auswachsenden ER-Strukturen, die eine Art peroxisomale Vorläufer darstellen [Hoepfner et al. 2005]. Weiterhin wurde mit Hilfe dieses Konstruktes gezeigt, dass PEX3 zuerst das ER erreicht und nachfolgend in das neue Peroxisom transloziert wird. Dieser Mechanismus ist abhängig von PEX16 [Toro et al. 2009]. Zudem ist PEX3 für die peroxisomale Membranbildung verantwortlich, noch bevor der Import von Matrixproteinen erfolgt. Die ersten nachweisbaren peroxisomalen Membranvesikel enthalten sowohl PEX3 als auch PMP70 [Ghaedi et al. 2000].

### 1.3.4 Proliferation

Die genauen Synthesewege der Peroxisomen werden in der Literatur noch sehr kontrovers diskutiert. Schrader und Fahimi publizierten 2006, dass sich Peroxisomen neben der *de-novo-Synthese* zusätzlich durch Wachstum und Teilung vermehren können [Schrader und Fahimi 2006]. In Hefen wurde gezeigt, dass sich Peroxisomen sogar

ausschließlich durch Wachstum und Teilung vermehren, wohingegen in Säugerzellen beide Vorgänge simultan ablaufen [Motley und Hettema 2007; Kim HJ et al. 2006].

In Säugerzellen zeigen Peroxisomen häufig eine tubuläre Morphologie, dazu wurde beobachtet, dass sich diese elongierten Peroxisomen in sphärische Organellen teilen, was zur Vermehrung der Peroxisomen führt [Schrader und Fahimi, 2006].

Generell lässt sich der Wachstums- und Teilungsprozess eines Peroxisoms in drei getrennte Prozesse unterteilen: die Elongation, die Einschnürung der peroxisomalen Membran und die Teilung. Die hierbei beteiligten Proteine sind PEX11 $\beta$ , welches für die Elongation und Teilung essentiell ist [Schrader und Fahimi 2006], die dynamin-ähnliche GTPase und Fis1, welche beide für die finale Teilung der peroxisomalen Membran notwendig sind [Kobayashi et al. 2007; Koch et al. 2003]. Außerdem wird eine Interaktion zwischen PEX11 $\beta$  und Fis1 vermutet [Kobayashi et al. 2007].

In Säugerzellen identifizierte man zusätzlich zu PEX11 $\beta$  die Isoformen Pex11 $\alpha$  und PEX11 $\gamma$ . Alle drei Isoformen bilden vermutlich Heterooligomere [Li und Gould 2002]. Während eine PEX11 $\alpha$ -Defizienz in der Maus keinen Effekt auf die Peroxisomenanzahl oder das Peroxisomenwachstum hat [Li et al. 2002], sieht man beim Verlust von PEX11 $\beta$  eine stark reduzierte Peroxisomenzahl, die mit neonataler Letalität verbunden ist [Li und Gould 2003]. Diese Mauslinie spiegelt also wichtige Aspekte des Zellweger-Syndroms wider. Mittels eines PEX11 $\beta$ -YFP-Konstrukts zeigte man außerdem, dass die elongierten, tubulären Peroxisomen akkumulieren, weil die Teilung dieser inhibiert ist. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Matrixproteine sowie PMPs normal in die tubulären, peroxisomalen Akkumulationen importiert und inseriert werden, was ein Hinweis für reife Organellen ist [Delille et al. 2010]. Innerhalb der tubulären peroxisomalen Akkumulationen konnte PEX11 $\beta$  ausschließlich in den tubulären Membranauswüchsen detektiert werden, aber nicht in dem für PMP70 positiven, globulären Teil der Peroxisomen. Dies deutet darauf hin, dass sich PEX11 $\beta$  in den wachsenden tubulären Auswüchsen konzentriert [Delille et al. 2010].

### 1.3.5 Proteinimport

Der Import peroxisomaler Proteine erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten der peroxisomalen Biogenese und ist daher von der *de-novo-Synthese* und Proliferation unabhängig [Motley und Hattema 2007]. Die meisten (es gibt auch noch den sog. Piggy-back-Mechanismus) zu importierenden Proteine weisen eine peroxisomale Zielsequenz auf. Der Großteil der Proteine trägt ein c-terminal gekoppeltes Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Serin, Lysin und Leucin, was auch als PTS1 (peroxisomal targeting sequence; PTS) bezeichnet wird. PTS1-Proteine werden von PEX5 erkannt [Goud et al. 1988] und bilden nach Bindung den zytosolischen PEX5-Rezeptor-Cargo-Komplex, an dessen Import unter anderem das peroxisomale Membranprotein PEX14 beteiligt ist. Dazu bilden PEX5 und PEX14 einen Kanal, der den Import vollständig gefalteter globulärer Proteine ermöglicht [Meinecke et al. 2010]. Beim Fehlen von PEX5 enthalten Zellen sogenannte peroxisomale Geister, welche zwar eine normale peroxisomale Membran inklusive der Membranproteine der PMP-Familie besitzen, jedoch keine Enzyme in der peroxisomalen Matrix aufweisen. „Peroxisomale Geister“ sind daher unfunktional. PMPs werden also unabhängig von den PTS-Sequenzen der Matrixproteine in die peroxisomale Membran integriert. Der Verlust von PEX5 führt ebenfalls zum Zellweger-Syndrom. Die peroxisomale Zielsequenz 2 (PTS2) besteht aus einem N-terminal gelegenen Nonapeptid. PTS2-gekoppelte Proteine werden von PEX7 erkannt [Platta et al. 2007]. Der Import von PTS2-Proteinen erfordert in Säugerzellen außerdem eine lange Isoform von PEX5 [Mukai und Fujiki 2006]. Der grundlegende Mechanismus des PTS1- und PTS2-vermittelten Proteintransportes scheint jedoch der Gleiche zu sein [Schliebs und Kunau 2006]. Nach Translokation des PEX5-Cargo-Komplexes in das peroxisomale Lumen wird PEX5 ubiquitinyliert und durch einen ATP-vermittelten Mechanismus wieder ins Zytoplasma entlassen [Platta et al. 2007].

### 1.3.6 Membranproteine

#### PEX14

Mutationen in PEX-Genen implizieren peroxisomale Krankheiten, wie zum Beispiel das Zellweger-Syndrom [Wander und Waterham 2006]. Das PEX14-Gen codiert das integrale Membranprotein PEX14, dem eine essentielle Bedeutung bei der Peroxisomenbiogenese zugeschrieben wird [Komori et al. 1997]. PEX14 ist in die peroxisomale Membran integriert und besitzt einen zytosolischen C-Terminus, wo es direkt mit PEX5 interagiert und so wahrscheinlich am zytosolischen Rezeptor-Cargo-Komplex mitwirkt [Albertini et al. 1997].

#### PMP70

Frühe Studien an Rattenlebern führten zu der Hypothese, Peroxisomen seien permeabel für Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht [de Duve 1966; van Veldhoven et al. 1987]. Van Roermund et al. vermuteten jedoch, dass einige Metabolite nicht in der Lage wären, die peroxisomale Membran in *Saccharomyces cerevisiae* zu durchqueren [van Roermund et al. 1995]. Wolvetang et al. zeigten, dass die Membran humaner Fibroblasten für mindestens eines der Substrate der peroxisomalen Acyl-CoA-Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase nicht permeabel ist. Es wurde außerdem beobachtet, dass der Substratimport ATP-abhängig ist [Wolvetang et al. 1990]. Daraus ist zu schließen, dass der Austausch zwischen Peroxisomen und dem Zytoplasma spezifische Transporter erfordert.

Das 70 kD peroxisomale Membranprotein (PMP70) ist ein Hauptbestandteil der peroxisomalen Membran, dessen Geninduktion gleichzeitig mit der Proliferation von Peroxisomen und der Geninduktion von Enzymen der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation erfolgt [Hashimoto et al. 1986; Hartl und Just 1987]. Es ist das am häufigsten vorkommende peroxisomale Membranprotein und einer von vier ATP-bindenden Kassetten-Halbtransportern (ATP-binding cassette; ABC) der ABCD-Subfamilie.

Die Transporteigenschaften von PMP70 wurden 2012 von Tsuneo Imanaka beschrieben [Imanaka und Morita 2012]. Bereits vorher wurde beobachtet, dass abhängig von



PMP69, welches später als PMP70-Strukturäquivalent identifiziert wurde, und der Anwesenheit von ATP die  $\beta$ -Oxidation in isolierten Peroxisomen stimuliert wird [Thomas et al. 1980].

Imanaka zeigte, dass ATP-Hydrolyse ebenfalls für die Translokation der Acyl-CoA-Oxidase ins Peroxisom notwendig ist, was zur Annahme führte, dass PMP70 ebenso am Proteinimport ins Peroxisom beteiligt sein könnte [Imanaka und Morita 2012].

### 1.4 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind durch Liganden aktivierbare Transkriptionsfaktoren der Steroidhormon-Rezeptorfamilie. Sie sind in verschiedene physiologische Prozesse, wie die Lipid-Homöostase [Keller HJ et al. 1993], den Energiemetabolismus [Desvergne und Wahli 1999], die Inflammation [Delerive et al. 2001] und der zellulären Differenzierung und Proliferation involviert. Zuerst wurden sie in *Xenopus laevis* (Krallenfrosch), dann in Maus und Mensch entdeckt und beschrieben [Dreyer et al. 1992; Zhu et al. 1993]. Bisher sind drei verschiedene Isoformen, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$ , identifiziert [Chen et al. 1993]. Die N-terminale Domäne der PPARs ist zwischen den einzelnen Subtypen nur wenig konserviert. Sie ist für die Unterschiede in den biologischen Funktionen verantwortlich. Der Unterschied der DNA-bindenden Domäne mit zwei Zinkfingermotiven ist zwischen den einzelnen Isoformen gering. Die ligandenbindende Domäne hingegen weist weniger Homologie zwischen den verschiedenen Isoformen auf, was die spezifische Ligandenbindung bedingt [Glass 1994]. PPARs regulieren die Genexpression von Zielgenen, indem sie einen aktivierten Heterodimer-Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor bilden, welcher dann an eine spezifische Erkennungssequenz im Promotor, dem PPAR-Response-Element (PPRE), bindet [Kliewer et al. 1992; Cimini et al. 2000]. Das erste identifizierte PPRE wurde im Acyl-CoA-Oxidase-Gen-Promotor gefunden [Tugwood et al. 1992].

### 1.4.1 Effekte der PPAR-Stimulierung auf Peroxisomen

Der Name PPAR (Peroxisomen-Prolifertor-aktivierte Rezeptoren) ist zurückzuführen auf die ersten beobachteten Effekte von PPAR-Liganden auf die Peroxisomenzahl. Nach Verabreichung von Ethyl-Chlorophenoxy-Isobutyrate wurde erstmals 1965 die Proliferation von Peroxisomen in der Rattenleber beschrieben [Hess und Staubli 1965]. Diese Substanz stellte sich später als PPAR-Aktivator heraus [Lalloyer und Steals 2010]. Erst 25 Jahre danach wurde der erste Rezeptor für den entsprechenden Liganden kloniert, der die peroxisomale Proliferation vermittelt [Issemann und Green 1990]. Dieser Effekt wurde weiter untersucht und man beobachtete nach Behandlung mit hypolipidämischen Verbindungen, wie Clofibrat, in Lebern von Ratten einen Anstieg von Peroxisomendichte und -volumen. Gleichzeitig stieg auch die Expression peroxisomaler Enzyme der  $\beta$ -Oxidation wie Acyl-CoA-Oxidase, Enoyl-CoA-Hydratase, Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase und 3-Ketoacyl-CoA-thiolase an [Latruffe et al. 2001].

### 1.4.2 Isoformen

Die PPAR-Isoformen weisen spezifische Expressionsmuster auf, die unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Zelltypen vermuten lassen [Braissant et al. 1996]. Während der späten Embryonalentwicklung werden im Rattengehirn alle drei Isoformen exprimiert und erst postnatal reguliert. Die Expression von PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  nimmt im Gehirn postnatal ab, während PPAR $\beta/\delta$  auch adult konstant exprimiert wird [Krey et al. 1997].

#### 1.4.2.1 PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$  wird besonders hoch in Leber, Herz, Niere, Darm und adipösem Gewebe exprimiert [Keller JM et al. 2000]. Fettsäuren sind natürliche Aktivatoren für diesen Rezeptor, der als Lipidsensor fungiert. So stimuliert PPAR $\alpha$  im Lebergewebe den Fettsäure- und Cholesterolkatabolismus sowie die Glukoneogenese [Reddy und Hashimoto 2001]. PPAR $\alpha$  ist bisher die einzige der PPAR-Isoformen, bei der man sowohl

in Nagern als auch im Primaten einen direkten Zusammenhang zwischen Stimulierung des Rezeptors und Anstieg der Peroxisomenzahl beobachten konnte [Issemann und Green 1990; Colton et al. 2004]. Latruffe wies außerdem nach, dass die Transkription von Enzymen des Lipidmetabolismus, speziell die der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation, durch die Stimulierung von PPAR $\alpha$  nach Behandlung mit Fibraten erhöht wird [Latruffe und Vamecq 1997]. Später fand man heraus, dass die pharmakologischen Effekte der Fibrate durch direkte PPAR $\alpha$ -Aktivierung hervorgerufen werden [Desvergne und Wahli, 1999]. Fibrate und dessen Derivate, wozu auch Fenofibrat gehört, beinhalten eine Gruppe hypolipidämischer Substanzen und gelten als synthetische Liganden von PPAR $\alpha$ . Sie wurden ursprünglich entwickelt, um den Gehalt von Cholesterin und Triglycerid im Blutplasma zu normalisieren [Thorp und Waring 1962]. Erst später fand man heraus, dass sie als spezifische Liganden für PPAR $\alpha$  wirken [Issemann und Green 1990].

Zusätzlich zu ihren lipidmindernden Effekten wurden für Fibrate ebenso anti-inflammatorische sowie antioxidative Wirkungen nachgewiesen [Staels et al. 1998; Escher und Wahli 2000]. Speziell Fenofibrat wies man zuletzt neuroprotektive Eigenschaften unter inflammatorischen Bedingungen für kortikale Neurone nach, die mit erhöhten PPAR $\alpha$ , PMP70 und Katalaseexpression sowie verstärkter Katalaseaktivität einhergehen [Gray et al. 2011]. Die Aktivierung von PPAR $\alpha$  erfolgt nicht ausschließlich durch Ligandenbindung. In Zellen humanen Ursprungs wies man eine deutlich kleinere Spleißvariante von PPAR $\alpha$  nach mit dominant negativer Funktion [Gervois et al. 1999]. Es handelt sich hierbei um eine am C-Terminus verkürzte Form, die aus vorgezogenem Stopcodon und alternativem Spleißen resultiert. Der verkürzten Isoform fehlt die gesamte Ligandenbindedomäne. Falls sie in den Zellkern transloziert wird, hat sie dort einen repressiven Einfluss auf die transaktivierende Funktion des vollen PPAR $\alpha$ -Transkriptes [Gervois et al. 1999].

### 1.4.2.2 PPAR $\beta/\delta$

PPAR $\beta/\delta$  ist ubiquitär exprimiert. Jedoch weisen bestimmte Gewebe, wie Gehirn, Fettgewebe und Haut, höhere Level der PPAR $\beta/\delta$ -mRNA auf [Amri et al. 1995; Braissant et al. 1996]. Auch PPAR $\beta/\delta$  kontrolliert verschiedene physiologische Funktionen,

einschließlich der Lipid- und Glukosehomöostase, Inflammation, Zellproliferation und -differenzierung [Barish et al. 2006]. PPAR $\beta/\delta$ -defiziente Mäuse zeigen unter anderem Störungen in der Myelinisierung des Corpus callosum, welches das größte Areal an weißer Substanz im Gehirn bildet [Peters et al. 2000]. PPAR $\beta/\delta$  ist die Einzige der PPAR-Isoformen, die repressive Aktivität aufweist, wenn sie an DNA gebunden ist. Es wurde gezeigt, dass nicht ligandengebundenes PPAR $\beta/\delta$  als Transskriptionsrepressor wirkt [Shi et al. 2002]. Da PPAR $\beta/\delta$  außerdem ubiquitär exprimiert wird, wird vermutet, dass dieser Isoform die zusätzliche Rolle als Repressor für die Expression von PPREs-Zielgenen zukommt. PPAR $\beta/\delta$  scheint autoreguliert zu sein.

Bisher ließen sich keine Zielgene, die von PPAR $\beta/\delta$  induziert werden, nachweisen, jedoch sind einige Liganden bekannt, die PPAR $\beta/\delta$  spezifisch binden und aktivieren. Darunter befinden sich natürliche Liganden wie Fettsäuren und Eicosanoide, aber auch synthetische wie Bezafibrat, Furan-konjugierte Linolsäuremetabolite, GW0742 und GW501516 [Krey et al. 1997; Moya-Camarena et al. 1999]. Die Behandlung von Mäusen mit GW0742 bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) erzielt positive Effekte, d.h. eine Reduzierung des neurologischen Schadens. Die Stimulierung von PPAR $\beta/\delta$  mit GW0742 erhöht die Expression von Myelinen und hat Effekte auf die Oligodendrozytenreifung. Interessanterweise ist in PPAR $\beta/\delta$ -null-mutanten Mäusen die Anzahl reifer Oligodendrozyten deutlich reduziert [Simonini et al. 2010].

### 1.4.2.3 PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  ist die am besten untersuchte PPAR-Isoform, deren natürliche Funktion die Regulation von Lipid- und Kohlenhydrathomöostase ist und die antiinflammatorisch im peripheren und zentralen Nervensystem wirkt [Heneka et al. 2007; Bernardo und Minghetti 2008]. Das Vorkommen von PPAR $\gamma$  ließ sich sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachweisen [Braissant et al. 1996]. PPAR $\gamma$  zeigt aber auch eine hohe Expression in adipösem Gewebe, wo es zur Ausdifferenzierung von Adipozyten beiträgt [Rosen et al. 1999]. Für PPAR $\gamma$  wurde nachgewiesen, dass es die Expression verschiedener Gene wie zum Beispiel die der inflammatorischen Zytokine, TNF- $\alpha$ , COX und iNOS, reguliert [Heneka et al. 2000; Park et al. 2003; Gray et al. 2012]. Die Liganden

von PPAR $\gamma$  wurden als neuroprotektive Substanzen identifiziert [Kaundal und Sharma 2010]. *In-vivo*-Studien zeigen, dass die Verabreichung von PPAR $\gamma$ -Liganden in vielen neurodegenerativen Krankheitsbildern, wie z.B. Alzheimer [Yan et al. 2003] und Parkinson [Shintu et al. 2012], die Stärke der Pathologie reduziert. Zu den aktivierenden PPAR $\gamma$ -Liganden gehören Verbindungen aus der Stoffgruppe der Thiazolidindione (TZD), zu denen die synthetischen Agonisten Pioglitazon, Rosiglitazon und Troglitazone zählen. Natürliche Liganden sind ebenso wie bei PPAR $\beta/\delta$  Fettsäuren und Eicosanoide. Wie schon bei PPAR $\alpha$  beschrieben, fand man auch bei humanem PPAR $\gamma$  eine N-terminal verkürzte Form, die ebenfalls durch alternatives Spleißen entsteht und auch dominant negativ wirkt [Kim HJ et al. 2006].

### 1.5 Zielsetzung

Die Gabe von PPAR-Liganden führt zu einer erhöhten Peroxisomenzahl in der Leber von Mäusen und Primaten [Hess und Staubli 1965; Colton et al. 2004]. Hauptsächlich wurde die anti-inflammatorische Wirkungsweise der PPAR-Liganden in bisherigen Studien untersucht und diskutiert. Der oben erwähnte mögliche sekundäre peroxisomale Funktionsverlust und dessen mögliche Kompensation durch pharmakologische Beeinflussung der peroxisomalen Abundanz wurde nicht untersucht. Es drängt sich die Frage auf, ob eine erhöhte Anzahl von Peroxisomen im Gehirn solch einen sekundären Verlust verhindern oder verlangsamen kann [Kassmann und Nave 2008].

Die vorliegende Arbeit soll Hinweise darauf geben, ob sich durch den PPAR $\alpha$ -Liganden Fenofibrat auch im Nervensystem *in vivo* die Peroxisomenproliferation anregen lässt. Dazu sollte die Behandlungszeit (30 Tage) im Vergleich zu älteren Versuchen (Berger et al. 1999) verdoppelt und die Wirkung von drei verschiedenen Konzentrationen Fenofibrat auf die Expression von peroxisomalen Genen im Gehirn untersucht werden. Gehirnllysate von behandelten ABCD1-defizienten und wildtypischen Mäusen sollten mit Hirnllysaten von unbehandelten Tieren gleichen Genotyps verglichen werden. Um Hinweise auf eine erhöhte Syntheserate von Peroxisomen zu erhalten, sollten „Messenger“ Ribonukleinsäuren (mRNS, oder engl. mRNA) peroxisomaler Gene mittels

quantitativer „real time“ Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) und die Proteinabundanz peroxisomaler Proteine mittels Western Blot Technik ermittelt werden. Während der Behandlung sollten außerdem mögliche stark toxische Effekte des Liganden mithilfe motorischer Tests und anhand der Gewichtszunahme der Tiere beurteilt werden.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Acrylamid 30%	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	International Biotechnology Inc.
Chloroform	Merck, Darmstadt
DTT (1,4-Dithiotreitol)	GibcoBRL, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver Instant Naturaflor	frema Reform
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Polyacrylamid	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Sucrose	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl-Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tween20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

### 2.2 Puffer und Lösungen

**PBS** (Phosphat-gepufferte Salzlösung 10X Stammlösung, 1000 ml)

Substanz	Menge in g
NaCl	100
KCl	2,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	7,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5

### Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

192 mM Glycin

0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS)

in H<sub>2</sub>O

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

10% SDS

in H<sub>2</sub>O

SDS-Probenpuffer

62,5 mM Tris/HCl pH 6,8

2,3% SDS

10% Glycerin

0,1% Bromphenolblau

5% β-Mercaptoethanol (frisch hinzufügen) in H<sub>2</sub>O



Trenngelpuffer

2 M Tris/HCl pH 8,8

10% SDS in H<sub>2</sub>O

Sammelgel

2 Gele

Substanz	Menge
30% Polyacrylamid	0,8 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml
H <sub>2</sub> O	3,7 ml
APS	2,5 µl
TEMED	20 µl

Trenngel 10%

2 Gele a 1,5 mm Dicke

Substanz	Menge
30% Polyacrylamid	6,6 ml
Trenngelpuffer	5 ml
H <sub>2</sub> O	8,4 ml
APS	100 µl
TEMED	20 µl

### Lösungen für Western Blot

Blockierlösung

5% Magermilchpulver

0,05% Tween 20

in 1 x TBS

Transferpuffer (10 x)

390 mM Glycin

480 mM Tris-Base

20 % Methan

Transferpuffer (10 x)

390 mM Glycin

480 mM Tris-Base

20 % Methanol (vor Gebrauch frisch hinzufügen) in H<sub>2</sub>O

### 2.3 Enzyme, Reaktionskomplettsysteme und Antikörper

Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl) Boehringer, Mannheim

DNase (RNase-free DNase Set) Qiagen, Hilden

RNeasy Mini Kit Qiagen, Hilden

Superscript III RT Invitrogen, Carlsbad, USA

Power Sybr® Green PCR Master Mix Applied Biosystems, UK

QiAzol ® Lysis Reagent 200ml Qiagen, Hilden

### Primärantikörper Western Blot

anti-ACAA1	(polyklonal, Kaninchen)	1:2000	Sigma
anti-CNP	(monoklonal, Maus)	1:300	Abcam
anti-GPX1	(polyklonal, Kaninchen)	1:750	Sigma
anti-PEX11b	(polyklonal, Kaninchen)	1:750	M.Baesanti-anti-
anti-PMP70	(polyklonal, Kaninchen)	1:750	Abcam
anti-Tubulin	(monoklonal, Maus)	1:500	Sigma

### Sekundärantikörper Western Blot

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

## 2.4 Nukleinsäuren

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)      Boehringer, Mannheim

## 2.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidprimer wurden mit Hilfe des „Universal ProbeLibrary Assay Design Center“-Programms der Firma Roche Applied Science entworfen, mit dem „Oligo Analyzer“ (Teemu Kuulasmaa) überprüft und im Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen synthetisiert.

Primersequenzen für quantitative qRT-PC (5' → 3'):

β-Actin    sense CTCCTCCCTGGAGAAGAGC  
          antisense ATGCCACAGGATTCCATACC

PMP70    sense GGGAGAAGCAGACAATCCAC  
(ABCD3) antisense CCGAAAGAAAATGAAATTATGTAGG

Pex14 sense CTCACTCCGCAGCCATACA  
antisense AGCCAAGGCACCATAATCTC

Acox1 sense GCCCAACTGTGACTTCCATC  
antisense GCCAGGACTATCGCATGATT

ACAA1 sense AGAAGCAGGATGCCTTTGC  
antisense TACGACTCTAACAGGACAC

MFP2 sense AACCCAGACACCTTCAGAGG  
antisense GCCTATCTCCCCAAACACAA

SOD [Cu-Zn] sense CCATCAGTATGGGGACAATACA  
antisense GGTCTCCAACATGCCTCTCT

GPX sense TTTCCCGTGCAATCAGTTC  
antisense TCGGACGTACTIONTGGAGGAAT

## 2.6 Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe Latex	Hartmann, Heidenheim
Einmalhandschuhe Nitril	Hartmann, Heidenheim
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen, 15 ml, 50 ml	Becton & Dickinson Le Pont De Claix, Frankreich
Kosmetiktücher	Wepa professional, Arnsberg
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
PCR-Platten	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Molecular Bioproducts, San Diego, CA, USA
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Stickstoff, flüssig	Messer-Griesheim, Krefeld

Trockeneis	Messer-Griesheim, Krefeld
Weichholzgranulateinstreu	sniff Spezialdiäten
Zentrifugenröhrchen	Beckmann

## 2.7 Geräte

7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Agarose Gelkammer mit Kämmen	Hauswerkstatt MPI exp. Medizin
Feinwaage, digital	Heraeus Instruments, Langenselbold
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Gewebehomogenisierer „Ultraturrax T8“	Agilent Technologies, Böblingen
Glaswaren	Schott, Mainz
ChemoCam Imager ECL	Intas, Göttingen
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Probenmischgerät „Vortexer“	Bender & Hobein, München
Magnetrührer	Omnilab, Bremen
PCR-Thermocycler „T3“	Biometra, Göttingen
Pipetten (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Reinstwasseranlage	Sartorius, Göttingen
Spannungsgeräte Elektrophorese	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tierkäfige	Tecniplast, Buguggiate, Italien
Trocknungszentrifuge „Speed Vac“	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Laboratory Centrifuge 4K15“	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Zentrifuge „Heraeus Biofuge 13“	Heraeus Instruments, Langenselbold

### 2.8 Software

7500 Fast System SDS Software	Applied Biosystems, UK
Excel Mac 2011	Microsoft Europe, Berlin
Oligo Analyzer 1.1.2	Teemu Kuulasmaa, Kuopio, Finnland
Universal Probe Library	Roche Applied Science, Mannheim

## **3. Methoden**

### 3.1 Mausbehandlung

Für die Behandlung wurden männliche Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57/bl6-Linie genommen. Die Tiere entsprechen den von Forss-Petter et al. beschriebenen Tieren [Forss-Petter et al. 1997]. Die Abcd1-defizienten Mäuse sind hemizygot  $y/-$  und werden im Weiteren mit Abcd1-/- bezeichnet. Diese Mauslinie wurde im Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen gezüchtet und trägt den Namen KALD. Es wurden je 6 wildtypische Mäuse und 6 Abcd1-/- Mäuse dieser KALD-Linie behandelt, dazu wurde eine (unbehandelte) Kontrollgruppe, ebenfalls aus 6 wildtypischen Mäusen und 6 Abcd1-/-Mäusen bestehend, mit handelsüblichem Mausefutter (als Placebokontrolle) gefüttert. Die Tiere wurden unter Beachtung der geltenden Tierschutzrichtlinien im Tierhaus des Max-Planck-Instituts gehalten. Die Tiere wurden im Alter von 60 Tagen für exakt 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 und 100 mg Fenofibrat pro kg Futter behandelt. Fenofibrat wurde in den entsprechenden Konzentrationen mit Prüfsubstanzfutter von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest, angemischt. Ausgehend von etwa 5 g Futteraufnahme pro Tag und Maus, hat ein Tier 0,125 mg (25 mg/kg Futter), 0,25 mg (50 mg/kg Futter) oder 0,5 mg Fenofibrat (100 mg/kg Futter) pro Tag aufgenommen. Während der Behandlung wurden die Tiere an jedem dritten Tag gewogen und einmal wöchentlich dem Gittertest und dem rotierenden Stabtest unterzogen. Nach 30 Tagen der Behandlung wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und es wurden sofort Großhirn, Kleinhirn, Leber, Ischiasnerv, und das Rückenmark entnommen. Die

entnommenen Gewebe wurden umgehend auf Trockeneis eingefroren und bei -80° Celsius gelagert.

### 3.1.1 Gittertest (engl. „Gridtest“)

Während der Behandlungszeit wurden die Mäuse im einwöchigen Abstand dem Gittertest unterzogen. Hierbei wird ein Metallgitter benutzt, dessen Streben einen Abstand von 1x1 cm aufweisen und welches eine Höhe von etwa 15 cm besitzt. Auf diesem Gitter müssen die Mäuse eine 40 cm lange Strecke hin- und zurücklaufen. Dabei wird gezählt, wie häufig die Mäuse die Gitterstäbe verfehlen und in den Freiraum zwischen den Stäben abrutschen.

### 3.1.2 Rotierender-Stabtest (engl. „Rotarodtest“)

Ebenfalls wöchentlich wurden die Mäuse auf einen sich längs rotierenden Stab gesetzt. Die Drehgeschwindigkeit konnte manuell variiert werden. Nach einer kurzen Eingewöhnungsphase von etwa 30 Sekunden bei 4 Upm (Umdrehungen pro Minute) wurde der Test gestartet. Die ersten 30 Sekunden betrug die Drehgeschwindigkeit 10 Upm, dann wurde sie für weitere 30 Sekunden auf 12 Upm erhöht und schließlich auf 20 Upm eingestellt. Nach 3 Minuten wurde der Test beendet. Dieser Test wurde 3 Mal pro Testtag wiederholt. Die Zeit bis das Tier vom rotierenden Stab fiel wurde gemessen.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Myelinpräparation aus Gehirnen

Das Standardprotokoll von Norton und Poduslo (1973) wurde in abgewandelter Form zur Präparation des Myelins aus dem Hirngewebe angewandt. Alle Schritte erfolgten auf Eis oder in vorgekühlten Zentrifugen. Die präparierten Gehirne wurden in 0,32 M Sucrose (10 ml/500 mg Gewebe) mit Protease-Inhibitor mittels eines Ultra-Turrax homogenisiert. 5 ml Homogenat wurde auf 5 ml 0,85 M Sucrose geschichtet und

zentrifugiert (75000 x g, 30 min). Die mit Myelin angereicherte Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und durch Resuspension in einem großem Volumen destilliertem Wasser gewaschen (75.000 x g, 15 min). Durch erneute Resuspension des Pellets in destilliertem Wasser mit anschließender Zentrifugation (15.000 x g, 15 min) wurde die Myelinfraktion einem osmotischen Schock ausgesetzt. Nach Wiederholung dieses Schrittes folgte die Aufnahme des Pellets in 0,32 M Sucrose, Schichtung auf 0,85 M Sucrose und anschließende Zentrifugation (75.000 x g, 30 min). Dies diente der Verringerung der axonalen Kontamination. Die Interphase wurde erneut in destilliertem Wasser aufgenommen und zentrifugiert (75.000 x g, 15 min), um die Sucrose zu eliminieren. Zum Abschluss erfolgte die Aufnahme des Pellets in einem kleinen Volumen sterilen PBS (100 µl/. Gehirn). Das gewonnene Myelin wurde der SDS-Gelelektrophorese und anschließend dem Western Blotting zugeführt.

### 3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit der Bradford-Methode lässt sich der Proteingehalt von Zelllysaten quantitativ bestimmen. Es wurden 3 µl der zu untersuchenden Probe mit 997 µl Bradfordreagenz gemischt, welches vorher im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Um Richtwerte zu bekommen, wurde eine Standardkurve aus Standardproteinlösungen mit den Konzentrationen von 1-7 µg BSA-Proteingehalt pipettiert. Diese Proteinlösung wurde mit der gleichen Menge Bradfordreagenz vermischt und vermessen.

### 3.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode mit deren Hilfe Proteine elektrophoretisch, ihrer Größe entsprechend, aufgetrennt werden können. Das Gel hat einen 10%igen Polyacrylamidgehalt und ist 1,5 mm dick. Gegossen werden die Gele mit Gießständern, Glasplatten, sowie Kämmen des BioRad-Systems. Zunächst wird das Trenngel gegossen, welches während der Polymerisationszeit von etwa 30 Minuten mit Isopropanol überschichtet wird. Auf dieses Trenngel wird das Sammelgel gegossen, in welches mit einem 1,5 mm dicken Kamm 10 Ladetaschen polymerisiert werden.



Bevor die Gele mit Proben geladen werden, setzt man je zwei auspolymerisierte Gele in die Halterung der Elektrophoresekammer des Mini-Protean®-ElektrophoreseCasting-Modul ein und füllt Zwischen- und Außenraum mit 1x Laufpuffer.

10 µg unserer Proben wurden mit der identischen Menge 2-fach konzentriertem Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 40°C und 55 Upm im Thermomixer inkubiert. Danach wurde die gesamte Probe jeweils in eine Geltasche geladen. Das Probenvolumen sollte 40 µl nicht übersteigen. In eine Tasche wurde 5 µl eines Proteinstandards als Marker geladen.

Bei 80 V liefen die Proben für 15 Minuten in das Gel, anschließend lief die Gelelektrophorese für etwa 90 Minuten bei 120 V.

### 3.2.4 Western Blotting und Proteinnachweis

Nachdem die Proteine mittels Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine PVDF-Nitrozellulosemembran transferiert. Direkt vor dem Transfer wurde die Membran für 1 Minute in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und konnte dann in Transferpuffer zwischengelagert werden. Die für den Transfer wichtigen 8 Whatmanpapiere und 6 Schwämme wurden ebenfalls in Transferpuffer eingelegt. Es wurde darauf geachtet, dass Schwämme wie Whatmanpapiere gut durchnässt sind. Der Transferpuffer wurde immer frisch angesetzt. Gel und Membran wurden zwischen zwei Stapel von durchnässen Whatmanpaperien und Schwämmen in folgender Anordnung gelegt:

Ausgehend von der Anode hin zur Kathode stapelt man

- 3 Schwämme
- 4 Whatmanpapiere
- SDS-Geld
- PVDF-Membran
- 4 Whatmanpapiere
- 3 Schwämme

Es wurde für 70 Minuten bei 250 mA geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran umgehend in Blockierlösung überführt, in der sie für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubierte.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper entweder bei 4°C über Nacht, oder für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

Die verwendeten Primärantikörper wurden in unten genannten Verdünnungen in 3 ml Blockierlösung angesetzt:

### Primärantikörper

anti-ACAA1	(polyklonal, Kaninchen)	1:2000	Sigma
anti-CNP	(monoklonal, Maus)	1:300	Abcam
anti-GPX1	(polyklonal, Kaninchen)	1:750	Sigma
anti-PEX11b	(polyklonal, Kaninchen)	1:750	M. Baes
anti-PMP70	(polyklonal, Kaninchen)	1:750	Abcam
anti-Tubulin	(monoklonal, Maus)	1:500	Sigma

Nach der Primärantikörperinkubation wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten mit TBST gewaschen, dann wurde der Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur dazugegeben. Dieser wurde ebenfalls entsprechend seiner Verdünnung in 10 ml Blockierlösung angesetzt:

### Sekundärantikörper

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

Wie nach der Primärantikörperinkubation wurde die Membran je dreimal mit TBST für 15 Minuten gewaschen.

Anschließend wurde das Proteinsignal mit Hilfe der Leuchtreaktion zwischen der an den Sekundärantikörper gekoppelten Horse-Radish-Peroxidase und des Western-Lightning

Plus ECL Reagent sichtbar gemacht. Der ChemoCam Imager ECL kann nun dieses Lichtsignal erkennen und Aufnahmen mit unterschiedlicher Belichtungszeit machen.

Im Anschluss wurden die Aufnahmen mittels ImageJ (Version 1.47h; ImageJ – Image Processing and Analysis in Java) quantifiziert.

Die statistische Auswertung wurde mittels ANOVA one-way (Varianzanalyse) gemacht. Es wurde jeweils mit dem Mittelwert aus den drei gemessenen Tieren gerechnet. Unterschiede ab  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Es wurde die Software MS Excel AddOn „StatPlus“ verwendet

### 3.3 Gewebeanalysen

#### 3.3.1 Isolation von RNA

Als erster Schritt zur Messung der Genexpression wurde Gesamt-RNA aus dem Großhirn isoliert. Hierbei wurde sich streng an das Protokoll des „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen gehalten:

Ein entnommenes halbes Großhirn ohne Bulbi oculi, wurde zusammen mit dem Lyse-Reagenz „Qlazol“ im Ultraturrax homogenisiert. Das gewonnene Lysat wurde mit Chloroform versehen und auf Eppendorf-Gefäße überführt (200  $\mu$ l auf 1 ml Qlazol). Von den nach dem Zentrifugieren (15' bei 13000 rpm) entstandenen, zwei wässrigen Phasen, wurde die obere vorsichtig abpipettiert und in ein weiteres Gefäß überführt. Anschließend wurde 70% Ethanol im Verhältnis 1:1 dazugegeben und das Gemisch auf RNeasy Spin-Säulen gegeben, an deren Filtern durch Zentrifugation (15'' bei 13000 rpm) die RNA gebunden wurde. Abschließend wurde mit dem RW1-Puffer (350  $\mu$ l) gewaschen und zentrifugiert. Nun wurde der DNase-Mix (10  $\mu$ l DNase + 70  $\mu$ l RDD-Puffer pro Säule) für 15 Minuten aufgetragen. Es wurde noch einmal mit RW1-Puffer gewaschen, dann folgten 1 Minute Zentrifugation, 500  $\mu$ l RPE-Puffer, Zentrifugation, Erneuern der Sammelröhrchen, Trockenzentrifugation und schließlich das Lösen der RNA durch Gabe von 50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser. Das Eluat enthielt nun reine RNA in Lösung.

### 3.3.2 Messung der Konzentration und Qualität der RNA

Um eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen RNA zu bekommen, wurde diese mit dem UV-Spektrometer vermessen. Die Konzentration von Nukleinsäuren kann mit Hilfe des Beer-Lambert'schen Gesetzes bestimmt werden. Hier wurde sich der lineare Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und der Konzentration einer Flüssigkeit zu Nutze gemacht. Je höher die Konzentration einer Substanz ist, desto höher muss auch die Intensität des sie durchbrechenden Lichtes sein. Spektrophotometer machen 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 diene uns hierbei als Indikator für die relative Reinheit und Qualität der gewonnenen RNA und sollte etwa zwischen 1,7 und 2 liegen.

Zunächst wurde das Gerät durch einen Standard aus destilliertem Wasser kalibriert, danach wurde die aufbereitete RNA im Verhältnis 1:49 mit destilliertem Wasser verdünnt und vermessen.

### 3.4 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription von RNA

Die Reaktion mit der man RNA wieder in DNA umschreiben kann, nennt sich reverse Transkription. Die synthetisierte DNA wird dann copyDNA (cDNA) genannt und kann zur Genexpressionsanalyse mittels Polymerasekettenreaktion genutzt werden. Hierfür wird das Enzym reverse Transkriptase benötigt, das mit Hilfe eines Primers, einem kurzen komplementären DNA-Abschnitt, an die RNA binden kann. Als Primer dienen ein oligo-dT-Primer ( $c=0.6 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ) und ein Nonamer-Primer (N9-Primer,  $c=120 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ). Als Endprodukt dieser Transkription erhalten wir einen cDNA-Strang, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert ist. Das Enzym RNase spaltet dann den RNA- vom cDNA-Strang ab. In der weiteren Prozessierung wird durch DNA-Polymerase ein komplementärer DNA-Strang zum schon bestehenden cDNA-Einzelstrang synthetisiert. Nun kann die neu synthetisierte cDNA für die Polymerasekettenreaktion genutzt werden. Bei der cDNA-Synthese wurden alle Proben entsprechend ihrer

Konzentration mit einer Masse von 1 µg eingesetzt. Ich habe das Kit und Protokoll von Invitrogen® benutzt.

Pro 0,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden hinzugefügt:

Substanz	Menge in µl
RNA	2
dt-Primer	1
N9-Primer	1

Die Proben inkubierten in einem Heizgerät (engl. „thermocycler“) bei 70°C für 2 Minuten. Danach wurden sie wieder auf Eis gebracht und die folgende Mischung wurde hinzugefügt:

Substanz	Menge in µl
H <sub>2</sub> O	1,5
5x 1st strand buffer (250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15mM MgCl <sub>2</sub> )	2
0,1M DTT (Dithiothreitol)	1
dNTPs 10 mM (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	0,5
Superscript III 200U/µl	1

Nach sorgfältigem Durchmischen wurden sie in das Heizgerät gestellt und folgende Parameter wurden eingestellt:

Bei einer Deckeltemperatur von 65°C beträgt die Temperatur in der Kammer die ersten 10 Minuten 25°C, dann wurde sie für 45 Minuten auf 50°C angehoben und zum Schluss nochmal für 45 Minuten um weitere 5 °C auf 55°C erhöht.

Im Anschluss wurden die Proben wieder auf Eis gelegt und konnten bei -80°C gelagert werden. Die erhaltende Konzentration entspricht 1000 ng/µl.

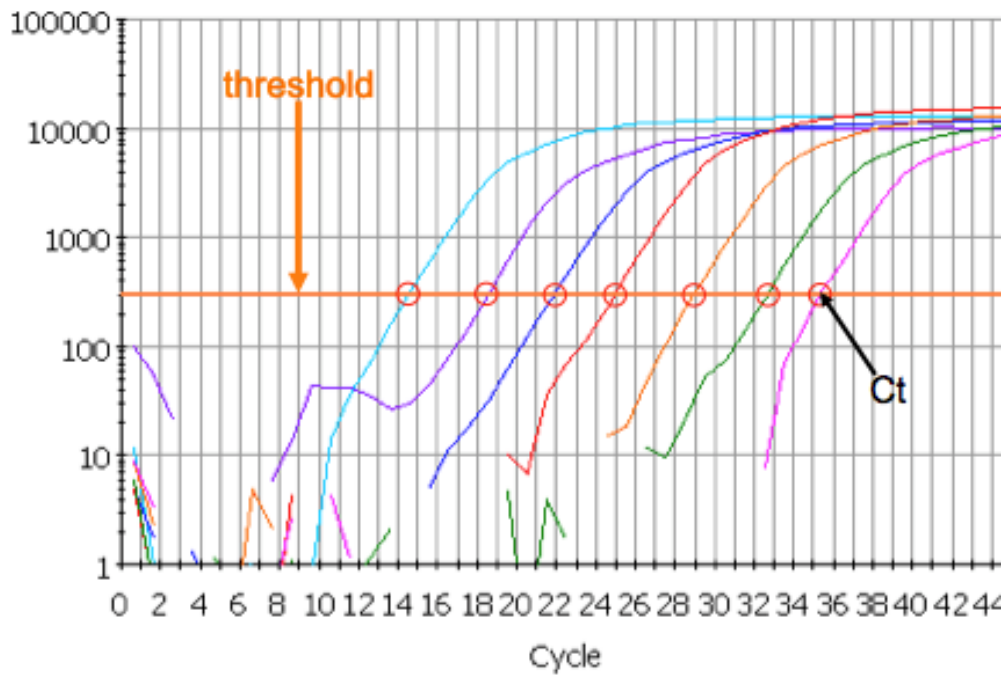
### 3.5 qRT-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit cDNA

#### 3.5.1 Funktionsweise einer qRT-PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können geringe Mengen eines definierten DNA-Abschnitts durch das Enzym DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigt werden. Die Real-time-PCR bestimmt dabei die exakte Menge („quantitativ“) der amplifizierten DNA-Produkte in Echtzeit. Bei jedem Zyklus wird dabei das gewünschte Transkript verdoppelt. Ich habe den Farbstoff Sybr®-Green benutzt. Dieser Marker lagert sich (interkaliert) spezifisch an die DNA. Er generiert nach der Bindung ein fluoreszentes Signal, das proportional zur Menge der neu 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 lässt sich die Zyklenzahl bestimmen, bei der sich das Fluoreszenzsignal verzehnfacht hat. Diese Zyklusnummer wird als Ct-wert (engl. „threshold-cycle“) bezeichnet und ist umso größer, je weniger DNA-Menge der Zielsequenz eingesetzt wurde.

Der ermittelte Ct-Wert der Probe wird stets auf den Ct-Wert eines „Haushaltsgens“ („housekeeping gene“) normalisiert. Diese werden neben den zu quantifizierenden Genen mitamplifiziert (Abb. 4). Als Housekeeping-Gen wird ein Gen ausgewählt, von dem eine konstante Expressionsmenge in allen untersuchten Proben vorausgesetzt werden kann. Ich habe für diese Untersuchungen das Zytoskelett-Protein  $\beta$ -Actin gewählt.



**Abb. 4 Auswertung der qRT-PCR-Rohdaten.**

Die Abbildung zeigt die Messung der Fluoreszenzintensität nach Anzahl der Kopien und des Amplifikationszykluses. Der orangene Pfeil deutet auf die Schwelle (threshold line), bei der das eigentliche Messsignal das Hintergrundsignal um das Zehnfache überschritten hat. Dieser Zyklus entspricht dem Ct-Wert (schwarzer Pfeil; Ct Value).

Quelle: <http://www.bio-rad.com>

### 3.5.2 Schmelzkurvenanalyse

Nachteil der Messung mit interkalierenden Farbstoffen ist die geringe Spezifität, da auch unspezifische PCR-Produkte (Primer-Dimere) den Farbstoff einlagern können. Um diesen Fehler auszugleichen, habe ich im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Mittels der Erhöhung der Temperatur wird die doppelsträngige DNA nun wieder aufgeschmolzen. Während dieses Prozesses wird weiterhin die Fluoreszenz gemessen. Spezifische DNA-Amplifikate zerfallen bei einer bestimmten Temperatur und können durch ein Absinken der Fluoreszenzstärke detektiert werden. Durch die unterschiedlichen Schmelzpunkte von spezifischen und unspezifischen (z.B. Primer-Dimere) Amplifikaten lassen sich diese unterscheiden. Im Idealfall ist am Ende der Schmelzkurvenanalyse nur ein Schmelzpunkt zu erkennen.

### 3.5.3 Reaktionsansatz und Amplifikationsprotokoll

Wir haben bei unseren Messungen stets eine Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l cDNA eingesetzt. Die Proben mussten dazu in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt werden.

Pipettierschema:

	Substanz	Menge in $\mu$ l
1.	SYBR®-Green	0,5
2.	Sense-Primer	0,1
3.	Antisense-Primer	0,1
4.	H <sub>2</sub> O	0,8
5.	cDNA	4,0

Zyklus:

	Zeit	Temperatur in °C
1.	10 Minuten	95
2.	15 Sekunden	95
3.	20 Sekunden	60
4.	40 Sekunden	72

Der Zyklus wurde 40 mal durchlaufen.

### 3.5.4 Auswertung der Ergebnisse

Zunächst wurde aus dem Ct-Wert der Zielsequenz und dem Ct-Wert des Standard-Gens durch die Bildung ihrer Differenz der so genannte  $\Delta$ Ct-Wert ermittelt:

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



Eine Probengruppe der in der PCR amplifizierten Proben diene als relative Referenz (Kalibrator) – in unserem Fall die Tiergruppe mit dem Placebo-Futter – und anhand dieser Referenz wurden alle anderen behandelten Tiergruppen kalibriert. Dafür wurde der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert hinzugezogen, der sich aus der Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Proben und der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte des Kalibrators errechnet:

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

Anhand des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes konnte nun die Expression des Zielgens mit folgender Formel berechnet werden:

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

### 3.6 Statistik

Zur Analyse und Normalisierung der Ct-Rohdaten wurde die Software „Excel Mac 2011“ verwendet.

Die statistische Auswertung wurde mittels ANOVA one-way (Varianzanalyse) und post hoc Test gemacht. Es wurde jeweils mit dem Mittelwert aus den drei gemessenen Tieren gerechnet. Fehlerbalken zeigen die Unterschiede zwischen technischen Replikaten. Unterschiede ab  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Es wurde die Software MS Excel AddOn „StatPlus“ verwendet.

#### **4. Ergebnisse**

Mutationen im Abcd1-Protein führen bei Menschen zur X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie. Schon im 1. Lebensjahrzehnt prägt sich bei etwa der Hälfte der Mutationsträger eine schwerwiegende Form der Krankheit, die zerebrale ALD (cALD), aus. Diese Form der Krankheit zeichnet sich u.a. durch eine schwere, schnell progressive subkortikale Demyelinisierung aus und verläuft letal.

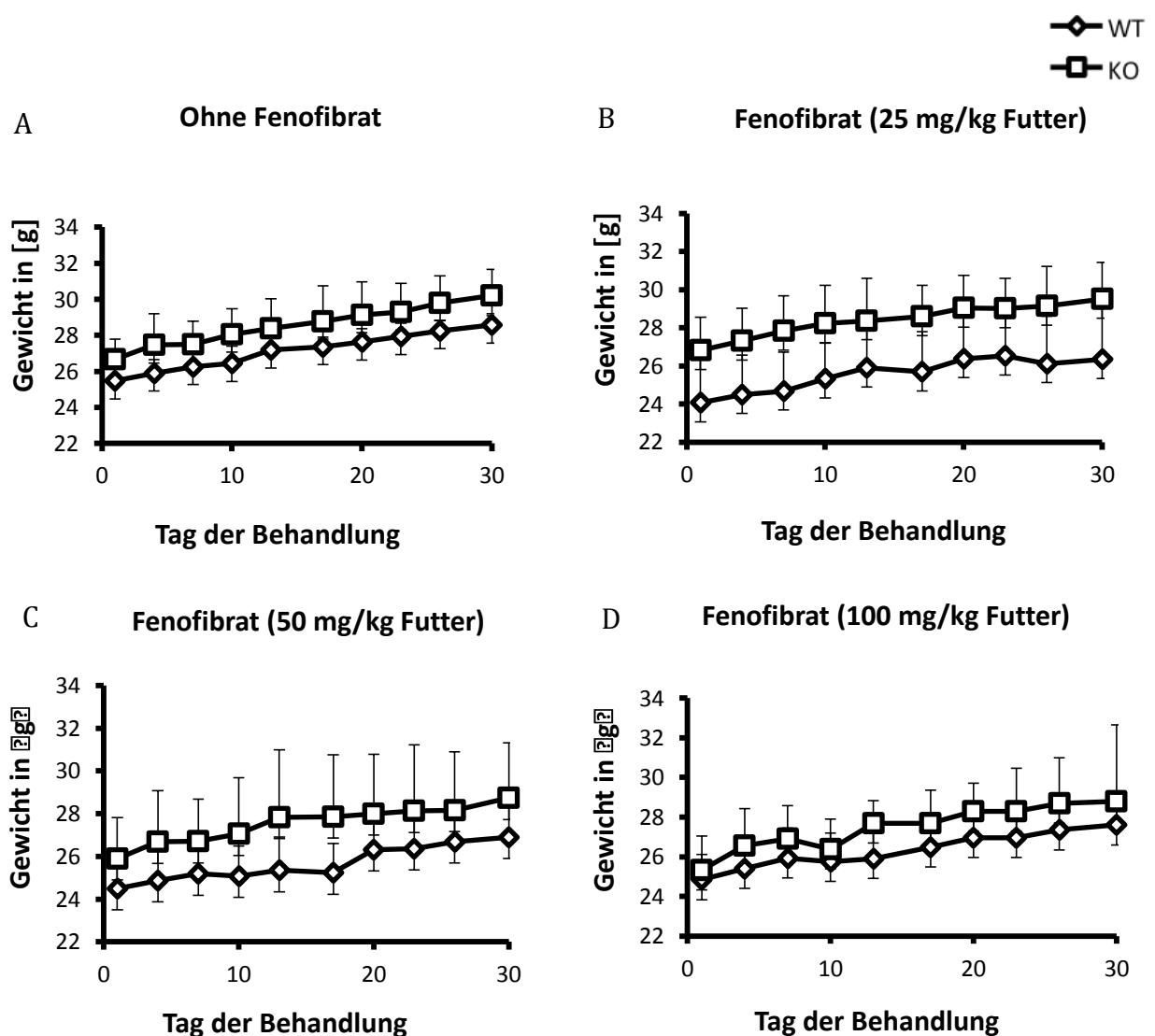
Abcd1-knockout-Mäuse hingegen entwickeln erst in der zweiten Lebenshälfte eine vergleichsweise leichte Neurodegeneration, die das Rückenmark betrifft. Mäuse ohne funktionelle Peroxisomen in myelinbildenden Zellen (CNP-Cre\*floxPEX5-Mäuse) entwickeln der zerebralen Adrenoleukodystrophie ähnliche Symptome [Kassmann et al. 2007]. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese eines zeitabhängigen sekundären Defekts in Peroxisomen, als Folge der Abcd1-Mutation in Patienten, welcher die Neurodegeneration bedingt. Eine weitere Annahme ist, dass dieser Pathomechanismus durch erhöhten Umsatz der Peroxisomen unterbrochen werden kann.

Schon 1965 zeigten Hess und Staubli, dass über Zusätze im Futter (damals Ethyl-Chlorophenoxy-Isobutyrate) die Peroxisomenanzahl in der Leber von Ratten erhöht werden konnte. Erst viel später wurden Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) und der zugrunde liegende Mechanismus der peroxisomalen Abundanz entdeckt. Colton et al. konnten 2004 zeigen, dass dieser Effekt auch in Primaten erzeugt werden kann. Diese Ergebnisse geben Anlass die Wirkung von PPAR-Agonisten im Gehirn genauer zu untersuchen. Bisherige *in vivo* Experimente zeigten einen Effekt bzgl. Peroxisomaler Proliferation nur von Leberzellen. Sollten PPAR-Agonisten auch in der Lage sein, die Peroxisomenbiosynthese im Gehirn anzuregen, wäre dies ein möglicher Ansatz zur Therapie der X-ALD.

Aus dem Grund ist Gegenstand dieser Arbeit die Analyse von wildtypischen und Abcd1-defizienten Mäusen, die mit einer von 3 verschiedenen Konzentrationen des PPAR $\alpha$ -Agonisten Fenofibrat behandelt wurden.

## 4.1 Gewichtszunahme und motorische Leistung der Mäuse nach Fenofibratbehandlung

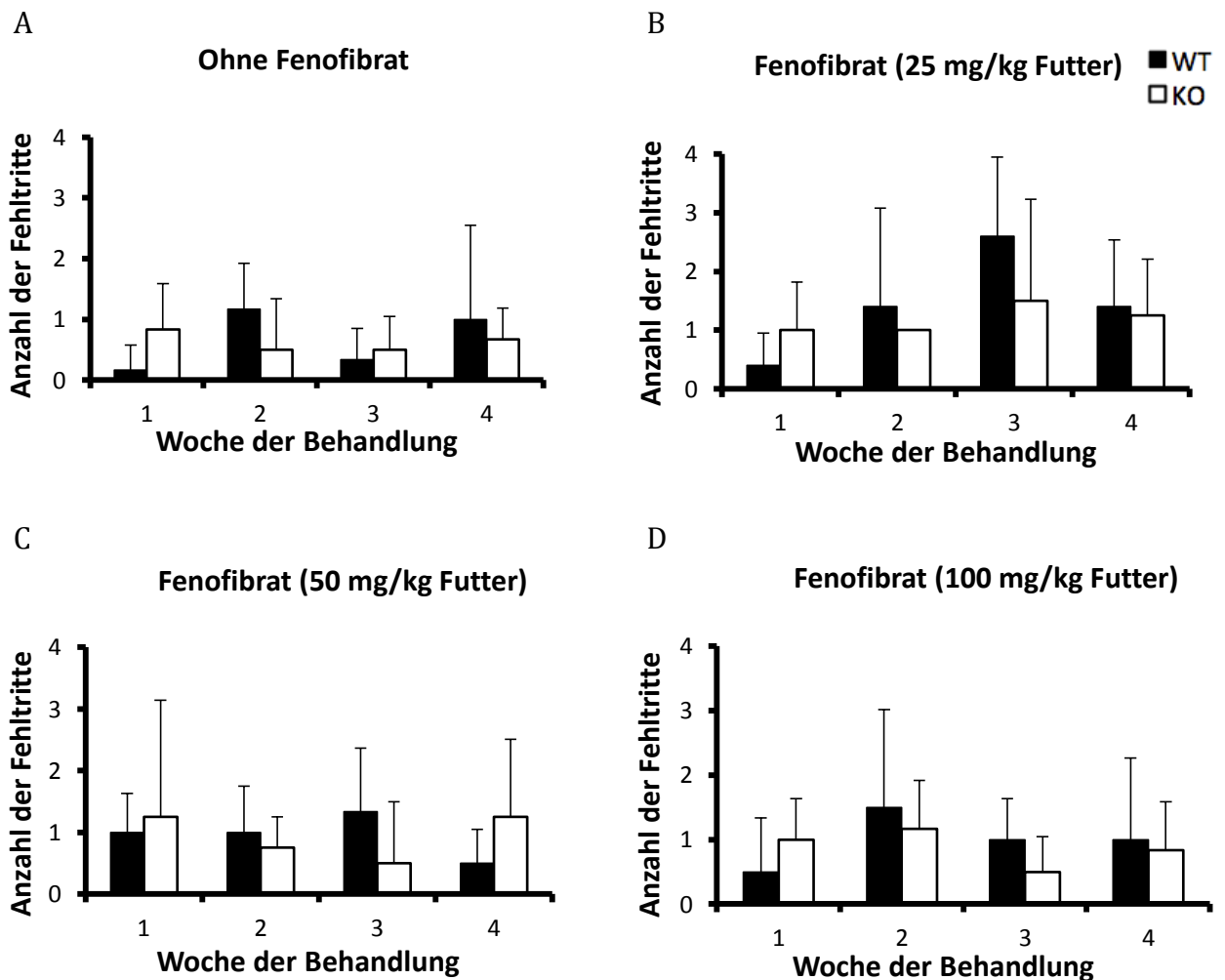
Um während der 30-tägigen Behandlungsphase mögliche toxische Effekte von Fenofibrat feststellen zu können, wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und motorischen Tests unterzogen. Abb. 5 zeigt, dass alle Tiergruppen in den 30 Tagen der Behandlung kontinuierlich an Gewicht zugenommen haben. Ein pathologischer Gewichtsverlust, als Folge verminderter Nahrungsaufnahme oder -verwertung konnte nicht ausgemacht werden. Interessanterweise waren Abcd1-knockout-Tiere (schon bei Beginn des Wiegens) schwerer als wildtypische Mäuse (Abb. 5 A-D).



**Abb. 5 Gewicht der Mäuse.**

(A-D) Die Mäuse jeder Behandlungsgruppe zeigten über den Behandlungszeitraum eine vergleichbare Gewichtszunahme. Bei allen Behandlungsgruppen fiel auf, dass Abcd1 <sup>-/-</sup> Mäuse von Beginn der Messungen an schwerer waren, als die wildtypischen Mäuse. Die Daten wurden mittels unabhängigem Zweistichproben-t-Test ausgewertet und sind als SD ± Mittelwert dargestellt. Die Gewichtsunterschiede zwischen wildtypischen und Abcd1 <sup>-/-</sup> Mäusen waren bei allen Behandlungsgruppen nicht signifikant; n=6.

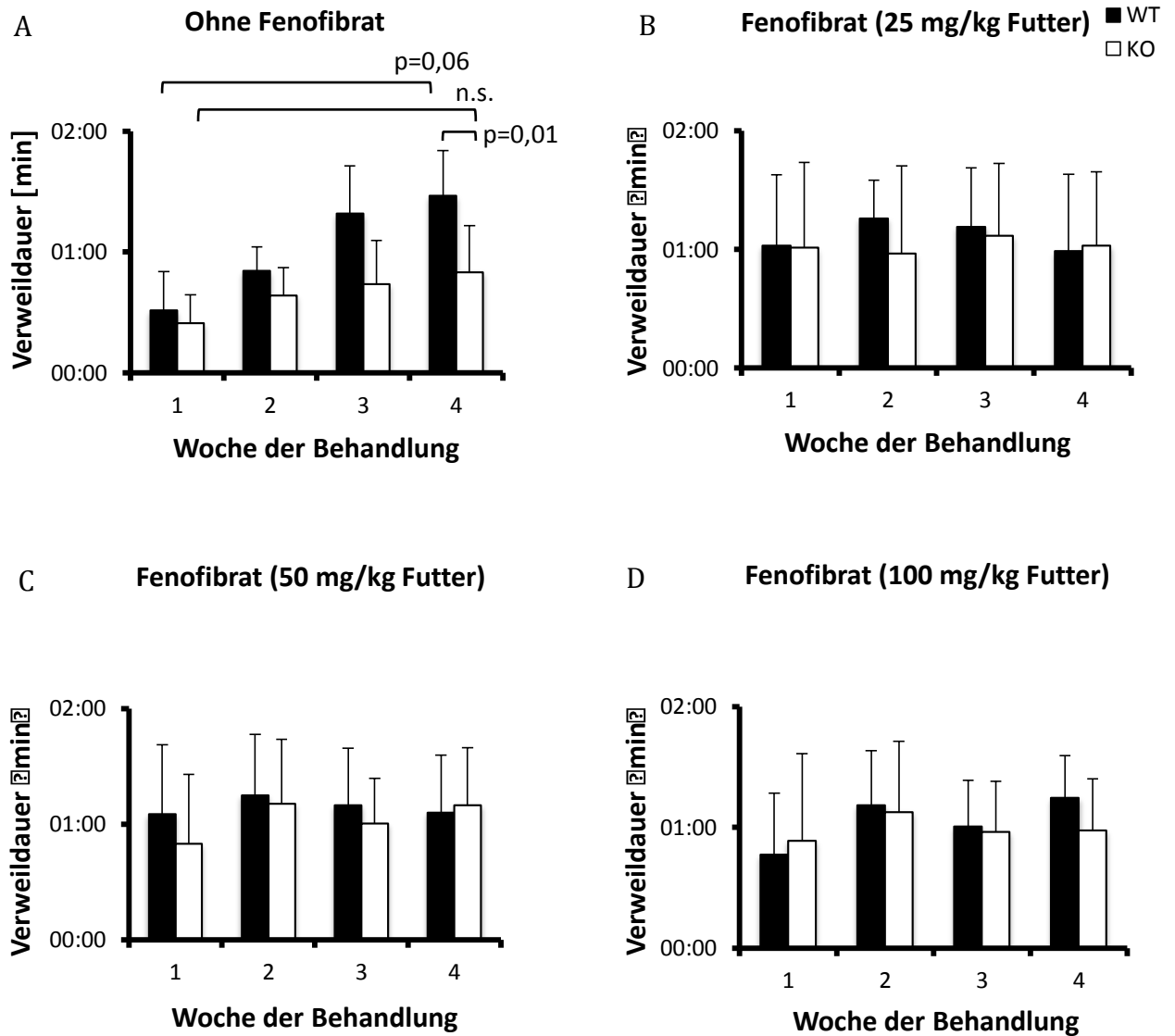
Zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse wurde einmal wöchentlich der Gittertest (Abb. 6) und der „Rotarod“ („rotating rod“) Test (Abb. 7) mit allen Tieren durchgeführt. Mithilfe dieser Methoden sollte die Motorik überprüft werden, um frühzeitige motorische Ausfälle aufgrund einer möglichen Toxizität des Behandlungswirkstoffs sichtbar zu machen. Motorisch betroffene Mäuse schaffen es nicht, sich zielgenau auf den Gitterstäbe zu bewegen, sondern rutschen ab, was als „Fehltritt“ gewertet und quantifiziert wird. Die Ergebnisse des Gittertests zeigten aber keine auffälligen Werte, die auf die Behandlung mit Fenofibrat zurückgeführt werden konnte (Abb. 6 A-D).



**Abb. 6 Gittertest.**

Die Tiere wurden einmal wöchentlich dem Gittertest unterzogen und die Anzahl der Fehlritte gemessen. (A-D) Zwischen den Tiergruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Die Varianz innerhalb der Gruppen war hoch. Die Daten wurden mittels unabhängigem Zweistichproben-t-Test ausgewertet und sind als  $SD \pm$  Mittelwert dargestellt;  $n=6$ .

Beim Rotarodtest zeigen Mäuse üblicherweise ein Lernverhalten, dass sich durch eine gesteigerte Verweildauer am Ende einer Testreihe im Vergleich zum Anfang bemerkbar macht [Zhang et al. 2013]. Die Ergebnisse des Rotarodtests zeigten tendenziell ein solches Lernverhalten mit längerer (jedoch nicht signifikant längerer) Verweildauer auf dem rotierenden Stab in der letzten Behandlungswoche. Dies galt für beide unbehandelte Tiergruppen, zeichnete sich jedoch bei den wildtypischen Tieren deutlicher ab ( $p=0,06$ ) als bei den Abcd1-knockout Mäusen ( $p=0,21$ ). In der letzten Behandlungswoche war die Verweildauer von Abcd1  $-/-$  Tieren im Vergleich zu den wildtypischen Tieren signifikant verringert (Abb. 7 A). Interessanterweise war das Lernverhalten in keiner der mit Fenofibrat behandelten Tiergruppen festzustellen (Abb. 7 B-D). Hier blieb die gemessene Zeit auf dem drehenden Stab über die 4 Behandlungswochen abgesehen von interindividuellen Unterschieden in etwa gleich und lies auch keine Unterschiede zwischen wildtypischen und knockout Tieren erkennen (Abb. 7 B-D).

**Abb. 7 Rotarodtest.**

Die Tiere wurden einmal wöchentlich dem Rotarodtest unterzogen. **(A)** Bei den unbehandelten Tiergruppen fällt ein kontinuierlicher, jedoch nicht signifikanter, Lerneffekt zwischen den Tests der ersten und letzten Behandlungswoche auf. Knockout Mäuse steigerten ihre Leistung in dem Zeitraum um ca. Faktor 2. Wildtypische Tiere dagegen hielten sich im Vergleich zum ersten Versuch beim letzten Test etwa 3 mal so lange auf dem rotierenden Stab. Die Verweildauer der knockout Mäuse auf dem Stab war am Ende der Testreihe signifikant kürzer als die von wildtypischen Tieren ( $p=0,01$ ). **(B-D)** Bei allen behandelten Gruppen wurde ein vergleichbarer Lerneffekt nicht beobachtet und die Leistungen der ABCD1-defizienten und der wildtypischen Tiere in den Tests waren stets ähnlich. Die Daten wurden mittels unabhängigem Zweistichproben-t-Test ausgewertet und sind als  $SD \pm$  Mittelwert dargestellt;  $n=6$ .

### 4.2 Auswirkungen der Fenofibratbehandlung auf die Expression peroxisomaler Gene im Gehirn von Mäusen

30 Tage nach Beginn der Behandlung wurden die Mäuse zervikal disloziert und es wurden Großhirn, Kleinhirn, Leber, Ischiasnerv und Rückenmark zur Analyse entnommen. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf dem Großhirn der Mäuse, da untersucht werden sollte, ob durch die Einnahme von Fenofibrat eine Genregulierung peroxisomaler Gene in diesem Gewebe stattgefunden hat. Dazu wurde das Gewebe mittels quantitativer „real time“ Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und Western Blot Technik analysiert. Hierzu wurden eine Reihe von möglicher Zielgenen festgelegt, die auf eine veränderte Peroxisomenbiosynthese hinweisen könnten. Als Zielgene wurden PMP70, PEX11b und PEX14 als peroxisomale Membranproteine gewählt, da bereits gezeigt wurde, dass diese, durch Fenofibratbehandlung im Gewebe moduliert werden können [Rampler et al. 2003]. Die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzyme ACAA1, ACOX1 und MFP2 sind ein guter Indikator dafür, ob durch die Behandlung die  $\beta$ -Oxidation möglicherweise wieder erhöht werden kann. Es wurde publiziert, dass auch diese Gene durch Fenofibrat reguliert wurden [Rampler et al. 2003]. SOD1 und GPX1 wurden als Marker für oxidativen Stress gewählt. Sie sind am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies und Wasserstoffperoxid beteiligt und konnten auch schon in *Abcd1*<sup>-/-</sup> Mäusen reguliert werden [Morato et al. 2013]. Die Regulation dieser Zielgene lässt eine erste Aussage über den möglichen therapeutischen Einsatz von Fenofibrat für ALD-Patienten zu.

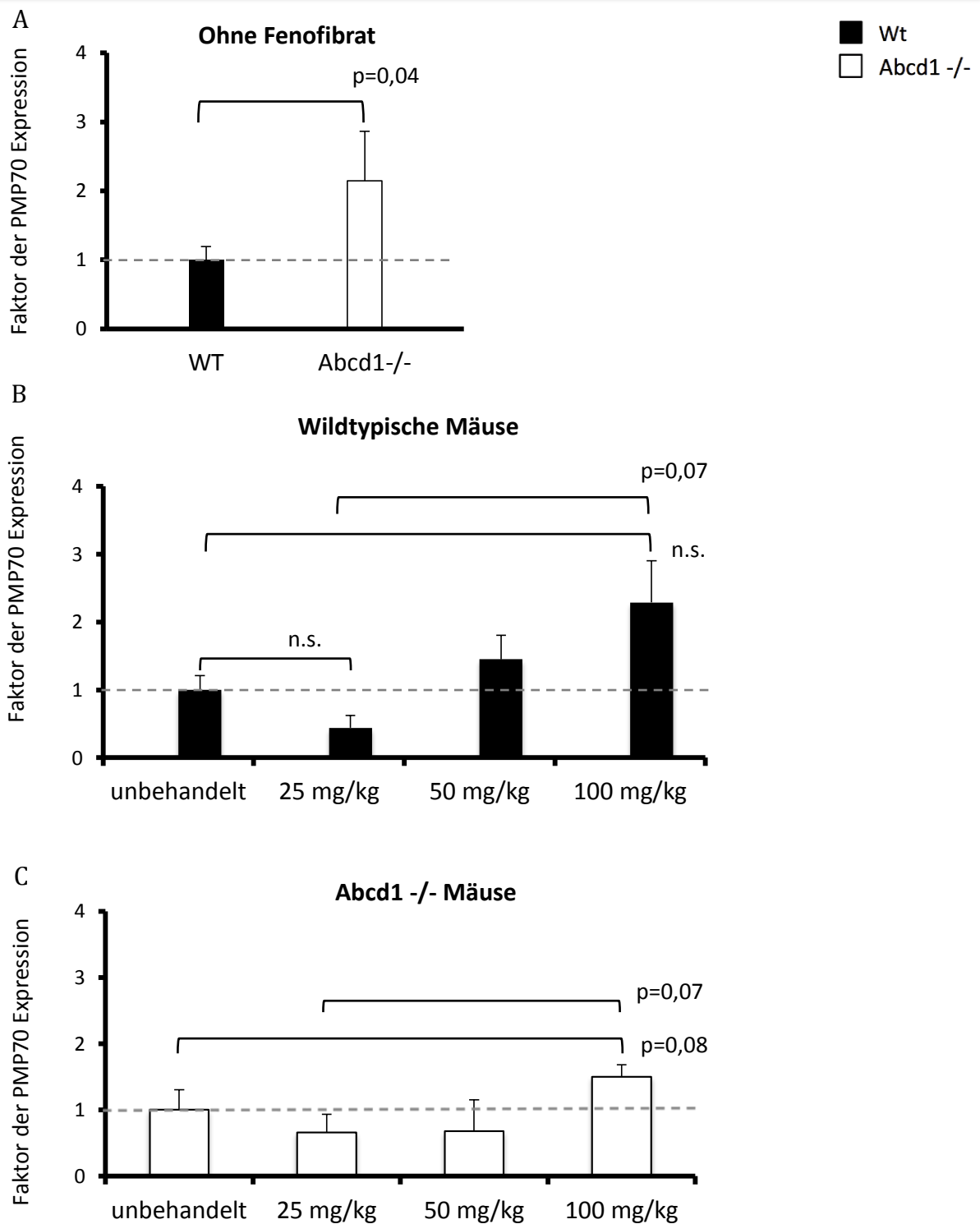
#### 4.2.1 Peroxisomale Membranproteine

PMP70 als peroxisomales Membranprotein stellt möglicherweise einen wichtigen Indikator für die Peroxisomenanzahl dar. Es konnte gezeigt werden, dass PMP70 in Anwesenheit von ATP die  $\beta$ -Oxidation in Peroxisomen stimuliert [Thomas et al. 1980].

Die Messwerte der qRT-PCR zeigten einen deutlichen Unterschied der Expression von PMP70 zwischen wildtypischen und *Abcd1*<sup>-/-</sup> Mäusen im Gehirn, die nicht mit Fenofibrat behandelt wurden (Abb. 8 A). Allein das Fehlen von *Abcd1* scheint dazu zu führen, dass sich die Expression von PMP70 in dieser Gruppe etwa verdoppelte (Abb. 8 A). Bei den behandelten wildtypischen Tieren zeigte sich eine von der Fenofibratdosis abhängige Zunahme der PMP70 Expression. Die PMP70 Expression der Gruppe mit der

höchsten Fenofibratdosis (100 mg pro kg Futter) hatte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mindestens verdoppelt. 25 mg Fenofibrat pro kg Futter schienen dagegen einen entgegengesetzten Effekt zu erzielen. Hier war die Expression von PMP70 deutlich geringer. Erstaunlicherweise sorgte bei *Abcd1* <sup>-/-</sup> Tieren die Behandlung mit 25 und 50 mg/kg Fenofibrat für eine niedrigere PMP70 Expression (Abb. 8 C). Durch die höchste Fenofibratmenge im Futter wurde allerdings auch bei knockout Tieren eine leicht (jedoch nicht signifikant) erhöhte Expression von PMP70 gemessen.





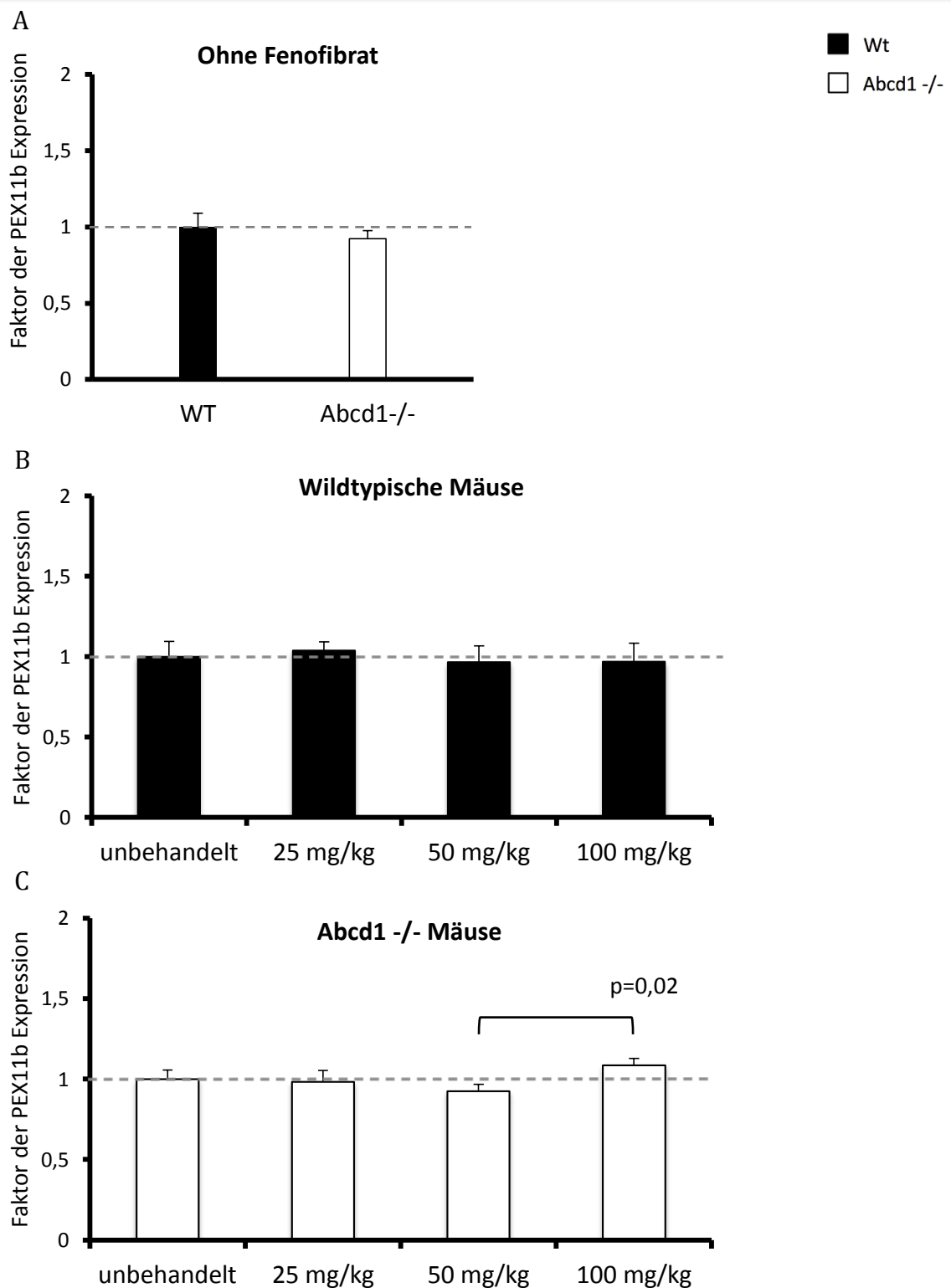
**Abb. 8 qRT-PCR Analyse der Expression des PMP70 Gens im Gehirn von Mäusen.** Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von PMP70 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** In unbehandelten Tieren zeigten Abcd1-defiziente Tiere bereits eine signifikant erhöhte Expression von PMP70 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Wildtypische mit Fenofibrat behandelte Mäuse wiesen eine dosisabhängige, nicht signifikant erhöhte Expression von PMP70 bei 50 und 100 mg/kg ( $p=0,16$ ) auf. Bei 25 mg/kg war die Expression von PMP70 nicht signifikant niedriger ( $p=0,29$ ). **(C)** Hingegen zeigten Abcd1<sup>-/-</sup> behandelte Mäuse eine solche Regulation nicht. Sie zeigten bei 25 und 50 mg/kg Fenofibrat zunächst sogar eine Reduktion der PMP70 Expression und erst bei 100 mg Fenofibrat pro kg Futter einen nur 1,5-fachen Anstieg der PMP70 Expression. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD  $\pm$  Mittelwert dargestellt.;  $n=3$ .

PEX11b ist an der Teilung von Peroxisomen beteiligt. Somit ist dieses Protein für die Biosynthese sehr wichtig und hat auch indirekten Einfluss auf die  $\beta$ -Oxidation [Li und Gould 2002]. Mutationen in diesem Protein können zu peroxisomalen Stoffwechselstörungen im menschlichen Körper führen [Thoms und Gärtner 2012].

In den behandelten wildtypischen-Gruppen wurde die Expression von PEX11b nicht reguliert (Abb. 9B). Bei den behandelten Abcd1<sup>-/-</sup> Mäusen waren die Unterschiede zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht signifikant. Allerdings hatte auch hier die Dosis von 50 mg Fenofibrat (pro Kilogramm Futter) einen senkenden Einfluss, aber die höchste Dosis eine leichte Verstärkung der Expression zur Folge (Abb. 9 C). Insgesamt wurde dadurch ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Behandlungsgruppen nachgewiesen.

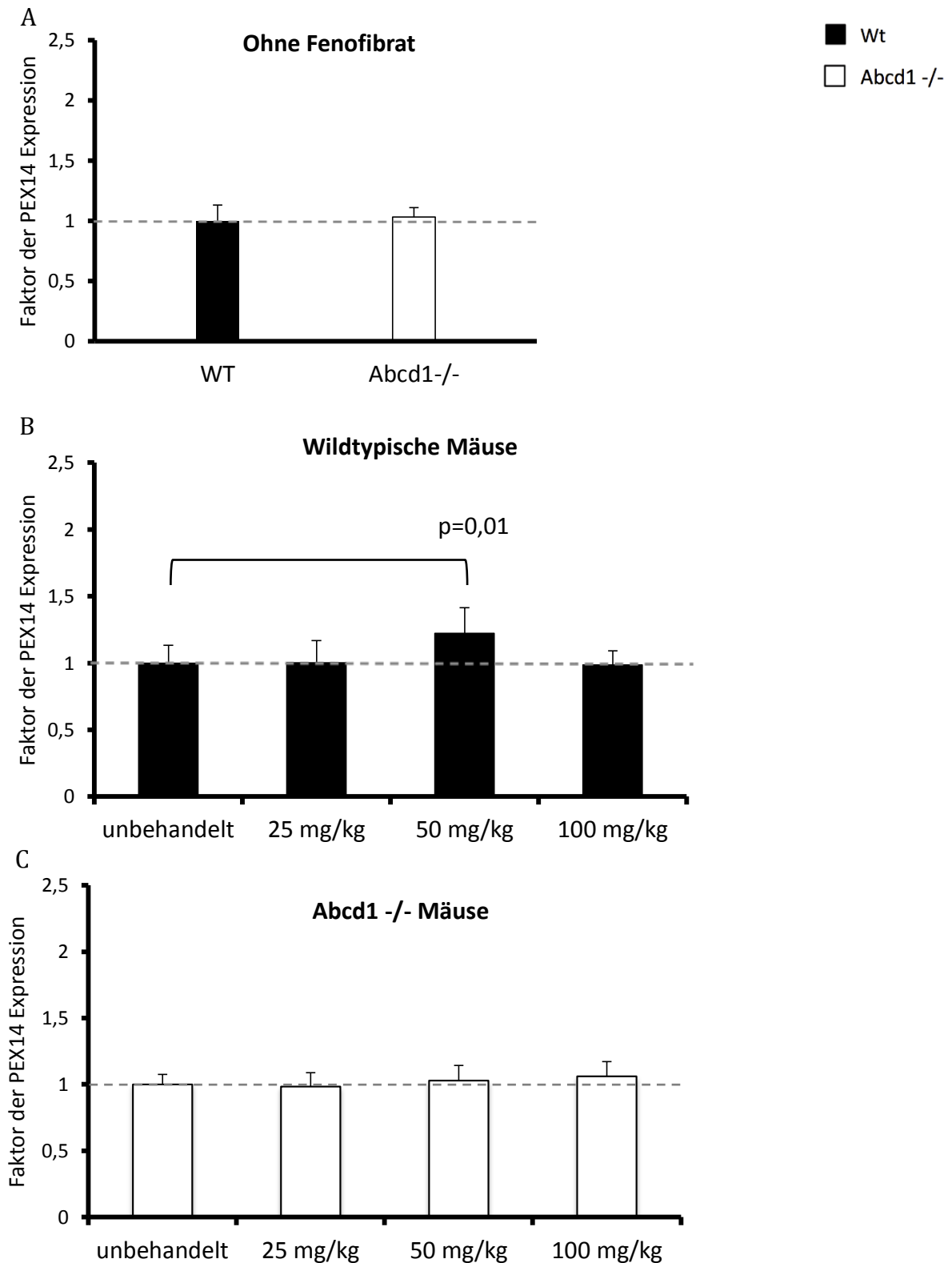
PEX14 ist ein integrales Membranprotein von Peroxisomen. Diesem wird eine essentielle Bedeutung bei der Peroxisomenbiogenese zugeschrieben [Komori et al. 1997]. Es gilt als Rezeptor des PEX5 Proteins, und ist damit wichtig für den Import peroxisomaler Proteine [Gould und Collins 2002].

PEX14 Expression war zwischen unbehandelten wildtypischen und Abcd1<sup>-/-</sup> Mäusen nicht differentiell reguliert (Abb. 10 A). Die behandelten wildtypischen Mäuse zeigten bei 50 mg Fenofibrat pro kg Futter eine signifikant erhöhte Expression ( $p=0,01$ ; Abb. 10 B). Das Gen war im Gehirn der anderen wildtypischen-Gruppen nicht reguliert (Abb. 10 B). In den Abcd1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde die PEX14 Expression nicht durch Fenofibrat reguliert (Abb. 10 C).



**Abb. 9 qRT-PCR Analyse der Expression des PEX11b Gens im Gehirn von Mäusen.**

Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von PEX11b wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** In unbehandelten Tieren zeigten Abcd1-defiziente Tiere minimale Repression von PEX11b im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Wildtypische mit Fenofibrat behandelte Mäuse wiesen keine dosisabhängige Regulation von PEX11b auf. **(C)** Der Expressionsunterschied zwischen der Dosis von 50 und 100 mg/kg Futter ist signifikant. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD  $\pm$  Mittelwert dargestellt. n=3.



**Abb. 10 qRT-PCR Analyse der Expression des PEX14 Gens im Gehirn von Mäusen.**

Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von PEX14 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** In unbehandelten Tieren zeigten Abcd1-defiziente Tiere keine veränderte Expression von PEX14 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Wildtypische mit 50 mg/kg Fenofibrat behandelte Mäuse wiesen eine signifikant ( $p=0,01$ ) erhöhte Expression von PEX14 auf. **(C)** Hingegen zeigten Abcd1<sup>-/-</sup> behandelte Mäuse eine solche Regulation nicht. Hier wurde die Expression von PEX14 nicht durch Fenofibrat reguliert. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD  $\pm$  Mittelwert dargestellt.  $n=3$ .

#### 4.2.2 Enzyme der peroxisomalen $\beta$ -Oxidation

Die Acyl-CoA-Oxidase 1 (ACOX1) ist das erste Enzym der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation. Defekte in diesem Protein führen daher unter anderem, wie Abcd1-Defekte, zu einer Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren [VLCFA; Baarine et al. 2012].

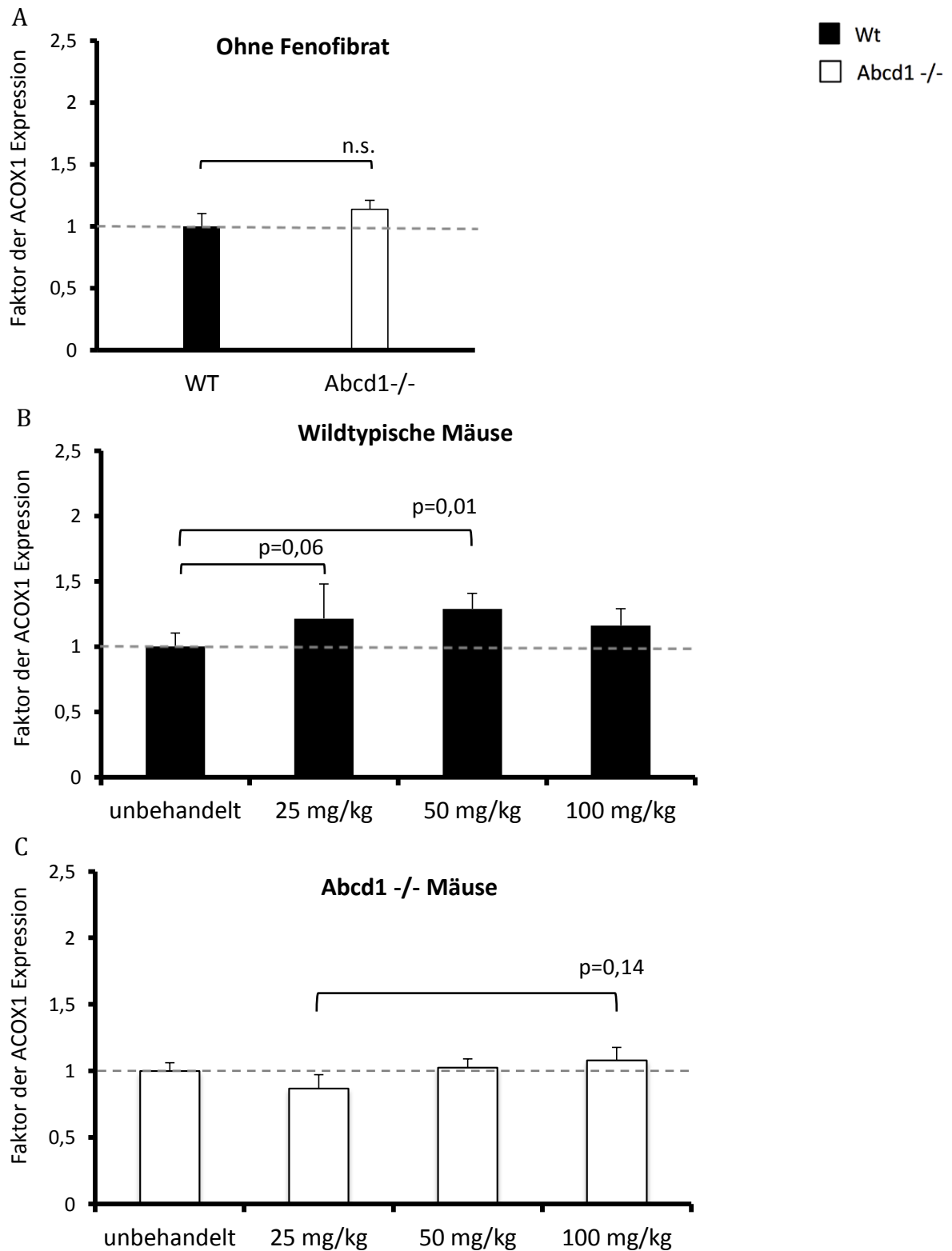
Die Expression von ACOX1 war in unbehandelten Abcd1-/- Mäuse leicht erhöht, aber nicht signifikant ( $p=0,18$ ; Abb. 11 A). Alle behandelten wildtypischen-Gruppen zeigten eine erhöhte Expression von ACOX1. Nur 50 mg Fenofibrat pro Kilogramm Futter sorgten für eine signifikante Erhöhung der ACOX1 Expression ( $p=0,01$ ; Abb. 11 B). In den Abcd1 -/- Tieren hatte die Fenofibratbehandlung geringeren Einfluss. Einzig 25 mg/kg sorgten für eine leichte Repression von ACOX1 (Abb. 11 C).

Die Expression der Acetyl-CoA-Acyltransferase 1 (ACAA1), ebenfalls ein Enzym der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation, wurde durch Behandlung mit PPAR-Agonisten in der Leber von Ratten erhöht [Guo et al. 2007]. Auch die Regulation der Expression von ACAA1 im Großhirn von Mäusen könnte somit als Hinweis auf eine veränderte Peroxisomenbiosynthese oder gesteigerte metabolische Aktivität herangezogen werden. Die quantitative real-time-PCR zeigte, dass die Expression von ACAA1 zwischen den unbehandelten Kontrollgruppen dieses Versuchs nicht unterschiedlich reguliert wurde (Abb. 12 A). Auch bei wildtypischen Mäusen zeigten die Fenofibrat-Behandlungen nur geringe Effekte. Allerdings war auch hier wieder das Phänomen zu beobachten, dass die geringste Fenofibratdosis reprimierend, die höchste leicht aktivierend wirkte, so dass der Expressionsunterschied zwischen diesen beiden Gruppen nah an der Grenze zur Signifikanz lag ( $p=0,06$ ; Abb. 12 B). Bei Abcd1-/- Tieren war bei allen 3 behandelten Gruppen eine niedrigere ACAA1 Expression messbar (Abb. 12 C). 50 mg/kg Fenofibrat senkte die ACAA1 Expression sogar signifikant ( $p=0,04$ ).

Das multifunktionale Protein 2 (MFP2) ist ebenfalls an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt. Huyghe et al. beschrieben 2006, dass das Fehlen von MFP2 in Mäusen neurologische Auffälligkeiten zur Folge hat und besonders Gliazellen beschädigt sind.

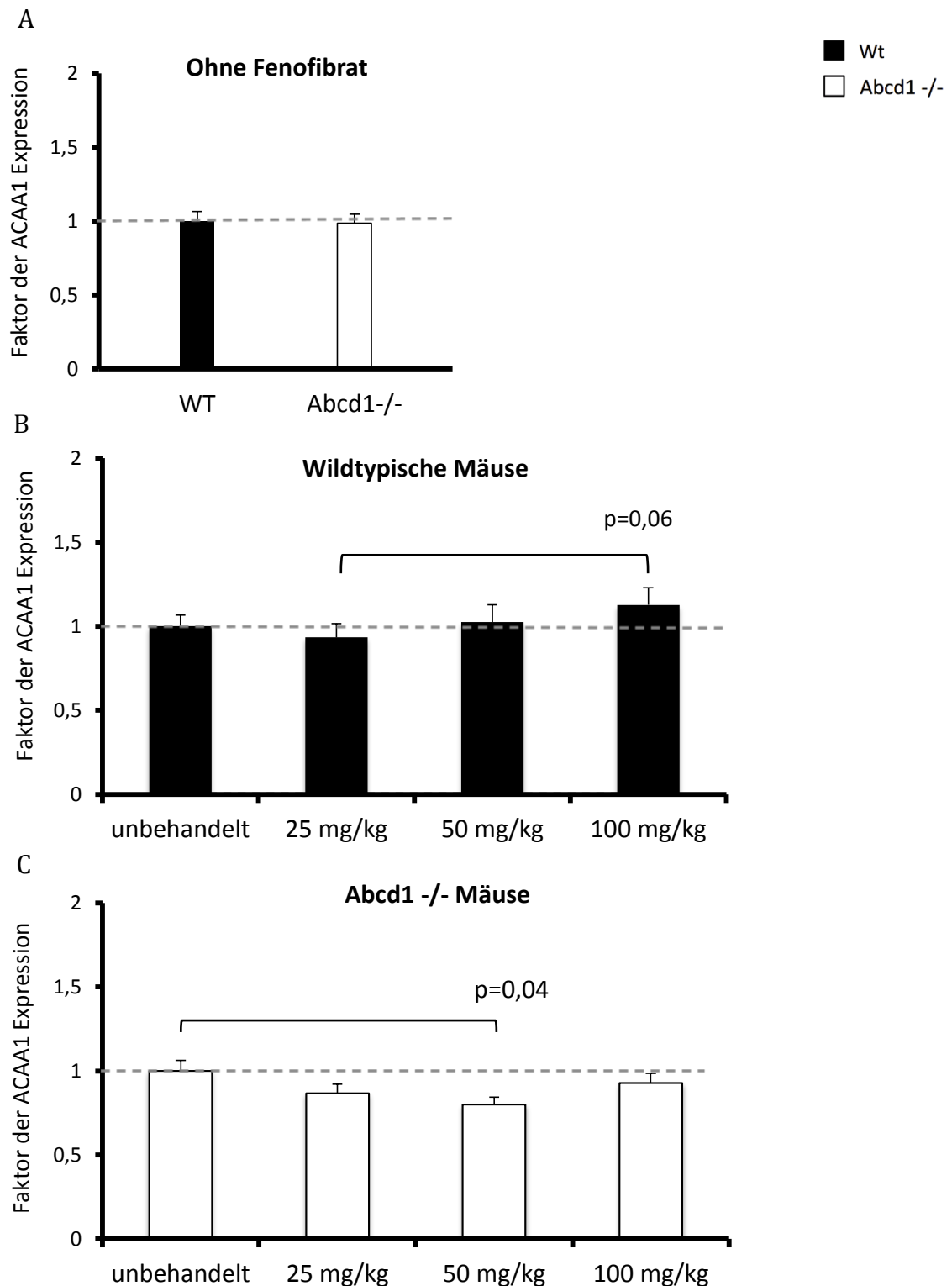
Bei unbehandelten knockout Tieren war die MFP2 Expression im Vergleich zu den wildtypischen Tieren leicht (aber nicht signifikant,  $p=0,17$ ) erhöht (Abb. 13 A). Die Behandlung von wildtypischen Mäusen zeigte bei allen drei Konzentrationen eine leicht

erhöhte Expression von MFP2. Diese war bei der mit 50 mg pro Kilogramm Futter behandelten Tiergruppe um Faktor 1,3 am deutlichsten ( $p=0,08$ ; Abb. 13 B). Die behandelten Abcd1-defizienten Mäuse sprachen erneut anders auf die Fenofibrat-Behandlung an. Bei 25 mg/kg Futter zeigte die Expression von MFP2 sogar eine Tendenz zur Abnahme. Diese war zwar nur gering und nicht signifikant (Abb. 13 C), wurde aber interessanterweise nach Verabreichung dieser Dosis von 25 mg/kg Fenofibrat bei Abcd1<sup>-/-</sup> Mäusen für verschieden Gene beobachtet werden.



**Abb. 11 qRT-PCR Analyse der Expression des ACOX1 Gens im Gehirn von Mäusen.**

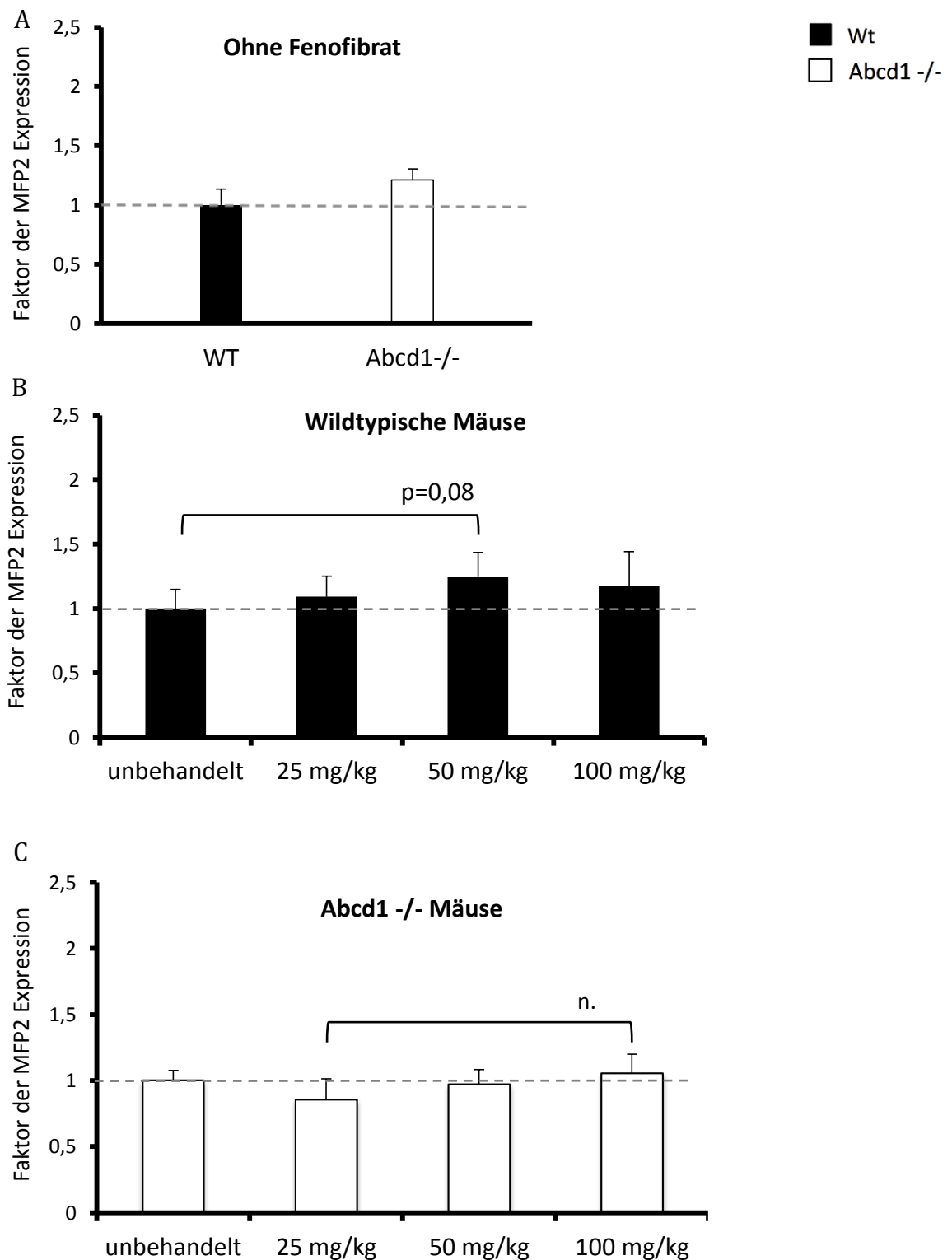
Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von ACOX1 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** Unbehandelte Abcd1-defiziente Tiere zeigten bereits eine leicht erhöhte Expression ( $p=0,18$ ) von ACOX1 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Bei wildtypischen Mäusen wurde die Expression von ACOX1 in allen behandelten Gruppen leicht erhöht. Interessanterweise wiesen die Tiere der mittleren Dosis den höchsten und einzig signifikanten Unterschied zur unbehandelten Gruppe auf. **(C)** Bei Abcd1-defizienten Tieren waren die Expressionsunterschiede nicht signifikant, führten aber zu minimalen Veränderungen: Bei der niedrigsten Dosis zu Reduktion, bei der höchsten Dosis zu einem minimalem Anstieg. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als  $SD \pm$  Mittelwert dargestellt;  $n=3$ .



**Abb. 12 qRT-PCR Analyse der Expression des ACAA1 Gens im Gehirn von Mäusen.**

Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von ACAA1 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** In unbehandelten Tieren zeigten Abcd1-defiziente Tiere keinen Unterschied in der mRNA-Konzentration von ACAA1 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Wildtypische mit 50 und 100 mg/kg Fenofibrat behandelte Mäuse wiesen eine minimal, nicht signifikant erhöhte Expression von ACAA1 auf. Bei 25 mg/kg war die Menge der ACAA1 Expression etwas reduziert. **(C)** Hingegen zeigten behandelte Abcd1<sup>-/-</sup> Mäuse eine geringe Reduktion der ACAA1 mRNA.. 50 mg/kg senkten die Konzentration sogar signifikant (p=0,04). Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD  $\pm$  Mittelwert dargestellt. n=3





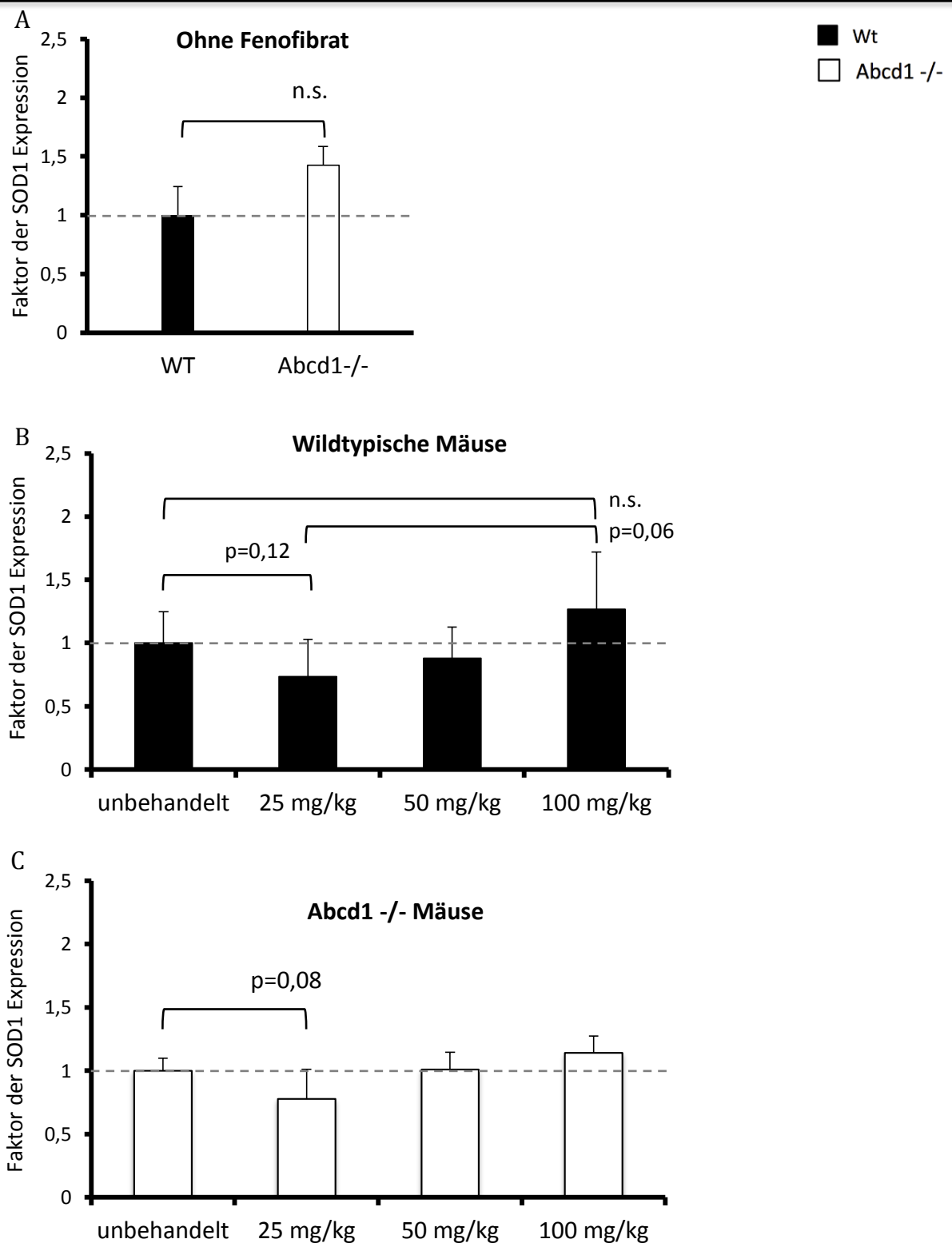
**Abb. 13 qRT-PCR Analyse der Expression des MFP2 Gens im Gehirn von Mäusen.** Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von MFP2 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** In unbehandelten Tieren zeigten Abcd1-defiziente Tiere eine gering höhere Expression ( $p=0,17$ ) von MFP2 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Wildtypische mit Fenofibrat behandelte Mäuse wiesen eine ebenfalls eine minimal erhöhte, aber nicht signifikante ( $p=0,08$ ), Expression von MFP2 auf. **(C)** Obwohl die Unterschiede bei Abcd1<sup>-/-</sup> behandelten Mäuse nicht signifikant waren, wurde wie bei anderen Gene festgestellt, dass bei der Konzentration von 25 mg/kg Fenofibrat eine Reduktion, bei 50 und 100 mg/kg Fenofibrat dieser regulatorische Effekt aufgehoben war. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorier Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als  $SD \pm$  Mittelwert dargestellt.  $n=3$ .

### 4.2.3 Anti-oxidative Enzyme

SOD1 (Superoxid Dismutase 1) ist ein Enzym, welches den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies katalysiert und somit für alle aeroben Zellen wichtig ist, da es dadurch Einfluss auf den oxidativen Stress hat. Forschungsergebnisse zeigen, dass ein Defekt in diesem Enzym zum Krankheitsbild der familiären amyotrophen Lateralsklerose (fALS) führt [Sharp et al. 2005]. Es gibt eine ganze Familie von Superoxid Dismutasen, die sich vor allem durch ihre chemische Zusammensetzung (zentrales Metallion) unterscheiden. SOD1 wird eine bedeutende Rolle beim Schutz vor frühzeitigem Altern der Zelle und Mutationen durch oxidativen Stress zugeschrieben [Borelli et al. 2014]. Außerdem ist SOD1 bereits in Peroxisomen beschrieben worden [Forucade et al. 2008].

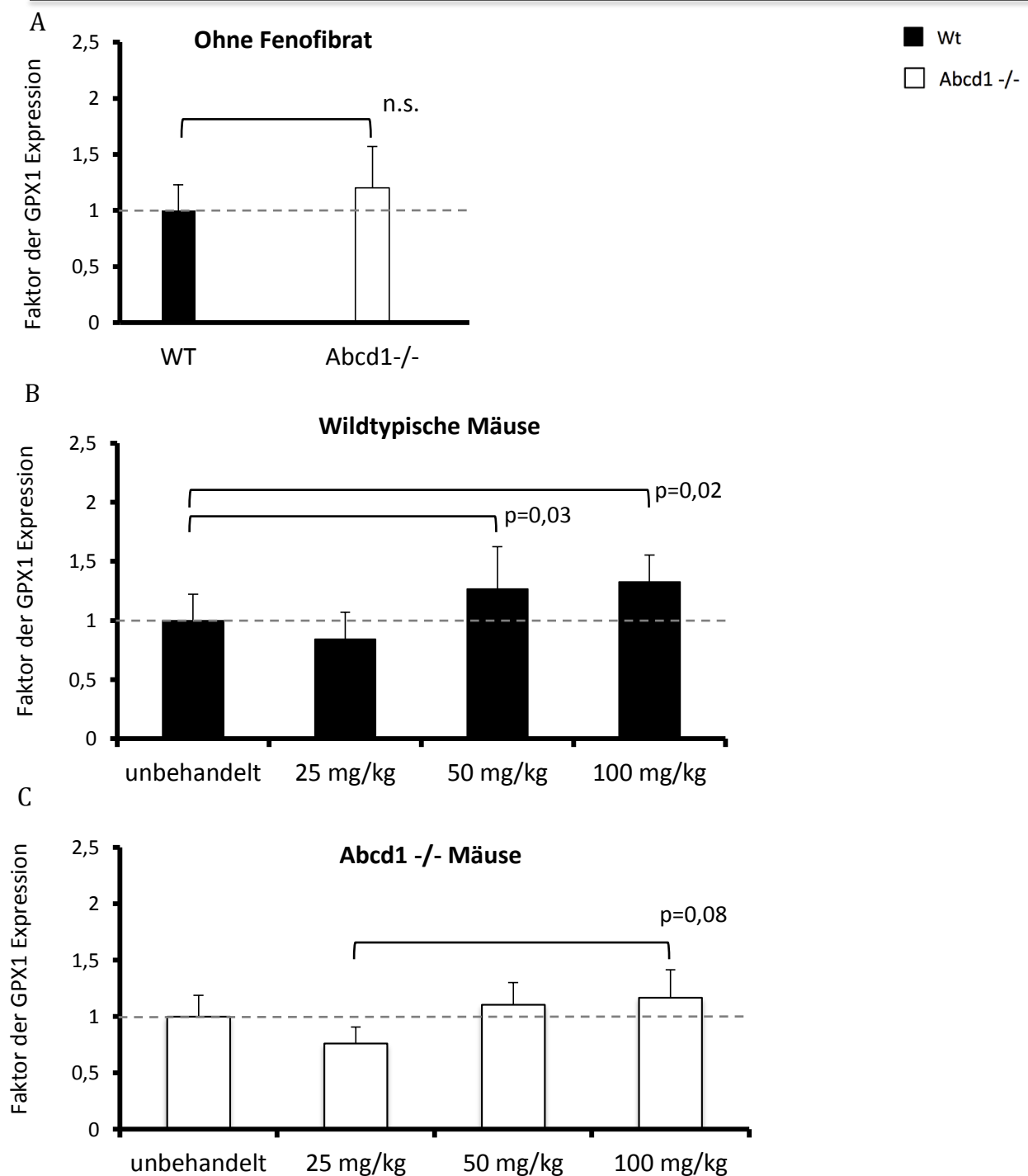
Die Expression von SOD1 der *Abcd1* <sup>-/-</sup> Tiere war im Vergleich zu wildtypischen Tieren gering aber nicht signifikant ( $p=0,17$ ) erhöht (Abb. 14 A). In behandelten wildtypischen Mäusen wurde die SOD1 Expression durch 25 und 50 mg/kg gesenkt, durch 100 mg/kg erhöht (Abb. 14 B). Der Unterschied zwischen diesen Gruppen war allerdings ebenfalls nicht signifikant. Ähnlich wie die Expression von MFP2 wurde auch die Expression von SOD1 durch Behandlung mit 25 mg/kg Fenofibrat in *Abcd1* <sup>-/-</sup> Tieren negativ reguliert (Abb. 14 C).

Die Glutathion Peroxidase 1 (GPX1) gehört zur Familie der Glutathion Peroxidasen. Sie übernimmt ebenfalls eine Entgiftungsfunktion für die Zelle. Sie katalysiert die Wasserstoffübertragung von Glutathion auf Wasserstoffperoxid, welcher dann weiter zu Wasser abgebaut werden kann und senkt somit den oxidativen Stress [Jesse et al. 2012]. Wie SOD1 war auch die Expression von GPX1 im Gehirn unbehandelter *Abcd1* <sup>-/-</sup> Mäuse leicht höher, jedoch nicht signifikant ( $p=0,16$ ; Abb. 15 A). Bei den wildtypischen Tieren führte die Behandlung mit 25 mg Fenofibrat pro kg Futter zu einer leicht gesenkten Expression von GPX1. 50 und 100 mg/kg regulierten GPX1 hingegen positiv ( $p=0,03$  und  $p=0,02$ ; Abb. 15 B). Die Behandlung der *Abcd1* <sup>-/-</sup> Mäuse zeigte bei den drei unterschiedlichen Fenofibratkonzentration im Futter ein vergleichbares Regulationsmuster von GPX1 mit jedoch nicht signifikanten Unterschieden (Abb. 15 C).



**Abb. 14 qRT-PCR Analyse der Expression des SOD1 Gens im Gehirn von Mäusen.**

Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von SOD1 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** Bei den unbehandelten Gruppen zeigten Abcd1-defiziente Tiere bereits eine nicht signifikant erhöhte Expression von SOD1 im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. **(B)** Wildtypische mit Fenofibrat behandelte Mäuse zeigten das Muster einer leichten Reduktion bei 25 mg, und leichte Anstiege bei 100 mg/kg auf das 1,25-fache. **(C)** Die Regulationen bei den behandelten Abcd1<sup>-/-</sup> war ähnlich. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorier Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD  $\pm$  Mittelwert dargestellt. n=3.



**Abb. 15 qRT-PCR Analyse der Expression des GPX1 Gens im Gehirn von Mäusen.**

Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25, 50 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Expression von GPX1 wurde mit aus Hirnlysaten gewonnener cDNA mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** Auch die Expression von GPX1 war im Gehirn Abcd1-defizienter Tiere im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen bereits leicht erhöht ohne Fenofibratbehandlung. **(B)** Wildtypische mit 50 und 100 mg/kg Fenofibrat behandelte Mäuse wiesen signifikant erhöhte Expressionen von GPX1 auf. 25 mg/kg führten erneut zu einer Repression der untersuchten mRNA-Konzentration. **(C)** Behandelte Abcd1<sup>-/-</sup> Tiere zeigten in ähnlicher Weise wie wildtypische Tiere bei der Konzentration von 25 mg/kg Fenofibrat eine Reduktion der GPX1 Expression und erst bei 50 und 100 mg Fenofibrat pro kg Futter einen leichten Anstieg der GPX1 Expression. Die Daten wurden auf gemessene  $\beta$ -Aktin Werte normalisiert und mittels einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD  $\pm$  Mittelwert dargestellt. n=3.

### 4.3 Abundanz peroxisomaler Proteine im Gehirn von Mäusen

Zum Abgleich der Ergebnisse aus der qRT-PCR wurden Western Blots von Hirnlysaten und biochemisch angereicherten Myelinfraktionen der untersuchten Tiere angefertigt. Auf der Ebene der Proteine sollte nun nachgeprüft werden, ob die Veränderung der Expression auch eine veränderte Proteinabundanz zur Folge hatte. Dies ist wichtig, denn Expressionsunterschiede ohne deren Auswirkung auf die Translation in funktionsfähige Proteine würde keinen funktionalen Effekt der Fenofibratbehandlung darstellen.

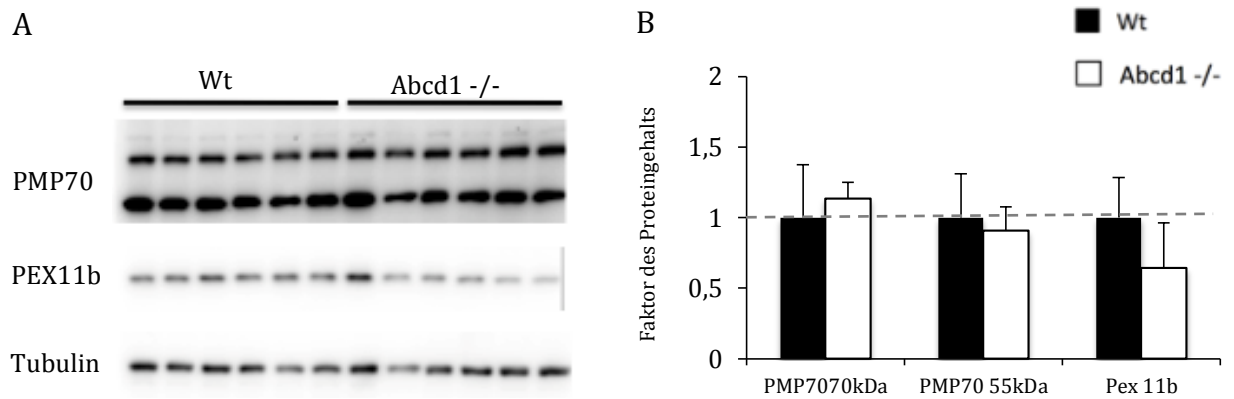
#### 4.3.1 Vergleich unbehandelter Abcd1-defizienter und wildtypischer Mäuse

Die Detektion von PMP70 führte im Western Blot zu zwei Banden unterschiedlicher Größe, nämlich bei etwa 55 kDa und bei 70 kDa. Dieses Phänomen wurde bereits beschrieben, aber konnte bislang nicht erklärt werden [z.B. Albet et al. 1997]. Obwohl im Gehirn die PMP70 mRNA bei knockout Tieren etwa um Faktor 2 abundanter war als bei wildtypischen Tieren, war ein solcher Unterschied auf Proteinebene nicht erkennbar (Abb. 16 A, oben).

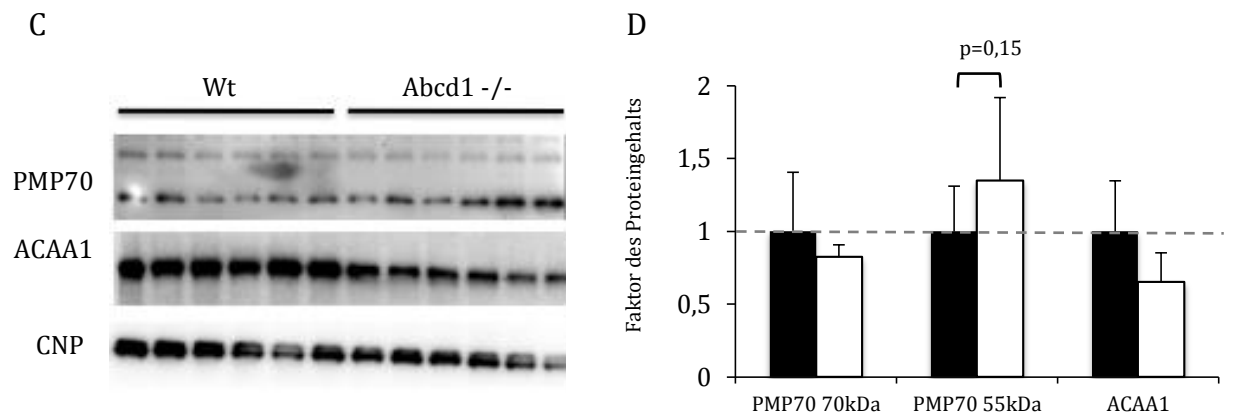
PEX11b hingegen lag als Protein deutlich weniger in Hirnlysaten der Abcd1<sup>-/-</sup> Tiere vor im Vergleich zu wildtypischen Tieren (Abb. 16 A, Mitte), obwohl die qRT-PCR-Ergebnisse nur eine vergleichsweise leicht verringerte Expression von PEX11b nachwies (vgl. Abb. 9 A).

Ebenfalls war die ACAA1-Abundanz im Myelin der unbehandelten Abcd1<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren verringert (Abb. 16 C und D), obgleich die qRT-PCR-Ergebnisse keine veränderte Expression von ACAA1 nachgewiesen hatten (Abb. 12 A).

## Hirnlisat von Mäusen ohne Fenofibrat-Behandlung



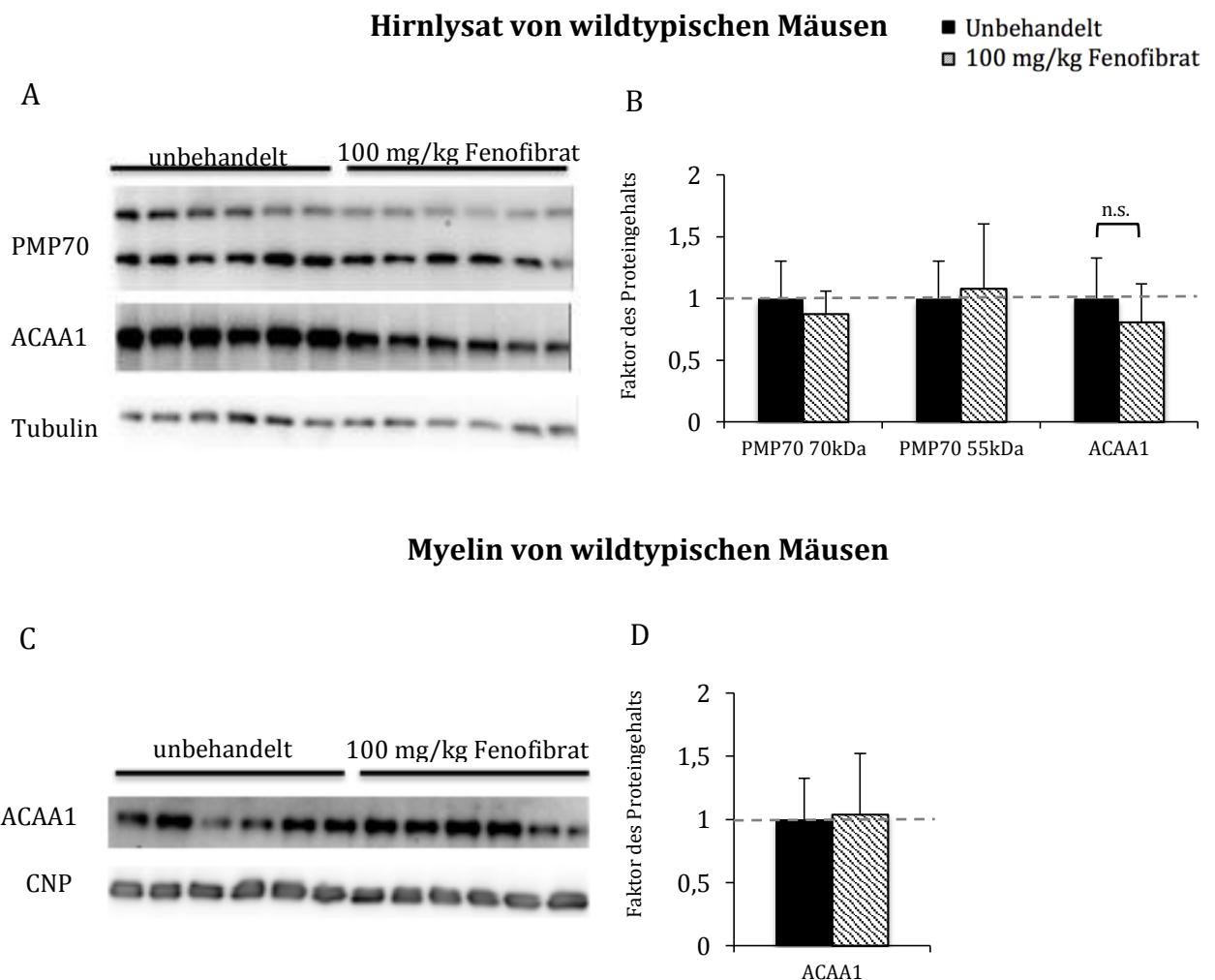
## Myelin von Mäusen ohne Fenofibrat-Behandlung

**Abb. 16 Western Blot-Analyse von Hirnlisaten und Myelin der Mäuse ohne Fenofibrat-Behandlung.**

Abcd1<sup>-/-</sup> und wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit normalem Futter (ohne Fenofibrat) behandelt. Die Proteinkonzentration von PMP70, PEX11b, und ACAA1 wurde in Hirnlisaten und Myelin mittels Western Blot bestimmt. **(A-B)** In unbehandelten Hirnlisaten waren die Abundanz von PMP70 in Abcd1<sup>-/-</sup> Mäusen nicht signifikant erhöht. Die PEX11b-Abundanz war in Abcd1<sup>-/-</sup> Tieren geringer als in wildtypischen Tieren. **(C-D)** Im Myelin war in der 70kDa-Bande PMP70 in Abcd1<sup>-/-</sup> Tieren leicht verringert, in der 55kDa-Bande war es in den Abcd1<sup>-/-</sup> Tieren nicht signifikant erhöht. Die ACAA1-Abundanz war in Abcd1<sup>-/-</sup> Tieren verringert. Die Daten wurden auf gemessene Tubulin- bzw. CNP-Werte normalisiert und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD ± Mittelwert dargestellt. Von jeder Probe wurden nebeneinander zwei technische Replikate geladen und n=3.

## 4.3.3 Effekt der Fenofibratbehandlung auf wildtypische Mäuse

In Hirnlysaten von wildtypischen Mäusen war die PMP70 Proteinmenge auch durch 100 mg/kg Fenofibrat nahezu unverändert (Abb. 17 A, B). Auch hier wurde also auf Proteinebene kein Anstieg detektiert, der aufgrund der erhöhten mRNA Expression möglich wäre (Abb. 8 B). Dies war ebenfalls beim ACAA1 Protein der Fall, dessen Genexpression minimal erhöht war (Abb. 12 B).

**Abb. 17 Western Blot-Analyse von Hirnlysaten und Myelin der wildtypischen Mäuse.**

Wildtypische Mäuse wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentration von 100 mg/kg Futter behandelt. Die Proteinkonzentration von PMP70 und ACAA1 wurde in Hirnlysaten und Myelin mittels Western Blot bestimmt. **(A-B)** Wildtypische behandelte Mäuse hatten im Zelllysat eine ähnliche PMP70-Abundanz, wie die Kontrollen. Die ACAA1-Abundanz wurde durch die Behandlung etwas gesenkt. **(C-D)** Hingegen wurde die ACAA1-Abundanz im Myelin durch Fenofibrat nicht beeinflusst. Die Daten wurden auf gemessene Tubulin- bzw. CNP-Werte normalisiert und mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als  $SD \pm$  Mittelwert dargestellt. Von jeder Probe wurden nebeneinander zwei technische Replikate geladen und  $n=3$ .

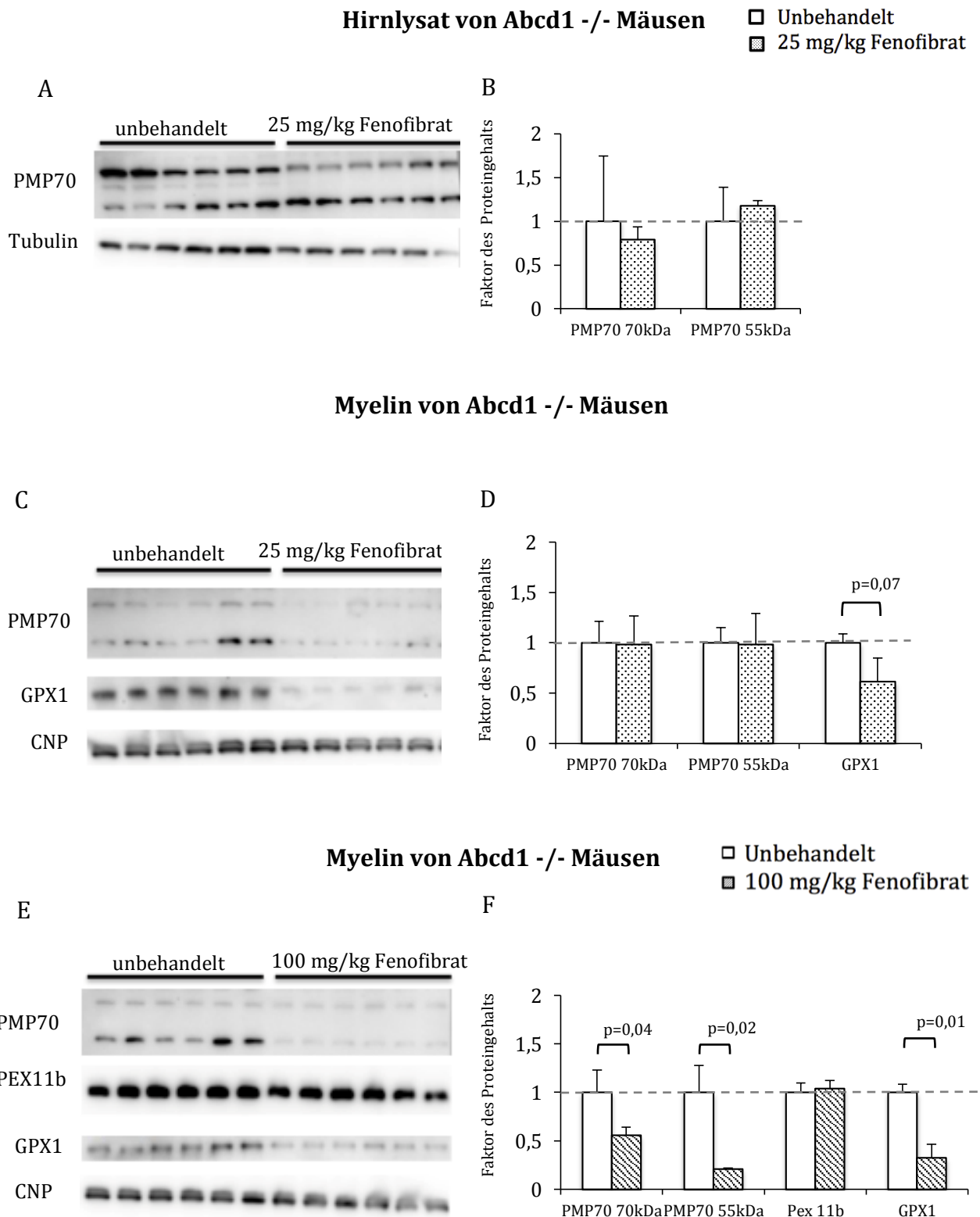
### 4.3.2 Effekt der Fenofibratbehandlung auf Abcd1-defiziente Mäuse

In Hirnlysaten von Abcd1<sup>-/-</sup> Mäusen war die Proteinmenge beider PMP70 Banden zwar nicht signifikant verändert, jedoch waren leichte Unterschiede zu erkennen: Während die größere, 70 kDa-Bande nach Behandlung mit 25 mg/kg Fenofibrat im Futter etwas schwächer war, war die 55 kDa Bande leicht stärker (Abb. 18 A, B).

Nach Behandlung mit nur 25 mg/kg Fenofibrat war die Proteinabundanz von PMP70 in Myelinfraktionen der knockout Tiere unverändert. Dagegen war die GPX1-Bande ähnlich wie bei der höchsten verabreichten Fenofibratdosis schwächer ( $p=0,07$ ), was etwa die Reduktion auf mRNA Ebene widerspiegelte (Abb. 18 C, D).

Nach Behandlung mit 100 mg/kg Fenofibrat waren in angereicherten Myelinfraktionen von knockout Tieren beide PMP70 Banden signifikant schwächer als bei unbehandelten Tieren gleichen Genotyps (Abb. 18 E, F). Erstaunlicherweise waren im Vergleich dazu die Ergebnisse der qRT-PCR von PMP70 erhöht (Abb. 8 C). PEX11b blieb zwischen diesen beiden Gruppen unverändert. Hingegen war auch die GPX1 Proteinbande deutlich schwächer als bei unbehandelten Tieren (Abb. 18 E, F). Genau wie bei PMP70 zeichnete sich also auf Proteinebene ein zur mRNA-Messung gegenteiliger Effekt ab.





**Abb. 18 Western Blot-Analyse von Hirnlysaten und Myelin der *Abcd1* <sup>-/-</sup> Mäuse.**

*Abcd1*<sup>-/-</sup> wurden 30 Tage mit Fenofibrat in Konzentrationen von 25 oder 100 mg/kg Futter behandelt. Die Proteinkonzentration von PMP70, PEX11b, und GPX1 wurde in Hirnlysaten und Myelin mittels Western Blot bestimmt. **(A-B)** Im Hirnlysate war die PMP70-Abundanz durch Fenofibrat (25 mg/kg) erhöht. **(C-D)** Im Myelin hatten 25 mg/kg Fenofibrat keinen Einfluss auf PMP70, die GPX1-Abundanz wurde allerdings nicht signifikant gesenkt. **(E-F)** Im Myelin von *Abcd1*<sup>-/-</sup> Tieren waren die PMP70- und GPX1-Abundanzen signifikant verringert. Die Daten wurden auf gemessene Tubulin- bzw. CNP-Werte normalisiert und mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und sind als SD ± Mittelwert dargestellt. Von jeder Probe wurden nebeneinander zwei technische Replikate geladen und n=3.

## **5. Diskussion**

Die X-chromosomal erbliche Adrenoleukodystrophie (X-ALD) wird durch Mutationen im ABCD1 Gen verursacht [Kassmann et al. 2014]. Während der Funktionsverlust dieses peroxisomalen Membranproteins bei Kindern, eine schwere, schnell progressive, entzündliche Demyelinisierung hervorrufen kann, entwickeln Mäuse lediglich eine vergleichsweise leichte Pathologie ohne zerebrale Neurodegeneration [Lu et al. 1997]. Es gibt Hinweise dafür, dass als zellulärer X-ALD Pathomechanismus eine Sekundärschädigung des Peroxisoms z.B. durch „Altern“ des Organells in Frage kommt. Aus dem Grund ist es von Interesse herauszufinden, ob das Alter von Peroxisomen im Gehirn pharmakologisch reduziert werden, bzw. ob eine Mehrproduktion dieser Organellen im Gehirn erzielt werden kann.

Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind zytoplasmatische Rezeptoren, die nach Bindung ihrer Liganden (oder Agonisten) aktiviert werden und in den Zellkern wandern, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren [Desvergne und Wahli 1999]. Sie erhielten ihren Namen aufgrund der Beobachtung, dass einige dieser Liganden die Proliferation von Peroxisomen in der Leber induzieren [Hess und Staubli 1965]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und welchen Einfluss drei unterschiedliche Konzentrationen des PPAR $\alpha$  Agonisten Fenofibrat nach 30-tägiger oraler Applikation auf die Genexpression und Proteinabundanz peroxisomaler Gene im Gehirn von wildtypischen und Abcd1-knockout Mäusen haben.

### ***Genotypische Unterschiede in der Expression peroxisomaler Gene***

Bei den Analysen wurde unerwartet entdeckt, dass bereits ohne Fenofibratbehandlung Unterschiede in der Expression peroxisomaler Gene im Gehirn zwischen Abcd1-defizienten und wildtypischen Mäusen auftraten. Bei der Mehrzahl der untersuchten Gene (PMP70, ACOX1, MFP2, SOD1 und GPX1) war die Expression in Abcd1-defizienten Mäusen höher als in wildtypischen Mäusen. Obwohl die Unterschiede in den meisten Fällen nicht signifikant waren, könnte diese Beobachtung von Bedeutung sein, und auf einen möglichen kompensatorischen Mechanismus bei knockout-Mäusen hindeuten.

Aus dem Grund wird es interessant sein diese Nebenbeobachtung in Zukunft systematischer und an größeren Tiergruppen zu untersuchen.

### ***Pharmakologische Beeinflussung peroxisomaler Genexpression im Mausgehirn***

Bei Tieren beider Genotypen wurde bei der Mehrzahl der untersuchten peroxisomalen Gene durch Fenofibratbehandlung eine Änderung der Expression beobachtet. Dabei zeigte sich häufig das Muster, dass die geringste Dosis eine negative, und die höchste Dosis eine positive Expressionsdifferenz bewirkte. PMP70, SOD1 und GPX1 zeigten bei wildtypischen und *Abcd1*<sup>-/-</sup> Tieren diesen Effekt. ACAA1 zeigte diesen Effekt bei wildtypischen Tieren, ACOX1 und MFP2 in *Abcd1*-defizienten Tieren.

Ein anderes Regulationsmuster das häufig zu beobachten war, war dadurch charakterisiert, dass die Fenofibratbehandlung entgegengesetzte Effekte auf wildtypische bzw. *Abcd1*-defiziente Tiere hatte. Die PEX11b-Expression war in allen wildtypischen behandelten Tieren verringert, in allen *Abcd1*-defizienten behandelten Tieren erhöht. Ähnlich kontroverse Effekte konnten für MFP2, ACAA1 und ACOX1 festgestellt werden.

Von einigen Genen (PEX14, ACAA1 und MFP2) wurde beobachtet, dass nicht die höchste, sondern die mittlere Fenofibratdosis den stärksten Effekt auf die Expression hatte.

Aufgrund der veränderten Expressionen und Abundanzen der untersuchten Gene nach Fenofibrat-Behandlung kann folglich die Hypothese aufgestellt werden, dass Fenofibrat vermutlich in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, um im Gehirn die Peroxisomenbiosynthese anzuregen. Um diese Hypothese zu stützen, muss in einem nächsten Schritt ausgeschlossen werden, dass nicht die erhöhte Fenofibratkonzentration in angrenzenden Geweben einen indirekten Effekt auf die Peroxisomenbiosynthese im Gehirn ausübt.

### ***Unterschiede in Expression und Abundanz der untersuchten Gene***

Auffällig war, dass nur von einem Gen, nämlich GPX1, die mRNA Menge mit der zugehörigen Proteinmenge zu korrelieren schien. In den anderen Fällen zeigten die qRT-PCR und Western Blot Ergebnisse Diskrepanzen. Obwohl die Expression erhöht wurde, wurden sogar Reduktionen auf Proteinebene gemessen. Die ACAA1-Expression war durch 100 mg/kg Fenofibrat im Hirnlysat von wildtypischen Mäusen deutlich erhöht

( $p=0,06$ ), die Abundanz im Western Blot von Hirnlysaten war allerdings nach gleicher Behandlung verringert (Vgl. Abb. 12 B und 17 B). Es konnte nicht geklärt werden, was die erhöhte Expression der Gene bei geringerem, bzw. gleichbleibendem Proteingehalt der korrespondierenden Proteine bedeutet. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen: Die mittels qRT-PCR gemessenen Expressionsunterschiede waren alle, obwohl teilweise signifikant, relativ klein ( $\leq$  Faktor 2). Die Western Blot Technik ist womöglich nicht sensitiv genug, um solch geringe Unterschiede nachzuweisen [Yang und Hongbao 2009]. Weiterhin kommt in Frage, dass zwar mehr der entsprechenden Proteine biosynthetisiert wurden, aber evtl. auch schneller abgebaut wurden, und so nicht auch Netto zur Vermehrung derselben Proteine führte. Und schließlich ist es möglich, dass das Mehr an mRNA nicht auch in Protein translatiert wird. Diese Frage zu beantworten, wird nötig sein, um zu bewerten, ob die Fenofibrat-Behandlung als (zumindest Teil-) Erfolg gewertet werden kann. Denn die erhöhte Expression bei gleichbleibendem Proteinlevel könnte als Hinweis auf einen erhöhten Umsatz von Peroxisomen oder auf einen erhöhten Umsatz peroxisomaler Proteine interpretiert werden. Dadurch könnte der vermutete Sekundärschaden von Peroxisomen bei ABCD1-Defizienz möglicherweise tatsächlich reduziert werden.

Insgesamt legen die Western Blot und qRT-PCR Daten außerdem nahe, dass möglicherweise verschiedene peroxisomale Populationen bei unterschiedlicher Ligandendosis induziert wurden, oder möglicherweise auch unterschiedliche Zelltypen oder Hirnregionen des Gehirns ganz unterschiedlich auf die verschiedenen Dosen reagierten. Dass Peroxisomen des Gehirns nicht nur zwischen verschiedenen Zelltypen unterschiedlich in der Zusammensetzung sein können, wurde vor kurzem in einem Artikel zusammengefasst [Kassmann 2014]. Deswegen wird es in Zukunft nötig sein, genauer aufzuschlüsseln, welche Zelltypen und Hirnregionen des Gehirns in welcher Weise auf den Liganden reagieren. Das könnte durch ähnliche wie hier vorgestellte *in vivo* Analysen erreicht werden mittels Nutzung transgener Mäuse, deren Peroxisomen zelltypspezifisch markiert sind [vgl. Richert et al., 2014]. Auch weitere Zellkulturanalysen werden helfen zu verstehen, welche Zelltypen wie auf die Behandlung mit dem Liganden Fenofibrat reagieren [Grey et al. 2011, Iwayanagi et al. 2011].

### ***Unterschiede der Fenofibrat-Wirkung auf peroxisomale Proteine in Großhirn und Myelin***

Die Auswertung der Western Blots zeigte, dass Myelin und Großhirn Unterschiede nach Fenofibrat-Behandlung aufwiesen. Bei unbehandelten Mäusen war im Hirnlysat die PMP70-Abundanz der 70 kDa-Bande von Abcd1-defizienten Mäusen erhöht, die Stärke der 55 kDa-Bande im Vergleich zu wildtypischen Tieren niedriger. Im Myelin war es umgekehrt. Hier war die PMP70-Abundanz der 70 kDa-Bande niedriger, die der 55 kDa-Bande höher. Nach Behandlung mit 25 mg/kg Fenofibrat war die 70 kDa-Bande im Hirnlysat von Abcd1-defizienten Mäusen reduziert, die 55 kDa-Bande dagegen etwas stärker. Im Myelin konnte nach gleicher Behandlung keine veränderte Abundanz von PMP70 festgestellt werden. Was dieser Unterschied der PMP70 Banden für den peroxisomalen Metabolismus bedeutet, ist leider unbekannt, da die beiden im Western Blot detektierten PMP70 „Isoformen“ bislang nicht mit unterschiedlicher Funktion in Zusammenhang gebracht wurden. Auch, ob es sich bei der 55 kDa Bande überhaupt um eine zweite funktionale Isoform des Proteins handelt, oder ob sie lediglich ein Abbauprodukt darstellt, ist bisher nicht geklärt.

Auch für ACAA1 wurde ein Unterschied zwischen dem gesamten Lysat des Großhirns und der Myelinfraktion daraus detektiert: Nach 100 mg/kg Fenofibratbehandlung war ACAA1 in wildtypischen Hirnlysaten reduziert, jedoch nicht im Myelin.

Es lässt sich also feststellen, dass die Fenofibrat-Behandlung nicht in allen Hirnregionen die selbe Wirkung hat. Die oben bereits erwähnte Hypothese der zelltypspezifischen Wirkung wird hierdurch weiter gestützt.

### ***Erkenntnisse für die Therapie der X-ALD***

Es wurde gezeigt, dass die gleiche Konzentration des PPAR-Liganden Fenofibrat teilweise entgegengesetzte Wirkung auf wildtypische bzw. auf Abcd1-defiziente Mäuse im Gehirn hatte. Zum Beispiel erhöhten schon 25 mg/kg Fenofibrat die Expression von ACOX1 und MFP2 im Gehirn von wildtypischen Tieren. Bei gleicher Behandlung von Abcd1-defizienten Tieren wurde die Expression dagegen verringert. Die mittlere Konzentration von 50 mg/kg Fenofibrat erhöhte die Expression von PMP70 und MFP2 in wildtypischen Tieren, senkte aber die Expression in Abcd1-defizienten Tieren. 100

mg/kg Fenofibrat erhöhte die Expression von PEX11b und ACAA1 in wildtypischen Mäusen, senkte sie aber in Abcd1-defizienten Tieren.

Diese Beobachtungen haben weitreichende Konsequenzen für einen möglichen Therapieansatz. Es wird festgehalten, dass die Ergebnisse keinem einfachen Dosis-Antwort-Prinzip (engl. „dose-response“) entsprechen und die Regulation peroxisomaler Gene im Gehirn durch Fenofibrat (möglicherweise auch durch andere PPAR-Agonisten) klare genotypische Spezifitäten zeigen. Falls diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, kann eine bestimmte Dosis des Liganden bei gesunden Menschen zu erhöhtem Expressionsprofil peroxisomaler Gene führen, bei X-ALD Patienten aber möglicherweise sogar das Gegenteil bewirken. Genotypisch-spezifischen Unterschiede nach Fenofibrat-Behandlung haben auch schon Fourcade et al. für die Lebergewebe von behandelten Mäusen beschrieben [Fourcade et al. 2001].

### ***Regulation peroxisomaler Gene im Gehirn von Mäusen nach Fenofibratbehandlung - Die Ergebnisse im Kontext zu früher publizierten Daten***

Albet et al. zeigten schon 1997, dass durch Fenofibrat die PMP70- und Abcd2-Expression in Leber und Eingeweiden von Ratten erhöht werden konnte, während die Abcd1-Expression unverändert war [Albet et al. 1997]. Netik et al. konnten 1999 zeigen, dass durch einwöchige Fenofibrat-Behandlung die PMP70- und Abcd2-Expression in der Leber von ABCD1-defizienten Mäusen erhöht werden konnte [Netik et al. 1999]. Berger et al. zeigten ebenfalls, dass durch zweiwöchige Fenofibrat-Behandlung die PMP70-, ACOX- und Abcd2-Expression in Leber und Eingeweide von ABCD1-defizienten Mäusen erhöht war. Es wurde auch das Großhirn untersucht, allerdings konnte dort keine veränderte Expression nach Fenofibrat-Behandlung festgestellt werden. Sie verwendeten allerdings höhere Fenofibrat-Konzentrationen (bis zu 3 g/kg Futter) [Berger et al. 1999]. Pujol et al. publizierten, dass die Expression von Abcd2 durch Stimulation von PPAR $\alpha$ -Rezeptoren (nicht mit Fenofibrat) in vitro unverändert blieb, was von Fourcade et al. wenige Zeit später bestätigt wurde, in dem sie zeigten, dass die Abcd2-Expression im Gehirn von Mäusen nicht PPAR $\alpha$ -abhängig war [Pujol et al. 2000; Fourcade et al. 2001]. Fourcade et al. publizierten, dass keine Regulation von ACOX und PMP70 im Gehirn beobachtet werden konnte. Sie behandelten die Tiere allerdings mit höheren Fenofibrat-Konzentrationen (etwa 2 mg/Tag, in dieser Arbeit bis zu 0,5 mg/Tag) und analysierten die Gewebe mittels Northern-Blot-Methode. Diesen Analysen

lag die Hypothese zu Grunde, dass eine erhöhte Abcd2-Expression sinnvoll wäre, da dieser Transporter teilweise überlappende Funktionen mit Abcd1 habe. Die teilweise deutlich höheren Konzentrationen an Fenofibrat lassen Vergleiche mit den Ergebnissen der genannten Arbeiten nur bedingt zu, da Fenofibrat in unterschiedlicher Dosierung auch unterschiedliche Wirkungen auf die Gewebe zu haben scheint (siehe vorheriger Abschnitt).

Diese vor gut 15 Jahren publizierten Ergebnisse gaben Anlass dazu die Wirkung von Fenofibrat auf Abcd1-defiziente Mäuse über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Im Vergleich zu Netik et al. wurde die Behandlungszeit auf 30 Tage vervierfacht, im Vergleich zu Berger et al. verdoppelt. Die aufgeführten publizierten Ergebnisse früherer *in vivo* Versuche mit Fenofibrat an Mäusen berichten nicht von einer ähnlichen, wie hier festgestellten transaktivierenden Wirkung auf peroxisomale Gene. Als mögliche Begründung für diese Diskrepanz kommen verschiedene Faktoren in Frage: Trotz teilweise ähnlicher Fenofibratkonzentrationen im Futter, ist die Art und Weise der Futteranmischung von Albet et al., Berger et al. und Rampler et al. kritisch zu sehen. Hier wurde Fenofibrat in einer Acetonlösung auf das Futter gesprüht/ingelegt. Eine gleichmäßige Aufnahme des Wirkstoffs ist daher in Frage zu stellen [Albet et al. 1997; Berger et al. 1999;; Rampler et al. 2003]. Neuere Methoden, wie die hier verwendete Bedampfung mit Fenofibrat und anschließende (Kalt-)Pressung des Futters, sorgen für eine gleichmäßigere Aufnahme in das Futter. Hier wird verhindert, dass sich Fenofibrat nur der Oberfläche auflagert.

Bislang gab es also keine Publikation, die einen *in vivo*-Effekt von Fenofibrat auf Zellen des Zentralnervensystems an gesunden Mäusen (mit intakter Blut-Hirn-Schranke) zeigte. Allerdings legen einige *in vitro* Analysen nahe, dass Fenofibrat und andere PPAR-Liganden die PMP70-Expression in Neuronen erhöhen kann und sogar neuroprotektive Wirkung zeigen [Gray et al. 2011; Gray et al., 2012; Mysiorek et al. 2009; Rolland et al. 2012]. Es wurde auch vermutet, dass die Peroxisomenzahl in diesen Zellen erhöht wurde. Für diese Aussage wurde allerdings ein Rückschluss von der erhöhten enzymatischen Aktivität der Katalase gezogen [Gray et al. 2011]. Dies ist kritisch zu sehen, denn Katalase ist nicht besonders effektiv um Aussagen über die Peroxisomen-Abundanz zu machen [Goth und Nagy 2013]. Katalase kommt nicht nur in Peroxisomen vor, sondern ist auch im Zytoplasma enthalten [Mahmoudi et al. 2013]. Eine erhöhte Expression muss somit nicht unbedingt eine erhöhte Peroxisomenanzahl bedeuten.

Im Gegensatz zu den genannten Publikationen wurden in dieser Arbeit wildtypische und Abcd1-defiziente Mäuse mit Fenofibrat in drei verschiedenen Konzentrationen behandelt. Dies hat zu der erstmaligen Beobachtung geführt, dass unterschiedliche Konzentrationen von Fenofibrat teils entgegengesetzte Wirkungen auf das Großhirn von behandelten Mäusen hatten. Weiterhin wurden hier mit der Expressionsanalyse von PMP70, PEX11b, PEX14, ACAA1, ACOX, MFP2, SOD1 und GPX1 tatsächlich Anhaltspunkte für eine erhöhte Peroxisomenbiogenese im Gehirn entdeckt. Intention dieser Arbeit war es zu erforschen, ob der PPAR $\alpha$ -Agonist Fenofibrat sich für eine mehrwöchige Tierbehandlung eignet, ob seine beschriebenen Effekte in Zellkultur und in der Leber bei *in vivo*-Versuchen, ebenso *in vivo* im Großhirn induzierbar sind.

Bei den hier vorgestellten Experimenten handelte es sich um einen Machbarkeits-Nachweis (engl. „proof of principle“), die peroxisomale Genexpression im Gehirn von Mäusen pharmakologisch anzuregen. In dem Zusammenhang ist zu bemerken, dass eventuell schon ein nur leicht angeregter „Turnover“ der Organellen ausreicht, um einen möglichen sekundären Funktionsverlust des Peroxisoms zu verhindern. Dass die gezeigten Ergebnisse in vielen Fällen nur nicht-signifikante Unterschiede zeigten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass innerhalb der Tiergruppen große Varianzen auftraten.

### ***Verträglichkeit des PPAR $\alpha$ Agonisten Fenofibrat durch Mäuse***

Das mit Fenofibrat versetzte Futter wurde in vergleichbaren Mengen von den Tieren gefressen, wie das reguläre Futter, was anhand des gleichen Futterbedarfs der Tiergruppen über den Zeitraum von 30 Tagen ersichtlich war. Zudem schienen die gewählten Fenofibratkonzentrationen während der 30-tägigen Behandlungsphase keine pathologischen Nebenwirkungen zu erzeugen, die mit einer abnormen Gewichtsveränderung oder mit verändertem motorischem Vermögen einhergehen. Der hier gewählte Behandlungszeitraum von 30 Tagen ab dem 60. Lebensstag war zu früh, um mögliche Therapieerfolge anhand der Motorik messen zu können, da ABCD1-defiziente Tiere erst viel später eine motorisch detektierbare Pathologie aufweisen [Pujol et al. 2002]. Die Tests dienten lediglich dazu frühzeitig mögliche toxische Nebenwirkungen der Behandlung aufdecken zu können. Eine weitere interessante Nebenbeobachtung aus dem Vergleich der unbehandelten Tiergruppen stellt das etwa



10% höhere Körpergewicht der Abcd1-defizienten Mäuse dar, welches bislang noch nicht beschrieben wurde, hier aber auch nicht näher erörtert werden konnte.

Die präsentierten Ergebnisse geben Anlass zur weiteren Untersuchung des Einflusses von PPAR-Agonisten auf die Peroxisomenbiosynthese im Gehirn. Es müssen auch pathologische Effekte, wie der Anstieg des oxidativen Stresses oder mögliche Schädigungen der Leber durch Überdosierung genauer untersucht werden. Es gibt Grund zu der Annahme, dass die Schwere des Krankheitsverlaufs der X-ALD nicht allein genetisch determiniert, sondern durch Umweltfaktoren modulierbar ist. Diese Annahme ist darauf zurückzuführen, dass der Krankheitsverlauf der X-ALD innerhalb einer Familie, ja sogar zwischen eineiigen Zwillingen, stark variiert [di Rocco et al. 2001]. Es wurde gezeigt, dass auch in der normalen Nahrung enthaltene Substanzen als PPAR-Liganden fungieren können [Grygiel-Gorniak 2014]. Diese natürlichen PPAR-Liganden in der Nahrung kommen durchaus als die gesuchten krankheitsmodifizierenden Umweltfaktoren in Frage.

Sollten durch Fenofibratbehandlung tatsächlich Peroxisomen neu synthetisiert werden, müsste überprüft werden, ob so auch die vermutete Sekundärschädigung der Peroxisomen vermieden werden und eine Reduktion der Pathologie erreicht werden kann. Dies wäre ein großer Schritt auf dem Weg zu einer Therapie der X-ALD.

### **6. Zusammenfassung**

Die X-chromosomal erbliche Adrenoleukodystrophie ist eine peroxisomale Stoffwechselkrankheit, die auf den Funktionsverlust des peroxisomalen Transmembrantransporters Abcd1 zurückzuführen ist. Es werden die häufigen Verlaufsformen der infantilen zerebralen Adrenoleukodystrophie (cALD) und der Adrenomyeloneuropathie (AMN) unterschieden. Während die AMN sich meist erst zwischen dem zwanzigsten und dreißigsten Lebensjahr manifestiert, tritt die cALD schon in den ersten Lebensjahren auf und verläuft letal. Durch Funktionsverlust des Transmembrantransporters kommt es zur Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren und zu einer inflammatorischen Demyelinisierung im Nervensystem. Mäuse, bei denen das Abcd1-Gen ausgeschaltet wurde, zeigen lediglich einen AMN-ähnlichen Phänotyp, Mäuse mit komplettem Funktionsverlust der Peroxisomen in myelinisierenden Zellen dagegen eine inflammatorische Demyelinisierung. Daher wird als Auslöser der zerebralen Degeneration ein sekundärer, umfangreicher Funktionsverlust der Peroxisomen als Folge von Abcd1-Defizienz vermutet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Abcd1<sup>-/-</sup> Mäuse 30 Tage lang mit 3 verschiedenen Konzentrationen des PPAR $\alpha$ -Agonisten Fenofibrat behandelt. Ziel war es, die Verträglichkeit des Wirkstoffs in einer Langzeitstudie und die Auswirkungen von Fenofibrat auf peroxisomale Proteine im Gehirn zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass durch Behandlung mit Fenofibrat die Expression von peroxisomalen Membranproteinen, von Enzymen der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation, sowie von anti-oxidativen peroxisomalen Enzymen im Gehirn der Maus moduliert werden können. Auffällig war, dass die niedrigste verabreichte Dosis des Wirkstoffs oft die Konzentration der untersuchten Proteine senkte, eine höhere Konzentration aber den entgegengesetzten Effekt hatte. Außerdem hat sich die Substanz im Behandlungszeitraum von 30 Tagen weder anhand motorischer Tests, noch durch Gewichtsverlust für die Mäuse als toxisch herausgestellt.

Ob die Effekte auf die direkte Wirkung von Fenofibrat, oder indirekt durch Botenstoffe aus dem peripheren Gewebe zurückzuführen ist, wurde nicht untersucht. Die präsentierten Ergebnisse geben Anlass, die Wirkung von Fenofibrat im Hinblick auf die Therapie von Leukodystrophien weiter zu untersuchen.

## **7. Literaturverzeichnis**

Albertini M, Rehling P, Erdmann P, Girzalsky W, Kiel JA, Veenhuis M, Kunau WH (1997): Pex 14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS dependent import pathways. *Cell* 89(1):83-92.

Albet S, Causeret C, Bentejac M, Mandel JL, Aubourg P, Maurice B (1997): Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP-binding transporter proteins of the peroxisomal membrane. *FEBS Lett.* 1997 Apr 1;405(3):394-7.

Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA (1995): Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem.* 270(5):2367-71.

Appikatla S1, Bessert D, Lee I, Hüttemann M, Mullins C, Somayajulu-Nitu M, Yao F, Skoff RP (2014): Insertion of proteolipid protein into oligodendrocyte mitochondria regulates extracellular pH and adenosine triphosphate. *Glia.* 2014 Mar;62(3):356-73. doi: 10.1002/glia.22591. Epub 2013 Dec 31.

Armati PJ1, Mathey EK. (2014): Clinical implications of Schwann cell biology. *J Peripher Nerv Syst.* 2014 Feb 6. doi: 10.1111/jns5.12057. [Epub ahead of print]

Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Lizard G (2012): Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of Abcd1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience.* 213:1-18. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.058. Epub 2012 Apr 19.

Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006): PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116(3):590-7.

Bernardo A, Minghetti L (2008): Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma Natural and Synthetic Agonists. *PPAR Res.* 864140. doi: 10.1155/2008/864140.

Bodnar AG, Rachubinski RA (1991): Characterization of the integral membrane polypeptides of rat liver peroxisomes isolated from untreated and clofibrate-treated rats. *Biochem Cell Biol.* 69(8):499-508.

Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Deplanque D, Duriez P, Staels B, Fruchart JC, Bastide M (2006): PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 6):1341-6.

Borrelli A, Schiattarella A, Patrizia Bonelli, Franca Maria Tuccillo, Franco Maria Buonaguro, and Aldo Mancini (2014): The Functional Role of MnSOD as a Biomarker of Human Diseases and Therapeutic Potential of a New Isoform of a Human Recombinant MnSOD. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 476789.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 137(1):354-66.

Cimini A, Cristiano L, Bernado A, Fariolo-Vecchioli S, Stefanini S, Ceru MP (2000): Presence and inducibility of peroxisomes in a human glioblastoma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474 (2000) 397-409.

Chen F, Law SW, O'Malley BW (1993): Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochem Biophys Res Commun.* 196(2):671-7.

Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiernemann C, Fantozzi R (2006): Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 530(1-2):70-80. Epub 2005 Dec 28.

Colton HM, Falls JG, Ni H, Kwanyuen P, Creech D, McNeil E, Casey WM, Hamilton G, Cariello NF (2004): Visualization and quantitation of peroxisomes using fluorescent nanocrystals: treatment of rats and monkeys with fibrates and detection in the liver. *Toxicol Sci.* 80(1):183-92. Epub 2004 Apr 14.

De Duve C, Baudhuin P (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 46(2):323-57.

Delerive P, Fruchart J-C, Staels B (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 2001 Jun;169(3):453-9.

Delille HK, Agricola B, Guimaraes SC, Borta H, Lüers GH, Fransen M, Schrader M. (2010): Pex11 $\beta$ -mediated growth and division of mammalian peroxisomes follows a maturation pathway. *J Cell Sci.* 123(Pt 16):2750-62. Epub 2010 Jul 20.

Desvergne B und Wahli W(1999): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr Rev.* 20(5):649-88.

Di Rocco M, Doria-Lamba L, Caruso U (2001): Monozygotic twins with X-linked adrenoleukodystrophy and different phenotypes. *Ann Neurol.* 2001 Sep;50(3):424.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992): Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 68(5):879-87.

Elgersma Y, Tabak HF (1996): Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning. *Biochim Biophys Acta.* 1286(3):269-83.

Escher P and Wahli W(2000): Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions, *Mutat Res.* 448(2):121-38.

Fang Y, Morrell JC, Jones JM, Gould SJ (2004): PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins.

J Cell Biol. 164(6):863-75. Epub 2004 Mar 8.

Frankenhauser B, Schneider D (1951): Some electrophysiological observations in isolated single myelinated nerve fibres (saltatory conduction). J Physiol. 115(2):177-84.

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. 1997 Dec 1;50(5):829-43.

Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroya F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Pujol A (2008): Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. Hum Mol Genet. 2008 Jun 15;17(12):1762-73. doi: 10.1093/hmg/ddn085. Epub 2008 Mar 14.

Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB (1982): Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. J Cell Biol. 93(1):103-10.

Gelosa P, Banfi C, Gianella A, Brioschi M, Pignieri A, Nobili E, Castiglioni L, Cimino M, Tremoli E, Sironi L (2010): Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonism prevents renal damage and the oxidative stress and inflammatory processes affecting the brains of stroke-prone rats. J Pharmacol Exp Ther. 335(2):324-31. Epub 2010 Jul 29.

Gervois P, Torra IP, Chinetti G, Grötzinger T, Dubois G, Fruchart JC, Fruchart-Najib J, Leitersdorf E, Staels B (1999): A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  splice variant with dominant negative activity. Mol Endocrinol. 13(9):1535-49.

Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y, Fujiki Y (2000): The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. Mol Biol Cell. 11(6):2085-102.

Glass CK (1994): Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. Endocr Rev. 15(3):391-407.

Goth L, Naghy T (2013): Inherited catalase deficiency: is it benign or a factor in various age related disorders? *Mutat Res.* 2013 Oct-Dec;753(2):147-54. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.08.002. Epub 2013 Sep 8.

Gould SJ, Collins CS (2002): Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):382-9.

Gould SJ, Keller GA, Subramani S (1988): Identification of peroxisomal targeting located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol.* 107(3):897-905.

Gray E, Ginty M, Kemp K, Scolding N, Wilkins A (2011): Peroxisome proliferatoractivated receptor- $\alpha$  agonists protect cortical neurons from inflammatory mediators and improve peroxisomal function. *Eur J Neurosci.* 33(8):1421-32. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07637.x. Epub 2011 Mar 7.

Gray E, Ginty M, Kemp K, Scolding N, Wilkins A (2011): The PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone protects cortical neurons from inflammatory mediators via improvement in peroxisomal function. *J Neuroinflammation.* 2012 Apr 5;9:63. doi: 10.1186/1742-2094-9-63.

Grygiel-Górniak B (2014): Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. *Nutr J.* 2014 Feb 14;13(1):17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17.

Guo Y, Jolly RA, Halstead BW, Baker TK, Stutz JP, Huffman M, Calley JN, West A, Gao H, Searfoss GH, Li S, Irizarry AR, Qian HR, Stevens JL, Ryan TP (2007): Underlying mechanisms of pharmacology and toxicity of a novel PPAR agonist revealed using rodent and canine hepatocytes. *Toxicol Sci.* 96(2):294-309. Epub 2007 Jan 25.

Hartl FU, Just WW (1987): Integral membrane polypeptides of rat liver peroxisomes: topology and response to different metabolic states. *Arch Biochem Biophys.* 255(1):109-19.

- Hashimoto T, Kuwabara T, Usuda N, Nagata, T (1986): Purification of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes. *J Biochem.* 100(2):301-10.
- Heiland I, Erdmann R (2005): Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 272(10):2362-72.
- Heneka MT, Klockgether T, Feinstein DL (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J Neurosci.* 20(18):6862-7.
- Heneka MT, Landreth GE, Hüll M (2007): Drug insight: effects mediated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in CNS disorders. *Nat Clin Pract Neurol.* 3(9):496-504.
- Hess R, Staubli W (1965): Nature of the hepatomegalic effect produced by ethylchlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature.* 208(5013):856-8.
- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF (2005): Contribution of the endoplasmatic reticulum to peroxisome formation. *Cell.* 122(1):85-95.
- Honosho M, Tamura S, Shimosawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y (1998): Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet.* 63(6):1622-30.
- Huyghe S, Schmalbruch H, Hulshagen L, Veldhoven PV, Baes M, Hartmann D. (2006): Peroxisomal multifunctional protein-2 deficiency causes motor deficits and glial lesions in the adult central nervous system. *Am J Pathol.* 168(4):1321-34.
- Imanaka T, Morita M (2012): Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822(9): 1387-96. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.009. Epub 2012 Feb 17.



Issemann I, Green S (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347(6294):645-50.

Iwayanagi Y, Takada T, Tomura F, Yamanashi Y, Terada T, Inui K, Suzuki H (2011): Human NPC1L1 expression is positively regulated by PPAR $\alpha$ . *Pharm Res*. 2011 Feb;28(2):405-12. doi: 10.1007/s11095-010-0294-4. Epub 2010 Oct 16.

Jardim LB1, da Silva AC, Blank D, Villanueva MM, Renck L, Costa ML, Vargas CR, Deon M, Coelho DL, Vedolin L, de Castro CG Jr, Gregianin L, Bonfim C, Giugliani R (2010): X-linked adrenoleukodystrophy: clinical course and minimal incidence in South Brazil. *Brain Dev*. 2010 Mar;32(3):180-90. doi: 10.1016/j.braindev.2009.02.002. Epub 2009 Mar 6.

Jesse CR, Bortolatto CF, Wilhelm EA, Roman SS, Prigol M, Nogueira CW (2012): The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone protects against cisplatin-induced renal damage in mice. *J Appl Toxicol*. 10.1002/jat.2818. [Epub ahead of print]

Jones JM, Morrell JC, Gould SJ (2004): PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol*. 164(1):57-67.

Kassmann CM (2014): Myelin peroxisomes - Essential organelles for the maintenance of white matter in the nervous system. *Biochemie* 2014 Mar;98:111-8. doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.020. Epub 2013 Oct 9.

Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahms J, Nave KA (2007): Axonal loss and Neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes *Nat Genet*. 39(8):969-76. Epub 2007 Jul 22.

Kassmann CM, Nave KA (2008): Oligodendroglial impact on axonal function and survival - a hypothesis. *Curr Opin Neurol*. 21(3):235-41.

Kassmann CM, Quintes S, Rietdorf J, Möbius W, Sereda MW, Nientiedt T, Saher G, Baes M, Nave KA (2011): A role for myelin-associated peroxisomes in maintaining paranodal loops and axonal integrity. *FEBS Lett.* 2011 Jul 21;585(14):2205-11. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.032. Epub 2011 May 23.

Kaundal RK, Sharma SS (2010): GW1929: a nonthiazolidinedione PPAR $\gamma$  agonist, ameliorates neurological damage in global cerebral ischemic-reperfusion injury through reduction in inflammation and DNA fragmentation. *Behav Brain Res.* 216(2):606-12. doi: 10.1016/j.bbr.2010.09.001. Epub 2010 Sep 15.

Keller HJ, Mahfoudi A, Dreyer C, Hihi AK, Medin J, Ozato K, Wahli W (1993): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Lipid Metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 684:157-73.

Keller JM, Collet P, Bianchi A, Huin C, Bouillaud-Kremarik P, Becuwe P, Schohn H, Domenjoud L, Dauça M (2000): Implications of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in development, cell life status and disease. *Int J Dev Biol.* 44(5):429-42.

Kemp S, Berger J, Aubourg P (2012): X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 1822(9):1465-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.03.012. Epub 2012 Mar 28.

Kim HJ, Woo IS, Kang ES, Eun SY, Kim HJ, Lee JH, Chang KC, Kim JH, Seo HG (2006): Identification of a truncated alternative splicing variant of human PPAR $\gamma$ 1 that exhibits dominant negative activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(3):698-706. Epub 2006 Jul 5.

Kim PK, Mullen RT, Schumann U, Lippincott-Schwartz J (2006): The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol.* 173(4):521-32.

- Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992): Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358(6389):771-4.
- Kobayashi T1, Shinnoh N, Kondo A, Yamada T (1997): Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Mar 27;232(3):631-6.
- Kobayashi S, Tanaka A, Fujiki Y (2007): Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Exp Cell Res*. 313(8):1675-86. Epub 2007 Mar 12.
- Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M (2003): Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem*. 278(10):8597-605. Epub 2002 Dec 23.
- Komori M, Rasmussen SW, Kiel JA, Baerends RJ, Cregg JM, van der Klei IJ, Veenhuis M (1997): The *Hansenula polymorpha* PEX14 gene encodes a novel peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *EMBO J*. 16(1):44-53.
- Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W (1997): Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. 11(6):779-91.
- Krisans SK (1992): The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 7(4):358-64.
- Lalloyer F und Staels B (2010): Fibrates, glitazones and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(5):894-9.
- Latruffe N, Cherkaoui Malki M, Nicolas-Frances V, Jannin B, Clemencet MC, Hansmannel F, Passilly-Degrace P, Berlot JP (2001): Peroxisome-proliferator-activated receptors as physiological sensors of fatty acid metabolism: molecular regulation in

peroxisomes. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 2):305-9.

Latruffe N, Vamecq J (1997): Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie.* 79(2-3):81-94.

Lazarow PB, Fujiki Y (1985): Biogenesis of Peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol.* 1:489-530.

Li X, Baumgart E, Dong GX, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Valle D, Smith KD, Gould SJ (2002): PEX11alpha is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor alphamediated peroxisome proliferation. *Mol Cell Biol.* 22(23):8226-40.

Li X, Gould SJ (2002): PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol.* 156(4):643-51. Epub 2002 Feb 11.

Li X, Gould SJ (2003): The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J Biol Chem.* 278(19):17012-20. Epub 2003 Mar 4.

Lu JF, Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW, Smith KD (1997): A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9366-71.

Lundgaard I1, Osório MJ2, Kress BT2, Sanggaard S2, Nedergaard M2 (2013): White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience.* 2013 Nov 11. pii: S0306-4522(13)00903-2. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.050. [Epub ahead of print]

Madathil KS, S Saravanan K, Haobam R, Varghese M, Rajamma U, Mohanakumar KP (2013): Nitric oxide synthase inhibitors protect against rotenone-induced, oxidative stress mediated parkinsonism in rats. *Neurochem Int.* S0197-0186(13)00010-7. doi: 10.1016/j.neuint.2013.01.007.

Mahmoudi Azar L, Mehdizadeh Aghdam E, Karimi F, Haghshenas B, Barzegari A, Yaghmaei P, Hejazi MS (2013): Influence of Foreign DNA Introduction and Periplasmic

Expression of Recombinant Human Interleukin-2 on Hydrogen Peroxide Quantity and Catalase Activity in *Escherichia coli*. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):395-402. doi: 10.5681/apb.2013.063. Epub 2013 Aug 20.

Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Krüger V, Beck S, Wagner R, Erdmann R (2010): The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol.* 12(3):273-7. Epub 2010 Feb 14.

Mooser HW, Mahmood A, Raymond GV (2007): X-linked Adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol.* 3(3):140-51.

Morató L, Galino J, Ruiz M, Calingasan NY, Starkov AA, Dumont M, Naudí A, Martínez JJ, Aubourg P, Portero-Otín M, Pamplona R, Galea E, Beal MF, Ferrer I, Fourcade S, Pujol A (2013): Pioglitazone halts axonal degeneration in a mouse model of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain.* 2013 Aug;136(Pt8):2432-43. doi: 10.1093/brain/awt143. Epub 2013 Jun 22.

Motley AM, Hetteema EH (2007): Yeast peroxisome multiply by growth and division. *J Cell Biol.* 178(3):399-410. Epub 2007 Jul 23.

Moya-Camarena SY, Van den Heuvel JP, Belury MA (1999): Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim Biophys Acta.* 1436(3):331-42.

Mukai S, Fujiki Y (2006): Molecular mechanism of import peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor PEx7 and PTS1 receptor Pex5pL. *J Biol Chem.* 281(49):37311-20. Epub 2006 Oct 13.

Mysiorek C, Culot M, Dehouck L, Derudas B, Staels B, Bordet R, Cecchelli R, Fenart L, Berezowski V (2009): Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha activation protects brain capillary endothelial cells from oxygen-glucose deprivation-induced

hyperpermeability in the blood-brain barrier. *Curr Neurovasc Res.* 2009 Aug;6(3):181-93. Epub 2009 Aug 1.

Novikoff AB, Shin WY (1978): Endoplasmic reticulum and autophagy in rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(10):5039-42.

Numata Y1, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi JI, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K (2014): Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol.* 2014 Feb 16. [Epub ahead of print]

Park EJ, Park SY, Joe EH, Jou I (2003): 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem.* 278(17):14747-52. Epub 2003 Feb 12.

Pedersen JI, Gustafsson J (1980): Conversion of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoic into cholic acid by rat liver peroxisomes. *FEBS Lett.* 121(2):345-8.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ (2000): Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 20(14):5119-28.

Platta HW, El Magraoui F, Schlee D, Grunau S, Girzalsky W, Erdmann R (2007): Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J Cell Biol.* 177(2):197-204.

Platta HW, Erdmann R (2007): The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett.* 581(15):2811-9. Epub 2007 Apr 9.

Poliak S, Peles E (2003): The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci.* 4(12):968-80.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Duale Reihe Biochemie. 2. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008

Raychaudhury B1, Banerjee S, Datta SC (2003): Peroxisomal function is altered during leishmania infection. *Med Sci Monit.* 2003 Apr;9(4):BR125-9.

Reddy JK, Hashimoto T (2001): Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 21:193-230.

Reddy JK, Mannaerts GP (1994): Peroxisomal lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 14:343-70.

Richert S, Kleinecke S, Günther J, Schaumburg F, Edgar J, Nienhaus GU, Nave KA, Kassmann CM (2014): In vivo labeling of peroxisomes by photoconvertible mEos2 in myelinating glia of mice. *Biochimie.* 2014 Mar;98:127-34. doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.022. Epub 2013 Nov 18.

Rinholm JE, Hamilton NB, Kessaris N, Richardson WD, Bergersen LH, Attwell D (2011): Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination by Glucose and Lactate. *J Neurosci.* 31(2):538-48.

Rolland B, Marche K, Cottencin O, Bordet R (2012): The PPAR $\alpha$  Agonist Fenofibrate Reduces Prepulse Inhibition Disruption in a Neurodevelopmental Model of Schizophrenia. *Schizophr Res Treatment.* 2012;2012:839853. doi: 10.1155/2012/839853. Epub 2012 May 1

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999): PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 4(4):611-7.

Rouiller C, Bernhard W (1956): „Microbodies“ and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J Biophys Biochem Cytol.* 2(4 Suppl):355-60.

Schliebs W, Kunau WH (2006): PTS2 co-receptors: diverse proteins with common features. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1605-12. Epub 2006 Sep 5.

Schrader M, Fahimi HD (2006): Growth and division of peroxisomes. *Int Rev Cytol*. 255:237-90.

Schrader M, Fahimi HD (2006): Peroxisomes and oxidative Stress. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1755-66. Epub 2006 Sep 14.

Shi Y, Hon M, Evans RM (2002): The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(5):2613-8. Epub 2002 Feb 26.

Sharp PS, Dick JR, Greensmith L. (2005): The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 130(4):897-910.

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(6):552-8.

Shintu L, Baudoin R, Navratil V, Prot JM, Pontoizeau C, Defernez M, Blaise BJ, Domange C, Péry AR, Toulhoat P, Legallais C, Brochot C, Leclerc E, Dumas M (2012): Metabolomics-on-a-chip and predictive systems toxicology in microfluidic bioartificial organs. *Anal Chem*. 84(4):1840-8. doi: 10.1021/ac2011075. Epub 2012 Feb 8.

Simonini VM, Polak PE, Boullerne AI, Peters JM, Richardson JC, Feinstein DL. (2010): Regulation of oligodendrocyte progenitor cell maturation by PPAR $\delta$ : effects on bone morphogenetic proteins. *ASN Neuro*. 2(1):e00025.

Smith JJ, Aitchison JD (2013): Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Dec;14(12):803-17. doi: 10.1038/nrm3700.



South ST, Gould SJ (1999): Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol.* 144(2):255-66.

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J and Tedgui A (1998): Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators, *Nature.* 393(6687):790-3.

Thomas J, Debeer LJ, De Schepper P J, and Mannaerts G P (1980): Factors influencing palmitoyl-CoA oxidation by rat liver peroxisomal fractions. Substrate concentration, organelle integrity and ATP. *Biochem J.* 190(3): 485–494.

Thoms S, Gärtner J (2012): First PEX11 $\beta$  patient extends spectrum of peroxisomal biogenesis disorder phenotypes. *J Med Genet.* 2012 May;49(5):314-6. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100899.

Thoms S, Harms I, Kalies KU, Gärtner J (2012): Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic.* 2012 Apr;13(4):599-609. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01324.x. Epub 2012 Jan 17.

Thorp JM, Waring WS (1962): Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature.* 194:948-9.

Titorenko VI, Ogrydiak DM, Rachubinski RA(1997): Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface and peroxisome biogenesis in the yeast. *Mol Cell Biol.* 17(9):5210-26.

Toro AA, Araya CA, Córdova GJ, Arredondo CA, Cárdenas HG, Moreno RE, Venegas A, Koenig CS, Cancino J, Gonzalez A, Santos MJ (2009): Pex3p-dependent peroxisomal biogenesis initiates in the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *J Cell Biochem.* 107(6):1083-96.

Trepel M: Neuroanatomie – Struktur und Funktion. 5. Auflage, Urban und Fischer Verlag/Elsevier GmbH 2011

Tugwood JD, Isseman I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S (1992): The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11(2):433-9.

Valentin GG: Über den Verlauf und die letzten Enden der Nerven. 1. Auflage: Grass, Barth und Comp. Verlag (1836)

Van Roermund CWT, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJA, Tabak HF (1995): The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14(14):3480-6.

Van Roermund CWT, Visser WF (2008): The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J.* 22(12):4201-8. Epub 2008 Aug 29.

Van Veldhoven PP, Just WW, Mannaerts GP (1987): Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of beta-oxidation. Evidence for the presence of a pore-forming protein. *J Biol Chem.*

Vanderver A, Tonduti D, Schiffmann R, Schmidt J, Van der Knaap MS. Leukodystrophy Overview. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014.

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

Weber FD, Wiesinger C, Forss-Petter S, Regelsberger G, Einwich A, Weber WH, Köhler W, Stockinger H, Berger J (2014): X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism is severely impaired in monocytes but not in lymphocytes. *Hum Mol Genet.* 2014 Jan 7. [Epub ahead of print]

Wolvetang EJ, Tager JM, Wanders RJA (1990): Latency of the peroxisomal enzyme acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in digitonin-permeabilized fibroblasts: the effect of ATP and ATPase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 170(3):1135-43.

Yan Q, Zhang J, Liu H, Babu-Khan S, Vassar R, Biere AL, Citron M, Landreth G (2003): Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 23(20):7504-9.

Yanagihara T, Cumings JN (1969): Alterations of phospholipids, particularly plasmalogens, in the demyelination of multiple sclerosis as compared with that cerebral oedema. *Brain.* 92(1):59-70.

Yang Y, Hongbao MA (2009): western blotting and ELISA techniques. *Researcher,* 2009;1(2):67-86

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. [Epub ahead of print]

Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK (1993): Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem.* 268(36):26817-20.

## 8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ACAA1	Acetyl-CoA-Acyltransferase 1
ACOX1	Acyl-CoA-Oxidase 1
ALD	Adrenoleukodystrophie
AMN	Adrenomyeloneuropathie
cALD	Childhood oder zerebrale ALD
EAE	Experimentelle Allergische Encephalomyelitis
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
GPX1	Gluthation Peroxidase 1
HBSS	Hank's buffered salt solution
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
kDa	Kilodalton
ko	knockout
M	Molar
mA	Milliampere
MFP2	multifunktionales Protein 2
min	Minuten
mk	Monoklonal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEX	Peroxin
PFA	Paraformaldehyd
pk	Polyklonal
PMP-70	Peroxisomales Membranprotein-70
PNS	Peripheres Nervensystem
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTS1,2	Peroxisomal Targetin Singal 1 bzw. 2
SOD1	Superoxid Dismutase 1
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Room Temperature
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethyldiamin
V	Volt
VLCFA	Very Long Chain Fatty Acids
WT	Wildtyp
X-ALD	X-chromosomal vererbte ALD
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **9. Lebenslauf**

Ich bin am 17.12.1986 als Sohn von Ute und Dr. med. Martin Linßen in Mülheim an der Ruhr geboren worden.

Von August 1993 bis Juni 1997 habe ich als Schüler die Grundschule am Saarnberg in Mülheim an der Ruhr besucht. In der 4. Klasse bekam ich die Empfehlung für die Realschule, wurde aber von meinen Eltern am Otto-Pankok-Gymnasium in Mülheim an der Ruhr angemeldet.

Dies besuchte ich ab August 1997 und habe am 17.06.2006 mit dem Erwerb der allgemeinen Hochschulreife die Schulausbildung am Otto-Pankok-Gymnasium beendet.

Von Juli 2006 bis März 2007 habe ich meinen Zivildienst beim Diakonischen Werk in Mülheim an der Ruhr abgeleistet.

Zum April 2007 habe ich dann das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen aufgenommen und habe am 14.03.2008 die naturwissenschaftliche Vorprüfung für Studierende der Zahnmedizin vollständig bestanden.

Am 23.09.2009 habe ich die zahnärztliche Vorprüfung vollständig bestanden. Von Oktober 2009 bis Februar 2012 war ich Student im klinischen Abschnitt des Zahnmedizinstudiums und habe diesen am 28.06.12 durch das vollständige Bestehen der zahnärztlichen Prüfung abgeschlossen.

Daraufhin wurde mir am 09.07.2012 die Approbation als Zahnarzt erteilt.

Seit Juli 2012 habe ich teilzeit, zwecks Promotion, am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen gearbeitet.