

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde  
der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H.-G. Lenard

Peroxisomenbiogenesedefekte:  
Klinische und molekulare Charakterisierung von Patienten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Natalie Preuß

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. Dieter Häussinger  
Dekan

Referentin: Univ.-Prof. Dr. Jutta Gärtner  
Korreferent: Prof. Dr. Peter Schadewaldt

## **DANKSAGUNG**

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Jutta Gärtner für ihre ständige motivierende Unterstützung und intensive Betreuung, die es mir möglich machten, wissenschaftliches Arbeiten kennenzulernen.

Herrn Prof. Dr. P. Schadewald danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Für die Zusendung von Patientenfibroblasten danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Conzelmann, Herrn Prof. Dr. med. C. Hübner, Herrn Prof. Dr. med. A. Kohlschütter, Herrn Prof. Dr. med. A. Roscher und Herrn Prof. Dr. med. T. Voit.

Bei Herrn Dr. med. G. Fricke, Herrn Prof. Dr. med. A. Kohlschütter und Herrn Dr. med. K. Sandig bedanke ich mich für die zur Verfügungstellung einzelner Patientendaten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie und der Urologie möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die spontane Hilfe im Laboralltag danken. Hervorheben möchte ich Dr. Marietta Wolter, deren kompetenten Ratschlägen ich jedesmal mit Freuden aufs Wort gehorchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor der Kinderklinik, meiner Labormama Dr. Ute Brosius, Martina Biermanns, Dr. Peter Roerig, Thomas Dehmel, Marco Henneke, Stefan Schönberger, Sabine Weller, Hendrik Rosewich, Markus Pattschull und Tanja Prick für das einmalige Arbeitsklima, ihre ständige Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden.

Für meine Oma und meine Eltern.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>LISTE VERWENDETER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Patienten mit Entwicklungsstörungen von Peroxisomen.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Material .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Kultivierung von Hautfibroblasten .....	12
2.3.2 Anlegen von Fibroblasten-Primärkulturen aus Hautbiopsien .....	13
2.3.3 Charakterisierung von Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung.....	13
2.3.4 Isolierung von genomischer DNS .....	14
2.3.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus Fibroblasten .....	14
2.3.4.2 Isolierung von genomischer DNS aus EDTA-Blut .....	15
2.3.4.3 Isolierung von genomischer DNS aus formalinfixierter Leber .....	15
2.3.5 Isolierung von DNS-Fragmenten .....	16
2.3.5.1 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen .....	16
2.3.5.2 Isolierung von DNS aus Polyacrylamidgelen .....	16
2.3.5.3 Aufreinigung von DNS-Fragmenten durch Säulenchromatographie ...	17
2.3.6 Isolierung von RNS.....	17
2.3.6.1 Isolierung von RNS aus Fibroblasten.....	17
2.3.6.2 Isolierung von RNS aus EDTA-Blut.....	17
2.3.7 Reverse Transkription von mRNS .....	18
2.3.8 Polymerasekettenreaktion .....	18
2.3.9 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNS-Fragmenten.....	19
2.3.10 Enzymatische Restriktion von DNS .....	20
2.3.11 Konformationspolymorphismen .....	20
2.3.12 Allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung (ASO) .....	21

2.3.13	Bestimmung von Nukleotidsequenzen.....	22
2.3.13.1	Radioaktive Sequenzierung.....	22
2.3.13.2	Cycle-Sequencing (ABI) .....	24
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>25</b>
3.1	Klinische Merkmale der Patienten.....	25
3.2	Mutationen im <i>PEX1</i> -Gen .....	28
3.3	Polymorphismen im <i>PEX1</i> -Gen .....	38
3.4	Allelfrequenz und Haplotyp-Assoziation im <i>PEX1</i> -Gen.....	38
3.5	Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	40
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
4.1	Peroxisomenbiogenesedefekte (PBD, Peroxisome Biogenesis Defects).....	47
4.2	Funktionelle Folgen von <i>PEX1</i> -Genmutationen .....	48
4.3	Entstehung von Mutationen im <i>PEX1</i> -Gen .....	53
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>57</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>65</b>

## LISTE VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A	Ampere
AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
ALD	Adrenoleukodystrophie
ASO	Allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
C	Cytosin
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG	Komplementierungsgruppe
Cy2	Carbocyanin
dATP	DesoxyATP
dCTP	DesoxyCTP
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
gDNS	genomische Desoxyribonukleinsäure
IMR	infantiler Morbus Refsum
kb	Kilobase(n), Kilobasenpaar(e)
kD	Kilo-Dalton
m	Milli
mRNS	messenger-/ Boten-Ribonukleinsäure
μ	Mikro
n	Nano
NALD	neonatale Adrenoleukodystrophie
p	Pico

P	Phosphat
PBD	Peroxisome Biogenesis Defects, Peroxisomenbiogenesedefekte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>PEX</i>	Peroxin-Gen
PEX	Peroxin-Protein
PTS1	Peroxisomal Targeting Sequence 1
PTS2	Peroxisomal Targeting Sequence 2
RCDP	Rhizomelia chondrodysplasia punctata
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Sodium Citrate buffer
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TC	Gewebekultur (tissue culture)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THCA	3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholestane-26-oic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin
U	Unit (Einheit des enzymatischen Umsatzes)
V	Volt
VLCFA	very long chain fatty acids, überlangkettige Fettsäuren
X-ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ZS	Zellweger Syndrom

# 1 EINLEITUNG

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieb der englische Sir Archibald Garrod die erste angeborene Stoffwechselerkrankung (Garrod 1908). Er hatte beobachtet, daß Patienten mit Alkaptonurie in großen Mengen Homogentisinsäure ausscheiden, die normalerweise nur in Spuren im menschlichen Urin vorkommt. Garrod stellte außerdem fest, daß die Erkrankung familiär gehäuft auftritt. Aus den Gesetzen von Gregor Mendel und den eigenen biochemischen Beobachtungen schloß Garrod, daß die Alkaptonurie autosomal vererbt wird und auf eine Änderung desjenigen Proteins zurückzuführen ist, das Homogentisinsäure abbaut. Garrod folgerte daraus, daß der Mensch neben seinem äußeren Erscheinungsbild (Phänotyp) eine chemische Individualität besitzt, die durch angeborene (Genotyp) und äußere Faktoren (Umwelt) bestimmt wird. Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken in den letzten beiden Jahrzehnten hat in eindrucksvoller Weise bestätigt, daß der Genotyp den Chemotyp und Phänotyp maßgeblich bestimmt. Die vorliegende Arbeit untersucht den Genotyp und Phänotyp von Patienten mit angeborenen Entwicklungsstörungen von Peroxisomen.

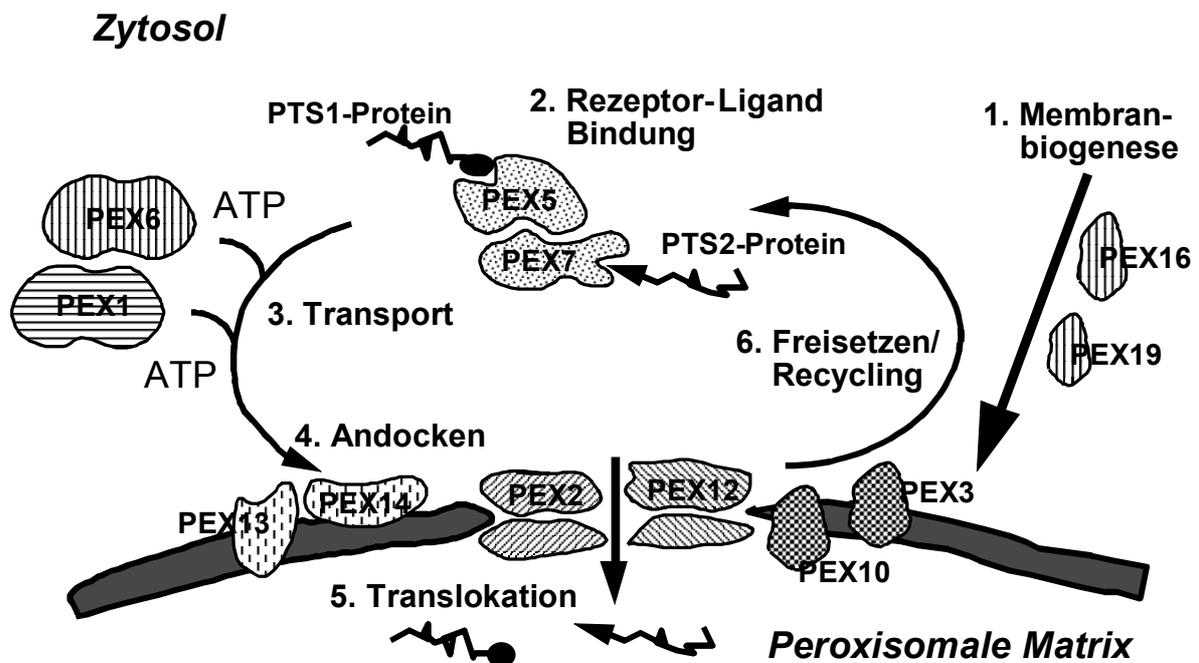
Die Geschichte peroxisomaler Erkrankungen beginnt 1954 mit der Erstbeschreibung von Peroxisomen. Rhodin beobachtete mit einem Elektronenmikroskop in Nierentubuluszellen von Mäusen zytoplasmatische Einschlüsse mit einer einfachen Membran und bezeichnete sie als „Microbodies“ (Rhodin 1954). De Duve und Mitarbeiter führten später den Begriff des „Peroxisoms“ für die funktionelle Einheit des Wasserstoffperoxidumsatzes ein und ersetzten damit die Bezeichnung „Microbody“ (De Duve 1965, De Duve und Baudhuin 1966). Peroxisomen kommen in allen menschlichen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten vor. Die Organellgröße, –häufigkeit und –form ist gewebespezifisch (Roels 1991). Leber- und Nierengewebe sind peroxisomenreich; das Organell ist rund und hat einen Durchmesser von 0,1 bis 0,5 µm. Fibroblasten und Amnionzellen enthalten nur einige wenige rundliche Peroxisomen mit einem Durchmesser von 0,1 bis 0,2 µm. Peroxisomen des Duodenalepithels sind wurmförmig (Roels 1991, Gould, Raymond und Valle 2001).

Das Peroxisom ist von einer einfachen Organellmembran umhüllt, in die verschiedene peroxisomenspezifische integrale Membranproteine eingebettet sind

(Suzuki et al. 1987, van den Bosch et al. 1992, Santos et al. 1994), daneben existieren membranassoziierte peroxisomale Proteine (James et al. 1994, Götte et al. 1998). Die Funktion peroxisomaler Membranproteine ist bislang weitgehend unbekannt. Die peroxisomale Matrix enthält mehr als 50 verschiedene Enzyme, die auf vielfältige Weise in die Stoffwechselforgänge der Zelle eingebunden sind (Gould, Raymond und Valle 2001). Neben den Enzymen für den Wasserstoffperoxidstoffwechsel enthält jedes Peroxisom ein eigenständiges  $\beta$ -Oxidationssystem, das sich vom mitochondrialen  $\beta$ -Oxidationssystem unterscheidet. Es ist verantwortlich für den Abbau von überlangkettigen Fettsäuren ( $>C_{22}$ ) (Kindl und Lazarow 1982, van den Bosch et al. 1992, Poulos 1995, Verhoeven et al. 1998). Andere katabole peroxisomale Stoffwechselfunktionen sind der Purin- und Aminosäureabbau, sowie der Abbau von Pipecolinsäure und von Phytansäure. Zu den anabolen peroxisomalen Funktionen gehören Schritte in der Synthese von Gallensäuren und Cholesterin, die Plasmalogenbiosynthese und die Gluconeogenese (Fahimi und Sies 1987, Gould, Raymond und Valle 2001). Bei gesunden Probanden erfolgt die Bildung neuer Peroxisomen in der Regel durch Teilung bereits bestehender Peroxisomen (Lazarow und Fujiki 1985). Peroxisomale Membran- und Matrixproteine werden im Zytoplasma an freien Polyribosomen synthetisiert und anschließend in die bereits bestehenden Peroxisomen transportiert (Lazarow et al. 1982, Fujiki et al. 1984). Die Erkennungssignale für den Import peroxisomaler Matrixproteine des Menschen sind ein Tripeptid (Serin-Lysin-Leucin, SKL und Varianten) am carboxyterminalen oder eine Gruppe von Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Proteins (Gould et al. 1988 und 1989, Swinkels et al. 1991 und 1992). Die carboxyterminale Erkennungssequenz wird auch PTS1 (Peroxisomal Targeting Sequence), das aminoternale Erkennungssignal auch PTS2 genannt. Die Erkennungssignale peroxisomaler Membranproteine sind weitgehend unbekannt. Anders als die PTS1- und PTS2-Signale der peroxisomalen Matrixproteine scheinen diese nicht auf einen kleinen Sequenzbereich beschränkt zu sein, sondern umfassen Proteindomänen (McCammon et al. 1994, Dyer et al. 1996, Elgersma et al. 1997, Landgraf et al. 1999). Aktuellere Untersuchungen weisen auch auf eine *de novo* Synthese von Peroxisomen hin (Waterham et al. 1993, South und Gould 1999). Die in die Bildung von Peroxisomen involvierten Proteine werden als Peroxine bezeichnet und von *PEX*-Genen kodiert. Komplementierungsstudien mit peroxisomendefizienten menschlichen Fibroblasten, chinesischen Hamster-

ovarialzellen und Hefezellen haben gezeigt, daß mindestens 16 Gene für die Entstehung menschlicher Peroxisomen bedeutend sind (Brul et al. 1988, Roscher et al. 1989, Mc Guinness et al. 1990, Gould, Raymond und Valle 2001). Abbildung 1 faßt das derzeitige Arbeitsmodell der Peroxisomenbiogenese zusammen. Die Bildung der peroxisomalen Membran ist weitgehend unverstanden, den Peroxinen PEX3 und PEX16 scheint hierbei eine Rolle zuzukommen. Die beiden zirkulierenden Rezeptorproteine PEX5 (PTS1-Rezeptor) und PEX7 (PTS2-Rezeptor) erkennen ihre jeweiligen PTS1- bzw. PTS2-Frachtproteine und binden diese. Der Rezeptor-Matrixprotein-Komplex dockt an die peroxisomale Membran an. Für diesen Prozeß werden die Peroxine PEX1 und PEX6 benötigt. An dem eigentlichen Transportvorgang von PTS1- und PTS2-Proteinen in die peroxisomale Matrix und der Wiedergewinnung der beiden PTS1- bzw PTS2-Rezeptoren sind Interaktionen zwischen unterschiedlichen peroxisomalen Membranproteinen notwendig, die bislang weitgehend unverstanden sind.

**Abbildung 1: Biogenese von Peroxisomen - hypothetisches Modell.**



Die vitale Bedeutung von Peroxisomen für das menschliche Stoffwechselnetzwerk zeigen autosomal-rezessiv und X-chromosomal vererbte Erkrankungen der Peroxisomen. Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen können in zwei Gruppen (I und II) eingeteilt werden.

In der Gruppe I werden Peroxisomen nicht oder nur sehr unvollständig gebildet. Defekte in mehreren peroxisomalen Stoffwechselwegen sind die Folge. Die zur Gruppe I gehörenden Erkrankungen sind das zerebrohepatorenale oder Zellweger Syndrom (ZS), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD), der infantile Morbus Refsum (IMR) und die Rhizomelia chondrodysplasia punctata (RCDP); sie werden als Peroxisome Biogenesis Defects (PBD) zusammengefaßt. In der Gruppe II liegt ein isolierter Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges bei ansonsten regelrechter Peroxisomenstruktur und -funktion vor. Zu den Erkrankungen der Gruppe II gehören die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD), die Hyperoxalurie Typ I, die Akatalasämie sowie der Oxidase-, Thiolase- und trifunktionale Enzymdefekt.

### **Tabelle 1: Einteilung peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen.**

#### **Gruppe I: Entwicklungsstörungen von Peroxisomen "Peroxisomenbiogenesedefekte (PBD)"**

Zellweger Syndrom  
atypisches Zellweger Syndrom („Pseudozellweger Syndrom“)  
neonatale Adrenoleukodystrophie  
infantiler Morbus Refsum  
Rhizomelia chondrodysplasia punctata

#### **Gruppe II: Isolierte Defekte peroxisomaler Stoffwechselwege**

X-chromosomale Adrenoleukodystrophie  
Morbus Refsum  
Hyperoxalurie Typ I  
Glutarazidurie Typ III  
andere

Der Prototyp der Erkrankungen der Gruppe I, der Peroxisome Biogenesis Defects (PBD) ist das Zellweger Syndrom (Gould, Raymond und Valle 2001). Die ersten Patienten mit Zellweger Syndrom wurden 1964 von Bowen und Mitarbeitern beschrieben (Bowen et al. 1964). Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und hat in Europa und den U.S.A. eine geschätzte Inzidenz von 1:100.000 bis 1:200.000 Neugeborenen. Die Patienten fallen durch ein typisches Gesicht mit flacher, hoher Stirn, tiefer Nasenwurzel, Hypertelorismus, Epikanthus, leicht mongoloider Lidachse, Mikrognathie und dysplastischen Ohrmuscheln auf (vergleiche Abbildungen 2 und 3).



**Abbildung 2: PBD-Patient mit Zellweger Syndrom.** Das Foto zeigt den Patienten N.K. im Alter von sechs Monaten. Man erkennt die für PBD-Patienten typische Facies mit flacher, hoher Stirn, tiefer Nasenwurzel, Hypertelorismus, Epikanthus, leicht mongoloider Lidachse und Mikrognathie.



**Abbildung 3: PBD-Patientin mit atypischem Zellweger Syndrom ("Pseudo-Zellweger Syndrom").**

Dieses Foto zeigt die Patientin J.S. im Alter von sechs Jahren. Sie weist ebenfalls die typischen Dysmorphiezeichen auf. Die Patientin ist schwerst psychomotorisch retardiert und blind, hat jedoch einige Fähigkeiten erlernt.

Sie haben neurologische Beschwerden wie allgemeine Muskelhypotonie, Hypo- und Areflexie, Trinkschwäche, Gedeihstörungen, Krampfanfälle und psychomotorische Retardierung. Weitere klinische Merkmale sind das Vorliegen von Nierenzysten und Leberveränderungen, außerdem findet man eine okuläre Beteiligung und Skelettveränderungen. Patienten mit dem klassischen Zellweger Syndrom versterben meist in den ersten sechs Lebensmonaten. Patienten mit neonataler Adrenoleukodystrophie, infantilem Morbus Refsum und Rhizomelia chondrodysplasia punctata haben dem Zellweger Syndrom ähnliche, jedoch weniger stark ausgeprägte biochemische Defekte und klinische Symptome. Die Überlebensdauer dieser Patienten beträgt mehrere Jahre. Zur biochemischen Diagnose werden neben der Bestimmung der Katalaseverteilung und Plasmalogenbiosynthese in Fibroblasten auch die Konzentration der überlangkettigen Fettsäuren (very long chain fatty acids, VLCFA), der Pipecolin- und Phytansäure im Plasma, sowie des Plasmalogens in Erythrozyten ermittelt. Patienten mit PBD können die meisten der im Zytoplasma synthetisierten peroxisomalen Matrixenzyme nicht in peroxisomenähnliche Vesikel importieren, die Matrixenzyme sind aber im Zytoplasma nachweisbar (Wanders et al. 1984 und 1985, Tager et al. 1985, Schram et al. 1986, Santos et al. 1988). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, daß die Ursache für PBD ein Fehler im Transportsystem peroxisomaler Matrixproteine ist und daß der Peroxisomenmembran eine Schlüsselrolle in diesem Prozeß zukommt. In Zellfusionierungsstudien mit Patienten-Fibroblasten konnten mindestens 16 Komplementierungsgruppen für PBD definiert werden (Moser et al. 1995, Brul et al. 1988). Ihre Defekte resultieren aus Mutationen in verschiedenen *PEX*-Genen. Die den einzelnen Komplementierungsgruppen zugeordneten *PEX*-Gendefekte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

**Tabelle 2: PEX-Gene und peroxisomale Stoffwechselerkrankungen.**

Gen-symbol	Protein-lokalisierung	Protein-familie	peroxisomale Erkrankung	Komplemen-tierungsgruppe	Referenz
<i>PEX1</i>	Zytopl.	ATPase	ZS, NALD, IRD	1	Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997
<i>PEX2</i>	px. Mb.	Zinkfinger	ZS	10	Shimozawa et al. 1992
<i>PEX3</i>	px. Mb.	unbekannt	ZS	12	Muntau et al. 2000, South et al. 2000
<i>PEX5</i>	Zytopl./px. Mb.	PTS1-Rezeptor	ZS, NALD	2	Dodt et al. 1995, Wiemer et al. 1995, Fransen et al. 1995
<i>PEX6</i>	Zytopl./px. Mb.	ATPase	ZS, NALD	4	Tsukamoto et al. 1995, Yahraus et al. 1996
<i>PEX7</i>	Zytopl./px. Mb.	PTS2-Rezeptor	RCDP	11	Braverman et al. 1997, Motley et al. 1997, Purdue et al. 1997
<i>PEX10</i>	px. Mb.	Zinkfinger	ZS, NALD	7	Warren et al. 1998
<i>PEX12</i>	px. Mb.	Zinkfinger	ZS, NALD	3	Chang et al. 1997, Okumoto et al. 1998
<i>PEX13</i>	px. Mb.	SH3-Domäne	NALD	13	Liu et al. 1999
<i>PEX16</i>	px. Mb.	unbekannt	ZS	9	Honsho et al. 1998, South and Gould 1999
<i>PEX19</i>	px. Mb.	Prenylierung	ZS	14	Matsuzono et al. 1999

px. Mb.: peroxisomale Membran, Zytopl.: Zytoplasma, ZS: Zellweger Syndrom, NALD: neonatale Adrenoleukodystrophie, IRD: infantiler Morbus Refsum, RCDP: Rhizomelia chondrodysplasia punctata

Patienten des Zellweger-Spektrums (ZS, NALD, IMR) verteilen sich auf mindestens zehn Komplementierungsgruppen. Mehr als die Hälfte aller PBD-Patienten konnte der Komplementierungsgruppe 1 zugeordnet werden. Mutationen im *PEX1*-Gen sind verantwortlich für Defekte in dieser Gruppe (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997, Collins and Gould 1999, Gärtner et al. 1999). Das *PEX1*-Gen kodiert ein 147 kD peroxisomales Protein, das zur Familie der ATPasen gehört (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997, Tamura et al. 1998). Die genaue Funktion des PEX1-Proteins im Rahmen der Peroxisomenbiogenese ist noch weitgehend unklar. Im Gegensatz zu Patienten des Zellweger-Spektrums fallen Patienten mit Rhizomelia chondrodysplasia punctata (RCDP) nur in die Komplementierungsgruppe 11; ihre Defekte resultieren ausschließlich aus Mutationen im *PEX7*-Gen.

Prototyp angeborener peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen der Gruppe II mit isoliertem Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges ist die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD) (Moser et al. 2001, Gärtner et al. 1998, Duboi-Dalcq et al. 1999). Der betroffene Stoffwechselweg ist die  $\beta$ -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren. Der erste Patient wurde 1921 von Siemerling und Creutzfeldt beschrieben. Es ist die häufigste peroxisomale Stoffwechselerkrankung mit einer Inzidenz von 1:15.000 – 1:40.000 männlichen Neugeborenen (van Geel et al. 1994, Moser 1997, Heim et al. 1997). Klinisch lassen sich vier Erkrankungsformen unterscheiden: 1. die kindliche cerebrale Form (kindliche Adrenoleukodystrophie), die etwa die Hälfte aller Patienten aufweisen, 2. die adulte Form (Adrenomyeloneuropathie), die etwa ein Drittel der Patienten betrifft, 3. eine Nebenniereninsuffizienz ohne neurologische Beschwerden (etwa ein Sechstel der Patienten) und 4. Patienten mit X-ALD, die weder eine Nebenniereninsuffizienz noch neurologische Symptome aufweisen. Die Diagnose der X-ALD wird durch die biochemische Bestimmung der Konzentration an überlangkettigen Fettsäuren gestellt, die als Folge des  $\beta$ -Oxidationsdefekts nicht abgebaut werden können. Die anderen Erkrankungen der Gruppe II werden autosomal-rezessiv vererbt und haben in Europa und den U.S.A. eine geschätzte Inzidenz von 1:100.000 Neugeborenen. Patienten mit Veränderungen der Oxidase, der Thiolase oder des trifunktionalen Enzyms zeigen dem Zellweger Syndrom ähnliche klinische Beschwerden und dysmorphe Veränderungen (Wanders, Barth und Heymans 2001). Patienten mit Hyperoxalurie Typ I fallen klinisch durch rezidivierende Nephrolithiasis und

Nephrocalcinose auf (Danpure 2001). Patienten mit Akatalasämie haben in der Regel keine klinischen Beschwerden (Eaton und Mouchou 1995). Die Diagnose wird durch die biochemische Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität oder der Konzentration an Substanzen gestellt, die als Folge des isolierten Defekts in einem peroxisomalen Stoffwechselweg nicht abgebaut werden können. Die primären Ursachen einiger Erkrankungen der Gruppe II konnten in biochemischen und molekulargenetischen Studien bereits aufgeklärt werden. Veränderungen in dem für den jeweiligen Stoffwechselweg notwendigen Enzym wurden für die Hyperoxalurie Typ I, die Akatalasämie sowie den Oxidase- und Thiolasemangel nachgewiesen (Wanders, Barth und Heymans 2001, Danpure 2001, Eaton und Mouchou 1995). Alle Patienten mit X-ALD weisen Mutationen im *ALD*-Gen auf, das für ein 75 kD integrales peroxisomales Membranprotein kodiert (Mosser et al. 1993). Als primäre Ursache der X-ALD wird ein Fehler im Importmechanismus peroxisomaler Bestandteile angenommen, die in die  $\beta$ -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren involviert sind (Aubourg et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Peroxisomenbiogenesedefekten, die dem Zellweger-Spektrum zugeordnet werden konnten, auf mögliche Mutationen im *PEX1*-Gen untersucht. Das klinisch-biochemische Erscheinungsbild der Patienten wurde anschließend den Mutationen gegenübergestellt. Dabei konnte eine Genotyp-Phänotyp Korrelation, jedoch keine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischen Merkmalen festgestellt werden.



## **2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patienten mit Entwicklungsstörungen von Peroxisomen**

Sechzehn Patienten deutscher, türkischer oder schweizer Herkunft mit dem klinischen Bild einer Entwicklungsstörung von Peroxisomen (Peroxisome Biogenesis Defects, PBD) wurden untersucht. Die folgenden Daten wurden für die klinische Charakterisierung der Patienten herangezogen: Überlebenszeit, Dysmorphiezeichen (große Fontanelle, weite Schädelnähte, flache und hohe Stirn, breite Nasenwurzel, Hypertelorismus, leicht mongoloide Lidachse, Epikanthus, Mikrognathie, dysplastische Ohrmuscheln), cerebrale, okuläre und hepatorenale Auffälligkeiten sowie Veränderungen am Skelettsystem. Die biochemische Charakterisierung der Patienten umfaßte Untersuchungen der Peroxisomenfunktion, wie die Konzentration der überlangkettigen Fettsäuren (very long chain fatty acids, VLCFA) und der Phytansäure, die partikuläre Verteilung der Katalase und die Plasmalogenbiosynthese. Die Bestimmung der Konzentration der VLCFA und der Phytansäure im Plasma sowie der Plasmalogenbiosynthese in Fibroblasten wurde im Rahmen der Routinediagnostik in den Laboratorien von Prof. Dr. rer. nat. E. Conzelmann, Würzburg, Dr. D.H. Hunneman, Göttingen, Prof. Dr. med. A. Roscher, München oder Dr. R.J.A. Wanders, Amsterdam durchgeführt. Die molekulargenetische Charakterisierung des *PEX1*-Gens erfolgte mittels cDNS oder genomischer DNS aus EDTA-Blut und/oder Fibroblasten der Patienten. Zur molekulargenetischen *PEX1*-Genanalyse der Eltern und Verwandten von Patienten und von gesunden Probanden wurde genomische DNS aus EDTA-Blut verwendet.

### **2.2 Material**

Chemikalien wurden, wenn nicht als versuchsspezifische Materialien gesondert aufgeführt, von den folgenden Firmen in höchstmöglichem Reinheitsgrad bezogen: Merck, Darmstadt, Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Biochrom KG, Berlin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Serva, Heidelberg, Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich. Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech, Ebersberg bezogen. Elektrophoresen wurden in Gelkammern von Gibco BRL GmbH, Eggenstein, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen und Owl Scientific, Woburn, U.S.A. durchgeführt.

Für photometrische Messungen wurde das UVIKON Spectrophotometer 922, Kontron Instruments, Neufahrn und für die Zentrifugation Geräte der Firmen Eppendorf, Hamburg und Beckmann, Klosterneuburg verwendet.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Kultivierung von Hautfibroblasten**

Materialien: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco BRL, Eggenstein)  
Fetales Kälberserum (Seromed Biochrom KG, Berlin)  
N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin-Lösung (Seromed Biochrom KG, Berlin)  
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Seromed Biochrom KG, Berlin)  
PBS-Dulbecco (Seromed Biochrom KG, Berlin)  
Trypsin-EDTA-Lösung (Seromed Biochrom KG, Berlin)

Die Hautfibroblasten wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (56°C, 30 Minuten), 2 mM L-Glutamin und jeweils 100 U/ml Penicillin und Steptomycin supplementiert war, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die adhärent wachsenden Fibroblasten wurden in einem Abstand von sieben Tagen mit einer Lösung aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in einem Verhältnis von 1:2 passagiert. Für die Kryokonservierung wurden die trypsinisierten Zellen einer bis zur Konfluenz bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche bei 500 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Einfriermedium (60% Medium, 8% Dimethylsulfoxid (DMSO), 32% fetales Kälberserum) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden eine Stunde bei einer Temperatur von -20°C vorgekühlt, über Nacht bei -80°C inkubiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

### 2.3.2 Anlegen von Fibroblasten-Primärkulturen aus Hautbiopsien

Materialien: vgl.: 2.3.1

Die humanen Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien kultiviert. Die Hautbiopsie wurde unter sterilen Bedingungen in einer TC-Petrischale (Durchmesser: 94 mm) mit Hilfe eines Skalpells in möglichst kleine Stücke ausgekratzt und mit 12 ml Vollmedium (vgl.: 2.3.1) versetzt. Die ausgekratzte Biopsie wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für ca. zehn Tage inkubiert. Die kultivierten, adhärent gewachsenen Fibroblasten wurden mittels einer Lösung aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA abgelöst, in Zellkulturflaschen überführt und unter den üblichen Wachstumsbedingungen (vgl.: 2.3.1) bis zur Konfluenz inkubiert und alle sieben Tage im Verhältnis 1:2 passagiert.

### 2.3.3 Charakterisierung von Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung

Materialien: Katalase-Antikörper (Bioscience Resource Project, Kennenbunk, U.S.A.)  
Cy2-konjugiert (Dianova, Hamburg) oder  
TRITC-konjugiert (Dianova, Hamburg)

Menschliche Hautfibroblasten wurden auf 2 cm<sup>2</sup> Deckgläschen unter den üblichen Wachstumsbedingungen in einer Petrischale (Durchmesser: 94 mm) kultiviert (vgl.: 2.3.1.). Die bewachsenen Deckgläschen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und bei Raumtemperatur mit 10 ml 3%igem Formaldehyd in PBS für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und ihre Zellmembran wurde durch fünfminütige Inkubation in 10 ml 1%iger Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen eines Deckgläschens für 20 bis 60 Minuten mit 50 µl (1 µg/ml) eines peroxisomenspezifischen, gegen Katalase gerichteten Antikörpers inkubiert. Die Zellen eines jeden Deckgläschens wurden zehnmal mit PBS gewaschen und dann für 20 bis 60 Minuten mit 50 µl (25 µg/ml) des mit Rhodamin oder mit Fluorescein markierten, gegen den ersten Antikörper gerichteten, zweiten Antikörpers inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde wahlweise Cy2-konjugiert (grüne Fluoreszenz) oder TRITC-konjugiert (rote Fluoreszenz) benutzt. Die bewachsene Seite der

Deckgläschen wurde zwölfmal mit PBS gespült und in 3 bis 6 µl einer frisch angesetzten Konservierungslösung (0,1% p-Phenylendiamin, 0,1 M Tris/HCl, pH 8.5 in Glycerin) auf Objektträger aufgelegt. Bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erschienen die durch die Antikörper nachgewiesenen, mit Peroxisomen assoziierten Proteine als Punkte, die in der Farbe des gewählten Fluorochroms leuchteten. Die nicht mit Peroxisomen assoziierten Proteine ergaben eine homogene Anfärbung des Zytoplasmas.

### 2.3.4 Isolierung von genomischer DNS

Die Isolierung genomischer DNS erfolgte sowohl aus EDTA-Blut als auch aus kultivierten Hautfibroblasten. Hierzu wurden folgende autoklavierte Lösungen verwendet:

Lösung A:	10 mM Tris-HCl	Lösung B:	400mM Tris-HCl, pH 8,0
	320 mM Sucrose		60 mM EDTA
	5 mM MgCl <sub>2</sub>		150 mM NaCl
	1% TritonX-100		1% SDS
	pH 8,0		

Lösung C: 5M Natriumperchloratlösung

#### 2.3.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus Fibroblasten

Die konfluent gewachsenen Zellen einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden abgelöst (vgl.: 2.3.1) und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml Lösung B resuspendiert, um die kernhaltigen Zellen zu lysieren. Nach Zugabe von 500 µl Lösung C wurde die Probe über 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 25 Minuten bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Extraktion der genomischen DNS wurden 2 ml Chloroform (-20°C) zu dem Zellysate gegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 800 x g zentrifugiert. Für die DNS-Fällung wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in 6 ml 98%

Ethanol (-20°C) überführt. Das DNS-Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und 15 Minuten getrocknet. Das Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer (1 mM Na-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentration und die Reinheit der genomischen DNS wurden über die photometrische Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt.

Genomische DNS aus konfluent wachsenden Fibroblasten einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche (ca. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen) wurde außerdem mit dem Qiagen Dneasy Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

#### 2.3.4.2 Isolierung von genomischer DNS aus EDTA-Blut

Zur DNS-Extraktion aus Blut wurden zunächst die kernhaltigen Zellen aus dem Vollblut präpariert. Hierzu wurden 5 bis 10 ml EDTA-Blut mit 40 ml Lösung A versetzt und 4 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Erythrozytenlysat wurde von den kernhaltigen Zellen durch 10 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1300 x g getrennt und als Überstand abgenommen. Das in diesem Schritt gewonnene Leukozytenpellet (ca. 35 x 10<sup>6</sup> Zellen) wurde zur besseren Reinigung erneut mit Lösung A versetzt und abzentrifugiert. Die Leukozyten-Lyse mit 2ml Lösung B und die nachfolgenden Extraktionsschritte wurden analog der oben beschriebenen Methode durchgeführt.

Genomische DNS aus EDTA-Blut in kleinen Mengen wurde auch mittels des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert.

#### 2.3.4.3 Isolierung von genomischer DNS aus formalinfixierter Leber

Etwa 500 mg bis 1 g Lebergewebe wurde in 1 ml Homogenisationslösung (100 mM NaCl, 10 mM TRIS pH, 7,6, 10 mM EDTA, 1% SDS und 100 µg/ml Protease K) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 60 Minuten bei 56°C erhitzt und danach für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Die DNS wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-fällung gewonnen. Dazu wurde das Leberhomogenat 1:1 (v/v) mit equilibriertem Phenol (pH 8,0) versetzt, geschüttelt und für 2 Minuten bei 2000 g und Raumtemperatur zentrifugiert; mit der oberen Phase

wurden die gleichen Schritte dann mit einem 1:1-Gemisch aus equilibriertem Phenol und Chloroform und zuletzt mit 1 ml Chloroform durchgeführt. Für die Fällung der DNS wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit einer Lösung aus 1/5-Volumen 7,5 M Ammonium-Acetat und 2,5 fachen Volumen 98%igen Ethanol (-20°C) versetzt und entweder über Nacht bei -20°C oder 2h bei -80°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 bis 10 Minuten bei 2000 g wurde das Pellet in Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Die DNS wurde in 50-300 µl TE-Puffer (1 mM Na-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentration und die Reinheit der genomischen DNS wurden über die photometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt.

## 2.3.5 Isolierung von DNS-Fragmenten

### 2.3.5.1 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Materialien: QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Die Isolierung von DNS-Fragmenten zwischen 100 bp und 500 bp wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 70 bis 80% der in der Agarose enthaltenen DNS wurden zurückgewonnen.

### 2.3.5.2 Isolierung von DNS aus Polyacrylamidgelen

Die ausgeschnittenen Gelstücke der gewünschten DNS-Fragmente wurden in 100 µl destilliertem Wasser 5 Minuten bei 99°C gekocht und über Nacht bei 4°C gelöst.

1 bis 4 µl der Suspension wurden mit der Polymerasekettenreaktion reamplifiziert und das erhaltene Amplifikationsprodukt wurde anschließend sequenziert.

### 2.3.5.3 Aufreinigung von DNS-Fragmenten durch Säulenchromatographie

Materialien: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Die Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Polymerasekettenreaktionansätzen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers.

### 2.3.6 Isolierung von RNS

Materialien: Qiagen Rneasy-Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Qiagen Rneasy Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

#### 2.3.6.1 Isolierung von RNS aus Fibroblasten

Die Präparation von RNS aus konfluent wachsenden Fibroblasten einer 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der RNS wurde photometrisch bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt.

#### 2.3.6.2 Isolierung von RNS aus EDTA-Blut

Zur Gewinnung von zellulärer RNS aus Vollblut wurde der RNeasy Blood Mini Kit eingesetzt. Das Präparationsprotokoll entsprach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der RNS wurde photometrisch bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt.

### 2.3.7 Reverse Transkription von mRNS

Materialien: Oligo(dT)<sub>15</sub> (Boehringer, Mannheim)  
Superscript™ II RNase H<sup>-</sup>Reverse Transcriptase (Gibco BRL,  
Gaithersburg, U.S.A.)

Die RNS-Transkription wurde mit Hilfe von Superscript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. 2 bis 5 µg zellulärer RNS wurden mit 100 ng Oligo dT<sub>15</sub> in RNase-freiem Wasser zu 16 µl gelöst. Nach Überschichtung der Probe mit 40 µl Mineralöl wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch Zufügen von 6 µl 5x Puffer (250 mM Tris-HCl [pH 8.3 bei Raumtemperatur], 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 µl DTT (0,1 M), 1,5 µl dNTPs (10 mM) und 2 µl Superscript II (200 U/µl) eingeleitet und für 60 Minuten bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Die cDNS wurde bei -20°C gelagert. Für eine Polymerasekettenreaktion wurden 2 bis 4 µl der auf diese Weise erhaltenen cDNS-Probe eingesetzt.

### 2.3.8 Polymerasekettenreaktion

Materialien: PrimeZyme™ DNA Polymerase Kit (Biometra, Göttingen)

Die Amplifikation der genomischen DNS bzw. cDNS erfolgte mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotiden mit einer Länge von 17-21 bp. Die Fragmentlänge aller PCR-Produkte lag zwischen 180 und 345 bp. Die Tabellen I bzw. II im Anhang zeigen die für die Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNS bzw. *PEX1*-cDNS verwendeten Oligonukleotide. In 25µl Reaktionsansatz (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,04 U/µl DNA Polymerase, 400µM dNTP, 2% Formamid) wurden 200 ng genomischer DNS bzw. 50 bis 100 ng der cDNS mit jeweils 50 pmol des 5'- und 3'- Oligonukleotids versetzt. Die Ansätze wurden mit 40 µl Mineralöl überschichtet und in einem DNS Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer GmbH Ueberlingen) bzw. einem Trio-Thermoblock der Firma Biometra Göttingen folgendermaßen inkubiert:

1 Zyklus	94°C	3 Minuten
30 Zyklen	94°C	1 Minute (Denaturierung)
	47-60°C*	1 Minute (Primer-Anlagerung)
	72°C	1 Minute (Primer-Verlängerung)
1 Zyklus	72°C	3 Minuten
	4°C	∞

Die mit \* angeführten Temperaturen entsprechen der Spannbreite der T<sub>m</sub>-Werte der Oligonukleotide. Für die einzelnen Oligonukleotid-Paare wurde eine individuell optimale Annealingtemperatur ermittelt (vgl.: Tabellen I und II im Anhang).

Die Charakterisierung der PCR-Produkte erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden.

### 2.3.9 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNS-Fragmenten

Materialien: Qualex-Gold-Agarose (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)  
123 bp DNA Ladder (Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.)

5 µl des zu trennenden DNS-Fragmentgemisches wurden mit 2 µl Blaumarker (30% Glycerin, 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau) versetzt und auf ein 0,8-2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Prozentigkeit des Gels wurde in Abhängigkeit von der Größe der DNS-Fragmente und den Anforderungen an die Qualität der Auftrennung gewählt. Die Elektrophorese wurde bei 200 mA mit maximal 100 V in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na-EDTA, pH 8,0) für ca. 30-60 Minuten durchgeführt. Als DNS-Längenstandard wurde die 123 bp-Leiter verwendet. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte durch eine 5 bis 20-minütige Inkubation des Agarosegels in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) und nachfolgende Anregung des interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht bei 254 oder 365 nm (UV-Transluminator GE-FLX-20L, Firma AGS, Heidelberg). Das spezifische Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Polaroid-Kamera-Systems (DS-34) der Firma AGS Heidelberg photographisch dokumentiert.

### 2.3.10 Enzymatische Restriktion von DNS

Materialien: Restriktionsendonuklease PST I (Boehringer, Mannheim)

Für die Restriktion wurden DNS-Fragmente in dem für die eingesetzte Endonuklease geeigneten Puffer H aufgenommen und mit einem 2 bis 3-fachen Enzymüberschuß (2-3 U/ $\mu$ g DNA) für mindestens 60 Minuten bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 80°C denaturiert. Die Charakterisierung der Restriktionsprodukte erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden.

### 2.3.11 Konformationspolymorphismen

Materialien. 30% PAA, 29:1 (Bio-rad Laboratories GmbH, München)  
GelBond PAG (Firma Biozym, Oldendorf)

Für die SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)-Untersuchung wurden mittels der Polymerasekettenreaktion amplifizierte Fragmente genomischer DNS und cDNS mit einer Länge von 180 bis 345 bp eingesetzt. Die Durchführung der SSCP erfolgte nach einer modifizierten Methode von Orita und Mitarbeitern (1989). Das Prinzip der SSCP beruht auf einem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von DNS-Einzelsträngen denaturierter PCR-Produkte, das von ihrer dreidimensionalen Konformation oder Sekundärstruktur abhängig ist. Eine unterschiedliche Primärstruktur bzw. Sequenz beeinflusst die Konformation und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Einzelstränge in der Polyacrylamid-gelelektrophorese. Somit können mit Hilfe der SSCP DNS-Fragmente detektiert werden, die aufgrund von Mutationen oder Polymorphismen ein anderes Laufverhalten zeigen als Kontrollfragmente. 4 bis 8  $\mu$ l PCR-Produkt wurden mit 4  $\mu$ l Ladepuffer (0,25 mg Brohmphenolblue- Xylencyanol, 74% Formamid) versetzt und für 3 bis 5 Minuten bei 94°C hitzedenaturiert. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel mit einer Dicke von 0,45 mm (10% Acrylamid:Bisacrylamid 29:1, 3M Urea, 1x TBE (89 mM Tris HCl, 89 mM Borsäure, 2,5 mM Na-EDTA) aufgetragen, welches zur Vereinfachung der Handhabung bei der Färbung auf GelBond PAG-Folie gegossen wurde. Zur Steigerung der Detektionsrate wurde bei einigen SSCP-Untersuchungen der Gelmatrix 5% Glycerin zugefügt (Nataraj et al.

1999). Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Laufpuffer bei 180-220 V und 4°C Umgebungstemperatur für 18 bis 24 Stunden. Zum Nachweis der Nukleinsäuren wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Das Gel wurde in einer Lösung aus 10% Ethanol und 1% Eisessig für mindestens 20 Minuten fixiert, 30 Minuten in einer 0,15%igen Silbernitratlösung gefärbt und daraufhin zweimal mit Aqua dest gewaschen. Anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Farbintensität (10 bis 15 Minuten) in Entwickler (0,5% Formaldehyd, 1,5% NaOH) gelegt und für weitere 5 Minuten in 0,75% Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. Die gefärbten Gele wurden in Klarsichtfolie eingeschweißt und durch Vergleich der Bandenmuster zwischen Kontrollen und Patienten ausgewertet. Die PCR-Produkte, deren Einzelstränge ein auffälliges Wanderungsmuster zeigten, wurden direkt bzw. als amplifiziertes Geleluat (vgl.: 2.3.5) sequenziert.

### 2.3.12 Allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung (ASO)

Materialien: Hybond N<sup>+</sup>-Membran (Amersham, Braunschweig)

T4 Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus)

TE Midi Select-D, G-25-Säule (5 Prime→ 3 Prime, Inc. Boulder, U.S.A.)

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP (Hartmann Analytic, Braunschweig)

Oligonukleotide wurden für Regionen des *PEX1*-Gens erstellt, in denen Mutationsereignisse bei Patienten mit PBD nachgewiesen worden waren und die einer ASO unterzogen werden sollten (siehe Tabelle III und IV im Anhang). DNS Fragmente der entsprechenden Regionen wurden aus genomischer DNS und cDNS von Patienten und gesunden Probanden amplifiziert. 10 µl Amplifikationsprodukt wurden mit 100 µl Denaturierungslösung (0,4 N NaOH, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA) versetzt und in einem Dot-Blotter nach den Angaben des Herstellers auf Hybond N<sup>+</sup>-Membran übertragen. Die Membran wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet und vor der radioaktiven Hybridisierung in einem Stratalinker UV Crosslinker Modell 1800 der Firma Stratagene Heidelberg, für 60 Sekunden bei 254 nm bestrahlt. Oligonukleotide wurden zur Identifizierung der gewünschten Banden auf einem Dot Blot als Sonden eingesetzt und nach der Methode von Orkin und Mitarbeitern (1983) mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP endständig markiert. Die Blot-Membranen wurden für eine Stunde in

0,3 ml/cm<sup>2</sup> einer Lösung aus 1% SDS, 1 M NaCl und 10% Dextransulfat bei einer Temperatur, die 2°C unter dem T<sub>m</sub>-Wert des jeweils verwendeten Oligonukleotids lag, prähybridisiert. Es wurden 2 µl (25 pmol/µl) der Oligonukleotide mit 3 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP (0,4 Mbq/µl), 1,5 µl (10 U/µl) T4 Polynukleotid-Kinase und 2,1 µl 10x T4 Polynukleotid Kinase-Puffer (0,7 M Tris/HCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, pH 7.6) in einem Gesamtvolumen von 21 µl für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit Aqua dest zu 50 µl aufgefüllt und über eine TE Midi Select-D G-25-Säule gefiltert und somit von den nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden weitgehend befreit. Die so erhaltene markierte Probe wurde zu der in der Prähybridisierungslösung befindlichen Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte analog der Prähybridisierung für mindestens eine Stunde. Die Membranen wurden anschließend in einer Lösung aus 2x SSC (300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat) und 0,1% SDS zweimal kurz bei Raumtemperatur und einmal für 10 Minuten bei einer Temperatur gewaschen, die dem T<sub>m</sub>-Wert des verwendeten Oligonukleotids entsprach. Die Membranen wurden dann für 2 bis 48 Stunden mit einem Kodak X-OMAT MR-Film und einer Verstärkerfolie bei –80°C exponiert.

## 2.3.13 Bestimmung von Nukleotidsequenzen

### 2.3.13.1 Radioaktive Sequenzierung

Materialien: Sequenase PCR Product Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, U.S.A.)

Sequencing Mix (Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.)

Glycerol Tolerant Gel Buffer (USB Corporation, Cleveland, U.S.A.)

<sup>35</sup>S-dATP (Hartmann, Braunschweig)

40% Acrylamid-Bisacrylamid Solution 19:1 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

3 mm-Filterpapier (Whatman International Ltd, Maidstone, England)

KODAK BioMax MR Film (Eastman KODAK Company, Rochester, U.S.A.)

Jeweils 5 µl eines zuvor über ein Agarosegel charakterisierten (vgl.:2.3.9) PCR-Ansatzes bzw. 7µl eines isolierten DNS-Fragmentes (vgl.: 2.3.5) wurden nach der

Kettenabbruchmethode (Sanger und Mitarbeiter 1977) direkt sequenziert. Durch den Einsatz von Alkalischer Phosphatase und Exonuklease I erfolgte der Abbau überschüssiger dNTPs und Oligonukleotide, daher konnten die PCR-Produkte direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. 5 µl des PCR-Produkts wurden zunächst mit 2 U Alkalischer Phosphatase und 10 U Exonuklease I versetzt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme 15 Minuten bei 80°C inaktiviert. Für die aus Agarosegelen isolierten DNS-Fragmente entfiel der enzymatische Abbau von Oligonukleotiden und dNTPs, die Proben wurden lediglich mit Mineralöl überschichtet. Die Ansätze wurden mit je 50 pm Oligonukleotid versetzt, für 5 bis 7 Minuten bei 99°C hitzedenaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Für die radioaktive Markierung wurden 10 µl der vorbehandelten Probe in einem Reaktionsansatz mit 2 µl Sequenase-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM NaCl), 1µl DTT (0,1 M), 2 µl Labeling-Mix (jeweils 1,5 µM dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl α-<sup>35</sup>S-dATP (5 µCi) und 2µl Sequenase 2,0 (1,6 U/µl) versetzt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die nachfolgende Sequenzierreaktion wurden 3,5 bis 4 µl der markierten Probe mit jeweils 2,5 µl der auf 42°C vorgewärmten vier Terminations-Ansätze (8 µM ddNTP A,C,G oder T; jeweils 80 µM dGTP, dATP, dCTP, dTTP; 50 mM NaCl) gemischt und 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Hierbei führen die in den Terminations-Ansätzen jeweils einzeln vorhandenen Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP bzw. ddTTP zum spezifischen Kettenabbruch. Durch Zugabe von 4,5 µl Stop-Lösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol) wurden die einzelnen Reaktionen abgebrochen. Die Lagerung der Reaktionsansätze erfolgte bei -20°C. Die Proben wurden in Polyacrylamidgelen (6% Acrylamid:Bisacrylamid 19:1, 7 M Harnstoff, 1x Glycerol Tolerant Gel Puffer: 1,08% Tris, 0,36% Taurin, 0,02% NaEDTA, 0,06% APS, 0,03% TEMED) von 0,4 mm Dicke in 0,8x Glycerol tolerantem Gelpuffer bei 70 W über 1 bis 5 Stunden in einer S2-Kammer der Firma Gibco Karlsruhe aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 15 Minuten in einer Lösung aus 5% Essigsäure und 5% Ethanol fixiert, auf ein Whatman-Filterpapier übertragen und 1 bis 2 Stunden bei 80°C auf einem Geltrockner der Firma AGS, Heidelberg unter Vakuum getrocknet. Schließlich wurde es für 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur auf einen Röntgenfilm gelegt und in einer DuPont Cronex TD-Apparatur entwickelt.

Die abgebildete Sequenz wurde anhand der Lauflänge der verschiedenen Fragmente bestimmt.

### 2.3.13.2 Cycle-Sequencing (ABI)

Materialien: DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Die nicht-radioaktive Sequenzierung wurde nach der „Dye-Terminator“-Methode durchgeführt. Dabei werden in einer „Cycle“-Sequenzierreaktion mit Hilfe des „Dye-Terminator“-Sequenzierkits (ABI) fluoreszierende Nukleotide eingebaut; die verschiedenen Nukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 7,5 µl der isolierten DNS-Fragmente (vgl.: 2.3.5) mit 5 bis 12.5 pmol Primer und 2 µl Premix versetzt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierreaktion wurde dann in einem Trio-Thermalblock (Biometra, Göttingen) mit dem folgenden Programm durchgeführt:

25 Zyklen: 96°C 10 Sekunden (Denaturierung)  
50°C 5 Sekunden (Primer-Anlagerung)  
60°C 4 Minuten (Primer-Verlängerung)  
4°C ∞

Die Aufbereitung der Proben erfolgte mittels Natriumacetat-Ethanol-Fällung. Hierzu wurde die komplette Probe der Sequenzierreaktion mit 1µl 3 M Na-Acetat (ph 4,6) und 25 µl 95% Ethanol versetzt, gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde 30 Minuten bei 4°C und 14000 rpm (Hettich Zentrifuge EBA12R) zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 µl 70% Ethanol. Die Pellets wurden bei 37°C ca. 30 Minuten lang getrocknet und in 3,5 µl Auftragspuffer (80% Formamid, 5 mM EDTA ph 8,0, 5% Dextranblau) resuspendiert. Jeweils 1,8-2,2µl wurden anschließend auf ein ABI-Sequenziergel aufgetragen. Die Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktionen erfolgte auf 5%igen Polyacrylamidgelen (7 M Harnstoff) mit Hilfe des automatischen Sequenziergerätes ABI 377.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Klinische Merkmale der Patienten

Es wurden 29 Patienten deutscher, türkischer und schweizer Herkunft untersucht. 16 dieser Patienten wurden durch routinemäßige Komplementierungsanalysen in unserem Labor der Komplementierungsgruppe 1 (CG1) zugeordnet, deren primäre Ursache Veränderungen im *PEX1*-Gen sind.

Tabelle 3 zeigt die klinischen Merkmale von Patienten der Komplementierungsgruppe 1. Die biochemischen Daten der Patienten der Komplementierungsgruppe 1 wurden in Tabelle 4 zusammengefaßt. Es wurden im Plasma der Patienten folgende Parameter bestimmt: die Konzentration der überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA), der Phytansäure und der Vorstufenprodukte der Gallensäuresynthese (THCA,  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihydroxy- $5\beta$ -cholestane-26-oic acid). In kultivierten Fibroblasten der Patienten wurden ebenfalls die Konzentrationen der VLCFA sowie Schritte der Plasmalogenbiosynthese und die partikuläre Katalase bestimmt. Alle Patienten zeigten eine Erhöhung der VLCFA im Plasma und in den Fibroblasten. Es konnte ebenfalls eine gesteigerte Phytansäure- und Gallensäuremetabolitenkonzentration im Plasma gemessen werden. In Fibroblasten wurde eine verminderte Plasmalogenbiosyntheserate bei allen Patienten gefunden. Ebenso war die partikuläre Katalase in den Fibroblasten aller untersuchter Patienten erniedrigt. Bei drei der 16 PBD-Patienten ergaben die Katalasefärbungen der kultivierten Patientenfibroblasten ein Mosaik, d.h. in einer Hälfte der Zellen war, bedingt durch die überwiegend intraperoxisomal gelegene Katalase ein punktförmiges Färbemuster nachweisbar, in der anderen Hälfte der Zellen zeigte sich ein homogenes Färbemuster der im Zytoplasma verteilten Katalase. Insgesamt wiesen die biochemischen Befunde bei allen Patienten auf eine generalisierte peroxisomale Funktionsstörung hin.



Tabelle 3: Klinische Merkmale der Patienten der Komplementierungsgruppe 1.

MERKMALE		PATIENTEN														
		A.W.	C.K.	D.W.	E.Y.	F.F.	H.B.	J.S.	L.H.	L.L.	M.K.	M.Kr.	N.K.	S.W.	T.R.	
Geburtsdatum		Mrz 97	Dez 96	Mrz 98	Nov 95	Jan 88	Okt 97	Okt 90	Sep 96	Nov 97	Aug 98	Sep 87	Mrz 95	Apr 90	Dez 76	
Sterbedatum			Jan 97	Mai 98	Dez 95	Nov 90	Jan 98				Nov 98		Dez 95			
Dysmorphiezeichen	große Fontanelle, weite Schädelnähte	+			+	+	+	+		+	+	+	+	+		
	flache, hohe Stirn				+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
	breite Nasenwurzel	+			+		+	+	+		+	+	+	+		
	Hypertelorismus	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
	leicht mongoloide Lidachse	+	+	+							+		-	+	+	
	Epikanthus				+			+	+				+	+	+	+
	Mikrognathie				+	+	+							+		
	dysplastische Ohrmuscheln		+		+		+	-	+				(+)	+		
Cerebral	Trinkschwäche		+		+	+		+	-	+	+		+		+	
	Sondenernährung		+		+	+	+		-		+	+	+			
	Hypotonie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	psychomotorische Retardierung					+		+	+	+		+	+	+	+	
	Krampfanfälle	+	+	+		+	+	+	+				+	-	-	
Okulär	Katarakt		+	-	+	-	+	-	-			-	-			
	Retinopathie	+		-		+		+	+		-	+	-	+	+	
	Opticusatrophie			-	+	-		+	-		-	+			+	
	Nystagmus	+		+	(+)	+		+	-			+	+	+	+	
Hepatorenal	Hepatomegalie	+	-	+	(+)	+	-	(+)	-	-		+	+	+	(+)	
	Leberfibrose / Leberzirrhose			+/-		+/-		-/-		+/-		-/-	+/-	-/+	-/-	
	erhöhte Leberenzyme	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	Nierenzysten	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-		
Skelettsystem													(+)			

+ : vorhanden

(+) : vorhanden, aber wenig ausgeprägt

- : nicht vorhanden

**Tabelle 4: Biochemische Merkmale der Patienten der Komplementierungsgruppe 1.**

UNTERSUCHUNGSMATERIAL		PATIENTEN																
		A.W.	C.K.	D.W.	E.Y.	F.F.	F.G.	H.B.	J.S.	L.H.	L.L.	M.K.	M.Kr.	N.K.	S.G.	S.W.	T.R.	
<b>PLASMA</b>	Normbereich																	
	VLCFA																	
	$C_{26:0}/C_{22:0}$	0,013 +/- 0,009	0,084	0,323	0,276	0,48	0,343		0,485	0,19		0,396	0,38	0,18	0,363		0,52	0,149
	Phytansäure (µg/ml)	< 5 µg/ml	6,98				52,7			19,5	34,9	10,05					6,5	27,3
Gallensäuren																		
THCA (µmol/l)	nn - 0,1 µmol/l					0,88			0,78	4,3			0,8				11,1	
<b>FIBROBLASTEN</b>																		
VLCFA																		
$C_{26:0}/C_{22:0}$	0,039 +/-0,011					0,24		0,444	0,04		0,668	45	0,18	0,471				1,45
Plasmalogenbiosynthese																		
$^3H / ^{14}C$ - Ratio	0,60 - 1,80	26,4				5,6	2,08	29,09	1,1	n	28,5		4,9	10,9	3,16	7,01		
% partikuläre Katalase	> 60%	16%						14%			14%		<5%	2%				

VLCFA : very long chain fatty acids

nn : nicht nachweisbar

n : normal



### 3.2 Mutationen im *PEX1*-Gen

Alle 29 Patienten wurden anhand von Zellfusionsstudien in Komplementierungsgruppen eingeordnet. Für die molekulargenetische Studie wurden 16 Patienten der Komplementierungsgruppe 1 (CG1) ausgewählt und die Mutationsereignisse im *PEX1*-Gen bestimmt. Die den Patienten zugehörigen Mutationen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

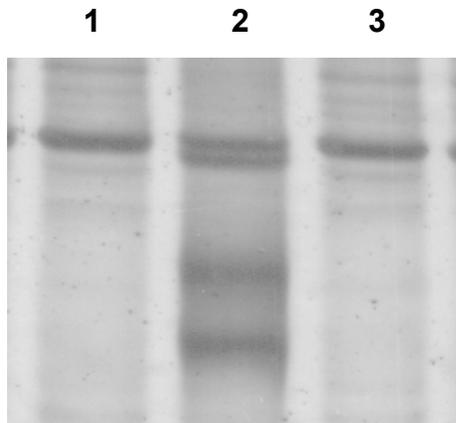
**Tabelle 5: Mutationen im *PEX1*-Gen der Patienten der Komplementierungsgruppe 1.**

Patienten	<i>PEX1</i> - Mutationen	
	Allel 1	Allel2
A.W.	G843D	G843D
C.K.	c.2097-2098insT	R872X
D.W.	c.2097-2098insT	c.2097-2098insT
E.Y.	c.2227-2416del	c.2227-2416del
F.F.	G843D homoz.	c.2097-2098insT
F.G.	G843D	G843D
H.B.	c.2097-2098insT	c.2814-2818del5bp
J.S.	G843D	G843D
L.H.	c.2227-2416del	???
L.L.	G843D	G843D
M.K.	c.2097-2098insT	c.2916delA
M.Kr.	G843D	G843D
N.K.	c.2097-2098insT	Y1126X
S.G.	G843D	G843D
S.W.	G843D	c.1865-1866ins9bp
T.R.	G843D	c.1865-1866ins9bp

homoz.: homozygot

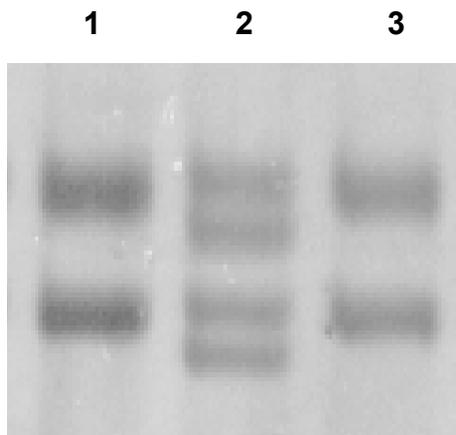
Um Mutationen im *PEX1*-Gen aufzudecken, wurde zunächst die mRNA der Patienten aus kultivierten Hautfibroblasten bzw. EDTA-Blut gewonnen und mittels reverser Transkription cDNA erstellt. Die *PEX1*-cDNA wurde durch Amplifikation von 13 Fragmenten ähnlicher Größe (267-312 bp) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) charakterisiert. Alternativ dazu wurde bei einigen Patienten genomische DNA (gDNA) aus kultivierten Hautfibroblasten bzw. EDTA-Blut gewonnen. Die 24 Exons des *PEX1*-Gens mit angrenzenden Intronsequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Die

cDNS-Fragmente bzw. gDNS-Fragmente wurden anschließend mit der SSCP(Single Strand Conformational Polymorphism)-Screeningmethode untersucht.



**Abbildung 4: SSCP-Analyse Exon 18 des *PEX1*-Gens.**

Aufgetragen wurde das Amplifikat von zwei Patienten (Proben 1 und 2) und einer gesunden Kontrollperson (Probe 3). Proben 1 und 3 entsprechen dem Wildtyp. Ein abweichendes Laufverhalten („shift“) zeigt sich bei Probe 2 (Patient H.B.). Durch anschließende Sequenzierung wurde bei dem Patienten H.B. die Mutation c.2814-2818delCTTTG heterozygot detektiert.



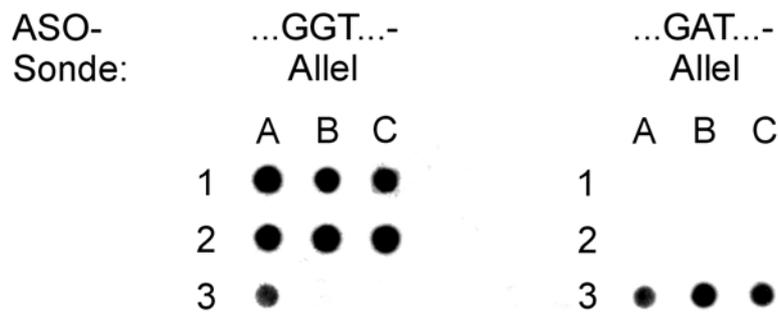
**Abbildung 5: SSCP-Analyse Exon 16 des *PEX1*-Gens.**

Aufgetragen wurde das Amplifikat von zwei Patienten (Proben 1 und 2) und einer gesunden Kontrollperson (Probe 3). Proben 1 und 3 entsprechen dem Wildtyp. Ein abweichendes Laufverhalten („shift“) zeigt sich bei Probe 2 (Patientin C.K.). Durch anschließende Sequenzierung wurde bei der Patientin C.K. die Nonsense-Mutation R872X heterozygot nachgewiesen.

Fragmente mit abnormem Wanderungsmuster wurden der Nukleotidsequenzbestimmung mittels radioaktiver bzw. automatischer Sequenzierung zugeführt. Mit diesen Methoden konnten zwei unterschiedliche Nonsense-Mutationen, zwei Insertionen und drei Deletionen aufgedeckt werden. Die Patientin C.K. zeigte R872X heterozygot; bei dem Patienten N.K. konnte Y1126X heterozygot nachgewiesen werden. In Exon 12 fand sich bei den zwei Patienten T.R. und S.W. jeweils heterozygot die 9bp-Insertion c.1960-1961insCAGTGTGGA. In Exon 14 fand sich die 190bp-Deletion c.2227-2416del, die bei einer Patientin (E.Y.) homozygot und

bei einer weiteren Patientin (L.H.) heterozygot nachgewiesen werden konnte. Des weiteren konnten die Deletionen c.2916delA und c.2814-2818delCTTTG, beide in Exon 18, jeweils der Patientin M.K. bzw. dem Patienten H.B. heterozygot zugewiesen werden.

Darüber hinaus wurde die in der Literatur bereits beschriebene Missense-Mutation G843D (Reuber et al. 1999, Portsteffen et al. 1999, Collins et al. 1999, Maxwell et al. 1999, Imamura et al. 1998, Geisbrecht et al. 1998, Gärtner et al. 1999, Gärtner et al. 2000), die in Exon 15 in Position 2528 der cDNS zu einem Austausch von Guanin gegen Adenin führt und die in der SSCP-Analyse bei den von uns verwendeten Versuchsbedingungen keine Veränderung des Laufverhaltens zeigte, durch allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung (ASO) und nachfolgende Sequenzierung bei sieben Patienten homozygot (A.W., F.F., F.G., J.S., L.L., M.Kr., S.G.) und bei zwei Patienten (S.W., T.R.) heterozygot nachgewiesen. Dabei stimmten die Ergebnisse der ASO mit denen der Nukleotidsequenzbestimmung überein.



**Abbildung 6: Dot Blot. *PEX1*-Gen – ASO der Mutation G843D in Exon 15.**

Zur allelspezifischen Oligonukleotidhybridisierung wurde der zu untersuchende Bereich in Exon 15 von drei gesunden Kontrollen und sechs PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe 1 amplifiziert. Die Proben wurden auf zwei Membranen in gleicher Position angeordnet. Die links dargestellte Membran wurde mit dem Oligonukleotid des gesunden Allels (...GGT...), die rechts dargestellte Membran mit dem Oligonukleotid des veränderten Allels (...GAT...) hybridisiert. Die Kontrollpersonen (Proben 1A, 1B, 1C) hybridisierten mit dem Oligonukleotid des gesunden Allels. Die PBD-Patienten-Proben 2A (Patientin E.Y.), 2B (Patient N.K.), 2C (Patient H.B.) zeigten ebenfalls das Wildtyp-Allel für G843D. Die Probe 3A des Patienten T.R. hybridisierte mit dem Oligonukleotid des gesunden und des veränderten Allels, er ist damit heterozygot für G843D. Die Proben 3B (Patientin M.Kr.) und 3C (Patientin A.W.) hybridisierten ausschließlich mit dem veränderten Allel. Diese beiden Patientinnen sind homozygot für die Mutation G843D.

Mit den gleichen Methoden konnte die Insertion c.2097-2098insT (Exon 13) bei dem Patienten D.W. homozygot und bei fünf Patienten (C.K., F.F., H.B., M.K., N.K.) heterozygot detektiert werden. Es fiel hier bei der für c.2097-2098insT durchgeführten ASO auf, daß zwei Patientinnen zunächst anhand der ASO als heterozygot für die Insertion eingestuft wurden, dies jedoch nicht in der nachfolgenden Sequenzierung bestätigt werden konnte. Beide zeigten an dieser Stelle den Wildtyp in der Nukleotidsequenz. Bei den anderen im Dot-Blot für c.2097-2098insT positiven Patienten entsprachen die Ergebnisse der ASO denen der Nukleotidsequenzbestimmungen.

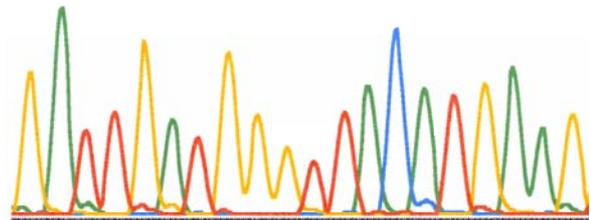
Patient F.F.: G843D homozygot

Allel 1: GATTG**A**TGGGTTACATGAAG

Allel 2: GATTG**A**TGGGTTACATGAAG

Wildtyp: GATTGGTGGGTTACATGAAG

G A T T G **A** T G G G T T A C A T G A A G



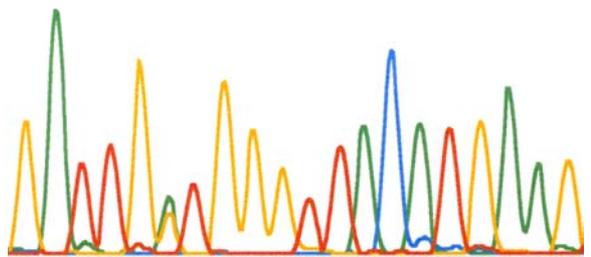
Patient T.R.: G843D heterozygot

Allel 1: GATTGGTGGGTTACATGAAG

Allel 2: GATTG**N**TGGGTTACATGAAG

Wildtyp: GATTGGTGGGTTACATGAAG

G A T T G **N** T G G G T T A C A T G A A G



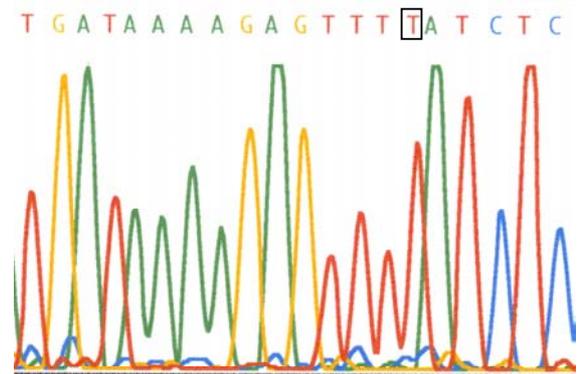
### Abbildung 7: ABI-Sequenzierung der Mutation G843D in Exon 15.

Auf der rechten Seite werden die Chromatogramme einer Region in Exon 15 zweier PBD-Patienten gezeigt. Die Wildtyp-Sequenz und die veränderte Sequenz der Patienten sind auf der linken Seite aufgeführt. Im Chromatogramm des Patienten F.F. erkennt man in Position c.2528 ausschließlich einen Ausschlag für die Base A (umrahmt dargestellt), somit ist F.F. homozygot für G843D. Das Chromatogramm des Patienten T.R. zeigt in Position c.2528 des *PEX1*-Gens ein A und ein G, hier repräsentiert als N (umrahmt), d.h. T.R. ist heterozygot für die Missense-Mutation G843D.

Patient D.W.: c.2097-2098insT homozygot

Allel 1: TGATAAAAGAGTTT<sup>T</sup>ATCTC  
Allel 2: TGATAAAAGAGTTT<sup>T</sup>ATCTC

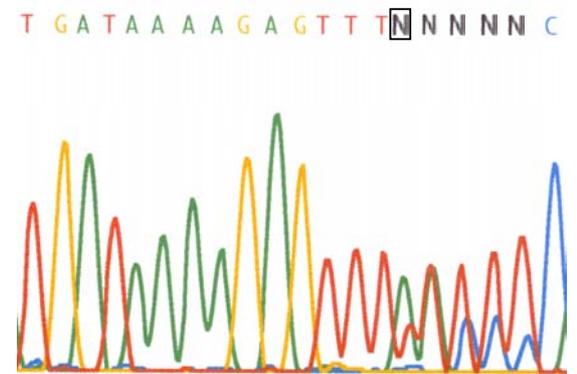
Wildtyp: TGATAAAAGAGTTTATCTC



Patient F.F.: c.2097-2098insT heterozygot

Allel 1: TGATAAAAGAGTTTATCTCC  
Allel 2: TGATAAAAGAGTTT<sup>N</sup>ATCTC

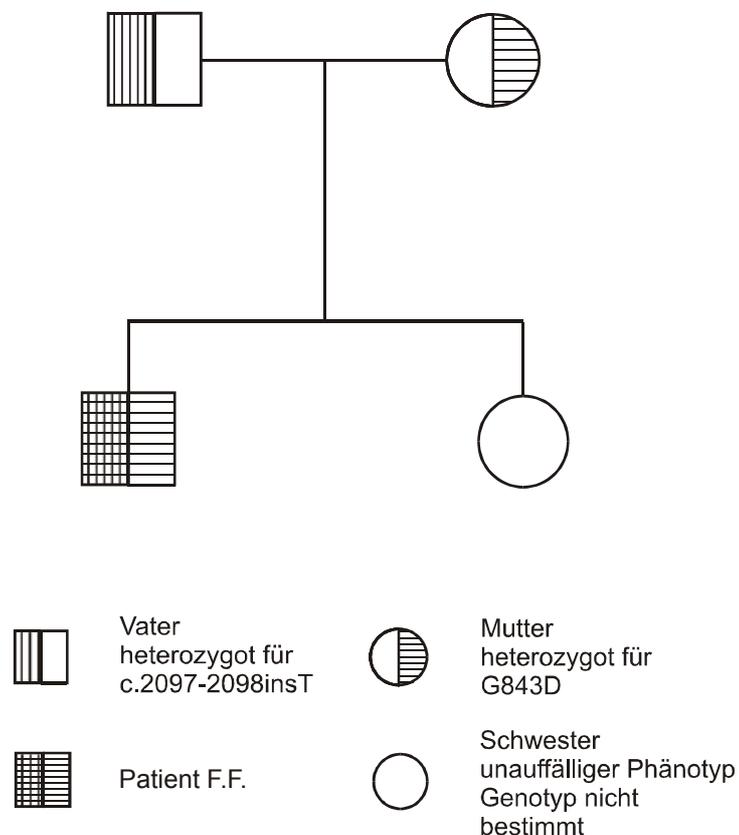
Wildtyp: TGATAAAAGAGTTTATCTC



### Abbildung 8: ABI-Sequenzierung der Mutation c.2097-2098insT in Exon 13.

Auf der rechten Seite werden die Chromatogramme einer Region in Exon 13 zweier PBD-Patienten gezeigt. Die Wildtyp-Sequenz und die veränderte Sequenz der Patienten sind auf der linken Seite aufgeführt. Das Chromatogramm des Patienten D.W. zeigt in Position c.2097-2098 ein zusätzliches T (umrahmt dargestellt); der Patient ist homozygot für c.2097-2098insT. Im Chromatogramm des Patienten F.F. sind ab Position c.2098 (als umrahmtes N gekennzeichnet) Doppelausschläge erkennbar, die durch die Insertion des T in einem Allel zustande kommen. Somit ist F.F. heterozygot für c.2097-2098insT.

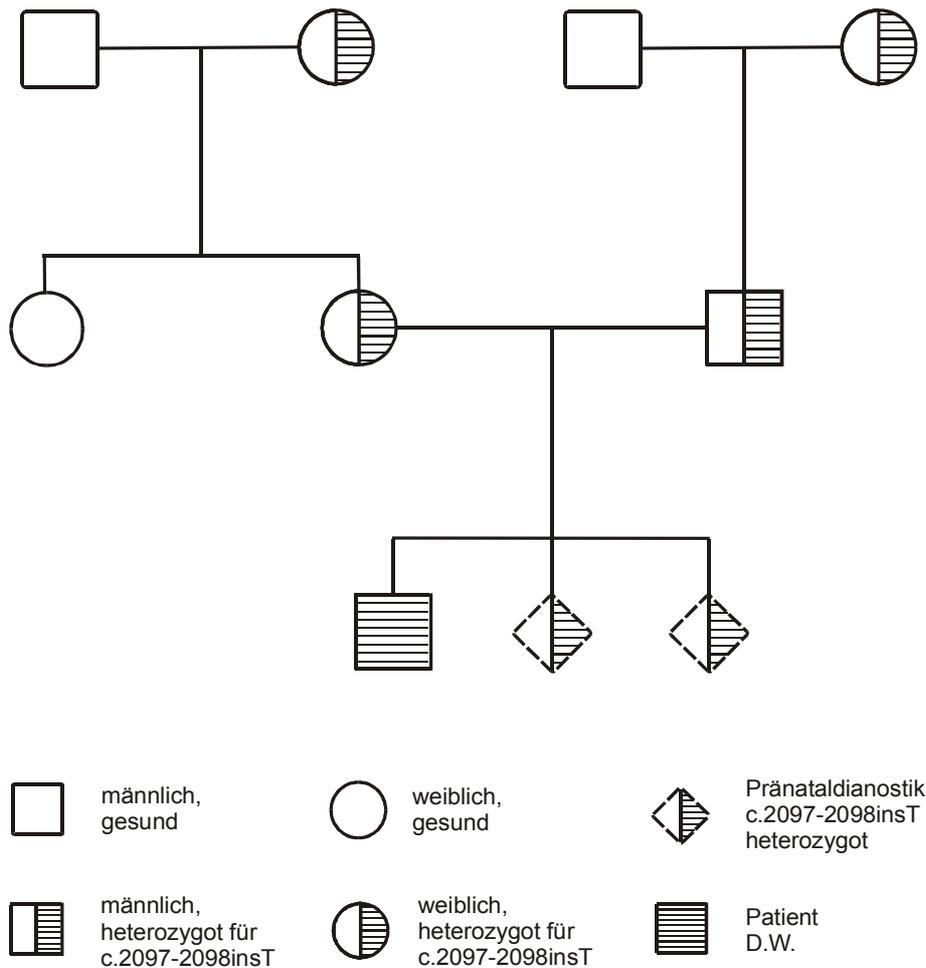
Hervorzuheben ist der Patient F.F., bei dem die Missense-Mutation G843D homozygot vorlag und bei dem zusätzlich für ein Allel die Insertion c.2097-2098insT nachgewiesen werden konnte (siehe auch Abbildungen 7 und 8). Der Vater von F.F. ist heterozygot für c.2097-2098insT, seine Mutter ist heterozygot für G843D. Beide Eltern wiesen jeweils bei der Mutation des anderen den Wildtyp auf (vergleiche Abbildung 9).



**Abbildung 9: Familienstammbaum des Patienten F.F..**

Der Patient F.F. weist das vom Vater entstammende c.2097-2098insT-Allel heterozygot und das von der Mutter entstammende G843D-Allel homozygot auf. Die Schwester des Patienten F.F. hat einen unauffälligen Phänotyp, ihr Genotyp wurde nicht bestimmt.

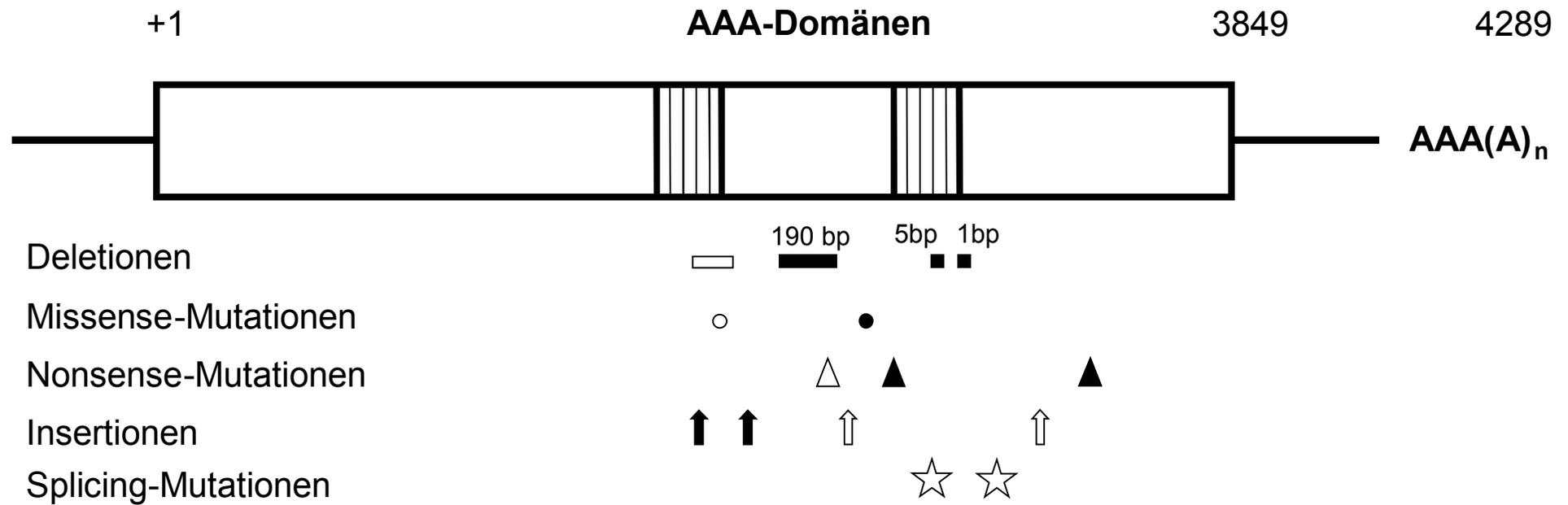
Für den Patienten D.W. wurden außerdem die Eltern und Großeltern auf das Vorliegen der Insertion c.2097-2098insT, die D.W. homozygot zeigte, hin untersucht. Die Mutter und der Vater von D.W. und beide Großmütter wiesen die Insertion heterozygot auf, bei beiden Großvätern konnte der Wildtyp nachgewiesen werden. Zwei Pränataldiagnosen dieser Familie aus Chorionzellen zeigten jeweils ein heterozygotes Vorliegen von c.2097-2098insT (siehe Abbildung 10). Bei der Patientin J.S., die die Missense-Mutation G843D homozygot aufwies, konnten beide Eltern als Überträger identifiziert werden. Der Patient N.K. zeigte eine Compound-Heterozygotie für c.2097-2098insT und Y1126X. Bei der Mutter des Patienten konnte die 1bp-Insertion, beim Vater die Nonsense-Mutation nachgewiesen werden. Bei dem Patienten S.W. wurden die Mutationen c.1960-1961insCAGTGTGGA und G843D jeweils heterozygot nachgewiesen. Die Mutter des Patienten ist Überträgerin der Insertion, der Vater ist Überträger der Missense-Mutation und dem Bruder des Patienten konnte für beide Mutationen der Wildtyp zugewiesen werden. Die Tante mütterlicherseits zeigte keinen Überträgerinnenstatus für die 9bp-Insertion.



**Abbildung 10: Familienstammbaum des Patienten D.W..**

Der Patient D.W. ist homozygot für die Mutation c.2097-2098insT. Das c.2097-2098insT-Allel konnte bei beiden Großmüttern, der Mutter und dem Vater des Patienten jeweils heterozygot nachgewiesen werden; beide Großväter zeigten den Wildtyp. Für zwei Pränataldiagnosen dieser Familie wurde ebenfalls ein heterozygotes Vorliegen der Insertion detektiert.

Die Lokalisationen der in dieser Studie gefundenen Mutationen sowie weiterer in der Literatur beschriebener Mutationen im *PEX1*-Gen sind in Abbildung 11 dargestellt. Das Peroxin 1 enthält zwei AAA-Cassetten mit jeweils einer ATP-Bindungsdomäne. Die meisten Mutationen befinden sich innerhalb dieser funktionell wichtigen Proteindomänen.



**Abbildung 11: Mutationen im *PEX1*-Gen bei PBD-Patienten.**

Die in dieser Studie beschriebenen Mutationen sind als schwarz ausgefüllte Symbole gekennzeichnet, die darüber hinaus in der Literatur beschriebenen Mutationen sind als nicht ausgefüllte Symbole dargestellt.

### 3.3 Polymorphismen im *PEX1*-Gen

Bei der SSCP-Screeninguntersuchung und anschließender Nukleotidsequenzbestimmung konnten zwei Polymorphismen im *PEX1*-Gen identifiziert werden. Der erste Polymorphismus G777G wurde in Exon 14 detektiert; die Sequenzierung zeigte den Basenaustausch c.2331A>C. In der Gruppe von 29 PBD-Patienten konnte G777G bei 3 Patienten homozygot und bei 6 Patienten heterozygot gefunden werden. G777G wurde innerhalb der 16 PBD-Patienten mit den in Tabelle 5 aufgeführten Mutationen im *PEX1*-Gen bei 3 Patienten (F.F., M.K., N.K.) heterozygot und bei 3 Patienten homozygot (C.K., D.W., H.B.) gefunden. Der zweite Polymorphismus befindet sich in Intron 11. Es handelt sich um die 16 bp Insertion (IVS11ins16bp) IVS11+142insAGAAATTTTAAGTCTT. Hinsichtlich dieses Polymorphismus wurden nur Patienten untersucht, bei denen in Voruntersuchungen entweder die Mutation G843D und/oder die Mutation c.2097-2098insT nachgewiesen werden konnten. Anhand dieser Kriterien wurden insgesamt 14 Patienten (vgl.: Tabelle 5: A.W., C.K., D.W., F.F., F.G., H.B., J.S., L.L., M.K., M.Kr., N.K., S.G., S.W., T.R.) auf das Vorliegen von IVS11ins16bp hin sequenziert. Sieben Patienten (A.W., F.G., J.S., M.K., S.G., S.W., T.R.) wiesen die Insertion homozygot auf, vier Patienten (F.F., L.L., M.K., N.K.) heterozygot und bei den drei Patienten C.K., D.W. und H.B. konnte IVS11ins16bp nicht nachgewiesen werden.

### 3.4 Allelfrequenz und Haplotyp-Assoziation im *PEX1*-Gen

Die in unserer Patientenpopulation am häufigsten im *PEX1*-Gen gefundene Mutation ist G843D, bei der es zu einem Austausch von Guanin gegen Adenin in Position 2528 der cDNS kommt. G843D wurde in insgesamt 16 Allelen der 16 Patienten detektiert und lag bei sieben Patienten homozygot und bei zwei Patienten heterozygot vor. Somit ist G843D in einer Frequenz von 0,5 (16/32 Allele) für Defekte in der Patienten-Komplementierungsgruppe 1 verantwortlich. Für G843D wurde zum Nachweis der Allelfrequenz in der Normalpopulation bei 100 gesunden Probanden eine allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung durchgeführt. Bei den 200 Allelen der Kontrollen konnte ausschließlich der Wildtyp nachgewiesen werden.

Es wurde ebenfalls das Vorkommen des bereits oben näher beschriebenen Polymorphismus G777G bei 29 PBD-Patienten und 101 gesunden Probanden

untersucht. Bei der durchgeführten ASO konnte in zwölf von 58 untersuchten PBD-Allelen und in 16 von 202 gesunden Allelen der Basenaustausch c.2331A>C gefunden werden. G777G wurde bei drei Patienten homozygot und bei sechs Patienten heterozygot nachgewiesen. 16 Kontrollen zeigten G777G heterozygot. Bei den PBD-Patienten aller Komplementierungsgruppen entspricht dies einer Allelfrequenz von 0,21, bei den Kontrollpersonen von 0,08 und insgesamt einer Allelfrequenz von 0,11 (28/260 Allele). Bezüglich des Polymorphismus IVS11ins16bp wurde mittels direkter Sequenzierung eine Allelfrequenz von 0,86 (86/100 Allele) bei 50 Kontrollen festgestellt. IVS11ins16bp trat bei 36 Probanden homozygot und bei 14 Probanden heterozygot auf. Die Allelfrequenz betrug 0,64 (18/28 Allele) bei den PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe 1 und 0,81 (104/128 Allele) in der Gesamtgruppe.

Beim Vergleich der bei den 16 PBD-Patienten gefundenen Mutationen mit den Polymorphismen fiel ein gehäuftes Zusammentreffen der Polymorphismen G777G und IVS11ins16bp mit den *PEX1*-Mutationen G843D und c.2097-2098insT auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

**Tabelle 6: Haplotyp-Assoziation im *PEX1*-Gen.**

Mutationen und Polymorphismen bei PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe1.

Patienten	Mutationen			Polymorphismen	
	G843D	c.2097-2098insT	andere	G777G	IVS11ins16bp
J.S.	+/+			-/-	+/+
A.W.	+/+			-/-	+/+
M.Kr.	+/+			-/-	+/+
F.G.	+/+			-/-	+/+
S.G.	+/+			-/-	+/+
L.L.	+/+			-/-	+/-
S.W.	+/-		+/-	-/-	+/+
T.R.	+/-		+/-	-/-	+/+
F.F.	+/+	+/-		+/-	+/-
D.W.		+/+		+/+	-/-
C.K.		+/-	+/-	+/+	-/-
H.B.		+/-	+/-	+/+	-/-
N.K.		+/-	+/-	+/-	+/-
M.K.		+/-	+/-	+/-	+/-

+: vorhanden, -: nicht vorhanden, +/+ oder -/-: homozygot, +/- oder -/+: heterozygot

Fünf PBD-Patienten (A.W., F.G., J.S., M.Kr., S.G.), bei denen G843D homozygot vorlag, wiesen das GGA-Allel homozygot für G777G auf und sind homozygot für IVS11ins16bp. Die Patientin L.L., die ebenfalls homozygot für G843D ist, zeigte jedoch neben dem GGA-Allel für G777G (homozygot) eine Heterozygotie für IVS11ins16bp. Bei vier weiteren Patienten, die heterozygot für c.2097-2098insT waren, wurde eine unterschiedliche Assoziation mit den zwei Polymorphismen gefunden. Patient H.B., der compound-heterozygot für c.2097-2098insT und die Deletion c.2814-2818delCTTTG (Exon 18) war, zeigte ein homozygoties Vorliegen des GGC-Allels für G777G und die Abwesenheit der 16 bp in Intron 11. Bei der Patientin M.K., die zusätzlich zu c.2097-2098insT die Deletion c.2916delA in Exon 18 aufwies, wurden beide Polymorphismen heterozygot nachgewiesen. Beide Polymorphismen waren auch bei dem Patient N.K. heterozygot nachweisbar; er zeigte neben c.2097-2098insT die Nonsense-Mutation c.3378C>G (Y1126X) in Exon 21. Bei der Patientin C.K., die heterozygot für c.2097-2098insT und die Nonsense-Mutation c.2614C>T (R872X Exon 16) war, konnte ein homozygoties Vorliegen des GGC-Allels für G777G und die Abwesenheit der 16 bp in Intron 11 detektiert werden. Der einzige in der von uns untersuchten Gruppe für c.2097-2098insT homozygote Patient D.W. zeigte ein homozygoties Vorliegen für G777G und das homozygote Fehlen der oben beschriebenen 16bp in Intron 11. Eine Sonderstellung nimmt auch hier wieder Patient F.F. mit dem Vorliegen von G843D homozygot und zusätzlich c.2097-2098insT heterozygot ein, dem sowohl G777G als auch IVS11ins16bp heterozygot zugeordnet werden konnte. Bei den zwei Patienten T.R. und S.W. mit Katalasemosaik, welche compound-heterozygot für G843D und die 9bp Insertion c.1960-1961insCAGTGTGGA sind, konnte für G777G das GGA-Allel und IVS11ins16bp homozygot nachgewiesen werden.

### **3.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelation**

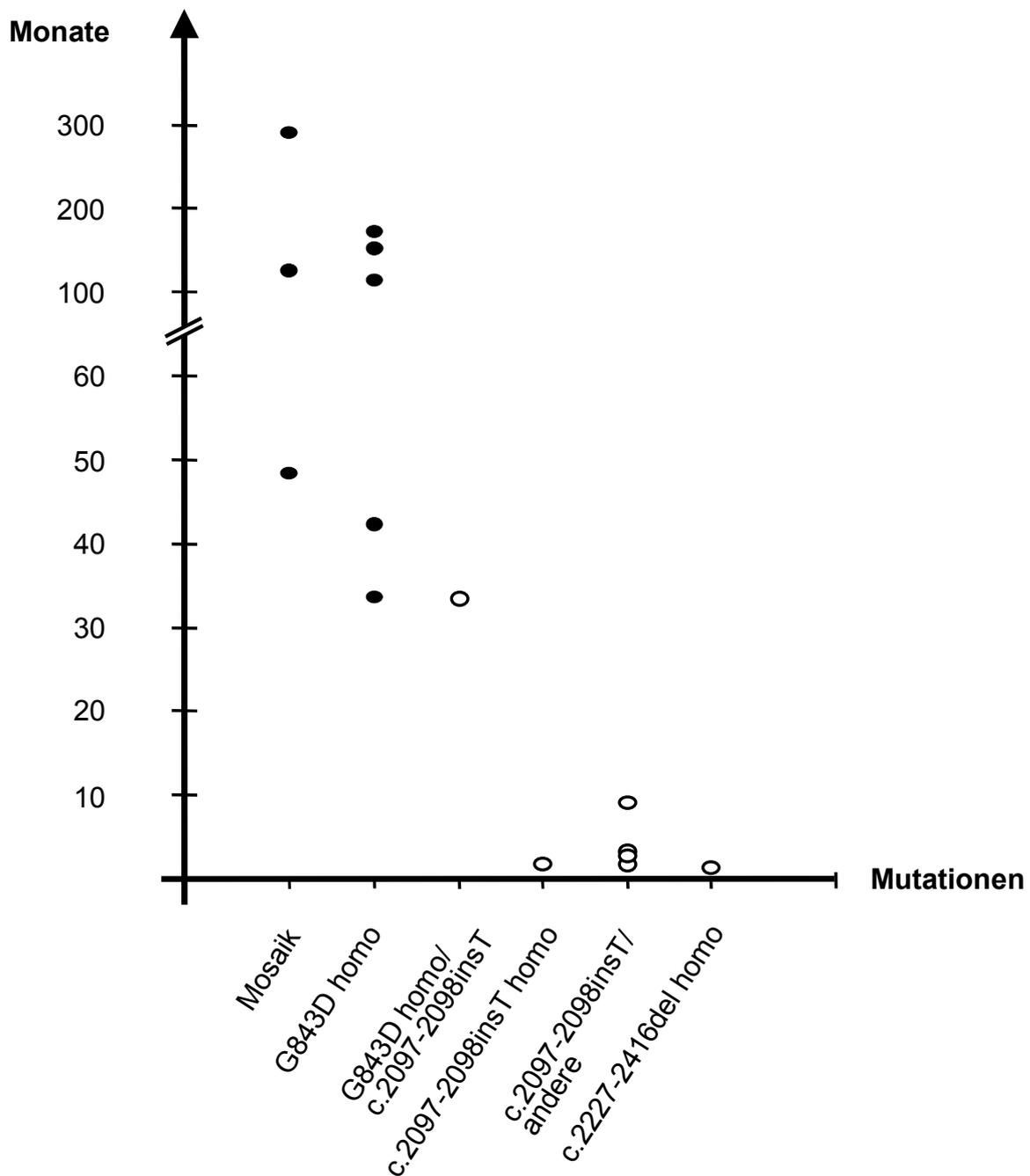
Beim Vergleich des klinischen Phänotyps mit dem Genotyp der einzelnen Patienten konnte eine Korrelation festgestellt werden. Alle untersuchten PBD-Patienten zeigten den für PBD typischen klinischen Phänotyp mit Dysmorphiezeichen und einer cerebralen, okulären und hepatorenenalen Beteiligung. In Tabelle 7 wurden die gefundenen Mutationen dem klinischen Phänotyp der PBD-Patienten gegenübergestellt.

**Tabelle 7: Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei PBD-Patienten der Koplementierungsgruppe 1.**

Genotyp	klinischer Phänotyp	
	weniger schwer ausgeprägt	schwer ausgeprägt
G843D homoz.	+	
G843D homoz. / c.2097-2098insT		+
c.2097-2098insT homoz.		+
c.2097-2098insT / c.2916delA		+
c.2097-2098insT / c.2814-2818delCTTTG		+
c.2097-2098insT / Y1126X		+
c.2097-2098insT / R872X		+
c.2227-2416del homoz.		+
Mosaikpatienten		
G843D / c.1865-1866insCAGTGTGGA	+	
c.2227-2416del heterozygot / ?	+	

homoz.: homozygot

Das homozygote Vorliegen der Missense-Mutation G843D ist assoziiert mit einer milden Verlaufsform der Erkrankung. Im Gegensatz dazu ist bereits das heterozygote Vorliegen der Frameshift-Mutation c.2097-2098insT mit einem schweren Verlauf der Erkrankung assoziiert. Ebenso gehen die anderen Insertionen und Deletionen mit einer schwer ausgeprägten Verlaufsform einher. Die drei Patienten mit Katalasemosaik zeigen ein mild ausgeprägtes Bild der Erkrankung. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation wird ebenso aus Abbildung 12 ersichtlich, in der der Genotyp mit dem Überlebensalter der Patienten korreliert wird.

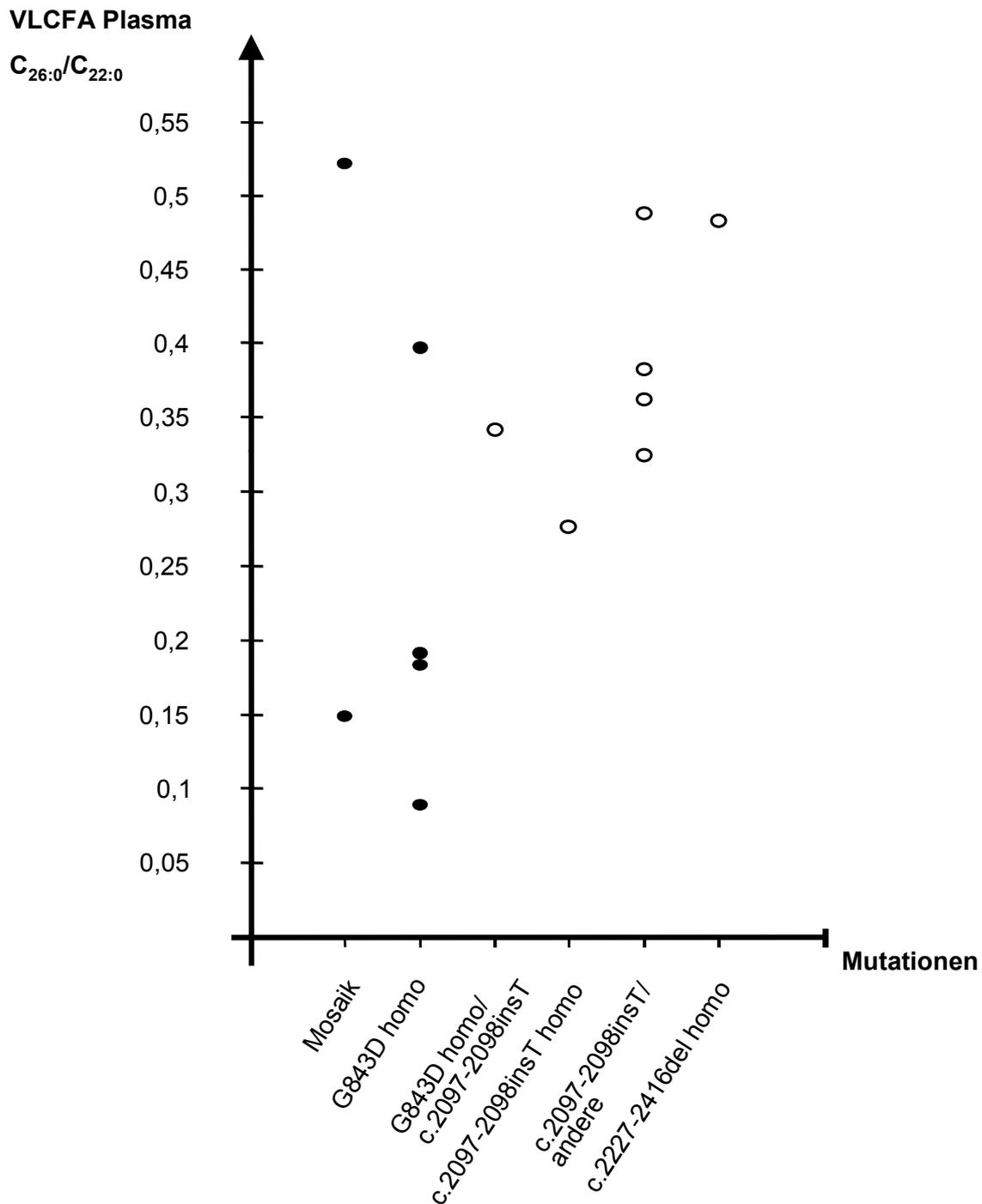


**Abbildung 12: Korrelation des Überlebensalters mit dem Genotyp von PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe 1.**

Es konnte eine Korrelation zwischen dem Überlebensalter und dem Genotyp aufgezeigt werden. Das Sterbealter von Patienten ist als nicht ausgefüllter Punkt aufgetragen. Das Alter von Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie lebten, ist als schwarz ausgefüllter Punkt dargestellt.

Die Patienten mit dem homozygoten Vorliegen von G843D wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Alter von 34 bis 169 Monaten auf. Der Patient F.F. mit den Mutationen G843D (homozygot) und c.2097-2098insT (heterozygot) verstarb im Alter von 34 Monaten. D.W., bei dem c.2097-2098insT homozygot nachgewiesen werden konnte, verstarb im Alter von zwei Monaten. Die Patienten, die compound-heterozygot für c.2097-2098insT und eine andere Nonsense-Mutation oder Deletion waren (C.K., H.B., M.K., N.K.), verstarben mit zwei bis neun Monaten. Die Patientin E.Y., bei der c.2227-2416del homozygot nachgewiesen werden konnte, wurde einen Monat alt.

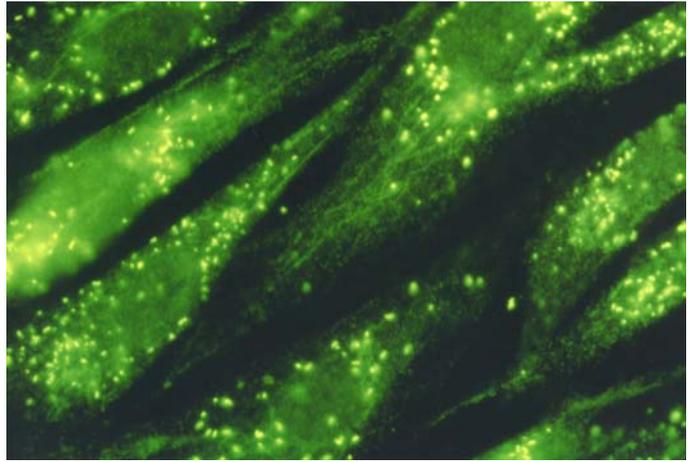
Im Gegensatz zur festgestellten Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp konnte keine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischem Phänotyp (vgl.: Abbildung 13) aufgezeigt werden. Alle untersuchten Patienten zeigten biochemische Veränderungen, die auf eine generalisierte Funktionsstörung der Peroxisomen hinwiesen. Die überlangkettigen Fettsäuren waren bei allen Patienten sowohl im Plasma als auch in Fibroblasten erhöht (Parameter:  $C_{26:0}/C_{22:0}$ ). Die Phytansäure und Gallensäuremetabolite (THCA) im Plasma war bei allen Patienten, selbst bei denjenigen mit der gleichen Mutation, in unterschiedlichem Maß erhöht. Bei allen Patienten konnte eine Erniedrigung der partikulären Katalase in Fibroblasten nachgewiesen werden.



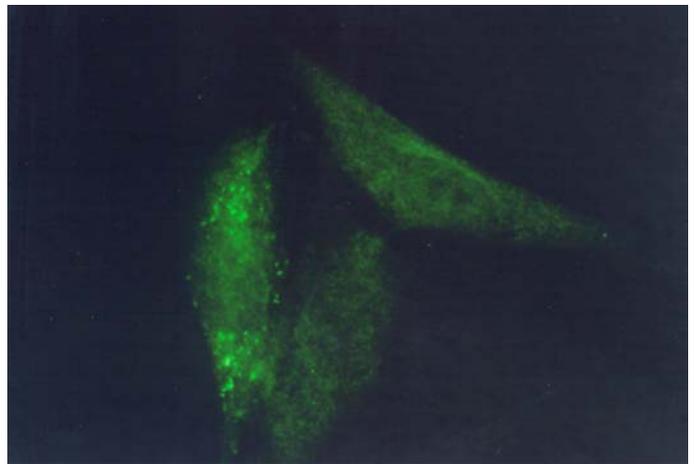
**Abbildung 13: Korrelation des biochemischen Phänotyps mit dem Genotyp von Patienten der Komplementierungsgruppe 1.**

Als biochemischer Parameter wird die  $C_{26:0}/C_{22:0}$ -Ratio der VLCFA im Plasma den unterschiedlichen Mutationen der Patienten gegenübergestellt. Es konnte keine Korrelation zwischen dem biochemischen Phänotyp und dem Genotyp aufgezeigt werden. Die  $C_{26:0}/C_{22:0}$ -Ratio der VLCFA im Plasma von verstorbenen Patienten ist als nicht ausgefüllter Punkt aufgetragen. Die  $C_{26:0}/C_{22:0}$ -Ratio von Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie lebten, ist als schwarz ausgefüllter Punkt dargestellt.

Innerhalb der 16 Patienten der Komplementierungsgruppe 1 konnte anhand von Katalasefärbungen in kultivierten Patientenfibroblasten bei drei Patienten (L.H., S.W., T.R.) ein Mosaik nachgewiesen werden. In einer Hälfte der Zellen war, bedingt durch die überwiegend intraperoxisomal gelegene Katalase ein punktförmiges Färbemuster nachweisbar, in der anderen Hälfte der Zellen zeigte sich ein homogenes Färbemuster der im Zytoplasma verteilten Katalase. Die Patienten T.R. und S.W. zeigten identische Mutationen im *PEX1*-Gen, sie sind compound-heterozygot für G843D und 1960-1961insCAGTGTGGA. Bei der Patientin L.H. wurde bisher lediglich die 190bp-Deletion c.2227-2416del heterozygot nachgewiesen, die zweite Mutation konnte bis jetzt noch nicht detektiert werden. Die klinische Verlaufsform der Mosaik-PBD-Patienten ist mild; T.R. war zum Zeitpunkt der Untersuchung knapp 24 Jahre alt, S.W. 10 Jahre und sechs Monate und L.H. vier Jahre alt. Die biochemischen Befunde der drei Patienten wiesen auf eine generalisierte peroxisomale Funktionsstörung hin.



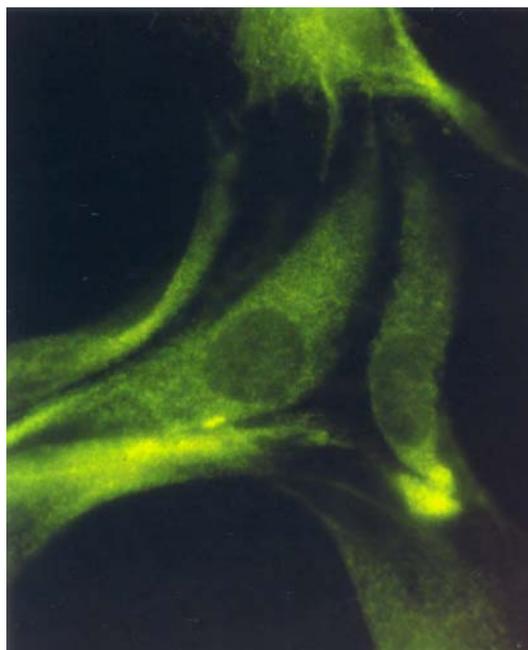
**Abbildung 14A**



**Abbildung 14B**

**Abbildung 14A-C: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten Hautfibroblasten**

Abbildung 14A zeigt katalasegefärbte Hautfibroblasten einer gesunden Kontrollperson. Man erkennt ein durch die intraperoxisomal gelegene Katalase punktförmiges Färbemuster. In Abbildung 14B sind kultivierte Fibroblasten des Patienten S.W. zu sehen, welche das bereits beschriebene typische Mosaikmuster in der Katalasefärbung zeigen. Bei Patienten mit der „klassischen“ PBD-Form, hier Hautfibroblasten des Patienten S.G. (Abbildung 14C), ist ein homogenes Färbemuster der im Zytoplasma verteilten Katalase nachweisbar.



**Abbildung 14C**

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Peroxisomenbiogenesedefekte (PBD, Peroxisome Biogenesis Defects)

Peroxisomenbiogenesedefekte (PBD) sind zurückzuführen auf Fehler in unterschiedlichen *PEX*-Genen, welche für Peroxine kodieren. Peroxine sind Proteine, denen eine Rolle in der Peroxisomenbiogenese und –proliferation zukommt. In Zellfusionsstudien mit Hautfibroblasten von PBD-Patienten konnten mindestens 16 Komplementierungsgruppen für PBD definiert werden. Daraus folgt, daß mindestens 16 unterschiedliche *PEX*-Gene für die Biogenese von Peroxisomen von Bedeutung sind. Patienten, die dem Zellweger-Spektrum (Zellweger Syndrom, neonatale Adrenoleukodystrophie, infantiler Morbus Refsum) angehören, verteilen sich auf zehn Komplementierungsgruppen. Im Gegensatz dazu konzentrieren sich Patienten mit Rhizomelia chondrodysplasia punctata ausschließlich auf die Komplementierungsgruppe 11, bei der Defekte im *PEX7*-Gen vorliegen. Die Komplementierungsgruppe 1 stellt die größte Komplementierungsgruppe dar und umfaßt mehr als 50% aller PBD-Patienten. Mutationen im *PEX1*-Gen sind verantwortlich für die Defekte in dieser Gruppe, und eine Vielzahl verschiedener Mutationen im *PEX1*-Gen wurde bereits beschrieben (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997, Imamura et al. 1998, Tamura et al. 1998, Collins and Gould 1999, Gärtner et al. 1999, Maxwell et al. 1999, Gärtner 2000). Diese *PEX1*-Genmutationen sind über unterschiedliche funktionelle Proteindomänen verteilt. Hierzu zählen vor allem die beiden AAA-Cassetten, die jeweils eine ATP-Bindungsdomäne mit den konservierten Motiven Walker A, 19-mer und Walker B enthalten (Walker et al. 1982, Tamura et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Patienten, die anhand ihrer klinischen und biochemischen Merkmale der Komplementierungsgruppe 1 des Zellweger-Spektrums zugeordnet werden konnten, auf das Vorhandensein von Mutationen im *PEX1*-Gen untersucht. Für 15 der Patienten konnten jeweils zwei veränderte Allele des *PEX1*-Gens nachgewiesen werden, bei einer Patientin gelang lediglich der Nachweis eines mutierten Allels. Der Genotyp der einzelnen Patienten wurde dem Überlebensalter, den klinischen Symptomen und dem biochemischen Phänotyp der Patienten gegenübergestellt.

## 4.2 Funktionelle Folgen von *PEX1*-Genmutationen

Die häufigste in unsere Patientengruppe gefundene Mutation ist die Missense-Mutation G843D, die in Position 2528 der cDNS zu einem Austausch von Guanin gegen Adenin führt. G843D konnte bei neun der 16 Patienten (sieben Homozygote, zwei Heterozygote) bzw. bei 16 von 32 betroffenen Allelen nachgewiesen werden. Somit ist G843D verantwortlich für 50% der mutierten *PEX1*-Allele in der von uns untersuchten Patientengruppe. Eine hohe Frequenz von G843D wurde auch bei PBD-Patienten anderer Arbeitsgruppen nachgewiesen. Bei amerikanischen Patienten zeigte sich eine G843D-Frequenz von 0,3; G843D war bei knapp der Hälfte der PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe 1 nachweisbar und konnte bei 22 von 74 Allelen detektiert werden (Reuber et al. 1997, Collins et al. 1999). In einer australischen Studie wurde G843D ebenfalls bei 50% der ausgewählten Patienten der Komplementierungsgruppe 1 nachgewiesen. Hier trat G843D bei sieben von 14 Patienten heterozygot und somit mit einer Allelfrequenz von 0,25 auf (Maxwell et al. 1999). Bei einem Kollektiv japanischer PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe 1 lag G843D mit einer Allelfrequenz von 0,5 vor (Imamura et al. 1998).

Alle Patienten innerhalb der von uns untersuchten PBD-Gruppe, die die Missense-Mutation G843D aufweisen, zeigen einen milden klinischen Phänotyp der Erkrankung. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Studie bis zu 14 Jahren alt. Der klinisch milde Verlauf dieser Patienten kann durch die bei G843D-Allelen gefundene 15%ige Restfunktion für den Import peroxisomaler Matrixproteinen erklärt werden (Reuber et al. 1997, Geisbrecht et al. 1998). Es kommt demnach nicht zu einem kompletten Ausfall des *PEX1*-Proteins, sondern lediglich zu einer Reduktion seiner Aktivität um über 80%. Dies läßt vermuten, daß nach quantitativ annähernd normaler Transkription der mRNS und dementsprechender Translation ein Peroxin 1 entsteht, welches durch den Basenaustausch in Position c.2528 eine andere Sekundärstruktur aufweist und somit möglicherweise gesteigert abgebaut wird (Maxwell et al. 1999, Dodt 2000). Der Basenaustausch liegt zwischen den beiden AAA-Cassetten des *PEX1* und stört wahrscheinlich die Struktur und Funktion der beiden ATP-Bindungsdomänen. Untersuchungen von Imamura et al (1998) zeigten, daß die bei der Mutation G843D vorliegende Restfunktion für den Import von Matrixenzymen temperaturabhängig ist. Im Gegensatz zu einem vollständig fehlenden

Katalaseimport bei Kulturbedingungen der Fibroblasten von 37°C konnte bei Patienten, die zumindest heterozygot für G843D waren, der Katalaseimport bei 30°C auf eine bis zu 100%ige Aktivität gesteigert werden. Bei homozygot vorliegendem G843D-Allel ließ sich ein PEX1-Proteinspiegel von ca. 5% gegenüber dem Wildtyp-Allel nachweisen (Dodt 2000). Dieser Proteinspiegel erhöhte sich auf 15% bei einer Temperatursenkung der kultivierten Fibroblasten von 37°C auf 30°C. Ein PEX1-Proteinspiegel von 15% erscheint ausreichend, um den peroxisomalen Proteintransport in Fibroblasten zu normalisieren (Dodt 2000). Im Gegensatz zur Korrelation, die zwischen klinischem Phänotyp und Genotyp aufgezeigt werden konnte, war keine Korrelation zwischen dem biochemischen Phänotyp und Genotyp herzustellen, obwohl man dies bei der nachgewiesenen Restfunktion des Peroxins 1 erwarten würde.

Die zweithäufigste in unserer Patientengruppe nachgewiesene Mutation ist die 1bp-Insertion c.2097-2098insT in Exon 13, die bei sechs von 16 Patienten (ein Homozygoter, fünf Heterozygote) nachgewiesen werden konnte. Sie trat mit einer Allelfrequenz von 0,22 auf. Bei amerikanischen Patienten konnte c.2097-2098insT in 22 von 74 betroffenen Allelen, also mit einer Allelfrequenz von 0,3 nachgewiesen werden (Collins et al. 1999). Australische Untersuchungen detektierten c.2097-2098insT bei acht von 14 Patienten der Komplementierungsgruppe 1, dabei war ein Patient homozygot, die restlichen sieben heterozygot für die 1bp-Insertion. Demnach beträgt die Allelfrequenz für c.2097-2098insT bei den untersuchten australischen CG1-Patienten 0,32 (Maxwell et al. 1999). c.2097-2098insT führt zu einem Frameshift und einem vorzeitigen Stop-Codon 41 Aminosäuren hinter der Insertion vor der zweiten ATP-Bindungsdomäne des *PEX1* (Collins et al 1999).

In unserer Studie konnten fünf Patienten mit c.2097-2098insT, in vier Fällen compound-heterozygot mit unterschiedlichen Deletionen bzw. Nonsense-Mutationen, detektiert werden. Die Patienten zeigten unabhängig von der Homozygotie oder der Heterozygotie für c.2097-2098insT einen rasch progredienten Verlauf der Erkrankung und verstarben im Alter von zwei bis neun Monaten. Der schwere Krankheitsverlauf kann durch den Verlust der Proteinfunktion des Peroxins 1 erklärt werden, der durch den vorzeitigen Kettenabbruch der kodierenden *PEX1*-Sequenz vor der zweiten AAA-Cassette zustande kommt. Das entstehende Peroxin 1 ist im Vergleich zum Wildtyp stark verkürzt und weist den Verlust einer kompletten ATP-

Bindungsdomäne auf. *PEX1*-defiziente Zellen mit *PEX1*-c.2097-2098insT-cDNS zeigten einen vollständig fehlenden Import von peroxisomalen Matrixproteinen. Die mRNA-Spiegel waren in diesen Zellen vermindert nachweisbar (Collins et al 1999). Die Vorstellung, daß sich mRNA-Produkte, die für ein vorzeitiges Stop-Codon kodieren, alternativen Splicing-Vorlagen unterziehen, die zu einem anderen Proteinprodukt führen als das, das von der Sequenz vorgegeben war (Dietz et al. 1993), konnte in unseren Fällen nicht bestätigt werden. Es wurde nachgewiesen, daß das *PEX1* mRNA-Produkt, welches die Exone 12-15 umfaßt, bei Patienten mit c.2097-2098insT normal gespliced wird. Somit erzeugt c.2097-2098insT kein aberrantes Splicing in dieser Region (Collins et al. 1999). Bei diesen Patienten mit der 1bp-Insertion konnte ebenso wie in den anderen Mutationsgruppen keine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischem Phänotyp hergestellt werden.

Bei zwei Patienten wurden Nonsense-Mutationen compound-heterozygot mit c.2097-2098insT nachgewiesen. Die erste Nonsense-Mutation R872X führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch vor der zweiten AAA-Cassette. Das entstehende Peroxin 1 ist im Vergleich zum Wildtyp stark verkürzt. Die andere Nonsense-Mutation Y1126X führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch hinter den beiden AAA-Cassetten. Die funktionelle Konsequenz ist unklar. Beide Patienten wiesen vergleichbar schwere Phänotypen auf. Der Patient mit R872X verstarb im Alter von einem Monat, der Patient mit Y1126X überlebte bis zu seinem neunten Lebensmonat. Die Tatsache, daß der zweite Patient mit der Mutation Y1126X ein zwar verkürztes, jedoch die beiden funktionell wichtigen AAA-Cassetten enthaltendes Peroxin 1 bildet, unterstreicht, daß nicht die Nonsense-Mutation, sondern die Mutation c.2097-2098insT für den schweren Phänotyp der Patienten verantwortlich sein muß. Weitere mit c.2097-2098insT compound-heterozygot aufgetretene Mutationen sind zwei Deletionen im Bereich der ATP-Bindungsfalte. Die erste Deletion c.2814-2818delCTTTG in Exon 18 grenzt direkt an das Walker B-Motiv der zweiten AAA-Cassette an und führt zu einem Frameshift. c.2814-2818delCTTTG führt eine Aminosäure nach der Deletion zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Die zweite Deletion c.2916delA in Exon 19 liegt hinter der zweiten ATP-Bindungsdomäne und erzeugt 27 Aminosäuren später einen vorzeitigen Kettenabbruch. Beide Patienten verstarben im Alter von drei Monaten nach einem rasch progredienten Erkrankungsverlauf. Es ist unklar, inwieweit die beschriebenen Deletionen die

Funktion des Peroxins 1 beeinflussen, da das bei diesen Patienten heterozygot vorliegende c.2097-2098insT-Allel bereits einen schweren klinischen Phänotyp bedingt.

Ein Patient dieser Studie wies drei Mutationen im *PEX1*-Gen auf: die Mutation G843D homozygot und zusätzlich die Insertion c.2097-2098insT heterozygot. Dieser Patient verstarb im Alter von 34 Monaten, seine Überlebensdauer war damit deutlich höher als die von Patienten, bei denen c.2097-2098insT ebenfalls compound-heterozygot nachgewiesen werden konnte. Bei diesem Patienten lag demnach ein intermediärer klinischer Phänotyp zwischen dem milden Krankheitsverlauf, der mit G843D assoziiert ist und der schwer verlaufenden Form, wie sie bei Patienten mit c.2097-2098insT-Allelen auftritt, vor. Dies unterstreicht die Vermutung, daß G843D einen mildernden Effekt auf den klinischen Phänotyp von PBD-Patienten hat (Imamura et al. 1998). Bei der Untersuchung der Eltern dieses Patienten konnte für den Vater das c.2097-2098insT-Allel und für die Mutter das G843D-Allel jeweils heterozygot nachgewiesen werden. Da der Patient G843D homozygot aufweist, muß das zweite mutierte G843D-Allel spontan entstanden sein.

Zwei Patienten mit einem sehr milden klinischen Erkrankungsverlauf sind compound-heterozygot für G843D und eine 9bp-Insertion. Die Sequenz der Insertion „CAGTGTGGA“ entspricht einer direkten Kopie der vorangegangenen neun Basenpaare und führt zu einer Insertion der drei Aminosäuren TWV bei M654 gleich hinter dem konservierten Tryptophan (W653) in dem Walker B Motiv der ersten ATP-Bindungsdomäne. c.1960-1961insCAGTGTGGA konnte ebenfalls bei einem amerikanischen Patienten heterozygot nachgewiesen werden (Portsteffen et al. 1997, Reuber et al. 1997). Unsere beiden Patienten zeigten in der Immunfluoreszenzfärbung der Fibroblasten ein Mosaik. Eine Korrelation zwischen dem außergewöhnlich milden Krankheitsverlauf und den biochemischen Parametern ergab sich jedoch nicht. Der ältere der beiden Patienten ist jetzt knapp 24 Jahre, der jüngere zehn Jahre und sechs Monate alt. Diese Mosaikpatienten zeigen die typischen Dysmorphiezeichen von PBD-Patienten. Das außergewöhnlich lange Überleben dieser zwei Patienten ist vermutlich auf den Mosaikbefund zurückzuführen, bei dem neben Zellen mit Entwicklungsstörungen von Peroxisomen Zellen mit funktionstüchtigen Peroxisomen nachweisbar sind. Eine andere

Möglichkeit ist, daß das 9bp-Insertion-Allel ebenso wie G843D ein PEX1-Protein bildet, dessen Funktion in der Peroxisomenbildung teilweise erhalten ist.

Bei zwei Patientinnen unserer Studie wurde die bisher in der in der Literatur nicht beschriebene 190bp-Deletion c.2227-2416del gefunden. Es handelt sich um eine Deletion des kompletten Exon 14, d.h. der Aminosäuren E743 bis E805 und des nachfolgenden Nukleotids A in Position c.2416, die zu einem Frameshift führt. Die Deletion liegt zwischen den beiden ATP-Bindungsdomänen. Es kommt zwei Aminosäuren nach der Deletion zu einem vorzeitigen Kettenabbruch, die damit den Verlust der zweiten ATP-Bindungsdomäne bedingt. Das läßt vermuten, daß diese Deletion eine schwerwiegende Störung der Peroxin 1-Funktion zur Folge hat. Eine der beiden Patientinnen wies die 190bp-Deletion homozygot auf, sie verstarb im Alter von einem Monat nach einem rasch progredienten Krankheitsverlauf. Bei der zweiten Patientin konnte neben der 190bp-Deletion, die heterozygot vorlag, bisher keine weitere Mutation detektiert werden. Die Patientin wies ebenfalls ein Mosaik in der Katalasefärbung auf und zeigt einen milden Krankheitsverlauf. Sie ist vier Jahre alt. Die zweite bei ihr vorliegende und noch unbekannt Mutation müßte damit einen mildernden Effekt auf den Phänotyp haben, oder aber der Mosaizismus ist für den bei einer Deletion unerwartet milden Verlauf der Erkrankung verantwortlich.

Alle von uns im *PEX1*-Gen gefundenen Mutationen, mit Ausnahme der Nonsense-Mutation Y1126X, liegen innerhalb der Sequenz, die für den Proteinabschnitt mit den beiden ATP-Bindungsdomänen kodiert. Das Peroxin 1 stellt wahrscheinlich ATP für den Import peroxisomaler Membranproteine zur Verfügung. Mutationen im Bereich der für die AAA-Bindungsdomänen kodierenden *PEX1*-Sequenzen können zu Struktur-veränderungen der ATP-Bindungsstelle führen und eine Störung der ATP-Bindung und -Hydrolyse bedingen. Das energieabhängige Importsystem für peroxisomale Proteine vom Zytoplasma in die peroxisomale Matrix ist damit gestört. Das Ausmaß der Störung dieser Importfunktion scheint mutationsabhängig zu sein, da sich eine Korrelation zwischen dem klinischen Phänotyp und dem Genotyp bei PBD-Patienten der Komplementierungsgruppe 1 abzeichnet. Das G843D-Allel ist mit einer Importrestfunktion und damit mit einem milden Verlauf der Erkrankung assoziiert, während Insertionen und Deletionen zu einem vollständigen Ausfall der

Importfunktion führen und so mit schwereren Krankheitsverläufen einhergehen (Collins and Gould 1999, Gärtner et al. 1999).

### 4.3 Entstehung von Mutationen im *PEX1*-Gen

In der vorliegenden Studie konnten neben für die Erkrankung ursächlichen Mutationen auch zwei Polymorphismen im *PEX1*-Gen nachgewiesen werden. Der Polymorphismus G777G liegt in Exon 14, der Polymorphismus IVS11+142insAGAAATTTTAAGTCTT in Intron11. Interessanterweise fand sich ein Zusammenhang dieser Polymorphismen mit den zwei häufigsten *PEX1*-Mutationen G843D und c.2097-2098insT (Collins and Gould 1999). Hieraus ergibt sich eine Haplotyp-Assoziation zwischen den beiden häufigsten *PEX1*-Mutationen und den zwei oben beschriebenen Polymorphismen. Die Mutation G843D ist gekoppelt mit der GGA-Form des Polymorphismus G777G und dem Vorliegen der 16bp-Insertion in Intron 11. Im Gegensatz hierzu ist die Mutation c.2097-2098insT gekoppelt mit der GGC-Form von G777G und der Abwesenheit der 16bp-Insertion in Intron 11. Häufig vorkommende Mutationen in Erkrankungsgenen sind entweder auf „Hotspot“-Genregionen oder auf einen „Founder“-Effekt zurückzuführen.

„Hotspot“-Regionen fallen durch ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in einer eingegrenzten Region innerhalb eines Gens auf. Diese sich wiederholenden Austausche von Nukleotiden treten gewöhnlich entweder in „CpG-Islands“, einer Region mit erhöhtem Anteil an CpG-Dinukleotiden, oder in DNS-Sequenz-Motiven, die eine wichtige Rolle bei DNS-Strangbrüchen und -Reparaturmechanismen spielen („Non-CpG Point Mutation Hotspots“). Angrenzend an die „Non-CpG Point Mutation Hotspots“ treten gehäuft Trinukleotide und Tetranukleotide, wie beispielsweise CTT, TTG, CTTT und TTTG, auf (Antonarakis et al. 2001). Die *PEX1*-DNS-Sequenz zeigt im Bereich der von uns detektierten Mutationen weder CpG-Dinukleotide noch die oben aufgeführten „Non-CpG Point Mutation Hotspots“.

Der „Founder“-Effekt oder Gründereffekt beschreibt das gehäufte Vorkommen eines ungewöhnlichen genetischen Merkmals, z.B. einer Mutation, in einer Bevölkerungsgruppe, das auf einen der Begründer dieser Gruppe, den Stammvater oder die Stammutter, zurückgeführt werden kann. Ein Beispiel für einen „Founder“-Effekt ist die Phenylketonurie (PKU). Für die PKU sind in der Literatur eine Vielzahl

von für die Erkrankung ursächlichen Mutationen und Polymorphismen beschrieben für die sich eine Haplotyp-Assoziation feststellen läßt. Anhand dieser Haplotypen gelingt es, neben der Einteilung von „Founder“-Populationen auch die Migration dieser Populationen innerhalb Europas nachzuvollziehen. So findet sich bei Patienten mit PKU im Nordwesten Europas vorherrschend die Mutation R408W mit dem Haplotyp H1, wohingegen im Südosten Europas die Mutation IVSnt-11 [H6] dominiert (Scriver et al. 2001).

Das Vorkommen der in unserer Studie bei PBD-Patienten häufigsten *PEX1*-Genmutationen G843D und c.2097-2098insT mit spezifischen Haplotypen weist daraufhin, daß diese Mutationen auf unterschiedlichen Allelen entstanden und am ehesten auf einen „Founder“-Effekt zurückzuführen sind.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in allen menschlichen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten vorkommen. Die vitale Bedeutung von Peroxisomen für den menschlichen Stoffwechsel zeigen autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen mit unterschiedlichem klinischen Phänotyp, wie das Zellweger Syndrom (ZS), der infantile Morbus Refsum (IMR), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und die Rhizomelia chondrodysplasia punctata (RCDP). Bei diesen Erkrankungen werden Peroxisomen nicht oder nur unvollständig gebildet. Defekte in mehreren peroxisomalen Stoffwechselwegen sind die Folge. Komplementierungsstudien mit menschlichen Fibroblasten haben gezeigt, daß Veränderungen in mindestens 11 verschiedenen Genen zum klinisch-biochemischen Phänotyp der Patienten führen können. Mehr als die Hälfte der Patienten mit Peroxisomenbiogenesedefekten (Peroxisome Biogenesis Defects, PBD) des Zellweger-Spektrums (ZS, IMR, NALD) konnte der Komplementierungsgruppe 1 zugeordnet werden, in der Mutationsereignisse im *PEX1*-Gen vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Patienten der Komplementierungsgruppe 1 auf das Vorhandensein von Mutationen im *PEX1*-Gen untersucht. Der Genotyp der einzelnen Patienten wurde den klinischen Merkmalen und dem biochemischen Phänotyp der Patienten gegenübergestellt. Für 15 der Patienten konnten jeweils zwei veränderte *PEX1*-Allele nachgewiesen werden; bei einer Patientin gelang lediglich der Nachweis eines mutierten Allels. Es konnten acht verschiedene Mutationen detektiert werden. Die häufigste gefundene Mutation ist die Missense-Mutation G843D in Exon 15, die verantwortlich für 50% der mutierten *PEX1*-Allele ist. Die zweithäufigste in unserer Patientengruppe nachgewiesene Mutation ist die 1bp-Insertion c.2097-2098insT in Exon 13, die bei sechs von 16 Patienten detektiert werden konnte. Des Weiteren wurden zwei Nonsense-Mutationen, eine weitere Insertion und drei unterschiedliche Deletionen gefunden. Beim Vergleich des klinischen Phänotyps mit dem Genotyp der einzelnen Patienten konnte eine Korrelation festgestellt werden. Das homozygote Vorliegen der Missense-Mutation G843D ist assoziiert mit einer milden Verlaufsform der Erkrankung. Im Gegensatz dazu ist bereits das heterozygote Vorliegen der 1bp-Insertion mit einem schweren Verlauf der Erkrankung assoziiert. Ebenso gehen die anderen Insertionen und Deletionen mit einer schwer ausgeprägten Verlaufsform einher. Im Gegensatz zur festgestellten Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp konnte keine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischem Phänotyp aufgezeigt werden. Darüber hinaus fand sich eine Haplotyp-Assoziation der beiden Polymorphismen G777G und IVS11ins16bp mit den zwei häufigsten *PEX1*-Genmutationen G843D und c.2097-2098insT. Dies weist darauf hin, daß diese Mutationen auf unterschiedlichen Allelen entstanden und am ehesten auf einen „Founder“-Effekt zurückzuführen sind.



## 6 LITERATUR

Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN (2001). The Nature and Mechanisms of Human Gene Mutation. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 343-377

Aubourg P, Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Lopez J, Mandel JL (1993). Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie* 75: 293-302

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

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

Brul S, Westerveld A, Strijland A, Wanders RAJ, Schram AW, Heymans HSA, Schutgens RBH, van den Bosch H, Tager JM (1988). Genetic heterogeneity in the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and other inherited disorders with a generalized impairment of peroxisomal functions. A study using complementation analysis. *J Clin Invest* 81: 1710-1715

Chang CC, Lee WH, Moser H, Valle D, Gould SJ (1997). Isolation of the human *PEX12* gene, mutated in group 3 of the peroxisome biogenesis disorder patients. *Nature Genet* 15: 385-388

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

Danpure CJ (2001). Primary hyperoxaluria. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 3323-3367

De Duve C (1965). Functions of microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol* 27: 25A-26A

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

Dietz HC, Valle D, Francomano CA, Kendzior RJ, Pyeritz RE, Cutting GR (1993). The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* 259: 680-683

Dotz G, Braverman N, Wong C, Moser A, Moser HW, Watkins P, Valle D, Gould SJ (1995). Mutations in the PTS1 receptor gene, *PXR1*, define complementation group 2 of the peroxisome biogenesis disorders. *Nature Genet* 9: 115-124

Dotd G (2000). Unterschiedliche Mengen an PEX1 Protein reflektieren die verschiedenen Phänotypen des Zellweger-Spektrums. *Monatsschr Kinderheilkd* 148: 548

Dubois-Dalcq M, Feigenbaum V, Aubourg P (1999). The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci* 22: 4-12

Dyer JM, McNew JA, Goodman JM (1996). The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J Cell Biol* 133: 269-280

Eaton JW, Mouchou M (1995). Acatalasemia. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 2371-2383

Elgersma Y, Kwast L, van den Berg M, Snyder WB, Distel B, Subramani S, Tabak HF (1997). Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* 16: 7326-7341

Fahimi HD, Sies H, edn (1987). *Peroxisomes in Biology and Medicine* Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer Verlag

Fransen M, Brees C, Baumgart E, Vanhooren JC, Baes M, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP (1995). Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J Biol Chem* 270: 7731-7736

Fujiki Y, Rachubinski RA, Lazarow PB (1984). Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7127-7131

Garrod AE (1908): Inborn errors of metabolism (Croonian Lectures). *Lancet* 2: 1-7, 73-79, 142-148, 214-220

Gärtner J, Braun A, Holzinger A, Roerig P, Lenard HG, Roscher AA (1998). Clinical and genetic aspects of X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics* 29: 3-13

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

Gärtner J (2000). Disorders related to peroxisomal membranes. *J Inher Metab Dis* 23: 264-272

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

Gloeckner CJ, Mayerhofer PU, Landgraf P, Muntau AC, Holzinger A, Gerber JK, Roscher AA (2000). Human Adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem Biophys Res Comm* 271: 144-150

Götte K, Girzalsky W, Linkert M, Baumgart E, Kammerer S, Kunau WH, Erdmann (1998). Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol* 18: 616-628

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

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

Gould SJ, Raymond GV, Valle D (2001). The Peroxisome Biogenesis Disorders. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 3181-3217

Heim P, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gärtner J, Harzer K, Hunnemann DH, Köhler W, Kurlemann G, Kohlschütter A (1997). Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Hum Genet* 71: 475-478

Honsho M, Tamura S, Shimosawa N, Yasuyuki S, Kondo N, Yukio F (1998). Mutations in *PEX16* is causal in the peroxisome deficient Zellweger syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet* 63: 1622-1630

Imamura A, Tamura S, Shimosawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Tsukamoto T, Orii T, Kondo N, Osumi T, Fujiki Y (1998). Temperature-sensitive mutation in *PEX1* moderates the phenotypes of peroxisome deficiency disorders. *Hum Mol Genet* 7: 2089-2094

James GL, Goldstein JL, Pathak RK., Brown MS (1994). PxF, a prenylated protein of peroxisomes. *J Biol Chem* 269: 14182-14190

Kindl H, Lazarow PB, eds (1982). Peroxisomes and Glyoxysomes. *Ann NY Acad Sci* 386: 5-59

Lazarow PB, Robbi M, Fujiki Y, Wong L (1982). Biogenesis of peroxisomal protein in vivo and in vitro. *Ann NY Acad Sci* 386: 285-300

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

Liu Y, Björkman J, Urquhart A, Wanders RJA, Crane DI, Gould SJ (1999). Pex13 is mutated in complementation group 13 of the peroxisome biogenesis disorders. *Am J Hum Genet* 65: 621-634

Matsuzono Y, Kinoshita N, Tamura S, Shimosawa N, Hamasaki M, Ghaedi K, Wanders RJA, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y (1999). Human *PEX19*: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2116-2121

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

McCammon MT, McNew JA, Willy PJ, Goodman JM (1994). An internal region of the peroxisomal membrane protein PMP47 is essential for sorting to peroxisomes. *J Cell Biol* 124: 915-925

McGuinness MC, Moser AB, Moser HW, Watkins PA (1990). Peroxisomal disorders: complementation analysis using  $\beta$ -oxidation of very long chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 364-369

Moser A, Rasmussen M, Naidu S, Watkins P, McGuinness M, Hajra A, Chen G, Raymond G, Liu A, Gordon D, Garnaas K, Walton D, Okjeldal O, Guggenheim M, Jackson L, Elias E, Moser H (1995). Phenotype of patients with peroxisomal disorders subdivided into sixteen complementation groups. *J Pediatr* 127: 13-22

Moser HW (1997). Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 120: 1485-1508

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001). X-linked Adrenoleukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 3257-3301

Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Koschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361: 726-730

Motley AM, Hetteema EH, Hogenhout EM, Brites P, ten Asbroek ALMA, Wijburg FA, Baas F, Heijmans HS, Tabak HF, Wanders RJA, Distel B (1997). Rhizomelic chondrodysplasia punctata is a peroxisomal protein targeting disease caused by a non-functional PTS2 receptor. *Nature Genet* 15: 377-380

Muntau AC, Mayerhofer PU, Paton BC, Kammerer S, Roscher AA (2000). Defective Peroxisome Membrane Synthesis Due To Mutations in Human *PEX3* Causes Zellweger Syndrome, Complementation Group G. *Am J Hum Gen* 67: 967-975

Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE Jr (1999). Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 20: 1177-1185

Okumoto K, Shimozawa N, Kawai A, Tamura S, Tsukamoto T, Osumi T, Moser H, Wanders RJA, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y (1998). *PEX12*, the pathogenic gene of group III Zellweger syndrome: cDNA cloning by functional complementation on a CHO cell mutant, patient analysis, and characterization of Pex12p. *Mol Cell Biol* 18: 4324-4336

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770

Orkin SH, Markham AF, Kazazian HH (1983). Direct detection of the common mediterranean  $\beta$ -thalassemia gene with synthetic DNA probes. *J Clin Invest* 71: 775-782

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

Poulos A (1995). Very long chain fatty acids in higher animals – a review. *Lipids* 30: 1-14

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

Reuber BE, Germain-Lee E, Collins CS, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D, Gould, SJ (1997). Mutations in *PEX1* are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *Nature Genet* 15: 445-448

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

Roels F (1991). Peroxisomes in human tissues. In *Peroxisomes, a personal account*, F Roels, ed (Brussel: VUB Press), 23-44

Roscher AA, Hoefler S, Hoefler G, Paschke E, Paltauf F, Moser A, Moser H (1989). Genetic and phenotypic heterogeneity in disorders of peroxisome biogenesis – a complementation study involving cell lines from 19 patients. *Pediatr Res* 26: 67-72

Sanger F, Nickler S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

Santos MJ, Imanaka T, Shio H, Lazarow PB (1988). Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem* 263: 10502-10509

Santos MJ, Kawada ME, Espeel M, Figueroa C, Alvarez A, Hidalgo U, Metz C (1994). Characterization of human peroxisomal membrane proteins. *J Biol Chem* 269: 24890-24896

Scriver CR, Kaufman S (2001). Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 1667-1724

Schram AW, Strijland A, Hashimoto T, Wanders RJA, Schutgens RBH, van den Bosch H, Tager JM (1986). Biosynthesis and maturation of peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes in fibroblasts in relation to the Zellweger syndrome and infantile Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6156-6158

Shimozawa N, Tsukamoto T, Suzuki Y, Orii T, Shirayoshi Y, Mori T, Fujiki Y (1992). A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science* 255: 1132-1134

Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Imamura A, Toyama R, Mukai S, Fujiki Y, Tsukamoto T, Osumi T, Orii T, Wanders RJ, Kondo N (1999). Nonsense and temperature-sensitive mutations in *PEX13* are the cause of complementation group H of peroxisome biogenesis disorders. *Hum Mol Genet* 8: 1077-1083

Siemerling E, Creutzfeldt HG (1923). Bronzekrankheit und sklerosierende Encephalomyelitis. *Arch Psychiatrie* 68: 217-244

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

South ST, Sacksteder KA, Li X, Liu Y, Gould SJ (2000). Inhibitors of COP II and COP II do not block *PEX3*-mediated peroxisome synthesis. *J Cell Biol* 149: 1345-1359

Suzuki Y, Orii T, Takiguchi M, Mori M, Hijikata M, Hashimoto T (1987). Biosynthesis of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes. *J Biochem* 101: 491-496

Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* 10: 3255-3261

Swinkels BW, Gould SJ, Subramani S (1992). Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett* 305: 133-136

Tager JM, van der Beek WATH, Wanders RJA, Hashimoto T, Heymans HSA, van den Bosch H, Schutgens RBH, Schram AW (1985). Peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzyme proteins in Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 1269-1275

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

Tsukamoto T, Miura S, Nakai S, Yokota S, Shimozawa N, Suzuki Y, Orii T, Fujiki Y, Sakai F, Akemi B, Yasumo H, Osumi T (1995). Peroxisome assembly factor-2, a putative ATPase cloned by functional complementation on a peroxisome deficient mammalian cell mutant. *Nat Genet* 11: 395-401

van den Bosch H, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 61: 157-197

van Geel BM, Assies J, Weverling GJ, Barth PG (1994). Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in the Netherlands: a survey of 30 kindreds. *Neurology* 44: 2343-2346

Verhoeven NM, Roe DS, Kok RM, Wanders RJA, Jakobs C, Roe CR (1998). Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 39: 66-74

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ and Gay NJ (1982). Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 8: 945-951

Wanders RJA, Kos M, Roest B, Meijer AJ, Schrakamp G, Heymans HSA, Tegelaers WHH, van den Bosch H, Schutgens RBH, Tager JM (1984). Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 1054-1061

Wanders RJA, Schutgens RBH, Tager JM (1985). Peroxisomal matrix enzymes in Zellweger syndrome: activity and subcellular localization in liver. *J Inher Metab Dis* 8: 151-152

Wanders RJA, Barth PG, Heymans HSA (2001). Single peroxisomal enzyme deficiencies. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle, edn (New York: McGraw-Hill Information Services Company), 3219-3256

Warren DS, Morrel JC, Moser HW, Valle D, Gould, SJ (1998). Identification of *PEX10*, the gene defective in complementation group 7 of the Peroxisome-Biogenesis Disorders. *Am J Hum Genet* 63: 347-359

Waterham HR, Titorenko VI, Swaving GJ, Harder W, Veenhuis M (1993). Peroxisomes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* do not necessarily derive from pre-existing organelles. *EMBO J* 12: 4785-4794

Wiemer EAC, Nuttley WM, Bertolaet, BL, Li X, Francke U, Wheelock MJ, Anne UK, Johnson KR, Subramani S (1995). Human peroxisomal targeting signal-1 receptor restores peroxisomal protein import in cells from patients with fatal peroxisomal disorders. *J Cell Biol* 130: 51-65

Yahraus T, Braverman N, Dodt G, Kalish JE, Morrell JC, Moser HW, Valle D, Gould SJ (1996). The peroxisome biogenesis disorder group 4 gene, PXAAA1, encodes a cytoplasmic ATPase required for stability of the PTS1 receptor. *EMBO J* 15: 2914-2923

# ANHANG

**Tabelle I: Oligonukleotide für die Amplifikation und die Sequenzierung der genomischen DNS des *PEX1*-Gens.**

Exon	Produktgröße (bp)	Primer sense		Primer antisense		Annealingtemperatur
		5'-Sequenz-3'	Position	5'-Sequenz-3'	Position	
1	257	cgatcctctccggctccg	IVS0(-32)-(-15)	ggctgaagatcaggtggc	IVS1(+36)-(+19)	54°C
2	266	catgtgaattgaataatag	IVS1(-87)-(-68)	tagaagaaagtattgcc	IVS2(+30)-(+13)	50°C
3	262	catagactacatacac	IVS2(-140)-(-123)	ccttaaatgagatagttc	IVS3(+35)-(+18)	47°C
4	217	ctagatatggagtggac	IVS3(-57)-(-41)	gctatagtgtagaatag	IVS4(+44)-(+27)	50°C
5	315	gaatgtgcactaatgagc	IVS4(-33)-(-16)	gcttcctatcatagtc	c.737-753	50°C
5	321	cagttgactcatcatag	c.707-724	gctttggagaaagtagc	c.1011-1027	50°C
5	301	gctttactgtgacatattg	c.980-998	gccacataaaatttctcc	IVS5(+41)-(+24)	50°C
6	264	caactaaattcatagaagc	IVS5(-102)-(-84)	cgtgtaaaagaattttg	IVS6(+42)-(+26)	47°C
7	252	gtaagtgcagatagagg	IVS6(-49)-(-31)	gtatgacaggttgcaag	IVS7(+78)-(+62)	60°C
8	244	gtttcagactaactctgc	IVS7(-43)-(-25)	cacttcacaatgcaaggtg	IVS8(+96)-(+78)	50°C
9	180	gacccgagaaaaacatgc	IVS8(-68)-(-51)	ctaacatgctagttggc	IVS9(+31)-(+14)	50°C
10	261	cagctctttatcatgtaac	IVS9(-37)-(-19)	caccctatataatagatgg	IVS10(+90)-(+72)	52°C
11	239	ggttgccacaatgacag	IVS10(-71)-(-51)	gcattatgtataacattcc	IVS11(+68)-(+50)	50°C
12	249	cagcactgaaatgatactg	IVS11(-44)-(-26)	caagacctaagccagtg	IVS12(+32)-(+15)	50°C
13	220	gcttttgcactatatgc	IVS12(-27)-(-10)	ggacataaattcaataatcc	IVS13(+39)-(+21)	50°C
14	273	cagttgaatacaattgg	IVS13(-44)-(-28)	gaagattccaagttcag	IVS14(+37)-(+21)	50°C
15	297	ccagctaagatgatggc	IVS14(-80)-(-64)	cagtggtcttctgggag	IVS15(+80)-(+60)	56°C
16	286	gctgctacttagtcatttctg	IVS15(-64)-(-44)	gccagtgaatttacactttg	IVS16(+34)-(+15)	54°C
17	254	catttagacttagtcag	IVS16(-75)-(-59)	cataaaccacaggtttc	IVS17(+96)-(+112)	47°C
18	320	cacttgccaactatgaag	IVS17(-54)-(-36)	ggcgactagtagcagcc	c.2940-2957	54°C
19	262	caaaatgcatcatgtc	IVS18(-54)-(-38)	gctggctcttaaggac	IVS19(+99)-(+107)	51°C
20	284	gaaaatcataagatacac	IVS19(-75)-(-58)	gtcataacaactcctc	IVS20(+30)-(+14)	50°C
21	295	ctttaaactggttgcc	IVS20(-30)-(-14)	cagaactgtataatgatg	IVS21(+32)-(+15)	50°C
22	285	ccatcttcattactac	IVS21(-30)-(-14)	ggtgaaacaattttaag	IVS22(+56)-(+39)	50°C
23	252	gtaacaactggactaccac	IVS22(-73)-(-55)	gtcactgtaatagtagctg	IVS23(+48)-(+29)	54°C
24	286	gccacaatccattatc	IVS23(-73)-(-57)	cagtattaatctcaatcc	c.4013-4030	50°C
24	345	gctataattatgtaatg	c.3992-4008	gaattatgtgtaatttc	IVS24(+26)-(+8)	47°C

f: forward

r: reverse

bp: Basenpaare

**Tabelle II: Oligonukleotide für die Amplifikation und die Sequenzierung der cDNS des *PEX1*-Gens.**

Exon	Produktgröße (bp)	Primer sense		Primer antisense		Annealingtemperatur
		5'-Sequenz-3'	Position	5'-Sequenz-3'	Position	
1+ 2	267	gaacccagagggacgctc	c.(-25) - (-8)	ccaactgtctgtaattc	c.223-242	50°C
2,3+4	283	gatcaaggtgaaaatgtg	c.202-219	gtattagtcaacaattg	c.466-484	52°C
4+5	294	catcttctagatcaaattc	c.384-403	caactggaatctctgactc	c.694-712	50°C
5	312	ctgtgggaatcactgaatc	c.665-683	gctctacatcaaaatattc	c.958-976	50°C
5	310	cataaacactgtgccattc	c.919-937	caagatggagaactctac	c.1210-1228	54°C
5,6+7	285	cttgaagaattgaacaatg	c.1171-1189	ctctgatattaccaagg	c.1435-1452	50°C
7,8,9+10	297	ctacagcagtctactacc	c.1408-1425	ctccaaggaggatacgcc	c.1687-1704	54°C
10,11+12	291	gctgagctcttgggagg	c.1656-1673	gtgaaagccacctctagg	c.1929-1946	52°C
11,12+13	295	gactgtaaagctttacgag	c.1882-1900	gagcagaaacaagtaaga	c.2159-2176	52°C
13,14+15	305	gtcagctcagcaatctc	c.2135-2152	gtccaatgtgttaaac	c.2422-2439	50°C
15+16	294	gtcagagtatatccaccag	c.1393-2411	gtgcaattacccagctag	c.2668-2686	50°C
16,17+18	293	ggaatactgttztatggtc	c.2626-2644	ccttctactcatccaac	c.2901-2918	52°C
19+20	291	gtagttaaccagttgctg	c.2878-2895	caattggcattgtaaag	c.3151-3168	50°C
20+21	286	ctttactggagctgatctg	c.3123-3141	ctgattcataagagcttcc	c.3391-3409	52°C
21+22	285	caatatgtaccggctctac	c.3369-3387	gttcatggattcgtcctc	c.3637-3654	52°C
22,23+24	301	caaaggcagataccggag	c.3609-3626	caacatatggaaaagccatc	c.3891-3910	52°C

bp: Basenpaare

**Tabelle III: Oligonukleotide für die Amplifikation von Regionen des *PEX1*-Gens zur allelspezifischen Oligonukleotidhybridisierung.**

Mutation	Exon	Prod.-gr. (bp)	Primer sense		Primer		Ann.-temp.
			5'-Sequenz-3'	Position	5'-Sequenz-3'	Position	
G843D	15	99	gcgaagtgtcaacctgc	c.2418-2434	ggtaactggatagtatcc	c.2499-2516	50°C
c.2097-2098insT	13	220 295	gctttgcactatatgc gactgtaaagctttacgag	Ex13,f.bp(-27)-bp(-10) c.1882-1900	ggacataattcaataatcc gagcagaaacaagtaaga	Ex13,r.bp(-39)-bp(-21) c.2159-2176	50°C 52°C
G777G	14	85	gttcaccgatcttgacc	c.2229-2245	ggctcgatccacaagtac	c.2996-2313	50°C

Prod.-gr.: Produktgröße

bp: Basenpaare

Ann.-temp.: Annealingtemperatur

**Tabelle IV: Oligonukleotide für die allelspezifische Oligonukleotidhybridisierung (ASO).**

Mutation	Exon	ASO Wildtyp			ASO Mutante/Polymorphismus	
		5'-Sequenz-3'	Position	Tm	5'-Sequenz-3'	Tm
G843D	15	aagattggtgggtt	c.2461-2474	40°C	aagattgatgggtt	38°C
c.2097-2098insT	13	taaaagagtttatctccat	c.2087-2105	46°C	taaaagagtttatctcca	46°C
G777G	14	aactggagggtttg	c.2285-2298	42°C	aactggcgggtttg	44°C





## LEBENS LAUF

Name: Natalie Preuß  
Geburtsdatum und –ort: 13. Oktober 1971 in Hilden  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1978–1982 Städt. Grundschule Meigen, Solingen  
1982–1991 Städt. Gymnasium August-Dicke-Schule, Solingen  
19. Juni 1991 Abitur

### Berufsausbildung

März–September 1992 Tätigkeit als Krankenpflegepraktikantin und –helferin  
im Städt. Krankenhaus Solingen  
Oktober 1992–März 1993 Beginn der Ausbildung zur Krankenschwester  
im Städt. Krankenhaus Solingen  
1993–1998 Aushilfstätigkeit als Krankenpflegehelferin  
Städt. Krankenhaus Solingen und Zentrum für  
Innere Medizin, Universitätsklinik Düsseldorf

### Universitätsausbildung

Wintersemester 1991/92 Studium der Betriebswirtschaftslehre,  
Gesamthochschule Siegen  
März 1993 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der  
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf  
September 1995 Ärztliche Vorprüfung  
August 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
März 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Mai 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufliche Tätigkeit

seit August 2000 Ärztin im Praktikum, Zentrum für Kinderheilkunde der  
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

## **Zusammenfassung – Peroxisomenbiogenesedefekte: Klinische und molekulare Charakterisierung von Patienten** vorgelegt von Natalie Preuß

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in allen menschlichen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten vorkommen. Die vitale Bedeutung von Peroxisomen für den menschlichen Stoffwechsel zeigen autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen mit unterschiedlichem klinischen Phänotyp, wie das Zellweger Syndrom (ZS), der infantile Morbus Refsum (IMR), die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und die Rhizomelia chondrodysplasia punctata (RCDP). Bei diesen Erkrankungen werden Peroxisomen nicht oder nur unvollständig gebildet. Defekte in mehreren peroxisomalen Stoffwechselwegen sind die Folge. Komplementierungsstudien mit menschlichen Fibroblasten haben gezeigt, daß Veränderungen in mindestens 11 verschiedenen Genen zum klinisch-biochemischen Phänotyp der Patienten führen können. Mehr als die Hälfte der Patienten mit Peroxisomenbiogenesedefekten (Peroxisome Biogenesis Defects, PBD) des Zellweger-Spektrums (ZS, IMR, NALD) konnte der Komplementierungsgruppe 1 zugeordnet werden, in der Mutationsereignisse im *PEX1*-Gen vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Patienten der Komplementierungsgruppe 1 auf das Vorhandensein von Mutationen im *PEX1*-Gen untersucht. Der Genotyp der einzelnen Patienten wurde den klinischen Merkmalen und dem biochemischen Phänotyp der Patienten gegenübergestellt. Für 15 der Patienten konnten jeweils zwei veränderte *PEX1*-Allele nachgewiesen werden; bei einer Patientin gelang lediglich der Nachweis eines mutierten Allels. Es konnten acht verschiedene Mutationen detektiert werden. Die häufigste gefundene Mutation ist die Missense-Mutation G843D in Exon 15, die verantwortlich für 50% der mutierten *PEX1*-Allele ist. Die zweithäufigste in unserer Patientengruppe nachgewiesene Mutation ist die 1bp-Insertion c.2097-2098insT in Exon 13, die bei sechs von 16 Patienten detektiert werden konnte. Des Weiteren wurden zwei Nonsense-Mutationen, eine weitere Insertion und drei unterschiedliche Deletionen gefunden. Beim Vergleich des klinischen Phänotyps mit dem Genotyp der einzelnen Patienten konnte eine Korrelation festgestellt werden. Das homozygote Vorliegen der Missense-Mutation G843D ist assoziiert mit einer milden Verlaufsform der Erkrankung. Im Gegensatz dazu ist bereits das heterozygote Vorliegen der 1bp-Insertion mit einem schweren Verlauf der Erkrankung assoziiert. Ebenso gehen die anderen Insertionen und Deletionen mit einer schwer ausgeprägten Verlaufsform einher. Im Gegensatz zur festgestellten Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp konnte keine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischem Phänotyp aufgezeigt werden. Darüber hinaus fand sich eine Haplotyp-Assoziation der beiden Polymorphismen G777G und IVS11ins16bp mit den zwei häufigsten *PEX1*-Genmutationen G843D und c.2097-2098insT. Dies weist darauf hin, daß diese Mutationen auf unterschiedlichen Allelen entstanden und am ehesten auf einen „Founder“-Effekt zurückzuführen sind.