

INAUGURAL - DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls - Universität
Heidelberg**

vorgelegt von

Celia Michèle Kassmann

aus Frankfurt am Main

Tag der mündlichen Prüfung:

**Konditionale Inaktivierung von Peroxisomen
im Nervensystem der Maus:**

**Ein transgenes Modell einer humanen
Leukodystrophie**

Gutachter:

Prof. Dr. Klaus-Armin Nave

PD. Dr. Anne Régnier-Vigouroux

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2001 bis September 2005 am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin (Göttingen) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Armin Nave durchgeführt.

Abkürzungen

4-PBA	4-Phenylbutyrat	OL	Oligodendrocyte
ALD	Adrenoleukodystrophie	OPC	Oligodendrocyte Precursor Cell
ALDP	Adrenoleukodystrophie Protein	P	Postnataltag
ALDRP	ALDP Related Protein	P70R	PMP-70 Related Protein
AMN	Adrenomyeloneuropathy	PBD	Peroxisomal Biogenesis Disorders
APZ	Antigen Präsentierende Zelle	PEX	Peroxin
bp	Basenpaare	PLP	Proteolipid Protein
BHS	Blut-Hirn-Schranke	PMP-70	Peroxisomales Membranprotein-70
cALD	Childhood oder Cerebrale Form der ALD	PNS	Peripheres Nervensystem
CD	2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase	PTS1,2	Peroxisomal Targeting Signal Type 1, bzw. Type 2
cDNA	Komplementäre DNA	RANTES	Reguliert durch Aktivierung, Normal T-Zell Exprimiert und Sekretiert
CNP	2',3'-zyklische 3'-Phosphodiesterase	RCDP	Rhizomeler Typ der Chondrodysplasia Punctata
Cre	3-3'-Diaminobenzidin	TGF	Transforming growth factor
CSF	Cerebro-Spinal-Flüssigkeit	TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
DAPAT	Dihydroxyazetonphosphat-Acyl-Transferase	TNFR-1, -2	TNF-Rezeptor-1, -2
EAE	Experimentelle Allergische Encephalomyelitis	VLCFA	Very Long Chain Fatty Acids
EtOH	Ethanol	X-ALD	X-chromosomal vererbte ALD
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	ZNS	Zentralnervensystem
GLD	Globoidzell Leukodystrophie	ZS	Zellweger Syndrom
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase		
ICAM	Intrazelluläres Adhensionsmolekül		
IFN- γ	Interferon- γ		
IL-1, -1 β , -6, -10	Interleukin-1, -1 β , -6, -10		
IPL	Intraperiod Line		
kDA	Kilodalton		
LFA	Leukozytenfunktion assoziiertes Antigen		
MAG	Myelin Assoziiertes Glykoprotein		
MBP	Myelin Basisches Protein		
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein-1		
MHC	Major Histocompatibility Complex		
MIP-1 α	Monozyten inflammatorisches Protein		
mRNA	Messenger RNA		
NS	Nervensystem		
NT	Neurotrophin		

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY	II
I EINLEITUNG.....	1
1 NEUROGLIA DES ZENTRALNERVENSYSTEMS.....	2
1.1 Mikroglia.....	2
1.2 Astrozyten.....	3
1.3 Oligodendrozyten.....	3
2 MYELIN.....	5
3 KOMPONENTEN EINES ENTZÜNDUNGSPROZESSES IM ZENTRALNERVENSYSTEM.....	6
3.1 Die Blut-Hirn-Schranke.....	6
3.2 Chemokine und Zytokine im Entzündungsprozess.....	7
3.3 Zelltypen im Entzündungsprozess.....	9
4 PEROXISOMEN.....	11
5 PEROXISOMENBIOGENESE.....	13
6 PEROXISOMALE KRANKHEITEN.....	14
7 DIE X-CHROMOSOMAL VERERBTE ADRENOLEUKODYSTROPHIE.....	17
7.1 Das Adrenoleukodystrophie-Protein.....	17
7.2 Symptomatik der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie.....	19
8 MAUSMODELLE PEROXISOMALER KRANKHEITEN.....	21
9 ZELLTYPESPEZIFISCHE INAKTIVIERUNG VON GENEN.....	22
10 ZIELSETZUNG DER DISSERTATION.....	23
II ERGEBNISSE.....	25
1 HERSTELLUNG EINER MAUSLINIE MIT DEFEKTER PEROXISOMENBIOGENESE IN MYELINBILDENDEN ZELLEN.....	25
2 BIOGENESE UND FUNKTION VON PEROXISOMEN IN OLIGODENDROZYTEN KONDITIONALER PEX5-DEFIZIENTER MÄUSE.....	28
2.1 Cre-vermittelte Rekombination des PEX5-Gens.....	28
2.2 Gestörte Peroxisomenbiogenese in PEX5-defizienten Oligodendrozyten.....	29
2.3 Biochemische Analyse der Peroxisomenfunktion.....	32
3 ANALYSE DES KLINISCHEN PHÄNOTYPS KONDITIONALER PEX5-DEFIZIENTER MÄUSE.....	35
4 MAGNETISCHE RESONANZ TOMOGRAPHIE AM GEHIRN.....	37
5 MYELINISIERUNG UND MYELINERHALT BEI KONDITIONALEN PEX5-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	40
5.1 Normale Gehirnentwicklung und Myelinisierung.....	40
5.2 Demyelinisierung im ZNS konditionaler PEX5-defizienter Mäuse.....	43
6 APOPTOTISCHER ZELLTOD VON OLIGODENDROZYTEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM.....	45
7 NEURONALE DEGENERATION IM ZENTRALNERVENSYSTEM.....	47
8 REAKTIVE GLIOSE IM ZENTRALNERVENSYSTEM.....	50
9 INFLAMMATION IN LÄSIONEN KONDITIONALER PEX5-DEFIZIENTER MÄUSE.....	52
III DISKUSSION.....	56
1 INAKTIVIERUNG MULTIPLER PEROXISOMENFUNKTIONEN IN MYELINBILDENDEN ZELLEN.....	57
2 ÄHNLICHKEITEN UND UNTERSCHIEDE DES MAUSMODELLS ZUR X-ALD.....	57
2.1 Normale Myelinisierung trotz eingeschränkter Peroxisomenfunktion.....	57
2.2 Beginn der klinischen Symptomatik nach dem Ende der Myelinisierung.....	58
2.3 Symmetrische cerebrale Demyelinisierung und Neurodegeneration.....	59
2.4 Spezifität der Läsionsregion.....	60
2.5 Der Zelltod: Primär neuronal oder glial?.....	62
2.6 Effektorzelltypen und deren Verteilung bei der Demyelinisierung.....	62

2.7	<i>Entzündliche Demyelinisierung</i>	63
3	BEDEUTUNG DER KONDITIONALEN PEX5-DEFIZIENTEN MAUSLINIE	64
3.1	„Natürliche zelltypspezifische“ Peroxisomendysfunktion in der X-ALD -eine Hypothese ..	64
3.2	Relevanz des Mausmodells für Therapien der X-ALD.....	66
4	MÖGLICHE SCHLÜSSELFUNKTIONEN DES PEROXISOMS FÜR DAS NERVENSYSTEM.....	68
4.1	Die Plasmalogensynthese.....	68
4.2	Die Cholesterinsynthese	69
4.3	Die VLCFA-Degradierung	70
5	AUSBLICK.....	70
IV	MATERIAL	72
1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	72
2	GERÄTE	73
3	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	74
3.1	<i>Molekularbiologie und Proteinbiochemie</i>	74
3.2	<i>Zellkultur</i>	76
3.3	<i>Histologie</i>	77
4	ANTIKÖRPER, ENZYME UND REAKTIONSKOMPLETTSYSTEME	80
4.1	<i>Primärantikörper</i>	80
4.2	<i>Sekundärantikörper</i>	81
4.3	<i>Enzyme</i>	81
4.4	<i>Reaktionskomplettsysteme</i>	81
5	NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE.....	81
5.1	<i>Radiochemikalien</i>	81
5.2	<i>Oligonukleotide</i>	81
6	VERSUCHSTIERE.....	82
7	COMPUTERSOFTWARE	83
V	METHODEN	84
1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	84
1.1	<i>Präparation genomischer DNS aus Gewebe</i>	84
1.2	<i>Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS und RNS</i>	84
1.3	<i>Präparation von Gesamt-RNS aus Gehirnen</i>	84
1.4	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	84
1.5	<i>DNS-Agarosegelelektrophorese</i>	85
1.6	<i>Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNS</i>	85
1.7	<i>Die Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	85
1.8	<i>cDNS-Synthese durch reverse Transkription von RNS</i>	86
1.9	<i>Quantitative TaqMan RealTime-PCR (qRT-PCR)</i>	87
2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	89
2.1	<i>Myelinpräparation aus Gehirnen</i>	89
2.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen</i>	89
3	ZELLKULTURMETHODEN	89
3.1	<i>Präparation und Kultur primärer Oligodendrozyten</i>	89
3.2	<i>Immunzytochemie</i>	90
4	QUANTITATIVE PHOSPHOLIPIDANALYSE DES MYELINS MITTELS NANO-ELECTROSPRAY-IONISIERUNG TANDEM-MASSENSPEKTROMETRIE (ESI-MS/MS).....	90
5	MAGNETISCHE RESONANZTOMOGRAPHIE (MRT) AN MÄUSEN.....	91
6	HISTOLOGISCHE METHODEN FÜR DIE LICHTMIKROSKOPIE	91
6.1	<i>Fixierung des Mauskörpers durch Perfusion</i>	91
6.2	<i>Herstellung von Paraffinschnitten</i>	91
6.3	<i>Hämatoxylin/Eosin-Färbung an Paraffinschnitten</i>	92
6.4	<i>Nissl-Färbung</i>	92
6.5	<i>Darstellung von Myelin durch „Luxol Fast Blue“</i>	92
6.6	<i>Versilberung von Neuronen und Axonen nach Bielschowsky</i>	92
6.7	<i>Versilberung von Myelin nach Gallyas (1979)</i>	92
6.8	<i>Darstellung apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung</i>	93

6.9	<i>Dako-LSAB2 System an Paraffinschnitten</i>	93
6.10	<i>Doppelimmunfluoreszenz an Paraffinschnitten</i>	93
7	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	95
7.1	<i>Einbettung in Epon</i>	95
7.2	<i>Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten</i>	95
8	TIERZUCHT UND TIERHALTUNG.....	96
8.1	<i>Tierzucht</i>	96
8.2	<i>Identifikation der Tiere und Schwanzbiopsien</i>	96
8.3	<i>Narkotisierung und Tötung von Versuchstieren</i>	96
9	VERHALTENSTESTS.....	97
9.1	<i>Beurteilung der Versuchstiere durch ein klinisches Punktesystem</i>	97
9.2	<i>Stabtest</i>	97
9.3	<i>Gittertest</i>	97
VI	LITERATUR	98

Zusammenfassung

Die juvenile Form der X-chromosomal vererbten Adrenoleukodystrophie ist durch eine progressive, entzündliche Demyelinisierung der cerebralen weißen Substanz bei gleichzeitiger Nebenniereninsuffizienz gekennzeichnet. Der zugrunde liegende genetische Defekt ist die Mutation eines peroxisomalen Membranproteins unbekannter Funktion, des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP). Versuche, ein Mausmodell für die juvenile Form der Krankheit zu generieren, waren erfolglos, da neurologische Symptome ausblieben. Die Deletion des ALDP Gens führte lediglich zu biochemischen Parallelen der Krankheit.

Da die Krankheit beim Menschen üblicherweise nicht vor dem fünften Lebensjahr ausbricht und dann besonders zwei sehr lipidhaltige Gewebe der Patienten betroffen sind (der adrenale Cortex und das Myelin), stellten wir die Arbeitshypothese auf, dass aus der primären ALDP-Defizienz ein sekundärer Peroxisomendefekt in fettreichen Geweben resultiert. Um ein Mausmodell für die X-ALD zu erhalten, an dem sich die pathologischen Vorgänge im Nervensystem untersuchen lassen, sollte diese Hypothese im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht und dazu eine Mauslinie mit defekter Peroxisomenbiogenese in myelinbildenden Zellen generiert werden.

Die oligodendrozytenspezifische Peroxisomendysfunktion wurde durch Anwendung des Cre/LoxP-Systems erreicht. Hierzu wurde eine Mauslinie, bei der die Cre-Rekombinase unter Regulation des CNP-Promotors steht, mit einer Mauslinie verpaart, bei der essentielle Bereiche des peroxisomalen Biogenesefaktor Peroxin 5- (PEX5) Gens mit LoxP-Sequenzen flankiert worden waren. Anhand von Zellkulturanalysen konditionaler PEX5 null-mutanter Mäuse (CNP-Cre^{flox}PEX5) konnte die Expression von Cre und eine damit verbundene Defizienz von PEX5 in Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Immunocytochemische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten Katalase-defiziente Peroxisomen in Oligodendrozyten und im Myelin der mutanten Tiere. Massenspektrometrische Lipidanalysen des Myelins ließen den Schluss auf peroxisomale Dysfunktion zu.

Homozygote konditionale PEX5-defiziente Mäuse sind lebensfähig und bis zu dem Alter von 3 bis 4 Monaten phänotypisch unauffällig. Im Alter zwischen 3 und 6 Monaten erscheinen erste neurologische Auffälligkeiten in Form einer motorischen Hinterlaufschwäche. Die Krankheit verläuft progressiv über die vollkommene Paralyse der Hinterläufe und dem Erreichen eines vegetativen Stadiums bis zum Tod. Es liegt eine progressive, inflammatorische, symmetrische Demyelinisierung und Neurodegeneration zu Grunde an der Mikroglia, Astrozyten und Leukozyten beteiligt sind. Die CNP-Cre^{flox}PEX5 Mauslinie liefert ein Mausmodell, das in seiner Ausprägung mit der juvenilen Form der X-chromosomal erblichen Adrenoleukodystrophie vergleichbar ist.

Summary

The juvenile form of X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) displays a progressive inflammatory demyelination of cerebral white matter accompanied by adrenal gland insufficiency. The disease is caused by mutations of the adrenoleukodystrophy protein (ALDP). This is a peroxisomal membrane protein of unknown function. Attempts to create a mouse model for the juvenile form of X-ALD by inactivating the ALDP gene failed, in as much as ALDP deficient mice did not exhibit CNS demyelination. These mice showed an abnormal accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) that is also found in human patients.

In humans X-ALD appears between four to ten years of age. Two of the most lipid rich tissues (myelin and adrenal glands) are affected. We hypothesized that ALDP deficiency, as a primary defect, leads to secondary loss of additional peroxisomal functions. This second step would take place preferentially in cells of lipid-rich tissues. To test for this hypothesis we generated a mouse line with defective peroxisomal biogenesis restricted to myelin forming glia, using the Cre-LoxP-system. We intercrossed a mouse line expressing Cre recombinase under control of CNP regulatory elements with a second mouse line that harboured a “floxed” peroxisomal biogenesis factor peroxin 5 (PEX5) gene. Immunocytochemical analysis of the offspring (CNP-Cre*floxPEX5) verified oligodendrocyte-specific Cre-mediated PEX5 deficiency. Further immunocytochemical and immunohistochemical examination displayed the lack of catalase positive peroxisomes in oligodendrocytes and in myelin of these mice. Mass spectrometric lipid analysis of myelin demonstrated peroxisomal dysfunction.

Homozygous conditional PEX5 deficient mice are viable and, up to 4 months of age, phenotypically normal. Between 4 to 6 months of age, first neurological abnormalities become obvious as indicated by motor-impairment of the hind limbs. The disease progresses gradually and comprises complete paralysis of the hind limbs, followed by a vegetative phase and death. The underlying cause is a progressive, inflammatory, symmetrical cerebral demyelination and neurodegeneration with involvement of microglia, reactive astrocytes, and invading leukocytes. CNP-Cre*floxPEX5 mice develop a leukodystrophy, that clinically and histologically resembles the severely progressive and inflammatory childhood form of X-ALD and thus, provide a bona fide mouse phenocopy for this neurological disease.

I Einleitung

Leukodystrophien bezeichnen erbliche neurodegenerative Erkrankungen mit progressivem Verlauf, die durch eine Dys- oder Demyelinisierung gekennzeichnet sind (Norton, 1984; Lazzarini, 2004). Damit unterscheidet man sie von erworbenen Myelinerkrankungen, wie einigen Formen der Multiplen Sklerose (MS; Lazzarini, 2004). In 50 % aller Fälle ist der zugrunde liegende genetische Defekt nicht aufgeklärt (Robitaille, 2005). Bei den Leukodystrophien, von denen der genetische Defekt bekannt ist, liegen in einigen Fällen Mutationen myelinspezifischer Strukturproteine zugrunde. Eine Mutation des Proteolipid Proteins ist z.B. Ursache der Pelizaeus Merzbacher Krankheit (Woodward und Malcolm, 1999). Ebenso sind Fälle von Leukodystrophien durch Mutationen in Glia-spezifischen Proteinen nicht-myelinbildender Gliazellen bekannt. Ein Beispiel hierfür ist die Alexander Krankheit, die Resultat eines Gendefekts des astrozytenspezifischen glialen fibrillären sauren Proteins („Glial Fibrillary Acidic Protein“, GFAP) ist (Noetzel, 2004). Oft sind Leukodystrophien Folge einer genetisch bedingten metabolischen Störung. Beispielsweise können Gendefekte lysosomaler Proteine (Globoid-Zell-Leukodystrophie, GLD; Wenger et al., 2000), oder Gendefekte mitochondrialer Proteine vorliegen, wie im Fall der humanen Zytochromoxidase-Defizienz (Robinson, 2000). Häufig sind auch peroxisomale Proteine betroffen (Bradl und Linington, 1996).

Die X-chromosomal erbliche Adrenoleukodystrophie (X-ALD) ist mit einer Inzidenz von 1/17.000 die häufigste aller peroxisomalen Krankheiten (Lazzarini, 2004) und wurde 1923 zuerst von Siemerling und Kreutzfeld beschrieben. Namensgebend sind die Degeneration der weißen Substanz und die Atrophie der Nebennieren (Addison Krankheit). Die X-ALD ist durch auffällige Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren (C26:0 und C25:0) in allen Geweben der Patienten gekennzeichnet (Moser et al., 1991). Histologische Befunde zeigen außerdem perivaskuläre Lymphozyten im Zentralnervensystem (ZNS; Powers et al., 1992; McGuinness et al., 1995; Ito et al., 2001). Solche neurologisch entzündlichen Prozesse sind außer von der X-ALD (Griffin et al., 1985) und der GLD (Itoh et al., 2002) von keiner weiteren Leukodystrophie bekannt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem Tiermodell für den ZNS-Phänotyp der juvenilen X-ALD. Daher werden im folgenden die bei dieser Erkrankung betroffene Struktur des ZNS, das Myelin, sowie die myelinbildenden Zellen des ZNS beschrieben. Weiterhin werden Komponenten behandelt, die zu entzündlichen Reaktionen im ZNS beitragen. Außerdem werden Grundlagen der Peroxisomenbiologie vermittelt, eine kurze allgemeine Beschreibung peroxisomaler Erkrankungen, im speziellen der X-ALD, und der assoziierten Mausmodelle gegeben. Methodisch wird kurz auf das Cre/LoxP-System zur zelltypspezifischen Eliminierung von Genen eingegangen, das zur Herstellung des beschriebenen Mausmodells verwendet wurde.

1 Neuroglia des Zentralnervensystems

Neben Nervenzellen, die nur ca. 10% (beim Mensch) bzw. 35% (bei Nagetieren) aller Zellen im Nervensystem ausmachen (Baumann und Pham-Dinh, 2001), treten die verschiedenen Neurogliatypen viel zahlreicher auf: Im ZNS sind dies Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, im peripheren Nervensystem Schwannsche, Enterische und Satellitenzellen. Bei der neuronalen Migration und dem gerichteten Wachstum der Axone kommt den Neurogliazellen während der Entwicklung eine bedeutende Rolle zu. Im adulten Nervensystem erhöhen sie durch die Bildung des Myelins die Leitgeschwindigkeit im Neuron etwa um das Zehnfache. In der Umgebung der Neuronen tragen sie zur Aufrechterhaltung einer zweckmäßigen Ionen- und Transmitterkonzentration bei. Sie haben Stütz- und trophische Funktion, dienen der Immunabwehr und übernehmen wichtige Aufgaben in pathologischen Prozessen (Kettenmann und Ransom, 2005).

1.1 Mikroglia

Etwa 5-20% aller Gliazellen des ZNS sind Mikroglia (Kettenmann und Ransom, 2005). Während die anderen Gliatypen des ZNS aus dem Neuroektoderm hervorgehen, stammen die Mikrogliazellen von mesodermalen Monozyten ab, die früh in der Entwicklung in das Gehirn einwandern (Sorokin et al., 1992; Streit, 2001; Nakajima und Kohsaka, 2004). Mikroglia liegen im gesunden Gehirn und Rückenmark gleichmäßig verteilt vor. In ihrer passiven Form sind sie bipolar oder haben viele verzweigte Zellfortsätze (ramifiziert; Lawson et al., 1990). Sie gelten als

Sensoren des ZNS für pathologische Veränderungen und werden z.B. durch Verletzungen oder den Befall von Fremdorganismen im ZNS aktiviert (Kreutzberg, 1996). Daraufhin verändern sie sich morphologisch zu amöboiden Zellen, die stark motil werden und cytotoxische Substanzen und Zytokine ausschütten können. Diese führen zur Aktivierung und Proliferation weiterer Mikroglia. Schließlich können sie die Fähigkeit zur Phagozytose erlangen und dadurch Pathogene und infizierte oder abgestorbene Zellen des eigenen Organismus beseitigen (Bechmann und Nitsch, 1997). Außerdem kommen diesem Zelltyp auch immunmodulatorische Aufgaben zu. Sie stellen also die immunologische Komponente im ZNS dar. In der Entwicklung übernehmen sie die Entsorgung apoptotischer Zellen (Streit, 2001; Raivich und Banati, 2004).

1.2 Astrozyten

Astrozyten sind der häufigste Zelltyp aller Gliazellen im ZNS. Ihren Namen verdanken sie ihrer sternförmigen Morphologie. Astrozyten bedecken mit ihren Endfüßen die Basallaminae der Pia mater und die der Blutgefäße und sind so mit an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beteiligt (Ballabh et al., 2004). Diese schützt das ZNS vor unerwünscht eindringenden Substanzen (siehe 3.1). Vermutlich sind Astrozyten für den Stoffaustausch zwischen Gehirn und Blut der hauptverantwortliche Zelltyp. Sie sind also sowohl für die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen als auch für die Entsorgung eventuell giftiger Zwischen- oder Endprodukte unabdingbar (Vannucci et al., 1997; Tamai und Tsuji, 2000). Im Falle von Entzündungen, Verletzungen, dem Eindringen von Fremdorganismen oder Viren reagieren neben den Mikroglia auch die Astroglia mit Proliferation (Astrozytose) und zeigen ein typisches Reaktionsmuster (Astrogliose). Dabei kommt es zur verstärkten Expression von glialem GFAP („Glial Fibrillary Acidic Protein“; (Pekny und Nilsson, 2005). Die Funktionen der Astrozyten in solch pathologischen Situationen ist nicht vollständig aufgeklärt. Einige Funktionen werden unter 3.3 genannt.

1.3 Oligodendrozyten

Im ZNS wird das Myelin von Oligodendrozyten (OL) gebildet. Die fettreiche Isolierung trägt zur höheren Geschwindigkeit der Erregungsleitung bei. Zusätzlich kommen den Oligodendrozyten weitere wichtige Funktionen für Nervenzellen zu. Die genauen

neuroglialen Interaktionsmechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Der Kontakt von Oligodendrozyten zu myelinisierten Axonen ist in vivo beispielsweise für die hoch spezialisierte axolemmale Organisation an Ranvierschen Schnürringen notwendig (Kaplan et al., 1997). Außerdem ist bekannt, dass für axonales Wachstum und Determinierung des axonalen Durchmessers der Kontakt mit der Oligodendrozyte als auch der Myelinisierungsprozess notwendig sind (Colello und Schwab, 1994; Yin et al., 1998). Daneben existieren Hinweise auf weitere mögliche Aufgaben der Oligodendrozyten, die für die Überlebensfähigkeit von Neuronen notwendig zu sein scheinen. So führt z.B. die Eliminierung des oligodendrozytenspezifischen CNP-Gens in der Maus zu axonaler Degeneration, obwohl die Ultrastruktur des Myelins völlig normal erscheint (Lappe-Siefke et al., 2003).

Man unterscheidet myelinisierende OL, nicht-myelinisierende Satelliten und Oligodendrozyten-Vorläufer. Die Existenz verschiedener Populationen von Oligodendrozyten-Vorläufern ist bereits von frühen Entwicklungsstadien bekannt (Pfeiffer et al., 1993). Myelinisierende Oligodendrozyten des adulten Gehirns sind durch einen auffälligen Polymorphismus gekennzeichnet. Sie entsenden zwischen einem und bis zu fünfzig feine Fortsätze (von 15-30 μm Länge) zu den Axonen verschiedener Neuronen. Diese Fortsätze verbreitern sich an ihrem Ziel, wickeln sich mehrfach (bis zu 160 mal) um einen Abschnitt des jeweiligen Axons und bilden so die Markscheide (Pannese, 1994). Myelinisierte Abschnitte (Internodien) werden von kleinen Bereichen nicht myelinisierter Abschnitte, sogenannten Ranvierschen Schnürringen (Nodien) unterbrochen. Die Axone des ZNS werden abhängig von ihrem Durchmesser von verschiedenen OL-Subtypen myelinisiert. Die Anzahl der Fortsätze und die Länge der Internodien (zwischen 50 und 1000 μm) variieren je nach myelinisierendem OL (Typ I/II und Typ III/IV; Kettenmann und Ransom, 2005). Der jeweilige Subtyp wiederum ist abhängig vom axonalen Durchmesser und der Axonlänge. Der kritische Axondurchmesser liegt bei 2 bis 4 μm . Die Axone des Optischen Nerven, des Balken (Corpus Callosum) und die der corticospinalen Bahnen haben einen Durchmesser von weniger als 2 μm und werden daher vom gleichen Oligodendrozyten Subtypen myelinisiert. In diesen Bereichen kann ein OL zu ca. 15 Axonen Kontakte herstellen. In Regionen mit großem Faserdurchmesser können es pro OL auch weniger als 5 Axone sein (Kettenmann und Ransom, 2005).

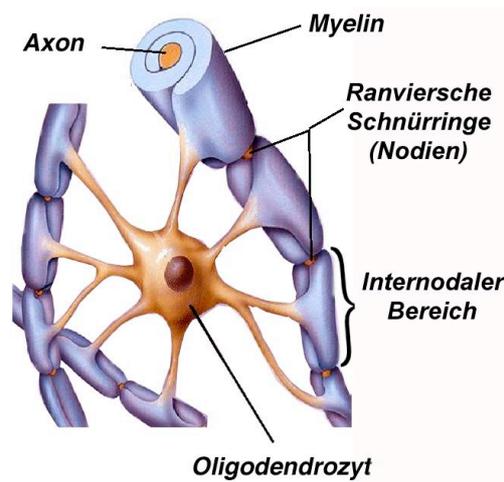


Abb. 1: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten

Oligodendrozyt mit Fortsätzen, die mehrere Axone erreichen und deren internodale Bereiche myelinisieren (modifiziert nach Bear et al., 2001).

2 Myelin

Die Myelinisierung setzt bei der Maus im Gehirn kurz vor der Geburt ein. Währenddessen beginnt sie beim Menschen schon im letzten Drittel der fötalen Entwicklung nicht im Gehirn sondern zuerst im Rückenmark (Kettenmann und Ransom, 2005). Nach der Umwindung eines axonalen Abschnittes wird das Myelin kompaktiert. Das Zytoplasma verbleibt in der innersten axonnahen (periaxonalen) und in der äußersten (abaxonalen) Myelinwindung, sowie in einem mikrotubulireichen Kanalsystem im Myelin (Schmidt-Lanterman-Kanäle). Diese Kanäle stellen auch Verbindungen zum Zellkörper der myelinisierenden Zelle her und gewährleisten den Stoffaustausch (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Die isolierende Eigenschaft des Myelins liegt in seinem hohen Lipidgehalt begründet. 70-85 % der Myelintrockenmasse sind Lipide (Sastry, 1985). Davon sind ca. 26% Cholesterol, 32% Glykolipide und 42% Phospholipide (Morell und Norton, 1980). Das Zusammenwirken der Isolierung durch Myelin und die hoch organisierte Verteilung spannungssensitiver Ionenkanäle in der Axonmembran sind Voraussetzung für die saltatorische Erregungsleitung. In der axonalen Membran der Ranvierschen Schnürringe liegen Natriumkanäle in besonders hoher Dichte vor. Die schnellen Kaliumkanäle haben die höchste Dichte im paranodalen Bereich. Im nicht-myelinisierten Axon ist die Geschwindigkeit der Impulsweiterleitung proportional zum Axondurchmesser (Kettenmann und Ransom, 2005).

Einige myelinspezifische Proteine sowie deren Spleißisoformen haben im ZNS und PNS ein äußerst genau determiniertes zeitliches und räumliches Expressionsmuster (Kettenmann und Ransom, 1995). Daher ist anzunehmen, dass sie spezifische Aufgaben erfüllen. Zu den Hauptmyelinproteinen des ZNS gehören unter anderem das Proteolipid Protein (PLP), ein integrales Membranprotein, und seine kleinere Spleißvariante DM-20. Sie bilden 50% des Gesamtmyelinproteins. Einen Anteil von 30-40 % des Myelinproteins haben die verschiedenen zytoplasmatischen Isoformen des Myelin basischen Proteins (MBP). MBP und PLP sind im kompaktierten Myelin lokalisiert. Ein zytoplasmatisches, Membran-assoziiertes, basisches Protein des nicht-kompakten Myelins ist die 2'-3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP). CNP wird schon zum Zeitpunkt der Oligodendrozytendifferenzierung exprimiert und gilt daher als einer der frühesten Marker der Oligodendrozytenlinie (Scherer et al., 1994).

Im PNS wird das Myelin von Schwannzellen gebildet. Sie sind der häufigste Zelltyp des PNS und stammen von pluripotenten Vorläufern der Neuralleiste ab (Paratore et al., 2002). Man unterscheidet auch hier den myelinbildenden vom nicht-myelinbildenden Typ. Myelinisierende Schwannsche Zellen umwickeln einen einzigen Axonbereich. Sie stellen also nur zu einem Axon Kontakt her, wodurch sie sich morphologisch von Oligodendrozyten unterscheiden (Arroyo und Scherer, 2000). Für den nicht-myelinisierenden Typ wurde gezeigt, dass seine Funktion für das Überleben der Neurone notwendig ist (Chen et al., 2003). Ungefähr die Hälfte aller Schwannzellen myelinisiert Axone mit relativ großem Durchmesser, während die andere Hälfte nicht myelinisierend mit Axonen kleineren Durchmessers assoziiert vorliegt (Jessen und Mirsky, 2005).

3 *Komponenten eines Entzündungsprozesses im Zentralnervensystem*

3.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Das ZNS ist umgeben vom Liquor cerebrospinalis. Um eine normale Funktionsweise der Nervenzellen des ZNS zu gewährleisten, muss die Konzentration bestimmter Moleküle (Hormone, Transmitter, Ionen, u.a.) in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) reguliert werden. Diese Regulation des Stoffaustauschs zwischen ZNS und Blut unterliegt der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. der Blut-Liquor-Schranke. Die

vaskulären Endothelzellen sind durch „Tight junctions“ (Zonula occludens) verbunden. Zellen und große Proteine können diese Barriere nicht passieren. Die Endothelzellen verfügen weiterhin über ein Enzymsystem zur Modifikation und zum Abbau lipophiler Substanzen, die die physische Eigenschaft zum Durchdringen von Membranen haben. Zudem sind Endothelzellen mit (luminal-abluminal) asymmetrischen Transportersystemen ausgestattet, wie „Carrier“-Systemen, Transport-ATPasen und Rezeptor vermittelten Transportern. Diese dienen der Transzytose hydrophiler Moleküle wie Glukose und Aminosäuren (Vannucci et al., 1997; Tamai und Tsuji, 2000).

Durch die BHS ist auch die Infiltration von Immunzellen in das ZNS ein regulierter Prozess, der unter Beteiligung von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Zytokinen und Metalloproteasen abläuft (Pachter et al., 2003). Mit Mikroglia und Astrozyten verfügt das ZNS außerdem über aktivierbare Zellen, die an immunologischen Reaktionen teilnehmen (Streit et al., 1999; Pekny und Nilsson, 2005). Sie exprimieren das MHC („Major Histocompatibility Complex“) Klasse II Molekül, gehören also zu den Antigen präsentierenden Zellen (APZ; Aloisi et al., 1998). Für Autoimmunität scheint das Präsentieren von Peptiden z.B. eines MBP-, eines PLP-Peptids oder anderer ZNS spezifischer Komponenten notwendig zu sein. Wodurch Autoantigene immunogen werden, ist allerdings unbekannt.

3.2 Chemokine und Zytokine im Entzündungsprozess

Chemokine, eine Klasse chemoattraktiver Moleküle, gehören u.a. zu den Auslösern entzündlicher Prozesse. Dies sind sekretierte Peptide (8-14 kDa), die meist über 7-Transmembran-G-Protein gekoppelte Rezeptoren interagieren. Ca. 50 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren sind z.Zt. bekannt. Sie sind an verschiedenen zellulären Aktivitäten beteiligt, wie der Regulation von Adhäsion, Apoptose, Proliferation, Phagozytose, Zytokinsekretion und T-Zelldifferenzierung. Bei der Entwicklung, der Homöostase und der Angiogenese sowie beim Tumorwachstum und der Tumormetastasierung spielen sie eine bedeutende Rolle (Belperio et al., 2000; Rossi und Zlotnik, 2000). Das Chemokinsystem ist durch hohe Redundanz charakterisiert. Die meisten Rezeptoren können auf mehr als einen Liganden und die meisten Liganden auf verschiedene Rezeptoren wirken (Rossi und Zlotnik, 2000). Chemokine, die zur CC- Familie gehören, gelten als notwendige chemoattraktive

Moleküle für Lymphozyten-Infiltration durch die Blut-Hirn-Schranke. In verschiedenen inflammatorischen neuropathologischen Situationen, wie der MS oder der EAE (Experimentelle Allergische Encephalomyelitis, ein Tiermodell für die MS; Wekerle, 1993), wurde eine erhöhte Expression einiger CC-Chemokine gefunden. Ihre Senkung führte zu verminderter Lymphozyten-Infiltration in der EAE (Karpus und Kennedy, 1997; Eugenin und Berman, 2003). Zur Familie der CC-Chemokine gehört z.B. das Makrophagen chemotaktische Protein (MCP)-1, das Monozyten inflammatorische Protein (MIP)- 1α , MIP- 1β , Eotaxin und RANTES (**R**eguliert durch **A**ktivierung, **N**ormal **T**-Zell **E**xprimiert und **S**ekretiert). MCP-1 ermöglicht die Translokation von Blutmonozyten durch die BHS. Für dieses Protein wurde ein eigener Chemokinrezeptor (CCR)-1 identifiziert. Während an einen anderen Rezeptor, den CCR-2, die Bindung von MIP- 1α und die von RANTES nachgewiesen wurde (Lukacs und Kunkel, 1998). Diese sind vermutlich ebenfalls an der Regulation der Lymphozyteninvasion des Gehirns in der MS beteiligt. Eine signifikant erhöhte MIP- 1α -Konzentration wurde im CSF von MS-Patienten gefunden und verstärkte MCP-1 Expression von Astrozyten wurden als frühestes Zeichen der Leukozyteninfiltration während einer EAE nachgewiesen (Miyagishi et al., 1995).

Einigen Zytokinen scheint eine duale Rolle bei Entzündungen zuzukommen. Die systemische Blockade des als proinflammatorischen Zytokin bekannten Tumor-Nekrose-Faktors- (TNF) α führte bei MS-Patienten unerwarteterweise zur Immunaktivierung und verstärkter Krankheitsentwicklung (van Oosten et al., 1996; Sicotte und Voskuhl, 2001). Das könnte durch die Existenz zweier Signaltransduktionswege zu erklären sein, die von unterschiedlichen TNF- α -Rezeptoren, TNFR-1 (p55) und TNFR-2 (p75) vermittelt werden. Während TNF- α über den TNFR-2 die Remyelinisierung und Oligodendrozyten Regeneration unterstützt, ist die Transduktion über TNFR-1 in die Initiation der Demyelinisierung involviert. Daher wird vermutet, dass TNF- α eine proinflammatorische Wirkung während der akuten Phase und eine immunsuppressive Wirkung während der chronischen Krankheitsphase ausüben könnte (Arnett et al., 2001; Arnett et al., 2003). Ein anderes proinflammatorisches Zytokin, Interleukin (IL) - 1β , wird hauptsächlich von Makrophagen und Mikroglia synthetisiert und führt zur Expression von TNF- α , IL-6 sowie zur Produktion von Stickoxid (NO). Auch für dieses Zytokin sind konträre Wirkungen bei demyelinisierenden Erkrankungen beobachtet worden.

Während IL-1 β -defiziente Mäuse verminderte Remyelinisierung zeigten (Mason et al., 2001), führte die Behandlung mit IL-1-Antagonisten in der EAE zu einem stärkeren Krankheitsverlauf (Jacobs et al., 1991). Für Interferon- (IFN) γ sind ebenfalls widersprüchliche Beobachtungen gemacht worden. So gilt es bis jetzt als potentieller Mediator autoimmuner Erkrankungen und gleichzeitig als Protektor gegen Demyelinisierung und axonalen Verlust (Krakowski und Owens, 1996; Furlan et al., 2001). Die finale Wirkung der Zytokine ist vermutlich nicht von einzelnen, sondern vom Gesamtprofil und dem Expressionsstatus der Zytokinrezeptoren abhängig.

3.3 Zelltypen im Entzündungsprozess

Immunzellen, z.B. T-Zellen, benötigen eine Kombination von Signalen, um die BHS passieren zu können. Endothelzellen können den zirkulierenden Immunzellen Chemokine und Adhäsionsmoleküle an der Gefäßinnenseite präsentieren. Hierauf folgt eine spezifische Interaktionssequenz verschiedener leukozytärer und endothelialer Signal- und Adhäsionsmoleküle, die schließlich zum Einwandern der Lymphozyten führt (Butcher et al., 1999; Middleton et al., 2002; Piccio et al., 2002). Danach kann eine weitere Aktivierung durch gleichzeitige Präsentation zweier Signale erfolgen. Das eine ist ein antigenspezifisches MHC I oder MHC II gekoppeltes und durch den T-Zellrezeptor vermitteltes, das andere ist ein kostimulatorisches nicht-antigenspezifisches Signal (Pryce et al., 1997). Diese initiale Interaktion bewirkt die Aktivierung der Endothelzellen, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IFN- γ und TNF- α), sowie die Rekrutierung zusätzlicher Lymphozyten und Monozyten. Infiltrierende T-Lymphozyten verlieren ihre Kapazität zur Proliferation anscheinend beim Eintritt in das ZNS (Matsumoto et al., 1993). Immunpathologische Untersuchungen inflammatorischer Erkrankungen wie der MS deuten auf eine primäre Rolle myelinspezifischer T-Zellen in der Pathogenese hin (Stinissen et al., 1997). Trotzdem gehören autoreaktive T-Zellen gegen Myelinantigene zum normalen Repertoire gesunder Säugetiere (Burns et al., 1983; Martino et al., 2000). Erst in den letzten Jahren wurden T-Zellen bei neurodegenerativen Prozessen auch neuroprotektive Funktionen zugeschrieben und nicht rein negative Auswirkungen unterstellt. So führte z.B. T-Zelldefizienz in einem Demyelinisierungsmodell zu reduzierter spontaner Remyelinisierung (Bieber et al., 2003) und T-Zellaktivierung in einem ZNS-Trauma Modell zu reduziertem neuronalen

Verlust (Yoles et al., 2001). T-Zellen erfüllen also auch regenerative Aufgaben im Entzündungsprozess.

Die Sekretion bestimmter Zytokine (wie z.B. die von IL-1 durch aktivierte Mikroglia) kann zu einer Astroglieose führen. In neuropathologischen Situationen stabilisieren Astrozyten die Reparatur des Gewebes, kontrollieren Neurotoxinkonzentrationen, regulieren die interzelluläre Kommunikation, tragen zur frühen Wundheilung bei und sind an der Beseitigung von Myelin- und neuronalen Abbauprodukten verletzter Hirnareale beteiligt (Eddleston und Mucke, 1993). Durch Sekretion neurotropher Faktoren tragen sie zur Überlebensfähigkeit von Neuronen bei. Sie weisen eine unvollständige Kapazität der Antigenpräsentation auf, indem sie das Antigen unabhängig von einem zur T-Zellaktivierung nötigen kostimulatorischen Signal präsentieren (Williams et al., 1994). *In Vitro-Versuche* lieferten Hinweise dafür, dass sie MBP-reaktive B- und T-Zellen inhibieren können (Xiao et al., 1998). Hingegen können aktivierte Astrozyten auch durch Expression von TNF- α , IL-1, IL-6 und Makrophagen Kolonie stimulierendem Faktor („Macrophage colony stimulating factor“, M-CSF) zur Entzündungsreaktion und Demyelinisierung beitragen.

Mikroglia exprimieren unter normalen Bedingungen mehr antiinflammatorische Zytokine (wie den Transformierenden Wachstumsfaktor- β 1, „Transforming Growth Factor“, TGF- β 1 und IL-10) als proinflammatorische (wie IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ und TNF- α ; Xiao et al., 1996). Schon kleine pathologische Veränderungen führen frühzeitig in der Krankheitsentwicklung zu ihrer Aktivierung (Kreutzberg, 1996). Im aktivierten Zustand entfernen sie das Myelin von den Axonen (Gimsa et al., 2000). Ihnen kommt aber auch eine Rolle bei der Gewebsreparatur und der neuronalen Regeneration zu (Rabchevsky und Streit, 1997). Aktivierte Mikroglia und infiltrierende B- und T-Lymphozyten im Gehirn von Multiple Sklerose- (MS) und Adrenoleukodystrophie- (X-ALD) Patienten führten zu der Vermutung, dass hier eine autoimmune Komponente durch die Mikrogliazellen vermittelt wird. Weiterhin zeigten Experimente an Ratten, dass immunsuppressive Behandlung nach Läsionsexperimenten im Rückenmark zu verbesserter Regeneration der motorischen Hinterbeinfunktion führte (Bethea et al., 1999; Popovich et al., 1999). Und in *In vitro*-Experimenten wurden Mikroglia von T-Zellen aktiviert. Diese phagozytierten daraufhin lebende myelinisierte Fasern (Gimsa et al., 2000). Solche Beobachtungen

weisen auf eine zusätzliche Gefährdung durch aktivierte Mikrogliazellen und Lymphozyten hin, denen intakte Fasern in Läsionen ausgesetzt sein könnten. Ebenso wird die Fähigkeit dieses Zelltyps zur Freisetzung zytotoxischer Substanzen im Aktivierungszustand als mögliche Gefahr diskutiert (Hanisch, 2002; Buckwalter und Wyss-Coray, 2004; Minghetti, 2005). Diese aktivierten Zellen können immunkompetent werden, MHC Moleküle der Klasse I und II sowie den Komplement-Rezeptor exprimieren und Zytokine sekretieren. Sie sind Hauptkandidaten für intrinsische Antigen-präsentierende Zellen (APZ) des ZNS, denn sie können auch sogenannte kostimulatorische Moleküle wie LFA-3 (Leukozytenfunktion Assoziiertes Antigen-3), ICAM (Intercelluläres Adhesionsmolekül) -1 und B-7 exprimieren (O'Keefe et al., 2002). Auf diese Weise sind sie vermutlich an der Rekrutierung von Lymphozyten in das ZNS beteiligt. Ob die infiltrierenden Lymphozyten in allen Fällen den Krankheitsprozess beschleunigen oder dem Organismus hilfreich sind ist allerdings nicht geklärt. Außerdem gibt es Hinweise für direkte protektive Funktionen der Mikroglia wie z.B. durch Sekretion neurotropher Faktoren (Schwartz, 2003; Correale und Villa, 2004; Schwartz und Kipnis, 2005).

4 Peroxisomen

Peroxisomen sind ubiquitär vorkommende, phylogenetisch alte Zellorganellen, die in fast jedem eukaryotischen Zelltyp vertreten sind. Ihren Namen verdanken sie einer Reihe peroxidativer Matrixenzyme (Plattner und Hentschel, 2002). Nur der in Pflanzenzellen vorkommende Typ, die Glyoxysomen, enthält keine Flavinoxidase und Katalase (Tolbert, 1981). Bei peroxidativen Reaktionen fällt häufig Wasserstoffperoxid an, das sofort von der im Peroxisom lokalisierten Katalase zu Wasser und Sauerstoff entgiftet wird. Inzwischen sind dem Peroxisom mehr als 60 Enzyme zugeordnet, wovon Katalase, Uratoxidase und D-Aminosäure-Oxidase zu den sogenannten Leitenzymen tierischer Peroxisomen gehören (Dansen und Wirtz, 2001; Plattner und Hentschel, 2002).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Gehirn junger Ratten haben gezeigt, dass in den ersten beiden postnatalen Wochen der Entwicklung Peroxisomen in allen Gebieten des ZNS zahlreich, in späteren Entwicklungsstadien reduziert und in manchen Gebieten so gut wie nicht vertreten sind (Arnold und Holtzman, 1978).

Weitere fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Analysen zeigten nur wenige Peroxisomen im adulten Cerebrum und Cerebellum, substantielle Mengen hingegen in bestimmten Subgruppen von Neuronen, z.B. einigen der Medulla oblongata (McKenna et al., 1976). In Neuronen waren sie hauptsächlich im Perikaryon lokalisiert, in den Axonen nur selten. Auch in Astrozyten sind nur wenige in der Nähe des Nukleus sowie in ihren Fortsätzen und Endfüßchen gefunden worden. Während der aktiven Myelinisierung ist ein starkes Vorkommen in den Fortsätzen, einschließlich der myelinisierenden Enden, von Oligodendrozyten nachweisbar (Arnold und Holtzman, 1978). Dort kommen sie in allen Zellkompartimenten, im Zellkörper, den Fortsätzen und im zytoplasmatischen adaxonalen Bereich des Myelins vor. Außerdem gibt es viele in den Ependymzellen des dritten und vierten Ventrikels (McKenna et al., 1976; Arnold und Holtzman, 1978). Die Anzahl von Peroxisomen in Oligodendrozyten ist laut dieser Untersuchungen etwa 40 mal so hoch wie in Neuronen oder Astrozyten. Oligodendrozytäre Peroxisomen sind auffällig klein und werden daher als Mikroperoxisomen bezeichnet (Holtzman et al., 1973). Auch im adulten ZNS sind Peroxisomen in Oligodendrozyten besonders stark vertreten. Dies wurde anhand enzymatischer Aktivitätsmessungen von Katalase in präpariertem Hirngewebe der Ratte gezeigt (Adamo et al., 1986).

Anzahl und Größe (0,1 bis 1 μ m) von Peroxisomen sowie die Enzymausstattung der peroxisomalen Matrix ist je nach Zelltyp und Entwicklungsstand sehr variabel (Plattner und Hentschel, 2002). Peroxisomen in Leber- und Nierenzellen sind groß und mit relativ vielen Entgiftungsenzymen ausgestattet. Das Organell ist von einer einfachen Membran begrenzt. In Fibroblasten wurde mithilfe eines pH-sensitiven Fluorophors ein alkalischer pH (8,1) der peroxisomalen Matrix nachgewiesen (Dansen et al., 2000). Hierzu lieferten (Lasorsa et al., 2004) widersprüchliche Daten. Sie wiesen einen sauren peroxisomalen pH in Hefezellen nach. Während Untersuchungen zum pH in CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen einen dem des Zytosol entsprechenden pH ergaben (Jankowski et al., 2001). Ob diese Unterschiede lediglich Messfehler oder die Existenz heterogener Peroxisomenpopulationen widerspiegeln, ist nicht geklärt. Im Peroxisom laufen Reaktionen ab, die am Alkoholabbau und dem Östrogenstoffwechsel beteiligt sind, ebenso wie einige Teile der Cholesterolsynthese, sowie metabolische und katabole Prozesse bestimmter Aminosäuren. Einige Aufgaben wie die β -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren

(VLCFA), Teile der Synthese ethergekoppelter Lipide (u.a. Plasmalogene) und die Synthese der Gallensäure scheinen ausschließlich im Peroxisom stattzufinden (Barth et al., 2001). Teilweise werden peroxisomale Funktionen redundant von anderen Organellen übernommen, z.B. die β -Oxidation bestimmter Fettsäuren auch von Mitochondrien (Reddy und Mannaerts, 1994). Ob es einen Vorteil der peroxisomalen β -Oxidation im Vergleich zur mitochondrialen gibt, ist nicht klar. Es wird aber angenommen, dass die peroxisomale gegenüber der mitochondrialen β -Oxidation einen Vorteil hat, der die (um 6%) verminderte ATP-Ausbeute rechtfertigen würde (Tolbert, 1981). Möglicherweise findet intrazelluläre Kommunikation zwischen Mitochondrien und Peroxisomen statt, da interessanterweise in manchen Patientengeweben verschiedener peroxisomaler Krankheiten auch die Mitochondrien strukturell abnorm sind (Hughes et al., 1990; Baumgart et al., 2001; Powers et al., 2001).

5 Peroxisomenbiogenese

In Trypanosomen konnte die Proliferation von Peroxisomen induziert werden. (Lorenz et al., 1998). Neue Peroxisomen entstehen durch Knospung aus unreifen Peroxisomen, wachsen und erhalten währenddessen ihre komplette Enzymausstattung (Terlecky und Fransen, 2000). Als zweite mögliche Variante wird die *De novo*-Entstehung aus dem Endoplasmatischen Retikulum diskutiert (Waterham et al., 1993; Geuze et al., 2003; Tabak et al., 2003; Hoepfner et al., 2005). Mechanismen bei der Bildung der peroxisomalen Membran und dem peroxisomalen Proteinimport sind voneinander unabhängig. Dies wurde klar, als man in Fibroblastenzellen von Patienten mit einer peroxisomalen Erkrankung peroxisomale Geister fand. Diese wiesen eine intakte peroxisomale Membran auf aber eine unvollständige Matrixproteinpopulation (Santos et al., 1988). Fast alle der in der Matrix befindlichen Enzyme tragen eine peroxisomale Aminosäuresignalsequenz, PTS1 („Peroxisomal Targeting Signal“; (Gould et al., 1989; Miura et al., 1992) oder PTS2 (Swinkels et al., 1991; Chudzik et al., 2000). Diese werden von zytoplasmatischen Rezeptoren erkannt, und die Proteine posttranslational und, im Gegensatz zu dem Importmechanismus anderer Zellorganellen, in ihrer funktionellen Tertiärstruktur in das Peroxisom transloziert (Rachubinski und Subramani, 1995; Gould und Collins, 2002). Gene, deren Produkte

an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind, werden als PEX-Gene bezeichnet, ihre Genprodukte als Peroxine. Inzwischen sind 15 PEX-Gene des humanen und mehr als 20 des Hefe Genoms bekannt.

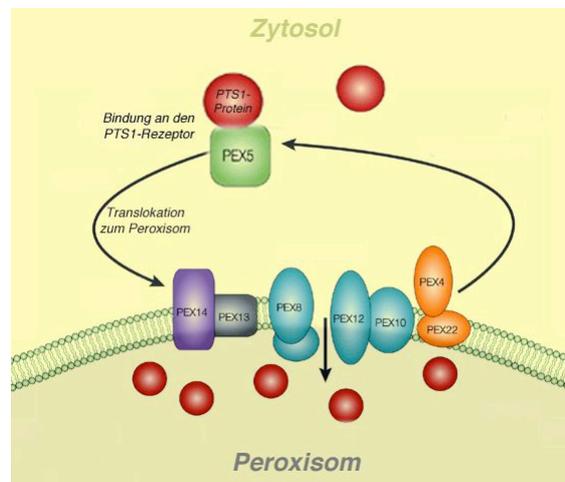


Abb. 2: Darstellung des PEX5-vermittelten Proteintransports in das Peroxisom

Der zytosolische Rezeptor PEX5 bindet Proteine mit PTS1-Sequenz und ist an deren Translokation in die peroxisomale Matrix beteiligt (modifiziert nach Gould und Collins, 2002).

Eine Schlüsselfunktion unter den PEX Genen nimmt PEX5 ein. Sein Genprodukt, Peroxin 5, ist der zytoplasmatische Rezeptor des PTS 1 (McCollum et al., 1993). Durch alternatives Spleißen von Exon 8 (111 bp) existieren zwei Isoformen von Peroxin 5, Pex5L und Pex5s. Beide sind am Import der PTS 1 Proteine beteiligt. Die größere Isoform (Pex5L) spielt in Säugetierzellen durch Bindung an den PTS 2 Rezeptor (PEX 7) auch eine Rolle beim Import von PTS2-Proteinen. Daher gelangen weder PTS1- noch PTS2-tragende Proteine in das Peroxisom PEX5-defizienter Zellen (Gould und Collins, 2002). Die Primärsequenz von Peroxin 5 ist 602 Aminosäuren lang. Darin liegen 8 Tetratricopeptid-Wiederholungen, Motive für die Interaktion zwischen Proteinen (Blatch und Lassel, 1999).

6 Peroxisomale Krankheiten

Peroxisomale Erbkrankheiten lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Bei denen der ersten Gruppe ist die Biogenese des Peroxisoms gestört. Meist ist eins der Peroxine mutiert, was zu Störungen in multiplen peroxisomalen enzymatischen Funktionen führt. Die zweite Gruppe zeichnet sich durch strukturell normale Peroxisomen mit einem einzelnen defekten Enzym aus (Schutgens et al., 1986). In 9

von 11 peroxisomalen Krankheiten liegen Störungen im Metabolismus von überlangkettigen Fettsäuren und Etherphospholipiden vor (Moser et al., 1991). In fast allen bekannten peroxisomalen Krankheiten ist das Nervensystem betroffen (Powers und Moser, 1998). Bei 10 der 12 bekannten Peroxisomalen Biogenese Krankheiten („Peroxisomal Biogenesis Disorders“, PBD) ist das mutierte Gen identifiziert. Alle 12 Erbkrankheiten führen zu sehr ähnlichen Symptomen. Insgesamt werden diese in vier phänotypische Subgruppen eingeordnet, die sich hauptsächlich durch die Schwere der Erkrankung unterscheiden. Das Zellweger Cerebro-Hepato-Renale Syndrom ist die schwerste aller peroxisomalen Krankheiten (Moser et al., 1991). Nahezu alle Organe sind dysfunktional. Betroffene Kinder überleben üblicherweise nicht länger als 4 Monate. Die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) nimmt eine Zwischenstellung ein. Die Infantile Refsum Krankheit ist die schwächste der PBD (Moser, 1999). Bei allen als PBD bekannten Krankheiten ist die Peroxisomenzahl reduziert. Außerdem zeigen die Organellen einen bestimmten Satz biochemischer und struktureller Abweichungen.

In vielen neurologischen Erkrankungen werden Veränderungen des Plasmalogengehalts gemessen. Dies könnte besonders bei peroxisomalen Krankheiten aufgrund verringerter Syntheseraten bzw. durch Stimulation der Phospholipase A₂ hervorgerufen werden (Farooqui und Horrocks, 2001). Neuronale Membranen enthalten drei Hauptgruppen von Lipiden: Cholesterol, Glykolipide und Phospholipide. Phospholipide machen 20-25 % der Trockenmasse des Gehirns aus (Farooqui und Horrocks, 2001). Typischerweise sind sie aus einer polaren Kopfgruppe, Glycerol und hydrophoben langen Kohlenstoffketten aufgebaut. Eine der 5 Klassen der Phospholipide des Gehirns sind die Plasmalogene. Sie sind 1-alkenyl-2acyl-Phosphoglyceride. Die Enoletherdoppelbindung an der sn-1 Position macht sie für ungepaarte Elektronen von Radikalen sehr empfänglich, wodurch sie antioxidativ wirken können (Yavin und Gatt, 1972). Die antioxidative Kapazität eines Mols Plasmalogene entspricht nur einem Fünfundzwanzigstel eines Mols Vitamin E. Allerdings sind Plasmalogene in Biomembranen fünfundzwanzig- bis hundertfach so oft vertreten wie das Vitamin (Calzada et al., 1997; Hahnel et al., 1999). Die sn-2 Position ist mit ungesättigten Fettsäuren der n-3 oder n-6 Familie essentieller Fettsäuren angereichert (Arachidonsäure). Vermutlich fungieren Plasmalogene auch als Quelle mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Sie kommen in allen Säugetierzellen

vor und machen den größten Teil der Phospholipide im Gehirn, Testis, Herz, Makrophagen und Tumoren aus (Cook et al., 1991). Einen besonders hohen Anteil (70% der Ethanolamin-Glycerophospholipide) haben sie im Myelin (Farooqui und Horrocks, 2001). Sie sind strukturelle Bestandteile von Membranen, dienen der Zelle als „second messenger“-Reservoir und sind an Membranfusionen sowie an Ionentransport und Cholesterolefflux beteiligt. Generell tragen Phospholipide zur Membranfluidität und Ionenpermeabilität bei. Außerdem werden sie für die reguläre Funktion integraler Membranproteine benötigt. Die ersten Schritte der Plasmalogensynthese erfolgen im Peroxisom, wo die ersten drei Enzyme, die Dihydroxyazetonphosphat- Acyltransferase (DAPAT), Alkyldihydroxyazetonphosphat-Synthase und Acyl/Alkyl-Dihydroxyazeton-Reduktase) lokalisiert sind. Die restlichen Enzyme für die Plasmalogensynthese liegen im endoplasmatischen Retikulum (Paltauf, 1994; Lee, 1998). Nach der Synthese werden Plasmalogene über Phospholipid-Austauschproteine zur Membran transportiert (Voelker, 2003).

Fettsäuren des Nervengewebes liegen hauptsächlich in Form komplexer Lipide vor, aber auch kovalent an Proteine gebunden, z.B. an das Proteolipidprotein (Bizzozero et al., 1991). Nur kleine Mengen kommen frei vor. Trotzdem sind diese wegen ihres dynamischen Metabolismus von Bedeutung. Ihre Synthese wird von einem zytoplasmatischen Enzymkomplex katalysiert, dessen Hauptprodukt Palmitat (C16:0) ist. Die Kettenverlängerung der Fettsäuren scheint nicht im Zytoplasma sondern in Organellen wie den Mitochondrien abzulaufen (Sastry, 1985). Überlangkettige Fettsäuren („Very Long Chain Fatty Acids“, VLCFA) bezeichnen Fettsäuren, deren Carbongerüst von 24 bis 30 C-Atomen gebildet wird. Sie werden speziell in den Peroxisomen abgebaut. Bei den meisten peroxisomalen Krankheiten finden sich bedeutende Mengen akkumulierter VLCFA in verschiedenen Geweben der Patienten. Es wird kontrovers diskutiert, ob diese nur biochemische Marker darstellen oder Auslöser der Krankheiten sind (Theda et al., 1992; Kobayashi et al., 1997; van Geel et al., 1999; Paintlia et al., 2003). Für peroxisomale Krankheiten wurden erhöhte VLCFA-Werte in Membranen des Myelins nachgewiesen. Deshalb wird ein destabilisierender Effekt auf das Myelin für möglich gehalten, der eine Dys- oder Demyelinisierung verursacht (Bizzozero et al., 1991; Ho et al., 1995; Powers et al., 2000).

7 Die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie

Die am häufigsten diagnostizierte Leukodystrophie ist die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD). Die Symptome traten bei den Patienten bisher frühestens im Alter von vier Jahren auf. Bei dieser Erkrankung ist nicht die Peroxisomenbiogenese gestört, sondern ein peroxisomales Membranprotein mit bislang unbekannter Funktion. Ähnliche Symptome bei Neugeborenen führten zu dem Namen der Neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD). Die NALD gehört allerdings zur Gruppe der peroxisomalen Biogenese-Krankheiten (Goldfischer und Reddy, 1984).

7.1 Das Adrenoleukodystrophie-Protein

Das bei der X-ALD betroffene Gen liegt auf dem X-Chromosom (Xq 28) und kodiert für einen 745 Aminosäuren langen ABC-Halbtransporter, das Adrenoleukodystrophieprotein (ALDP; Mosser et al., 1993; Mosser et al., 1994). Dies ist ein integrales Membranprotein des Peroxisoms (Contreras et al., 1994), das zu einer Subfamilie von vier ABC-Halbtransportern gehört. Dazu gehören auch PMP-70 (Peroxisomales Membranprotein 70; Kamijo et al., 1990), ALDRP (ALD related Protein; Lombard-Platet et al., 1996), und P70R („PMP-70 related Protein“; Holzinger et al., 1997). ALDRP weist die höchste Homologie zu ALDP auf. Hinsichtlich ihrer Funktion bei der β -Oxidation von VLCFA wurde beiden Proteinen teilweise redundante Funktion zugeschrieben. Dies ging aus Experimenten hervor, in denen Fibroblasten von X-ALD-Patienten mit ALDRP-cDNS oder PMP70-cDNS transfiziert wurden (Kemp et al., 1998). Außerdem führte 4-PBA- (4-Phenylbutyrat) Fütterung ALDP-defizienter Mäuse zu verstärkter Expression des ALDRP und zur Steigerung der β -Oxidation von VLCFA (Kemp et al., 1998). In Koimmunopräzipitations- und Hefe-zwei-Hybrid-Systemstudien wurde die Homo- und Heterodimerisierung von ALDP mit ALDRP und PMP-70 gezeigt (Liu et al., 1999). Anhand konfokaler Fluoreszenzmikroskopie fand man heraus, dass die Expressionsmuster von ALDP im ZNS von Maus und Mensch vergleichbar sind. Dazu wurden humanes postmortem Gewebe und Gehirnzellen, die aus Biopsien von X-ALD-Patienten stammten, nach immunchemischer Detektion von ALDP, anderen peroxisomalen, sowie glialen und neuronalen Markerantigenen untersucht. Hierbei wurden Peroxisomen in allen Zelltypen, einschließlich der Neuronen, nachgewiesen. Dagegen waren ALDP-positive Peroxisomen auf Astrozyten, Mikroglia, die weiße Substanz und

Endothelzellen beschränkt. Nur Oligodendrozyten prominenter Strukturen weißer Substanz (Corpus Callosum, Interne Kapsel, Anteriore Kommissur) zeigten eine ähnlich hohe Expression wie Astrozyten (Fouquet et al., 1997). Die homologen Proteine ALDRP und PMP-70 sind dagegen auch in neuronalen Peroxisomen lokalisiert (Troffer-Charlier et al., 1998).

Der molekulare Pathomechanismus der X-ALD sowie die Funktion des ALDP sind bislang ungeklärt. Von den inzwischen über 550 verschiedenen bekannten Mutationen des ALD-Gens (Lazzarini, 2004), ist das Protein in 75 % der Fälle nicht messbar. Die unterschiedliche Ausprägung des klinischen Phänotyps hängt nicht mit der Art der Mutation zusammen (Braun et al., 1995; Dubois-Dalcq et al., 1999). Demnach kann ein dominant negativer Effekt des mutierten ALD-Proteins ausgeschlossen werden. 1984 zeigten Singh et al., dass in Fibroblastenzelllinien von X-ALD-Patienten die Kapazität zur β -Oxidation der VLCFA eingeschränkt ist (Singh et al., 1984). Dann wurde durch Messungen enzymatischer Aktivität an aufgereinigten Peroxisomen von diesen Fibroblasten gezeigt, dass der erste Schritt der β -Oxidation von VLCFA nur reduziert abläuft (Wanders et al., 1988), aber ab dem zweiten Schritt normal fortgeführt wird (Hashmi et al., 1986). Das Enzym, das diesen ersten Schritt katalysiert, die VLCS (VLCFA-Acyl-CoA-Synthetase), wurde daraufhin in Patientenfibroblasten untersucht. Mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Immunogold-Elektronenmikroskopie, wurde die korrekte VLCS-Lokalisation innerhalb der peroxisomalen Matrix in den Fibroblasten von ALD-Patienten nachgewiesen (Steinberg et al., 1999; Smith et al., 2000). Trotzdem konnte durch Überexpression der VLCS in ALDP-defizienten Zellen die β -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren gesteigert werden (Heinzer et al., 2002). Eine Annahme war daraufhin, dass der VLCFA-Transport in das Peroxisom ALDP-abhängig sein könnte. Nachforschungen an Patientenfibroblasten, die den Import der VLCFA in die Peroxisomen zeigten, widerlegten diese These (Singh et al., 1992). Bezüglich der β -Oxidation waren neuere Publikationen kontrovers zu älteren Daten. So wurden von kultiviertem Gewebe ALDP-defizienter Mäuse, sowie von Patienten- und Mauszellen trotz erhöhter VLCFA-Werte normale β -Oxidationsraten gemessen (McGuinness et al., 2003). Umgekehrt ergab die Analyse einer VLCS-defizienten Maus zwar eine reduzierte peroxisomale β -Oxidationsrate, führte aber nicht zur Erhöhung der VLCFA-Werte (Heinzer et al., 2003). Aus diesen Ergebnissen, leitete sich die

Vermutung ab, dass die typische VLCFA-Akkumulation in ALDP-defizienten Zellen und Geweben nicht das Resultat inhibierter peroxisomaler β -Oxidation sei. Damit im Einklang stehen erst kürzlich veröffentlichte Daten, die eine erhöhte Syntheserate von VLCFA in Patientenzelllinien zeigten (Kemp et al., 2005).

7.2 Symptomatik der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie

Aus medizinischer Sicht werden bei der X-ALD zwei Subtypen unterschieden: Die cerebrale Form der X-ALD (cALD) ist durch neurologische Symptome im Kleinkindalter (4-12 Jahre) und eine entzündliche Demyelinisierung der cerebralen und cerebellaren weißen Substanz gekennzeichnet (Myelopathie). Bei Patienten der adulten Form (Adrenomyeloneuropathie, AMN) treten neurologische Symptome in der zweiten bis dritten Dekade auf. Bei ihnen sind auf- und absteigende myelinisierte Fasern des Rückenmarks und in geringerem Umfang auch periphere Nerven betroffen (Lazzarini, 2004).

40% der männlichen Träger einer ALDP-Mutation entwickeln den Typ der cALD (Dubois-Dalcq et al., 1999). Bei ihnen macht sich die Krankheit meistens zuerst als Lernbehinderungen bemerkbar. Es häufen sich Wahrnehmungs- und Konzentrationsstörungen. Als nächstes folgen Koordinationsstörungen, die manchmal von Anfällen begleitet werden und zu starken Gehbehinderungen werden können. Der weitere Verlauf ist nicht selten mit dem Verlust von Lang- und Kurzzeitgedächtnis verbunden. Seh- und Hörbehinderungen treten ein, die sich bis zur völligen Taubheit und Blindheit entwickeln können. Hinzu kommen Verhaltens- und Persönlichkeitsveränderungen. Ein normaler Junge kann innerhalb weniger Monate durch die Krankheit in ein vegetatives Stadium gelangen.

50% der Betroffenen bemerken die Krankheit erst im Alter zwischen 20 und 30 Jahren (AMN; Dubois-Dalcq et al., 1999). In den meisten Fällen leiden die jungen Männer an spastischen Lähmungen der Beine, die zu unterschiedlich stark ausgeprägten Gehbehinderungen werden können, begleitet von moderatem Verlust des Gefühlssinns. Weitere Probleme sind Inkontinenz, Impotenz, in manchen Fällen kognitive Defekte, emotionale Störungen und Depressionen. Üblicherweise handelt es sich bei der AMN um eine langsam progressive Entwicklung, die sich über mehrere Jahrzehnte erstreckt.

5% der Männer mit Mutation des ALD-Gens leben bis ins hohe Alter neurologisch asymptomatisch (Roels, 2003).

Ca. 30 % der Frauen mit heterozygot mutiertem ALD-Gen entwickeln im Alter zwischen 30 und 40 Jahren eine milde Variante des AMN-Phänotyps. Eine kompensatorische Erhöhung der Expressionsrate des intakten ALD-Gens wurde bei den Frauen nicht nachgewiesen. Die Ausprägung des klinischen Phänotyps korreliert mit dem Verhältnis von ALDP-negativen zu ALDP-positiven Fibroblasten der Patientinnen (Dubois-Dalcq et al., 1999).

Sowohl bei den älteren als auch bei den jüngeren Patienten werden die neurologischen Symptome von den Auswirkungen einer Nebennierendegeneration begleitet, die zu stark eingeschränkter Hormonproduktion der adrenalen Drüsen führt (Morbus Addison). Der Krankheitsverlauf ist absolut variabel und korreliert nicht mit den bekannten biochemischen Markern oder Mutationen. Deshalb wird über die Existenz möglicher modifizierender Gene diskutiert. Weiterhin wurde man auf die mögliche Bedeutung epigentischer Faktoren aufmerksam, als Fälle eineiiger Zwillinge mit extrem unterschiedlichem Krankheitsverlauf publiziert wurden (Sobue et al., 1994; Korenke et al., 1996). Auch Kopfverletzungen können Auslöser für den Krankheitsausbruch sein. Es ist mehrfach berichtet worden, dass erste demyelinisierende Erscheinungen direkt in Folge einer Kopfverletzung an eben der Verletzungsstelle auftraten (Wilkinson et al., 1987).

Ein spezifischer biochemischer Marker der X-ALD ist die Akkumulation bestimmter VLCFA (vornehmlich C26:0 und C25:0 der Cholesterolesterfraktionen) in jedem Gewebe (Moser et al., 1981). Diese ermöglicht eine frühe Diagnose und dadurch lebensverlängernde Therapie bezüglich der beeinträchtigten Nebennierenrindenfunktion. Die Herkunft der VLCFA wird kontrovers diskutiert (siehe 7.1). Weiterhin sind die Plasmalogen- und Cholesterol-Werte reduziert (Ramsey et al., 1976; Wilson und Sargent, 1993). Als zellbiologische Besonderheit der Krankheit sind kristalline trilamellare Einschlüsse zu nennen, die elektronenmikroskopisch in Makrophagen des Gehirns gefunden wurden (Dubois-Dalcq et al., 1999). Eine weiteres Charakteristikum stellt die Beteiligung des Immunsystems dar. Unter den Leukodystrophien wurden nur in der ALD und der GLD, neben reaktiven Astrozyten und Mikroglia, auch Lymphozyten (mehr T- als B-Zellen) in den Läsionen gefunden (Powers et al., 1992; Ito et al., 2001; Kaye, 2001).

Durch kernspintomographische Darstellung des Gehirns (Magnetische Resonanz Tomographie, MRT) von Patienten ist es möglich den Verlauf der Demyelinisierung zu verfolgen. Das typische T2-gewichtete Bild zeigt symmetrisch in beiden Hemisphären abnorme Signale, die meist in der parietooccipitalen Region beginnen und sich mit dem Fortschreiten der Krankheit zum frontalen Lobus ausbreiten (Dubois-Dalcq et al., 1999).

8 Mausmodelle peroxisomaler Krankheiten

Mithilfe der homologen Rekombination wurden verschiedene PEX-Gene oder solche, die peroxisomale Proteine kodieren, im Mausgenom eliminiert. Von der Inaktivierung des ALDP-Gens (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997) versprach man sich ein Mausmodell für die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie. Allerdings sind diese Mäuse bis zum Alter von 16 Monaten phänotypisch unauffällig. Lipidanalysen zeigten jedoch die von Patienten bekannte Akkumulation der überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA). Erst bei sehr alten Mäusen konnten leichte neurologische Defekte nachgewiesen werden. Histologisch wurden in Analysen alter Mäuse nur im PNS Auffälligkeiten im Verhältnis von Myelindicke zum Axondurchmesser gefunden und im Rückenmark kamen vereinzelt Auffälligkeiten in der Myelinstruktur vor. Der klinische Phänotyp kommt der menschlichen AMN-Form am nächsten (Pujol et al., 2002). Die Symptome treten in ALD*ALDRP doppelmutanten Mäusen früher auf und können durch Überexpression von ALDRP sogar auf ein niedrigeres Niveau als das der korrespondierenden einzel-nullmutanten Mäuse reduziert werden (Pujol et al., 2004).

Eine VLCS-nullmutante Maus wurde generiert, um der Frage auf den Grund zu gehen, ob der eigentliche Defekt der X-ALD, die eingeschränkte β -Oxidation der VLCFA sei. Bei diesen Mäusen konnte eine Reduktion der peroxisomalen β -Oxidation gemessen werden. Allerdings resultierte daraus nicht die erwartete Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren (Heinzer et al., 2003).

Die DAPAT- (Dihydroxyazetonphosphat-Acyltransferase) defiziente Maus, sollte ein Mausmodell für den rhizomelen Typ der Chondrodysplasia Punctata („Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata“, RCDP) werden. Obwohl die Plasmalogene erwartungsgemäß im Gehirn dieser mutanten Tiere fehlten, zeigten sie nur wenige

Krankheitssymptome, z.B. Infertilität und Störungen in der Augenentwicklung (Rodemer et al., 2003).

Die Inaktivierung des PEX5-Gens führte zu einem Mausmodell für das Zellweger Syndrom. Homozygote Tiere dieser Mauslinie sind nur wenige Tage lebensfähig und zeigten die von Menschen bekannte Retardierung aller Organe. Untersuchte biochemische Parameter wie erhöhter VLCFA- und gesenkter Plasmalogengehalt entsprachen den Beobachtungen bei Patienten. Auch der neuronale Migrationsdefekt und eine hohe Apoptoserate wurden nachgewiesen (Baes et al., 1997).

9 Zelltypspezifische Inaktivierung von Genen

Um die biologische Fragestellung nach der Funktion bestimmter Gene bzw. deren Genprodukte zu beantworten, ist es oft hilfreich, zu untersuchen wie sich Zellen, Gewebe oder der ganze Organismus ohne das betreffende Protein verändern. Die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ermöglicht es, Sequenzen aus dem Genom zu entfernen oder zusätzliche einzufügen. Mithilfe sogenannter konditionaler Geninaktivierung kann man den Zeitpunkt oder den Zelltyp für die Entfernung eines Gens bewusst bestimmen. Auf diese Weise lässt sich die Funktion eines Proteins z.B. im adulten Tier untersuchen, ohne die Entwicklung beeinflusst zu haben.

Ein Gen zelltypspezifisch zu inaktivieren, bietet sich z.B. in Fällen an, in denen die herkömmliche Eliminierung mithilfe der homologen Rekombination früh zum Tod führt. In solchen Fällen kann man sich das Cre/LoxP-System zunutze machen. Das Verfahren basiert auf dem Zusammenwirken von positionsspezifischen DNA-Rekombinationsstellen, die als LoxP-Sequenzen bezeichnet werden, und der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1. Eine LoxP-Sequenz besteht aus zwei palindromen 13 Basenpaare langen Erkennungssequenzen, die durch einen „Spacer“ getrennt sind. Die Cre-Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei LoxP-Sequenzen nach der spezifischen Bindung je eines Monomers an eine Erkennungssequenz (Lewandoski, 2001; Van Duyne, 2001). Man „floxt“ ein Gen, indem zwei LoxP-Sequenzen in das Genom derart inseriert werden, dass die zu eliminierende DNA-Sequenz von diesen flankiert wird, ohne das Gen in seiner

Funktion zu beeinträchtigen. Ist im Genom gleichzeitig die kodierende Sequenz für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zelltypspezifisch aktiven Promotors inseriert, wird diese nur in dem entsprechenden Zelltyp exprimiert. Dadurch findet die Cre-vermittelte Rekombination, also die Inaktivierung des Zielgens, nur in diesem Zelltyp statt.

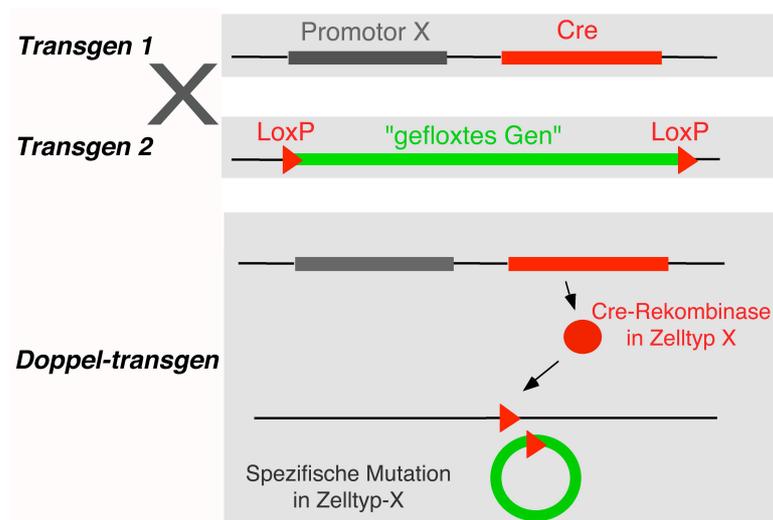


Abb. 3: Schematische Darstellung zelltypspezifischer Geninaktivierung durch das Cre/LoxP-System

Mauslinie mit Promotor X-gesteuerter Cre-Expression im Zelltyp X (oben). Mauslinie mit einem „gefloxten“ Gen (mitte). Nachkommen einer Verpaarung dieser beiden Mauslinien tragen das geflochte Gen und exprimieren Cre spezifisch im Zelltyp X (unten). Dadurch kommt es nur in diesen Zellen des Typ X zur Cre-vermittelten Rekombination (modifiziert nach C. Lappe-Siefke).

10 Zielsetzung der Dissertation

Die konventionelle Inaktivierung des ALDP-Gens in der Maus führte nicht wie bei der juvenilen X-ALD zu cerebraler Demyelinisierung. Da die Erkrankung beim Menschen nicht vor dem vierten Lebensjahr ausbricht, stellte sich die Frage, ob wegen der kurzen Lebensdauer von Mäusen keine Symptomatik auftrat. Außerdem sind bei X-ALD Patienten vor allem lipidreiche Gewebe des Körpers betroffen, wie die Nebennieren und weiße Substanz des Gehirns. Dies deutete auf eine natürliche „gewebsspezifische“ Störung bei der X-ALD hin. Dadurch ergab sich die Hypothese, dass dauerhafte ALDP-Defizienz bei starkem Lipid-Umsatz zusätzliche Störung peroxisomaler Funktionen hervorrufen könnte. Laut dieser Hypothese müsste eine künstlich hervorgerufene zelltypspezifische Peroxisomendysfunktion in

Oligodendrozyten von Mäusen zum neurologischen Krankheitsbild der juvenilen X-ALD führen. Aus dem Grund sollte mittels Cre/LoxP-System eine Mauslinie mit Oligodendrozyten-spezifischer Peroxin 5-Defizienz generiert werden, die möglicherweise als Tiermodell für die X-ALD dienen könnte. In diesen Tieren sollten die Cre-vermittelte Rekombination in Oligodendrozyten, daraus resultierende Folgen für peroxisomale Biogenese und Peroxisomenfunktion sowie Myelinisierung und der Erhalt des Myelins überprüft werden. Mögliche neurodegenerative Prozesse sollten im Verlauf vergleichend mit dem von Patienten analysiert werden. Besondere Aufmerksamkeit bei der Analyse sollte den charakteristischen Merkmalen der X-ALD zukommen. Dazu gehören der beinahe symmetrische Verlauf der Demyelinisierung, die stark erhöhten VLCFA-Werte, die verminderte Plasmalogenkonzentration sowie eine inflammatorische Komponente. Zur Untersuchung sollten biochemische, immunzytochemische und histologische Methoden sowie klinische bildgebende Verfahren dienen.

II Ergebnisse

Verschiedene Mutationen des peroxisomalen Adrenoleukodystrophie-Proteins führen beim Menschen zur X-chromosomal vererbten Adrenoleukodystrophie (X-ALD), deren juvenile Form durch eine stark progressive subcortikale Demyelinisierung gekennzeichnet ist (Lazzarini, 2004). Die konventionelle Deletion des homologen Gens in der Maus führte zu einer milden Variante dieser Erkrankung (Adrenomyeloneuropathie, AMN; Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997), die erst im spät adulten Stadium einsetzt, hauptsächlich die langen Bahnen des Rückenmarks betrifft und nur langsam progressiv ist (Powers et al., 2000). Zwei Hypothesen waren Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit:

1. Bei der X-ALD verursachen ALDP-Mutationen speziell in lipidreichen Geweben sekundär weitere peroxisomale Defekte.

2. Die Peroxisomen der Oligodendrozyten spielen eine bedeutende physiologische Rolle für den Erhalt des Myelins.

Zusammen führten beide Hypothesen zu der Annahme, dass besonders die weiße Substanz bei der X-ALD von sekundärem Verlust peroxisomaler Funktionen betroffen sein könnte, wodurch es zur Demyelinisierung kommen könnte. Um diese Annahme zu verfolgen, bestand die Aufgabe der vorliegenden Arbeit in der Generierung einer Mauslinie mit defekten Peroxisomen in myelinbildenden Zellen. Das so generierte Mausmodell sollte vergleichend zur menschlichen X-ALD analysiert werden.

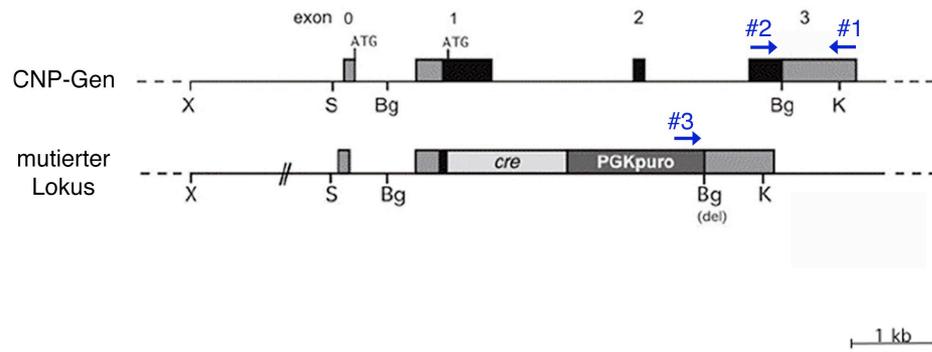
1 Herstellung einer Mauslinie mit defekter Peroxisomenbiogenese in myelinbildenden Zellen

Peroxin 5 (PEX5) ist ein essentieller, ubiquitär exprimierter, peroxisomaler Biogenesefaktor. Als zytoplasmatischer Rezeptor bindet er Proteine mit peroxisomaler Lokalisationssequenz 1 („Peroxisomal Targeting Signal 1“; PTS1) und ist an deren Translokation in die peroxisomale Matrix beteiligt (Gould und Collins, 2002). Für PEX5-defiziente Zellen war ein unvollständiger Satz peroxisomaler Matrixenzyme (McCollum et al., 1993) und stark eingeschränkte Peroxisomenfunktion nachgewiesen worden (Zoeller und Raetz, 1986). Um eine Mauslinie mit defekten Peroxisomen in myelinbildenden Zellen zu generieren, sollte

daher PEX5 mithilfe des Cre/LoxP-Systems zelltypspezifisch ausgeschaltet werden. Dazu wurde eine Mauslinie, deren Cre-Expression von regulatorischen Elementen des myelinspezifischen CNP- (2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase) Gens kontrolliert wird (hergestellt von C. Lappe-Siefke, AG Nave ; Abb. 4 A; Lappe-Siefke et al., 2003), mit einer Mauslinie verpaart, bei der Exone 11 bis 14 des PEX5-Gens „gefloxt“ worden waren (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Baes; Baes et al., 2002; Abb. 4 B). Diese Exone kodieren für den Bereich des Proteins, der die Protein-Protein-Interaktion zwischen PEX5 und seinem Substrat vermittelt. Daher sollte die Cre-vermittelte Deletion zur Inaktivierung von PEX5 führen. Die CNP-Expression beginnt an Embryonaltag 11 und ist weitgehend auf myelinbildende Zellen beschränkt (Scherer et al., 1994; Gravel et al., 1998; Belachew et al., 2001). Wegen Steuerung der Cre-Expression durch den CNP-Promotor wurde dasselbe Expressionsmuster für die Cre-Rekombinase erwartet.

Der Genotyp der Mäuse wurde mithilfe von PCR-Analysen auf genomische Maus-DNS bestimmt (Abb. 5 A, B). Die Primer #1 und #2 (Abb. 4) führen zur Amplifikation eines 1160 bp großen Fragments des CNP-Wildtypallels, während die Primer #1 und #3 zur Amplifikation eines 890 bp Fragments des veränderten Allels führen (Lappe-Siefke et al., 2003). Die Primer #4 und #5 (Abb. 4 B) führten zur Amplifikation eines 400 bp großen Fragments des PEX5-Wildtypallels und zu einem um 50 bp größeren PCR-Produkt bei inserierter LoxP-Sequenz.

A



B

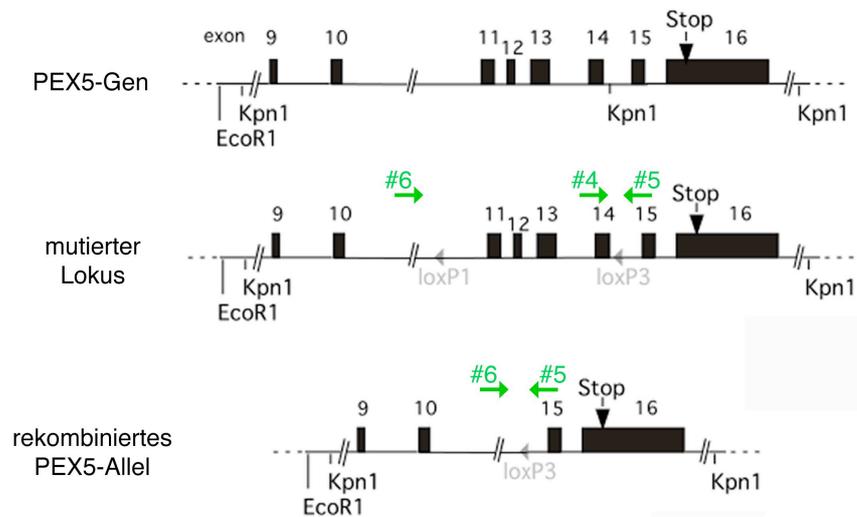


Abb. 4: Schematische Darstellung der Wildtyp- und der veränderten Gen-Struktur des PEX5- und des CNP-Lokus

(A) Wildtyp CNP-Gen (oben), veränderter CNP-Lokus (unten). Primer #1, #2 und #3 wurden für Genotypisierungs-PCR-Analysen eingesetzt (modifiziert nach Lappe-Siefke et al., 2003). (B) PEX5-Wildtypallel (oben), „gefloxter“ PEX5-Lokus (mitte) und rekombiniertes Allel (unten). Primer #4 und #5 wurden für Genotypisierungs-PCR-Analysen verwendet, Primer #5 und #6 für den Nachweis Cre-vermittelter Rekombination (modifiziert nach Baes et al., 2002).

Tiere mit den möglichen Kombinationen beider mutierter Genloki wurden in der nach Mendel zu erwartenden Verteilung geboren. Geschwisterverpaarungen der doppelt-heterozygoten F1-Generation erzeugten konditionale PEX5-defiziente Mäuse mit homozygot „gefloxtem“ PEX5-Gen und heterozygoter Cre-Rekombinase-kodierender Sequenz sowie heterozygotem CNP-Wildtypallel (CNP+/Cre*PEX5^{flox/flox}, im folgenden als kPEX5^{-/-} bezeichnet). Bei Kontrolltieren war im Unterschied dazu das PEX5-Gen nicht (CNP+/Cre*PEX5^{+/+}) oder nur heterozygot (CNP+/Cre*PEX5^{+/flox}) „gefloxte“, oder das Wildtyp-CNP-Gen lag auf beiden Allelen vor (CNP+/+*PEX5^{flox/flox}).

2 Biogenese und Funktion von Peroxisomen in Oligodendrozyten konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Zunächst wurde molekularbiologisch, immunzytochemisch und immunhistochemisch die Cre-vermittelte Rekombination und deren Spezifität untersucht. Außerdem sollte nachgewiesen werden, ob PEX5-Defizienz in Oligodendrozyten zu defekter Peroxisomenbiogenese und zu defekter Peroxisomenfunktion führt.

2.1 Cre-vermittelte Rekombination des PEX5-Gens

Mithilfe von PCR-Reaktionen auf genomische DNS adulter CNP-Cre**flox*PEX5-Tiere wurde der Nachweis über die Cre-vermittelte Rekombination erbracht. Da Cre im *flox*PEX5-mutierten Locus zur Exzision der Exone 11 bis 14 des PEX5-Gens führt, kann mit den Primern #5 und #6 (Abb. 4), die die gefloxt Sequenz flankieren, Rekombination an LoxP-Sequenzen nachgewiesen werden (Abb. 5).

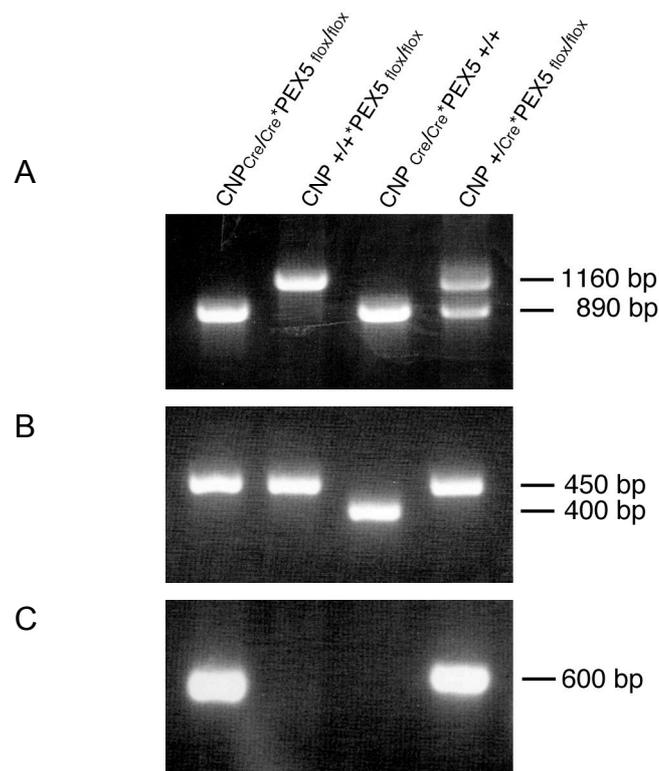


Abb. 5: Molekularbiologischer Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination

PCR-Analysen auf genomische DNS adulter CNP-Cre**flox*PEX5-Mäuse. **(A)** Genotypisierung des CNP-Lokus mit Primern #1, #2 und #3. Das CNP-Wildtypallel dient als Matrize eines 1160 bp großen PCR-Produkts. Das CNP-Cre-Allel dient als Matrize eines 890 bp großen PCR-Produkts. **(B)** Genotypisierung des PEX5-Lokus mit Primern #4 und #5. Das „gefloxt“ Allel ist um 50 bp länger als das PEX5-Wildtypallel. **(C)** Amplifikation mit Primern #5 und #6 des 600 bp DNS-Fragments nach Cre-vermittelter Rekombination. Das PCR-Produkt wurde nur bei Tieren amplifiziert, deren beide Gen-Loki verändert waren. Die Lokalisation der Primer ist Abb. 4 zu entnehmen.

Die konditionale Inaktivierung von PEX5 wurde in primären Oligodendrozyten mithilfe immunzytochemischer Färbungen an kultivierten Hirnzellen neonataler konditionaler PEX5-mutanter Mäuse nachgewiesen. Die Färbungen zeigten, dass Oligodendrozyten die Cre-Rekombinase exprimierten und PEX5-defizient waren, während Fibroblasten derselben Kultur keine Cre- aber PEX5-Expression aufwiesen (Abb. 6).

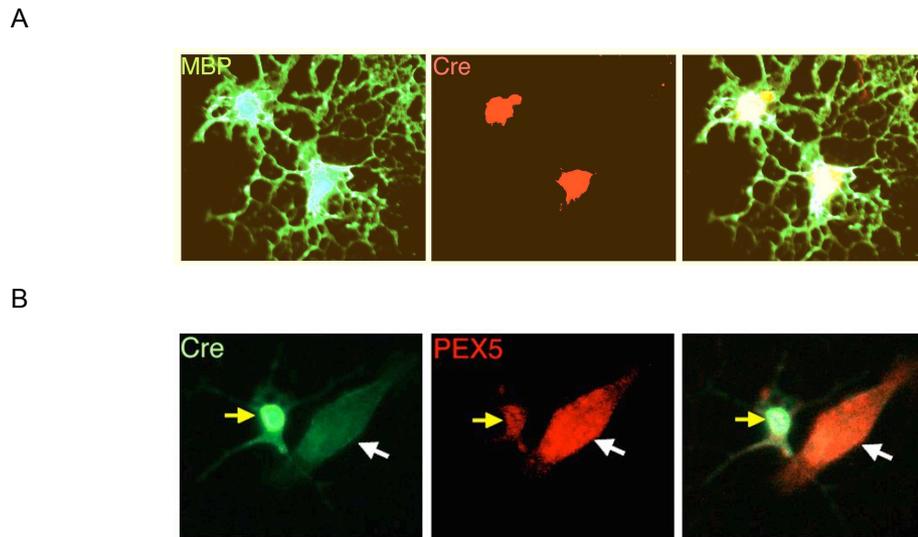


Abb. 6: Immunzytochemischer Nachweis Cre-vermittelter PEX5-Inaktivierung in Oligodendrozyten

Doppelimmunfluoreszenzfärbung an kultivierten Gehirnzellen neonataler konditionaler PEX5-mutanter Mäuse. **(A)** Oligodendrozyten koexprimieren myelinspezifisches MBP und Cre-Rekombinase. **(B)** Verwendung von Cre- und PEX5-spezifischen-Antikörpern zeigt PEX5-Defizienz Cre-exprimierender Zellen (gelber Pfeil), während eine Fibroblastenzelle nicht Cre- aber PEX5 exprimiert (weißer Pfeil).

2.2 Gestörte Peroxisomenbiogenese in PEX5-defizienten Oligodendrozyten

Um den peroxisomalen Importdefekt durch PEX5-Defizienz zu untersuchen, wurde exemplarisch die Lokalisation der Katalase mithilfe von Immunfärbungen an primären Oligodendrozyten-Kulturen sowie an Rückenmarks- und Gehirnschnitten untersucht. Katalase ist ein PTS1-tragendes peroxisomales Matrixprotein (Gould et al., 1988), das in intakten Zellen vom PTS1-Rezeptor, PEX5, in das Peroxisom transloziert wird (Dodt und Gould, 1996). Daher können Peroxisomen bei korrekter peroxisomaler Katalase-Lokalisation durch Immunfärbungen mit Katalase-spezifischen Antikörpern dargestellt werden. So erzielte punktförmige Farbmuster spiegeln die subzelluläre Peroxisomenverteilung wider.

In primären kultivierten PEX5-defizienten Oligodendrozyten wurde Katalase nicht in die Peroxisomen transloziert (Abb. 7, unten). In Gehirnschnitten wies die weiße Substanz des ZNS von Kontrolltieren eine Vielzahl von Peroxisomen auf (Abb. 8, links). Bei drei Wochen alten konditionalen PEX5-mutanten Mäusen war die Peroxisomenzahl in der weißen Substanz stark reduziert und auf die Grenze zur grauen Substanz beschränkt (Abb. 8 B, zweite Spalte). Ab dem Alter von zwei Monaten waren keine Katalase-haltigen Peroxisomen detektierbar. Dagegen waren Neuronale Zellkörper von der Defizienz nicht betroffen (Abb. 9).

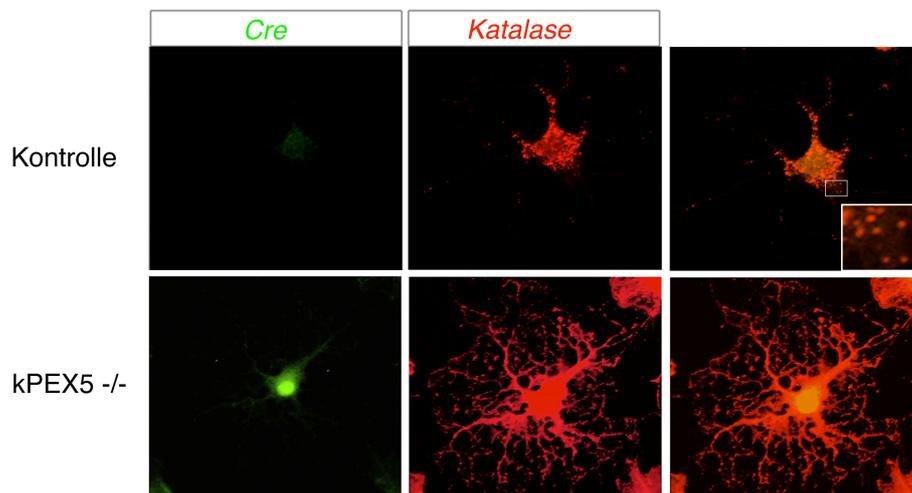


Abb. 7: Defekte Katalase-Lokalisation in Oligodendrozyten konditionaler PEX5-mutanter Mäuse

Konfokale Analyse immunhistochemisch markierter kultivierter Oligodendrozyten neonataler konditionaler PEX5-mutanter Mäuse. Katalase ist in Zellen mit Cre-Expression gleichmäßig zellulär verteilt, während Katalase-Färbungen der Kontrollzellen eine punktförmige Verteilung zeigen, die auf peroxisomale Lokalisation schließen lässt.

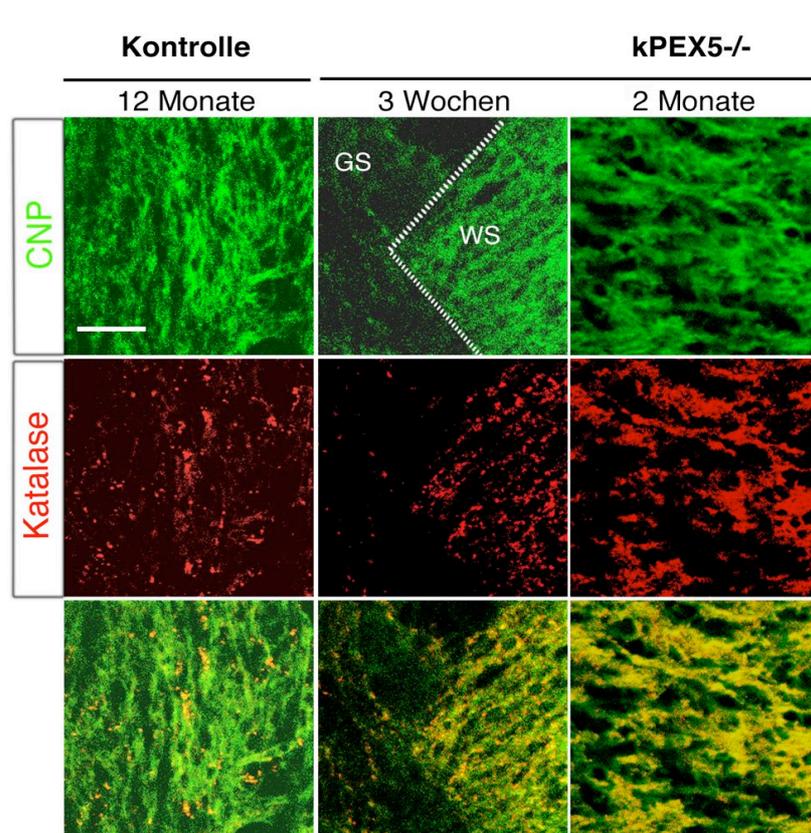


Abb. 8: Defekte Katalase-Lokalisation in der weißen Substanz konditionaler PEX5-mutanter Mäuse

Konfokale Analyse des Corpus Callosum immunhistochemisch markierter Paraffinschnitte von Mausgehirnen. Im Gehirn des Kontrolltiers (linke Spalte) kolokalisieren Katalase-positive Peroxisomen mit myelinspezifischem CNP. In Gehirnen 3 Wochen alter konditionaler PEX5-mutanter Tiere ist das punktförmige Katalase-Muster auf Grenzgebiete zu grauer Substanz beschränkt. Die weiße Substanz 2 Monate alter Tiere zeigt gleichmäßige subzelluläre Verteilung der Katalase (rechte Spalte), die auf den peroxisomalen Importdefekt schließen lässt. GS: Graue Substanz; WS: Weiße Substanz. Größenbalken: 10 µm.

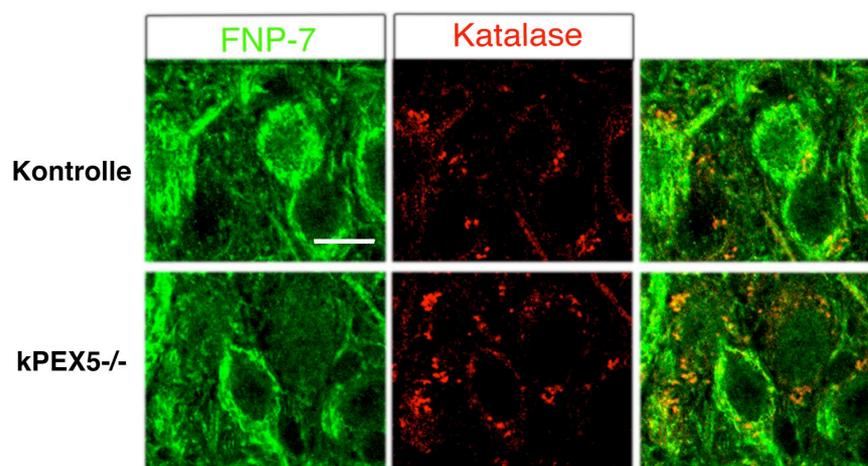


Abb. 9: Normale Katalase-Lokalisation in Neuronen

Konfokale Analyse hippocampaler Neuronen immunhistochemisch markierter Paraffinschnitte von Mausgehirnen. Detektion des neuronalen Markerantigens FNP-7 und von Katalase zeigt normale peroxisomale Katalase-Lokalisation in Neuronen von Kontrolltieren und konditional PEX5-defizienten Mäusen. Größenbalken: 10 µm.

2.3 Biochemische Analyse der Peroxisomenfunktion

In Peroxisomen findet eine Vielzahl biochemischer Reaktionen des Lipidmetabolismus statt. Bei den meisten peroxisomalen Krankheiten weicht die Konzentration verschiedener dieser Metabolite stark vom normalen physiologischen Bereich ab (Wanders, 2004). Peroxisomale Dysfunktion führt häufig zur Senkung des Plasmalogen- und Cholesterolspiegels, zur Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren (Very Long Chain Fatty Acids, VLCFA) und zur vermehrten Produktion von Phosphatidylethanolaminen (Zoeller und Raetz, 1986; Di Biase und Salvati, 1997; Kovacs und Krisans, 2003).

Nachdem Nachweis der fehlerhaften Peroxisomen-Biogenese in Oligodendrozyten konditionaler PEX5-defizienten Mäuse wurde untersucht, ob daraus eine messbare Peroxisomendysfunktion resultierte. Dazu wurde präpariertes Myelin von 10 Monate alten konditionalen PEX5-defizienten Mäusen massenspektrometrisch analysiert. Die quantitative Phospholipidanalyse wurde in Kooperation mit B. Brügger (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg) durchgeführt. Die Vermessung des Myelins mutanter Mäuse ergab eine Senkung des Gesamtphospholipidgehalts (PL; Abb. 10, A). Besonders stark waren die Plasmalogene (pl-PE) von der Reduktion betroffen (Abb. 10, B und C). Interessanterweise waren die Konzentrationen von Cholesterol (Chol), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) bei Abgleich auf den Gesamtproteingehalt reduziert (Abb. 10 D, links) im Verhältnis zum Gesamtphospholipidgehalt allerdings unverändert (Abb. 10 D, rechts). Dagegen war die Konzentration der Phosphatidylethanolamine (PE) ungefähr auf das doppelte Niveau erhöht (Abb. 10 C), was sich mit publizierten Daten PEX5-defizienter Zellen deckt (Zoeller und Raetz, 1986). Entgegen den Erwartungen waren die Fettsäurekettenlängen der PC-, SM-, PS- und PE- Fraktionen des Myelins konditionaler PEX5-defizienter Tiere unverändert (Abb. 11) und zeigten keine Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren, wie es bei Gewebe von X-ALD-Patienten der Fall ist.

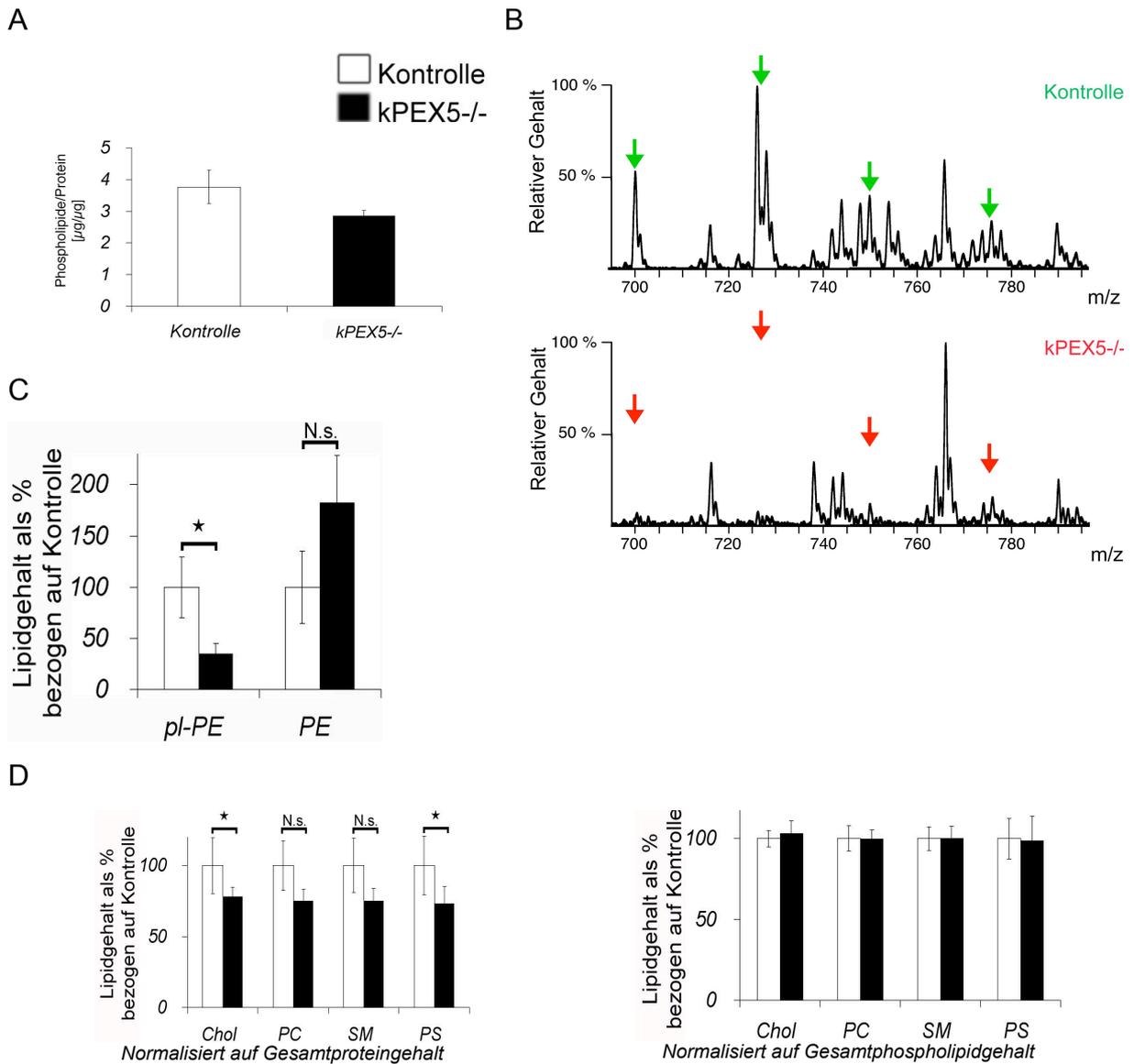


Abb. 10: Biochemischer Nachweis peroxisomaler Dysfunktion in konditionalen PEX5-mutanten Mäusen

Graphische Darstellung der massenspektrometrischen Myelin-Analyse von Mausgehirnen 12 Monate alter Mäuse. Balken stellen gemittelte Werte von je 6 Tieren pro Genotyp dar. **(A)** Der Gesamtlipidgehalt des Myelins von konditionalen kPEX5^{-/-} Mäusen ist im Vergleich zu dem der Kontrollmäuse reduziert. **(B)** Die massenspektroskopische Darstellung zeigt den normalen Anteil verschiedener Plasmalogene (grüne Pfeile) im Myelin eines Kontrolltiers und deren starke Reduktion im Myelin einer mutanten Maus (rote Pfeile). **(C)** Die Quantifizierung der Plasmalogene (pl-PE) und des Phosphatidylethanolamins (PE) zeigt die für PEX5-Defizienz typische Senkung der Plasmalogene und Erhöhung des PE-Gehalts. **(D)** Quantifizierung von Cholesterin (Chol), Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SM) und Phosphatidylserin (PS). Bei Normalisierung auf den Proteingehalt wird die Senkung der Lipide um ca. 25 % im Vergleich zur Kontrolle deutlich (links). Dagegen zeigt die Normalisierung auf den Phospholipidgehalt, dass diese Lipide relativ zur Gesamtmenge der Phospholipide konstant bleiben.

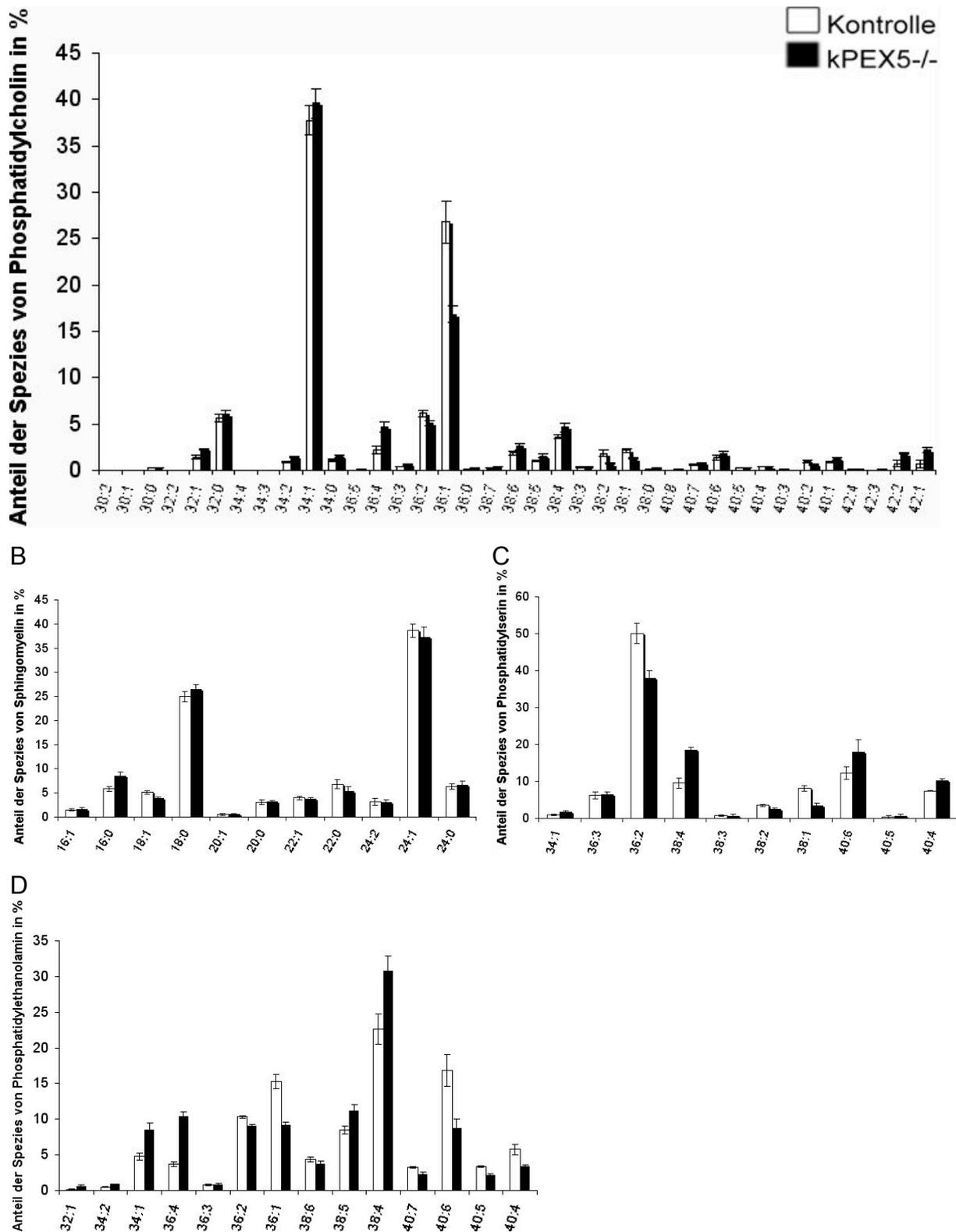


Abb. 11: Normale Fettsäurekettenlängen im Myelin PEX5-mutanter Mäuse

Massenspektrometrische Myelin-Analyse von Mausgehirnen 12 Monate alter Mäuse. Dargestellt sind Vorkommen und Verteilung der Fettsäurekettenlängen untersuchter Lipidklassen. Balken: Gemittelte Werte von je 6 Tieren pro Genotyp. (A) Phosphatidylcholin, (B) Sphingomyelin, (C) Phosphatidylserin, (D) Phosphatidylethanolamin. Es sind keine auffälligen Erhöhungen bestimmter Fettsäurekettenlängen im Myelin der kPEX5^{-/-} Tiere zu erkennen.

3 Analyse des klinischen Phänotyps konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Konditionale PEX5-nullmutante Mäuse waren bis zu dem Alter von drei bis sechs Monaten phänotypisch unauffällig. Dann entwickelten sie motorische Schwächen und gelangten innerhalb weniger Monate in ein vegetatives Stadium.

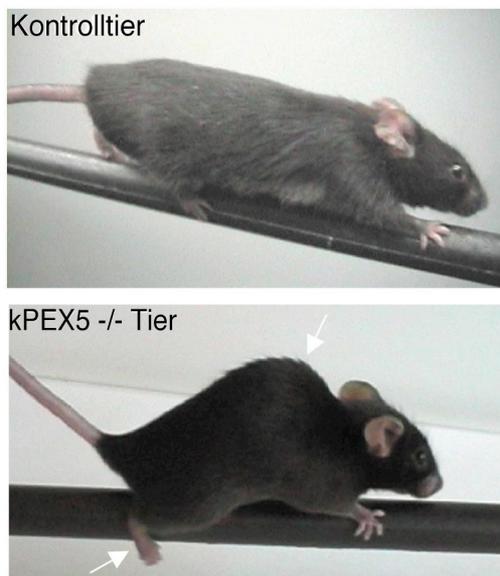
Der Krankheitsverlauf von Leukodystrophie- oder Multiple Sklerose-Patienten wird üblicherweise durch regelmäßige Zuordnung eines klinischen Skalenwertes dokumentiert. Für die viele Erkrankungen existiert eine eigene Skala mit einem Bereich von eins bis fünf, nach der der Gesamtzustand des Patienten beurteilt wird. Um den Krankheitsverlauf der mutanten Tiere mit dem von Patienten zu vergleichen, wurden die Mäuse einmal monatlich anhand der phänotypischen Auffälligkeiten in verschiedene Krankheitsstadien eingestuft. Dazu wurde ein Notensystem für die Mäuse entwickelt (Tab. 1).

Verhaltensauffälligkeit	<i>Klinisches Stadium</i>				
	I	II	III	IV	V
Ataxie der Hinterläufe	-	+	+	+	+
Kyphose	-	-	+	+	+
Parese der Hinterläufe	-	-	-	+	+
Ataxie der Vorderläufe	-	-	-	+	+
Intentionstremor	-	-	-	+	+
Plegie der Hinterläufe	-	-	-	-	+
Passivität	-	-	-	-	+
Gewichtsverlust	-	-	-	-	+
Atemprobleme	-	-	-	-	+

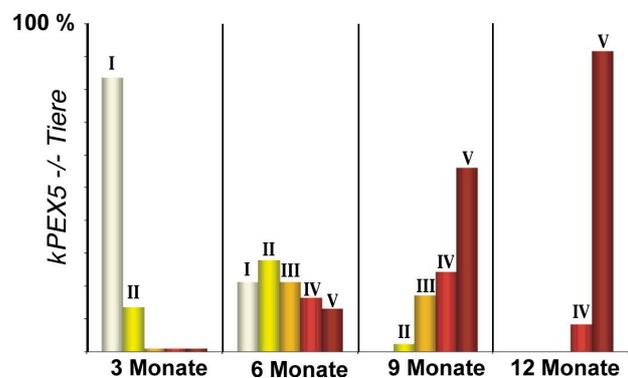
Tab. 1: Phänotypische Kriterien zur Beurteilung des Gesamtzustandes der Mäuse.

Erste Auffälligkeiten der Tiere waren motorische Hinterlaufschwächen, die im frühen Stadium (II) nur im Gittertest detektierbar waren. Dann entwickelten die Mäuse eine auffällige Kyphose (Abb. 12 A) und Tremore bis schließlich die Hinterläufe eine schlaffe Lähmung aufwiesen. In späteren Stadien waren auch die Vorderbeine betroffen. Die Tiere starben deutlich früher als ihre Geschwisterkontrolltiere (Abb. 12 B). Im Alter von 7 Monaten war eine auffällig hohe Sterblichkeitsrate deutlich. 50 % erreichten ein Alter von 11 Monaten. Nur wenige Tiere wurden älter als 12 Monate (Abb. 12 C).

A



B



C

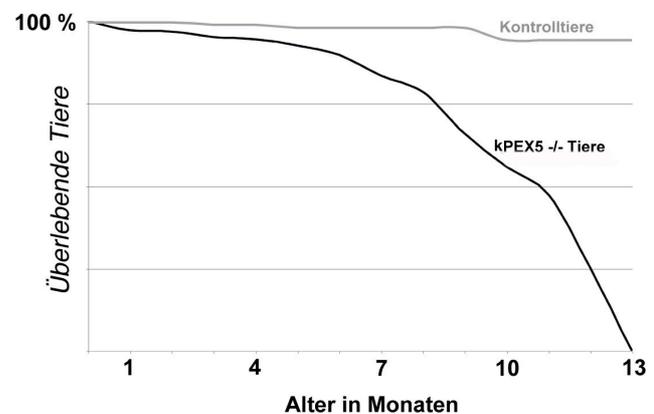


Abb. 12: Klinische Symptome und erhöhte Sterblichkeitsrate der konditionalen PEX5-nullmutanten Mäuse

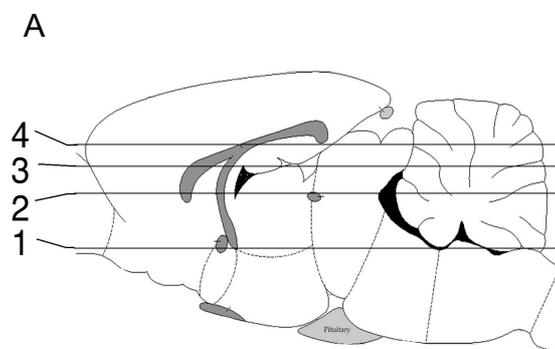
(A) Kontrolltier (oben) und konditional PEX5-mutantes Tier (unten; klinisches Stadium IV). Kyphose und Hinterlaufschwäche sind in diesem Stadium deutlich ausgeprägt. (B) Einteilung der Tiere in die verschiedenen Krankheitsstadien (I-V; siehe Tab. 1). Im Alter von 3 Monaten sind ca. 80 % der konditionalen PEX5-nullmutanten Tiere unauffällig. Im Alter von 6 Monaten, sind nahezu gleichmäßig viele Tiere in jedem der 5 Krankheitsstadien. Mit 9 Monaten sind fast 50 % der mutanten Tiere im letzten Krankheitsstadium oder bereits gestorben. (C) Die mutanten Mäuse sterben spätestens im Alter von 13 Monaten. Zu diesem Zeitpunkt leben noch ca. 95 % der Kontrolltiere.

4 Magnetische Resonanz Tomographie am Gehirn

Neben der Beurteilung durch ein klinisches Notensystem gehört zur Kontrolle und Diagnose von Leukodystrophie-Patienten die regelmäßige kernspintomographische Untersuchung des Gehirns. Bei ALD-Patienten zeigen sich symmetrische Veränderungen in der subcortikalen weißen Substanz. Aus dem Grund wurde auch der Krankheitsverlauf einzelner Tiere mithilfe des klinischen bildgebenden Verfahrens, der Magnetischen Resonanz Tomographie (MRT), verfolgt. Dazu wurden in Kooperation mit T. Michaelis (Biomedizinische NMR, Göttingen) im Abstand von zwei Monaten wiederholt Messungen an den selben Tieren vorgenommen.

Die MRT mutanter, zwei Monate alter Mäuse war ununterscheidbar von Kontrolltieren. Abnorme Signale wurden dagegen in T2-gewichteter MRT vier Monate alter Tiere detektiert (Abb. 13 C). Das Signal des rostralen Bereichs subcortikaler weißer Substanz war hyperintensiv, während andere Myelin-Domänen unverändert schienen. Mit fortschreitendem Alter breitete sich die Läsion dreidimensional aus. In caudaler Richtung erreichte sie die externe Kapsel und später die Fimbria hippocampi; in apikaler Richtung erzeugte das gesamte Corpus Callosum abnorme Signale; basal erreichte die Läsion im vierten Krankheitsstadium auch die Anteriore Commissur. Cerebellares Myelin und die hippocampale Fissur sowie die interne Kapsel schienen normal. Tendenziell ergaben T1-gewichtete MRT-Messungen dieselben Ergebnisse, waren aber weniger sensitiv. Der Grad abnormer Signale korrelierte also mit der zugeordneten klinischen Note.

Abb. 13, A: Sagittale schematische Darstellung eines Mausgehirns
Angedeutet sind die vier horizontalen Ebenen (1-4), die von den Magnetischen Resonanz Tomographien (B-E) dargestellt werden. (modifiziert nach Franklin und Paxinos)



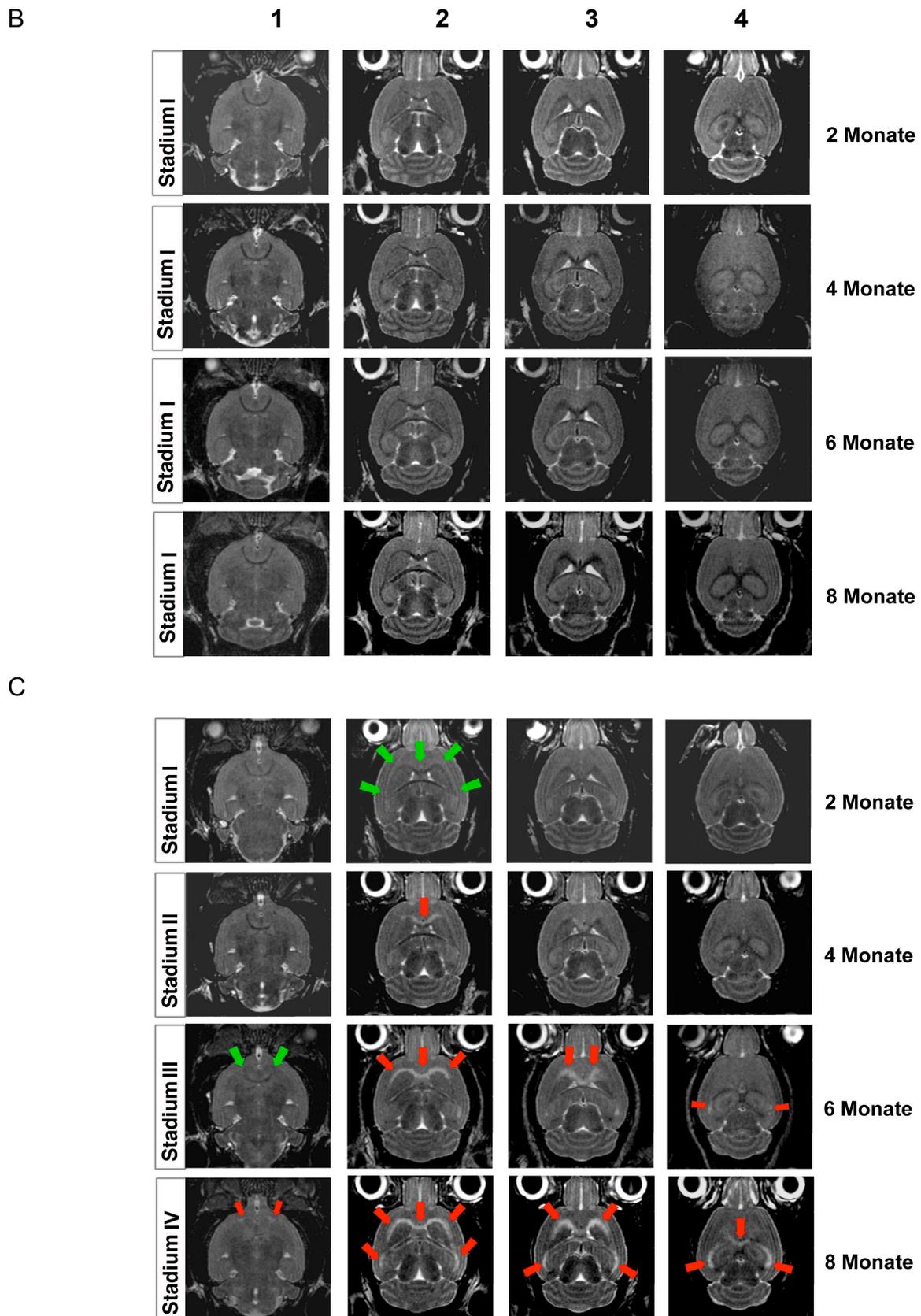


Abb. 13 (B-E): Progressive Veränderung des subcortikalen Myelins in vivo
 Zeitlich aufeinanderfolgende T2- (B,C) und T1- (D,E) gewichtete Magnetische Resonanz Tomographien (MRT) eines Kontrolltiers (B, D) und einer kPEX5^{-/-} Maus (C, E). Bilder einer Zeile zeigen verschiedene horizontale Ebenen (siehe Abb.11 A) des Mausgehirns einer Messung. Im Alter von 4 Monaten treten erste hyperintensive Signale in der frontalen Region des Corpus Callosum auf (C), die sich mit fortschreitendem Alter in caudale Regionen

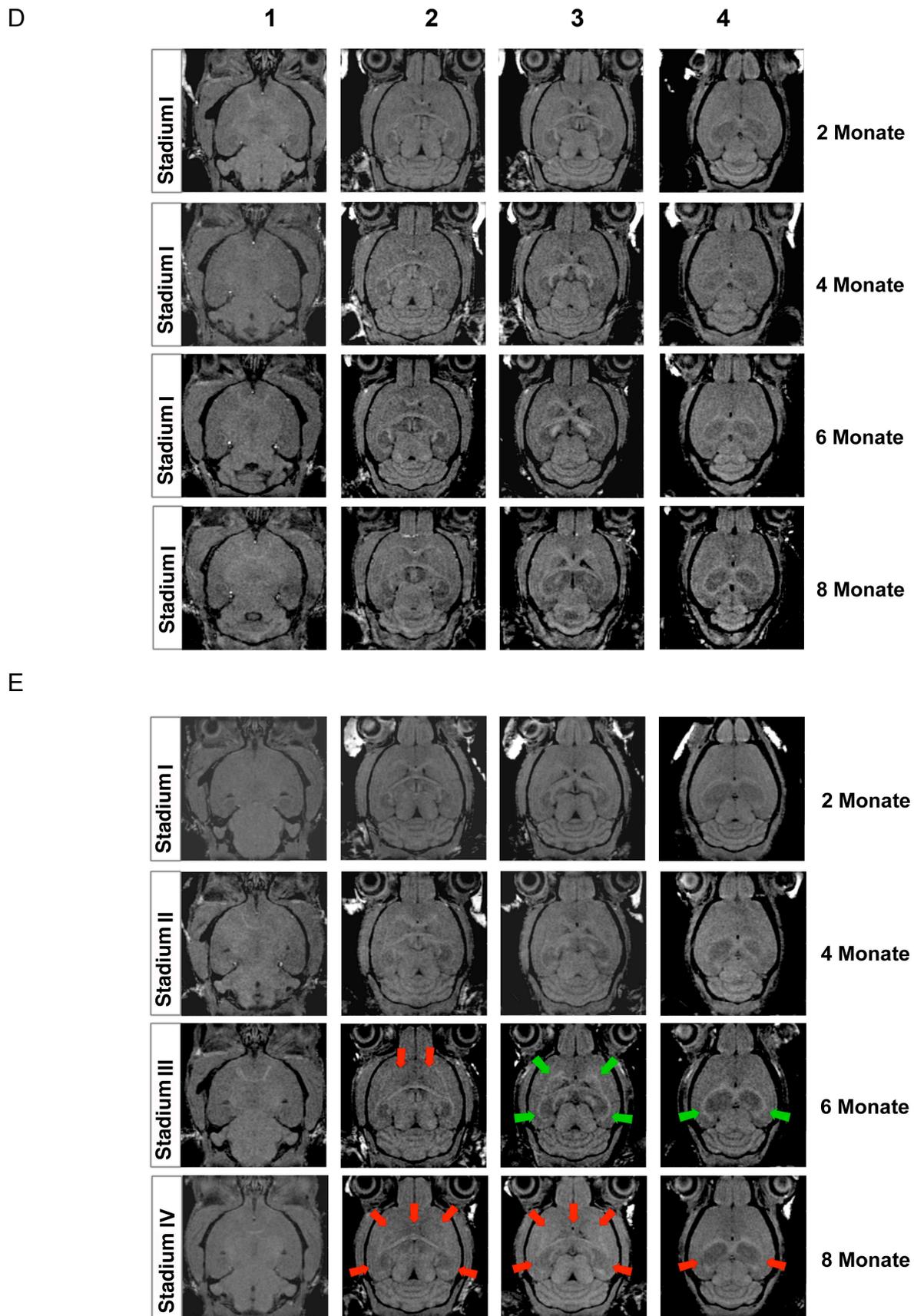


Abb. 13: ausbreiten. T2-gewichtete Messungen (**D**, **E**) zeigen erste Auffälligkeiten des Myelins der selben Region erst im Alter von 6 Monaten (**E**). Grüne Pfeile: Normale Signale; Rote Pfeile: Abnorme Signale.

5 Myelinisierung und Myelinerhalt bei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen

Da sich die durchgeführten MRT darauf beschränken, den Gehalt freier Wassermoleküle zu messen, wurden im folgenden die pathologischen Veränderungen des Myelins in konditionalen PEX5-defizienten Mäusen durch histologische Untersuchungen genauer charakterisiert.

5.1 Normale Gehirnentwicklung und Myelinisierung

Von Zellweger Syndrom- (ZS) Patienten, bei denen das PEX5-Gen mutiert ist, sind schwere Entwicklungsmängel bekannt, zu denen ein neuronaler Migrationsdefekt gehört. Infolgedessen werden prominente Gehirnstrukturen bei ihnen nicht korrekt ausgebildet (Janssen et al., 2003). Wegen der frühen Deletion des PEX5-Gens könnte die gestörte Peroxisomenbiogenese in Oligodendrozyten konditionaler PEX5-defizienter Tiere Einfluss auf die Gehirnentwicklung haben. Deswegen wurden Gehirne junger und adulter konditionaler PEX5-mutanter Tiere auf mögliche Entwicklungsunterschiede hin untersucht. Um die Hirnstrukturen sichtbar zu machen, wurden Mausgehirne nach Beendigung der Myelinisierung histologisch mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Der Vergleich der Gehirne mutanter Tiere mit denen von Kontrolltieren ergab keine offensichtlichen Unterschiede (Abb. 14). Hippocampale und cerebellare Hirnstrukturen sowie die Schichtung des Cortex schienen vollkommen normal.

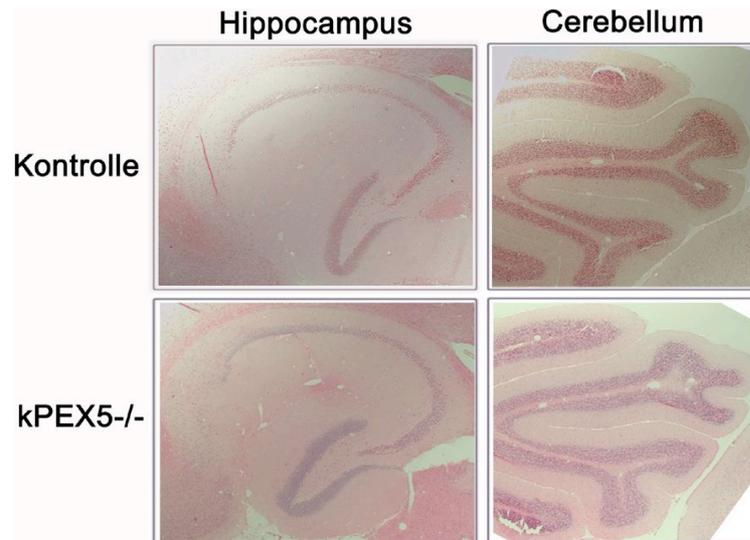


Abb. 14: Normale Entwicklung der Gehirnstrukturen bei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen

Lichtmikroskopische Analyse Hämatoxylin/Eosin-gefärbter horizontaler Paraffinschnitte von Mausgehirnen 2 Monate alter Mäuse. Der Hippocampus und das Kleinhirn konditionaler PEX5-mutanter Tiere sind normal ausgebildet.

Um das Myelin 2 Monate alter konditionaler PEX5-nullmutanter Mäuse auf mögliche subtile Unterschiede vor dem Auftreten klinischer phänotypischer Auffälligkeiten zu untersuchen, wurden Hirnschnitte 2 Monate alter Tiere myelinspezifisch gefärbt. Die Analyse konzentrierte sich dabei auf Regionen, die laut MRT zuerst und am stärksten betroffen waren. Eine Gallyas-Silberimprägnierung sowie eine Luxol fast Blue- (LfB) Färbung zeigten keine Abweichungen im Myelin mutanter Tiere (nicht gezeigt). Da diese Färbemethoden auf einem unbekanntem molekularen Mechanismus beruhen, wurden auch immunhistochemische Myelindarstellung mit MBP- und PLP-spezifischen Antikörpern angefertigt. Dabei wurden keinen Unterschiede zwischen mutanten und Kontrolltieren festgestellt (Abb. 15 A). Auch elektronenmikroskopisch waren keine Auffälligkeiten zu erkennen. Das Verhältnis von Axondurchmesser und Myelindicke schien normal zu sein (Abb. 15 B). Auch die Ultrastruktur des Myelins wies das reguläre Muster von IPL („Intraperiod Line“) und MDL („Major Dense Line“) auf (Abb. 15 C).

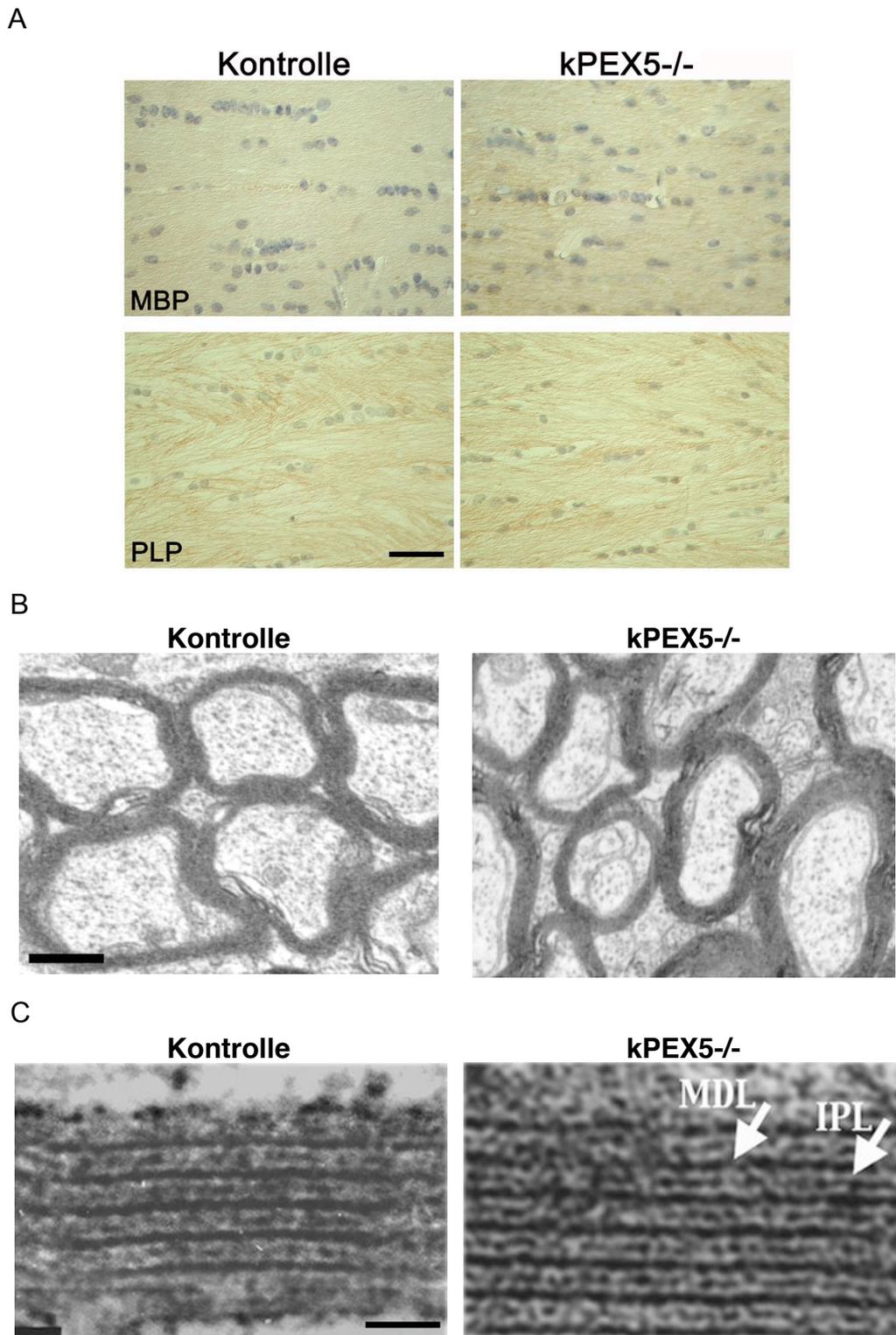


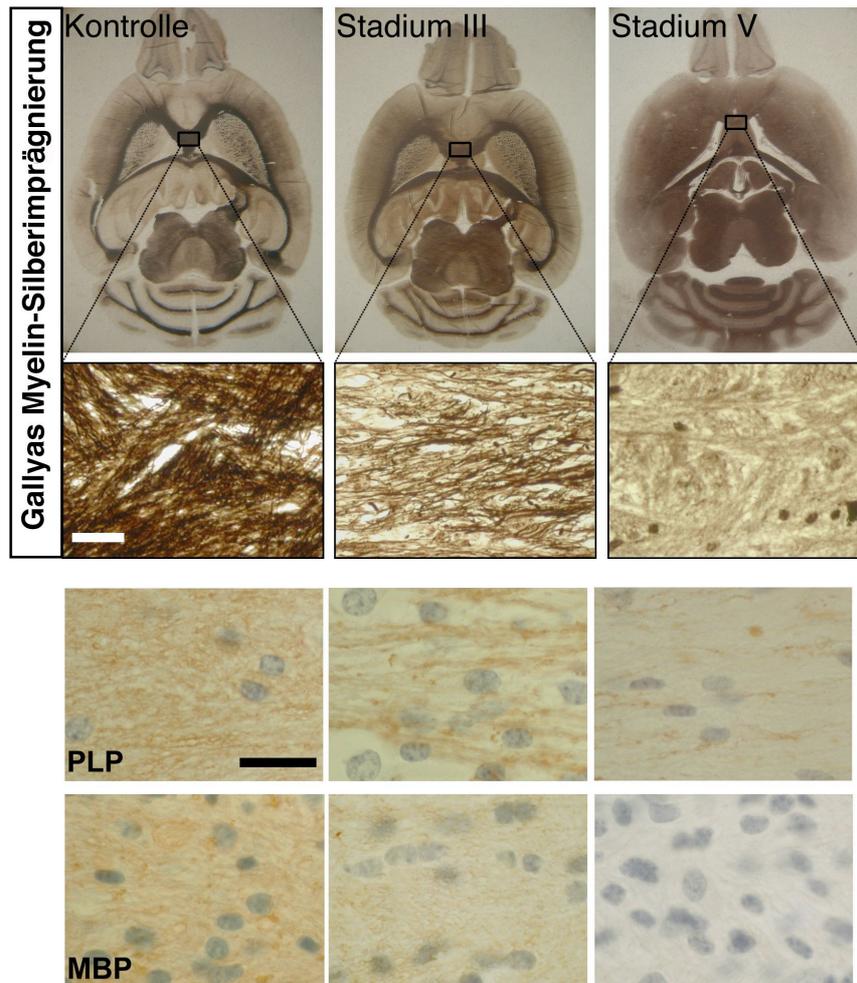
Abb. 15: Normale Myelinisierung im Gehirn konditionaler PEX5-nullmutanter Mäuse

Analyse des Corpus Callosum von horizontalen Gehirnschnitten 2 Monate alter Mäuse **(A)** Lichtmikroskopische Analyse von Paraffinschnitten. Immunhistochemisch detektierte Myelinproteine MBP und PLP zeigen keine Unterschiede zwischen konditional PEX5-defizienten Mäusen und Kontrolltieren. **(B, C)** Die Elektronenmikroskopische Analyse zeigt normal myelinisierte Axone in konditional PEX5-defizienten Mäusen und veranschaulicht die normale Ultrastruktur des Myelins mit „Major Dense Line“ (MDL) und „Intraperiod Line“ (IPL). Größenbalken in A: 3 µm; Größenbalken in B: 550 nm; Größenbalken in C: 25 nm.

5.2 Demyelinisierung im ZNS konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Die Myelinstrukturen, die in der MRT von konditionalen PEX5-defizienten Mäusen als betroffen identifiziert wurden, sollten histologisch an Tieren verschiedener Krankheitsstadien untersucht werden. Dazu wurden myelinspezifische Färbungen durch Gallyas-Silberimprägnierung (Abb. 16 A, oben), LfB (nicht gezeigt) sowie immunhistochemische Darstellungen der abundanten Myelinproteine MBP und PLP angefertigt und lichtmikroskopisch analysiert. Das Myelin von Tieren des ersten klinischen Stadiums war ununterscheidbar von dem der Kontrolltiere. Dagegen zeigten die Myelindarstellungen stark betroffener Tiere (Stadium V) einen kompletten Myelinverlust der subcortikalen weißen Substanz. Die Myelinanalyse ergab erste eindeutige Zeichen einer Demyelinisierung ab dem dritten Krankheitsstadium. Der zuerst betroffene Bereich entsprach der Region, die in MRT-Messungen zuerst auffällig war, dem Genu des Corpus callosum. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf wurde die symmetrische Ausbreitung in caudale Hirnregionen deutlich. Der histologische Vergleich verschieden alter Tiere mit vergleichbarem klinischen Phänotyp ergab, dass die Demyelinisierung mit dem klinischen Phänotyp korrelierte und daher nicht strikt vom Alter der Tiere abhängig war (nicht gezeigt). Außerdem zeigten myelinspezifische Färbungen des Rückenmarks erst in sehr spätem Krankheitsstadium nur leichten Myelinverlust (nicht gezeigt). Untersuchungen des peripheren Ischiasnerven ließen auch bei Tieren des fünften Krankheitsstadiums keine Auffälligkeiten erkennen (nicht gezeigt).

A



B

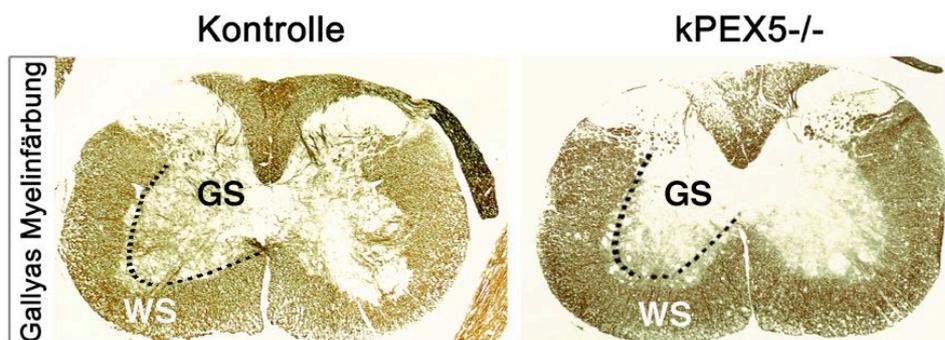


Abb. 16: Subcorticale Demyelinisierung konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Lichtmikroskopische Analyse Myelin-gefärbter Paraffinschnitte von Kontrolltieren und kPEX5^{-/-} mutanten Mäusen im Krankheitsstadium III und V **(A)** Horizontale Schnitte des Mausgehirns zeigen zunehmenden Verlust der Myelinstrukturen, der mit der Schwere der Erkrankung korreliert (links nach rechts). Ausschnittsvergrößerungen zeigen erste subtile Veränderungen im rostralen Bereich des Corpus Callosum. **(B)** Die weiße Substanz (WS) des Rückenmarks ist dagegen auch bei Tieren des fünften Krankheitsstadiums weitgehend normal. Leichte Unterschiede fallen in der grauen Substanz (GS) des Rückenmarks von kPEX5^{-/-} Tieren des fünften Krankheitsstadiums auf. Größenbalken in A: 2 μ m.

Mithilfe der Elektronenmikroskopie wurden die Erkenntnisse aus der Lichtmikroskopie verifiziert und vertieft. In Läsionsbereichen stark betroffener Tiere war die Demyelinisierung elektronenmikroskopisch deutlich sichtbar. Die Analyse zeigte, dass Myelin transversal verlaufender Fasern, die beide Hemisphären verbinden, stärker betroffen war als das von rostro-caudalen longitudinal verlaufenden Fasern. Die in Kontrollgewebe stark vertretenen transversalen myelinisierten Fasergruppen waren in Tieren des fünften klinischen Stadiums elektronenmikroskopisch nicht auffindbar.

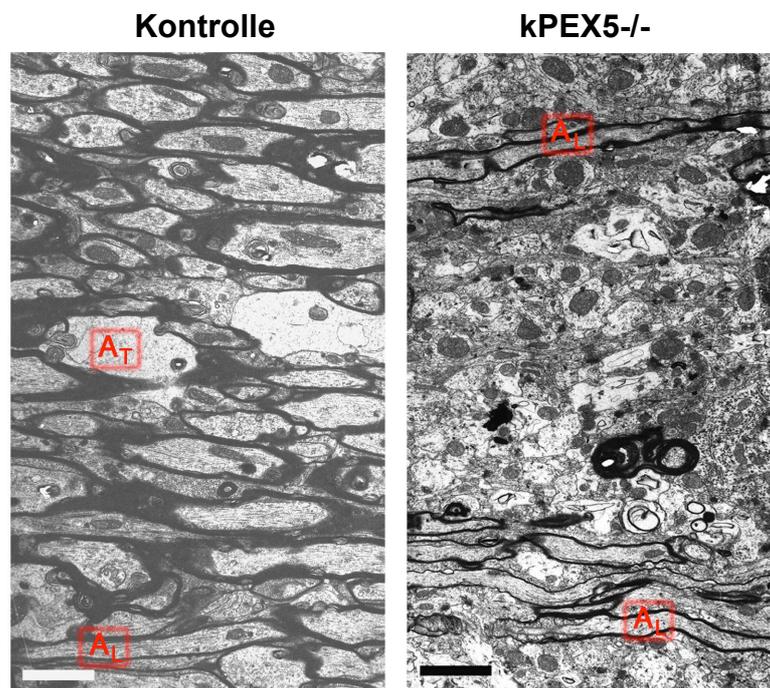


Abb. 17: Spezifischer Myelinverlust callosaler Axone

Elektronenmikroskopische Analyse des Corpus Callosum 12 Monate alter Mäuse zeigt deutlich den Verlust von Myelin der kPEX5^{-/-} Mutanten. Dabei ist das Myelin einiger longitudinal verlaufender Axone (A_L), die rostrale mit caudalen Hirnregionen verbinden, länger erhalten, als das Myelin transversaler Axone (A_T), die beide Hemisphären verbinden. Größenbalken: 1,25 µm.

6 Apoptotischer Zelltod von Oligodendrozyten im Zentralnervensystem

Durch histologische Analyse der Zellzahl von Oligodendrozyten in konditionalen PEX5-nullmutanten Mäusen, sollte überprüft werden, ob die Demyelinisierung Ergebnis eines massiven Zelltods von Oligodendrozyten sein könnte. Zellen, die aufgrund des programmierten Zelltods sterben, können durch Hämatoxylin/Eosin und mit der Apoptose darstellenden TUNEL-Färbung identifiziert werden. Diese Färbungen, sowie die immunhistochemische Markierung der Zellkörper lebender

Oligodendrozyten mit einem anti-Cre Antikörper wurden an Hirnschnitten von Tieren verschiedener Krankheitsstadien durchgeführt.

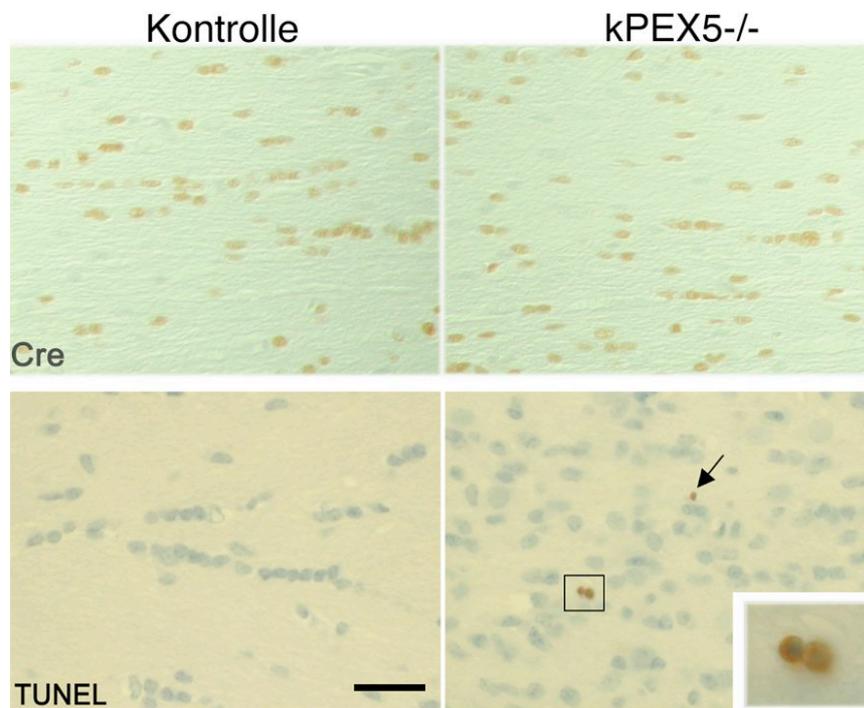


Abb.18: Lebensfähigkeit von Oligodendrozyten in konditional PEX5-defizienten Mäuse

Lichtmikroskopische Analyse des Corpus Callosum horizontaler Paraffinschnitte (5 μ m) von Mausgehirnen 11 Monate alter Mäuse. Die Cre-spezifische Antikörperfärbung zeigt keinen deutlichen Verlust von Oligodendrozyten (oben) bei konditionalen PEX5-mutanten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. Auch ein Apoptosenachweis mithilfe der TUNEL-Färbung zeigt nur wenige apoptotische Zellen (Pfeil). Die Vergrößerung zeigt den schwarz umrandeten Ausschnitt. Größenbalken: 3 μ m.

In den Läsionen horizontaler Gehirnschnitten von adulten mutanten Tieren waren signifikant mehr Zellen apoptotisch als bei Kontrolltieren. In 5 μ m dicken Paraffinschnitten der Tiere des ersten Stadiums wurden weniger als 10 apoptotische Zellen markiert (Abb. 18). Bei den mittleren Krankheitsstadien (II und III) bewegte sich die Zahl apoptotischer Zellen eines gesamten Horizontalschnitts bei bis zu 15. Auch in späten Stadien (IV und V) waren es nie mehr als 20 Zellen. Aufgrund der Lokalisation konnten die apoptotischen Zellen als Oligodendrozyten identifiziert werden. Die Auswertung der TUNEL- und Hämatoxylin/Eosin-Färbung ergaben ähnliche Ergebnisse. Cre-spezifische Antikörpermarkierung zeigte auch bei 12 Monate alten Tieren keinen auffälligen Verlust von Oligodendrozyten.

7 Neuronale Degeneration im Zentralnervensystem

Da betroffene Oligodendrozyten ihre assoziierten Neuronen beeinträchtigen könnten, sollten spezifisch neuronale Färbungen zeigen, ob Neuronen durch den hohen Grad der Demyelinisierung betroffen werden.

Die Bielschowsky-Silberimprägnierung dient der Darstellung von Neuronen und Axonen. Diese Färbungen ließen an Gehirnschnitten 2 Monate alter Tiere keine Unterschiede zwischen kPEX5^{-/-} und Kontrolltieren erkennen. Dagegen wurde ein umfassender subkortikaler Faserverlust stark betroffener Tiere deutlich (Abb. 19). Der Beginn dieses Verlusts war bei Tieren des dritten Krankheitsstadiums auszumachen und lokalisierte im Genu des Corpus callosum. Die vergleichende Analyse der axonalen mit der Myelinsilberimprägnierung von Hirnschnitten identischer Tiere verschiedener Krankheitsstadien zeigte einen ähnlichen Verlauf von Myelin- und axonalem Verlust. Der axonale Verlust schien leicht ausgeprägter zu sein als die Demyelinisierung (Vgl. Abb.15 A und Abb. 16, Stadium III). Immunhistochemische Analysen sollten zeigen, ob der schwächeren Bielschowsky-Färbung ein Faserverlust zugrunde liegt oder lediglich eine Veränderung der Fasern, die die Silberimprägnierung stört. Dazu wurde ein spezifisch axonales (SMI-31, Abb. 19) und ein panneuronales Markerantigen detektiert (NeuN, nicht gezeigt). Die axonale Färbung bestätigte den Faserverlust. Dagegen war kein auffälliger Verlust neuronaler Zellkörper zu beobachten.

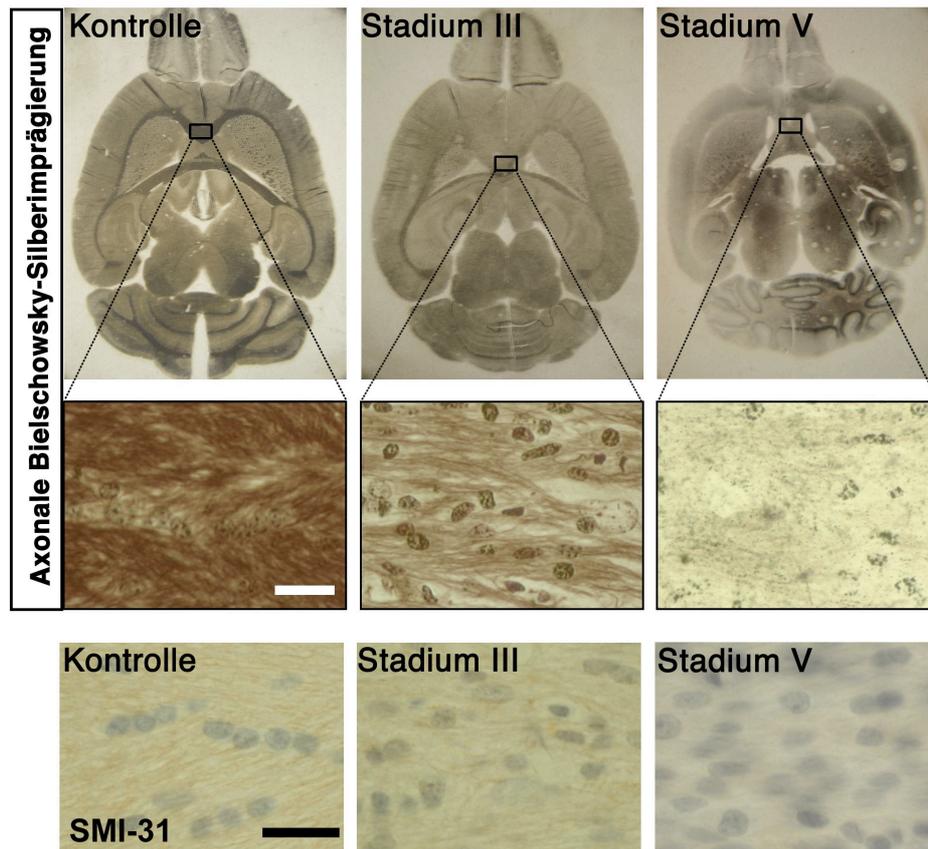
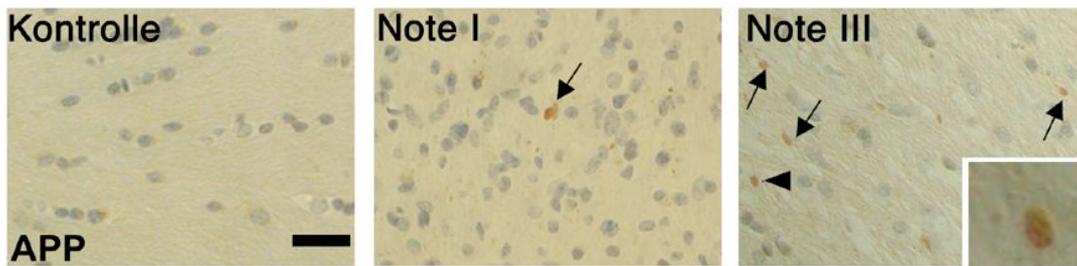


Abb. 19: Axonaler Verlust im Gehirn konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

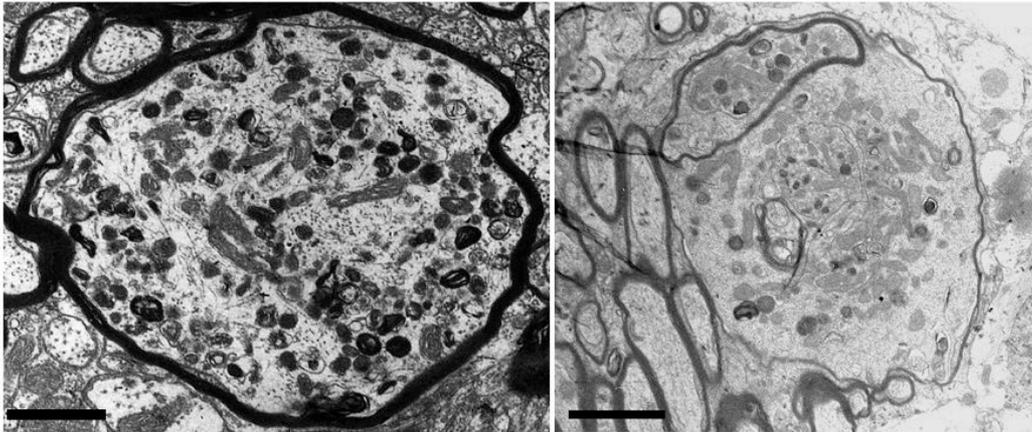
Lichtmikroskopische Analyse spezifisch neuronal markierter horizontaler Paraffinschnitte von Mausgehirnen. Sowohl eine Silberimprägung der Axone nach Bielschowsky (oben) als auch die immunhistochemische Darstellung des neuronalen Filaments SMI-31 (unten) zeigt progressiven axonalen Verlust, der mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Größenbalken: 2 μ m.

In einigen Neurodegenerativen Erkrankungen gehen axonale Schwellungen der axonalen Degeneration voraus. Sie können immunhistochemisch durch Akkumulation von APP („Amyloid Precursor Protein“) und elektronenmikroskopisch identifiziert werden. Solche axonalen Schwellungen wurden in Gehirnen von kPEX5^{-/-} Tieren des ersten Stadiums gefunden. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (III) traten axonale Schwellungen vermehrt auf (Abb. 20); im letzten Stadium waren es dagegen nur wenige. Die Elektronenmikroskopie verifiziert das häufige Vorkommen von axonalen Schwellungen und degenerierenden Axonen.

A



B



C

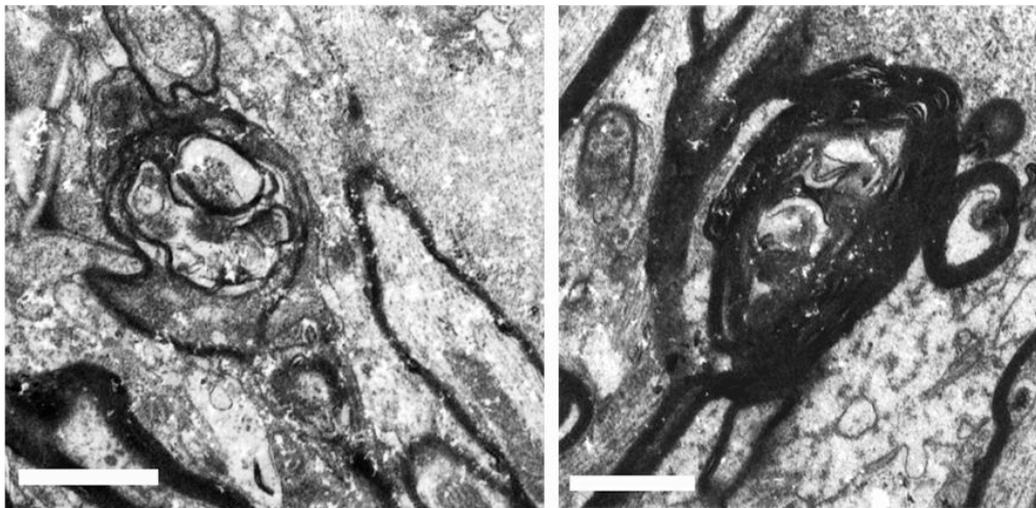


Abb. 20: Axonale Schwellungen und Degeneration im Corpus Callosum konditionaler PEX5-mutanter Mäuse

(A) Lichtmikroskopische Analyse horizontaler Paraffinschnitte von Mausgehirnen verschiedener Krankheitsstadien. APP-Akkumulationen markieren axonale Schwellungen bei einem Tier des ersten Krankheitsstadiums (mitte). Solche Akkumulationen treten verstärkt in Tieren des dritten Krankheitsstadiums auf (rechts). Elektronenmikroskopische Darstellungen des Corpus Callosum 12 Monate alter Mäuse zeigen axonale Schwellungen (B) und axonale Degeneration (C). Pfeile: APP-Akkumulationen; Pfeilspitze deutet auf die axonale Schwellung der Ausschnittsvergrößerung. Größenbalken in A: 3 μm ; Größenbalken in B: 1,1 μm ; Größenbalken in C: 1,25 μm .

8 Reaktive Gliose im Zentralnervensystem

Demyelinisierung und Neurodegeneration stören die Homöostase im ZNS, was üblicherweise zur Aktivierung und Proliferation von Mikroglia (Mikrogliose) und Astrozyten (Astrogliose) führt (Streit et al., 1999; Pekny und Nilsson, 2005). Infolge mikroglialer Aktivierung wird die Expression des Oberflächenmarkerantigens in diesen Zellen erhöht. Dadurch werden sie mit MAC-3-Antikörpern nachweisbar. Hingegen erreicht astrozytäre GFAP-Expression auch im gesunden Gehirn die Nachweisgrenze. Astrogliosen werden daher durch signifikante Erhöhung der Zellzahl und verstärkte Expression von GFAP nachgewiesen.

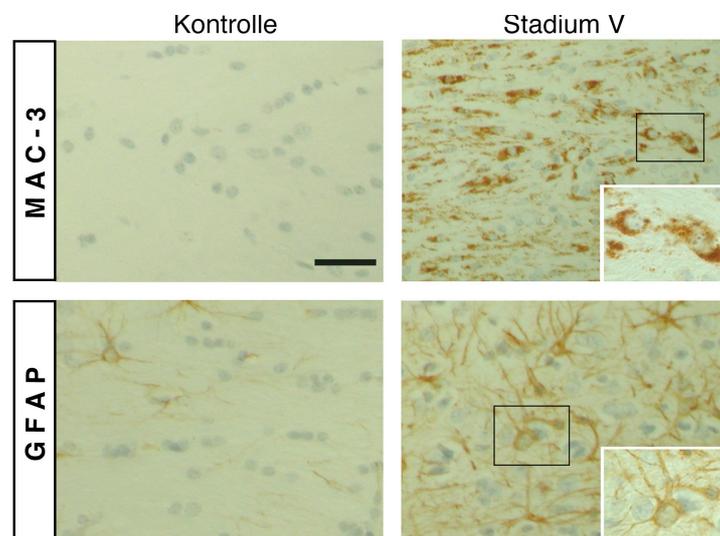


Abb. 21: Reaktive Gliose im ZNS konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

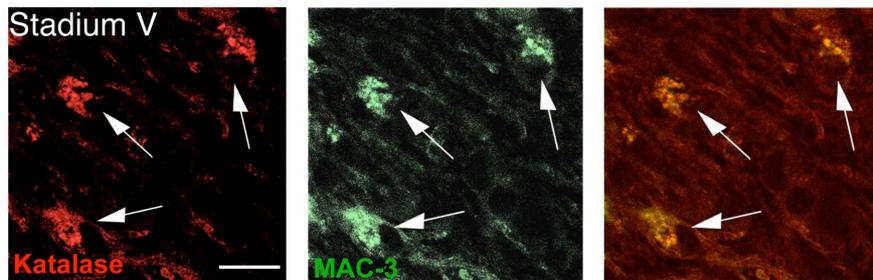
Lichtmikroskopische Darstellung des Corpus Callosum immunhistochemisch markierter horizontaler Paraffinschnitte von Mausgehirnen 12 Monate alter Mäuse. Während des letzten Krankheitsstadiums ist eine massive Mikrogliose (rechts oben) nachweisbar, die nicht im gesunden Tier vorkommt (links oben). Diese Zellen sind vermutlich phagozytotisch aktiv (schwarz umrandeter Ausschnitt ist vergrößert und zeigt die amöboide Morphologie). Die Färbung mit GFAP-spezifischem Antikörper zeigt eine deutliche Astrogliose (unten rechts) im Gewebe der konditionalen PEX5-defizienten Maus. Vergrößerungen zeigen den jeweils schwarz umrandeten Ausschnitt. Größenbalken: 3 μm .

Schon im Alter von zwei Monaten, waren erste wenige aktivierte Mikrogliazellen im ZNS konditionaler PEX5-defizienter Mäuse zu finden. Der Grad der Mikrogliaaktivierung, ihre Zellzahl und Verteilung, korrelierte mit dem Grad der klinischen phänotypischen Ausprägung (nicht gezeigt). Zunächst entsprach die Verteilung dieses Zelltyps exakt dem Muster der Läsionsausbreitung, das aus der MRT bekannt war, und dem auch Demyelinisierung und neuronale Degeneration folgten. Zeitlich war das Vorkommen der Zellen allerdings den degenerativen

Prozessen voraus. Außerdem waren Mikroglia in Gehirnen stark betroffener Tiere nicht auf Strukturen der weißen Substanz beschränkt. Hier waren zwar besonders viele Makrophagen lokalisiert (Abb. 21, oben), sie waren aber auch gleichmäßig in allen übrigen Regionen des Gehirns verteilt. Diese Beobachtungen trafen mit leicht zeitlicher Verschiebung genauso auf Astrozyten zu. Im fünften klinischen Stadium waren die Gliosen so massiv, dass die meisten Zellkörper innerhalb der Läsion den Mikroglia und Astrozyten zuzuordnen waren (Abb. 21). Vermutlich ist dadurch ebenso die erhöhte Zellzahl in den Läsionen erklärbar. Untersuchungen des Rückenmarks zeigten deutlich weniger aktivierte Mikroglia als im Gehirn (nicht gezeigt), und im peripheren Ischiasnerv war erst in späteren Krankheitsstadien (III bis IV) eine vergleichsweise leichte Makrophagenaktivität zu beobachten (nicht gezeigt). Ob Astrozyten wirklich später als Mikroglia aktiviert oder nur später als reaktiv erkannt werden, ist nicht zu sagen. Denn der Nachweis aktivierter Mikroglia ist durch die Verwendung des MAC-3-spezifischen Antikörpers, mit dem ein „Alles-oder-Nichts“-Ergebnis erzielt wird, sehr viel eindeutiger und dadurch sensitiver als der GFAP-Antikörper mit dem eine Astrogliose durch abnorme Verteilung und Anzahl der Zellen dargestellt wird.

Um Hinweise auf die Funktion der in den Läsionen lokalisierten Hirnmakrophagen zu bekommen, wurden detailliertere Untersuchungen mithilfe von Elektronenmikroskopie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt (Abb. 22). Elektronenmikroskopisch betrachtet waren die häufig auftretenden Makrophagen mit elektronendichten Vesikeln gefüllt. Einige davon konnten als Überreste phagozytierten Myelins identifiziert werden, andere stellen vermutlich Peroxisomen dar. Der hohe Gehalt von Peroxisomen in Mikrogliazellen wurde auch mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durch Doppelimmunfärbung mit Katalase- und MAC-3-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

A



B

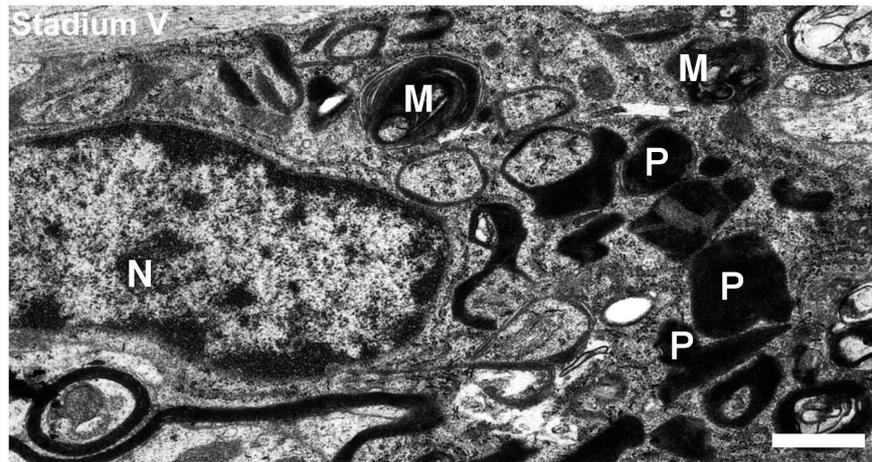


Abb. 22: Peroxisomenreiche Mikrogliazellen in Läsionen des ZNS

Untersuchung von Mikrogliazellen der Läsionsregion horizontaler Gehirnschnitte 12 Monate alter konditionaler PEX5-nullmutanter Mäuse. **(A)** Konfokale Mikroskopie eines Paraffinschnitts nach Detektion des mikroglialen Markerantigens MAC-3 und des peroxisomalen Markerantigens Katalase. Die Mikroglia der Läsionen beherbergen eine Vielzahl von Peroxisomen (Pfeile: Peroxisomenreiche Microglia). **(B)** Elektronenmikroskopisch sind in den Mikroglia Peroxisomen und Vesikel mit Abbauüberresten von Myelin nachweisbar. M: Myelin gefüllte Vesikel; N: Nukleus; P: Peroxisomen. Größenbalken in A: 10 μ m; Größenbalken in B: 1 μ m.

9 Inflammation in Läsionen konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Eine Besonderheit der X-ALD im Vergleich zu anderen Leukodystrophien ist die Infiltration des Gehirns von B- und T-Lymphozyten des Blutes (Powers et al., 1992). Deswegen wurden immunhistochemische Färbungen mit B-zellspezifischen (anti-CD-45R) und T-zellspezifischen (anti-CD-3) Antikörpern durchgeführt (Abb. 23). Interessanterweise wurden sowohl T- als auch B-Zellen frühestens in Gehirnen 4 Monate alter Tiere detektiert. B-Zellen waren in der Nähe der Blutgefäße oder direkt im Blutgefäßepithel (perivaskulär) lokalisiert. Beide Zelltypen kamen ausschließlich in der weißen Substanz vor. Sie lagen spezifisch in Läsionsregionen. Zellzahlen variierten von Tier zu Tier. Zahlenmäßig waren sie mikroglialen und astrozytären Zellen unterlegen. Stets überwog die Anzahl von T-Zellen die der B-Zellen. Alle

Hirnschnitte, die eine Lymphozyteninfiltration zeigten, waren sowohl für B- als auch für T-zellspezifische Proteine positiv. Rückenmarksuntersuchungen zeigten ebenfalls in der weißen Substanz, allerdings nur vereinzelt, T- aber keine B-Zellen.

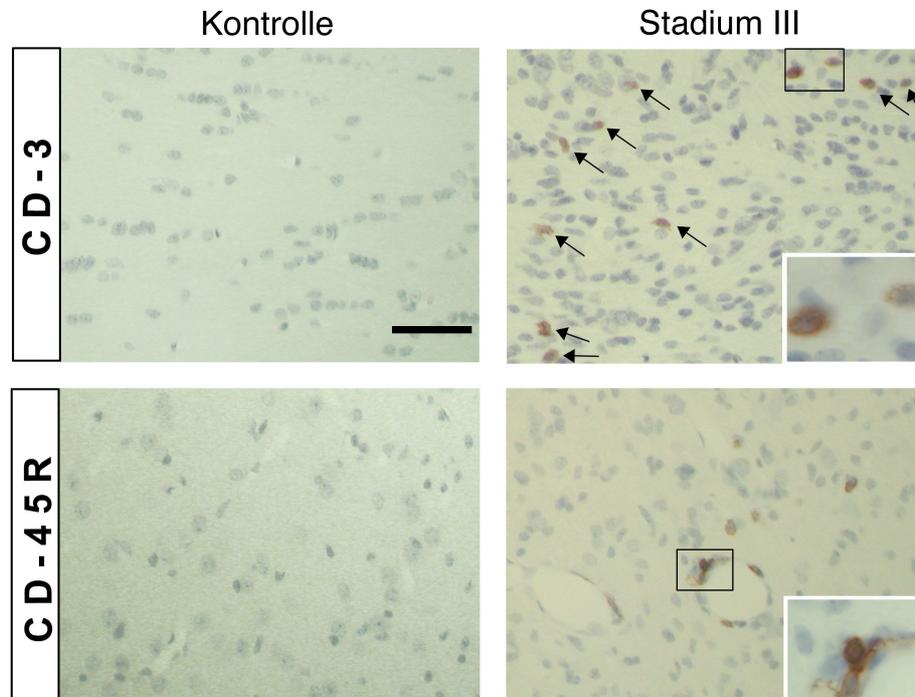
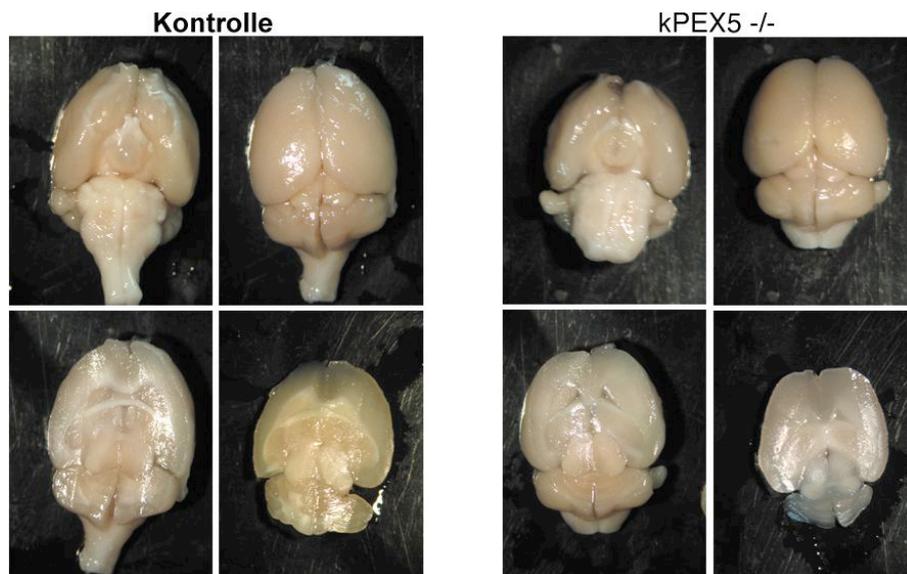


Abb. 23: Lymphozyten-Infiltration in Läsionen des Zentralnervensystems

Die immunohistochemische Detektion lymphozytärer Markerantigene (CD-3 und CD-45R) an horizontalen Paraffinschnitten zeigt das Vorkommen CD-3-positiver T-Zellen (Pfeile; oben) und perivaskuläres Vorkommen CD-45R-positiver B-Zellen in den Läsionen des Corpus Callosum 6 Monate alter konditionaler PEX5-defizienter Mäuse. Diese Zelltypen wurden in Gehirnen der Kontrolltiere nie entdeckt. Die Vergrößerung zeigt den jeweils schwarz umrandeten Ausschnitt. Größenbalken: 5 µm.

Durch Läsionen im Gehirn kann die Blut-Hirn-Schranke (BHS) beschädigt werden, die im gesunden Organismus zur Homöostase beiträgt und verhindert, dass Hormone, Ionen, Fremdorganismen aber auch eigene Blutzellen (etc.) aus dem Blutkreislauf unkontrolliert in das ZNS eindringen. Die BHS wurde überprüft, um herauszufinden, ob die beobachtete Lymphozyteninfiltration spezifisch war oder Resultat einer defekten BHS. Dazu wurde ein blauer Farbstoff (Evans Blau), der das Blotalbumin bindet, in den Kreislauf mutanter Mäuse des Krankheitsstadiums V injiziert. Anschließend wurden die Gehirne daraufhin untersucht, ob das Farbstoffgekoppelte Protein in das Gehirn eingedrungen war. In keinem untersuchten Gehirn wurden Spuren des blauen Farbstoffs nachgewiesen (Abb. 24). Die BHS-Untersuchung schloss daher unspezifische Lymphozyteninfiltration aus.

**Abb. 24: Nachweis einer intakten Blut-Hirn-Schranke**

Fixierte Mausgehirne 12 Monate alter Tiere, die 6 Stunden nach Evans-Blau-Farbstoff-Injektion getötet wurden. Der an Blutalbumin bindende Farbstoff gelangt bei defekter Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn und färbt diese Bereiche entsprechend blau an. Die BHS konditionaler PEX5-nullmutanter Tiere ließ den Farbstoff nicht in das Gehirn eindringen.

Von MS-Patienten Untersuchungen war bekannt, dass verschiedene Zytokine und Chemokine bei der spezifischen Lymphozyteninfiltration eine Rolle spielen (Karpus und Kennedy, 1997). Aus dem Grund wurde verfolgt, ob die Expression einiger dieser Faktoren auch in Gehirnen konditionaler PEX5-mutanter Mäuse erhöht war. In Zusammenarbeit mit A. Mildner (AG Prinz, Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen) wurden verschiedene Chemokin- und Zytokinkandidaten anhand quantitativer RT- (Real Time) PCR-Analysen überprüft (Abb. 25). Dabei wurde eine Erhöhung der Expression des Chemokinrezeptors CCR-2 um Faktor 4 nachgewiesen. Ein bekannter Ligand dieses Rezeptors, das auf Lymphozyten chemotaktisch wirkende MIP-1 α (Monozyten Inflammatorisches Protein 1 α), war sogar bis 15 mal höher als in den Kontrolltieren exprimiert. Die Expressionsaktivierung des ebenfalls chemotaktisch auf Lymphozyten wirkenden MCP-1 (Makrophagen Chemotaktisches Protein 1) bewegte sich um den Faktor 7. Weiterhin ließen erhöhte Expressionsraten des proinflammatorischen Zytokins, TNF- α , und des inflammatorischen Zytokins IFN- γ die Aktivierung von Lymphozyten im Gehirn konditionaler PEX5-defizienter Mäuse vermuten (Abb. 26).

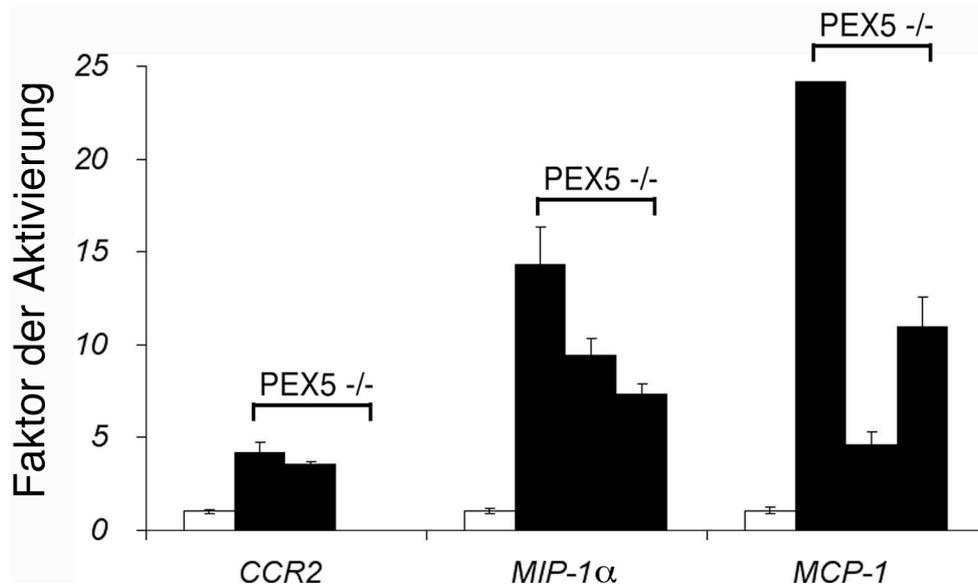


Abb. 25: Erhöhte Expression Lymphozyten-chemoattraktiver Chemokine und eines Chemokinrezeptors im Gehirn konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Graphische Darstellung quantitativer RT-PCR-Analysen, die mit aus Mausgehirn gewonnener cDNA von je 3 Kontrolltieren (gemittelt, weißer Balken) und drei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen (einzeln dargestellt, schwarze Balken) durchgeführt wurden. Die Expressionsaktivität wurde nach dem Mittel der Kontrolltier-Expression normiert. Untersucht wurde die Expression von Chemokinen (Monozyten Inflammatorisches Protein 1 α , MIP-1 α und Makrophagen Chemotaktisches Protein 1, MCP-1), und deren Rezeptor (CCR2). In allen drei Tieren war eine deutliche transkriptionale Aktivierung der chemoattraktiven Proteine im Vergleich zum Kontrolltierwert messbar.

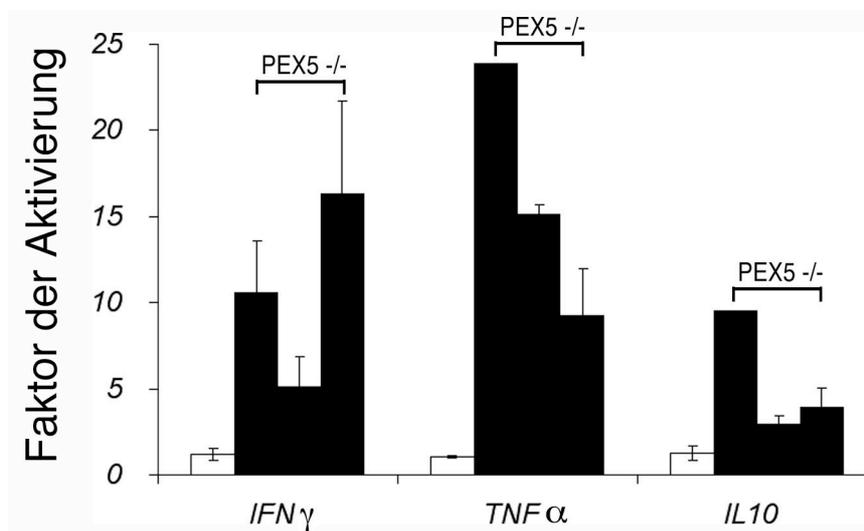


Abb. 26: Erhöhte Expression pro- und antiinflammatorischer Proteine im Gehirn konditionaler PEX5-defizienter Mäuse

Graphische Darstellung quantitativer RT-PCR-Analysen, die mit aus Mausgehirn gewonnener cDNA von je 3 Kontrolltieren (gemittelt, weißer Balken) und drei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen (einzeln dargestellt, schwarze Balken) durchgeführt wurden. Die Expressionsaktivität wurde nach dem Mittel der Expression der Kontrolltiere normiert. Untersucht wurde die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und des inflammatorischen Zytokins IFN- γ . In allen drei Tieren war eine deutliche transkriptionale Aktivierung der Gene im Vergleich zum Kontrolltierwert messbar.

III Diskussion

Die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD) ist die häufigste juvenile Leukodystrophie. Bei dieser letalen Erkrankung werden zwei Verlaufsformen unterschieden. Die erste wird als cerebrale oder „childhood ALD“ (cALD) bezeichnet, tritt im Kindesalter auf und ist in ihrem Verlauf stark progressiv. Mithilfe des klinischen bildgebenden Verfahrens der MRT (Magnet-Resonanz-Tomographie) kann im Nervensystem betroffener Patienten die Degeneration subcortikaler weißer Substanz nachgewiesen und in ihrem Verlauf verfolgt werden. Die zweite langsam progressive Form wird als Adrenomyeloneuropathie (AMN) bezeichnet, setzt erst im Erwachsenenalter ein und betrifft hauptsächlich die langen Bahnen des Rückenmarks (Moser et al., 1992).

Der X-ALD liegt ein genetischer Defekt des peroxisomalen Membranproteins ALDP (Adrenoleukodystrophie Protein) zugrunde (Mosser et al., 1993; Contreras et al., 1994; Mosser et al., 1994). Die Inaktivierung dieses Gens in der Maus hatte keine cerebrale Neurodegeneration zur Folge (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997). Nur sehr milde Schädigungen des Nervensystems, im symptomatischen Verlauf der adulten AMN vergleichbar, konnten bei mindestens 16 Monate alten Mäusen festgestellt werden (Pujol et al., 2002). Wie bei allen X-ALD-Patienten kam es auch bei diesen Mäusen zur Akkumulation überlangkettiger Fettsäuren (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997).

Da anhand humanen Autopsiematerials nur der Endpunkt einer Erkrankung analysiert werden kann, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell für die juvenile Form der X-ALD entwickelt und analysiert werden. Dafür sollte getestet werden, ob der Verlust peroxisomaler Funktion spezifisch in myelinbildenden Zellen zu einer cerebralen Demyelinisierung führt. Um die Peroxisomenfunktion in Oligodendrozyten einzuschränken, sollte ein zentraler peroxisomaler Biogenesefaktor, Peroxin 5 (PEX5), inaktiviert werden.

1 *Inaktivierung multipler Peroxisomenfunktionen in myelinbildenden Zellen*

PEX5-Defizienz verursacht in einer Vielzahl von Organismen peroxisomale Dysfunktion, da durch PEX5-Defizienz der Import nahezu aller Matrixproteine in das Peroxisom inhibiert wird (Gould und Collins, 2002). Mäuse mit konventionell inaktiviertem PEX5-Gen sind, vermutlich aufgrund starker Leberschäden, postnatal weniger als 72 Stunden lebensfähig (Baes et al., 1997) und daher nicht hilfreich bei Fragestellungen, die die Myelinisierung oder den Erhalt des Myelins betreffen. Deswegen sollte die peroxisomale Funktion zelltypspezifisch mithilfe des Cre/LoxP-Systems inhibiert werden. Mäuse mit Cre-Expression in myelinbildenden Zellen (CNP-Cre Mäuse) wurden dazu mit einer Mauslinie verpaart, deren PEX5-Gen „gefloxt“ ist. Die immunhistochemische, immunzytochemische, molekularbiologische und massenspektrometrische Analyse des ZNS dieser Nachkommen zeigte die erfolgreiche Deletion des PEX5-Gens in Oligodendrozyten sowie damit verbundene Merkmale für gestörte Biogenese und Funktion von Peroxisomen.

2 *Ähnlichkeiten und Unterschiede des Mausmodells zur X-ALD*

Der Phänotyp konditionaler PEX5-nullmutanter Mäuse weist hohe Vergleichbarkeit zur menschlichen X-ALD auf. Das deutet darauf hin, dass der genetische Defekt der X-ALD ebenfalls zu umfassender peroxisomaler Dysfunktion in Oligodendrozyten führt. Die adrenocortikalen und Leydigischen Zellen sind wegen des zelltypspezifischen Defekts in diesen Mäusen nicht betroffen.

2.1 *Normale Myelinisierung trotz eingeschränkter Peroxisomenfunktion*

Mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen enzymatischer Katalase-Aktivität in der weißen Substanz am Nervensystem der Ratte war gezeigt worden, dass die Peroxisomenzahl von Oligodendrozyten während der Entwicklung zunimmt und dies mit dem Beginn der Myelinisierung koinzidiert (Arnold und Holtzman, 1978; Adamo et al., 1986). Dies ließ auf eine bedeutsame Rolle der Peroxisomen bei der Myelinbildung schließen.

Aufgrund der zeitlichen Verschiebung zwischen Cre-Expression, Deletion des PEX5-Gens, Eliminierung bereits existierenden PEX5-Proteins und Degeneration zuvor

funktionaler Peroxisomen, lässt sich der genaue Zeitpunkt des peroxisomalen Verlusts *In vivo* konditionaler PEX5-defizienter Mäuse nicht bestimmen. Die immunhistochemische und immunzytochemische Analyse der PEX5- und Cre-Expression sowie die der Katalaseverteilung im ZNS PEX5-defizienter Mäuse lässt auf frühen Verlust peroxisomaler Funktion schließen. Trotzdem wurde normale Myelinisierung in diesen mutanten Mäusen nachgewiesen. Das deutet darauf hin, dass Peroxisomen bei der initialen Myelinbildung keine essentielle Rolle spielen. Eine Ausnahme könnte hierbei die Synthese von Cholesterin darstellen, denn Cholesterin macht 26% aller Lipide des Myelins aus (Sastry, 1985), und publizierte Daten belegen, dass Teile der Cholesterinsynthese in Peroxisomen stattfinden (Hodge et al., 1991; Wanders und Romeijn, 1998; Kovacs et al., 2004). Möglicherweise ist die Myelinbildung nicht von Cholesterinmangel betroffen, weil die maximale Cholesterinsynthese bereits an Embryonaltag 10-12 erreicht ist (Muse et al., 2001), wenn die CNP-Expression beginnt.

Pathologische Veränderungen werden bei Leukodystrophie-Patienten mittels MRT meist schon innerhalb der ersten zwei Lebensjahre während der Myelinisierungsphase sichtbar. Diese Dysmyelinisierungen werden von demyelinisierenden Erkrankungen abgegrenzt, bei denen eine weitgehend normale Myelinentwicklung den degenerativen Prozessen vorausgeht (Lazzarini, 2004). Unter der Vielzahl von Leukodystrophien existieren nur wenige demyelinisierende Erkrankungen. Diese sind der X-ALD, der MLD (Metachromatische Leukodystrophie) und der GLD (Globoid Zell Leukodystrophie) zuzuordnen (Lazzarini, 2004). Als einziges Demyelinisierungsmodell gewinnt die konditionale PEX5-nullmutante Maus daher besonders an Bedeutung.

2.2 Beginn der klinischen Symptomatik nach dem Ende der Myelinisierung

Bei juvenilen X-ALD-Patienten ist der Verlauf pränataler, perinataler und früher postnataler Entwicklung vollkommen normal (Lazzarini, 2004). Die Normalität der Entwicklung konnte auch bei konditionalen PEX5-nullmutanten Mäusen gezeigt werden. Erst nach der Myelinisierung im Alter zwischen drei und sechs Monaten, setzten neurologische Symptome ein. Bei Patienten beginnen diese im Alter von 4 bis 10 Jahren (Lazzarini, 2004). Auch der progressive Verlauf bis zur vollkommenen Paralyse im späten Krankheitsstadium sowie die Beeinträchtigung der

Rumpfmuskulatur spiegeln Merkmale verschiedener Leukodystrophien wider (Gartner et al., 1998; Clayton, 2001). Den Endpunkt der Erkrankung stellt sowohl im Mausmodell (nach weiteren vier bis sechs Monaten) als auch bei Patienten (nach weiteren 1,9 +/- 2 Jahren) ein vegetatives Stadium dar. Die Motorik betreffend ist der Phänotyp konditionaler PEX5-defizienter Mäuse folglich mit den pathologischen Veränderungen bei Leukodystrophie-Patienten vergleichbar.

2.3 Symmetrische cerebrale Demyelinisierung und Neurodegeneration

Histochemische Färbungen und MRT-Untersuchungen von Gehirnen PEX5-defizienter Mäuse stellten deutlich einen Verlust subcortikalen Myelins dar. Der Läsionsbeginn lokalisierte im frontalen Bereich des Corpus Callosum (Genu des Corpus Callosum) mit symmetrischer Progression in caudale Richtung. Dieser Verlauf entspricht dem von ca. 10 % der Patienten (Dubois-Dalcq et al., 1999; Hammerschmidt, 2003). Die Graue Substanz der Patienten bleibt von diesem degenerativen Prozess weitgehend verschont (Feigenbaum et al., 2000), was auch auf konditionale PEX5-nullmutante Mäuse zutrifft. Weitere typische histopathologische Merkmale der juvenilen X-ALD, die ebenfalls im Gehirn der Mäuse nachgewiesen wurden, sind wenige apoptotische Oligodendrozyten und der Verlust von Axonen (Feigenbaum et al., 2000) (Ito et al., 2001; Lazzarini, 2004). Obwohl die Ergebnisse bezüglich der apoptotischen Zelltodrate vom Mausmodell und Patienten-Autopsiematerial vergleichbar sind, erlaubt die histopathologische Analyse früher Krankheitsstadien der Maus eine andere Schlußfolgerung. Während die Analyse des Autopsiematerials von ALD-Patienten nur einen Zeitpunkt widerspiegelt, wurde bei den Mäusen die Verteilung apoptotischer Zellen im Gehirn bereits ab dem Alter von 2 Monaten untersucht. Dabei traten apoptotische Zellen bei leicht steigender Tendenz in jedem untersuchten Alter auf. Vor dem Hintergrund betrachtet, daß apoptotische Zellen nur in einem schmalen Zeitfenster dargestellt werden können, wird diese Beobachtung bedeutsamer. Im Gegensatz zur publizierten Meinung, dass nicht die wenigen apoptotischen Zellen sondern T-Zell-vermittelte Zytolyse Oligodendrozytenverlust verursacht, ist daher anzunehmen, dass auch die geringe Zahl detektierbarer apoptotischer Zellen auf lange Sicht Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf haben könnten.

Das Zellweger Syndrom ist die Erkrankung, die aus PEX5-Defizienz resultiert. Sie gehört zur Gruppe der Peroxisomale-Biogenese-Krankheiten („Peroxisomal

Biogenesis Disorders“, PBD). Auch bei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen kommt es in Oligodendrozyten zur Störung peroxisomaler Biogenese und damit zu vielfältiger Störung peroxisomaler Funktionen. Von diesem Standpunkt aus betrachtet, könnte das Mausmodell auch als Modell der neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD) gesehen werden. Diese erhielt ihren Namen wegen vergleichbarer klinischer Auffälligkeiten mit der X-ALD und gehört zur Großgruppe der PBD. In einigen wichtigen Punkten, in denen sich X-ALD und NALD unterscheiden, entspricht das Mausmodell jedoch der juvenilen X-ALD: Bei der NALD treten immense neuronale Migrationsdefekte auf, die im Mausmodell und bei X-ALD-Patienten nicht zu finden sind. Außerdem treten bei der NALD-Patienten multifokale Läsionen auf (Kelley et al., 1986), währenddessen sich konditionale PEX5-mutante Mäuse und X-ALD-Patienten durch unifokale Läsionen auszeichnen.

Obwohl die peroxisomale Schädigung der Mäuse auch die cerebellare weiße Substanz, das Rückenmark und die Schwannschen Zellen des PNS betrifft, bleiben diese Regionen von degenerativen Prozessen weitgehend verschont. In diesen Punkten weist das Mausmodell ebenfalls hohe Vergleichbarkeit zu Patienten der juvenilen X-ALD auf. Bei AMN Patienten hingegen ist hauptsächlich das Rückenmark betroffen und auch das PNS weist Läsionen auf (Powers et al., 2000).

2.4 Spezifität der Läsionsregion

Trotz peroxisomaler Dysfunktion aller myelinbildenden Zellen in konditionalen PEX5-nullmutanten Mäusen, ist der Läsionsbeginn stets im Genu des Corpus Callosum mit caudaler Progression zu finden. Andere Bereiche der weißen Substanz bleiben verschont. Dies kann nicht durch das temporale Expressionsmuster der Cre-Rekombinase erklärt werden, da die CNP-Expression in der Mausentwicklung im Rückenmark und Kleinhirn beginnt (Gravel et al., 1998), und gerade diese Bereiche der Mäuse erst sehr spät und vergleichsweise leicht von der Demyelinisierung betroffen sind. Der Spezifität des Läsionsmusters muss also ein anderer Mechanismus zugrunde liegen. Es wäre denkbar, dass der peroxisomale Umsatz in betroffenen Gebieten schneller ist als in anderen Bereichen. In diesem Fall würden sich hier erste unfunktionale Peroxisomen finden. Allerdings weist die Verteilung Katalase-positiver Peroxisomen auf einen gleichmäßigen Verlust in der weißen Substanz hin. Deswegen scheint es wahrscheinlicher, dass zuerst betroffene

Regionen mehr als andere Bereiche von peroxisomaler Funktion abhängig sind. Da bei X-ALD-Patienten alle Zellen vom genetischen Defekt betroffen sind, ist dies auch bei ihnen die wahrscheinlichste Erklärung für die Spezifität der Läsion. Beim Vergleich der Läsionen von X-ALD-Patienten und konditionalen PEX5-nullmutanten Mäusen ist auffällig, dass die Läsion bei Mäusen im frontalen Bereich, bei Patienten meistens im occipitalen Bereich beginnt. Diese Beobachtung gewinnt an Bedeutung vor dem Hintergrund, dass die frontalen callosalen Fasern die Hemisphärenbereiche für die Informationsverarbeitung des Riechsinnesorgans verbinden, während die occipitalen callosalen Fasern die Hemisphärenbereiche für die Informationsverarbeitung des optischen Sinnes verbinden (Osborn et al., 2004). Interessant ist dabei, dass für Mäuse das Riechsinnesorgan, aber für Menschen der optische Sinn von besonderer Bedeutung ist (Skrandies und Fahle, 1994; Schiller, 1997; Bleckmann et al., 2004; Brennan, 2004). Entsprechend ist davon auszugehen, dass die verbindenden Fasern in der jeweiligen Spezies besonders aktiv sind. Daher kann vermutet werden, dass der Anspruch an oligodendrozytäre Peroxisomen von axonaler Aktivität abhängig ist und besonders hohe axonale Aktivität zur Läsionsbildung sowohl bei ALD-Patienten als auch bei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen beiträgt.

Die exakte Lokalisation des Läsionsbeginns der konditionalen PEX5-defizienten Mäuse mittig zwischen den Hemisphären, ist hiermit allerdings nicht erklärt. Alle Oligodendrozyten, die an der Myelinisierung dieser besonders aktiven Fasern beteiligt sind, müssten auf gleiche Weise beansprucht werden, unabhängig davon, ob sie in der Mitte oder an den Axonendigungen lokalisiert sind. Auch die gleichmäßige Verteilung der Peroxisomen innerhalb der weißen Substanz lässt dies vermuten (McKenna et al., 1976; Adamo et al., 1986). Trotzdem handelt es sich um einen mittigen unifokalen Läsionsbeginn. Im Mausmodell könnte der Grund dafür darin liegen, dass oligodendrozytäre Fehlfunktion peripherer Bereiche teilweise durch intakte Peroxisomen neuronaler und astrozytärer Zellkörper kompensiert werden kann. Ein horizontaler Transfer peroxisomaler Produkte wurde *In vivo* bereits für Cholesterin im Gehirn und für andere Lipide auch im PNS nachgewiesen (Toews et al., 1988; Saher et al., 2005).

2.5 Der Zelltod: Primär neuronal oder glial?

Bei der Analyse der mutanten Mäuse war es nicht möglich, eindeutig festzustellen, ob axonaler Verlust dem des Myelins vorausgeht oder folgt, denn die Möglichkeiten zur Quantifizierung von Myelin und Axonen sind begrenzt. Zwar treten bei den Mäusen axonale Schwellungen schon in sehr frühen vorklinischen Stadien auf, genauso früh sterben jedoch apoptotisch erste Oligodendrozyten. Ein Indiz dafür, dass Neuronen früher als gliale Zellen betroffen sein könnten, lieferte der Vergleich der axonalen Bielschowsky- mit der Myelin-Silberimprägnierung. Während durch immunhistochemische Analysen nur in demyelinisierten Läsionsgebieten auch Verlust neuronaler Markerproteine wie SMI-31/-32 gezeigt wurde, war die axonale Bielschowsky-Färbung im gesamten Gehirnschnitt der Tiere ab dem dritten Krankheitsstadium schwächer als bei Kontrolltieren. Deshalb lässt sich vermuten, dass es bereits vor Myelinverlust zu pathologischen Veränderungen der Axone kommt. Neuronaler Zelltod könnte also das primäre Ereignis sein, welches Demyelinisierung und Oligodendrozytensterben nach sich zieht. Dieses bekannte Phänomen wird als Wallersche Degeneration bezeichnet (Kandel et al., 2000).

Obwohl der peroxisomale Defekt im Mausmodell nur Oligodendrozyten betrifft, ist es möglich, dass zuerst Neuronen unter diesem Verlust leiden. Einige deletionsmutante Mauslinien myelinspezifischer Proteine, bei denen primär axonale Schädigungen nachgewiesen worden sind, sind bereits beschrieben. So wurden in 6 Wochen alten PLP-nullmutanten Mäusen axonale Schwellungen beobachtet (Griffiths et al., 1998). Diese Mäuse wiesen nur leichte Unterschiede zu Kontrolltieren in der Ultrastruktur des Myelins auf (Klugmann et al., 1997). Weiterhin entwickeln CNP-defiziente Mäuse eine axonale Pathologie bei normaler Ultrastruktur des Myelins und ohne detektierbaren Myelinverlust (Lappe-Siefke et al., 2003).

2.6 Effektorzelltypen und deren Verteilung bei der Demyelinisierung

Bei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen konnte das zeitliche Verlaufsmuster der Demyelinisierung und daran beteiligter Zelltypen genau aufgeschlüsselt und mit dem klinischen Erscheinungsbild korreliert werden. Obwohl phänotypische Veränderungen anhand neurologischer Symptome erst einige Monate später ausgemacht werden konnten, wurden immunhistochemisch erste Anzeichen von Gliosen bereits kurz nach Abschluß der Myelinisierung in den Mausgehirnen

detektiert. In fortgeschritteneren Stadien traten in den Läsionen auch T- und B-Lymphozyten auf. Das Vorkommen und die Verteilung beteiligter Zelltypen in den Gehirnen konditionaler PEX5-defizienter Mäuse weist besonders hohe Vergleichbarkeit zu Daten einer Publikation auf (Ito et al., 2001), in der Makrophagen und dann Astrozyten als dominierende Zelltypen in den Läsionen von X-ALD-Patienten beschrieben werden, gefolgt von T- und nur vereinzelt B-Zellen. Hierbei ist die Lymphozyten-Infiltration von besonderer Bedeutung, da sie unter den Leukodystrophien als Charakteristikum der X-ALD eingestuft wird. In abgeschwächter Form kommen Lymphozyten sonst nur noch in der GLD und in wenigen Läsionen der Alexander Krankheit vor (Lazzarini, 2004).

Ein wichtiges ultrastrukturelles Merkmal der ALD (Powers und Schaumburg, 1973; Johnson et al., 1976; Martin, 1995) war in den Mäusen nicht zu finden: Die subzellularen kristallinen Einschlüsse in den Makrophagen fehlten. Dies ist durch den zelltypspezifischen peroxisomalen Defekt zu erklären, der die Makrophagen dieser Mäuse nicht betrifft. Sie sind daher in der Lage phagozytiertes Myelin normal abzubauen.

2.7 Entzündliche Demyelinisierung

Sowohl die spezifische Infiltration und Lokalisation der Lymphozyten bei konditionalen PEX5-nullmutanten Mäusen, als auch verstärkte Expression inflammatorischer Zytokine sind mit der von ALD-Patienten vergleichbar. Da die Demyelinisierung auftrat bevor erste Lymphozyten entdeckt wurden, lässt sich vermuten, dass das primäre Demyelinisierungsereignis in den Mäusen nicht entzündlich ist. Im Unterschied zur Multiplen Sklerose sind Lymphozyten im Gewebe von ALD-Patienten hinter der Läsionsgrenze lokalisiert (Schaumburg et al., 1975; Schaumburg et al., 1976; Aubourg und Dubois-Dalcq, 2000), was der Grund für die Annahme ist, dass es sich auch hier nicht primär um ein entzündliches erstes Demyelinisierungsereignis handelt (Dubois-Dalcq et al., 1999). Im Unterschied zur AMN wird bei der juvenilen Form der X-ALD ein zweiseitiger Mechanismus vermutet, bei dem initiale Demyelinisierung einem autoreaktiven Immunmechanismus vorausgeht (Powers et al., 1992). Eine autoreaktive Beteiligung des Immunsystems wird als mögliche Ursache für den sehr viel schnelleren Krankheitsverlauf der juvenilen X-ALD im Vergleich zur AMN diskutiert. Als Beweis

dafür sind allerdings nicht mehr als die Existenz der Lymphozyten sowie die einiger inflammatorischer Zytokine nachgewiesen worden (Griffin et al., 1985; Powers et al., 1992; McGuinness et al., 1997; Ito et al., 2001). Die Wirkung immunsuppressiver Therapieversuche auf den Krankheitsverlauf von X-ALD-Patienten ist umstritten (Naidu et al., 1988; Cappa et al., 1994), daher ist eine autoreaktive Beteiligung nicht eindeutig bewiesen.

3 Bedeutung der konditionalen PEX5-defizienten Mauslinie

3.1 „Natürliche zelltypspezifische“ Peroxisomendysfunktion in der X-ALD - eine Hypothese

Bei juvenilen Patienten der X-ALD sind hauptsächlich Myelin und der adrenale Cortex von degenerativen Prozessen betroffen. Die Nebennieren sind in Fettgewebe eingebettet (Kessel und Kardon, 1979; Vahouny et al., 1984). Eine Gemeinsamkeit beider Gewebe stellt der hohe Fettanteil und Fettumsatz dar. Lipide werden besonders im Peroxisom metabolisiert (Kramar, 1986; Lazarow, 1987; Lazarow, 1987), in dem Organell, dessen Membranprotein ALDP von Mutationen bei dieser Erkrankung betroffen ist. Es scheint daher wahrscheinlich, dass erst hoher Lipid-Metabolismus bei ALDP-Defizienz zur Degeneration der Zellen führt. Insofern lässt sich bei ALDP-Defizienz eine Sekundärschädigung vermuten, die sich aus dem Lipid-Metabolismus ergibt. Weiterhin lässt die normale Myelinisierung bei ALDP-Defizienz vermuten, dass Synthese-Prozesse des Peroxisoms anscheinend normal ablaufen, denn auch die juvenile Form der X-ALD betrifft Patienten erst ab dem vierten Lebensjahr. Den Krankheitsausbruch der ALD durch eine Sekundärschädigung zu erklären, würde auch die Begründung dafür liefern, dass ALDP-defiziente Mäuse aufgrund ihrer kurzen Lebenserwartung kaum neurologische Symptome entwickeln.

Die Funktion von ALDP ist bislang ungeklärt. Aufgrund der Struktur, der Sequenzhomologie mit ABC-Transportern und der subzellularen Lokalisation (Mosser et al., 1993; Contreras et al., 1994), ist zu vermuten, dass es für den ATP-abhängigen Import oder Export eines peroxisomalen Enzyms, Substrats oder Produkts verantwortlich sein könnte. Die Inhibition des ALDP-vermittelten Transports könnte in einer Kettenreaktion chemische Gleichgewichte von Substraten, Zwischen-

oder Endprodukten des peroxisomalen Metabolismus verschieben und dadurch weitere peroxisomale Funktionen stören. Außer direkt ALDP-abhängiger Funktion wäre also eine umfassende Schädigung des Organells denkbar, die aus ALDP-Defizienz resultieren könnte. Eine Reihe von Hinweisen unterstützen die Hypothese einer zelltypspezifischen Sekundärschädigung des Peroxisoms in der X-ALD:

1) Eine zelltypspezifische Schädigung ist bereits für andere peroxisomale Krankheiten beschrieben worden: In Leberbiopsien eines Patienten wurde ein Katalase-Import-Defekt gefunden, aber in den kultivierten Fibroblasten desselben Patienten nicht (Baumgartner et al., 1998).

2) Während in Fibroblasten von X-ALD-Patienten normale Plasmalogen- und Cholesterin-Werte gefunden wurden (Perichon et al., 1998), waren diese Werte im Gehirn von X-ALD-Patienten gesenkt (Ramsey et al., 1976; Wilson und Sargent, 1993).

3) Einige peroxisomale Einzelenzymdefekte stellen sich klinisch wie eine Peroxisomale-Biogenese-Krankheit (Peroxisomal Biogenesis Disorder, PBD) dar (Moser, 1999). Dies deutet darauf hin, daß Einzelenzymdefekte grundsätzlich in der Lage sind, sekundär auch die gesamte Peroxisomenfunktion stören zu können. Ein Mosaizismus, wie unter 1) genannt oder wie in der X-ALD wäre demnach so zu erklären, dass zuerst Organe oder Zelltypen betroffen sind, in denen die Aktivität des betreffenden Enzyms am höchsten ist.

4) Bei dem Versuch für den rhizomelen Typ der Chondrodysplasia Punctata (RCDP) ein Mausmodell zu generieren, trat dasselbe Phänomen auf, wie bei dem Versuch eins für die X-ALD zu finden. Die Inaktivierung des in der Maus homologen Proteins (Dihydroxyazetonphosphat-Acyltransferase, DAPAT) führte nicht zu den erwarteten phänotypischen Veränderungen, obwohl der biochemische Aspekt, die Senkung des Plasmalogengehalts, nachgewiesen wurde. Auch hier könnte es sein, daß erst eine sekundäre Störung weiterer peroxisomaler Funktionen die Krankheit auslöst.

5) Speziell dafür, dass im Fall der X-ALD sekundär weitere Peroxisomenfunktionen ausfallen, spricht auch die Existenz der Neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD). Klassischerweise treten erste Symptome deutlich früher auf als bei der X-ALD. Diese sind aber denen der X-ALD so ähnlich, dass die beiden Krankheiten über Jahrzehnte bis zur Aufdeckung des jeweiligen genetischen Defekts als dieselbe Krankheit betrachtet wurden. In Wirklichkeit gehört aber die

NALD zur Klasse der PBD. Hier liegt also bereits primär ein Funktionsverlust des kompletten Peroxisoms vor.

6) Einen weiteren Hinweis, der die Hypothese untermauert, liefert die Analyse der konditionalen PEX5-defizienten Maus. Alle untersuchten klinischen sowie histopathologischen Ergebnisse spiegeln so exakt wie möglich das von X-ALD-Patienten bekannte Bild wider (siehe 2).

Es ist also wahrscheinlich, dass es bei der X-ALD zu einem natürlichen zelltypspezifischen Sekundärschaden peroxisomaler Funktion kommen könnte, der in der konditionalen PEX5-defizienten Maus auf künstliche Weise durch die entsprechende Genmanipulation erzeugt wird. Daher handelt es sich hierbei um ein adäquates Mausmodell für diese Krankheit.

3.2 Relevanz des Mausmodells für Therapien der X-ALD

Obwohl die progressive, symmetrische, entzündliche Demyelinisierung der konditionalen PEX5-defizienten Mäuse so stark der von X-ALD-Patienten entspricht, eignet sich das Mausmodell zur weiteren Erforschung der Erkrankung nur begrenzt. Den molekularen Pathomechanismus aufzuklären, der möglicherweise als Folge des ALDP-Defekts zum Verlust der kompletten Peroxisomenfunktion führt, ist durch Untersuchungen dieser Mauslinie nicht möglich. Da in den Mäusen bereits durch den genetischen Defekt eine weitreichendere Schädigung des Peroxisoms erzielt wird, als es primär bei der X-ALD der Fall ist, eignet sich die Mauslinie vermutlich auch nicht für Therapieversuche, die auf vorklinische Stadien abzielen. Vielmehr bietet das Mausmodell einen guten Überblick über die Art und das zeitliche Muster der degenerativen Prozesse, inklusive der Beteiligung des Immunsystems. Einige Ergebnisse dieser Arbeit können der Entwicklung von Therapien für Patienten später Krankheitsstadien dienen; andere liefern mögliche Erklärungen für Therapieerfolge mancher Behandlungen oder stellen bereits angewandte Therapien in Frage.

Da in den konditionalen PEX5-defizienten Mäusen außer den Oligodendrozyten kein Zelltyp des Gehirns eine peroxisomale Schädigung aufweist, bleiben auch Mikroglia davon verschont. Wie immunhistochemische Katalase-Färbungen an Gehirnschnitten konditionaler PEX5-defizienter Mäuse zeigten, waren in den Läsionen zahlreiche aktivierte Mikroglia durch Ausstattung mit auffällig vielen

Peroxisomen gekennzeichnet. Dies liefert ein Indiz dafür, dass funktionsfähige Mirkoglia in den Läsionen peroxisomale Aktivität zur Verfügung stellen könnten, was sich mit Vermutungen über den teilweise Erfolg von Knochenmarkstransplantationen (KMT) deckt. Diese werden häufig als Therapie für ALD-Patienten eingesetzt und scheinen in einigen Fällen vorübergehend zum Stillstand der Krankheitsentwicklung zu führen (Krivit et al., 1992; Krivit et al., 1995). Es wird vermutet, dass dafür Makrophagen mit intakten Peroxisomen verantwortlich sind, die aus dem Spenderknochenmark hervorgehen und das Gehirn infiltrieren (Krivit et al., 1995; Krivit et al., 1999; Baumann et al., 2003).

Da bei der Analyse konditionaler PEX5-nullmutanter Mäuse auch Tiere mit extrem starker Lymphozyteninvasion zu relativ spätem Zeitpunkt vom klinischen Erscheinungsbild her noch als gesund eingestuft wurden, ist denkbar, dass das Immunsystem keinen oder sogar einen inhibierenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen könnte. Demnach könnte es bei der juvenilen X-ALD auch so sein, dass die schnelle Demyelinisierung Auslöser für die Aktivierung des Immunsystems ist, und nicht die Immunsystemaktivierung zur schnellen Demyelinisierung führt. Dieser Sachverhalt kann an der konditionalen PEX5-nullmutanten Mauslinie weiter untersucht und möglicherweise hilfreich für die weitere Therapieentwicklung in der X-ALD werden.

ALD-Patienten werden außerdem oft mit Medikamenten zur Förderung von Remyelinisierung (Dubois-Dalcq et al., 1999) behandelt. Bei konditionalen PEX5-defizienten Mäusen erfolgt massiver axonaler Verlust zeitgleich mit der Demyelinisierung. Falls auch bei ALD-Patienten der axonale Verlust so früh auftreten sollte, wären Therapien die die Remyelinisierung verfolgen in Frage zu stellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen unsere Hypothese, dass eine sekundäre Schädigung des Peroxisoms zur Demyelinisierung führt. Daher scheint eine möglicherweise sinnvolle Therapieform für die X-ALD, in frühem Krankheitsstadium, also vor der Sekundärschädigung, die Proliferation der Peroxisomen anzuregen. Indem peroxisomale Proliferation angeregt wird, könnte eventuell sogar Patienten späterer Krankheitsstadien geholfen werden. Dazu müsste die Therapie allerdings auf *De Novo* Synthese von Peroxisomen aus dem

Endoplasmatischen Retikulum abzielen. Diese Peroxisomen könnten bis zum Auftreten der Sekundärschädigung teilweise normale Funktionen ausüben. Für eine solche Therapie wären allerdings umfangreichere, als die bislang gewonnenen Kenntnisse über *De Novo*-Biogenese von Peroxisomen und deren Regulation notwendig.

4 Mögliche Schlüsselfunktionen des Peroxisoms für das Nervensystem

Je nach Zelltyp sind Peroxisomen, was Enzymausstattung, Größe und den pH in der Matrix angeht, extrem heterogene Organellen (Plattner und Hentschel, 2002). Daher ist anzunehmen, dass auch die Funktion von Zelltyp zu Zelltyp variiert. Speziell über Peroxisomen von Oligodendrozyten sind mit Ausnahme der auffällig geringen Größe, die ihnen den Namen „Mikroperoxisomen“ einbrachten (Adamo et al., 1986), kaum Details bezüglich Enzymausstattung oder spezieller Substrate bekannt. Aufgrund bekannter peroxisomaler Funktionen, lassen sich aber Vermutungen über mögliche „Schlüsselfunktionen“ in Oligodendrozyten anstellen. Grundsätzlich kommen dafür alle Funktionen in Frage, die nicht oder nicht ausreichend redundant von anderen Organellen übernommen werden könnten. Dazu gehören der Abbau der VLCFA, die Plasmalogen- und eventuell auch Cholesterinsynthese (Lazarow, 1978; Thomas et al., 1979; Opperdoes, 1984; Krisans, 1992; Kovacs et al., 2002).

4.1 Die Plasmalogensynthese

Die Plasmalogenwerte im Myelin konditionaler PEX5-defizienter Mäuse waren deutlich reduziert. Dies deckt sich mit Ergebnissen stark eingeschränkter Plasmalogensynthese in PEX5-defizienten Zellen (Zoeller und Raetz, 1986). Die geringe Plasmalogenmenge im Myelin könnte Oligodendrozyten von benachbarten anderen Zelltypen zur Verfügung gestellt worden sein. Zumindest *In Vitro* wurde ein solcher Plasmalogentransfer bereits nachgewiesen (Loidl et al., 1990). Dennoch ist nicht auszumachen, ob die Plasmalogenwertsenkung Ursache der Demyelinisierung bei den konditionalen PEX5-mutanten Mäusen oder bei der X-ALD sein könnte. Interessanterweise ist bei der letalen Erbkrankheit RCDP (rhizomeler Typ der Chondrodysplasia Punctata) die Plasmalogensynthese gestört. Hier liegen meistens Mutationen des peroxisomalen Biogenesefaktors PEX7 zugrunde (Braverman et al., 1997; Motley et al., 1997; Purdue et al., 1997; Ofman et al., 1998). PEX7-defiziente

Zellen können die Subgruppe peroxisomaler Matrixenzyme, die eine peroxisomale Lokalisationssequenz 2 („peroxisomal targeting sequence 2“, PTS 2) tragen, nicht in das Peroxisom translozieren (Purdue et al., 1999). Eines der PTS2-tragenden Enzyme ist DAPAT (Moser, 1999; Purdue et al., 1999). Dieses Enzym katalysiert einen Schritt in der Plasmalogensynthese (Liu et al., 2005). Mutationen des Enzyms DAPAT führen beim Menschen ebenfalls zur RCDP. Daher wird angenommen, daß der Auslöser der Erkrankung auch bei PEX7-Defizienz hauptsächlich die mangelnde Synthese von Plasmalogenen ist. Der Verlauf dieser Erbkrankheit ist ebenfalls mit cerebraler Demyelinisierung verbunden, betrifft aber auch schon die frühe Entwicklung und führt zu neuronalen Migrationsdefekten, Blindheit, Taubheit und verkürzten Extremitäten. Es handelt sich also um eine weitreichende systemische Entwicklungsstörung. Welchen Anteil an dieser Erkrankung der Plasmalogensynthesedefekt in Oligodendrozyten hat, lässt sich nicht aufschlüsseln. Daher bleibt die Rolle der Plasmalogensynthese bei der X-ALD unklar.

4.2 Die Cholesterinsynthese

In den konditionalen PEX5-defizienten Mäusen wird das Nervensystem vermutlich trotz Peroxisomendysfunktion durch frühe Cholesterinsynthese ausreichend mit Cholesterin für die initiale Myelinisierung versorgt (siehe 2.1). In alten Tieren waren die Cholesterinwerte signifikant gesenkt. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass bei dem Umsatz des Myelins wegen der Peroxisomendysfunktion nicht mehr genügend neu synthetisiertes Cholesterin nachgeliefert werden kann. Unter dem Gesichtspunkt erscheint auch der zeitliche Verlauf der Krankheitsentwicklung plausibel, da die Dauer eines kompletten Cholesterinumsatzes im Myelin ca. ein Jahr beträgt (Dietschy und Turley, 2001; Dietschy und Turley, 2002). Auch die Senkung anderer Phospholipide im Myelin, die bei den konditionalen PEX5-nullmutanten Tiere gefunden wurden, könnte durch die verminderte Cholesterinsynthese erklärt werden, da die Cholesterinmenge anscheinend durch eine „Qualitätskontrolle“ maßgeblich an der Quantität der verschiedenen Phospholipide beteiligt ist, die verhältnismäßig zum Cholesterin stets konstant bleiben (Saher et al., 2005). Es ist demnach auch möglich, dass ein sekundärer peroxisomaler Defekt zu verminderter Cholesterinsynthese und dadurch zur Demyelinisierung in der X-ALD führen könnte.

4.3 Die VLCFA-Degradierung

Im Myelin konditionaler PEX5-defizienter Mäuse war keine Erhöhung der VLCFA messbar, möglicherweise weil die spezifisch in Peroxisomen lokalisierte VLCFA-Degradierung kompensatorisch von umgebenden, intakten Zellen übernommen werden konnte. Dies ist besonders interessant, weil die entzündliche Demyelinisierung in der Maus offenbar ohne VLCFA-Akkumulation ausgelöst wurde. Dadurch wird die Rolle der VLCFA als Ursache der Demyelinisierung in der X-ALD ein weiteres Mal in Frage gestellt. Dieses Ergebnis steht auch damit im Einklang, dass umgekehrt ALDP-defiziente Mäuse trotz erhöhter VLCFA-Werte keine Demyelinisierung entwickeln (Forss-Petter et al., 1997; Kobayashi et al., 1997; Lu et al., 1997), und keine Korrelation zwischen der Menge akkumulierter VLCFA und den unterschiedlichen Phänotypen (von cALD und AMN) in der X-ALD festgestellt wurde. Demnach kann zumindest die Demyelinisierung als Folge von Einlagerung der VLCFA in die Myelinmembran als unwahrscheinlich betrachtet werden. Nicht auszuschließen ist hingegen, dass VLCFA-Akkumulation zur Sekundärschädigung von Peroxisomen führt und daher doch von zentraler Bedeutung bei der X-ALD sein könnte. VLCFA-Akkumulation könnte zu veränderten chemischen Verhältnissen innerhalb des Peroxisoms führen, wodurch das Peroxisom weiter geschädigt werden könnte (siehe 3.2). Andererseits existieren Hinweise darauf, dass die verminderte VLCFA-Degradierung bereits sekundärer Folgeeffekt peroxisomaler Dysfunktion sein könnte, und ALDP nicht direkt an diesem Prozess beteiligt ist. So dokumentieren publizierte Daten normale β -Oxidationsraten in Geweben und Zellen von X-ALD-Patienten und ALDP-defizienten Mäusen (McGuinness et al., 2003). Außerdem ist durch Applikation bestimmter Androgene eine signifikante Steigerung der β -Oxidation gezeigt worden, ohne zur Senkung der VLCFA beizutragen (Petroni et al., 2003). Es ist also auch möglich, dass die β -Oxidation nicht prinzipiell gestört ist, sondern durch einen regulativen Mechanismus reduziert abläuft.

5 Ausblick

Um die Hypothese eines umfangreichen sekundären Peroxisomenschadens als Folge der ALDP-Fehlfunktion weiter zu verfolgen, soll die Verteilung und Anzahl der Peroxisomen aus nicht vollständig demyelinisierten Läsionen von Patientenmaterial überprüft werden.

Weiterhin sollen Aktivitätsmessungen verschiedener peroxisomaler Enzyme kultivierter ALDP-defizienter Oligodendrozyten durchgeführt werden. Um dabei den akkumulierten Schaden in primären Oligodendrozyten zu erzeugen, soll der Lipid-Metabolismus zuvor durch Zusatz exogener Lipide erhöht werden.

Speziell soll der pH von oligodendroglialen Peroxisomen von Kontrollzellen mit dem von ALDP-defizienten Zellen verglichen werden. Hintergrund dieses Experiments ist die Überlegung, dass eine pH-Änderung innerhalb eines Organells durch ein defektes Membrantransportprotein gut vorstellbar wäre. Da die Enzyme eines Organells häufig ein pH-Optimum haben, welches dem speziellen pH des Organells entspricht, könnte eine pH-Änderung zu weitgehendem Funktionsverlust dieses Organells führen. Die pH-Messung soll durch Anwendung eines an ein PTS1-gekoppelten pH-sensitiven Fluorophors geschehen.

Um besser zu verstehen, warum gerade die betroffenen Regionen als erste für die peroxisomale Dysfunktion anfällig sind, während andere Regionen anscheinend weitgehend unversehrt bleiben, soll außerdem die *In vivo* Lokalisation von Peroxisomen genauer untersucht werden. Dies soll mithilfe einer transgenen Maus geschehen, deren peroxisomale Matrix aufgrund von importiertem GFP leicht visualisiert werden kann.

Zusätzlich soll die Analyse oligodendroglialer Peroxisomenproteine Hinweise auf mögliche spezielle Funktionen oligodendrozytärer Peroxisomen geben. Dazu sollen die Peroxisomen weißer Substanz aufgereinigt und deren Proteine identifiziert werden

IV Material

1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle im folgenden nicht aufgeführten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia, Boehringer Mannheim bzw. Roche, Carl Roth, Serva, Falcon, Fluka, Eppendorf, Riedel de Haen, VWR und Sigma-Aldrich.

Acrylamid (30%)	Gerbu Trading
Agarose	BioRad, FMC, Biozym, Seakem LE agarose
Aqua Polymount	Polysciences
Aquatex	VWR
Azur II	VWR
Bleicitrat	VWR
BNF (buffered neutral formaline, 10%)	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich,
DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol)	Boehringer bzw. Roche
Diaminobenzidin (DAB)	Dianova
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
DMP30	Serva
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco
2-Duodecenylnsuccinicacidanhydrid (DDSA)	Serva
EDTA	Sigma-Aldrich
Einbettmedium (Aqua Poly Mount)	Polyscience Ltd.
Eosin Farbstoff	VWR
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich bzw. Fluka
„Evans Blau“-Farbstoff	Sigma-Aldrich
Eukitt	Kindler
FCS (fötale Kälberserum, ES-Qualität)	Gibco
Ficoll (Typ 400)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	VWR
Formamid	Fluka
Glutaraldehyd	VWR
Glycidether	Serva
Glyzerin	Sigma-Aldrich
Hämatoxin	VWR
HBSS	Gibco
HS (Pferdeblutserum)	Gibco
Isoamylalkohol	VWR
Ketamin	Parke-Davis
Luxolechtblau (1B, MBS)	Chroma
MEM (non-essential amino acids)	Gibco
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methylenblau	VWR

MNA	Serva
Na-Cacodylat	Roth
Na-Pyruvat	Gibco
Objektträger	Menzel-Gläser
Osmiumtetroxid	Roth
Paraformaldehyd	Serva
Penicillin/Streptavidin	Sigma-Aldrich
Phenol	Roth, Gibco
Phenol-Chloroform	VWR
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Polypropylenröhrchen (15,50 ml)	Falcon, Greiner
Polystyrolröhrchen (15 ml)	Falcon
2-Propanol	VWR
Propylenoxid	VWR
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Schiff 's Reagenz	VWR
Trypsin	Gibco
Uranylacetat	VWR
Zellkulturschalen	Falcon/Nunc

2 Geräte

ABI Prism 7700 Sequence Det. System	Applied Biosystems
Agilent Bioanalyser 2100	Agilent Technologies
Diamantmesser „Ultrathin Diamond Knife 45°“	Diatome
Elektronenmikroskop (EM10, EM109, EM900)	Zeiss, Leo
Fräse für Epon-Präparate	Reichert
Gelkammern für Agarosegele	IBI
Gelladestation für Agilent Bioanalyser	Agilent Technologies
Gewebe-Einbettautomat „Lynx el“	Vision BioSystems Inc.
Gewebeinfiltrationsautomat „Microm HMP 110“	Leica Microsystems
Glaswaren	Schott
Laborwaagen	Sartorius
Magnetrührer „RCT basic Ikamag“	Omnilab
Mikroskope	Leica DM
	IRBE (invers),
	Leica DM RXA,
	Axiophot (Zeiss),
	Stemi SV6 (Zeiss),
	LSM510 N20/Axiovert20
	(Zeiss)
	AEG
Mikrowelle Mikromat	Leica Microsystems
Paraffin-Ausgießstation „Microm AP 280“	Biometra
PCR-Maschinen	ABgene
PCR-Mikrotiterplatten	ABgene
PCR-Mikrotiterplattenfolien „Air Pore Sheet“	Advanced
PCR-Versiegler „Combi Thermosealer“	Biotechnologies
	Heraeus
Perestaltikpumpe SR70	

Photometer (Ultraspec 3000)	Pharmacia
Pipetten (Pipetman)	Gilson
Präparationsbesteck	Fine Science Tools
Quarzküvette	Hellma
Rotationsmikrotom „Leica RM 2155“	Leica Microsystems
Schlittenmikrotom „Microm HM 400“	Leica Microsystems
Spannungsgeräte	Pharmacia, LKB Bromma
Stangentesteinrichtung	wissenschaftliche Werkstatt des MPI (Exp. Med.)
Sterilbank	Heraeus, Baker
Szintillationsmessgerät „TopCount“	Perkin-Elmer
Thermomixer	Eppendorf
Trocknungszentrifuge „Speed Vac“	Eppendorf
Ultra-Turrax Polytron PT3000	Kinematika AG
Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik
UV-Illuminator (Stratalinker 2400)	Stratagene
Vortexer	Scientific Industries
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zentrifugen und Ultrazentrifugen	Sorvall Du Pont, Heraeus, Eppendorf, Beckmann

3 **Lösungen und Puffer**

3.1 **Molekularbiologie und Proteinbiochemie**

Puffer AE, AL/E, ATL, AW1, AW2

(Teile des DNeasy 96 Kit)
Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben.

Qiagen

Chloroform-Isoamylalkohol

24:1 (v/v) gemischt

DEPC-H₂O

H ₂ O	1000 ml
DEPC	1 ml

über Nacht bei 37°C inkubieren, dann autoklavieren bei 121°C für eine Stunde.

DNA Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
„Ficoll (Typ 400)“	15% in H ₂ O

Erststrangpuffer

(Teil des Superscript II RT-Kits) GibcoBRL, Karlsruhe
Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben.

Homogenisierungspuffer (Myelinpräparation)

Sucrose (0,85 M)	188 ml (0,32 M)
PMSF (0,1 M)	2,5 ml (0,5 mM)
Aprotinin (1,7 mg/ml)	10 µl
EDTA (0,5 M)	20 µl
Sojabohnen-Trypsininhibitor	100 µg

auf 500 ml mit H₂O auffüllen,sterilfiltrieren.

RNA-Gelpuffer (10x,1000 ml)

MOPS	41,2 g (0,2 M)
Natriumacetat (100mM)	800 ml (80 mM)
pH 7 mit 2 M NaOH einstellen	
EDTA (0,5 M,pH 8)	20 ml (10mM)

auf 1000 ml mit H₂O-DEPC auffüllen.

RNA-Gelpuffer (1x,1000 ml)

RNA-Gelpuffer (10x)	100 ml
Formaldehyd (37%)	175 ml

auf 1000 ml mit H₂O-DEPC auffüllen.

RNA-Probenpuffer (2x)

RNA-Gelpuffer (10x)	50 µl
Glyzerin	300 µl
Formaldehyd (37%)	50 µl
Formamid	50 µl
Bromphenolblau	0,25%

nach RNA-Zugabe, 5 min auf 65 °C erhitzen.

SDS-DEPC-H₂O

Sodium-Dodecyl-Sulfat 10 g
auf 1000 ml mit DEPC-H₂O auffüllen.

TAE (50x, 1000ml)

Tris-HCl Base	242 g
Essigsäure 100%	57,1 ml
EDTA (0,5 M pH 8)	100 ml

auf 1000 ml mit H₂O auffüllen.

TBS (1000 ml)

Tris-Base (1M,pH 8) 50 ml (50 mM)
 NaCl (5M) 30 ml (150 mM)
 auf 1000 ml mit H₂O auffüllen, pH 7,4 mit HCl einstellen.

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM
 EDTA (0,5 M) 1 mM
 in H₂O; für DEPC-TE DEPC-H₂O verwenden.

3.2 ZellkulturBME/HS (500 ml)

Pen/Strep 5 ml
 HS 50 ml

FCS/HS

50 ml aliquotieren und bei 56 °C für 45 min Hitze-inaktivieren.

HBSS⁺

MgSO₄ (10%) 7,5 ml (0,15%)
 Zu 500 ml HBSS hinzufügen.

Hoechst-Färbelösung

1 mg/ml in Methanol, dunkel bei -20 °C aufbewahren,
 für gebrauchsfertige Lösung 1:100 mit PBS oder TBS verdünnen.

Methylenblau-Färbelösung (100 ml)

Methylenblau 2 mg (2%)
 auf 100 ml mit H₂O auffüllen.

PBS (10x Stammlösung, 1000ml)

NaCl 100 g
 KCl 2,5 g
 Na₂HPO₄*2 H₂O 7,2 g
 KH₂PO₄ 2,5 g

auf 900 ml mit H₂O auffüllen; pH 7,2 mit 10 N NaOH einstellen; auf 1000 ml mit H₂O auffüllen; autoklavieren; zur Verwendung die Stammlösung 1:10 verdünnen (1x PBS).

Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser

Deckgläser autoklavieren, mit EtOH abwaschen, abflammen, bei 37 °C für 1 h in einer Poly-L-Lysinlösung (0,01% in H₂O) inkubieren und dreimal mit PBS waschen.

Sato-Medium (100 ml) zur Kultivierung primärer Oligodendrozyten

DMEM (high glucose, NaHCO ₃ , Glutamin, Pyruvat)	97 ml
Transferrin (5 mg/ml in DMEM)	100 µl (1 µg/ml)
Insulin (1 mg/ml in 0,01 M HCl in DMEM)	1 ml (10 µg/ml)
Putrescin (10 mM in DMEM)	1 ml (100 µM)
Progesteron (2 mM in EtOH)	10 µl (200 nM)
Tri-iodo-thyronin (500 nM in EtOH)	100 µl (500 pM)
Na-Selenit (300 µM H ₂ O)	74 µl (220 nM)
L-Thyroxin (4 mM in 0,13 M NaOH in 70% EtOH)	13 µl (520 nM)
Gentamycin (50 mg/ml, Sigma)	50 µl (25 µg/ml)

sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße) und anschließend 1% (f.c.) HS zugeben.

Trypanblau-Färbelösung (0.08% in 1x PBS)

Trypanblau 0,16 g
auf 200 ml mit 1x PBS auffüllen.

3.3 HistologieBielschowsky-Lösungen

A 1% Silbernitratlösung:
2,5 g AgNO₃
1% Pyridin
ad 250 ml mit H₂O.

B Ammoniakalische Silbernitratlösung:
I. 2,5% Silbernitratlösung: 2,75g AgNO₃ in 110 ml
II. 65 ml 96 % EtOH

1) 13 ml 2,5 % NaOH
11 ml konzentrierte NH₃-Lösung

Alle drei Lösungen (I-III) werden in der aufgeführten Reihenfolge zueinander gegeben. Lösung III unter rühren titrieren bis vorübergehender Niederschlag wieder aufklart.

C Entwicklungslösung:
0,675 ml 40 % Formol
0,03g Zitronensäure (1 %)
30 ml EtOH
ad 250 ml mit H₂O.

Citratpuffer

Stammlösung A:
0,1 M Zitronensäure

Stammlösung B:
0,1 M Natriumcitrat

Gebrauchslösung (0,01 M, pH 6):
Stammlösung A 9 ml
Stammlösung B 41 ml
aqua bidest ad 500 ml.

DAB-Lösung

100 mg DAB unter Lichtausschluß in 200 ml Trispuffer lösen, dem 200 µl 30%iges Wasserstoffperoxid zugesetzt wurden.

Fixativ für die Elektronenmikroskopie (Karnovsky 1965), 500 ml

Paraformaldehydlösung (8%)	250 ml
Glutardialdehyd (25%)	100 ml
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,33 g
Na-Cacodylat-Puffer (0,08 M)	150 ml

Fixativ für die Paraffineinbettung

Paraformaldehyd 40 g (4%)
auf 500 ml mit H₂O auffüllen; auf 60°C erhitzen und tropfenweise 1M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird; 500 ml 0,2 M Sörensenpuffer zugeben; steril filtrieren; auf pH 7,2 einstellen.

Gallyas Entwicklungslösung

Der Entwickler wurde vor Gebrauch frisch aus drei Stammlösungen (A,B,C) im Verhältnis 100:70:30 angesetzt.

A 50 g Na₂CO₃ wasserfrei
auf 1000 ml mit H₂O auffüllen

B 2g AgNO₃
2g NH₄NO₃
10 g H₄ [Si(W₃O₁₀)₄] H₂O
auf 1000 ml mit H₂O auffüllen

C 2 g AgNO₃
2 g NH₄NO₃
10 g H₄ [Si(W₃O₁₀)₄] H₂O
7 ml Formol (37%)
auf 1000 ml mit H₂O auffüllen.

Gallyas Inkubationslösung (1979)1g NH₄NO₃1g AgNO₃

auf 1000 ml mit H₂O auffüllen, zuvor mit NaOH pH 7,5 einstellen, ein brauner Niederschlag löst sich durch Schütteln (haltbar ca.8-10 Wochen).

Kunstharzmischung Epon (Luft 1961)Epon Lösung A

Glycidether 67,5 g

DDSA 88,2 g

eine Stunde mit Magnetprüher rühren

Epon Lösung B

Glycidether 82,3 g

MNA 73,3 g

eine Stunde mit Magnetprüher rühren.

Gebrauchslösung Epon

Epon Lösungen A + B im Verhältnis 1 : 1 mischen; 1,8% DMP30 zugeben.

Luxol Fast Blue-Lösung

1g Luxolechtblau

in 1000 ml vorgewärmten 96% EtOH lösen und filtrieren.

Gebrauchslösung

50µl konzentrierte Essigsäure zu 100 ml LfB-Inkubationslösung

Methylen-Azur-II-Färbelösung (Richardson et al. 1960)

Methylenblau-Lösung: 1% Methylenblau in 1% wässriger Boraxlösung

Azur-II-Lösung: 1% Azur II in H₂O

beide Lösungen in einem Verhältnis von 1 : 1 mischen.

Natrium-Cacodylat-Puffer (0,08 M) pH 7,2

Natrium-Cacodylat (8,56 g) auf 500 ml mit H₂O auffüllen; pH 7,2 einstellen; steril filtrieren.

Paraformaldehydlösung (8%)

Paraformaldehyd (40 g) auf 500 ml mit H₂O auf 60°C erhitzen, 1 M NaOH bis zum Aufklaren zusetzen, steril filtrieren, pH 7,2 mit 1 M HCl einstellen.

Sörensenpuffer

Lösung A	
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	6,9 g (0,2 M)
in 250 ml H ₂ O	
Lösung B	
Na ₂ HPO ₄	28,4 g (0,2 M)
in 1000 ml H ₂ O	
Lösung A	196 ml
Lösung B	804 ml
mischen und pH 7,4 einstellen.	

Trispuffer (Stammlösung 0,5 M pH 7,6)

TRIS	60,57 g
H ₂ O	500 ml
mit ca.390 ml 1M HCl auf pH 7,6 einstellen und auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen.	

Trispuffer (Gebrauchslösung 0,05 M pH 7,6)

NaCl 9 g
 Tris (0,5 M pH 7,6) 100 ml
 auf 1000 ml mit H₂O auffüllen

4 Antikörper, Enzyme und Reaktionskomplettsysteme**4.1 Primärantikörper**

anti-APP (monoklonal, Maus)	Chemicon
anti-CD-3 (monoklonal, Maus)	Serotec
anti-CD45R(monoklonal, Maus)	Santa Cruz
anti-CNP (monoklonal, Maus)	Sigma
anti-Cre-Rekombinase (polyklonal, Kaninchen)	BabCO
anti-FNP-7 (monoklonal, Maus)	Zymed
anti-GFAP (monoklonal, Maus)	Chemicon
anti-Katalase (polyklonal, Schaf)	The Binding Site
anti-MAC-3 (monoklonal, Maus)	Pharmingen
anti-MBP (monoklonal, Maus)	DAKO
anti-NeuN (monoklonal, Kaninchen)	Chemicon
anti-PEX5 (polyklonal, Kaninchen)	G. Dodt
anti-PLP („A431“, polyklonal, Kaninchen)	M. Jung
anti-SMI-31 (monoklonal, Maus)	Sternberger

4.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor™ 488 (Ziege anti-Kaninchen)	MoBiTec
Alexa Fluor™ 488 (Ziege anti-Maus)	MoBiTec
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Kaninchen)	Dianova
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Maus)	Dianova
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Ratte)	Dianova
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Esel anti-Schaf)	Dianova
HRP-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Kaninchen)	Dianova
HRP-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Maus)	Dianova
HRP-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Ratte)	Dianova

4.3 Enzyme

Proteinase K (Lyophilisat; auf 10 U/µl einstellen)	Boehringer
RNase-Inhibitor „Rnasin“	Promega
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	Boehringer
Red Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich

4.4 Reaktionskomplettsysteme

DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	Promega
„DNeasy 96“ Kit	Qiagen
PCR-Komplettansatz	Promega
„RNA 6000 Nano“ Assay	Agilent Technologies
„Superscript II RT“-Kit	GibcoBRL
„TaqMan“ PCR-Mastermix	Eurogentec
„TRIzol“ Reagent	GibcoBRL
LSAB2-Kit	DAKO
Mycoplasma-Detection-Kit	Stratagene
QIAamp Tissue Kit	Qiagen

5 Nukleinsäuren und Nukleotide

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer
DNA-Größenmarker „Lambda/HindIII“	Promega
DNA-Größenmarker „PhiX174/HaeIII“	Promega
zufällige Nonamerprimer	F. Benseler, MPI (Exp. Med.)

5.1 Radiochemikalien

[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia
---	--------------------

5.2 Oligonukleotide

Primeroligonukleotide wurden mit Hilfe der Programme DNASTar SeqMan und Primer Express 1.65 entworfen und von F. Benseler (Abt. 5000 des MPI für exp. Medizin,

Göttingen) hergestellt. Mit Farbstoffen markierte Sonden wurden von Eurogentec (Brüssel, Belgien) synthetisiert. Als Farbstoffe wurden FAM, TET und TAMRA verwendet.

Oligonukleotide zur Genotypisierung des PEX5-Lokus:

PEX5E₁₄sense: 5'-CGGGGAGTACGACAAGGCTGTGGACT-3'

PEX5I₁₄antisense: 5'-TCTGGTCCCATTGGCCAGGGTGGC-3'

Oligonukleotide zur Genotypisierung des CNP-Lokus:

CNPE₃sense: 5'-GCCTTCAAAGTGTCCATCTC-3'

CNP5'-EcoIN2: 5'-GATGGGGCTTACTCTTGC-3'

puro3 5'-CATAGCCTGAAGAACGAGA-3'

Oligonukleotide zur Überprüfung Cre-vermittelter Rekombination:

PEX5I₁₀sense: 5'-TTTGAGGATGGGAAGCAGTGCT-3'

PEX5I₁₄antisense: 5'-TCTGGTCCCATTGGCCAGGGTGGC-3'

Primer für die qRT-PCR-Analysen:

CCR2 5'-ACC TCA GTT CAT CCA CGG CAT AC-3'

3'-CAG CCC TGT GCC TCT TCT TCT CA-5'

IL -10 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA - 3'

3'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT -5'

TNF- α : 5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A -3'

3'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC -5'

MIP-1 α : 5'-CAC CAC TGC CCT TGC TGT T -3'

3'-AGG AGA AGC AGC AGG CAG TC- 5'

MCP-1 5'-TCT GGG CCT GCT GTT CAC C -3'

3'-TTG GGA TCA TCT TGC TGG TG -5'

β -Actin sense: 5'-CTCTGAACCCTAAGGCCAACC-3'

β -Actin antisense: 5'-GGCATAACAGGGACAACACAGC-3'

6 Versuchstiere

Die "gefloxt" PEX5-Mauslinie hatte einen gemischten genetischen Hintergrund vom Auszuchtstamm SW:fBR und vom Inzuchtstamm C57bl6/J. Die CNP-Cre-Mauslinie hatte einen gemischten genetischen Hintergrund der Mausstämmen SV129/J und C57bl6/J.

7 *Computersoftware*

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und -vergleiche, Literatursuche) wurden mit Hilfe des Internetservice "National Center for Biotechnology Information" (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Sequenzanalysen mit dem Programm DNA Strider 1.2 durchgeführt. Grafiken wurden mit den Programmen Canvas TM3.5.5, Canvas TM6.0, Adobe Illustrator • 9.0, Adobe • InDesign TM1.5 und Adobe • Photoshop • 5.5 erstellt. Lehrbuchabbildungen mit einem AGFA-Scanner (Duoscan T 1200) digitalisiert und mit Adobe • Photoshop 5.5 weiterverarbeitet. Digitalisierte Bilder wurden mit Hilfe von Openlab 2.2.3 (Improvision) erstellt und statistische Daten mit dem Programm Excel 3.0 verarbeitet. Die Arbeit wurde auf einem Apple Macintosh Powerbook G3 mit Microsoft Word98 geschrieben.

V Methoden

1 Molekularbiologische Methoden

1.1 Präparation genomischer DNS aus Gewebe

Genomische DNS (bis 50 µg) wurde aus Schwanzbiopsien (ca. 0,5 cm) oder aus Teilen von Mausgehirnen mit dem "QIAamp Tissue Kit" (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gewonnen (QIAamp Tissue Kit Handbuch) und bei 4 °C gelagert. Für die PCR-Analyse wurden 1,5 µl des Gesamteluats eingesetzt.

1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS und RNS

Durch Extraktion mit je 1 Volumen Phenol/Chloroform (Phe/Chl 1:1) und 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurden Verunreinigungen von DNS- bzw. RNS-Lösungen abgetrennt. Nach Fällung der DNS mit 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 5,2) und 2 Volumen EtOH (15 min -20 °C) wurde für 15 min bei 15.000 upm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 15), in 80% EtOH gewaschen, getrocknet und das Sediment in TE aufgenommen.

1.3 Präparation von Gesamt-RNS aus Gehirnen

Nach Tötung durch zervikale Dislokation, wurden die Gehirne der Mäuse präpariert und mithilfe eines Ultraturrax (IKA Labortechnik) zerkleinert. Die Präparationsmethode von Gesamt-RNS beruht auf der Einschritt-RNS-Isolation von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) und erfolgte durch Zugabe von „TRIZOL •Reagent“ (GIBCOBRL) nach Angaben des Herstellers. Die RNS-Sedimente wurden bei -70 °C gelagert. Zur Vermessung und Analyse der RNS wurden die Sedimente in DEPC-TE 10 min bei 60 °C gelöst.

1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNS- und RNS-Lösungen wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Dazu wurden die Lösungen zuvor verdünnt (1:100) und deren Extinktion bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette vermessen. Die Extinktion bei 260 nm gibt Auskunft über die Konzentration, wobei gilt:

OD ₂₆₀ =1 entspricht:	50 µg/ml bei dsDNS-Lösungen
	40 µg/ml bei ssDNS-Lösungen
	40 µg/ml bei RNS-Lösungen

Die Extinktion bei 280 nm gibt Auskunft über den Grad der Verunreinigung der Lösung, wobei ein Wert von OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,5 und 2 eine geringe Verunreinigung (im Toleranzbereich) anzeigt.

Die Molarität der Oligonukleotidlösungen wurde über die Extinktionskoeffizienten E [M⁻¹ cm⁻¹] der Nukleotide nach der Formel $M = OD_{260} / E_{gesamt}$ ermittelt (wobei: $E_{gesamt} = \sum \text{Extinktionskoeffizienten}$).

Guanin:E =12010

Adenin:E =15200

Thymin:E =8400

Cytosin:E =7050

1.5 DNS-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht es, DNS-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen. Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten der Größe 0,5 bis 15 kb wurden 0,7 bis 2% Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Zusatz von Ethidiumbromid (f.c. 1 µg/ml) in einen Gelschlitten gegossen. Das Einsetzen der Gelkämme führte zur Bildung der Probentaschen. Das Gel wurde im Gelschlitten in eine mit Laufpuffer (1x TAE) gefüllte Flachgelkammer gelegt und mit den Proben beladen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 120 V (5-10 V/cm). Wegen der interkalierenden Eigenschaft von Ethidiumbromid in DNS war diese nach der Elektrophorese auf einem UV-Illuminator sichtbar. Als Größenmarker diente Hind III verdaute λ Bakteriophagen-DNS (0,5-23 kb) und mit Hae III verdaute φ X174 Phagen-DNS (70-1350 bp).

1.6 Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNS

Die Auftrennung von RNS-Fragmenten erfolgte in formaldehydhaltigen 1% Agarosegelen. Dazu wurde 1 g Agarose in 82,5 ml 1x RB aufgekocht und nach Abkühlung 17,5 ml 37% (12,3 M) Formaldehyd zugegeben (f.c. 2,2 M). Die RNS-Proben (5-10 µg) wurden mit einem Volumen RNS-Ladepuffer (2-fach) versetzt, bei 65 °C für 5 min denaturiert und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 2-3 h in 1x RB (+ Formaldehyd, f.c. 2,2 M).

1.7 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine PCR ermöglicht, kleinste DNS-Mengen in vitro zu amplifizieren (Mullis et al., 1986). Das Prinzip dieser Reaktion basiert auf der hitzestabilen DNS-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Ausgehend von sequenzspezifisch bindenden Oligonukleotiden (Primern) synthetisiert sie einen DNS-Strang komplementär zum denaturierten Matrizenstrang. Durch zyklisch aufeinanderfolgende Reaktionsschritte von DNS-Denaturierung bei 95°C, Anlagerung der Primer bei ca. 56 bis 62°C und Synthese der neuen DNS bei 72°C (Elongation) lassen sich spezifische DNS-Bereiche exponentiell vervielfachen. Dazu wurde ein Reaktionskit von Sigma verwendet. Standardansätze wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt.

Standardreaktion:

Matrizen-DNS	1,5 μ l	Durch Zugabe von DMSO, Tween 20 oder „Substanz Q“ (Qiagen), sowie durch Veränderung der $MgCl_2$ -Konzentration wurden jeweilige Reaktionen optimiert.
10x PCR-Puffer	2 μ l	
Nukleotidmix (4x 2,5 mM)	2 μ l	
5'-Primer (5x 10^6 M)	0,5 μ l	
3'-Primer (5x 10^6 M)	0,5 μ l	
red Taq-Polymerase	1 μ l	
H ₂ O ad	20 μ l	

Standard-Amplifikationsprotokoll (mit 36 Zyklen):

3 min	95 °C		Denaturierung	
30 sek	56 °C	Zyklus	Anlagerung	Anlagerungs- und Extensionstemperaturen, sowie die Dauer der einzelnen Zyklusphasen wurden gegebenenfalls für die jeweiligen Primer optimiert.
90 sek	72 °C		Elongation	
60 sek	95 °C		Denaturierung	
60 sek	55 °C		Schlussanlagerung	
10 min	72 °C		Schlussexension	

1.8 cDNS-Synthese durch reverse Transkription von RNS

Die Quantifizierung einzelner Gentranskripte einer RNS ist nach reverser Transkription in cDNS möglich. Die Inkorporation radioaktiver Nukleotide während der reversen Transkription erlaubt die Quantifizierung der Gesamtmenge der cDNS. cDNS wurde mit dem Superscript-II-Kit (GIBCOBRL) synthetisiert. Zu 2 μ g isolierter RNS in einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 40 U RNSase-Inhibitor RNSsin und 100 pmol zufällige Nonamerprimer (random Nonamers) gegeben. Nach Auffüllen der Probe auf ein Volumen von 26 μ l mit DEPC-H₂O wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und die Probe danach 2 min auf Eis gestellt. Dann erfolgte die Zugabe von 8 μ l 5x Erststrangpuffer, 10 μ l dNTP-mix (2,5 mM) und 4 μ l 0,1 M DTT und eine fünfminütige Inkubation bei 42°C. Nach Zugabe von 1 μ l (1 U) des Enzyms „Superscript II RT“ reverser Transkriptase und 0,3 μ l P32-dCTPs wurde der Ansatz gemischt.

Die Synthese-Reaktion erfolgte innerhalb von drei Inkubationsschritten (10 min 25 °C, 50 min 42 °C, 15 min 70 °C). Nach 5 min Abkühlung der Probe (auf Eis), wurde das Volumen per Zugabe von 250 μ l DEPC-H₂O, 150 μ l 7,5 M Ammoniumacetat und 1.050 μ l 100 % Ethanol auf ein Gesamtvolumen von 1500 μ l gebracht. Davon wurden 5 μ l für die erste Messung im Szintillationsmessgerät entnommen (s.u.). Nach Fällung der gewonnenen cDNS durch 30 min Lagerung bei -20°C folgte eine

Zentrifugation für 10 min und 13.000 upm bei 4°C. Das entstandene Präzipitat wurde zweimal mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen und anschließend 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurde das Präzipitat in 100 µl TE Puffer gelöst, wovon 10 µl für die zweite Messung im Szintillationsmessgerät abgenommen wurden (s.u.).

Da die Masse der eingesetzten Nukleotide und der Anteil der davon inkorporierten Nukleotide bekannt war, ließ sich daraus die Masse der synthetisierten cDNS berechnen. Zur Expressionsmessung wurden konstante Mengen in der quantitativen PCR eingesetzt. Zur Bestimmung der Konzentration der cDNS wurde die Aktivität für beide entnommenen Proben in einem Szintillationsmessgerät als so genannte „Cerenkov-Counts“ gemessen. Die Messung der ersten Probe diente als Maß für die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität und die zweite Messung als Maß für die in der cDNS gebundene Radioaktivität. Das Verhältnis von „Counts nach der Reaktion“ zu „Counts vor der Reaktion“ entspricht dem Anteil inkorporierter Nukleotide zur Gesamtmenge der Nukleotide.

1.9 Quantitative TaqMan RealTime-PCR (qRT-PCR)

Bei der konventionellen PCR erfolgt der Nachweis der amplifizierten Zielsequenz durch Gelelektrophorese des PCR Produktes. Die TaqMan PCR erlaubt darüber hinaus die Quantifizierung der DNS Transkripte. In diesem System macht man sich die Spaltung fluorogener Sonden (TaqMan-Sonden) durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze. Die qRT-PCR wurde in einer Kooperation mit A. Mildner (AG Prinz, Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen) durchgeführt.

TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (FAM oder TET; Fluoreszin-Derivate) und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (TAMRA; Rhodamin-Derivat) markiert. Der Quencherfarbstoff verhindert durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) bei räumlicher Nähe die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs, so dass eine intakte TaqMan-Sonde nicht fluoresziert. Erst nach Synthese eines spezifischen PCR-Produkts spaltet die Taq-Polymerase die DNS-gebundene Sonde, wodurch es zur räumlichen Trennung beider Farbstoffe und folglich zu einem Fluoreszenzsignal kommt. Die kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität während der PCR erlaubt die Bestimmung der PCR-Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die zehnfache Standardabweichung der Grundaktivität überschreitet. Diese Zyklenzahl wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) definiert und ist umso kleiner, je größer die eingesetzte Menge an DNS-Zielsequenz war. Neben dem zu quantifizierenden Gen wird ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“ amplifiziert, dessen Expression in allen untersuchten Proben als konstant vorausgesetzt werden kann und das als Maß für die Menge eingesetzter DNS dient. Aus der Differenz zwischen Ct-Wert der Zielsequenz und Ct-Wert des Housekeeping-Gens wird der so genannte Δ Ct-Wert berechnet.

$$\Delta\text{Ct-WertZiel} / \text{Kalibrator} = \text{CtZielsequenz} - \text{CtHousekeeping}$$

Eine der in der PCR amplifizierten Proben dient als relative Referenz (Kalibrator). Deren Expression wird als „1“ definiert. Nach der Formel:

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

errechnet sich der $\Delta\Delta Ct$ -Wert. Dieser gibt die Ct-Wertdifferenz relativ zu einer gewählten Probe an, also den Unterschied zwischen ΔCt der gesuchten Probe (ΔCt_{Ziel}) und dem ΔCt einer als relative Referenz gewählten Probe ($\Delta Ct_{\text{Kalibrator}}$). Aus diesem $\Delta\Delta Ct$ -Wert kann die Expression des Zielgens berechnet werden nach der Formel:

$$\text{mRNS Konzentration} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die berechnete Konzentration wurde damit auf ein „Housekeeping-Gen“ normalisiert und als ein Vielfaches der Expression der Kontrolltier-Probe ausgedrückt.

TaqMan PCR Reaktion:

Mastermix (Eurogentec)	5 μl
Forwardprimer (f.c. 900 nM)	1 μl
Reverseprimer (f.c. 900 nM)	1 μl
TaqMan Probe (f.c. 250 nM)	0,5 μl
H ₂ O	0,5 μl
Proben cDNS	2 μl

Die Primer und TaqMan Sonde waren spezifisch für das zu untersuchende Gentranskript (s.o.). Für jede cDNS-Probe wurde eine Mischung der dreifachen Menge angesetzt und auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Der Mittelwert der drei unabhängig gemessenen $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurde für weitere Berechnungen verwendet, um falsche Werte durch Schwankungen innerhalb einer PCR zu minimieren. Alle quantitativen PCRs wurden zweimal durchgeführt und der Mittelwert der Expression beider Ergebnisse für die weitere Interpretation verwendet. Für alle TaqMan PCR-Reaktionen wurden Zyklusbedingungen (s.u.) gewählt, bei der Anlagerung und Elongation in einem kombinierten Schritt ablaufen. Die Reaktion wurde im „ABI PRISM 7700 Sequence Detector“ durchgeführt.

TaqMan PCR-Amplifikationsprotokoll (mit 40 Zyklen):

2 min	50 °C	Zyklus	Präinkubation
10 min	95 °C		Aktivierung („HotStart AmpliTaq Gold Taq Polymerase“)
15 sek	95 °C		Denaturierung
60 sek	60 °C		Anlagerung / Elongation

2 Proteinbiochemische Methoden

2.1 Myelinpräparation aus Gehirnen

Myelinpräparationen aus Gehirngewebe erfolgte nach einem abgewandelten Standardprotokoll von Norton und Poduslo (1973). Die Gehirne getöteter Mäuse unterschiedlichen Genotyps und Alters wurden präpariert und in 0,32 M Sucrose überführt (10 ml/500 mg Gewebe). Das Gewebe wurde mithilfe eines Ultraturrax (T8 IKA Labortechnik) homogenisiert und anschließend auf ein gleiches Volumen 0,85 M Sucrose geschichtet. Dann folgte eine dreißigminütige Zentrifugation bei 75000 x g und 4 °C (21000 upm, Ti 41, Beckmann). Hierbei bildete sich eine mit Myelin angereicherte Interphase, die mit einer Pasteurpipette aufgenommen wurde. Durch Resuspension in großem Volumen H₂O wurde die myelinreiche Fraktion einem osmotischen Schock ausgesetzt und anschließend für 15 min bei 75000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach wiederholtem osmotischem Schock und Zentrifugation wurde das Myelin erneut in einem Sucrosegradienten zentrifugiert (30 min, 75000 x g, 4 °C), um axonale Kontaminationen zu verringern. Zur Eliminierung der Sucrose aus der angereicherten Myelinfraktion wurde die Interphase erneut aufgenommen, in H₂O resuspendiert und zentrifugiert (15 min, bei 75000 x g und 4 °C). Resuspension und Zentrifugation wurden wiederholt und das sedimentierte Myelin in möglichst kleinem Volumen sterilem PBS (250 µl/0,4 g Gehirn) aufgenommen, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach Bradford (1976). Hierzu wurde das BioRad Protein Assay-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Erstellung der Standardkurve wurden mit BSA Proteinlösungen bekannter Konzentrationen hergestellt. Anschließend erfolgte die Messung der Standardansätze und Proben im Spektralphotometer.

3 Zellkulturmethoden

3.1 Präparation und Kultur primärer Oligodendrozyten

Neugeborene Mäuse wurden dekapitiert, die Gehirne präpariert und in HBSS⁺ gelegt. Die Meningen wurden vollständig entfernt und die Gehirne in ein 15 ml Gefäß überführt. Nach Entfernung des HBSS⁺ wurde das Gewebe mit Hilfe von 1x Trypsin/EDTA (f.c. 0,5% / 0,1%) in BME (2-3 ml/10 Gehirne) trypsinisiert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS⁺ wurde das Gewebe in DNSase-haltiger Lösung (0,05% in HBSS; 2 ml/10 Gehirne) durch mehrfaches Aufnehmen in eine ausgezogene Pasteurpipette dissoziiert. Dieser Vorgang wurde fortgeführt bis eine Einzelzellsuspension erreicht war. Die Suspension wurde 5-10 min bei 800 upm (Heraeus Biofuge 400e) zentrifugiert, das entstandene Sediment zweimal in HBSS⁺ resuspendiert und anschließend wieder zentrifugiert. Das Sediment wurde in BME mit Pferdeblutserum (BME/HS) aufgenommen und in Zellkulturflaschen (Nunc), die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet worden waren, ausplattiert (3-4x10⁷ Zellen/80 cm

2 Flasche). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂. Nach zwei Tagen wurden tote Zellen, Zellüberreste und nicht vereinzelte Zellen durch Waschen mit vorgewärmten HBSS entfernt. Darauf folgte die weitere Kultivierung in BME/HS. Das Medium wurde alle 2-4 Tage gewechselt. Nach 7-8 Tagen hatte sich ein konfluenter Astrozytenrasen gebildet, auf dem Mikroglia und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen verschiedener Stadien wuchsen. Die Neuronen starben größtenteils bei der Präparation. Mikrogliazellen wurden zunächst durch Abschütteln mit HBSS entfernt. Anschließend wurden Oligodendrozyten-Vorläufer mit 5 ml BME/HS abgeschüttelt, durch Zentrifugation (10 min; 800 upm, Heraeus Biofuge 400e) sedimentiert, in 1% HS enthaltendem Sato-Medium resuspendiert und auf Poly-L-Lysin beschichteten 11 mm Deckgläschen ausplattiert ($3,5 \times 10^4$ Zellen/Deckglas).

3.2 Immunzytochemie

Die Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläser mit primären Oligodendrozyten (siehe 3.1) wurden den Kulturschalen entnommen, mit TBS gewaschen und bei Raumtemperatur (RT) für 10 min in 4% PFA-haltiger PB Puffer-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und mit 0,1% TritonX-100 in 10% HS-haltigem TBS permeabilisiert. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit TBS und dreißigminütiges Blockieren mit 10% HS in TBS (HS/TBS). Die verschiedenen Erstantikörper wurden in HS/TBS verdünnt (jeweilige Verdünnung siehe Tabelle unter 6.10). Für die Bindung des ersten Antikörpers erfolgte eine Inkubation von entweder 1 bis 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen folgten drei Waschschrte mit TBS je 10 min. Danach erfolgte für die Bindung des Zweitantikörper (jeweilige Verdünnung siehe Tabelle unter 6.10) eine einstündige Inkubation bei RT und zweimaliges Waschen für 10 min mit TBS. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde eine Hoechstfärbung (3 min) durchgeführt, auf die erneut drei Waschschrte folgten. Die Deckgläser mit den Zellen wurden in "Aqua-Poly/Mount" (Polysciences) eingebettet.

4 *Quantitative Phospholipidanalyse des Myelins mittels nano-Electrospray-Ionisierung Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)*

Um die Zusammensetzung der Phospholipide des Myelins quantitativ zu analysieren erfolgte zunächst eine Myelinaufreinigung (wie unter 2.1 beschrieben). Dann wurde die Lipidextraktion in Gegenwart von Phospholipidstandardlösungen durchgeführt. Die in Chloroform gelösten synthetischen Phospholipide wurden der Bligh und Dyer Lösung vor Zugabe der wässrigen Probe zugesetzt (Bligh and Dyer, 1959). Die Lipidextraktion und anschließende quantitative Phospholipidanalytik wurde von Dr. B. Brügger (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg) nach Brügger (Brugger et al., 2000) durchgeführt.

5 Magnetische Resonanztomographie (MRT) an Mäusen

Mithilfe der hochauflösenden 3D-MRT von Mausgehirnen können kleine cerebrale Strukturen *in vivo* dargestellt werden (Natt et al., 2002). Für die Messungen wurden die Tiere intubiert, anästhesiert (1,0 %-1,5 % Halothan in 70:30 N₂O:O₂) und der Kopf durch ein stereotaktisches Hilfsmittel fixiert. Die erreichte isotropische Auflösung betrug 117 µm³. Alle MR-Messungen wurden von Dr. T. Michaelis und Dr. O. Natt der Biomedizinischen NMR des Max-Planck-Instituts für Biochemische Chemie in Göttingen durchgeführt.

6 Histologische Methoden für die Lichtmikroskopie

6.1 Fixierung des Mausekörpers durch Perfusion

Nach tiefer Anästhesie durch intraperitoneale Injektion von Ketamin/Xylazin, wurden die Mäuse median thorakotomiert, ihr Herz freipräpariert und eine 23G „Venofix“-Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt. Die Vena cava inferior distal zum rechten Vorhof wurde inzidiert. Der Kreislauf des Tieres wurde über die Kanüle mithilfe einer Peristaltikpumpe (Heraeus SR70, Flussrate 0,2 bis 0,5 ml/min) mit 50 ml HBSS perfundiert, gefolgt von 50 ml Fixativ für Epon- oder Paraffineinbettung. Für Paraffineinbettungen diente 4% Paraformaldehyd in Sörensenpuffer als Fixativ, für die elektronenmikroskopische Analyse, für die die Gewebe in Epon eingebettet werden sollten, wurde 4% PFA und 5% Glutaraldehyd in PBS oder ein modifiziertes Karnovsky-Fixativ (Perfixol) verwendet (Karnovsky, 1965). Auf diese Weise wurde der gesamte Körper des Versuchstiers fixiert. Darauf folgte eine Immersionsfixierung durch Lagerung im jeweiligen Fixativ für weitere 4 bis 6 Stunden, woraufhin die zu untersuchenden Gewebe entnommen und eingebettet wurden.

6.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Präparierte, mit 4% Paraformaldehyd fixierte und mindestens 4 h nachfixierte Gehirne (siehe 6.1) wurden mithilfe eines Gewebe-Infiltrationsautomaten (MICROM HMP 110) paraffiniert und an einer Paraffin-Ausgießstation (MICROM AP 280) in Paraffin eingebettet. 5 µm dünne Paraffinschnitte wurden an einem Schlittenmikrotom (Microm HM400) angefertigt.

Für viele histochemische und für die immunhistochemischen Anwendungen wurden die so hergestellten Paraffinschnitte zunächst über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Xylol, einmal 10 min in Xylol/Isopropanol (1:1) und dann je 5 min in einer 100% EtOH-, einer 90% EtOH-, einer 80% EtOH-, einer 70% EtOH- und dann in einer 50% EtOH-Lösung inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte bis zur weiteren Behandlung in H₂O gelagert.

Nach der jeweiligen histochemischen Anwendung wurden die Schnitte wieder durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Beginnend mit einem Waschschriff in H₂O, und darauffolgenden je 5 minütigen Inkubationen in einer 50% EtOH-, einer 70% EtOH-, einer 80% EtOH-, einer 90% EtOH-, einer 100% EtOH-Lösung folgten je zehnmünütige Inkubationen in Xylol/Isopropanol (1:1) und zwei Xyloylbäder. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

6.3 Hämatoxilin/Eosin-Färbung an Paraffinschnitten

Azidophiles Hämatoxilin färbt das Chromatin der Zellkerne eines Gewebes blau, während Eosin das basische Zytoplasma rot färbt. Für die Färbung wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung (s.u. 1.2) erneut in H₂O gespült und anschließend für 10 min in saurem Hämalaun gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in H₂O und HCl/EtOH. Die Schnitte wurden 10 min in Leitungswasser gebläut, dann 5 min im alkalischen Eosin gefärbt und anschließend in H₂O gespült. Daraufhin folgte die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte (siehe 1.2).

6.4 Nissl-Färbung

Für die Nissl-Färbung (violette Kernfärbung) wurden Paraffinschnitte nach der Entparaffinierung (siehe 1.2) wie folgt behandelt: 1x 1min Thioninlösung, 1x 2 min H₂O. Dann folgte die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte (siehe 1.2).

6.5 Darstellung von Myelin durch „Luxol Fast Blue“

Die „Luxol Fast Blue“- (LfB) Färbung erfolgt aufgrund der Lipoproteine des Myelins. Der Mechanismus basiert auf einer Säure-Base-Reaktion unter Bildung eines Salzes; die Base des Lipoproteins ersetzt dabei die Base des Farbstoffs. Die LfB-Färbelösung wurde für jede Färbung frisch angesetzt. Nach der Inkubation in 100% EtOH der Entparaffinierung (siehe 1.2) wurden die Schnitte über Nacht bei 56°C in 0,1% LfB-Lösung inkubiert. Nach Abkühlung wurden die Schnitte kurz in 96% frisches EtOH getaucht und sofort ebenso kurz in H₂O, dann 5 min in 0,1% Lithiumcarbonat inkubiert, kurz in 70% EtOH getaucht und anschließend wieder sofort in H₂O gespült. Dann erfolgte die Gegenfärbung durch 10 minütige Inkubation mit Kernechtrot und kurzem Spülen in H₂O. Danach folgte die aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung und das Eindecken (siehe 1.2).

6.6 Versilberung von Neuronen und Axonen nach Bielschowsky

Bei der Silberimprägnierung nach Bielschowsky werden durch Zugabe von NaOH zu Silbernitrat Silberionenkomplexe gebildet. Dabei werden Axone und neuronale Zellkörper braun bis schwarz gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert (siehe 1.2) und 10 min in H₂O gewässert. Danach wurden sie in einer 1% Silbernitratlösung (Lösung A) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann 10 Sekunden in eine frische ammoniakalische Silbernitratlösung (Lösung B) getaucht, bis zu 5 Sekunden in Entwicklerlösung (Lösung C) inkubiert und 5 min in H₂O gewaschen. Die Präparate wurden in 2% Natriumthiosulfatlösung für 5 Minuten fixiert, in Leitungswasser 5 Minuten gespült, dehydriert und eingedeckt.

6.7 Versilberung von Myelin nach Gallyas (1979)

Mit der Versilberungsmethode nach Gallyas werden Myelin und Erythrocyten imprägniert, wodurch sie schwarz oder dunkelbraun erscheinen. Axone dagegen werden nicht versilbert. 5 µm dicke horizontale Paraffinschnitte wurden angefertigt und entparaffiniert (siehe 1.2). Danach wurden die Schnitte in H₂O gespült, 30 min acetyliert (Pyridin/Essigsäureanhydrid 2:1), 2-3x je 4 min in dH₂O gewaschen, 45-50 min bei 30 °C in Inkubationslösung inkubiert und dann 3x je 5 min in 0,5%

Essigsäure gewaschen. Dann folgten 3-15 min bei 30 °C in frisch hergestellter Entwicklungslösung bis eine graubraune Farbe erkennbar war. Die Färbung wurde dabei makroskopisch kontrolliert. Um die Entwicklung zu beenden, wurden die Schnitte 3x 5 min in 1% Essigsäure gewaschen. Danach wurden sie erneut in dH₂O gewaschen und über Nacht in einem Wärmeschrank getrocknet. Zuletzt wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (siehe 1.2) und in Kanadabalsam eingedeckt.

6.8 Darstellung apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung

Mit der TUNEL- (Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling) Färbemethode werden die Enden fragmentierter DNS apoptotischer Zellen markiert. Schnitte wurden nach der Entparaffinierung (siehe 1.2) zur Markierung apoptotischer Zellen mit dem „DeadEnd(Colorimetric TUNEL System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Schnitte wurden nicht dehydriert sondern anschließend wässrig in Aquatex eingedeckt.

6.9 Dako-LSAB2 System an Paraffinschnitten

Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte von Mausgehirnen verschiedenen Genotyps und Alters angefertigt, auf beschichtete Objektträger (Histobond) aufgezogen und über Nacht getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe. Die Schnitte wurden dann 5 min in Citratpuffer inkubiert, anschließend in kochenden Citratpuffer (Mikrowelle) gegeben, darin 20 min gekocht und bei RT ca.20 min abgekühlt. Dann wurden die Schnitte 5 min in Trispuffer mit 2% Milchpulver gespült und mit einem Fettstift (Pap-Pen) umrandet. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 5 min in 3% H₂O₂ inkubiert. Das anschließende Spülen erfolgte in Trispuffer mit 2% Milchpulver. Um die unspezifische Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten, wurden die Schnitte bei RT in inaktiviertem Ziegenserum (200 µl+800 µl PBS/BSA) inkubiert, das nach 10 min dekantiert wurde. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in PBS/BSA (Verdünnung siehe Tabelle unter 6.10), erfolgte entweder eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach Spülung mit Trispuffer (+2% Milchpulver) wurde der Brückenantikörper 10 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben, mit Trispuffer (+2% Milchpulver) abgewaschen und anschließend der „Horseradish-Peroxidase- Streptavidin-Komplex “aufgetragen. Diese Inkubation dauerte ebenfalls 10 min. Nachdem die Schnitte wiederum in Trispuffer ohne Milchpulver gespült wurden, folgte die enzymhistochemische Reaktion. Dazu wurde eine DAB-Gebrauchslösung hergestellt. Die Inkubationszeit der Schnitte in dieser Lösung betrug 7 min. Im Anschluß wurden die Schnitte zweimal in H₂O gespült (je 5 min), mit Hämalaun 30 sek gefärbt und nochmals in H₂O gespült. Das Bläuen erfolgte alternativ in Trispuffer oder Leitungswasser (10 min, 3x wechseln). Dann folgte die Dehydrierung (siehe 1.2) und das Eindecken in Eukitt.

6.10 Doppelimmunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Die Schnitte wurden zunächst entwässert (siehe 1.2), dann mit Ausnahme einer verlängerten Blockpufferinkubation (20 min) bis zur Inkubation mit dem ersten Antikörper wie unter 1.9 beschrieben vorgegangen. Anschließend wurde der Primärantikörper in seiner jeweiligen Gebrauchsverdünnung (siehe Tabelle unten) in

PBS/BSA aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4° C über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten von denen nur der letzte in Trispuffer ohne Milchpulver durchgeführt wurde, wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (siehe Tabelle unten) appliziert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur, die unter Vermeidung von Lichteinwirkung stattfand. Es folgten drei Waschschrritte in Trispuffer bevor die Schnitte zur Darstellung der Kerne in DAPI-Lösung (0,5 µg/µl) inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen mit Trispuffer wurden die Schnitte mit Immo-Mount (Shandon) eingedeckt.

<i>Primärantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
Maus, anti-APP	1:750
Maus, anti-CD-3	1:150
Maus, anti-CD-45R	1:100
Maus, anti-CNP	1:300
Kaninchen, anti-Cre-Rekombinase	1:3000
Maus, anti-FNP-7	1:200
Maus, anti-GFAP	1:500
Schaf, anti-Katalase	1:1000
Ratte, anti-MAC-3	1:100
Maus, anti-MBP	1:300
Maus, anti-NeuN	1:100
Kaninchen, anti-PEX5	1:1000
Kaninchen, anti-PLP	1:200
Maus, anti-SMI-31	1:1000
<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
Alexa Fluor™ 488 (Ziege anti-Kaninchen)	1:400
Alexa Fluor™ 488 (Ziege anti-Maus)	1:1500
Cy™2-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Kaninchen)	1:200
Cy™2-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Maus)	1:200
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Esel anti-Schaf)	1:750
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Kaninchen)	1:1500
Cy™3-gekoppelter Antikörper (Ziege anti-Maus)	1:1500

7 Elektronenmikroskopie

7.1 Einbettung in Epon

Die fixierten Gehirne wurden zur Herstellung von Semidünnschnitten in das Kunstharz Epon eingebettet nach der Methode von Luft (1961). Dazu wurden sie aus den perfundierten Mäusen reseziert. Ca. 1mm³ Bereiche des Corpus Callosum, Kleinhirns und des Cortex wurden jeweils aus vergleichbarer Region entnommen. Diese wurden in gleicher Ausrichtung in vorgefertigte Körbchen des Einbettautomaten „Lynx el“ gelegt und dann mit Epon infiltriert. Dabei wurden die Körbchen bei 4°C nach folgendem Schema in den entsprechenden Lösungen geschwenkt.

Lösung	Dauer
Na-Cacodylatpuffer	2 x 30 Minuten
1% OsO ₄ / Osmiumtetroxid	2 Stunden
Na-Cacodylatpuffer	2 x 15 Minuten
30% Ethanol	15 Minuten
50% Ethanol	15 Minuten
70% Ethanol	15 Minuten
80% Ethanol	15 Minuten
90% Ethanol	15 Minuten
100% Ethanol	2 x 15 Minuten
Isopropanol	15 Minuten
Propylenoxid	2 x 15 Minuten
Propylenoxid : Epon 2 : 1 Mischung	2 Stunden
Propylenoxid : Epon 1 : 1 Mischung	2 Stunden
Propylenoxid : Epon 1 : 2 Mischung	4 Stunden
Epon	4 Stunden

Nach der Infiltration wurden die Nerven in Epon eingebettet. Dazu wurden sie in Ausgießformen mit reinem Epon gegeben welches durch Erhitzen auf 60°C für 24 Stunden polymerisierte, so dass feste Epon-Kunstharzblöcke entstanden. Die Eponblöcke wurden mit einer Fräse an der Spitze zu Pyramidenform zugetrimmt. Von diesen Eponblöcken wurden mithilfe eines Ultramikrotoms zuerst Semidünnschnitte (0,1 µm) angefertigt. Diese Semidünnschnitte wurden auf Objektträger transferiert und eine Stunde lang getrocknet.

7.2 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Um zunächst lichtmikroskopisch die Qualität der in Epon eingebetteten Blöcke zu überprüfen wurden Semidünnschnitte mit der Methylen-Azur-II-Färbung nach Richardson (Richardson et al. 1960) gefärbt. Die Methylenblau-Lösung und Azur-II-Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und filtriert. Die fertige Färbelösung wurde auf die Schnitte gegeben und nach einer Minute bei 60°C mit destilliertem Wasser abgewaschen, für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und mit Eukitt eingedeckt. Danach wurden Ultradünnschnitte (50-70 nm) angefertigt, auf Formvar befilmte Netze gezogen, 20 min auf einen Tropfen 1%iger Uranylacetatlösung

kontrastiert und anschließend in H₂O gespült. Eine zweite Kontrastierung erfolgte 7 min in Bleicitrat, das ebenfalls durch H₂O abgespült wurde. Nachdem die Schnitte auf den Netzen getrocknet waren, erfolgte die elektronenmikroskopische Analyse mit einem EM10 bzw. eines EM109 Elektronenmikroskop der Firma Leo.

8 Tierzucht und Tierhaltung

8.1 Tierzucht

Für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund verwendet. Die Nachkommen der Kreuzung dieser beiden Mauslinien wurde weiter als Inzucht fortgeführt. Die Tiere wurden durch PCR-Analysen (siehe 1.7) genotypisiert. Die Tierhaltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin (Göttingen) entsprechend den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde. Die Haltung erfolgte auf staubfreiem Weichholzgranulateinstreu. Die Mäuse wurden mit einer sedimentierten Standarddiät gefüttert. Futter war zu jeder Zeit ad libitum für die Tiere verfügbar. Zur Wasserversorgung wurde Leitungswasser aus Tränkflaschen ebenfalls ad libitum bereitgestellt. Die Raumtemperatur lag für alle Tiere bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit bei $55 \pm 10\%$. Die Luftwechselrate lag bei 15-fach pro Stunde. Die Beleuchtung erfolgte mit Kunstlicht von 4.30 bis 16.30 Uhr MEZ mit einer Lichtintensität von 300 Lux, gemessen in einer Höhe von einem Meter über dem Fußboden in der Raummitte.

8.2 Identifikation der Tiere und Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurden Schwanzbiopsien entnommen. Diese erfolgten im Alter von drei bis vier Wochen beim Absetzen vom Muttertier. Gleichzeitig wurden Ohrlochmarkierung, durch die die Tiere eine laufende Nummer erhielten, zur Identifikation vorgenommen. Der Schwanzbiopsie wurde die Nummer des jeweiligen Tiers zugeordnet. In einem Zuchtprotokoll wurden für jeden Wurf Anzahl der Nachkommen, Geburtsdatum und Geschlecht der Tiere festgehalten.

8.3 Narkotisierung und Tötung von Versuchstieren

Zur histologischen Probengewinnung, die eine Perfusionsfixierung erforderte, erhielten die Mäuse eine Injektionsnarkose durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus 5 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketanest®) und 2 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun®). Für eine Probengewinnung, die keine Perfusion erforderte, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

9 Verhaltenstests

9.1 Beurteilung der Versuchstiere durch ein klinisches Punktesystem

Zur Beurteilung des Gesamtzustandes der Mäuse wurde eine klinische Skala entwickelt. Die Tiere wurden einmal monatlich von einem geblindeten Versuchsleiter jeweils am späten Nachmittag danach bewertet und ihr klinisches Stadium bestimmt. Jeder untersuchte Parameter wurde durch eine Dichotomie-Ja/Nein-Antwort auf eine bestimmte Frage bewertet. Die Mäuse wurden dazu zunächst unter normalen Haltungsbedingungen im Käfig beobachtet, um festzustellen, ob die Tiere Atemprobleme oder eine Kyphose entwickelt hatten, oder durch besondere Passivität auffielen. Hierbei wurden das spontane Aufrichten an der Käfigwand und die Kletterbereitschaft beurteilt. Eine mögliche Plegie der Hinterläufe wurde anhand der Gangbildveränderungen bestimmt. Um Ataxien, Intentionstremor und Parese beurteilen zu können, wurden die Tiere nach Beobachtung im Käfig im Stabtest (siehe 9.3.2) und im Gittertest (siehe 9.3.3) bewertet. Jedes Tier wurde gewogen und bei einem Gewichtsverlust von mehr als 20 % des ehemaligen Gewichts im Alter von 2 Monaten als „Tier mit Gewichtsverlust“ eingestuft.

9.2 Stabtest

Die Tiere wurden auf ihr Käfiggitter gesetzt und am Schwanz nach oben gezogen, um eine paretische Entwicklung zu entdecken. Dabei wurde geprüft, ob sie sich mit den Hinter- oder nur mit den Vorderbeinen am Käfiggitter festhalten konnten. Wenn die Hinterläufe dabei als schwach erachtet wurden, wurde ein modifizierter Stabtest in Anlehnung an SEREDA ET AL. (1996) durchgeführt, um die Hinterläufe weiter zu testen. Dazu wurde ein Metallstab (1,2 cm Durchmesser) mit rauher Oberfläche in einer Höhe von 40 cm über dem Boden in einer mit Schaumstoffplatten ausgelegten Plastikbox verwendet. Vor dem Test wurde den Mäusen für 2 Minuten Gelegenheit gegeben, sich auf die neue Umgebung auf dem Stab einzustellen. Danach wurde geprüft, ob sich die Tiere unter Fortbewegung auf dem Stab halten konnten oder nicht. Nur Tiere, die in der Lage waren sich auf dem Stab fortzubewegen wurden danach als nicht paretisch eingeschätzt.

9.3 Gittertest

Im Gittertest wurden mögliche Ataxien der Vorder- und Hinterläufe sowie Intentionstremore bestimmt. Die Tiere wurden dazu auf einem Gitter aus Metallstäben (Stabdurchmesser 2 mm) in 20 cm Höhe über dem Boden getestet. Die Stäbe waren so angeordnet, dass sie 1 cm² große Flächen frei ließen. Die Gesamtfläche des Gitters betrug 40x20 cm². Ein Tier wurde als ataktisch beurteilt wenn es beim Laufen auf einer ca. 80 cm Strecke mehr als zweimal neben einen Stab trat.

VI Literatur

- Adamo, A. M., Aloise, P. A. & Pasquini, J. M. (1986). "A possible relationship between concentration of microperoxisomes and myelination." *Int J Dev Neurosci* **4**(6): 513-7.
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G. & Adorini, L. (1998). "Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation." *J Immunol* **160**(10): 4671-80.
- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K. & Ting, J. P. (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." *Nat Neurosci* **4**(11): 1116-22.
- Arnett, H. A., Wang, Y., Matsushima, G. K., Suzuki, K. & Ting, J. P. (2003). "Functional genomic analysis of remyelination reveals importance of inflammation in oligodendrocyte regeneration." *J Neurosci* **23**(30): 9824-32.
- Arnold, G. & Holtzman, E. (1978). "Microperoxisomes in the central nervous system of the postnatal rat." *Brain Res* **155**(1): 1-17.
- Arroyo, E. J. & Scherer, S. S. (2000). "On the molecular architecture of myelinated fibers." *Histochem Cell Biol* **113**(1): 1-18.
- Aubourg, P. & Dubois-Dalcq, M. (2000). "X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia?" *Glia* **29**(2): 186-90.
- Baes, M., Dewerchin, M., Janssen, A., Collen, D. & Carmeliet, P. (2002). "Generation of Pex5-loxP mice allowing the conditional elimination of peroxisomes." *Genesis* **32**(2): 177-8.
- Baes, M., Gressens, P., Baumgart, E., Carmeliet, P., Casteels, M., Fransen, M., Evrard, P., Fahimi, D., Declercq, P. E., Collen, D., van Veldhoven, P. P. & Mannaerts, G. P. (1997). "A mouse model for Zellweger syndrome." *Nat Genet* **17**(1): 49-57.
- Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. (2004). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." *Neurobiol Dis* **16**(1): 1-13.
- Barth, P. G., Gootjes, J., Bode, H., Vreken, P., Majoie, C. B. & Wanders, R. J. (2001). "Late onset white matter disease in peroxisome biogenesis disorder." *Neurology* **57**(11): 1949-55.
- Baumann, M., Korenke, G. C., Weddige-Diedrichs, A., Wilichowski, E., Hunneman, D. H., Wilken, B., Brockmann, K., Klingebiel, T., Niethammer, D., Kuhl, J., Ebell, W. & Hanefeld, F. (2003). "Haematopoietic stem cell transplantation in 12 patients with cerebral X-linked adrenoleukodystrophy." *Eur J Pediatr* **162**(1): 6-14.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." *Physiol Rev* **81**(2): 871-927.
- Baumgart, E., Vanhorebeek, I., Grabenbauer, M., Borgers, M., Declercq, P. E., Fahimi, H. D. & Baes, M. (2001). "Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse)." *Am J Pathol* **159**(4): 1477-94.
- Baumgartner, M. R., Poll-The, B. T., Verhoeven, N. M., Jakobs, C., Espeel, M., Roels, F., Rabier, D., Levade, T., Rolland, M. O., Martinez, M., Wanders, R. J. & Saudubray, J. M.

(1998). "Clinical approach to inherited peroxisomal disorders: a series of 27 patients." Ann Neurol **44**(5): 720-30.

Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. (2001). Neuroscience Exploring the Brain, Lippincott Williams & Wilkins.

Bechmann, I. & Nitsch, R. (1997). "Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining." Histochem Cell Biol **107**(5): 391-7.

Belachew, S., Yuan, X. & Gallo, V. (2001). "Unraveling oligodendrocyte origin and function by cell-specific transgenesis." Dev Neurosci **23**(4-5): 287-98.

Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D. & Strieter, R. M. (2000). "CXC chemokines in angiogenesis." J Leukoc Biol **68**(1): 1-8.

Bethea, J. R., Nagashima, H., Acosta, M. C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A. E., Loor, K., Green, J. & Dietrich, W. D. (1999). "Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats." J Neurotrauma **16**(10): 851-63.

Bieber, A. J., Kerr, S. & Rodriguez, M. (2003). "Efficient central nervous system remyelination requires T cells." Ann Neurol **53**(5): 680-4.

Bizzozero, O. A., Zuniga, G. & Lees, M. B. (1991). "Fatty acid composition of human myelin proteolipid protein in peroxisomal disorders." J Neurochem **56**(3): 872-8.

Blatch, G. L. & Lassel, M. (1999). "The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions." Bioessays **21**(11): 932-9.

Bleckmann, H., Schmitz, H. & von der Emde, G. (2004). "Nature as a model for technical sensors." J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol **190**(12): 971-81.

Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol **37**(8): 911-7.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

Bradl, M. & Linington, C. (1996). "Animal models of demyelination." Brain Pathol **6**(3): 303-11.

Braun, A., Ambach, H., Kammerer, S., Rolinski, B., Stockler, S., Rabl, W., Gartner, J., Zierz, S. & Roscher, A. A. (1995). "Mutations in the gene for X-linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes." Am J Hum Genet **56**(4): 854-61.

Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S. J. & Valle, D. (1997). "Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata." Nat Genet **15**(4): 369-76.

Brennan, P. A. (2004). "The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice." Horm Behav **46**(3): 231-40.

Brown, F. R., 3rd, Chen, W. W., Kirschner, D. A., Frayer, K. L., Powers, J. M., Moser, A. B. & Moser, H. W. (1983). "Myelin membrane from adrenoleukodystrophy brain white matter-- biochemical properties." J Neurochem **41**(2): 341-8.

Brugger, B., Sandhoff, R., Wegehingel, S., Gorgas, K., Malsam, J., Helms, J. B., Lehmann, W. D., Nickel, W. & Wieland, F. T. (2000). "Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles." J Cell Biol **151**(3): 507-18.

Buckwalter, M. S. & Wyss-Coray, T. (2004). "Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo." J Neuroinflammation **1**(1): 10.

Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B. & Lisak, R. P. (1983). "Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood." Cell Immunol **81**(2): 435-40.

Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. & Briskin, M. (1999). "Lymphocyte trafficking and regional immunity." Adv Immunol **72**: 209-53.

Calzada, C., Bruckdorfer, K. R. & Rice-Evans, C. A. (1997). "The influence of antioxidant nutrients on platelet function in healthy volunteers." Atherosclerosis **128**(1): 97-105.

Cappa, M., Bertini, E., del Balzo, P., Cambiaso, P., Di Biase, A. & Salvati, S. (1994). "High dose immunoglobulin IV treatment in adrenoleukodystrophy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **57 Suppl**: 69-70; discussion 71.

Chen, S., Rio, C., Ji, R. R., Dikkes, P., Coggeshall, R. E., Woolf, C. J. & Corfas, G. (2003). "Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss." Nat Neurosci **6**(11): 1186-93.

Cheon, J. E., Kim, I. O., Hwang, Y. S., Kim, K. J., Wang, K. C., Cho, B. K., Chi, J. G., Kim, C. J., Kim, W. S. & Yeon, K. M. (2002). "Leukodystrophy in children: a pictorial review of MR imaging features." Radiographics **22**(3): 461-76.

Chudzik, D. M., Michels, P. A., de Walque, S. & Hol, W. G. (2000). "Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases." J Mol Biol **300**(4): 697-707.

Clayton, P. T. (2001). "Clinical consequences of defects in peroxisomal beta-oxidation." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 298-305.

Colello, R. J. & Schwab, M. E. (1994). "A role for oligodendrocytes in the stabilization of optic axon numbers." J Neurosci **14**(11 Pt 1): 6446-52.

Contreras, M., Mosser, J., Mandel, J. L., Aubourg, P. & Singh, I. (1994). "The protein coded by the X-adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein." FEBS Lett **344**(2-3): 211-5.

Cook, H. W., Thomas, S. E. & Xu, Z. (1991). "Essential fatty acids and serine as plasmalogen precursors in relation to competing metabolic pathways." Biochem Cell Biol **69**(7): 475-84.

Correale, J. & Villa, A. (2004). "The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries." J Neurol **251**(11): 1304-16.

Dansen, T. B. & Wirtz, K. W. (2001). "The peroxisome in oxidative stress." IUBMB Life **51**(4): 223-30.

Dansen, T. B., Wirtz, K. W., Wanders, R. J. & Pap, E. H. (2000). "Peroxisomes in human fibroblasts have a basic pH." Nat Cell Biol **2**(1): 51-3.

- Di Biase, A. & Salvati, S. (1997). "Exogenous lipids in myelination and myelination." Kaohsiung J Med Sci **13**(1): 19-29.
- Dietschy, J. M. & Turley, S. D. (2001). "Cholesterol metabolism in the brain." Curr Opin Lipidol **12**(2): 105-12.
- Dietschy, J. M. & Turley, S. D. (2002). "Control of cholesterol turnover in the mouse." J Biol Chem **277**(6): 3801-4.
- Dotz, G. & Gould, S. J. (1996). "Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1763-74.
- Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V. & Aubourg, P. (1999). "The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder." Trends Neurosci **22**(1): 4-12.
- Eddleston, M. & Mucke, L. (1993). "Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease." Neuroscience **54**(1): 15-36.
- Eugenin, E. A. & Berman, J. W. (2003). "Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier." Methods **29**(4): 351-61.
- Farooqui, A. A. & Horrocks, L. A. (2001). "Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia." Neuroscientist **7**(3): 232-45.
- Feigenbaum, V., Gelot, A., Casanova, P., Daumas-Duport, C., Aubourg, P. & Dubois-Dalcq, M. (2000). "Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients." Neurobiol Dis **7**(6 Pt B): 600-12.
- Forss-Petter, S., Werner, H., Berger, J., Lassmann, H., Molzer, B., Schwab, M. H., Bernheimer, H., Zimmermann, F. & Nave, K. A. (1997). "Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice." J Neurosci Res **50**(5): 829-43.
- Fouquet, F., Zhou, J. M., Ralston, E., Murray, K., Troalen, F., Magal, E., Robain, O., Dubois-Dalcq, M. & Aubourg, P. (1997). "Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system." Neurobiol Dis **3**(4): 271-85.
- Furlan, R., Brambilla, E., Ruffini, F., Poliani, P. L., Bergami, A., Marconi, P. C., Franciotta, D. M., Penna, G., Comi, G., Adorini, L. & Martino, G. (2001). "Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes." J Immunol **167**(3): 1821-9.
- Gallyas, F. (1979). "Silver staining of myelin by means of physical development." Neurol Res **1**(2): 203-9.
- Gartner, J., Braun, A., Holzinger, A., Roerig, P., Lenard, H. G. & Roscher, A. A. (1998). "Clinical and genetic aspects of X-linked adrenoleukodystrophy." Neuropediatrics **29**(1): 3-13.
- Geuze, H. J., Murk, J. L., Stroobants, A. K., Griffith, J. M., Kleijmeer, M. J., Koster, A. J., Verkleij, A. J., Distel, B. & Tabak, H. F. (2003). "Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation." Mol Biol Cell **14**(7): 2900-7.

- Gimsa, U., Peter, S. V., Lehmann, K., Bechmann, I. & Nitsch, R. (2000). "Axonal damage induced by invading T cells in organotypic central nervous system tissue in vitro: involvement of microglial cells." Brain Pathol **10**(3): 365-77.
- Goldfischer, S. & Reddy, J. K. (1984). "Peroxisomes (microbodies) in cell pathology." Int Rev Exp Pathol **26**: 45-84.
- Gould, S. J. & Collins, C. S. (2002). "Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 382-9.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. (1989). "A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes." J Cell Biol **108**(5): 1657-64.
- Gould, S. J., Keller, G. A. & Subramani, S. (1988). "Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins." J Cell Biol **107**(3): 897-905.
- Gravel, M., Di Polo, A., Valera, P. B. & Braun, P. E. (1998). "Four-kilobase sequence of the mouse CNP gene directs spatial and temporal expression of lacZ in transgenic mice." J Neurosci Res **53**(4): 393-404.
- Griffin, D. E., Moser, H. W., Mendoza, Q., Moench, T. R., O'Toole, S. & Moser, A. B. (1985). "Identification of the inflammatory cells in the central nervous system of patients with adrenoleukodystrophy." Ann Neurol **18**(6): 660-4.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M. H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N. & Nave, K. A. (1998). "Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin." Science **280**(5369): 1610-3.
- Hahnel, D., Beyer, K. & Engelmann, B. (1999). "Inhibition of peroxy radical-mediated lipid oxidation by plasmalogen phospholipids and alpha-tocopherol." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 1087-94.
- Hammerschmidt, D. E. (2003). "Adrenoleukodystrophy: abnormal white matter signal on MRI." J Lab Clin Med **142**(6): 433.
- Hanisch, U. K. (2002). "Microglia as a source and target of cytokines." Glia **40**(2): 140-55.
- Hashmi, M., Stanley, W. & Singh, I. (1986). "Lignoceroyl-CoASH ligase: enzyme defect in fatty acid beta-oxidation system in X-linked childhood adrenoleukodystrophy." FEBS Lett **196**(2): 247-50.
- Heinzer, A. K., Kemp, S., Lu, J. F., Watkins, P. A. & Smith, K. D. (2002). "Mouse very long-chain acyl-CoA synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy." J Biol Chem **277**(32): 28765-73.
- Heinzer, A. K., Watkins, P. A., Lu, J. F., Kemp, S., Moser, A. B., Li, Y. Y., Mihalik, S., Powers, J. M. & Smith, K. D. (2003). "A very long-chain acyl-CoA synthetase-deficient mouse and its relevance to X-linked adrenoleukodystrophy." Hum Mol Genet **12**(10): 1145-54.
- Hettema, E. H., Distel, B. & Tabak, H. F. (1999). "Import of proteins into peroxisomes." Biochim Biophys Acta **1451**(1): 17-34.
- Ho, J. K., Moser, H., Kishimoto, Y. & Hamilton, J. A. (1995). "Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy." J Clin Invest **96**(3): 1455-63.

Hodge, V. J., Gould, S. J., Subramani, S., Moser, H. W. & Krisans, S. K. (1991). "Normal cholesterol synthesis in human cells requires functional peroxisomes." Biochem Biophys Res Commun **181**(2): 537-41.

Hoepfner, D., Schildknegt, D., Braakman, I., Philippsen, P. & Tabak, H. F. (2005). "Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation." Cell **122**(1): 85-95.

Holtzman, E., Teichberg, S., Abrahams, S. J., Citkowitz, E., Crain, S. M., Kawai, N. & Peterson, E. R. (1973). "Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and the adrenal medulla." J Histochem Cytochem **21**(4): 349-85.

Holzinger, A., Kammerer, S. & Roscher, A. A. (1997). "Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter." Biochem Biophys Res Commun **237**(1): 152-7.

Hughes, J. L., Poulos, A., Robertson, E., Chow, C. W., Sheffield, L. J., Christodoulou, J. & Carter, R. F. (1990). "Pathology of hepatic peroxisomes and mitochondria in patients with peroxisomal disorders." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **416**(3): 255-64.

Ito, M., Blumberg, B. M., Mock, D. J., Goodman, A. D., Moser, A. B., Moser, H. W., Smith, K. D. & Powers, J. M. (2001). "Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation." J Neuropathol Exp Neurol **60**(10): 1004-19.

Itoh, M., Hayashi, M., Fujioka, Y., Nagashima, K., Morimatsu, Y. & Matsuyama, H. (2002). "Immunohistological study of globoid cell leukodystrophy." Brain Dev **24**(5): 284-90.

Jacobs, C. A., Baker, P. E., Roux, E. R., Picha, K. S., Toivola, B., Waugh, S. & Kennedy, M. K. (1991). "Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated by IL-1 alpha and suppressed by soluble IL-1 receptor." J Immunol **146**(9): 2983-9.

Jankowski, A., Kim, J. H., Collins, R. F., Daneman, R., Walton, P. & Grinstein, S. (2001). "In situ measurements of the pH of mammalian peroxisomes using the fluorescent protein pHluorin." J Biol Chem **276**(52): 48748-53.

Janssen, A., Gressens, P., Grabenbauer, M., Baumgart, E., Schad, A., Vanhorebeek, I., Brouwers, A., Declercq, P. E., Fahimi, D., Evrard, P., Schoonjans, L., Collen, D., Carmeliet, P., Mannaerts, G., Van Veldhoven, P. & Baes, M. (2003). "Neuronal migration depends on intact peroxisomal function in brain and in extraneuronal tissues." J Neurosci **23**(30): 9732-41.

Jessen, K. R. & Mirsky, R. (2005). "The origin and development of glial cells in peripheral nerves." Nat Rev Neurosci **6**(9): 671-82.

Johnson, A. B., Schaumburg, H. H. & Powers, J. M. (1976). "Histochemical characteristics of the striated inclusions of adrenoleukodystrophy." J Histochem Cytochem **24**(6): 725-30.

Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. (1990). "The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily." J Biol Chem **265**(8): 4534-40.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessel, T. M. (2000). Principle of Neural Science, McGraw Hill Companies.

Kaplan, M. R., Meyer-Franke, A., Lambert, S., Bennett, V., Duncan, I. D., Levinson, S. R. & Barres, B. A. (1997). "Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes." Nature **386**(6626): 724-8.

Karpus, W. J. & Kennedy, K. J. (1997). "MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation." J Leukoc Biol **62**(5): 681-7.

Karpus, W. J., Lukacs, N. W., Kennedy, K. J., Smith, W. S., Hurst, S. D. & Barrett, T. A. (1997). "Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production." J Immunol **158**(9): 4129-36.

Kaye, E. M. (2001). "Update on genetic disorders affecting white matter." Pediatr Neurol **24**(1): 11-24.

Kelley, R. I., Datta, N. S., Dobyns, W. B., Hajra, A. K., Moser, A. B., Noetzel, M. J., Zackai, E. H. & Moser, H. W. (1986). "Neonatal adrenoleukodystrophy: new cases, biochemical studies, and differentiation from Zellweger and related peroxisomal polydystrophy syndromes." Am J Med Genet **23**(4): 869-901.

Kemp, S., Valianpour, F., Denis, S., Ofman, R., Sanders, R. J., Mooyer, P., Barth, P. G. & Wanders, R. J. (2005). "Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy." Mol Genet Metab **84**(2): 144-51.

Kemp, S., Wei, H. M., Lu, J. F., Braiterman, L. T., McGuinness, M. C., Moser, A. B., Watkins, P. A. & Smith, K. D. (1998). "Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy." Nat Med **4**(11): 1261-8.

Kessel, R. G. & Kardon, R. H. (1979). Tissues and Organs: a text-atlas of scanning electron microscopy, W.H. Freeman & Company.

Kettenmann, H. & Ransom, B. R. (1995). Neuroglia, Oxford University Press.

Klugmann, M., Schwab, M. H., Puhlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I. R. & Nave, K. A. (1997). "Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein." Neuron **18**(1): 59-70.

Kobayashi, T., Shinnoh, N., Kondo, A. & Yamada, T. (1997). "Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism." Biochem Biophys Res Commun **232**(3): 631-6.

Korenke, G. C., Fuchs, S., Krasemann, E., Doerr, H. G., Wilichowski, E., Hunneman, D. H. & Hanefeld, F. (1996). "Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype." Ann Neurol **40**(2): 254-7.

Kovacs, W. J. & Krisans, S. (2003). "Cholesterol biosynthesis and regulation: role of peroxisomes." Adv Exp Med Biol **544**: 315-27.

Kovacs, W. J., Olivier, L. M. & Krisans, S. K. (2002). "Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis." Prog Lipid Res **41**(5): 369-91.

Kovacs, W. J., Shackelford, J. E., Tape, K. N., Richards, M. J., Faust, P. L., Fliesler, S. J. & Krisans, S. K. (2004). "Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model." Mol Cell Biol **24**(1): 1-13.

- Krakowski, M. & Owens, T. (1996). "Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis." Eur J Immunol **26**(7): 1641-6.
- Kramar, R. (1986). "[The contribution of peroxisomes to lipid metabolism]." J Clin Chem Clin Biochem **24**(2): 109-18.
- Kreutzberg, G. W. (1996). "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." Trends Neurosci **19**(8): 312-8.
- Krisans, S. K. (1992). "The role of peroxisomes in cholesterol metabolism." Am J Respir Cell Mol Biol **7**(4): 358-64.
- Krivit, W., Lockman, L. A., Watkins, P. A., Hirsch, J. & Shapiro, E. G. (1995). "The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome." J Inherit Metab Dis **18**(4): 398-412.
- Krivit, W., Peters, C. & Shapiro, E. G. (1999). "Bone marrow transplantation as effective treatment of central nervous system disease in globoid cell leukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, mannosidosis, fucosidosis, aspartylglucosaminuria, Hurler, Maroteaux-Lamy, and Sly syndromes, and Gaucher disease type III." Curr Opin Neurol **12**(2): 167-76.
- Krivit, W., Shapiro, E., Hoogerbrugge, P. M. & Moser, H. W. (1992). "State of the art review. Bone marrow transplantation treatment for storage diseases. Keystone. January 23, 1992." Bone Marrow Transplant **10 Suppl 1**: 87-96.
- Krivit, W., Sung, J. H., Shapiro, E. G. & Lockman, L. A. (1995). "Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases." Cell Transplant **4**(4): 385-92.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R. & Nave, K. A. (2003). "Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination." Nat Genet **33**(3): 366-74.
- Lasorsa, F. M., Scarcia, P., Erdmann, R., Palmieri, F., Rottensteiner, H. & Palmieri, L. (2004). "The yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter: characterization of two transport modes and involvement in DeltapH formation across peroxisomal membranes." Biochem J **381**(Pt 3): 581-5.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P. & Gordon, S. (1990). "Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain." Neuroscience **39**(1): 151-70.
- Lazarow, P. B. (1978). "Rat liver peroxisomes catalyze the beta oxidation of fatty acids." J Biol Chem **253**(5): 1522-8.
- Lazarow, P. B. (1987). "The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism." J Inherit Metab Dis **10 Suppl 1**: 11-22.
- Lazarow, P. B. (1987). "What is a peroxisome?" Toxicol Ind Health **3**(2): 1-6.
- Lazzarini, R. A. (2004). Myelin Biology and Disorders, Elsevier Academic Press.
- Lee, T. C. (1998). "Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens." Biochim Biophys Acta **1394**(2-3): 129-45.

- Lewandoski, M. (2001). "Conditional control of gene expression in the mouse." Nat Rev Genet **2**(10): 743-55.
- Liu, D., Nagan, N., Just, W. W., Rodemer, C., Thai, T. P. & Zoeller, R. A. (2005). "Role of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in the biosynthesis of plasmalogens and nonether glycerolipids." J Lipid Res **46**(4): 727-35.
- Liu, L. X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R. & Aubourg, P. (1999). "Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters." J Biol Chem **274**(46): 32738-43.
- Loidl, J., Schwabe, G., Paschke, E., Paltauf, F. & Hermetter, A. (1990). "Uptake of fluorescent plasmalogen analogs by cultured human skin fibroblasts deficient in plasmalogen." Biochim Biophys Acta **1029**(1): 75-84.
- Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C. O., Mandel, J. L. & Chimini, G. (1996). "A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1265-9.
- Lorenz, P., Maier, A. G., Baumgart, E., Erdmann, R. & Clayton, C. (1998). "Elongation and clustering of glycosomes in *Trypanosoma brucei* overexpressing the glycosomal Pex11p." Embo J **17**(13): 3542-55.
- Lu, J. F., Lawler, A. M., Watkins, P. A., Powers, J. M., Moser, A. B., Moser, H. W. & Smith, K. D. (1997). "A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9366-71.
- Luft, J. H. (1961). "Improvements in epoxy resin embedding methods." J Biophys Biochem Cytol **9**: 409-14.
- Lukacs, N. W. & Kunkel, S. L. (1998). "Chemokines and their role in disease." Int J Clin Lab Res **28**(2): 91-5.
- Martin, J. J. (1995). "Neuropathology of peroxisomal diseases." J Inherit Metab Dis **18 Suppl 1**: 19-33.
- Martino, G., Furlan, R., Brambilla, E., Bergami, A., Ruffini, F., Gironi, M., Poliani, P. L., Grimaldi, L. M. & Comi, G. (2000). "Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis." J Neuroimmunol **109**(1): 3-9.
- Mason, J. L., Suzuki, K., Chaplin, D. D. & Matsushima, G. K. (2001). "Interleukin-1beta promotes repair of the CNS." J Neurosci **21**(18): 7046-52.
- Matsumoto, Y., Hanawa, H., Tsuchida, M. & Abo, T. (1993). "In situ inactivation of infiltrating T cells in the central nervous system with autoimmune encephalomyelitis. The role of astrocytes." Immunology **79**(3): 381-90.
- McCollum, D., Monosov, E. & Subramani, S. (1993). "The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells--the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family." J Cell Biol **121**(4): 761-74.
- McGuinness, M. C., Griffin, D. E., Raymond, G. V., Washington, C. A., Moser, H. W. & Smith, K. D. (1995). "Tumor necrosis factor-alpha and X-linked adrenoleukodystrophy." J Neuroimmunol **61**(2): 161-9.

- McGuinness, M. C., Lu, J. F., Zhang, H. P., Dong, G. X., Heinzer, A. K., Watkins, P. A., Powers, J. & Smith, K. D. (2003). "Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy." *Mol Cell Biol* **23**(2): 744-53.
- McGuinness, M. C., Powers, J. M., Bias, W. B., Schmeckpeper, B. J., Segal, A. H., Gowda, V. C., Wesselingh, S. L., Berger, J., Griffin, D. E. & Smith, K. D. (1997). "Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **75**(1-2): 174-82.
- McKenna, O., Arnold, G. & Holtzman, E. (1976). "Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat." *Brain Res* **117**(2): 181-94.
- Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. (2002). "Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium." *Blood* **100**(12): 3853-60.
- Minghetti, L. (2005). "Role of inflammation in neurodegenerative diseases." *Curr Opin Neurol* **18**(3): 315-21.
- Miura, S., Kasuya-Arai, I., Mori, H., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T. & Fujiki, Y. (1992). "Carboxyl-terminal consensus Ser-Lys-Leu-related tripeptide of peroxisomal proteins functions in vitro as a minimal peroxisome-targeting signal." *J Biol Chem* **267**(20): 14405-11.
- Miyagishi, R., Kikuchi, S., Fukazawa, T. & Tashiro, K. (1995). "Macrophage inflammatory protein-1 alpha in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological diseases." *J Neurol Sci* **129**(2): 223-7.
- Morell, P. & Norton, W. T. (1980). "Myelin." *Sci Am* **242**(5): 88-90, 92, 96 passim.
- Moser, H. W. (1996). *Handbook of clinical Neurology*, Elsevier Science.
- Moser, H. W. (1999). "Genotype-phenotype correlations in disorders of peroxisome biogenesis." *Mol Genet Metab* **68**(2): 316-27.
- Moser, H. W., Bergin, A. & Cornblath, D. (1991). "Peroxisomal disorders." *Biochem Cell Biol* **69**(7): 463-74.
- Moser, H. W., Bergin, A., Naidu, S. & Ladenson, P. W. (1991). "Adrenoleukodystrophy." *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**(2): 297-318.
- Moser, H. W., Moser, A. B., Frayer, K. K., Chen, W., Schulman, J. D., O'Neill, B. P. & Kishimoto, Y. (1981). "Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids." *Neurology* **31**(10): 1241-9.
- Moser, H. W., Moser, A. B., Smith, K. D., Bergin, A., Borel, J., Shankroff, J., Stine, O. C., Merette, C., Ott, J., Krivit, W. & et al. (1992). "Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy." *J Inherit Metab Dis* **15**(4): 645-64.
- Mosser, J., Douar, A. M., Sarde, C. O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L. & Aubourg, P. (1993). "Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters." *Nature* **361**(6414): 726-30.
- Mosser, J., Sarde, C. O., Vicaire, S., Yates, J. R. & Mandel, J. L. (1994). "A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene." *Genomics* **22**(2): 469-71.

- Motley, A. M., Hetteema, E. H., Hogenhout, E. M., Brites, P., ten Asbroek, A. L., Wijburg, F. A., Baas, F., Heijmans, H. S., Tabak, H. F., Wanders, R. J. & Distel, B. (1997). "Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor." Nat Genet **15**(4): 377-80.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Muse, E. D., Jurevics, H., Toews, A. D., Matsushima, G. K. & Morell, P. (2001). "Parameters related to lipid metabolism as markers of myelination in mouse brain." J Neurochem **76**(1): 77-86.
- Naidu, S., Bresnan, M. J., Griffin, D., O'Toole, S. & Moser, H. W. (1988). "Childhood adrenoleukodystrophy. Failure of intensive immunosuppression to arrest neurologic progression." Arch Neurol **45**(8): 846-8.
- Nakajima, K. & Kohsaka, S. (2004). "Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **4**(1): 65-84.
- Natt, O., Watanabe, T., Boretius, S., Radulovic, J., Frahm, J. & Michaelis, T. (2002). "High-resolution 3D MRI of mouse brain reveals small cerebral structures in vivo." J Neurosci Methods **120**(2): 203-9.
- Noetzel, M. J. (2004). "Diagnosing "undiagnosed" leukodystrophies: The role of molecular genetics." Neurology **62**(6): 847-8.
- Norton, W. T. (1984). "Some thoughts on the neurobiology of the leukodystrophies." Neuropediatrics **15 Suppl**: 28-31.
- Norton, W. T. & Poduslo, S. E. (1973). "Myelination in rat brain: method of myelin isolation." J Neurochem **21**(4): 749-57.
- O'Keefe, G. M., Nguyen, V. T. & Benveniste, E. N. (2002). "Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases." J Neurovirol **8**(6): 496-512.
- Ofman, R., Hetteema, E. H., Hogenhout, E. M., Caruso, U., Muijsers, A. O. & Wanders, R. J. (1998). "Acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase: cloning of the human cDNA and resolution of the molecular basis in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2." Hum Mol Genet **7**(5): 847-53.
- Opperdoes, F. R. (1984). "Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*." FEBS Lett **169**(1): 35-9.
- Osborn, Blaser & Saltman (2004). Diagnostic Imaging: Brain, Elsevier Saunders.
- Pachter, J. S., de Vries, H. E. & Fabry, Z. (2003). "The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **62**(6): 593-604.
- Paintlia, A. S., Gilg, A. G., Khan, M., Singh, A. K., Barbosa, E. & Singh, I. (2003). "Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies." Neurobiol Dis **14**(3): 425-39.
- Paltauf, F. (1994). "Ether lipids in biomembranes." Chem Phys Lipids **74**(2): 101-39.

Pannese, E. (1994). *Neurocytology*, Thieme Verlag.

Paratore, C., Hagedorn, L., Floris, J., Hari, L., Kleber, M., Suter, U. & Sommer, L. (2002). "Cell-intrinsic and cell-extrinsic cues regulating lineage decisions in multipotent neural crest-derived progenitor cells." *Int J Dev Biol* **46**(1): 193-200.

Pekny, M. & Nilsson, M. (2005). "Astrocyte activation and reactive gliosis." *Glia* **50**(4): 427-34.

Perichon, R., Moser, A. B., Wallace, W. C., Cunningham, S. C., Roth, G. S. & Moser, H. W. (1998). "Peroxisomal disease cell lines with cellular plasmalogen deficiency have impaired muscarinic cholinergic signal transduction activity and amyloid precursor protein secretion." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(1): 57-61.

Petroni, A., Blasevich, M. & Uziel, G. (2003). "Effects of the testosterone metabolite dihydrotestosterone and 5 alpha-androstan-3 alpha,17 beta-diol on very long chain fatty acid metabolism in X-adrenoleukodystrophic fibroblasts." *Life Sci* **73**(12): 1567-75.

Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E. & Bansal, R. (1993). "The oligodendrocyte and its many cellular processes." *Trends Cell Biol* **3**(6): 191-7.

Piccio, L., Rossi, B., Scarpini, E., Laudanna, C., Giagulli, C., Issekutz, A. C., Vestweber, D., Butcher, E. C. & Constantin, G. (2002). "Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors." *J Immunol* **168**(4): 1940-9.

Plattner, H. & Hentschel, J. (2002). *Zellbiologie*, Thieme Verlag.

Popovich, P. G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., van Rooijen, N. & Stokes, B. T. (1999). "Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury." *Exp Neurol* **158**(2): 351-65.

Powers, J. M., DeCiero, D. P., Cox, C., Richfield, E. K., Ito, M., Moser, A. B. & Moser, H. W. (2001). "The dorsal root ganglia in adrenomyeloneuropathy: neuronal atrophy and abnormal mitochondria." *J Neuropathol Exp Neurol* **60**(5): 493-501.

Powers, J. M., DeCiero, D. P., Ito, M., Moser, A. B. & Moser, H. W. (2000). "Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy." *J Neuropathol Exp Neurol* **59**(2): 89-102.

Powers, J. M., Liu, Y., Moser, A. B. & Moser, H. W. (1992). "The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications." *J Neuropathol Exp Neurol* **51**(6): 630-43.

Powers, J. M. & Moser, H. W. (1998). "Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis." *Brain Pathol* **8**(1): 101-20.

Powers, J. M. & Schaumburg, H. H. (1973). "The adrenal cortex in adreno-leukodystrophy." *Arch Pathol* **96**(5): 305-10.

Pryce, G., Male, D., Campbell, I. & Greenwood, J. (1997). "Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro." *J Neuroimmunol* **75**(1-2): 84-94.

Pryce, G., Male, D. K. & Sarkar, C. (1991). "Control of lymphocyte migration into brain: selective interactions of lymphocyte subpopulations with brain endothelium." *Immunology* **72**(3): 393-8.

Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C., Metzger, E., Hindelang, C., Callizot, N., Ruiz, M., Pampols, T., Giros, M. & Mandel, J. L. (2004). "Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy." Hum Mol Genet **13**(23): 2997-3006.

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

Purdue, P. E., Skoneczny, M., Yang, X., Zhang, J. W. & Lazarow, P. B. (1999). "Rhizomelic chondrodysplasia punctata, a peroxisomal biogenesis disorder caused by defects in Pex7p, a peroxisomal protein import receptor: a minireview." Neurochem Res **24**(4): 581-6.

Purdue, P. E., Zhang, J. W., Skoneczny, M. & Lazarow, P. B. (1997). "Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor." Nat Genet **15**(4): 381-4.

Rabchevsky, A. G. & Streit, W. J. (1997). "Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth." J Neurosci Res **47**(1): 34-48.

Rachubinski, R. A. & Subramani, S. (1995). "How proteins penetrate peroxisomes." Cell **83**(4): 525-8.

Raivich, G. & Banati, R. (2004). "Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease." Brain Res Brain Res Rev **46**(3): 261-81.

Ramsey, R. B., Banik, N. L., Scott, T. & Davison, A. N. (1976). "Neurochemical findings in adreno-leukodystrophy." J Neurol Sci **29**(2-4): 277-94.

Reddy, J. K. & Mannaerts, G. P. (1994). "Peroxisomal lipid metabolism." Annu Rev Nutr **14**: 343-70.

Richardson, K. C., Jarett, L. & Finke, E. H. (1960). "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy." Stain Technol **35**: 313-23.

Robinson, B. H. (2000). "Human cytochrome oxidase deficiency." Pediatr Res **48**(5): 581-5.

Robitaille, Y. (2005). "Hereditary leukodystrophies without identified mutations." J Neurol Sci **228**(2): 208-9.

Rodemer, C., Thai, T. P., Brugger, B., Gorgas, K. & Just, W. (2003). "Targeted disruption of ether lipid synthesis in mice." Adv Exp Med Biol **544**: 355-68.

Roels, F. (2003). Peroxisomal Disorders and Regulation of Genes, Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.

Saher, G., Brugger, B., Lappe-Siefke, C., Mobius, W., Tozawa, R., Wehr, M. C., Wieland, F., Ishibashi, S. & Nave, K. A. (2005). "High cholesterol level is essential for myelin membrane growth." Nat Neurosci **8**(4): 468-75.

- Santos, M. J., Imanaka, T., Shio, H. & Lazarow, P. B. (1988). "Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts." J Biol Chem **263**(21): 10502-9.
- Sastry, P. S. (1985). "Lipids of nervous tissue: composition and metabolism." Prog Lipid Res **24**(2): 69-176.
- Schaumburg, H. H., Powers, J. M., Raine, C. S., Johnson, A. B., Kolodny, E. H., Kishimoto, Y., Igarashi, M. & Suzuki, K. (1976). "Adrenoleukodystrophy: a clinical, pathological and biochemical study." Adv Exp Med Biol **68**: 379-87.
- Schaumburg, H. H., Powers, J. M., Raine, C. S., Suzuki, K. & Richardson, E. P., Jr. (1975). "Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases." Arch Neurol **32**(9): 577-91.
- Scherer, S. S., Braun, P. E., Grinspan, J., Collarini, E., Wang, D. Y. & Kamholz, J. (1994). "Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development." Neuron **12**(6): 1363-75.
- Schiller, F. (1997). "A memoir of olfaction." J Hist Neurosci **6**(2): 133-46.
- Schutgens, R. B., Heymans, H. S., Wanders, R. J., van den Bosch, H. & Tager, J. M. (1986). "Peroxisomal disorders: a newly recognised group of genetic diseases." Eur J Pediatr **144**(5): 430-40.
- Schwartz, M. (2003). "Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful?" J Cereb Blood Flow Metab **23**(4): 385-94.
- Schwartz, M. & Kipnis, J. (2005). "Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases." J Neurol Sci **233**(1-2): 163-6.
- Sereda, M., Griffiths, I., Puhlhofer, A., Stewart, H., Rossner, M. J., Zimmerman, F., Magyar, J. P., Schneider, A., Hund, E., Meinck, H. M., Suter, U. & Nave, K. A. (1996). "A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease." Neuron **16**(5): 1049-60.
- Sicotte, N. L. & Voskuhl, R. R. (2001). "Onset of multiple sclerosis associated with anti-TNF therapy." Neurology **57**(10): 1885-8.
- Singh, I., Lazo, O., Dhaunsi, G. S. & Contreras, M. (1992). "Transport of fatty acids into human and rat peroxisomes. Differential transport of palmitic and lignoceric acids and its implication to X-adrenoleukodystrophy." J Biol Chem **267**(19): 13306-13.
- Singh, I., Moser, A. E., Moser, H. W. & Kishimoto, Y. (1984). "Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes." Pediatr Res **18**(3): 286-90.
- Skrandies, W. & Fahle, M. (1994). "Neurophysiological correlates of perceptual learning in the human brain." Brain Topogr **7**(2): 163-8.
- Smith, B. T., Sengupta, T. K. & Singh, I. (2000). "Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy." Exp Cell Res **254**(2): 309-20.
- Sobue, G., Ueno-Natsukari, I., Okamoto, H., Connell, T. A., Aizawa, I., Mizoguchi, K., Honma, M., Ishikawa, G., Mitsuma, T. & Natsukari, N. (1994). "Phenotypic heterogeneity of an adult form of adrenoleukodystrophy in monozygotic twins." Ann Neurol **36**(6): 912-5.

- Sorokin, S. P., Hoyt, R. F., Jr., Blunt, D. G. & McNelly, N. A. (1992). "Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker." Anat Rec **232**(4): 527-50.
- Steinberg, S. J., Kemp, S., Braiterman, L. T. & Watkins, P. A. (1999). "Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy." Ann Neurol **46**(3): 409-12.
- Stinissen, P., Raus, J. & Zhang, J. (1997). "Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies." Crit Rev Immunol **17**(1): 33-75.
- Streit, W. J. (2001). "Microglia and macrophages in the developing CNS." Neurotoxicology **22**(5): 619-24.
- Streit, W. J., Walter, S. A. & Pennell, N. A. (1999). "Reactive microgliosis." Prog Neurobiol **57**(6): 563-81.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. & Subramani, S. (1991). "A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase." Embo J **10**(11): 3255-62.
- Tabak, H. F., Murk, J. L., Braakman, I. & Geuze, H. J. (2003). "Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum." Traffic **4**(8): 512-8.
- Tamai, I. & Tsuji, A. (2000). "Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier." J Pharm Sci **89**(11): 1371-88.
- Terlecky, S. R. & Fransen, M. (2000). "How peroxisomes arise." Traffic **1**(6): 465-73.
- Theda, C., Moser, A. B., Powers, J. M. & Moser, H. W. (1992). "Phospholipids in X-linked adrenoleukodystrophy white matter: fatty acid abnormalities before the onset of demyelination." J Neurol Sci **110**(1-2): 195-204.
- Thomas, J., Debeer, L. J., De Schepper, P. J. & Mannaerts, G. P. (1979). "Relative contribution of mitochondria and peroxisomes to overall fatty acid oxidation in isolated hepatocytes [proceedings]." Arch Int Physiol Biochim **87**(2): 426-8.
- Toews, A. D., Armstrong, R., Ray, R., Gould, R. M. & Morell, P. (1988). "Deposition and transfer of axonally transported phospholipids in rat sciatic nerve." J Neurosci **8**(2): 593-601.
- Tolbert, N. E. (1981). "Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes." Annu Rev Biochem **50**: 133-57.
- Troffer-Charlier, N., Doerflinger, N., Metzger, E., Fouquet, F., Mandel, J. L. & Aubourg, P. (1998). "Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines." Eur J Cell Biol **75**(3): 254-64.
- Vahouny, G. V., Chanderbhan, R., Noland, B. J. & Scallen, T. J. (1984). "Cholesterol ester hydrolase and sterol carrier proteins." Endocr Res **10**(3-4): 473-505.
- Van Duyne, G. D. (2001). "A structural view of cre-loxp site-specific recombination." Annu Rev Phys Biol Struct **30**: 87-104.

van Geel, B. M., Assies, J., Haverkort, E. B., Koelman, J. H., Verbeeten, B., Jr., Wanders, R. J. & Barth, P. G. (1999). "Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil"." J Neurol Neurosurg Psychiatry **67**(3): 290-9.

van Oosten, B. W., Barkhof, F., Truyen, L., Boringa, J. B., Bertelsmann, F. W., von Blomberg, B. M., Woody, J. N., Hartung, H. P. & Polman, C. H. (1996). "Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2." Neurology **47**(6): 1531-4.

Vannucci, S. J., Maher, F. & Simpson, I. A. (1997). "Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia." Glia **21**(1): 2-21.

Voelker, D. R. (2003). "New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic." J Lipid Res **44**(3): 441-9.

Wanders, R. J. (2004). "Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders." Mol Genet Metab **83**(1-2): 16-27.

Wanders, R. J. & Romeijn, G. J. (1998). "Differential deficiency of mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase in patients with distinct defects in peroxisome biogenesis: evidence for a major role of peroxisomes in cholesterol biosynthesis." Biochem Biophys Res Commun **247**(3): 663-7.

Wanders, R. J., van Roermund, C. W., Schutgens, R. B., van den Bosch, H. & Tager, J. M. (1988). "Impaired ability of peroxisomes to activate very-long-chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy." Lancet **2**(8603): 170.

Waterham, H. R., Titorenko, V. I., Swaving, G. J., Harder, W. & Veenhuis, M. (1993). "Peroxisomes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* do not necessarily derive from pre-existing organelles." Embo J **12**(12): 4785-94.

Wekerle, H. (1993). "Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease." Curr Opin Neurobiol **3**(5): 779-84.

Wekerle, H. (1993). "T-cell autoimmunity in the central nervous system." Intervirology **35**(1-4): 95-100.

Wenger, D. A., Rafi, M. A., Luzi, P., Datto, J. & Costantino-Ceccarini, E. (2000). "Krabbe disease: genetic aspects and progress toward therapy." Mol Genet Metab **70**(1): 1-9.

Wilkinson, I. A., Hopkins, I. J. & Pollard, A. C. (1987). "Can head injury influence the site of demyelination in adrenoleukodystrophy?" Dev Med Child Neurol **29**(6): 797-800.

Williams, K., Ulvestad, E. & Antel, J. P. (1994). "B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ." Eur J Immunol **24**(12): 3031-7.

Wilson, R. & Sargent, J. R. (1993). "Lipid and fatty acid composition of brain tissue from adrenoleukodystrophy patients." J Neurochem **61**(1): 290-7.

Woodward, K. & Malcolm, S. (1999). "Proteolipid protein gene: Pelizaeus-Merzbacher disease in humans and neurodegeneration in mice." Trends Genet **15**(4): 125-8.

Xiao, B. G., Bai, X. F., Zhang, G. X., Hojeborg, B. & Link, H. (1996). "Shift from anti- to proinflammatory cytokine profiles in microglia through LPS- or IFN-gamma-mediated pathways." Neuroreport **7**(12): 1893-8.

Xiao, B. G., Diab, A., Zhu, J., van der Meide, P. & Link, H. (1998). "Astrocytes induce hyporesponses of myelin basic protein-reactive T and B cell function." J Neuroimmunol **89**(1-2): 113-21.

Yavin, E. & Gatt, S. (1972). "Oxygen-dependent cleavage of the vinyl-ether linkage of plasmalogens. 1. Cleavage by rat-brain supernatant." Eur J Biochem **25**(3): 431-6.

Yin, X., Crawford, T. O., Griffin, J. W., Tu, P., Lee, V. M., Li, C., Roder, J. & Trapp, B. D. (1998). "Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons." J Neurosci **18**(6): 1953-62.

Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Weiner, H. & Schwartz, M. (2001). "Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma." J Neurosci **21**(11): 3740-8.

Zoeller, R. A. & Raetz, C. R. (1986). "Isolation of animal cell mutants deficient in plasmalogen biosynthesis and peroxisome assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5170-4.

Ich möchte mich bedanken bei:

Klaus-Armin Nave für einige sehr geistreiche Diskussionen und außerdem dafür, dass er mir den Wechsel aus meiner Münchener Arbeitsgruppe so erleichterte.

Anne Régnier-Vigouroux für die Übernahme des Koreferates.

Hauke Werner vor allem für die Einladung nach Göttingen vor fast fünf Jahren und für das damalige Gespräch, indem er mir mein hiesiges Projekt so interessant vermittelte.

Ulli Bode, meiner ersten Anlaufstelle bei jeglichen Problemen und Problemchen im Labor.

Annette Fahrenholz für die unglaublich schnelle und zuverlässige Hilfe in der Histochemie.

Meinen Kooperationspartnern für ihr Interesse und Engagement an meinem Projekt.

Sandra Göbbels und allen übrigen Kollegen, die zu einer freundlichen und freundschaftlichen Atmosphäre beigetragen haben.