

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Geschäftsführender Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. U. Göbel

**X-chromosomale Adrenoleukodystrophie**  
Auswirkungen der Blutstammzelltransplantation  
auf den Genotyp und die Proteinexpression  
in unterschiedlichen Hirnregionen und extraneuralen Geweben

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von  
Stefan Schönberger  
2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg (Dekan)  
Referent: Privatdozent Dr. med. Dominik Schneider  
Korreferent: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

# Danksagung

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

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger für die Übernahme des Koreferates und die Unterstützung in der Beurteilung der durchgeführten immunhistochemischen Arbeiten.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Göbel und Herrn PD Dr. med. Dominik Schneider für die hilfreichen Beiträge zur Diskussion und für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Für die Überlassung der klinisch-biochemischen Daten einzelner Patienten danke ich Herrn Dr. Weschke und Herrn PD Dr. med. Ebell vom Virchow-Klinikum in Berlin.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die spontane Hilfe im Laboralltag danken. Hervorheben möchte ich Frau Mähler, deren kompetente Ratschläge für mich stets von großem Wert waren.

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

Für meine Eltern.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Historische Perspektive	1
1.2. peroxisomale Stoffwechselerkrankungen	2
1.3. X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD)	5
1.3.1. Historie	5
1.3.2. klinische Präsentation	6
1.3.3. Diagnostik	8
1.3.4. Therapie	9
1.3.5. Genetik	11
1.3.6. Pathogenese und Histopathologie	13
<b>2. Patienten, Materialien und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1. Untersuchungsmaterialien der Patienten	15
2.2. Materialien	18
2.2.1. Kulturmedien	18
2.2.2. Antikörper (AK)	18
2.2.3. Oligonukleotidprimer	20
2.2.4. Chemikalien	21
2.2.5. Apparaturen	21
2.3. Umgang mit Bakterienzellen	21
2.3.1. Kultivierung von Escherichia coli	21
2.3.2. Transformation von kompetenten One Shot INVaF' Zellen mit anschließender Blau-Weiß-Selektion	22
2.4. Umgang mit Fibroblasten	22
2.4.1. Anlegen von Fibroblasten-Primärkulturen aus Hautbiopsien	22
2.4.2. Kultivierung von Fibroblasten	23
2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten	23
2.5. Umgang mit Paraffingewebe	24
2.5.1. Fixierung von Kulturzellen in Paraffingewebe	24
2.5.2. Anfertigung von Paraffingewebeschnitten	24
2.5.3. Laserdissektion von Paraffingewebeschnitten	25
2.5.4. Immunhistochemische Färbungen	25

<b>2.6. Präparative Methoden</b>	<b>26</b>
2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA _____	26
2.6.2. Isolierung genomischer DNA _____	26
2.6.2.1. Extraktion von genomischer DNA aus EDTA-Blut	26
2.6.2.2. Extraktion von genomischer DNA aus Fibroblasten	27
2.6.2.3. Extraktion von genomischer DNA aus Paraffingewebe	27
2.6.2.4. Extraktion von genomischer DNA aus laserdisseziertem Paraffingewebe	28
2.6.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen _____	28
2.6.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Säulenchromatographie _____	28
<b>2.7. Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von DNA</b>	<b>28</b>
<b>2.8. Enzymatische Reaktionen</b>	<b>29</b>
2.8.1. Ligation _____	29
2.8.2. Restriktionsverdau _____	29
2.8.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	29
2.8.3.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 60 bis 400 bp	29
2.8.3.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge bis zu 3000 bp	30
2.8.4. Sequenzierung _____	31
<b>2.9. Gelelektrophoretische Methoden</b>	<b>32</b>
2.9.1. Agarosegelelektrophorese _____	32
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Klinische und biochemische Phänotypen</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Der genetische Defekt</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Auswirkungen der Stammzelltransplantation auf den Genotyp</b>	<b>42</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Der genetische Defekt</b>	<b>54</b>
<b>4.2. Auswirkungen der Stammzelltransplantation</b>	<b>56</b>
4.2.1. Auswirkungen auf den Phänotyp _____	56
4.2.2. Auswirkungen auf die Expression des ALD-Proteins (ALDP) _____	57
4.2.3. Überlegungen zum pathophysiologischen Mechanismus _____	60
<b>4.3. Ausblick</b>	<b>62</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. *Historische Perspektive*

„Inborn errors of metabolism“ - Dieser heute noch gebräuchliche Ausdruck wurde Anfang letzten Jahrhunderts durch den englischen Arzt Sir Archibald Garrod geprägt (Garrod 1908). Seine wegweisenden Untersuchungen über die Alkaptonurie bildeten die Grundlage für das bis heute erlangte molekularbiologische Verständnis der Physiologie des Menschen.

Garrod hatte damals den Urin von Patienten mit Alkaptonurie analysiert und festgestellt, daß seine Patienten große Mengen an Homogentisinsäure ausschieden, die normalerweise nur als Spur im Urin nachweisbar ist. Zudem beobachtete er, daß diese Erkrankung familiär gehäuft auftrat. Aufbauend auf den Gesetzen von Gregor Mendel und seinen eigenen biochemischen Untersuchungen kam Garrod zu dem bemerkenswerten Schluß, daß die Alkaptonurie autosomal-rezessiv vererbt wird und auf eine Veränderung desjenigen Proteins welches Homogentisinsäure abbaut zurückzuführen ist. Garrod hatte erkannt, daß der Mensch neben seinem äußeren Erscheinungsbild (Phänotyp) eine chemische Individualität (Chemotyp) besitzt, die durch angeborene (Genotyp) und äußere Faktoren (Umwelt) determiniert wird.

Die rasante Entwicklung molekularbiologischer Techniken in den letzten zwei Jahrzehnten hat in eindrucksvoller Weise bestätigt, daß der Genotyp den Chemo- und Phänotyp des Menschen maßgeblich bestimmt. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und der zunehmenden Identifizierung verschiedener Genotypen sind die gewonnenen Informationen für die Diagnosestellung sowie für therapeutische Ansätze zugänglich geworden. Dabei besteht in der Transplantation von genotypisch differenten (allogenen) Stammzellen eine potentielle Heilungsmöglichkeit für Patienten mit bestimmten Stoffwechselerkrankungen. Darüber hinaus werden Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, diese durch Transplantation von gentechnisch veränderten autologen Stammzellen zu ersetzen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Geno- und Phänotypen in einer durch eine angeborene Stoffwechselstörung namens X-ALD (X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie) betroffenen Familie und analysiert die Auswirkungen einer

allogenen Stammzelltransplantation auf den Geno- und Phänotyp sowie die Proteinexpression.

## **1.2. Peroxisomale Stoffwechselerkrankungen**

Bei der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (X-ALD) handelt es sich um eine die Peroxisomen betreffende angeborene Stoffwechselerkrankung.

Peroxisomen sind Zellorganellen, die in fast allen Eukaryontenzellen vorkommen und von einer einfachen Organellmembran umhüllt sind. Sie sind als letztes bekanntes Säugetierorganell im Jahre 1954 durch Rhodin entdeckt worden, der sie bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Nierentubuluszellen von Mäusen beobachtete und sie als „Microbodies“ bezeichnete (Rhodin 1954). Die eigentliche Bezeichnung als „Peroxisom“ wurde von De Duve und Baudhuin elf Jahre später eingeführt. Diese Bezeichnung geht auf den Gehalt an zelltoxischen Wasserstoffperoxiden zurück, die durch Oxidasen gebildet und in den entdeckten Kompartimenten durch Katalasen abgebaut werden (De Duve 1966).

Peroxisomen sind in unterschiedlicher Anzahl, Form und Größe gewebsspezifisch verteilt, wobei Leber- und Nierengewebe besonders peroxisomenreich, Fibroblasten und Amnionzellen im Vergleich eher arm an Peroxisomen sind (Roels 1991). Die Organellmembran besteht aus peroxisomenspezifischen integralen Membranproteinen (Santos et al. 1994), neben denen membranassoziierte peroxisomale Proteine existieren, deren Funktion bislang weitgehend unbekannt ist (James et al. 1994; Gotte et al. 1998). Die peroxisomale Matrix enthält mehr als 50 Enzyme für anabolische und katabolische Stoffwechselwege (Kindl und Lazarow 1982; Fahimi und Sies 1987; van den Bosch et al. 1992; Gould et al. 2001). Dabei zählen die Cholesterolf- und Gallensäuresynthese, die Plasmalogenbiosynthese sowie die Gluconeogenese zu den anabolischen Stoffwechselwegen, während der Abbau von Wasserstoffperoxiden, Purinen, Aminosäuren, überlangkettigen Fettsäuren, Pipicolinsäure und Phytansäure zu den katabolischen Stoffwechselwegen zu zählen ist (Fahimi und Sies 1987; Gould et al. 2001).

Peroxisomale Membran- und Matrixproteine werden im Zytoplasma an freien Polyribosomen synthetisiert und bis auf wenige Ausnahmen in ihrer reifen Form und nicht als Vorstufen über einen ATP-abhängigen Mechanismus in die Peroxisomen transportiert (Suzuki et al. 1987; Subramani 1993). Dabei dienen beim Import von peroxisomalen Matrixproteinen ein Tripeptid (Serin-Lysin-Leucin und Varianten) am



carboxyterminalen oder eine Gruppe von Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Proteins als Erkennungssignal. Diese Sequenzen werden als Peroxisomal Targeting Sequence (PTS) 1 bzw. 2 bezeichnet (Gould et al. 1988; Gould et al. 1989; Swinkels et al. 1991; Swinkels et al. 1992). Die Bildung von neuen Peroxisomen erfolgt in der Regel durch Teilung bereits bestehender Peroxisomen (Lazarow und Fujiki 1985), in aktuelleren Untersuchungen wurde aber auch eine de novo-Synthese beschrieben (Waterham et al. 1993; South und Gould 1999).

Die autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbten peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen liegen u.a. in einer Störung der Peroxisomenbiogenese und des oben beschriebenen Importmechanismus begründet und können in zwei Gruppen (I und II, Tabelle 1) eingeteilt werden. Während bei Erkrankungen der Gruppe I Peroxisomen nicht oder nur sehr unvollständig gebildet werden (Peroxisomenbiogenesedefekte = PBD), liegt bei Erkrankungen der Gruppe II ein isolierter Defekt eines peroxisomalen Stoffwechselweges bei ansonsten regelrechter Peroxisomenstruktur und -funktion vor.

Tabelle 1: Einteilung peroxisomaler Stoffwechselerkrankungen

Gruppe I	Gruppe II
Entwicklungsstörungen von Peroxisomen (Peroxisomenbiogenesedefekte = PBD)	isolierte Defekte peroxisomaler Stoffwechselwege
<b>Neonatale Adrenoleukodystrophie</b>	<b>X-chromosomale Adrenoleukodystrophie</b>
<b>Infantiler Morbus Refsum</b>	<b>Hyperoxalurie Typ I</b>
<b>Rhizomelia Chondrodysplasia Punctata</b>	<b>Glutarazidurie Typ III</b>
<b>Zellweger-Syndrom</b>	<b>Morbus Refsum</b>
<b>Atypisches Zellweger-Syndrom</b> („Pseudozellweger-Syndrom“)	<b>β-Oxidationsdefekte</b>
	<b>andere</b>

Das zerebrohepatorenale oder Zellweger Syndrom (ZS) ist als Prototyp der Gruppe I (der PBD) anzusehen (Gould et al. 2001). Bei Patienten mit PBD wurde beobachtet, daß die meisten der im Zytoplasma synthetisierten peroxisomalen Matrixenzyme nicht in peroxisomenähnliche Vesikel importiert werden. Dabei bleiben die Matrixenzyme im Zytoplasma nachweisbar (Wanders et al. 1984; Tager et al. 1985;

Wanders et al. 1985; Schram et al. 1986; Santos et al. 1988). Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, daß den PBD ein Fehler im Importmechanismus peroxisomaler Matrixproteine zugrunde liegt, und daß dabei der Peroxisomenmembran eine Schlüsselrolle in diesem Prozeß zukommt.

Die Erkrankungen der Gruppe II (s. Tabelle 1) werden mit Ausnahme der X-ALD autosomal rezessiv vererbt und besitzen in Europa und den USA eine geschätzte Inzidenz von 1:100.000 Neugeborenen. Die Diagnose dieser Erkrankungen erfolgt durch die biochemische Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität oder der Konzentration der Substanzen im Serum, die als Folge des Enzymdefektes in einem peroxisomalen Stoffwechselweg nicht abgebaut werden können. Im Gegensatz zu der Hyperoxalurie Typ I, der Glutarazidurie Typ III und der Akatalasämie, bei denen ein zugrunde liegender Enzymdefekt bereits nachgewiesen werden konnte (Eaton und Mouchou 1995; Danpure 2001; Wanders et al. 2001), liegt bei der ebenfalls zu der Gruppe II zugehörigen X-ALD kein Enzymdefekt vor (Aubourg et al. 1993; Mosser et al. 1993).

## **1.3. X-chromosomale Adrenoleukodystrophie (X-ALD)**

### **1.3.1. Historie**

Im Jahre 1923 haben Siemerling und Creutzfeldt bei einem Patienten die Kombination einer adrenokortikalen Atrophie und einer cerebralen Demyelinisierung (Siemerling und Creutzfeldt 1923) beschrieben. Der erste publizierte Fallbericht eines Patienten mit X-ALD ist aber offensichtlich schon 1910 durch Haberfeld und Spieler erfolgt. Der bis zum Alter von sechs Lebensjahren normal entwickelte Junge wurde durch unregelmäßige Augenbewegungen und Sehstörungen auffällig. Ein schulischer Leistungsabfall war zu verzeichnen, bevor sich vier Monate später ein spastisches Gangbild entwickelte, das schließlich in einer Gangunfähigkeit mündete. Bei Aufnahme in ein Krankenhaus im Alter von 7 Lebensjahren wurde eine dunkle Verfärbung der Haut bemerkt. Acht Monate später verstarb der Patient. Sein Bruder verstarb mit 8½ Lebensjahren an einer klinisch ähnlichen Erkrankung (Haberfeld und Spieler 1910).

Der Begriff der Adrenoleukodystrophie wurde aber erst Jahrzehnte nach den Beschreibungen von Haberfeld und Siemerling eingeführt. Dabei wurden die zwei zu beobachtenden charakteristischen klinischen Merkmale der Erkrankung definiert (Blaw 1970). Der Begriff „Adreno“ beschreibt die Funktionseinschränkung der Nebennierenrinde, während der Begriff „Leukodystrophie“ den Untergang der weißen Substanz des Gehirns und Rückenmarks beschreibt. Der X-chromosomale Vererbungsmechanismus der Erkrankung wurde bereits sieben Jahre zuvor durch Fanconi entdeckt (Fanconi 1963).

Für die Zukunft wegweisende Beobachtungen gelangen in den Jahren 1974-1976, als Schaumburg und Kollegen in Zellen der Nebennierenrinde und des Cortex Lipideinschlüsse mit einem übermäßigen Anteil an überlangkettigen Fettsäuren entdeckten (Powers und Schaumburg 1974; Schaumburg et al. 1974; Johnson et al. 1976). Anfang der achtziger Jahre wurden erhöhte Konzentrationen von überlangkettigen Fettsäuren in Fibroblasten, Plasma, Erythrozyten und Amnionzellen nachgewiesen (Moser et al. 1980; Moser et al. 1981; Tsuji et al. 1981; Moser et al. 1982). Aufbauend auf diesen Untersuchungen wurden eine post- und pränatale Diagnostik entwickelt und Therapiemöglichkeiten evaluiert.

### 1.3.2. Klinische Präsentation

Mit einer in Europa und den USA geschätzten Inzidenz von 1:25.000 Neugeborenen stellt die X-ALD die häufigste peroxisomale Stoffwechselerkrankung dar. Sie kommt in allen ethnischen Gruppen vor. Bei ihr lassen sich eine Vielzahl von Erkrankungsformen unterscheiden. So werden die cerebralen Adrenoleukodystrophieformen, die Adrenomyeloneuropathie (AMN), die einfache Addison-Variante, die asymptomatische Form des Erwachsenenalters und eine in der Adoleszenz oder im Erwachsenenalter auftretende spinocerebelläre Ataxie als Varianten der X-ALD angesehen (Tabelle 2). Außerdem können Überträgerinnen symptomatisch sein. Die Zuordnung zu den jeweiligen Gruppen erfolgt nach dem Erkrankungsbeginn, den in die Erkrankung involvierten Organen und dem Progress der neurologischen Symptomatik (Moser et al. 2001).

Tabelle 2: Erkrankungsformen der X-ALD

<b>kindliche cerebrale Form</b>
Adoleszente und adulte cerebrale Form
Adrenomyeloneuropathie
Morbus Addison
Asymptomatische Form
Spinocerebelläre Ataxie
symptomatische Überträgerinnen

Etwa die Hälfte aller Patienten ist von dem häufigsten Erscheinungsbild, der kindlichen cerebralen Form betroffen. Sie gilt als die schwerste Form der Erkrankung und ist durch einen raschen Progress nach Erkrankungsbeginn charakterisiert, der meist im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt zum Tode führt. Zunächst durchlaufen die Patienten in den ersten zwei bis zehn Lebensjahren eine unauffällige psychomotorische Entwicklung, bis eine progressive neurologische Symptomatik in den Vordergrund tritt. Zu den typischen Frühsymptomen zählen Verhaltensauffälligkeiten wie Unkonzentriertheit, emotionale Labilität, Hyperaktivität und schulischer Leistungsabfall. Später folgen Hör- und Sehstörungen, Gangauffälligkeiten, Dysarthrie und Demenz. Außerdem können fokale oder

generalisierte Krampfanfälle auftreten. Eine Nebennierenrindeninsuffizienz mit dem für sie typischen klinischen Erscheinungsbild (s.u.) tritt in 80% aller Fälle auf und kann den neurologischen Symptomen vorausgehen oder diese begleiten. Im Endstadium der Erkrankung sind die Kinder aufgrund einer Optikusatrophy erblindet, und das Sprechen ist ebenfalls nicht mehr möglich (Moser et al. 2001).

Im Gegensatz zur kindlichen cerebralen Form der X-ALD werden Patienten mit der adoleszenten oder adulten cerebralen Form erst im zweiten Lebensjahrzehnt oder noch später klinisch manifest. Dabei unterscheidet sich der Verlauf nach Erkrankungsbeginn aber nicht von dem der kindlichen cerebralen Form. Auch bei diesen Formen kann eine Nebennierenrindeninsuffizienz den neurologischen Symptomen vorausgehen oder diese begleiten. Aufgrund der initial zu beobachtenden Verhaltensauffälligkeiten werden diesen Patienten oft psychiatrische Krankheitsbilder, wie z.B. die Schizophrenie, zugeordnet (Moser et al. 2001).

Ebenfalls in der zweiten Lebensdekade wird die bei ca. einem Viertel der Patienten vorkommende Adrenomyeloneuropathie (AMN) manifest. Im Gegensatz zu den cerebralen Formen der X-ALD besteht hier eine über Jahrzehnte langsam progrediente neurologische Symptomatik. Häufige Symptome der AMN sind eine Schwäche der unteren Extremitäten, Parästhesien, Blasen- und Mastdarmschwäche sowie eine gonadale Insuffizienz. Bei bis zu zwei Drittel der Patienten besteht zusätzlich eine Nebennierenrindeninsuffizienz (Moser et al. 2001).

Ungefähr ein Zehntel bis ein Fünftel aller Patienten mit X-ALD leiden lediglich unter dem Bild eines Morbus Addison ohne neurologische Beeinträchtigung. Diese Patienten weisen die typischen Hyperpigmentierungen im Bereich der Hände sowie im Mund- und Rachenraum auf.

Eine seltenere Variante der X-ALD stellt die spinozerebelläre Ataxie dar, bei der die Patienten im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt zusätzlich zu einem schon vorhandenen Morbus Addison eine Ataxie entwickeln.

Schließlich bleiben einige Patienten trotz nachgewiesenem genetischen und biochemischen Defekt ein Leben lang asymptomatisch. Sie haben weder neurologische Symptome noch eine Nebennierenrindeninsuffizienz.

Infolge ungleichförmiger X-Inaktivierung können auch weibliche Überträgerinnen des Gendefektes neurologische Symptome präsentieren, wobei die Häufigkeit und der Schweregrad der neurologischen Symptomatik mit zunehmendem Lebensalter zunimmt (Moser et al. 1991). Neben der AMN ähnlichen Symptomen wie

Hyperreflexie und Parästhesien entwickeln einige Überträgerinnen im fortgeschrittenen Alter eine progrediente Paraplegie, die häufig als klinisches Merkmal einer Multiplen Sklerose fehlgedeutet wird (Dooley und Wright 1985).

### **1.3.3. Diagnostik**

Die Diagnose der X-ALD erfolgt anhand des klinischen Erscheinungsbildes und biochemisch über den Nachweis einer erhöhten Konzentration an VLCFA. Dabei sind die Bestimmung von Lignocerinsäure (Tetracosansäure, C<sub>24:0</sub>) und Cerotinsäure (Hexacosansäure, C<sub>26:0</sub>) sowie deren Verhältnis zu Behensäure (Docasansäure, C<sub>22:0</sub>) von besonderer Bedeutung. In 85% der Fälle sind auch bei heterozygoten Überträgerinnen der Erkrankung erhöhte Konzentrationen an VLCFA nachweisbar (Moser et al. 1983; Moser et al. 1999). Ferner ergänzt die cerebrale Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) die Diagnostik, indem sie das Ausmaß der Läsionen abschätzen kann. Dabei scheint sich aus dem initialen Ausmaß der sichtbaren Veränderungen, ihrem Verteilungsmuster und dem Lebensalter des Patienten zum Zeitpunkt des MRTs eine Aussage über den weiteren Fortgang der MRT-Veränderungen treffen zu lassen (Loes et al. 2003). Außerdem zeigt die MRT-Untersuchung des Schädels nach intravenöser Gabe von Gadolinium bei aktiver Entmarkung ein für die Erkrankung pathognomonisches Gadolinium-Enhancement in den Randzonen der Läsionen. Eine Magnetresonanzspektroskopie (MRS) sollte ebenfalls ergänzend durchgeführt werden, da bereits Hinweise auf Entmarkungsreaktionen über ein erniedrigtes N-Acetylaspartat-Signal und ein erhöhtes Cholinsignal gefunden werden können, bevor leukodystrophische Herde im MRT sichtbar werden (Pouwels et al. 1998).

Zur Abklärung einer manifesten oder latenten Nebennierenrindeninsuffizienz (Morbus Addison) sind die Basalwerte für Cortisol und ACTH im Serum zu bestimmen und gegebenenfalls durch einen ACTH-Test zur Sicherung einer latenten Nebennierenrindeninsuffizienz zu ergänzen.

Da die neuropsychologischen Auffälligkeiten der Patienten in der Regel den neurologischen Symptomen vorausgehen, sind standardisierte neuropsychologische Testungen wie die Griffith Entwicklungsskala und die Wechsler Intelligenztestskala durchzuführen. Die Erfassung der neuropsychologischen Auffälligkeiten ist ferner bei der Beurteilung des Erkrankungsverlaufs und vor dem Einsatz risikoreicher oder experimenteller Therapieansätze bedeutend (Shapiro et al. 1997).

Beeinträchtigungen des Seh- und Hörvermögens, der hirnelektrischen Aktivität und/oder des peripheren Nervensystems können anhand von neurophysiologischen Untersuchungen, wie visuell und akustisch evozierte Potentiale (VEP und AEP), Elektroenzephalogramm (EEG) sowie motorisch evozierte Potentiale (MEP) und Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) erfasst werden.

Die Mutationsanalyse ist bei betroffenen männlichen Patienten zur Diagnosestellung nicht erforderlich und auch für die Einschätzung des Erkrankungsverlaufs wenig hilfreich, da keine Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp besteht. Zur sicheren Erfassung oder zum Ausschluss eines heterozygoten Überträgerstatus ist sie allerdings bei allen weiblichen Mitgliedern einer betroffenen Familie durchzuführen, auch wenn diese eine normale Konzentration an überlangkettigen Fettsäuren aufweisen. Eine Pränataldiagnostik steht für heterozygote Anlageträgerinnen zur Verfügung, wobei die Konzentration an überlangkettigen Fettsäuren oder die in einer Familie bekannte Mutation in Chorion- oder Amnionzellen bestimmt werden kann (Moser und Moser 1999).

#### **1.3.4. Therapie**

Aufgrund der bislang weitgehend unbekanntem Pathogenese der X-ALD ist die Entwicklung kurativer Therapieansätze erschwert. Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen ist momentan der einzige kurative Therapieansatz der X-ALD wobei sich deren Anwendung aufgrund des hohen Risikos auf Patienten mit einer cerebralen Form der X-ALD und gerade beginnenden neurologischen Symptomen beschränkt.

Die allogene Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut spielt bei Kindern eine immer größer werdende Rolle in der Behandlung von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen wie z.B. der Leukämie. Zunehmend werden auch Kinder mit ausgewählten immunologischen oder metabolischen Erkrankungen allogenen transplantiert. Dabei werden durch eine Hochdosischemotherapie die im Knochenmark des Empfängers vorhandenen Zellen zerstört. Anschließend werden die zunehmend aus dem peripheren Blut des Spenders mittels Leukozytenapherese gewonnenen Stammzellen dem Empfänger infundiert. Nach dem Anwachsen des Transplantats werden die drei Zellreihen des Blutes nach ca. 2-4 Wochen aus den Stammzellen neu gebildet. Eine charakteristische Komplikation der allogenen

Stammzelltransplantation (SZT) ist die Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (GvHD). Hierbei kommt es zu einer in Einzelfällen lebensbedrohlichen Abstoßungsreaktion der transplantierten immunkompetenten Zellen gegen Gewebe des Empfängers.

Die erste SZT bei X-ALD wurde im Jahre 1981 bei einem 12,5-jährigen Jungen durchgeführt, der bereits deutliche neurologische Auffälligkeiten zeigte. Obwohl bei diesem Patienten biochemisch eine Normalisierung der VLCFA in den oberen Normbereich bestand, zeigte sich eine Progression der neurologischen Symptomatik, die den anfänglichen Enthusiasmus über diesen kurativen Therapieansatz trübte (Moser et al. 1984). Im Gegensatz dazu konnte bei einem 8-jährigen Jungen mit milden neurologischen Symptomen und leichten kernspintomographischen Veränderungen eine Normalisierung der auffälligen Befunde nach Durchführung einer SZT beobachtet werden (Aubourg et al. 1990). Insgesamt wurden bisher weltweit mehr als 150 Patienten transplantiert. Dabei zeigt die bisherige Erfahrung, daß sich die SZT nur bei Patienten im Frühstadium, nicht jedoch bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung als wirkungsvoll erwiesen hat (Krivit et al. 1999; Shapiro et al. 2000).

Einen weiteren kurativen Therapieansatz stellte die Gabe des aus Film und Fernsehen bekannten „Lorenzos Öl“ dar, welches nach dem Patienten Lorenzo Odone benannt wurde, dessen Eltern diesen Therapieversuch initiiert haben. Bei „Lorenzos Öl“ handelt es sich um ein Gemisch aus Oleinsäure („glyceryl trioleate“, GTO) und Erukasäure („glyceryl trierucate“, GTE) im Verhältnis 4:1. Dieser Therapieansatz basiert auf den Beobachtungen, daß sich mit der Nahrung aufgenommene markierte Hexacosansäure ( $C_{26:0}$ ) in der weißen Substanz erkrankter Patienten ablagert (Kishimoto et al. 1980) und daß Oleinsäure um das Enzymsystem konkurriert, welches an der Elongation langkettiger Fettsäuren beteiligt ist (Bourre et al. 1976). Somit führen eine an VLCFA arme Diät und die Gabe von „Lorenzos Öl“ sowohl zu einer Reduzierung der exogenen Zufuhr als auch zu einer Hemmung der endogenen Synthese von VLCFA. Daraus resultiert eine Reduzierung der Konzentration von VLCFA im Plasma. Allerdings konnten durch diese Therapie weder das Ausmaß der Nebennierenrindeninsuffizienz noch die Progredienz der neurologischen Symptomatik günstig beeinflusst werden (Aubourg et al. 1993; Asano et al. 1994). Diese Beobachtung läßt sich z.B. durch eine mangelnde Penetration von Erukasäure in das Zentralnervensystem erklären (Rasmussen et al. 1994). Da die



Progression der neurodegenerativen Erkrankung mit einer Entzündungsreaktion im Zentralnervensystem einhergeht (vgl. 1.3.3.), wurde in weiteren Therapieansätzen die Gabe von immunmodulatorischen Substanzen, wie  $\beta$ -Interferon, Cyclophosphamid, Cyclosporin, Immunglobuline und Thalidomid versucht, die jedoch keinen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung hatte (Moser et al. 2001).

Im Gegensatz zu den neurologischen Symptomen kann die Nebennierenrindeninsuffizienz wirkungsvoll durch die Gabe von Hydrokortison und Fludrokortison behandelt werden (Moser et al. 2001). Die im Vordergrund der Therapie stehenden symptomatischen Behandlungsmaßnahmen bestehen aus der Behandlung von Unruhezuständen, schmerzhaften Muskelspasmen, cerebralen Krampfanfällen und von rezidivierenden Atemwegsinfekten und Pneumonien. Neben präventiven krankengymnastischen Übungsbehandlungen kann zur Vermeidung von Kontrakturen und schmerzhaften Muskeltonuserhöhungen bzw. -spasmen die Gabe von muskelrelaxierenden Medikamenten wie Nitrazepam und Baclofen versucht werden. Zur Verbesserung oder Beseitigung von Knochenfehlstellungen und Kontrakturen sind Injektionen von Botulinumtoxin und orthopädische Korrekturoperationen zu erwägen. Cerebrale Krampfanfälle können durch den Einsatz gängiger Antiepileptika wie Phenobarbital, Valproinsäure, Carbamazepin und Primidon behandelt werden. Da im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium die Patienten meist dauerhaft per Magensonde ernährt werden, empfiehlt sich die Anlage einer PEG (perkutane endoskopische Gastrostomie)-Sonde.

Insgesamt stellt die X-ALD mit den aufkommenden psychosozialen und pädagogischen Problemen wie kaum eine andere Erkrankung eine Herausforderung für die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Eltern, Lehrern, Psychologen, Interessenvereinigungen und Ärzten dar.

### **1.3.5. Genetik**

Der X-ALD liegt biochemisch eine Störung des peroxisomalen Abbaus von gesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 22 Kohlenstoffatomen, den sogenannten überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA) zugrunde. Als Folge dieser Abbaustörung akkumulieren VLCFA in den Körperflüssigkeiten und Geweben, insbesondere in der weißen Hirnsubstanz, in der Nebennierenrinde und dem Hoden (Menkes und Corbo 1977). Dabei besteht zwischen der Konzentration an VLCFA und dem Grad der klinischen Ausprägung kein Zusammenhang.

Die Isolierung des Genes auf der Bande 28 des langen Armes des X-Chromosoms gelang 1993 durch positionelles Klonieren (Mosser et al. 1993). Das ALD-Gen enthält 10 Exons und umfaßt insgesamt etwa 26 kb. Das aus einer 4,3 kb großen RNA translatierte 75 kD schwere Adrenoleukodystrophieprotein (ALDP) besteht aus 745 Aminosäuren und besitzt eine Homologie zu den ATP-bindenden Transporterproteinen (ABC-Transporter), die an einer Vielzahl von transmembranösen Transportprozessen beteiligt sind (Higgins 1995). Diese Beobachtung verwarf die ursprünglich aufgestellte These, daß es sich bei dem ALDP um ein Enzym des Fettsäureabbaues (der  $\beta$ -Oxidationskaskade) handelt. Neben der X-ALD liegen z.B. auch die zystische Fibrose, die Stargardt-Krankheit, die Tangier-Krankheit und das Dubin Johnson-Syndrom in einer Veränderung eines ATP-bindenden Transporterproteins begründet (Efferth 2001). Im Gegensatz zur X-ALD handelt es sich jedoch bei den dort involvierten Proteinen um vollständige Transporterproteine, während das ALDP nur aus einer von zwei ABC-Transporterhälften besteht (Mosser et al. 1993). Daher benötigt das ALDP eine zweite ABC-Transporterhälfte, um ein funktionstüchtiges Protein bilden zu können. Es wird angenommen, daß das ALDP entweder mit sich selbst oder mit einem dem ALDP ähnlichem ABC-Transporterprotein, wie dem ALD-related Protein (ALDR), dem 70kD schweren peroxisomalen Membranprotein PMP70 oder dem PMP70-ähnlichen Protein P70R in der peroxisomalen Membran dimerisiert (Gärtner et al. 1992; Lombard-Platet et al. 1996; Holzinger et al. 1997). Insgesamt können bisher aufgrund der Aminosäuresequenz vier funktionelle Domänen des ALDP unterschieden werden. Dabei handelt es sich neben den Transmembrandomänen um das Fettsäurebindungsmotiv, die peroxisomale Signalsequenz und die Nukleotidbindungsfalte mit den hochkonservierten Sequenzen Walker A, Walker B und 19mer.

Bislang konnten in mehr als 250 betroffenen Familien eine Vielzahl von Mutationen im ALD-Gen nachgewiesen werden (Gärtner et al. 1998; Kemp et al. 2001). Dabei zeigt mit wenigen Ausnahmen jede Familie ihre eigene Mutation. Die bisher beschriebenen Mutationen, zu denen Missense-, Nonsense- und Splice Site-Mutationen sowie Deletionen und Insertionen zählen, verteilen sich über alle funktionellen Domänen des ALDP mit einer Häufung im Bereich der Nukleotidbindungsfalte. Aufgrund der heterogenen Verteilung der Mutationen über alle funktionellen Domänen des ALDP ist anzunehmen, daß unterschiedliche

Mechanismen zu einer Fehlfunktion des ALDP führen. Mit Immunfluoreszenzfärbungen von kultivierten Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß aus ca. 2/3 aller Mutationen ein vollständiger Verlust des Genproduktes resultiert. Zwischen der Art der Mutation, der Konzentration an VLCFA und dem klinischen Verlauf ergibt sich keine Korrelation. So können innerhalb von Familien mit mehreren betroffenen Mitgliedern trotz identischer Mutation im ALD-Gen schwere und milde klinische Ausprägungen nebeneinander vorkommen (Berger et al. 1994). Selbst bei monozygoten Zwillingen sind unterschiedliche Erkrankungsverläufe beschrieben worden (Korenke et al. 1996). Neben der Mutation im ALD-Gen müssen daher auch modifizierende Gene und epigenetische Faktoren für die Ausprägung des klinischen Bildes eine Rolle spielen (Moser et al. 1992; Korenke et al. 1996; Gärtner 2000).

### **1.3.6. Pathogenese und Histopathologie**

Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Mutation im ALD-Gen und der Störung der  $\beta$ -Oxidation der gesättigten überlangkettigen Fettsäuren ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Komplementierungsstudien haben gezeigt, daß die Expression von ALD-cDNA die Störung der  $\beta$ -Oxidation in Fibroblasten aufhebt (Cartier et al. 1995; Shinnoh et al. 1995). Ferner konnte durch Studien an Hefepilzen gezeigt werden, daß das ALDP an dem energieabhängigen Transport von CoA-Fettsäuren und Co-Faktoren der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation aus dem Zytosol durch die peroxisomale Membran in die peroxisomale Matrix beteiligt ist (Hettema et al. 1996; Shani und Valle 1998; Aubourg und Dubois-Dalcq 2000). Die durch die Mutation bedingte Störung im Abbau der VLCFA scheint also auf eine Aufhebung oder Einschränkung der peroxisomalen Transportfunktion des ALDP zurückzuführen zu sein, aus der eine Akkumulation der VLCFA in allen Geweben und Körperflüssigkeiten resultiert. Diese Akkumulation der VLCFA und deren vermehrte Aufnahme in Phospholipidmembranen führt zu Veränderungen von Membranstrukturen und deren Funktion (Whitcomb et al. 1988; Ho et al. 1995). Ferner spielt pathogenetisch die Akkumulation von VLCFA enthaltenden abnormalen Lipiden eine Rolle (Powers und Schaumburg 1980).

Histopathologisch findet sich bei Patienten mit der cerebralen Form der X-ALD neben einem meist intakten Kortex eine mikroskopisch erkennbare Entmarkung und reaktive Astroglie (Schaumburg et al. 1975). Die primär parieto-okzipital

lokalisierten Demyelinisierungsregionen stellen sich bilateral, nahezu symmetrisch und konfluierend dar. Dabei schreitet die Demyelinisierung caudorostral fort. Innerhalb dieser Läsionen finden sich neben dem Markscheidenverlust perivaskuläre Ansammlungen von PAS-positiven Makrophagen (Myelophagen) und Lymphozyten (Griffin et al. 1985). In chronischen Läsionen kommt es neben dem Untergang von Oligodendrozyten und von in Frühstadien noch erhaltenen Axonen zu einer reaktiven fibrillären Astrogliose.

## 2. Patienten, Materialien und Methoden

### 2.1. Untersuchungsmaterialien der Patienten

In der hier vorliegenden Arbeit sind sechs Mitglieder einer Familie, in der eine X-ALD klinisch und biochemisch diagnostiziert werden konnte, untersucht worden. Eine Übersicht der zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterialien dieser Familienmitglieder liefert Tabelle 3, die klinischen und biochemischen Phänotypen werden ausführlich in Kapitel 3.1. beschrieben.

Tabelle 3: Untersuchungsmaterialien

Familienmitglied	Klinische Präsentation	Untersuchungsmaterial
GAW	asymptomatische Überträgerin	EDTA-Blut
NAW	asymptomatisch	EDTA-Blut
NIW	kindliche cerebrale Form	EDTA-Blut vor Durchführung einer allogenen-unverwandten SZT in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes autoptisches Gewebe (s. Tabelle 4)
FLW	Nebennierenrindeninsuffizienz	EDTA-Blut Fibroblastenkultur
JUW	kindliche cerebrale Form	EDTA-Blut vor und nach Durchführung einer allogenen-unverwandten SZT
JEW	asymptomatisch	EDTA-Blut

Zwei männliche Familienmitglieder litten an einer kindlichen cerebralen Form einer X-ALD und erhielten eine allogene-unverwandte SZT. Während bei dem Patienten JUW EDTA-Blut untersucht werden konnte, welches vor und nach der Durchführung der SZT gewonnen wurde, lag bei dem Patienten NIW nur EDTA-Blut von einem Zeitpunkt vor SZT vor. Zwei Tage nach dem Exitus dieses Patienten aufgrund von Komplikationen der SZT erfolgte mit dem Einverständnis der Eltern eine Obduktion, die neuropathologische Sektion fand einen Monat später statt. Das aus dieser Obduktion zu diagnostischen Zwecken in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe wurde in der hier vorliegenden Arbeit verwendet. Insgesamt wurden 23 Organe bzw. Regionen unterschieden (Tabelle 4). Als Kontrollgewebe

stand Gewebe von insgesamt 12 verschiedenen Patienten zur Verfügung, die an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems verstorben sind. Das Kontrollgewebe wurde im gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen in Paraffin eingebettet. Außerdem wurde bei der Auswahl des Kontrollgewebes darauf geachtet, daß deren pathologische Begutachtung keinen auffälligen Befund ergab. Kryokonserviertes Material lag leider nicht vor.

Bei einem weiteren betroffenen männlichen Familienmitglied konnte eine humane Fibroblastenzelllinie angelegt und subkultiviert werden.

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten Paraffingewebe

Nr.	Gewebeart	Nr.	Gewebeart
1	Frontales Hirngewebe	25	Knochenmark
2	Frontales Hirngewebe (Kontrollgewebe)	26	Knochenmark (Kontrollgewebe)
3	Zentrales Hirngewebe	27	Nebenniere
4	Zentrales Hirngewebe (Kontrollgewebe)	28	Nebenniere (Kontrollgewebe)
5	Okzipitales Hirngewebe rechts	29	Leber
6	Okzipitales Hirngewebe rechts (Kontrollgewebe)	30	Leber (Kontrollgewebe)
7	Ammonshorn	31	Milz
8	Ammonshorn (Kontrollgewebe)	32	Milz (Kontrollgewebe)
9	Medulla oblongata	33	Dünndarm
10	Medulla oblongata (Kontrollgewebe)	34	Dünndarm (Kontrollgewebe)
11	thorakales Rückenmark	35	Dickdarm
12	thorakales Rückenmark (Kontrollgewebe)	36	Dickdarm (Kontrollgewebe)
13	lumbales Rückenmark	37	Niere
14	lumbales Rückenmark (Kontrollgewebe)	38	Niere (Kontrollgewebe)
15	Stammganglien	39	Herz
16	Stammganglien (Kontrollgewebe)	40	Herz (Kontrollgewebe)
17	Okzipitales Hirngewebe links	41	Lunge
18	Okzipitales Hirngewebe links (Kontrollgewebe)	42	Lunge (Kontrollgewebe)
19	Mittelhirn	43	Haut
20	Mittelhirn (Kontrollgewebe)	44	Haut (Kontrollgewebe)
21	Brücke	45	Hoden
22	Brücke (Kontrollgewebe)	46	Hoden (Kontrollgewebe)
23	Kleinhirnhemisphäre		
24	Kleinhirnhemisphäre (Kontrollgewebe)		

## **2.2. Materialien**

### **2.2.1. Kulturmedien**

#### Kulturmedium für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden ad 1 Liter gelöst, und der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf 7.0 eingestellt. Für feste Nährböden wurden 1,5% (w/v) Agarose zugesetzt. Durch Zugabe von 25 µg/ml Kanamycin in die auf 50°C abgekühlte, autoklavierte Lösung konnte auf Antibiotikaresistenzen selektioniert werden.

#### Kulturmedium für Fibroblasten

Die menschlichen Hautfibroblasten wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, das mit 10% fetalem Kälberserum (30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert), 2 mM L-Glutamin und einer Kombination aus 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 U/ml Penicillin G-Natrium supplementiert war.

### **2.2.2. Antikörper (AK)**

#### Primäre Antikörper

##### **ALDP-AK MAB2164**

Der gegen die Nukleotidbindungsfalte des humanen ALD-Proteins von AS 495 bis AS 648 gerichtete monoklonale Maus-AK (Fa. Chemicon, Kanada) wurde für die Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblastenkulturen in einer 1:250-Verdünnung und für die immunhistochemischen Färbungen von Paraffingewebe in einer 1:20.000-Verdünnung eingesetzt.

##### **ALDP-AK MAB2162**

Der gegen die AS 279 bis AS 482 des humanen ALD-Proteins gerichtete monoklonale Maus-AK (Fa. Chemicon, Kanada) wurde für die Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblastenkulturen in einer 1:250-Verdünnung und für die immunhistochemischen Färbungen von Paraffingewebe in einer 1:20.000-Verdünnung eingesetzt.

Bei beiden Antikörpern diente in den immunhistochemischen Färbungen mit dem DAKO CSA-System (DAKO Corp., USA) das DAKO Antibody Diluent als Verdünnungsmedium, welches unspezifische Hintergrundfärbungen reduzieren soll. Eine Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper mit den ALDP-verwandten Proteinen ALDR und PMP70 wird von Seiten des Herstellers ausgeschlossen.



### **Katalase-AK**

Es wurde ein polyklonaler AK der Firma Europa Bioproducts Ltd., England, verwendet, der durch Immunisierung von Kaninchen gegen humane Katalase erzeugt wurde. Für die Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblastenkulturen wurde der AK in einer 1:250-Verdünnung eingesetzt.

### **Synaptophysin-AK**

Als Kontrollantikörper für das in Paraffin eingebettete Hirngewebe wurde ein gegen das Protein Synaptophysin gerichteter monoklonaler Maus-AK (DAKO Corp., USA) verwendet. Dieser wurde für die immunhistochemischen Färbungen von Paraffingewebe in einer 1:5.000-Verdünnung eingesetzt

### **Vimentin-AK**

Als Kontrollantikörper für die immunhistochemische Anfärbung von in Paraffin eingebetteten Fibroblasten wurde ein monoklonaler Maus-AK (Fa. Biogenex, USA) in einer Verdünnung von 1:5.000 eingesetzt.

### Sekundäre Antikörper

#### **FITC-konjugiert**

Es wurden Ziege Anti-Kaninchen-IgG und Ziege Anti-Maus-IgG der Firma Sigma-Aldrich, USA, eingesetzt, die Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) als Fluorochrom aufweisen. Die Anregung von FITC erfolgt bei 492 nm. Der lyophilisierte AK wurde ad 1,2 mg/ml in PBS gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblastenkulturen wurden die AK in einer 1:50-Verdünnung eingesetzt.

#### **Cy2-konjugiert**

Alternativ zu den FITC-konjugierten AK wurden Ziege Anti-Kaninchen-IgG und Ziege Anti-Maus-IgG der Firma Dianova, Hamburg, verwendet, welche den grünen Fluoreszenzfarbstoff Cy2 tragen. Dessen Anregungswellenlänge liegt ebenfalls bei 492 nm. Die AK wurden in einem Puffer aus 0,01 M Natriumphosphat und 0,25 M NaCl, pH 7,6 ad 1,5 mg/ml geliefert. Es erfolgte eine Aliquotierung und anschließende Lagerung bei -80°C. Für die Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblastenkulturen wurden die AK in einer 1:50-Verdünnung eingesetzt.

### 2.2.3. Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH, Ebersberg synthetisiert. Für die Identifizierung der Mutation und zum Nachweis von genomischer DNA des Spenders und Empfängers nach SZT wurden folgende Oligonukleotide der cDNA des *ALD*-Gens eingesetzt:

Primer	Sequenz (5'→3')	Position im Gen
JG 255F	CAG CCA CCT GCC TCA ACT G	bp 318-336
JG 256R	CAC ATA CAC CGA CAG GAA G	bp 701-719
JG 257F	CTG CTG GCC CTG CAC TCG	bp 663-680
JG 258R	GCC ACA GAG GCC GCA AAG	bp 995-1012
JG 259F	CTG ACC AGT CTC TGA CGG	bp 964-981
JG 260R	CAC ACG CTT CCC TCC GTG	bp 1310-1327
JG 261F	CTG TGC ATG GCC AGG AAG	bp 4307-4324
JG 262R	CTG GAT CCT CTT GGA GCC	bp 4543-4561
JG 263F	GAC TTT CCG CTG TCT CTG C	bp 11167-11185
JG 264R	CAT GGC AAG GAT GGC AAG G	bp 11395-11413
JG 265F	CTC CCT GCA ACT GGC AGG	bp 11419-11436
JG 266R	GCA GCA GGT CAG CAC CTG	bp 11680-11697
JG 267F	CAG AAT GCA GAG GGG TCG	bp 12213-12230
JG 268R	CCA AGG GCT GAG GCT TGC	bp 12408-12425
JG 269F	CTC TGG CGT CAG CGG CTG	bp 15181-15198
JG 270R	CAG GAA GCC ATG TGT GAGC	bp 15402-15420
JG 271F	GAG GCG CAG AGT ATC TTGG	bp 15625-15643
JG 272R	CAA AGG GTG GCT GCC AGC	bp 15853-15870
JG 273F	CTG AGC CAA GAC CAT TGC	bp 18078-18095
JG 274R	CCA CAG CTG CTA CTT CCC	bp 18234-18251
JG 275F	GCA CAG ACT CTC CTC TCG	bp 18308-18325
JG 276R	CTC CCC TCA GGC AGG CAC	bp 18502-18519
JG 277F	GCG GCT GTC ATC AGC AGC	bp 18550-18567
JG 278R	CAT GTG ATC CGA GCT TGGG	Intron n. ALDG
JG 510F	GGA GTC ACT GTC GCT TCA GCC AG	bp -31 bis -9
JG 513R	CAG GGC AGA GAC AGC GGA AAG TC	bp 11167-11189
JG 681F	GTG CTC TCC AGG CCC CGG CCC TG	bp 393-415
JG 682R	CAC AGA GAC AGG AAG CAG ATG AG	bp 10072-10094
JG 753F	GAC CTA CTA CCG GGT CAG CAA CAT G	bp 920-944
JG 754R	CAG GCT GGT CTC AAA CTC CTG AAC	bp 9480-9503
JG 756R	CGA AGC AGG GTG TAG GAA GTC ACA G	bp 1054-1078

#### **2.2.4. Chemikalien**

Chemikalien wurden, wenn nicht als versuchsspezifische Materialien gesondert aufgeführt, von den folgenden Firmen in höchstmöglichem Reinheitsgrad bezogen: Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Gibco BRL GmbH (Eggenstein), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Biochrom KG (Berlin), Nunc GmbH (Wiesbaden-Biebrich), Serva (Heidelberg).

#### **2.2.5. Apparaturen**

Gewebeschnitte aus Paraffingewebeblöcken wurden mit den Mikrotomen Finesse ME (Shandon Scientific Ltd., England) oder Histoslides 2000 (Reichert-Jung, Nussloch) angefertigt. Für die Laserdissektionen wurde der Pix Cell II der Firma Arcturus Engineering (Kalifornien, USA) verwendet. Zentrifugationen erfolgten mit Geräten der Firmen Eppendorf (Hamburg) und Beckmann (Klosterneuburg). Elektrophoresen wurden in Gelkammern der Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) durchgeführt. Zur nicht-radioaktiven Sequenzierung wurde der ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) benutzt. Für photometrische Messungen wurde das Uvikon Spectrophotometer 922 der Kontron Instruments (Neufahrn) verwendet.

### **2.3. *Umgang mit Bakterienzellen***

#### **2.3.1. Kultivierung von *Escherichia coli***

Es wurde der *Escherichia coli* Sicherheitsstamm XL1-blue verwandt. Zur Anzucht wurden 4 ml LB-Medium (vgl. 2.2.1.) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert, wobei die Nährlösungen mit Ampicillin versetzt wurden. Diese Übernachtskulturen wurden zur analytischen Plasmidisolierung weiterverwendet. Die längerfristige Lagerung der Bakterienkulturen erfolgte in 15%iger Glycerollösung bei -80°C.

### **2.3.2. Transformation von kompetenten One Shot INVaF' Zellen mit anschließender Blau-Weiß-Selektion**

Materialien: TA-Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, San Diego, USA)

Mit Hilfe des TA-Cloning<sup>®</sup> Kits der Firma Invitrogen (San Diego, USA) wurden zu klonierende PCR-Fragmente in das Plasmid pCRTMII ligiert. Die Transformationsbedingungen entsprachen den Anweisungen des Herstellers. 100, 300 und 600 µl der Bakteriensuspension wurden auf mit Kanamycin versetzten LB-Platten (vgl. 2.2.1.) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Da das käufliche erworbene Plasmid pCRTMII das  $\beta$ -Galactosidase Strukturgen (LacZ-Gen) exprimiert (lacZa), kann ein Bakterienklon, der ein Plasmid ohne Insert beinhaltet, durch seine blaue Färbung von einem Bakterienklon, der ein Plasmid mit einem Insert trägt und eine weiße Färbung aufweist, unterschieden werden.

Dafür wurden auf den Agaroseplatten 60 Minuten vor dem Ausplattieren der transformierten Bakterien (s.o.) zunächst 45 µl in Dimethylformamid (DMF) gelöstes 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosid (X-Gal, 20 mg/ml) und anschließend 12-15 µl 0,1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ausgestrichen. In den Vektoren ohne Insert wird durch das IPTG die Transkription des Enzyms induziert, welches die Hydrolyse von X-Gal zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo katalysiert.

## **2.4. Umgang mit Fibroblasten**

### **2.4.1. Anlegen von Fibroblasten-Primärkulturen aus Hautbiopsien**

Die Kultivierung von humanen Fibroblasten erfolgte aus Hautbiopsien. Dabei wurde ein Hautbiopsat unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale (Durchmesser: 94 mm) mit Hilfe eines Skalpells in möglichst kleine Stücke ausgekratzt. Anschließend wurde der Schale 12 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zugesetzt. Das ausgekratzte Biopsat wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für ca. 10 Tage inkubiert. Die aus dem Biopsat ausgewachsenen, adhärennten Fibroblasten wurden mittels einer Lösung aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA abgelöst, in Zellkulturflaschen überführt und unter den üblichen Wachstumsbedingungen (vgl. 2.2.1.) bis zur Konfluenz inkubiert.

### **2.4.2. Kultivierung von Fibroblasten**

Die adhären wachsenden humanen Fibroblasten wurden alle sieben Tage mit einer Lösung aus 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA im Verhältnis 1:2 passagiert. Nach maximal 30 Passagen wurden frische Kulturen aus Gefriervorräten angelegt.

Für die Kryokonservierung wurden die trypsinisierten Zellen einer bis zur Konfluenz bewachsenen 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium bestehend aus 60% Vollmedium, 32% fetalem Kälberserum und 8% Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden eine Stunde bei -20°C vorgekühlt, über Nacht bei -80°C inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

### **2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten**

Menschliche Hautfibroblasten wurden auf 2 cm<sup>2</sup> Deckgläschen unter den üblichen Wachstumsbedingungen in einer Petrischale (Durchmesser: 94 mm) kultiviert (vgl. 2.2.1.). Zur Fixation wurden die mit Fibroblasten bewachsenen Deckgläschen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und bei RT mit 10 ml 3%igem (v/v) gepuffertem Formaldehyd in PBS für 30 Minuten versetzt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und ihre Zellmembran durch fünfminütige Inkubation in 10 ml 1%iger (v/v) Triton X-100 in PBS-Lösung permeabilisiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen eines Deckgläschens für 60 Minuten in 50 µl (1 µg/ml) eines peroxisomenspezifischen Antikörpers, der gegen ALDP oder Katalase gerichtet war (vgl. 2.2.2.), inkubiert. Die Zellen eines jeden Deckgläschens wurden anschließend zehnmal mit PBS gewaschen und dann für weitere 60 Minuten in 50 µl (25 µg/ml) des mit Fluorescein markierten, gegen den ersten Antikörper gerichteten, zweiten Antikörper (vgl. 2.2.2.) inkubiert. Die bewachsenen Deckgläschen wurden nochmals zehnmal mit PBS gespült und in 5 µl einer frisch angesetzten Konservierungslösung (0,1% p-Phenylendiamin (w/v), 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 grün leuchtende Punkte.

## **2.5. Umgang mit Paraffingewebe**

### **2.5.1. Fixierung von Kulturzellen in Paraffingewebe**

Zur Einbettung in Paraffin wurden zunächst fünf bis zur Konfluenz bewachsene 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 12 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) aufgefüllt. Die Ablösung der Fibroblasten erfolgte unter Anwendung eines Falcon<sup>®</sup> Cell Scrapers (Modell-Nr. 3087, Becton Dickinson, USA). Die Zellsuspension wurde dann bei RT und 1000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluß wurde das Pellet 10 min. in 1 ml gepuffertem vierprozentigem Formalin (ph 7) resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf Filterpapier gegeben mit welchem eine kleine Einbettschale ausgelegt war. Dieses Filterpapier wurde anschließend zusammengefaltet und zur besseren Darstellung des Gewebes mit Eosin bepinselt. Dann wurde die Einbettschale in das Autotechnikon Citadell 1000 (Shandon Scientific Ltd, England) überführt. Es erfolgte eine maximal zehnssekündige Fixierung in Formalin, gefolgt von einem Übergang in eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol für jeweils 5 min. pro Lösung. Im Anschluß wurde auf einer Einbettbank das mit Eosin gefärbte Gewebe vom Filterpapier abgekratzt und in eine Einbettschale mit flüssigem Paraffin überführt. Nach Abkühlung des Gewebeblockes stand dieser der weiteren Verwendung zur immunhistochemischen Färbung (vgl. 2.5.2. und 2.5.3.) und DNA-Isolierung (vgl. 2.6.2.) zur Verfügung.

### **2.5.2. Anfertigung von Paraffingewebeschnitten**

Von den in Paraffinblöcken eingebetteten Geweben wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (vgl. 2.2.5.) 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden im 45°C warmen Wasserbad auf beschichtete Objektträger (Superfrost<sup>®</sup> Plus, Firma Menzel-Gläser, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden die Objektträger in einem Wärmeschrank (60-80°C) für mindestens 60 Minuten getrocknet bis sie weiterverwendet wurden.

### **2.5.3. Laserdissektion von Paraffingewebeschnitten**

Zur Laserdissektion von Paraffingewebeschnitten wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt (vgl. 2.5.2.) und mit Hämatoxylin gefärbt. Auf die nicht eingedeckten getrockneten Gewebeschnitte wurden anschließend die Arcturus Laser Capture Microdissection (LCM)<sup>®</sup>-Membranen aufgelegt. Unter dem Pix Cell II<sup>®</sup>-Mikroskop der Firma Arcturus wurden dann die gewünschten Gewebestrukturen aufgesucht und mit einem Laser (85 mW für 0,8 ms) auf die Membran gebrannt. So wurden einzelne Nervenzellen der grauen Substanz, Gliazellen der weißen Substanz, in Hirnschnitten sichtbare Blutzellen und Tubuluszellen der Nieren selektiv auf jeweils eine Membran übertragen. Von den verwendeten Arcturus LCM<sup>®</sup>-Membranen wurde anschließend die DNA der Zellen isoliert (vgl. 2.6.2.4.).

### **2.5.4. Immunhistochemische Färbungen**

Materialien: DAKO<sup>®</sup> CSA-System (DAKO Corporation, USA)

DAKO<sup>®</sup> TBST-Puffer (DAKO Corporation, USA)

DAKO<sup>®</sup> Target Retrieval Solution (DAKO Corporation, USA)

DAKO<sup>®</sup> Biotin Blocking System (DAKO Corporation, USA)

Zur Anfärbung des peroxisomalen ALD-Proteins wurde mit dem Catalyzed Signal Amplification System (CSA-System) der Firma DAKO<sup>®</sup> eine Detektionsmethode ausgewählt, die im Vergleich zur konventionellen Streptavidin-Biotin-Methode (sogenannte ABC-Methode) eine 50-fach höhere Sensitivität aufweist. Es handelt sich dabei um eine peroxidasekatalysierte Ablagerung von biotinylierten Phenolen gefolgt von einer zweiten Reaktion mit Streptavidin Peroxidase (Bobrow et al. 1989). Dabei bindet zunächst ein biotinylierter Sekundär-AK an den verwendeten Primär-AK. Anschließend bindet ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex über sein Streptavidin an den Sekundär-AK. Die zum Komplex gehörende Peroxidase katalysiert dann die Präzipitation von biotinylierten Phenolmolekülen auf dem Gewebeschnitt. Dieses hat zur Folge, daß sich die Menge an zur Reaktion mit Streptavidin Peroxidase zur Verfügung stehenden Molekülen erhöht. Die Peroxidase katalysiert im letzten Schritt die Farbreaktion. Die zusätzlich zum DAKO<sup>®</sup> CSA-System notwendigen Reagenzien wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers von diesem bezogen, um ein optimal abgestimmtes Reagenziensystem zu erhalten und bestmögliche Färbungsergebnisse zu erzielen.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert. Nach einer Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit DAKO® Target Retrieval Solution im Wasserbad bei 97°C für 20 Minuten, erfolgte die Abkühlung der Gewebeschnitte bei RT in weiteren 20 Minuten. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal mit raumtemperiertem DAKO® TBST-Puffer gewaschen. Nach Anleitung des Herstellers wurde nun das DAKO® Biotin Blocking System appliziert, bevor mit der CSA-Färbung mit dem DAKO® CSA-System begonnen wurde. Nach Anwendung von Wasserstoffperoxid zur Blockierung der endogenen Peroxidase und des Proteinblockes wurden die Gewebeschnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper (vgl. 2.2.2.) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit der CSA-Färbung gemäß der Anleitung des Herstellers fortgefahren. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 3-5 Sekunden. Nach drei Wasserbädern wurden die Gewebeschnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt, anschließend in drei Xylolbäder gegeben und mit einem Eindeckmedium (Eukitt®, Firma Kindler, Freiburg) unter Deckgläsern (Laborbedarf Engelbrecht, Edermünde) fixiert. Die Begutachtung und Photodokumentation der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit dem Mikroskop Axioplan II der Firma Carl Zeiss (Jena).

## **2.6. Präparative Methoden**

### **2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

Materialien: Qiaprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen GmbH, Hilden)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde der Qiaprep Spin Miniprep Kit® (bis zu 20 µg/Silicanmatrix) der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers verwendet.

### **2.6.2. Isolierung genomischer DNA**

Materialien: QIAamp Blood Systems® (Qiagen GmbH, Hilden)

DNeasy® Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

#### **2.6.2.1. Extraktion von genomischer DNA aus EDTA-Blut**

Zur Extraktion von genomischer DNA aus Blut wurden zunächst die kernhaltigen Zellen aus dem EDTA-Blut präpariert. Hierzu wurden 5 bis 10 ml EDTA-Blut mit 40 ml Puffer A (10 mM Tris-HCl, 320 mM Saccharose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100,



pH 8,0) versetzt und 4 Minuten bei RT kräftig geschüttelt. Das Erythrozytenlysat wurde von den kernhaltigen Zellen durch zehnmütige Zentrifugation bei RT und 1300 x g getrennt und als Überstand abgenommen. Das so gewonnene Leukozytenpellet (ca.  $35 \times 10^6$  Zellen) wurde zur besseren Aufreinigung erneut mit Puffer A versetzt und abzentrifugiert. Zur Leukozytenlyse wurde das Pellet anschließend in 2 ml Puffer B (400 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl 5 M Natriumperchlorat wurden die Proben kräftig geschüttelt und anschließend für 25 Minuten bei 65°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Extraktion der genomischen DNA wurden 2 ml Chloroform (-20°C) zu dem Zel lysat gegeben, die Proben 10 Minuten bei RT geschüttelt und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 800 x g zentrifugiert. Für die Fällung der DNA wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in 6 ml absolutem Ethanol (-20 °C) überführt. Das DNA-Präzipitat wurde in 600 µl Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert und über 15 Minuten bei RT getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Aus 5 ml menschlichem Blut konnten auf diese Weise zwischen 25 und 30 µg hochmolekulare DNA isoliert werden. Abschließend erfolgte eine Kontrolle von Qualität und Quantität der DNA (s. Kapitel 2.7.).

Alternativ wurden kleine Mengen genomischer DNA mittels des QIAamp Blood Systems® nach Anleitung des Herstellers isoliert. Auf diese Weise konnten aus 200 µl EDTA-Blut zwischen 3 und 6 µg DNA gewonnen werden.

#### 2.6.2.2. Extraktion von genomischer DNA aus Fibroblasten

Die Extraktion von genomischer DNA aus kultivierten Fibroblasten einer bis zur Konfluenz bewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche erfolgte mit dem DNeasy® Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

#### 2.6.2.3. Extraktion von genomischer DNA aus Paraffingewebe

Zur Extraktion von genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden zunächst von den unterschiedlichen Paraffingewebeblöcken bis zu 5 Schnitte mit hoher Schnittdicke (je 20-30 µm) angefertigt und in ein 2 ml-Zentrifugengefäß gegeben. Anschließend wurden 1200 µl Xylol zugegeben und eine Zentrifugation bei 6000 x g bei RT für 5 Minuten durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte zur Entfernung von Xylolresten zweimal die Zugabe von je 1200 µl Ethanol mit anschließender Zentrifugation. Daraufhin wurden die Proben bei 37°C für 10-15

Minuten getrocknet. Im Anschluß wurde der DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

#### 2.6.2.4. Extraktion von genomischer DNA aus laserdisseziertem Paraffingewebe

Zur Extraktion von genomischer DNA aus laserdisseziertem Paraffingewebe (vgl. 2.5.3.) wurde ein 500 µl-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 20 µl eines Digestionspuffers bestehend aus 50 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA und 0,5% Tween 20 sowie 5 µl Proteinase K in einer Konzentration von 10 mg/ml (Qiagen GmbH, Hilden) gefüllt. Die für die Laserdissektion verwendeten Arcturus LCM<sup>®</sup>-Membranen wurden mit ihrer Oberfläche nach unten, als Deckel für die Eppendorf-Reaktionsgefäße fungierend, aufgesetzt. Die auf dem Deckel stehenden Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden eine Woche bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation wurde die Quantität der DNA bestimmt (vgl. 2.7.) und diese für die Polymerase-Kettenreaktion (vgl. 2.8.3.) eingesetzt.

#### **2.6.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Materialien: QIAEX II<sup>®</sup> (Qiagen GmbH, Hilden)

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht im Agarosegel identifiziert, ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des QIAEX II<sup>®</sup>-Kits nach Anleitung des Herstellers isoliert, wobei 70 bis 80% der in der Agarose enthaltenen DNA zurückgewonnen werden konnte.

#### **2.6.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten durch Säulenchromatographie**

Materialien: QIAquick PCR Purification Kit<sup>®</sup> (Qiagen GmbH, Hilden)

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Polymerasekettenreaktionsansätzen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers.

### **2.7. Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von DNA**

Genomische DNA und Plasmid-DNA wurde über ihre UV-Absorption quantitativ charakterisiert, indem eine Extinktionsmessung einer 1:100-Verdünnung der jeweiligen DNA-Präparation bei 260 und 280 nm durchgeführt wurde. Für reine DNA wurde ein Extinktionsquotient ( $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ ) zwischen 1,8 und 2,1 angenommen. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Die Qualität der Plasmid-DNA wurde zusätzlich durch spezifische Restriktion (vgl. 2.8.2.) von 1 µg DNA und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung (vgl. 2.9.1.) im elektrischen Feld bestimmt.

## **2.8. Enzymatische Reaktionen**

### **2.8.1. Ligation**

Die Ligation eines knapp 3000 bp großen DNA-Fragmentes erfolgte mit den Reagenzien des TA Kloning<sup>®</sup> Kits (vgl. 2.3.2.). Dabei wurden 13,2 µl einer aufgereinigten PCR-Probe (vgl. 2.6.4.) mit 2 µl Vektor, 1,8 µl Puffer und 1 µl T<sub>4</sub>-Ligase versetzt und über Nacht bei 14°C ligiert.

### **2.8.2. Restriktionsverdau**

Für einen Restriktionsverdau wurde die isolierte DNA des pCRTMII-Plasmids in einem für die Endonuklease EcoRI geeigneten Puffer aufgenommen und mit einem 2 bis 3-fachen Enzymüberschuß an EcoRI (2-3 U/µg DNA) für mindestens 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

### **2.8.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Materialien: PrimeZyme<sup>®</sup> DNA Polymerase Kit (Biometra, Göttingen)

#### 2.8.3.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 60 bis 400 bp

Zur Amplifikation von genomischer DNA wurden genspezifische Oligonukleotide (vgl. 2.2.3.) mit einer Länge von 18-25 bp verwendet. Die dabei entstandenen PCR-Produkte besaßen Fragmentlängen zwischen 68 und 364 bp. Für einen 40 µl Reaktionsansatz wurden in Abhängigkeit von der DNA-Qualität 50-500 ng genomische DNA mit 50 pmol genspezifischen Oligonukleotiden, 1,7 µl Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 10mM), 4,0 µl 10x PCR-Puffer, 1,0 µl Polymerase, 0,8 µl Formamid (2%) und Aqua dest. versetzt und mit ca. 35 µl Mineralöl überschichtet.

Anschließend erfolgte die Inkubation in einem Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) wie folgt:

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1x	96°C	3 Minuten (initiale Denaturierung)
30x	94°C	1 Minute (Denaturierung)
	xx°C*	1 Minute (Primer-Anlagerung)
	74°C	1 Minute (Primer-Verlängerung)
1x	74°C	3 Minuten
	4°C	8

Die Temperatur für die Primer-Anlagerung (\*) variierte in Abhängigkeit von der Länge und der Basenzusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotide, wobei eine individuell ermittelte optimale Anlagerungstemperatur 2 bis 4°C unter dem  $T_m$ -Wert der eingesetzten Oligonukleotide ( $T_m = 4 \times (\text{Anzahl G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl A und T})$  [°C] gewählt wurde (Suggs SV 1981).

Beim Einsatz der aus der Laserdissektion gewonnenen genomischen DNA wurde die Zyklusanzahl versuchsweise von 30 bis auf 40 Zyklen erhöht.

#### 2.8.3.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge bis zu 3000 bp

Die Amplifikation eines knapp 3000 bp großen DNA-Fragments für die Klonierung mit dem TA-Kloning<sup>®</sup> Kit erfolgte durch eine Modifizierung des zuvor beschriebenen Inkubationsprogramms. Zum Einsatz kamen besonders lange genspezifische Oligonukleotide (JG 510 und JG 513 (vgl. 2.2.3.)), um eine möglichst hohe Primer-Anlagerungstemperatur wählen zu können. In Anbetracht der zu erwartenden Fragmentlänge wurde die Zeiten für die Primer-Verlängerung wie folgt erhöht:

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
1x	96°C	3 Minuten (initiale Denaturierung)
	94°C	1 Minute (Denaturierung)
	66°C	1 Minute (Primer-Anlagerung)
	74°C	6 Minuten (Primer-Verlängerung)
1x	74°C	8 Minuten
	4°C	8

Die Charakterisierung aller entstandenen PCR-Produkte erfolgte durch gelelektrophoretische Methoden (vgl.2.9.1.).

## 2.8.4. Sequenzierung

Materialien: DNA Sequencing Kit Big Dye<sup>®</sup> Terminator Cycle  
Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Weiterstadt)  
Dye Ex Spin Columns<sup>®</sup> (Qiagen GmbH, Hilden)

Die Sequenzierung von amplifizierten DNA-Fragmenten (vgl. 2.8.3.) erfolgte nach der nicht-radioaktiven „Dye-Terminator“-Methode, bei der in einer zyklischen Sequenzierungsreaktion mit Hilfe der oben aufgeführten Kits fluoreszierende Nucleotide eingebaut werden. Dabei sind die unterschiedlichen Nucleotide mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Für einen Sequenzierungsansatz wurden 6,5 µl des amplifizierten und aufgereinigten PCR-Produktes mit 12,5 pmol des entsprechenden Primers und 3 µl Premix versetzt und mit ca. 35 µl Mineralöl überschichtet. Anschließend erfolgte die Inkubation in einem Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm:

Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit
25x	96°C	10 Sekunden (Denaturierung)
	55°C	5 Sekunden (Primer-Anlagerung)
	60°C	4 Minuten (Primer-Verlängerung)
	4°C	8

Die Produkte der Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe der Dye Ex Spin Columns<sup>®</sup> nach Anleitung des Herstellers von überschüssigen Primern und Nucleotiden getrennt, in einer SpeedVac (Biometra, Göttingen) getrocknet und in 3,5 µl Ladepuffer (80% Formamid, 5mM EDTA, pH 8,0, 5% Dextranblau, Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte in einem ABI Prism 310 Sequenzierer (Applied Biosystems, Weiterstadt) mittels elektrophoretischer Auftrennung in einer Mikrokapillare und Bestimmung der Fluoreszenzspektren für die einzelnen Nucleotide.

## **2.9. Gelelektrophoretische Methoden**

### **2.9.1. Agarosegelelektrophorese**

Materialien: Qualex-Gold-Agarose (Peqlab Biotechnologie GmbH)

101 bp- oder 1 kb-Leiter (Firma Gibco BRL, Karlsruhe)

Für die Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten wurde das zu trennende DNA-Fragmentgemisch nach der Anleitung von Maniatis und Mitarbeitern (Maniatis et al. 1982) mit 1/5tel Volumen Ladepuffer (43% Glycerin, 0,2 M EDTA, pH 7,4, 6 mg Bromphenolblau) versetzt und auf ein 0,8-2%iges Agarosegel aufgetragen, wobei der Agarosegehalt des Geles in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente und den Anforderungen an die Qualität der Auftrennung gewählt wurde. Die Durchführung der Gelelektrophorese in 1x TBE als Laufpuffer erfolgte bei 200 mA mit maximal 100 V. Als DNA-Längenstandard diente eine 101 bp- oder 1 kb-Leiter (Firma Gibco BRL, Karlsruhe).

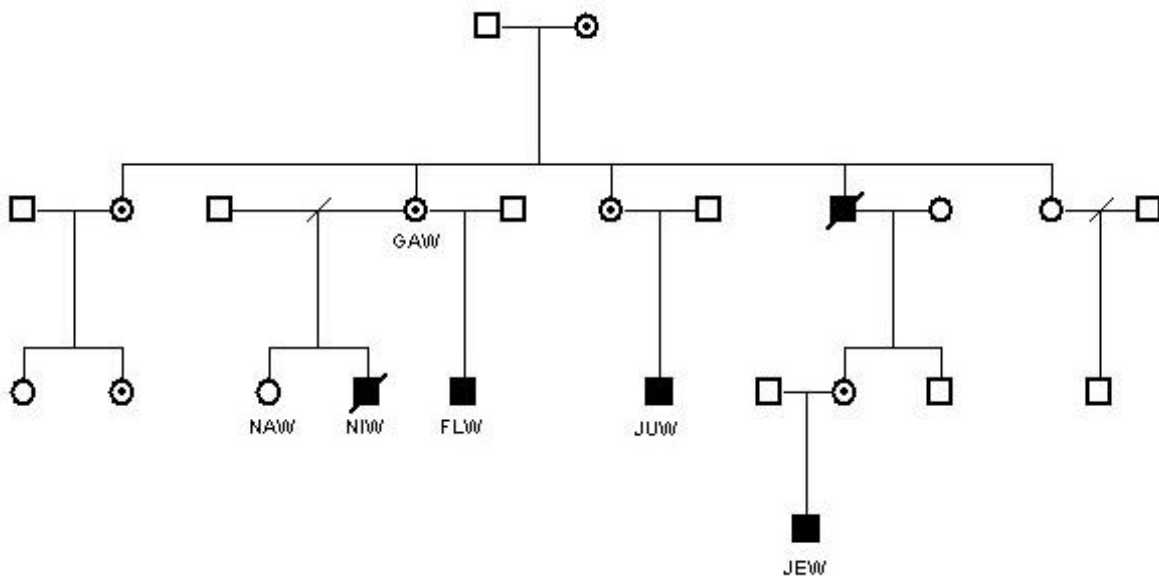
Im Anschluß an die Auftrennung erfolgte der Nachweis der Nukleinsäuren mittels einer Ethidiumbromidfärbung, wobei das Gel 5-20 Minuten in einer wäßrigen Lösung aus 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator (GE-FLX-20L, Firma AGS, Heidelberg) bei 254 oder 365 nm betrachtet wurde. Das spezifische Bandenmuster wurde mit Hilfe eines digitalen Kamerasystems (BioDocAnalyse, Firma Biometra, Göttingen) photographisch dokumentiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische und biochemische Phänotypen

Untersucht wurden insgesamt sechs Mitglieder einer Familie, in der eine X-ALD klinisch und biochemisch diagnostiziert werden konnte. Neben einer Mutter, ihren zwei Söhnen und ihrer Tochter wurden ein Neffe und ein Großneffe der Mutter untersucht. Aus der weiteren Familienanamnese ist bekannt, daß ein Onkel sowie ein Bruder der Mutter im Alter von 39 bzw. 25 Jahren verstorben sind, wobei der verstorbene Bruder der Mutter zunächst unter dem Bild einer der multiplen Sklerose ähnlichen Erkrankung behandelt wurde, bis diese in eine progressive neurodegenerative Erkrankung überging. Insgesamt ist aufgrund der klinischen Beschreibung bei beiden Verstorbenen eine adulte Form der cerebralen X-ALD zu vermuten.

Einen Überblick über die untersuchten Personen liefert der Stammbaum in Abbildung 1. Die demographischen und klinischen Merkmale sind in Tabelle 5, biochemische und kernspintomographische Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.



**Abbildung 1:** Stammbaum der Familie W. Die Mutter GAW ist heterozygote Überträgerin der ALD-Genmutation. Bei ihren Söhnen NIW und FLW sowie bei dem Neffen JUW und dem Großneffen JEW konnte biochemisch eine X-ALD nachgewiesen werden. Bei der Tochter NAW bestand keine Erhöhung der überlangkettigen Fettsäuren.

**Tabelle 5:** Demographische und klinische Merkmale der untersuchten Personen

Patient	Alter (Jahre, Mon.)	Geschlecht (M/W)	Klinische Merkmale
GAW	47,2	W	klinisch asymptomatisch
NAW	27,1	W	klinisch asymptomatisch
NIW	15,4	M	Verhaltensauffälligkeiten, Leistungsabfall, Visusverlust fortschreitende neurodegenerative Erkrankung Exitus am Tag +76 nach allogenen-unverwandter SZT
FLW	9,9	M	therapiebedürftige Nebennierenrindeninsuffizienz neurologisch unauffällig Intelligenzwerte im Durchschnittsbereich
JUW	6,3	M	Störungen im akustischen Kurzzeitgedächtnis und in der visuell-räumlichen Wahrnehmung Z.n. allogenen-unverwandter SZT 12/01 bisher kein weiterer Progress der Erkrankung
JEW	3,1	M	klinisch asymptomatisch

**Tabelle 6:** Biochemische und kernspintomographische Untersuchungsergebnisse

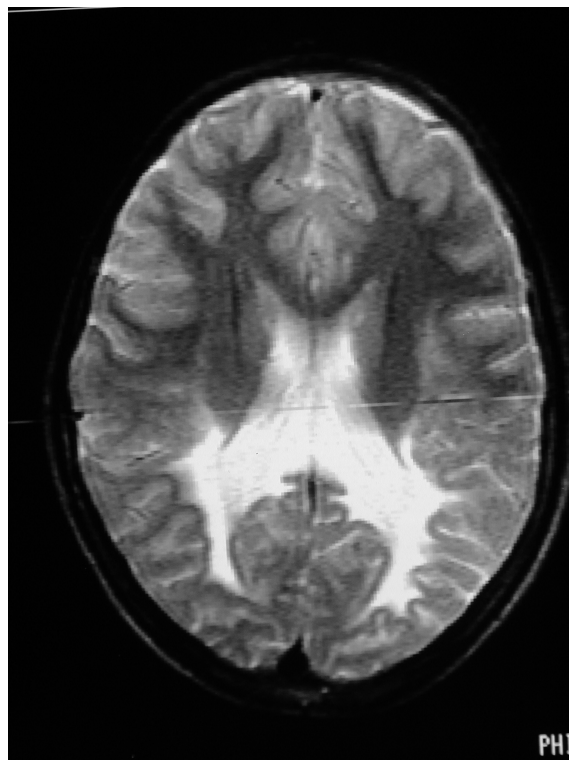
Patient	C24/C22 (nmol/l)	C26/C22 (nmol/l)	C26 (nmol/l)	Nebennieren- insuffizienz	Demyelinisierung im MRT Schädel
GAW	normal	normal	normal	nicht untersucht	nicht untersucht
NAW	normal	normal	normal	nicht untersucht	nicht untersucht
NIW	1,05 (erhöht)	0,036 (erhöht)	2,3 (erhöht)	---	+++
FLW	1,26 (erhöht)	0,058 (erhöht)	3,4 (erhöht)	+++	+
JUW	1,29 (erhöht)	0,081 (erhöht)	3,1 (erhöht)	latent	++
JEW	1,53 (erhöht)	0,052 (erhöht)	2,0 (erhöht)	latent	nicht untersucht

Die zwei untersuchten weiblichen Familienmitglieder (NAW, GAW) sind bis heute asymptomatisch. Laborchemisch liegen bei beiden normwertige überlangkettige Fettsäuren vor, insbesondere auch bei der Mutter GAW, die heterozygote Überträgerin ist (siehe auch 3.2.). Im Gegensatz dazu ist bei allen vier untersuchten männlichen Kindern (NIW, FLW, JUW, JEW) eine Erhöhung der überlangkettigen Fettsäuren festgestellt worden, so daß die Diagnose einer X-ALD gestellt werden konnte. Unter diesen laborchemisch auffälligen Kindern zeigen der jüngste Patient JEW und dessen Onkel FLW bislang keine neurologischen Auffälligkeiten. Während sich bei dem Patienten JEW eine kompensierte Nebennierenrindeninsuffizienz bei



dezent erhöhtem ACTH und normwertigem Cortisol findet, liegt bei dem Patienten FLW eine therapiebedürftige Nebennierenrindeninsuffizienz vor. Außerdem zeigt dieser Patient beginnende okzipitale Demyelinisierungen, die bisher aber nicht fortschreiten.

Im Gegensatz zu diesen bislang milden klinischen Verlaufsformen liegt bei den zwei anderen untersuchten männlichen Kindern NIW und JUW eine cerebrale Form der X-ALD mit neurologischen und kernspintomographischen Auffälligkeiten vor. Dabei manifestierte sich die Erkrankung bei NIW im 13. Lebensjahr mit Verhaltensauffälligkeiten, intellektuellem Abbau und beginnendem beidseitigem Visusverlust. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Kernspintomographie des Schädels die für die X-ALD typische Demyelinisierung bereits in massiver Ausprägung (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Kernspintomographische Untersuchung des Schädels beim Patienten NIW, vorwiegend im okzipitalen Marklager zu erkennende ausgeprägte Hyperintensitäten in der T2-Wichtung.

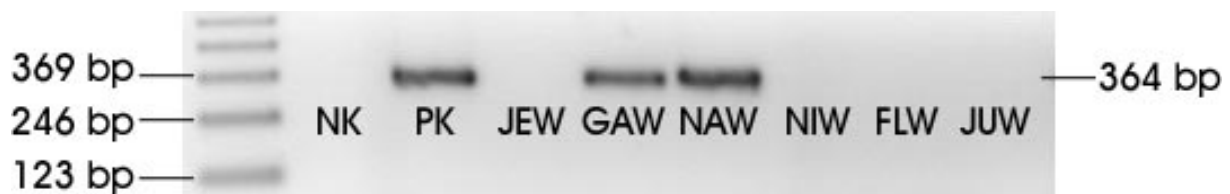
Bei fortschreitender neurodegenerativer Erkrankung wurde die Indikation zur Durchführung einer SZT gestellt. Dabei verstarb der Patient am Tag +76 nach allogenen-unverwandter SZT bei ausgeprägter Graft-versus-Host-Disease unter dem Bild eines hämolytisch-urämischen Syndromes. Bis zum Exitus des Patienten NIW konnte klinisch keine neurologische Verschlechterung des Patienten festgestellt

werden. Die Konzentration der VLCFA befand sich unter der Therapie mit „Lorenzos Öl“ wie bereits vor der SZT im Normbereich. Das Engraftment konnte ab dem Tag +10 verzeichnet werden. In einer Chimärismusanalyse am Tag +49 zeigte sich ein vollständiger Chimärismus im Knochenmark.

Im Gegensatz zu dem Patienten NIW wurde bei dessen Cousin JUW bereits bei beginnender degenerativer neurologischer Erkrankung die Indikation zur Durchführung einer SZT gestellt, die dann im Dezember 2001 durchgeführt wurde. In dem bisherigen zweijährigen Verlauf zeigt der Patient sowohl in der klinischen als auch in der kernspintomographischen Untersuchung keinen weiteren Progress der Erkrankung. Insbesondere war während der Konditionierung und stattgefundenen viralen Infektionen keine Verschlechterung des gesundheitlichen Zustandes zu erkennen. Bei den neuropsychologischen Tests besteht sogar eine wahrscheinlich motivational bedingte Verbesserung des Handlungs-IQ. Die Konzentration der VLCFA befindet sich unter der Therapie mit „Lorenzos Öl“ wie bereits vor der SZT im Normbereich. Bei seit dem Tag +16 bestehendem Engraftment liegt ein vollständiger Chimärismus im Knochenmark vor.

### 3.2. Der genetische Defekt

Zur Charakterisierung der molekularen Veränderung im ALD-Gen hat zunächst die Extraktion genomischer DNA aus den Leukozyten der untersuchten Personen stattgefunden. Die zehn Exone des ALD-Gens sind mit den jeweils angrenzenden Intronsequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert worden, wobei das Exon 1 aufgrund einer Länge von über tausend Basenpaaren durch drei spezifische Oligonukleotidprimerpaare in drei einzelnen Teilen amplifiziert (Exon 1A, 1B und 1C) worden ist. Nach Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente (85-364 bp) in der Agarosegelelektrophorese ist aufgefallen, daß die Exone 1C und 2 wiederholt von den männlichen Familienmitgliedern nicht amplifiziert werden konnten (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Fehlende Amplifikation des Exon 1C bei den männlichen Familienmitgliedern JEW, NIW, FLW und JUW. Regelrechte Amplifikation des Exons bei der Mutter GAW und ihrer Tochter NAW. NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle.

Die ausbleibende Amplifikation der Exone 1C und 2 läßt die Vermutung zu, daß die komplementären Abschnitte zu den spezifischen Oligonukleotidprimern im ALD-Gen der männlichen Familienmitglieder nicht vorhanden bzw. deletiert sind. Aufgrund des zwischen Exon 1 und Exon 2 liegenden und über 3 kb umfassenden Introns kann somit von einer mindestens 3 kb umfassenden Deletion im ALD-Gen ausgegangen werden.

Daraufhin sind weitere spezifische Oligonukleotidprimer entworfen worden, die nachweislich komplementär zu noch amplifizierbaren Abschnitten des ALD-Gens sind. Unter Verwendung dieser spezifischen Oligonukleotidprimer ist dann wiederholt die Amplifikation eines 2,8 kb großen PCR-Fragmentes gelungen. Da eine direkte automatische Sequenzierung des 2,8 kb großen PCR-Fragmentes nicht gelungen ist, ist dieses zur Vervielfältigung in einen Vektor ligiert worden. Die aus den Bakterienkolonien gewonnene DNA ist dann unter Verwendung von ALD-spezifischen Oligonukleotidprimern automatisch sequenziert worden. Dabei hat sich ein Abbruch der bekannten ALD-Sequenz ab Position 948 und eine anschließende Wiederaufnahme der ALD-Sequenz ab Position 9463 gezeigt, so daß eine 8516

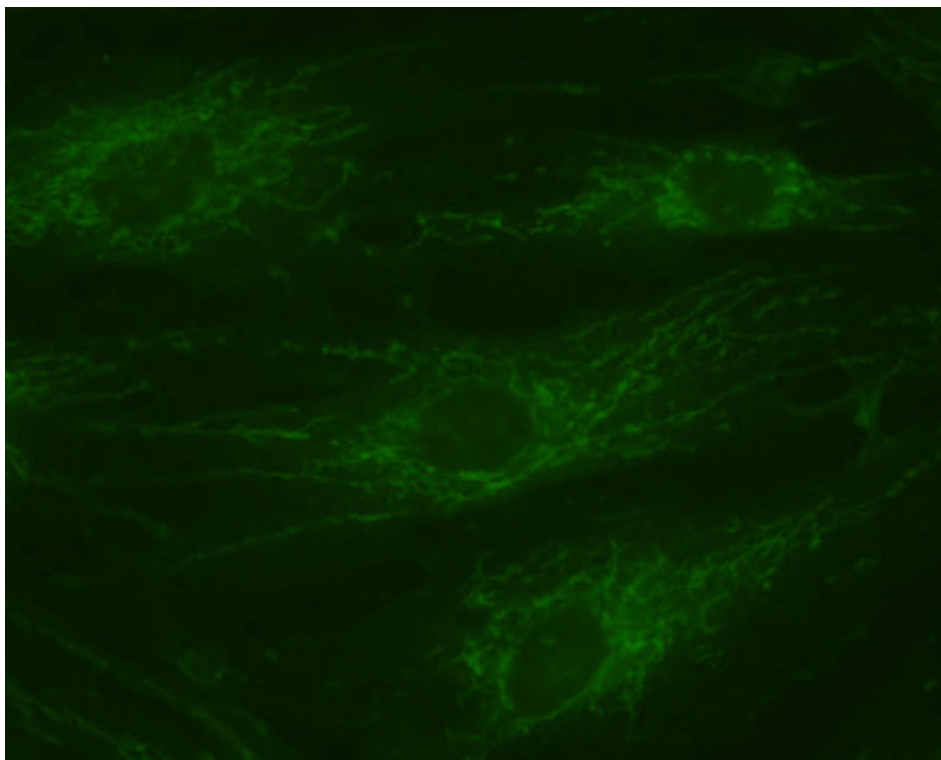
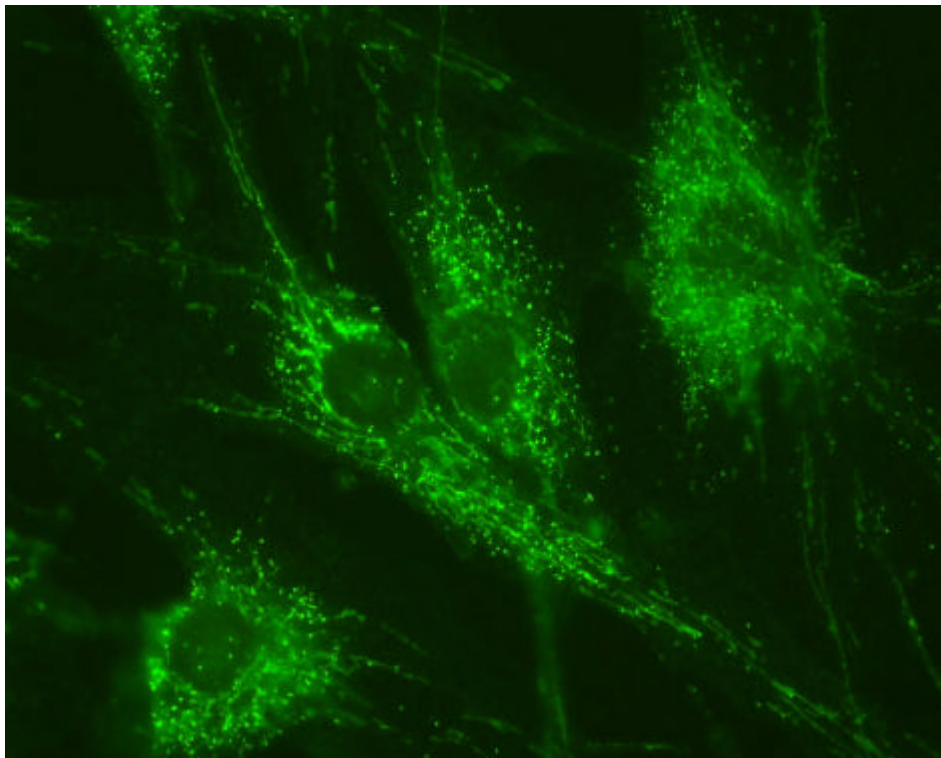
Basenpaare umfassende Deletion (948-9462del) als Ursache der ausbleibenden Amplifikation der Exone 1C und 2 ermittelt werden konnte (Abbildung 4).

	920	940	960	980
<b>Consensus</b>	GCCTCTACTTCTCCCGCAGACCTACTACCGGGTCAGCAACATGGACCAAGTGGTTACCTGAGTTCAGGAGTTTGAC			
bp 1-948 ▶	GCCTCTACTTCTCCCGCAGACCTACTACCGGGTCAGCAACATGGAC			
Sequenz FLW ▶	GC.TCTACTTCTCCCGCAGACCTACTACCGGGTCAGCAACATGGACCAAGTTGCT.ACCTGAGTTCAGGAGTTTGAC			
Sequenz GAW ▶	GC.TCTACTTCTCCCGCAGACCTACTACCGGGTCAGCAACATGGACCAAGTTGCT.ACCTGAGTTCAGGAGTTTGAC			
bp 9463-9900 ▶	CAAGTGGATCACCTGAGTTCAGGAGTTTGAC			

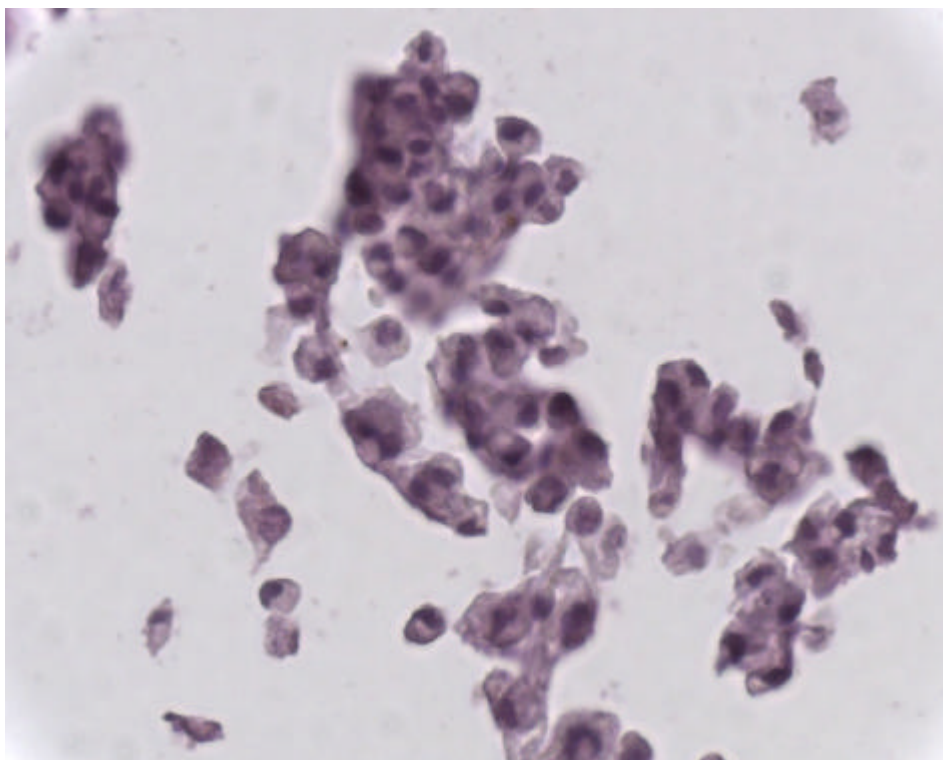
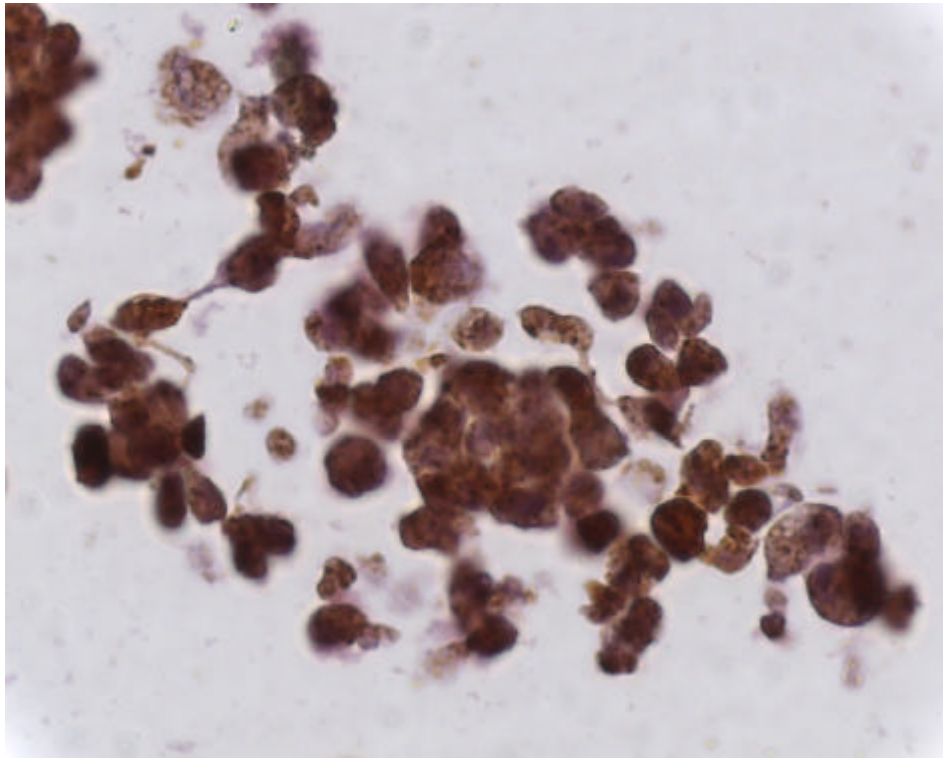
**Abbildung 4:** Abbruch der ALD-Sequenz ab bp 948 und Wiederaufnahme der ALD-Sequenz ab bp 9463 in den sequenzierten PCR-Fragmenten von FLW (Sohn) und GAW (Mutter). Entdeckung einer 8516 Basenpaare umfassenden Deletion (948-9462del).

Diese Deletion umfasst neben einem Teil des Exons 1 das über 3 kb umfassende Intron 1, das komplette Exon 2 (180 bp) sowie knapp 5 kb des insgesamt 6,7 kb umfassenden Introns 2. Aufgrund der deletierten Exonabschnitte bleibt die Kodierung der Aminosäuren Nr. 316-489 des ALDP aus und es erfolgt eine Verschiebung des Leserasters. Somit kann ein Funktionsverlust des Genproduktes angenommen werden.

Um zu klären inwieweit aufgrund der Mutation bei den männlichen Familienmitgliedern (NIW, FLW, JUW und JEW) ein mutiertes Genprodukt exprimiert wird, oder ob das Genprodukt vollständig fehlt, ist eine Immunfluoreszenzfärbung an kultivierten Hautfibroblasten von FLW durchgeführt worden. Dabei sind zwei Antikörper (MAB2164 und MAB2162) zur Anwendung gekommen, die sich gegen zwei unterschiedliche ALDP-Fragmente richten. Diese ALDP-Fragmente bestehen aus den Aminosäuren Nr. 279-482 bzw. den Aminosäuren Nr. 495-648. Somit ist der Antikörper MAB2164 gegen das durch die Mutation deletierte ALDP-Fragment (Aminosäuren Nr. 316-489) gerichtet, MAB2162 stattdessen gegen die im hinteren Teil des ALDP gelegene Nukleotidbindungsfalte. Während in der Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen das intraperoxisomale Protein Katalase gerichteten Primäantikörper das typische granuläre Färbungsmuster (Abbildung 5) sichtbar ist, ist sowohl mit MAB2162 als auch mit MAB2164 kein Proteinfragment zu detektieren (Abbildung 6). Weiterhin sind zur Überprüfung der Funktionalität der bisher nicht im Paraffingewebe erprobten verwendeten Antikörper MAB2162 und MAB2164 kultivierte Hautfibroblasten von FLW in Paraffin eingebettet und mit dem DAKO® CSA-System immunhistochemisch gefärbt worden (Abbildung 7 und 8). Auch mit dieser Färbemethode läßt sich sowohl mit MAB2162 als auch mit MAB2164 als Primäantikörper kein ALDP nachweisen.



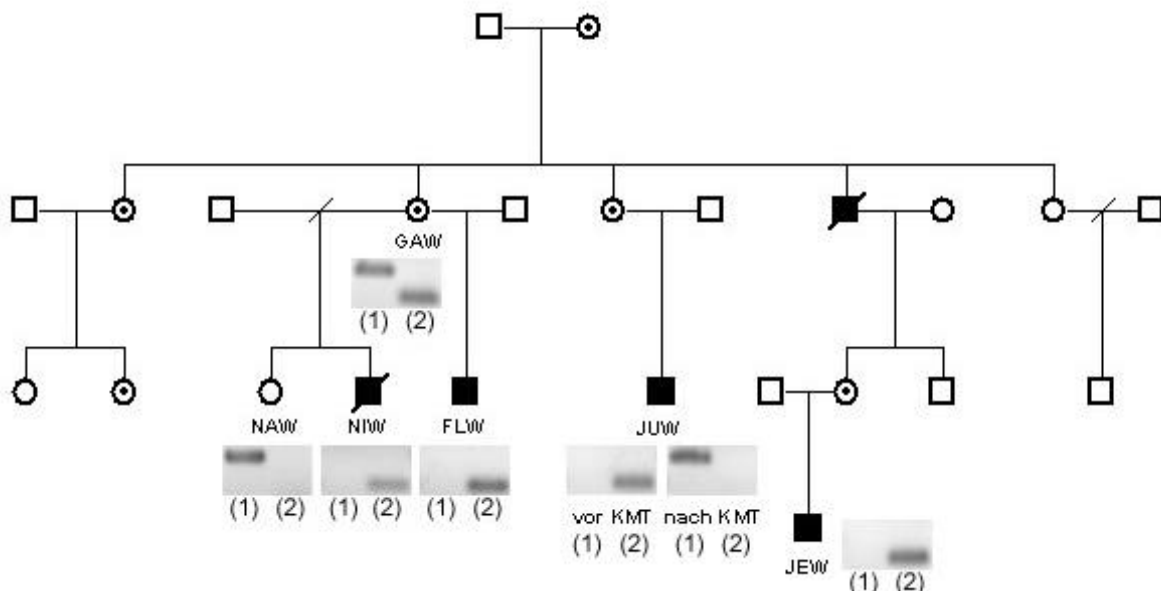
**Abbildung 5 und 6:** Immunfluoreszenzfärbung. Oben: granuläres Färbemuster von katalasegefärbten Hautfibroblasten des Patienten FLW (630-fache Originalvergrößerung). Unten: Im Gegensatz dazu fehlende Anfärbung der Hautfibroblasten des Patienten FLW unter Verwendung des gegen das ALDP gerichteten Primärantikörpers MAB2162 (630-fache Originalvergrößerung).



**Abbildung 7 und 8:** Immunhistochemische Färbung mit dem DAKO® CSA-System von in Paraffingewebe eingebetteten kultivierten Hautfibroblasten mit MAB2162 als Primärantikörper. Oben: granuläre bräunliche Anfärbung bei der Positivkontrolle (400-fache Originalvergrößerung), unten: fehlende Anfärbung bei dem Patienten FLW (400-fache Originalvergrößerung).

Aus der Deletion 948-9462del im ALD-Gen resultiert somit ein Verlust des Genproduktes ALDP, während andere peroxisomale Proteine nachweisbar bleiben.

Zur molekulargenetischen Charakterisierung der weiteren Familienmitglieder sind ALD-spezifische Oligonukleotidprimerpaare (JG 753/754 bzw. JG 753/756) entworfen worden, deren zu erwartende PCR-Fragmente (68 bp bzw. 158 bp) sowohl innerhalb als auch außerhalb der detektierten Deletion liegen. Somit ist eine Amplifikation mit dem Oligonukleotidprimerpaar JG 753/756 nur dann möglich, wenn zumindestens auf einem Allel die bekannte Deletion nicht vorliegt. Im Gegensatz dazu erfolgt die Amplifikation eines 68 Basenpaare umfassenden PCR-Fragmentes mit dem Oligonukleotidprimerpaar JG 753/754 nur dann, wenn Abschnitte des ALD-Gens wie vorbeschrieben deletiert sind. Somit amplifizieren heterozygote Anlageträger aufgrund ihrer zwei unterschiedlichen Allele beide PCR-Fragmente. Die molekulargenetische Charakterisierung der untersuchten Familienmitglieder durch die Amplifizierung der vorbeschriebenen PCR-Fragmente ist dem Stammbaum in Abbildung 9 zu entnehmen. Alle vier männlichen untersuchten Kinder (FLW, NIW, JUW, JEW) besitzen die Deletion 948-9462del und amplifizieren das 68 bp PCR-Fragment. Im Gegensatz dazu amplifiziert die nach der SZT aus EDTA-Blut des Patienten JUW gewonnene genomische DNA nur das größere PCR-Fragment. Die heterozygote Mutter GAW amplifiziert dementsprechend beide PCR-Fragmente. Für ihre Tochter NAW ist, indem nur das größere PCR-Fragment amplifiziert wurde, eine Heterozygotie für die ALD-Mutation ausgeschlossen worden (Abbildung 9).



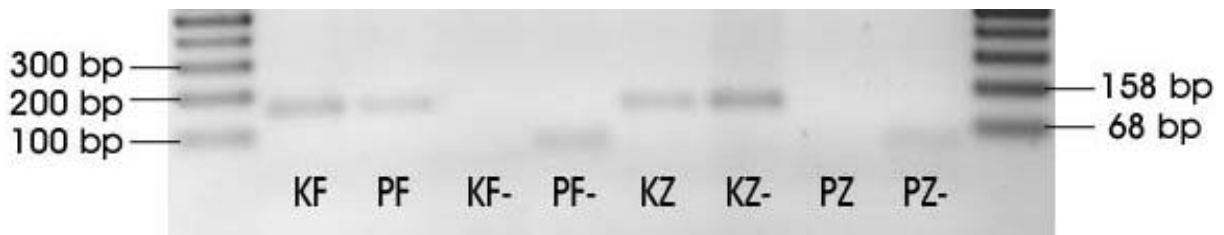
**Abbildung 9:** Molekulargenetische Charakterisierung der Familie W. Die betroffenen männlichen Familienmitglieder (NIW, FLW, JEW und JUW vor SZT) mit der Deletion 948-9462del amplifizieren das 68 bp PCR-Fragment (2), während gesunde Familienmitglieder (NAW, JUW nach SZT) das 158 bp PCR-Fragment (1) amplifizieren. Die heterozygote Mutter GAW amplifiziert beide PCR-Fragmente.

### **3.3. Auswirkungen der Stammzelltransplantation auf den Genotyp**

Um den Effekt der SZT bei dem Patienten NIW auf den Geno- und Phänotyp zu untersuchen, ist zunächst aus den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben der Obduktion die Extraktion genomischer DNA erfolgt. Diese ist anschließend in PCR-Ansätzen mit den oben beschriebenen Oligonukleotidprimerpaaren JG 753/756 bzw. JG 753/754 eingesetzt worden, um das Vorliegen intakter genomischer DNA in den einzelnen Geweben zu beweisen. Dabei hat sich sowohl mit dem Oligonukleotidprimerpaar JG 753/756 (Amplifikation bei fehlender Deletion) als auch mit dem Oligonukleotidprimerpaar JG 753/754 (Amplifikation bei vorhandener Deletion) das entsprechende PCR-Fragment amplifizieren lassen. Die Abbildungen 10-22 stellen die Ergebnisse der Agarosegelelektrophoresen dar. Zusammenfassend hat sich beweisen können, daß in allen 23 unterschiedlichen Geweben sowohl körpereigene DNA mit der bekannten Deletion 948-9462del als auch DNA vom Spender ohne die vorbeschriebene Deletion im ALD-Gen vorliegt.

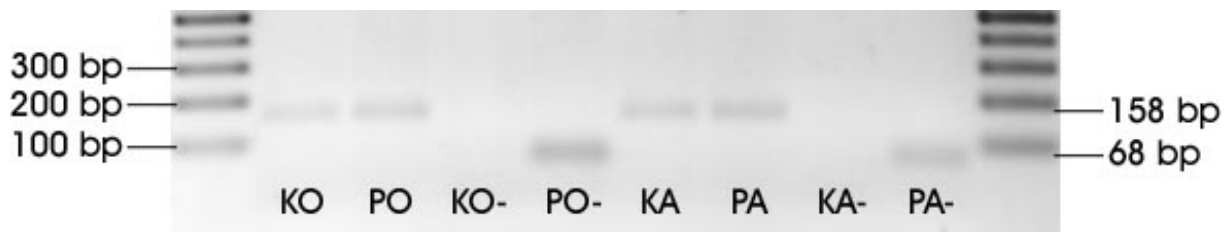


### Frontale und zentrale Hirnregion



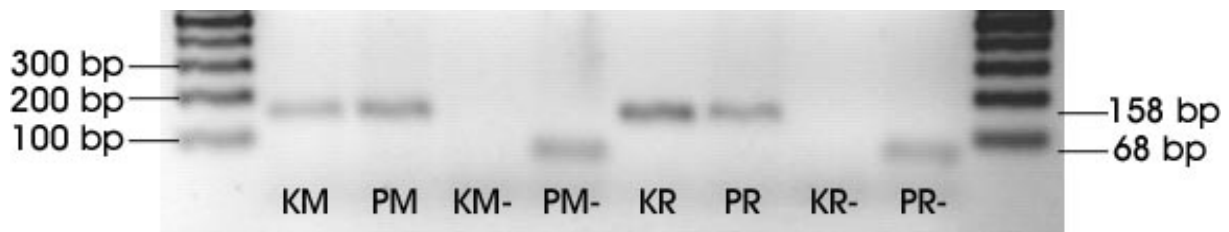
**Abbildung 10:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der frontalen Hirnregion (F) und der zentralen Hirnregion (Z). Sowohl in der frontalen als auch in der zentralen Hirnregion des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PF- und PZ-) sowie ohne die bekannte Deletion (PF und PZ) nachgewiesen werden.

### Rechte okzipitale Hirnregion und Ammonshorn



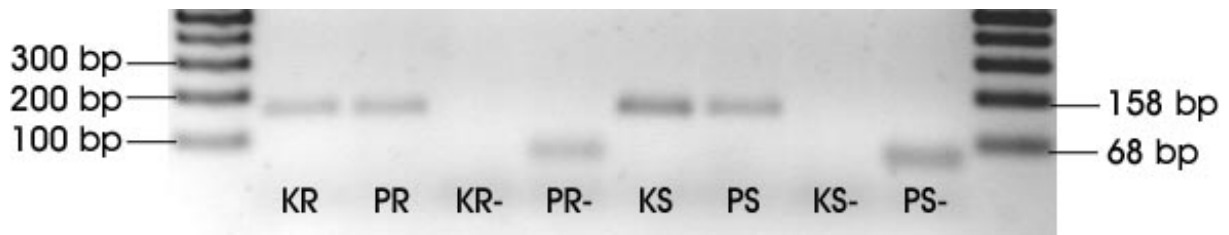
**Abbildung 11:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der okzipitalen Hirnregion rechts (O) und dem Ammonshorn (A). Sowohl in der okzipitalen Hirnregion rechts als auch im Ammonshorn des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PO- und PA-) sowie ohne die bekannte Deletion (PO und PA) nachgewiesen werden.

### Medulla oblongata und thorakales Rückenmark



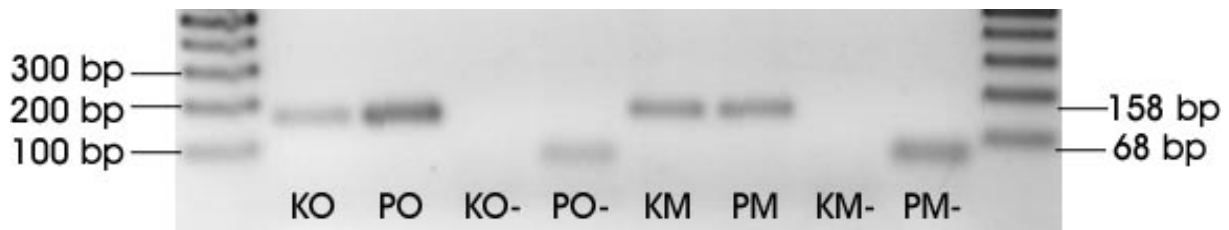
**Abbildung 12:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der Medulla oblongata (M) und dem thorakalen Rückenmark (R). Sowohl in der Medulla oblongata als auch im thorakalen Rückenmark des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PM- und PR-) sowie ohne die bekannte Deletion (PM und PR) nachgewiesen werden.

### lumbales Rückenmark und Stammganglien



**Abbildung 13:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus dem lumbalen Rückenmark (R) und den Stammganglien (S). Sowohl im lumbalen Rückenmark als auch in den Stammganglien des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PR- und PS-) sowie ohne die bekannte Deletion (PR und PS) nachgewiesen werden.

### linke okzipitale Hirnregion und Mittelhirn



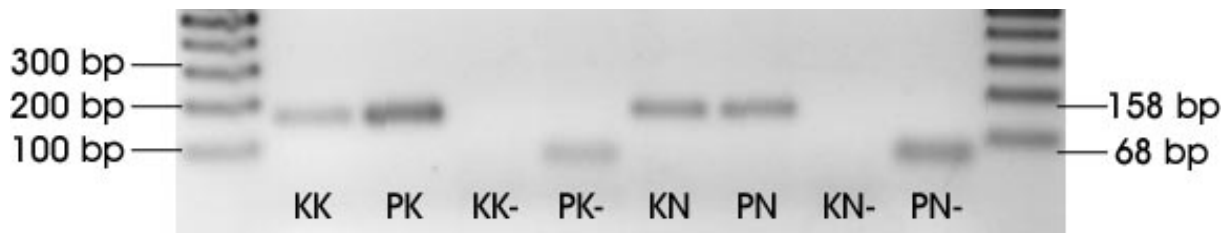
**Abbildung 14:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der linken okzipitalen Hirnregion (O) und dem Mittelhirn (M). Sowohl in der linken okzipitalen Hirnregion als auch im Mittelhirn des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PO- und PM-) sowie ohne die bekannte Deletion (PO und PM) nachgewiesen werden.

### Brücke und Kleinhirn



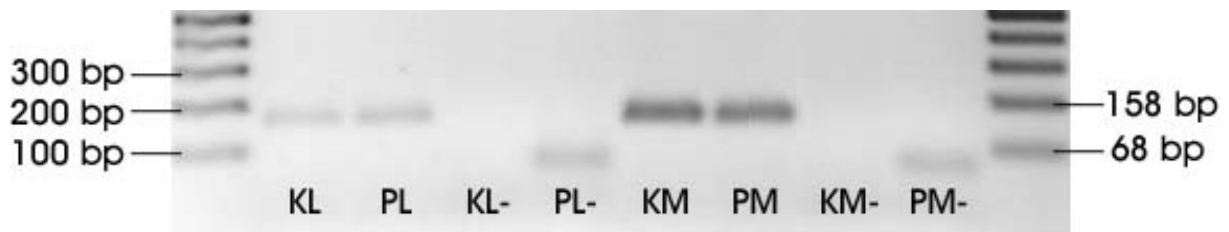
**Abbildung 15:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der Brücke (B) und dem Kleinhirn (K). Sowohl in der Brücke als auch im Kleinhirn des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PB- und PK-) sowie ohne die bekannte Deletion (PB und PK) nachgewiesen werden.

### Knochenmark und Nebenniere



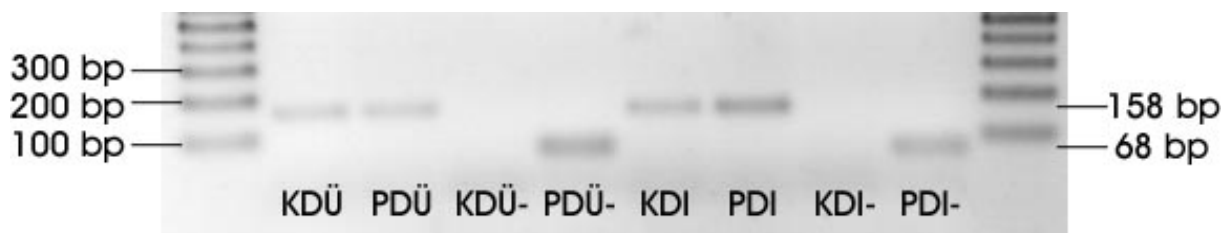
**Abbildung 16:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus dem Knochenmark (K) und der Nebenniere (N). Sowohl im Knochenmark als auch in der Nebenniere des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PK- und PN-) sowie ohne die bekannte Deletion (PK und PN) nachgewiesen werden.

### Leber und Milz



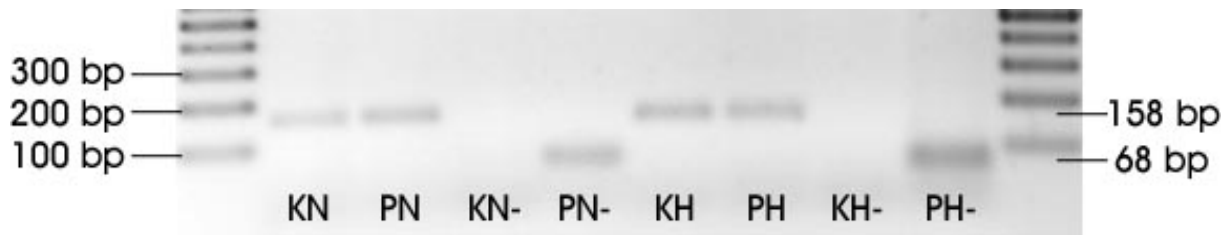
**Abbildung 17:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der Leber (L) und der Milz (M). Sowohl in der Leber als auch in der Milz des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PL- und PM-) sowie ohne die bekannte Deletion (PL und PM) nachgewiesen werden.

### Dünn- und Dickdarm



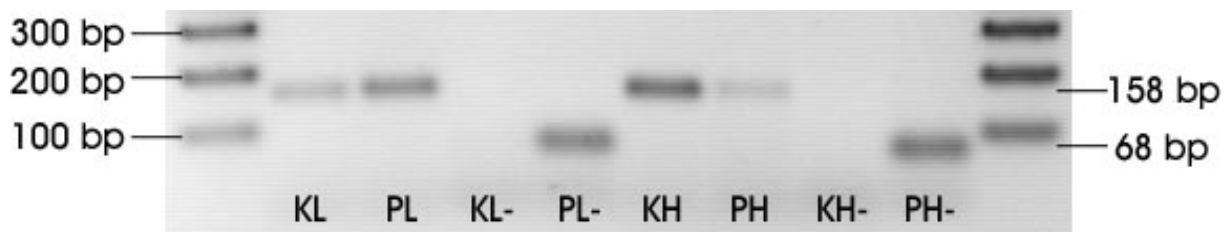
**Abbildung 18:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus dem Dünn- (DÜ) und Dickdarm (DI). Sowohl im Dünn- als auch im Dickdarm des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PDÜ- und PDI-) sowie ohne die bekannte Deletion (PDÜ und PDI) nachgewiesen werden.

### Niere und Herz



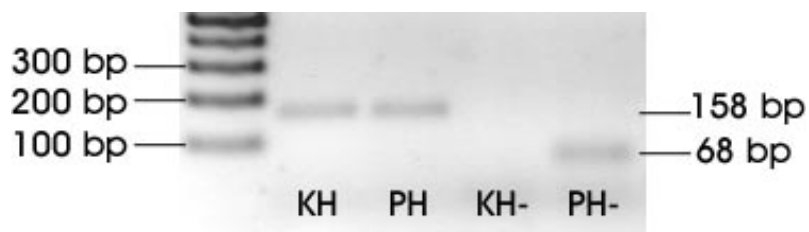
**Abbildung 19:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der Niere (N) und dem Herz (H). Sowohl in der Niere als auch im Herz des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PN- und PH-) sowie ohne die bekannte Deletion (PN und PH) nachgewiesen werden.

### Lunge und Haut



**Abbildung 20:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus der Lunge (L) und der Haut (H). Sowohl in der Lunge als auch in der Haut des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PL- und PH-) sowie ohne die bekannte Deletion (PL und PH) nachgewiesen werden.

### Hoden

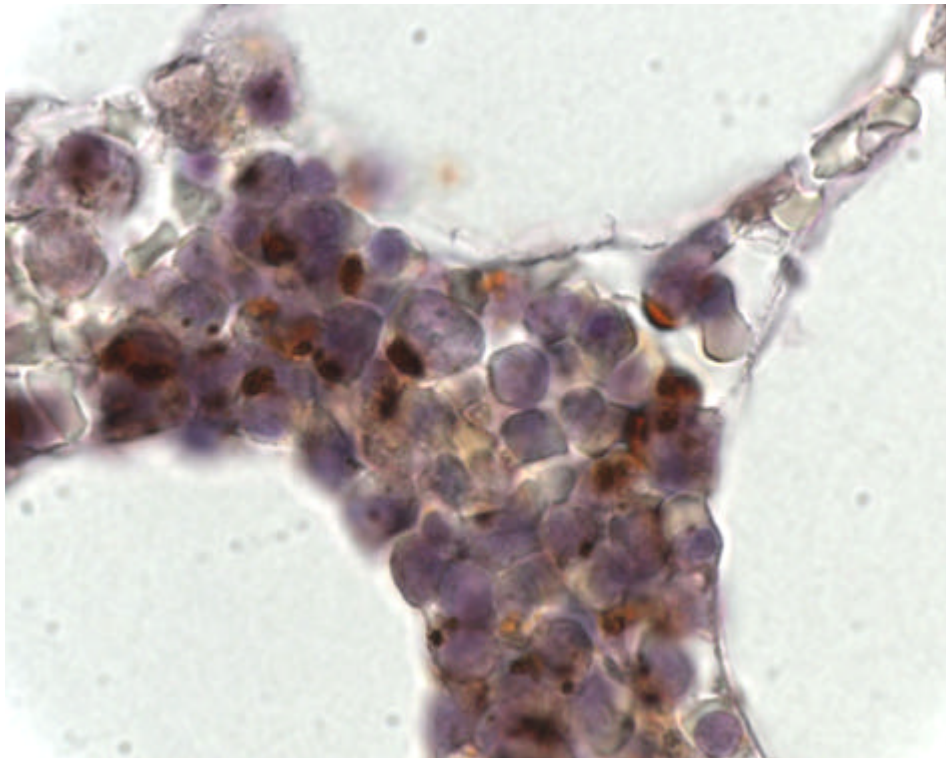
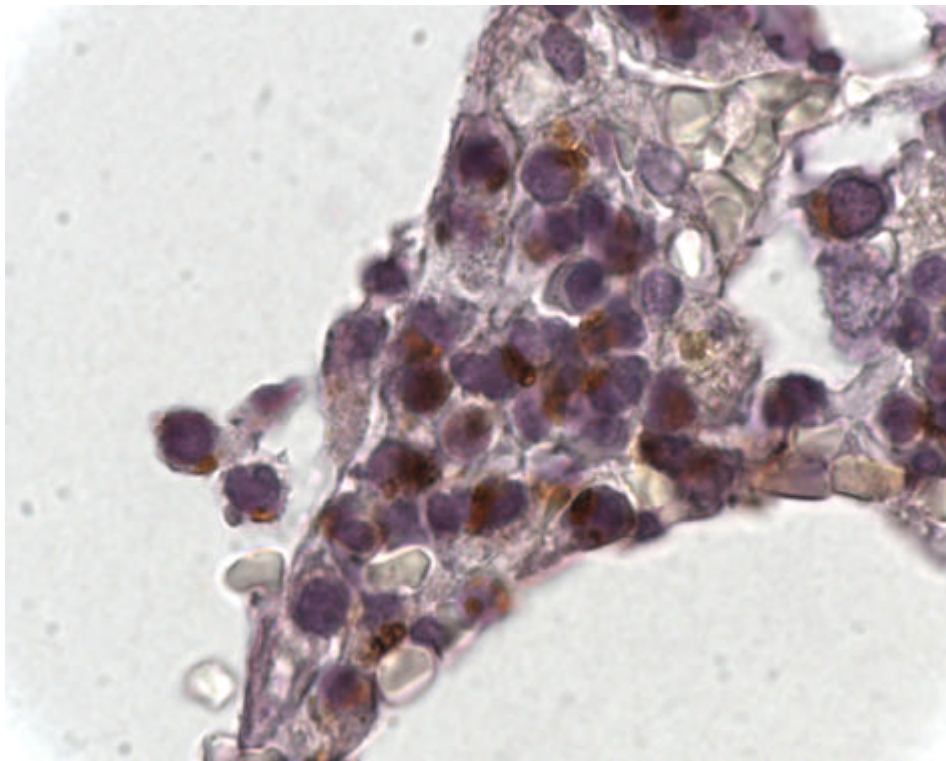


**Abbildung 21:** Auftragung der PCR-Fragmente einer Kontrolle (K) und des Patienten NIW (P) aus dem Hoden (H). Auch im Hoden des Patienten NIW konnte DNA mit der bekannten Deletion (PH-) sowie ohne die bekannte Deletion (PH) nachgewiesen werden.

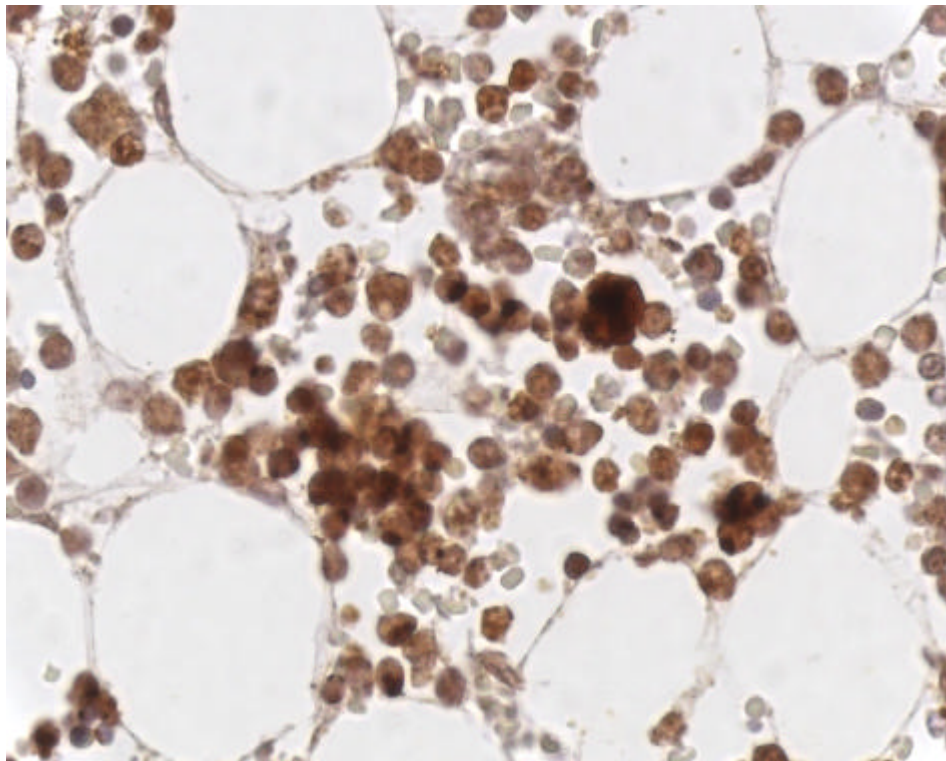
Zum Nachweis eines möglicherweise neu gebildeten ALDPs sind die einzelnen Paraffingewebe immunhistochemisch gefärbt worden. Dafür sind die bereits in der Färbung von kultivierten Hautfibroblasten bewährten ALDP-Antikörper MAB2162 und MAB2164 zur Anwendung gekommen. Während diese Antikörper bisher bei frischem oder kryokonserviertem Material vielseitig in unserer Arbeitsgruppe erprobt worden sind, mußte ihre Verwendung für die immunhistochemischen Färbungen von Paraffingewebe etabliert werden. Dieses ist zunächst nach den Angaben des Antikörperherstellers erfolgt. Aufgrund der besonderen Lokalisation des ALDP innerhalb einer Zelle (peroxisomal) und innerhalb eines Peroxisoms (membranständig), sind verschiedene Formen der Vorbehandlung des Gewebes (sog. Antigen Retrieval) durchgeführt worden. Da unterschiedliche Arten von immunhistochemischen Färbungen mit den ALDP-Antikörpern nicht zu reproduzierbaren spezifischen Ergebnissen geführt haben, ist schließlich mit dem DAKO® CSA-System eine immunhistochemische Anfärbemethode mit Verstärkerreaktion ausgewählt worden, die eine bis zu 50-fache Steigerung der Sensitivität verspricht.

Unter Verwendung dieser Färbemethode haben sich in allen 46 angefärbten Geweben unterschiedliche Strukturen bei regelrechter Negativ- und Positivkontrolle nachweisen lassen. Insgesamt hat sich in dem Ausmaß und Grad der Anfärbungen kein Unterschied zwischen dem Kontroll- und dem Patientengewebe gezeigt, wobei besonderes Augenmerk auf die Ergebnisse der Anfärbungen von Knochenmark und der unterschiedlichen Hirnregionen zu legen ist.

Im Knochenmark ist sowohl im Kontroll- als auch im Patientengewebe mit beiden verwendeten Antikörpern eine zytoplasmatische und vereinzelt grobschollige Anfärbung erkennbar (Abbildung 22 und 23 sowie 24). Insbesondere der ALDP-Antikörper MAB2162 zeigt neben dieser Anfärbung das aus der Anfärbung von kultivierten Hautfibroblasten bekannte granuläre Muster. Dabei lassen sich neben den Zellen der Granulopoese auch Megakaryozyten anfärben (Abbildung 24, Abbildung 7).



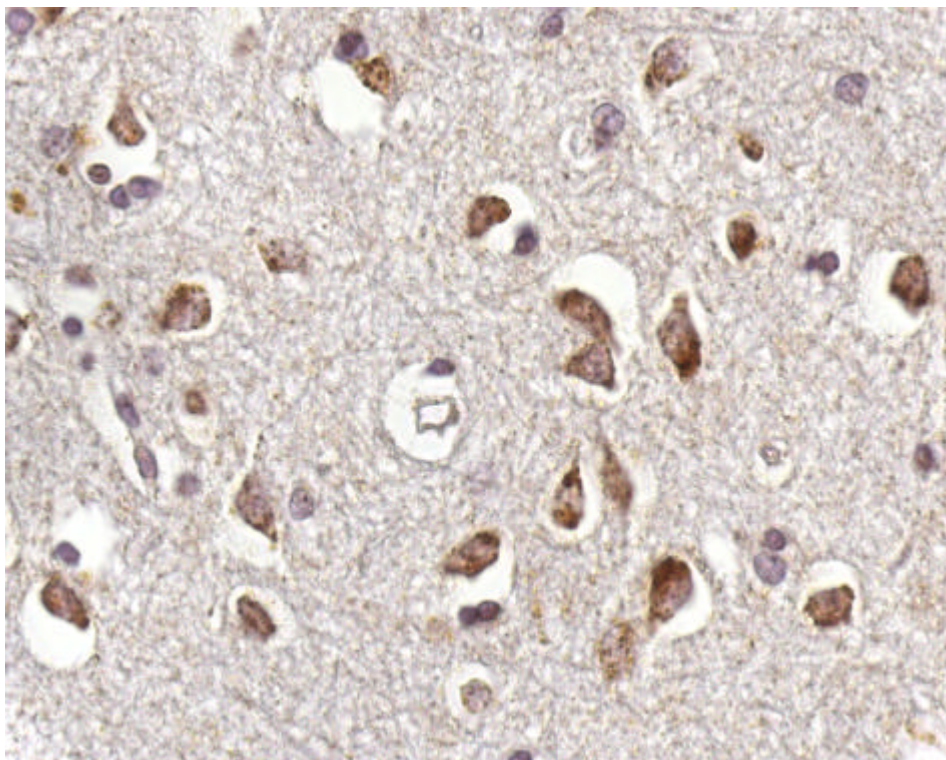
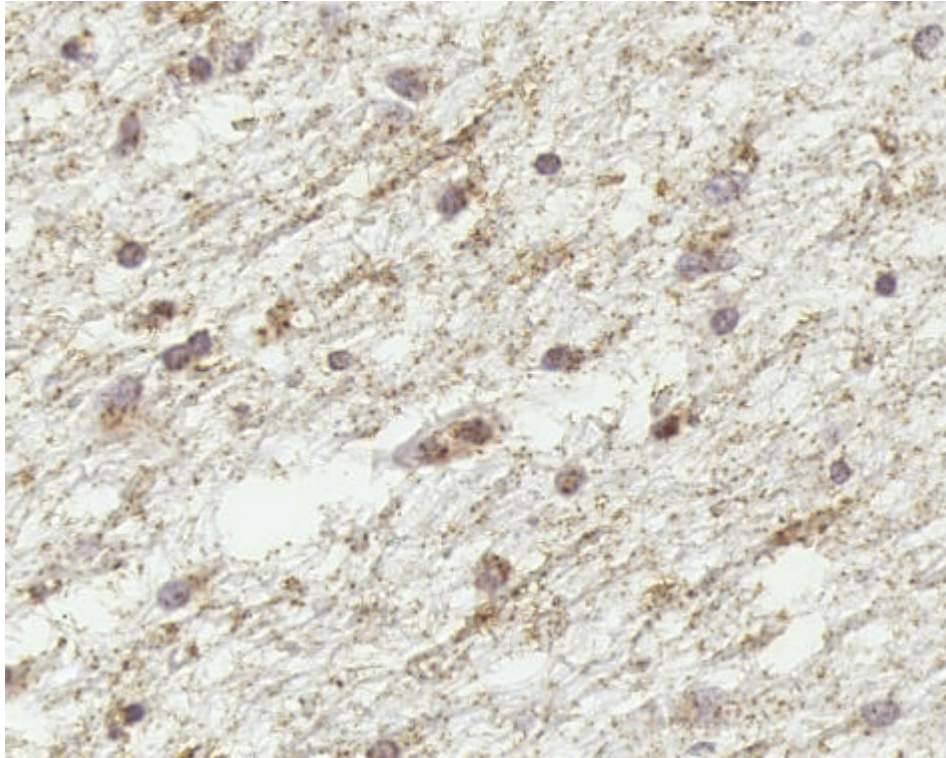
**Abbildung 22 und 23:** Immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebettetem Knochenmark mit MAB2164 als Primärantikörper. Oben: zytoplasmatische vereinzelt grobschollige bräunliche Anfärbung des Kontrollgewebes (1000-fache Originalvergrößerung). Unten: vergleichbare Anfärbung des Patientengewebes (1000-fache Originalvergrößerung).



**Abbildung 24:** Immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebettetem Knochenmark mit MAB2162 als Primärantikörper. Hier im Kontrollgewebe bekannte granuläre bräunliche Anfärbung mit vereinzelt grobscholliger Anfärbung (400-fache Originalvergrößerung).

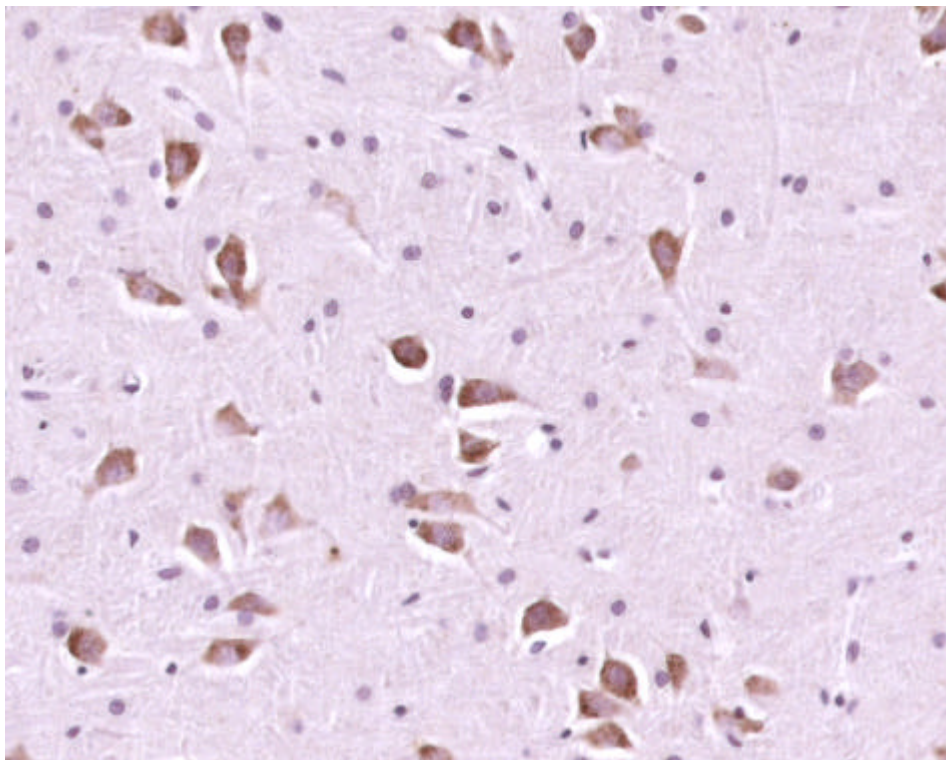
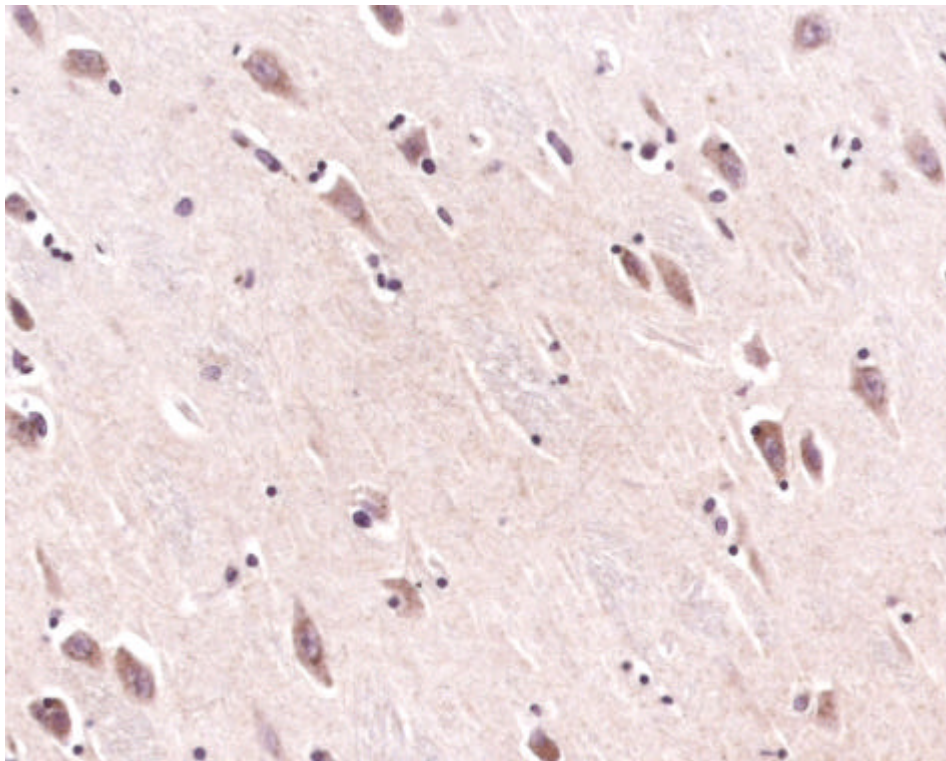
In den 12 unterschiedlichen Hirnregionen zeigt sich bei regelrechten Positivkontrollen mit dem Synaptophysin-Antikörper ein einheitliches Bild der Anfärbung. Sowohl im Kontroll- als auch im Patientengewebe sind neben Blut- und Gliazellen auch Nervenzellen, insbesondere deren Zytoplasma, angefärbt (Abbildung 25-28). Dabei zeigt der ALDP-Antikörper MAB2162 generell eine intensivere Anfärbung als der ALDP-Antikörper MAB2164, welcher teilweise nur lokalisiert reagiert hat.

Auch in den Anfärbungen von Niere und Nebenniere finden sich keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientengewebe. Trotz der teilweise erheblich autolytischen veränderten Gewebestruktur zeigt das Patienten- wie das Kontrollgewebe in der Niere eine Anfärbung von Tubulusepithelzellen (Abbildung 29). In den Anfärbungen der Nebenniere ist ein deutlicher gradueller Unterschied zwischen der Anfärbung von Nebennierenrinde und -mark zu erkennen (Abbildung 30). Die Anfärbungen von Leber und Milz sind aufgrund gravierender autolytischer Gewebsveränderungen leider nicht auswertbar gewesen.

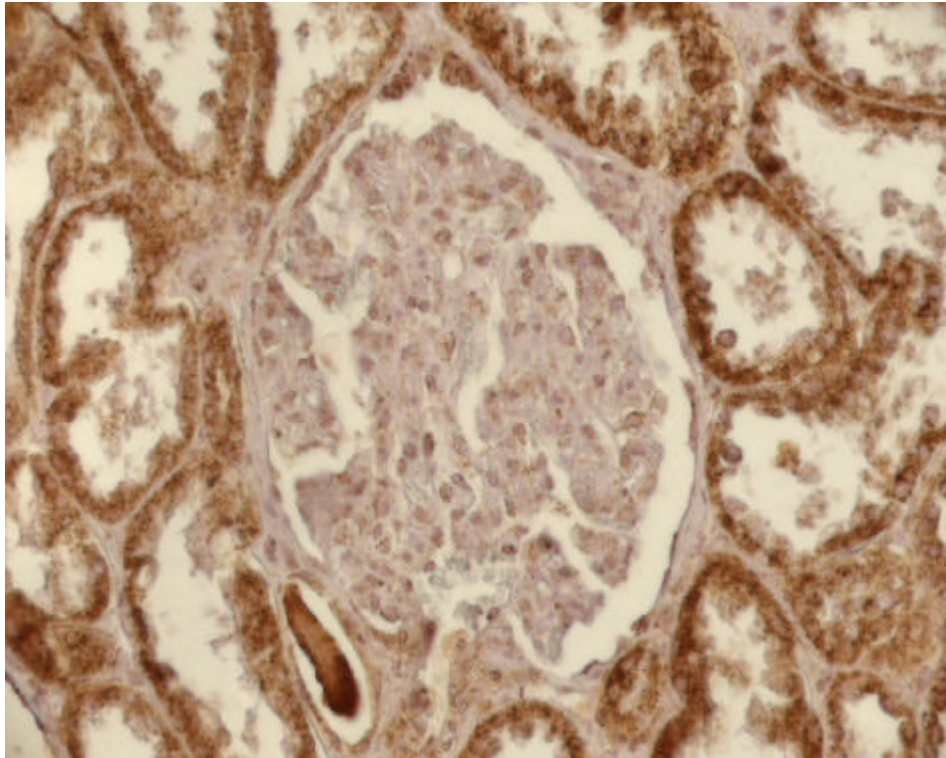


**Abbildung 25 und 26:** Immunhistochemische Färbung der in Paraffin eingebetteten okzipitalen Hirnregion des Patienten NIW mit MAB2162 als Primärantikörper. Oben: ubiquitäre bräunliche granuläre Anfärbung der Gliazellen in der weißen Substanz (400-fache Originalvergrößerung). Unten: bräunliche granuläre Anfärbung von Nervenzellen in der grauen Substanz (400-fache Originalvergrößerung).

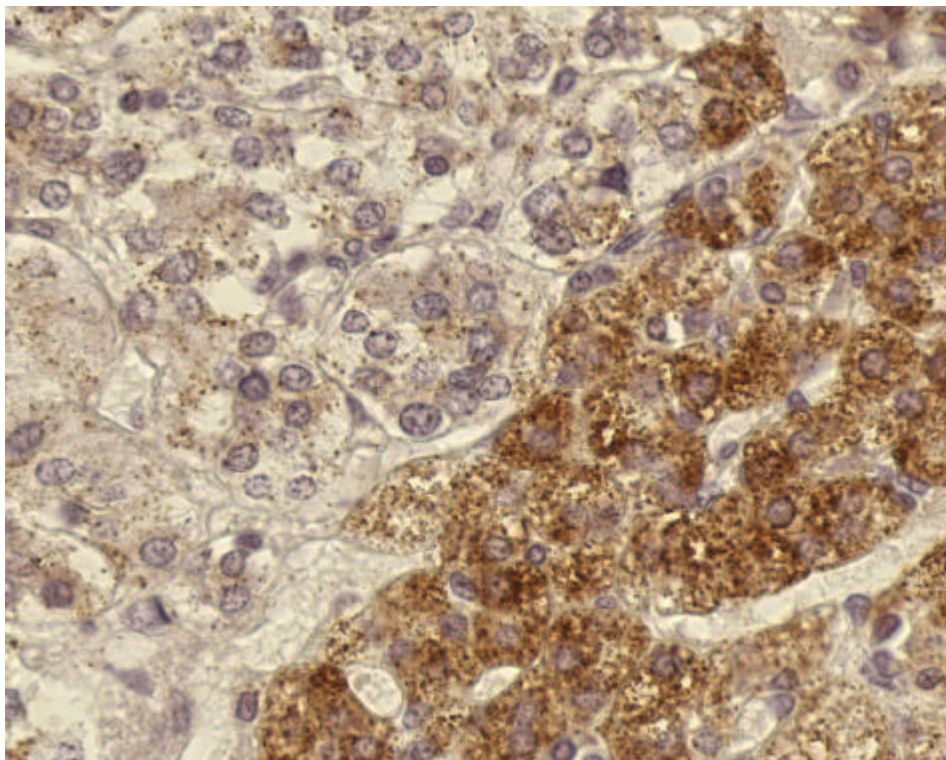




**Abbildung 27 und 28:** Immunhistochemische Färbung der in Paraffin eingebetteten Ammonshorn-Hirnregion mit MAB2162 als Primärantikörper. Oben: bräunliche granuläre Anfärbung von Nervenzellen im Kontrollgewebe (400-fache Originalvergrößerung). Unten: gleichartige Anfärbung des Patientengewebes (400-fache Originalvergrößerung).



**Abbildung 29:** Immunhistochemische Färbung eines in Paraffin eingebetteten Kontrollgewebes der Niere mit MAB2162 als Primärantikörper. Bei Aussparung des Glomerulums stellt sich eine Anfärbung von Tubulusepithelzellen dar (400-fache Originalvergrößerung).



**Abbildung 30:** Immunhistochemische Färbung eines in Paraffin eingebetteten Kontrollgewebes der Nebenniere mit MAB2164 als Primärantikörper. Deutlich gradueller Unterschied der Anfärbung von Nebennierenrinde (rechts) und -mark (links) (400-fache Originalvergrößerung).

Zum Nachweis einer spezifischen Anfärbung des ALDP ist durch Laserdissektion von Paraffingewebe die Extraktion von DNA vier verschiedener Zellarten (Blut-, Glia- und Nervenzellen sowie Nierentubulusepithelzellen) getrennt voneinander erfolgt. Die so gewonnene DNA ist dann in die bereits zuvor bewährte PCR mit den ALD-spezifischen Oligonukleotidprimerpaaren JG 753/754 bzw. JG 753/756 eingesetzt worden, um die bekannte Deletion in der DNA ein- oder auszuschließen. Aufgrund der Tatsache, daß spezifisch angefärbtes ALDP das Vorhandensein von intakter DNA in der Zelle voraussetzt, müßte somit eine Amplifikation mit dem Oligonukleotidprimerpaar JG 753/756 insbesondere mit der DNA aus Nerven- und Nierentubulusepithelzellen gelingen. Leider ist trotz des Einsatzes von in Quantität und Qualität ausreichender DNA weder eine Amplifikation mit DNA des Kontroll- als auch des Patientengewebes möglich gewesen.



**Abbildung 31:** PCR mit dem Oligonukleotidprimerpaar JG 753/756. Eingesetzt worden ist mittels Laserdissektion gewonnene DNA aus Kontrollgewebe (K) und Gewebe des Patienten NIW (P). NT = DNA aus Nierentubuluszellen, NZ = DNA aus Nervenzellen, GL = DNA aus Gliazellen, BZ = DNA aus in Hirngewebeschnitten sichtbaren Blutzellen, NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle, eingesetzt worden ist aus EDTA-Blut gewonnene DNA. Sowohl mit DNA aus Kontroll- als auch aus Patientengewebe gelingt keine Amplifikation.

## 4. Diskussion

### 4.1. *Der genetische Defekt*

Bei der X-ALD handelt es sich um eine genetisch bedingte Erkrankung, der ein Defekt im ALD-Gen auf dem X-Chromosom zugrunde liegt. Bislang ist eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen im ALD-Gen publiziert worden, die in einer im Internet verfügbaren Datenbank zusammengefasst sind (Kemp et al. 2001). Bei diesen Mutationen handelt es sich hauptsächlich um Missense-Mutationen (59%) und Frame shift-Mutationen (24%), während die Deletion eines oder mehrerer Exone mit ca. 4% selten vorkommt.

In der in dieser Arbeit untersuchten Familie findet sich ein bisher nicht beschriebener Defekt im ALD-Gen, wodurch die Beobachtung unterstützt wird, daß in der Regel jede betroffene Familie ihre eigene Mutation im ALD-Gen besitzt (Kemp et al. 2001). Dieser Defekt, eine Deletion des Exons 2 und eines Teiles des Exons 1 des ALD-Gens (948-9462del), ist bei 5 der 6 untersuchten Familienmitglieder nachweisbar und führt wie ca. 2/3 aller beschriebenen X-ALD-Mutationen zu einem Verlust des ALDP. Unter den bisher beschriebenen 22 Deletionen von einem oder mehr Exonen des ALD-Gens sind bisher jedoch nur zwei mit Blick auf ihre Auswirkungen auf die ALDP-Expression untersucht worden, wobei auch diese beiden Deletionen einen Verlust des ALDP zeigen. In der o.g. Datenbank der X-ALD-Mutationen sind Genveränderungen im Exon 2 mit 3% selten. Hingegen sind Mutationen im Exon 1C mit 21% am häufigsten (Kemp et al. 2001).

Trotz identischen genetischen Defektes sind bei den vier betroffenen untersuchten Kindern drei verschiedene klinische Phänotypen zu unterscheiden. Während der Patient JEW bislang klinisch asymptomatisch ist und der Patient FLW eine Nebennierenrindeninsuffizienz ohne neurologische Symptomatik zeigt, hat sich bei den Patienten NIW und JUW die X-ALD mit einer kindlichen cerebralen Form manifestiert. Außerdem liegt in der weiteren Familienanamnese in zwei Fällen eine adulte cerebrale Form vor. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß zwischen der entdeckten Mutation im ALD-Gen sowie dem fehlenden Nachweis des ALDP und dem Phänotyp keine Korrelation besteht. Diese fehlende Genotyp-Phänotyp-Korrelation zeigt sich auch in den bisher entdeckten ALD-Mutationen (Mosser et al. 1993; Kemp et al. 2001; Moser et al. 2001). Vergleichbar mit den

Brüdern FLW und NIW in dieser Arbeit finden sich in einer untersuchten Familie zwei Brüder mit der gleichen Deletion im ALD-Gen, wobei der jüngere Bruder eine schwere cerebrale Form der X-ALD entwickelt hat, während sein fünf Jahre älterer Bruder nur eine milde Nebenniereninsuffizienz zeigt (Mosser et al. 1993). Das gemeinsame Vorkommen dieser verschiedenen klinischen Phänotypen ist wie eingangs erwähnt sogar bei Zwillingen publiziert (Korenke et al. 1996; Di Rocco et al. 2001). Ferner ist bei Vorliegen einer Deletion von einem oder mehreren Exonen im ALD-Gen sowohl über adulte cerebrale Formen der X-ALD als auch über die Adrenomyeloneuropathie berichtet worden (Mosser et al. 1993; Koike et al. 1995). Schließlich wird die fehlende Genotyp-Phänotyp-Korrelation in einer Familie besonders eindrucksvoll deutlich, in der fünf unterschiedliche klinische Phänotypen unter sechs männlichen Familienmitgliedern mit einer Missense-Mutation zu unterscheiden sind (Berger et al. 1994). Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit besteht neben dem klinischen Erscheinungsbild auch zwischen dem Maß der Erhöhung der VLCFA und der vorliegenden Mutation keine Korrelation (Moser et al. 2001). Bei fehlender Genotyp-Phänotyp-Korrelation müssen auch bei den hier betroffenen Familienmitgliedern modifizierende Gene und epigenetische Faktoren für die unterschiedliche klinische Ausprägung eine Rolle spielen.

Aufgrund der Anamnese der hier untersuchten Familie ist anzunehmen, daß die Mutter GAW heterozygot für die entdeckte Mutation im ALD-Gen ist (Abbildung 1). Dieser Status als Überträgerin der Erkrankung hat sich jedoch nicht in Form von erhöhten VLCFA im Plasma manifestiert, die sich wie bei der Tochter NAW im Normbereich befinden. Schließlich läßt die molekulargenetische Untersuchung erkennen, daß die Deletion 948-9462del im Gegensatz zu der Tochter NAW bei der Mutter GAW vorliegt (Abbildung 9). Somit zeigt sich erneut die Problematik in der Identifikation von weiblichen Überträgerinnen über die Bestimmung der VLCFA im Plasma. Über deren Erhöhung können nur ca. 85% aller weiblichen Anlageträgerinnen identifiziert werden (Moser et al. 1983; Moser et al. 1999). Dabei ist gezeigt worden, daß zwei Drittel aller Überträgerinnen mit normwertigen VLCFA im Plasma erhöhte Konzentrationen an VLCFA in Fibroblasten haben (Moser et al. 1983). Ferner zeigen Überträgerinnen bei zum ALDP-Verlust führenden Mutationen in der Immunfluoreszenzmikroskopie ein Mosaikbild von positiven und negativen Fibroblasten (Feigenbaum et al. 1996). Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, daß physiologischerweise immer ein X-Chromosom durch epigenetische Modifikation

inaktiviert ist und es somit bei einigen Zellen mit inaktiviertem gesundem X-Chromosom zu einem ALDP-Verlust kommt.

Die molekulargenetische Untersuchung stellt daher die verlässlichste Methode zur Untersuchung von potentiellen Überträgerinnen dar (Boehm et al. 1999) und muß auch mit Blick auf die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit empfohlen werden. Sie ist vor allem dann effektiv einzusetzen, wenn der in der Familie vorkommende genetische Defekt bereits charakterisiert worden ist. Mit ihr ist es außerdem möglich, eine sichere Pränataldiagnostik für zukünftige Schwangerschaften der Überträgerin zur Verfügung zu stellen, wobei bei Nachweis der ALD-Mutation aufgrund der fehlenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation jedoch keine Schlußfolgerungen über den zu erwartenden klinischen Verlauf getroffen werden können.

## **4.2. Auswirkungen der Stammzelltransplantation**

### **4.2.1. Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf**

Von den vier untersuchten betroffenen Kindern erhielten die Patienten NIW und JUW nach der klinischen Manifestation der X-ALD mit einer kindlichen cerebralen Form eine allogenen-unverwandte SZT. Während bei dem Patienten JUW ein frühes klinisches Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der SZT vorlag, waren die neurologischen Symptome bei dem Patienten NIW schon weit fortgeschritten. Bei beiden Patienten kam es nach der SZT zu keiner klinisch erkennbaren Progression der Erkrankung, wobei detaillierte Follow up-Untersuchungen, z.B. mittels neuropsychologischer Testung, bei dem Patienten NIW bis zu seinem Tode am Tag +76 nach allogenen-unverwandter SZT aufgrund des schlechten klinischen Zustandes nicht möglich waren.

In der Literatur finden sich verschiedene Publikationen zum Effekt einer SZT bei X-ALD. Dabei zeigt sich neben einer Normalisierung initial erhöhter VLCFA (Shapiro et al. 2000) eine Stabilisierung - teilweise sogar Verbesserung - des klinischen Bildes sowie der neuropsychologischen Testergebnisse (Malm et al. 1997; Krivit et al. 1999; Shapiro et al. 2000; Suzuki et al. 2000; Moser et al. 2001). Ferner stellen sich die Demyelinisierungen im MRT gleichbleibend bis teilweise sogar rückläufig dar (Aubourg et al. 1990; Loes et al. 1994; Shapiro et al. 2000; Suzuki et al. 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit diesen Studien vergleichbar. Neben einer ausbleibenden fortschreitenden Demyelinisierung im MRT finden sich bei dem Patienten JUW unter der fortgeführten Therapie mit Lorenzo's Öl weiterhin normwertige VLCFA im Plasma. Außerdem zeigen die aktuellen neurophysiologischen wie -psychologischen Untersuchungen insgesamt vergleichbare Ergebnisse zu dem Status vor SZT, wobei der Handlungs-IQ sich - wahrscheinlich motivationsbedingt - verbessert hat.

Wiederholt ist in den oben aufgeführten Studien allerdings in einigen Fällen auch eine Progression der neurodegenerativen Erkrankung zu verzeichnen, insbesondere dann wenn bereits zum Zeitpunkt der SZT ein schweres neurologisches Ausfallbild vorliegt (Malm et al. 1997; Shapiro et al. 2000; Suzuki et al. 2000). Dabei ist allerdings nicht zu unterscheiden, ob der progrediente Verlauf nach SZT durch die Durchführung einer SZT noch zusätzlich gefördert worden ist, oder ob ein natürlicher Progreß der Erkrankung vorgelegen hat.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Indikation zur Durchführung einer SZT bei der cerebralen Form der X-ALD frühzeitig zu stellen ist. Dabei stellen Verschlechterungen in den neuropsychologischen Testungen und eine Progression in den kernspintomographischen Untersuchungen absolute Indikationen zur Durchführung einer SZT dar (Shapiro et al. 2000; Moser et al. 2001). Daher sind bei Diagnose einer X-ALD diese Untersuchungen in regelmäßigen Abständen durchzuführen, um eine drohende Krankheitsprogredienz frühzeitig, am besten in einem subklinischen Stadium, zu detektieren.

#### **4.2.2. Auswirkungen auf die Expression des ALD-Proteins (ALDP)**

Über die Verteilung des ALDPs im menschlichen Gewebe ist bisher wenig bekannt. Bei der zu beobachtenden ubiquitären Erhöhung der VLCFA in den Körperflüssigkeiten und Geweben von Patienten mit X-ALD findet sich eine höhere Konzentration von VLCFA in der weißen Hirnsubstanz, in der Nebennierenrinde und dem Hoden (Menkes und Corbo 1977), die auf eine dort höhere ALDP-Expression schließen lassen. Außerdem gilt die Leber als besonders peroxisomenreich und somit reich an ALDP. Diese Thesen werden durch die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an den Kontrollgeweben in dieser Arbeit gestützt. Neben einer Anfärbung von ALDP im Hoden, zeigt die immunhistochemische Anfärbung der Nebennierenrinde ein gegenüber dem Nebennierenmark deutlich

stärkeres Signal (Abbildung 30). Vereinbar mit einer vermuteten ubiquitären ALDP-Expression findet sich auch in den Nieren, dem Herzen, den Lungen und dem Darm eine Anfärbung von ALDP. Dabei ist ALDP sowohl in organspezifischen Zellarten (z.B. den Tubulusepithelzellen der Nieren) als auch in Endothelzellen nachweisbar. Im Knochenmark findet sich eine ALDP-Expression in den Megakaryozyten sowie in den Zellen der Granulopoese (Abbildung 24), wobei sich neben einer körnigen Anfärbung eine zytoplasmatische vereinzelt grobschollige Anfärbung der einzelnen Zellen zeigt.

Genauere Untersuchungen zu der exakten Lokalisation des ALDP im zentralen Nervensystem sind im Hirngewebe von Mensch und Maus durchgeführt worden, die keinen Unterschied zwischen den beiden Spezies erkennen lassen (Fouquet et al. 1997). Dabei ist die ALDP-Expression auf die weiße Hirnsubstanz und die Endothelzellen beschränkt, wobei die Astrozyten und Mikrogliazellen in höherem Maße als die Oligodendrozyten ALDP exprimieren. Im direkten Gegensatz dazu steht die Beobachtung dieser Arbeit, daß mittels immunhistochemischer Färbungen im Hirngewebe der Nachweis von ALDP nicht nur in Endothel- und Gliazellen, sondern in stärkerem Ausmaße auch in Nervenzellen gelingt.

Es stellt sich hier die Frage, ob das Muster der immunhistochemischen Anfärbung in der hier vorliegenden Arbeit spezifisch ist. Zur Klärung kann der Vergleich mit dem immunhistochemischen Färbemuster der als Markerprotein für Peroxisomen bekannten Katalase aufschlußreich sein. Dieses Färbemuster ist in einer unlängst veröffentlichten Untersuchung zur Expression von Katalase-mRNA und -Protein im Hirngewebe von erwachsenen Ratten beschrieben worden (Schad et al. 2003). Es findet sich dort eine Anfärbung der Katalase-mRNA und des Katalaseproteins in den Nervenzellen, wobei das Zytoplasma granulär angefärbt und der Zellkern ausgespart wird.

Ein weiteres vergleichbares Muster zwischen der Anfärbung von Katalaseprotein und der hier durchgeführten Anfärbung von ALDP ist in einer Untersuchung von menschlichem Nierengewebe beschrieben (Litwin et al. 1988). Wie auch in der hier vorliegenden Arbeit findet sich eine Anfärbung des Tubulusepithels unter Aussparung des Glomerulums (Abbildung 29). Darüberhinaus besteht auch im Nebennierengewebe ein ähnliches Färbemuster zwischen dem Nachweis von Katalase-mRNA (Baumgart et al. 1997) und der hier gezeigten Anfärbung von ALDP mit deutlicher Betonung der Nebennierenrinde. Unter der Annahme, daß die



Katalase ein Markerprotein für Peroxisomen ist, läßt sich aus der gleichen Verteilung der Anfärbung für Katalase und ALDP ableiten, daß die in dieser Arbeit beschriebene ALDP-Positivität einem peroxisomalen Färbemuster entspricht.

Es ist evident, daß sich nach Durchführung einer SZT bei vollständigem Chimärismus im peripheren Blut und Knochenmark die ursprüngliche Mutation des Patienten im ALD-Gen in Leukozyten-DNA nicht mehr nachweisen läßt (Abbildung 9). Es ist jedoch erstaunlich, daß sich in den 23 unterschiedlichen Geweben neben der mutierten DNA des Empfängers auch nichtmutierte DNA des Spenders nachweisen läßt. Der Nachweis von Spender-DNA ist bisher nur in einer anderen Arbeit in menschlichem Hirngewebe gelungen (Malm et al. 1997). Bei dem hier durchgeführten molekulargenetischen Nachweis der Spender-DNA ist jedoch nicht zu unterscheiden, aus welcher Zellart die DNA stammt. Es ist anzunehmen, daß sie auf Spender-Blutzellen zurückzuführen ist. Allerdings ist es nicht auszuschließen, daß es sich z.B. auch um DNA aus Mikrogliazellen handelt. Letztere Hypothese ist vereinbar mit den Beobachtungen, daß sich Mikrogliazellen aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln können (Hickey und Kimura 1988; Hickey et al. 1992) [siehe auch 4.2.3.].

Gegen diese Hypothese sprechen allerdings die Beobachtungen, daß kein Unterschied im Muster und in der Intensität der Anfärbung von Kontroll- und Patientengewebe besteht und ferner zahlreiche Nervenzellen angefärbt werden. Daher ist die Spezifität der hier durchgeführten ALDP-Färbungen des Hirngewebes anzuzweifeln. Eine Kreuzreaktion der verwendeten ALDP-Antikörper mit anderen cerebralen Strukturen erscheint dabei wahrscheinlich. Als Hinweis auf eine mögliche Kreuzreaktion der verwendeten ALDP-Antikörper mit anderen menschlichen Proteinen findet sich in einer Arbeit eine zu beobachtende zweite schwache Bande im Western Blot von menschlichem Hirngewebe (Fouquet et al. 1997). In einem Sequenzvergleich zwischen der Proteinsequenz, gegen die die ALDP-Antikörper gerichtet sind, und menschlichen oder tierischen Proteinen, konnte in mehreren Proteindatenbanken nur eine Homologie zu den ALDP-ähnlichen Proteinen ALDRP und PMP70 festgestellt werden. Eine Kreuzreaktion der Antikörper mit diesen Proteinen wird allerdings vom Hersteller ausgeschlossen. Dennoch ist es denkbar, daß eine - vielleicht auch nur geringe - Kreuzreaktion durch die hochsensitive CSA-Methode demaskiert worden ist. Vereinbar damit ist die Beobachtung, daß die verwendeten ALDP-Antikörper bei anderen Färbemethoden, wie z.B. bei der

Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten, wiederholt eine ausreichende Spezifität bewiesen haben. Eine mögliche Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen Proteinen ist ferner durch eine Veränderung in der Sekundärstruktur von Proteinen denkbar, die durch Autolyse und Fixation des Gewebes verursacht worden sein kann. In diesem Zusammenhang läßt das beobachtete peroxisomale Färbemuster leider keine weiteren Schlußfolgerungen bezüglich der Spezifität zu, weil die mit ALDP verwandten Moleküle ALDRP und PMP70 ebenfalls peroxisomal lokalisiert sind.

Da neben einer Kreuzreaktion der Antikörper im Hirngewebe auch eine Kreuzreaktion in anderen Geweben nicht auszuschließen ist, müssen die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen insgesamt mit Vorsicht bewertet werden.

#### **4.2.3. Überlegungen zum pathophysiologischen Mechanismus**

Bislang ist ungeklärt über welche biologischen Mechanismen der therapeutische Effekt der SZT vermittelt wird. Bei der SZT stehen zwei therapeutische Prinzipien im Vordergrund, die Immunmodulation sowie die Zelltherapie. Da bei der Progression der neurodegenerativen Erkrankung entzündliche Prozesse im Hirngewebe beteiligt sind, wurde ein positiver Effekt der mit der SZT verbundenen Immunsuppression vermutet. Dem widersprechen aber die Beobachtungen, daß die alleinige Immunsuppression ohne Durchführung einer SZT bzw. nach mißlungener SZT bei autologer Rekonstitution des Knochenmarkes die neurologische Progression nicht aufhalten kann (Naidu et al. 1988; Nowaczyk et al. 1997; Moser et al. 2001).

Somit ist zu vermuten, daß der therapeutische Effekt der SZT wesentlich durch die Transplantation stoffwechselkompetenter Spenderzellen vermittelt wird. Dabei führen in den einzelnen Geweben die Spenderzellen zu einer Absenkung der erhöhten VLCFA-Spiegel. Mit Blick auf das pathogenetische Modell der X-ALD (Whitcomb et al. 1988; Ho et al. 1995) kommt es in der Folge zur Wiederherstellung alter Membranstrukturen und deren Funktion, welches sich z.B. in einer Remyelinisierung der weißen Substanz widerspiegelt. Die Tatsache, daß häufiger eine ausbleibende Progression als eine Verbesserung der Grunderkrankung zu beobachten ist, könnte darin begründet liegen, daß bereits eine irreversible Schädigung des Zentralnervensystems vorliegt. Im Falle der im MRT sichtbaren Demyelinisierungen scheinen frühe Stadien reversibel, spätere Stadien irreversibel zu sein. Eine Beobachtung, die bereits bei anderen Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. der Phenylketonurie, gemacht worden ist (van der Knaap und Valk 1995).

Histopathologisch lassen sich aus dem transplantierten Knochenmark abstammende Zellen im Hirngewebe nicht nur intra- sondern auch perivaskulär nachweisen (Unger et al. 1993; Malm et al. 1997). Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß es sich bei diesen Zellen um aus den transplantierten Stammzellen neu entstandene stoffwechselkompetente Leukozyten handelt, die aus der Gefäßbahn über die Blut-Hirn-Schranke in das perivaskuläre Gewebe migrieren. Im Falle des zu den lysosomalen Speichererkrankungen zählenden Morbus Krabbe ist dieses an einem Tiermodell bereits beschrieben worden (Hoogerbrugge et al. 1988). Mit zunehmendem Abstand zur SZT sind Spendermakrophagen im Hirngewebe der untersuchten Mäuse nachweisbar, die zum Abbau des toxischen Produktes fähig sind und dessen Gehalt im Gewebe absenken. Dabei findet sich verglichen mit den Erkenntnissen bei der X-ALD mit zunehmender Verbreitung der Spendermakrophagen eine Remyelinisierung der weißen Substanz. Im Gegensatz zu der beobachteten Aufnahme des defekten Enzyms nach SZT bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen (Walkley et al. 1994), welche aufgrund der Pathogenese der X-ALD hier nicht vorliegen kann, lassen sich die oben aufgeführten Beobachtungen als ein Erklärungsmodell für den therapeutischen Effekt der SZT bei der X-ALD heranziehen.

Auf der anderen Seite könnte es sich im Falle des Hirngewebes aber auch um zum VLCFA-Abbau fähige Mikrogliazellen handeln, die aus Transdifferenzierung von aus dem Knochenmark abstammenden Zellen hervorgegangen sind (Hickey und Kimura 1988; Hickey et al. 1992). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, daß bei männlichen Stammzellspendern der Nachweis von Y-Chromosomen in perivaskulären Zellen des Hirngewebes von weiblichen Empfängern gelingt (Unger et al. 1993). Unter der Annahme, daß das ALDP im Hirngewebe vor allem in Mikrogliazellen und Astrozyten exprimiert wird (Fouquet et al. 1997), kann gefolgert werden, daß die Mikroglia den zu beobachtenden therapeutischen Effekt der SZT bei X-ALD im Wesentlichen vermittelt (Krivit et al. 1999). Aufgrund deren langsamer Erneuerungsrate wird diese These auch durch die Beobachtung unterstützt, daß die positiven Effekte erst 6-12 Monate nach Durchführung einer SZT zu verzeichnen sind (Aubourg et al. 1990).

Alternativ zur Hypothese der Transdifferenzierung wird die Möglichkeit der Fusion von Stammzellen mit organspezifischen Zellen im Zielorgan rege diskutiert. In jüngsten Untersuchungen ist nachgewiesen worden, daß nach SZT bei Mäusen mit

Tyrosinämie Typ I Stammzellen in die Leber einwandern und dort mit den stoffwechseldefekten Hepatozyten fusionieren. Dabei kommt es zu einer Übertragung des Genoms der Stammzellen auf die organspezifischen Zellen, die somit wieder stoffwechselkompetent werden (Vassilopoulos et al. 2003; Wang et al. 2003).

Zielsetzung der hier vorgelegten Arbeit ist es, den zelltherapeutisch vermittelten Effekt der SZT molekularbiologisch und immunhistochemisch zu belegen. Insgesamt läßt sich nachweisen, daß es nach SZT bei dem Patienten NIW zu einer Reversion des genetischen Defektes, wahrscheinlich mit der Expression von intaktem ALDP, gekommen ist. Eine Beobachtung, die durch den bisherigen klinischen Verlauf nach SZT bei dem Patienten JUW unterstützt wird. Aufgrund der erörterten methodischen Schwierigkeiten und der Problematik der Gewebequalität gelingt die Beweisführung jedoch nicht ohne Zweifel, so daß der genaue pathophysiologische Mechanismus weiter unklar bleibt. Die hier vorgestellten Ergebnisse entsprechen aber denen bei vergleichbaren Untersuchungen von Patienten mit anderen neurodegenerativen Stoffwechselerkrankungen. Daher kann gefolgert werden, daß der therapeutische Effekt der SZT vorwiegend durch die Transplantation stoffwechselkompetenter Zellen und nicht durch die mit der SZT verbundene Immunmodulation vermittelt wird. Die experimentellen Beobachtungen dieser Arbeit bieten somit das Modell, auf dessen Grundlage der therapeutische Effekt der SZT bei X-ALD zu erklären ist.

Weitergehende Untersuchungen mittels In-situ-Hybridisierung oder immunhistochemischer Doppelfärbung von Zellen in tierischem und wenn möglich kryokonserviertem menschlichen Gewebe sind durchzuführen, um die relevanten Zellarten zu identifizieren.

### **4.3. Ausblick**

Bis zur Etablierung neuer Therapieverfahren bleibt die auch im Fall von NIW und JUW durchgeführte allogene SZT der einzig kurative Therapieansatz.

Die Untersuchung der Wirksamkeit einer autologen SZT mit genetisch korrigierten hämatopoetischen Stammzellen ist Gegenstand der aktuellen klinischen Forschung, wobei bei zukünftiger Anwendung am Menschen das Risiko der Leukämogenese bedacht werden muß. Es konnte gezeigt werden, daß nach retroviralem Gentransfer

die Transduktion und Expression eines funktionstüchtigen ALDP gelingt (Cartier et al. 1995; Doerflinger et al. 1998; Benhamida et al. 2003).

Ferner gibt es pharmakologische Therapieansätze, in der durch ausgewählte Substanzen die Expression eines dem Erkrankungsgen funktionell ähnlichen Gens hochreguliert wird. Dabei konnte gezeigt werden, daß durch die Gabe von 4-Phenylbutyrat das dem ALD-Gen ähnliche ALDR-Gen überexprimiert und eine teilweise Restitution der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation überlangkettiger Fettsäuren erreicht wird (Kemp et al. 1998).

Bis zu einer breiten klinischen Anwendung sind jedoch noch umfangreiche Studien zur Effizienz und Sicherheit neurotroper Viren sowie zur Pharmakokinetik notwendig. Dennoch ist die Verfügbarkeit einer für alle Patienten kurativen und zugänglichen Behandlung näher gerückt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Asano, J, Suzuki, Y, Yajima, S, Inoue, K, Shimosawa, N, Kondo, N, Murase, M und Orii, T. Effects of erucic acid therapy on Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Dev.* 1994;16:454-458
- Aubourg, P, Adamsbaum, C, Lavallard-Rousseau, MC, Rocchiccioli, F, Cartier, N, Jambaque, I, Jakobezak, C, Lemaitre, A, Boureau, F, Wolf, C und et al. A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *N Engl J Med.* 1993;329:745-752
- Aubourg, P, Blanche, S, Jambaque, I, Rocchiccioli, F, Kalifa, G, Naud-Saudreau, C, Rolland, MO, Debre, M, Chaussain, JL, Griscelli, C und et al. Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1990;322:1860-1866
- Aubourg, P und Dubois-Dalcq, M. X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia? *Glia.* 2000;29:186-190
- Aubourg, P, Mosser, J, Douar, AM, Sarde, CO, Lopez, J und Mandel, JL. Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie.* 1993;75:293-302
- Baumgart, E, Schad, A, Volkl, A und Fahimi, HD. Detection of mRNAs encoding peroxisomal proteins by non-radioactive in situ hybridization with digoxigenin-labelled cRNAs. *Histochem Cell Biol.* 1997;108:371-379
- Benhamida, S, Pflumio, F, Dubart-Kupperschmitt, A, Zhao-Emonet, JC, Cavazzana-Calvo, M, Rocchiccioli, F, Fichelson, S, Aubourg, P, Charneau, P und Cartier, N. Transduced CD34(+) cells from adrenoleukodystrophy patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Mol Ther.* 2003;7:317-324

- Berger, J, Molzer, B, Fae, I und Bernheimer, H. X-linked adrenoleukodystrophy (ALD): a novel mutation of the ALD gene in 6 members of a family presenting with 5 different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1638-1643
- Blaw, ME. Melanodermic type leucodystrophy (adreno-leucodystrophy). In: Vinken, PJ, Bruyn, G.W., ed. *Neurodystrophies and Neurolipidoses*: North Holland Publishing Co, 1970:128
- Bobrow, MN, Harris, TD, Shaughnessy, KJ und Litt, GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods.* 1989;125:279-285
- Boehm, CD, Cutting, GR, Lachtermacher, MB, Moser, HW und Chong, SS. Accurate DNA-based diagnostic and carrier testing for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab.* 1999;66:128-136
- Bourre, JM, Daudu, O und Baumann, N. Nervonic acid biosynthesis by erucyl-CoA elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and poly-unsaturated). *Biochim Biophys Acta.* 1976;424:1-7
- Cartier, N, Lopez, J, Moullier, P, Rocchiccioli, F, Rolland, MO, Jorge, P, Mosser, J, Mandel, JL, Bougneres, PF, Danos, O und et al. Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:1674-1678
- Danpure, CJ. Primary hyperoxaluria. In: Scriver CR, BA, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic and molecular base of inherited disease*. New York: McGraw-Hill Information Services Company, 2001:3323-3367
- De Duve, C, Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 1966;46:323-357

- Di Rocco, M, Doria-Lamba, L und Caruso, U. Monozygotic twins with X-linked adrenoleukodystrophy and different phenotypes. *Ann Neurol.* 2001;50:424
- Doerflinger, N, Miclea, JM, Lopez, J, Chomienne, C, Bougneres, P, Aubourg, P und Cartier, N. Retroviral transfer and long-term expression of the adrenoleukodystrophy gene in human CD34+ cells. *Hum Gene Ther.* 1998;9:1025-1036
- Dooley, JM und Wright, BA. Adrenoleukodystrophy mimicking multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 1985;12:73-74
- Eaton, JW und Mouchou, M. Acatlasemia. In: Scriver CR, BA, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic and molecular base of inherited disease.* New York: McGraw-Hill Information Services Company, 1995:2371-2383
- Efferth, T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med.* 2001;1:45-65
- Fahimi, HD und Sies, H. *Peroxisomes in Biology and Medicine: Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1987*
- Feigenbaum, V, Lombard-Platet, G, Guidoux, S, Sarde, CO, Mandel, JL und Aubourg, P. Mutational and protein analysis of patients and heterozygous women with X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet.* 1996;58:1135-1144
- Fouquet, F, Zhou, JM, Ralston, E, Murray, K, Troalen, F, Magal, E, Robain, O, Dubois-Dalcq, M und Aubourg, P. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol Dis.* 1997;3:271-285
- Garrod, A. Inborn errors of metabolism. *Lancet.* 1908;2:1-7, 73-79, 142-148, 214-220
- Gärtner, J. X-chromosomale Adrenoleukodystrophie - Genetik und Epigenetik. In: U., S, ed. *Aktuelle Neuropädiatrie.* Vol. 432-436. Nürnberg: Novartis Pharma Verlag, 2000



- Gärtner, J, Braun, A, Holzinger, A, Roerig, P, Lenard, HG und Roscher, AA. Clinical and genetic aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics*. 1998;29:3-13
- Gärtner, J, Moser, H und Valle, D. Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat Genet*. 1992;1:16-23
- Gotte, K, Girzalsky, W, Linkert, M, Baumgart, E, Kammerer, S, Kunau, WH und Erdmann, R. Pex19p, a farnesylated protein essential for peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol*. 1998;18:616-628
- Gould, SJ, Keller, GA, Hosken, N, Wilkinson, J und Subramani, S. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol*. 1989;108:1657-1664
- Gould, SJ, Keller, GA und Subramani, S. Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J Cell Biol*. 1988;107:897-905
- Gould, SJ, Raymond, GV und D., V. The peroxisome biogenesis disorders. In: Scriver, CR, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill Information Services Company, 2001:3181-3217
- Griffin, DE, Moser, HW, Mendoza, Q, Moench, TR, O'Toole, S und Moser, AB. Identification of the inflammatory cells in the central nervous system of patients with adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol*. 1985;18:660-664
- Haberfeld, W und Spieler, F. Zur diffusen Hirn-Rückenmarksclerose im Kindesalter. *Dtsch Z Nervenhe*. 1910;40:436
- Hetteema, EH, van Roermund, CW, Distel, B, van den Berg, M, Vilela, C, Rodrigues-Pousada, C, Wanders, RJ und Tabak, HF. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*. 1996;15:3813-3822

- Hickey, WF und Kimura, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*. 1988;239:290-292
- Hickey, WF, Vass, K und Lassmann, H. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992;51:246-256
- Higgins, CF. The ABC of channel regulation. *Cell*. 1995;82:693-696
- Ho, JK, Moser, H, Kishimoto, Y und Hamilton, JA. Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest*. 1995;96:1455-1463
- Holzinger, A, Kammerer, S und Roscher, AA. Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:152-157
- Hoogerbrugge, PM, Suzuki, K, Poorthuis, BJ, Kobayashi, T, Wagemaker, G und van Bakkum, DW. Donor-derived cells in the central nervous system of twitcher mice after bone marrow transplantation. *Science*. 1988;239:1035-1038
- James, GL, Goldstein, JL, Pathak, RK, Anderson, RG und Brown, MS. PxF, a prenylated protein of peroxisomes. *J Biol Chem*. 1994;269:14182-14190
- Johnson, AB, Schaumburg, HH und Powers, JM. Histochemical characteristics of the striated inclusions of adrenoleukodystrophy. *J Histochem Cytochem*. 1976;24:725-730
- Kemp, S, Pujol, A, Waterham, HR, van Geel, BM, Boehm, CD, Raymond, GV, Cutting, GR, Wanders, RJ und Moser, HW. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat*. 2001;18:499-515
- Kemp, S, Wei, HM, Lu, JF, Braiterman, LT, McGuinness, MC, Moser, AB, Watkins, PA und Smith, KD. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med*. 1998;4:1261-1268

Kindl, H und Lazarow, PB. Peroxisomes and Glyoxysomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982;5-59

Kishimoto, Y, Moser, HW, Kawamura, N, Platt, M, Pallante, SL und Fenselau, C. Adrenoleukodystrophy: evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;96:69-76

Koike, R, Onodera, O, Tabe, H, Kaneko, K, Miyatake, T, Iwasaki, S, Nakano, M, Shizuma, N, Ikeguchi, K, Nishizawa, M und et al. Partial deletions of putative adrenoleukodystrophy (ALD) gene in Japanese ALD patients. *Hum Mutat.* 1995;6:263-267

Korenke, GC, Fuchs, S, Krasemann, E, Doerr, HG, Wilichowski, E, Hunneman, DH und Hanefeld, F. Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Ann Neurol.* 1996;40:254-257

Krivit, W, Aubourg, P, Shapiro, E und Peters, C. Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol.* 1999;6:377-382

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

Litwin, JA, Volkl, A, Stachura, J und Fahimi, HD. Detection of peroxisomes in human liver and kidney fixed with formalin and embedded in paraffin: the use of catalase and lipid beta-oxidation enzymes as immunocytochemical markers. *Histochem J.* 1988;20:165-173

Loes, DJ, Fatemi, A, Melhem, ER, Gupte, N, Bezman, L, Moser, HW und Raymond, GV. Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology.* 2003;61:369-374

Loes, DJ, Stillman, AE, Hite, S, Shapiro, E, Lockman, L, Latchaw, RE, Moser, H und Krivit, W. Childhood cerebral form of adrenoleukodystrophy: short-term effect of bone marrow transplantation on brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994;15:1767-1771

Lombard-Platet, G, Savary, S, Sarde, CO, Mandel, JL und Chimini, G. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:1265-1269

Malm, G, Ringden, O, Anvret, M, von Döbeln, U, Hagenfeldt, L, Isberg, B, Knuutila, S, Nennesmo, I, Winiarski, J und Marcus, C. Treatment of adrenoleukodystrophy with bone marrow transplantation. *Acta Paediatr.* 1997;86:484-492

Maniatis, T, Fritsch, EF und Sambrook, J. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982

Menkes, JH und Corbo, LM. Adrenoleukodystrophy. Accumulation of cholesterol esters with very long chain fatty acids. *Neurology.* 1977;27:928-932

Moser, AB, Kreiter, N, Bezman, L, Lu, S, Raymond, GV, Naidu, S und Moser, HW. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol.* 1999;45:100-110

Moser, AB und Moser, HW. The prenatal diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Prenat Diagn.* 1999;19:46-48

Moser, HW, Moser, AB, Frayer, KK, Chen, W, Schulman, JD, O'Neill, BP und Kishimoto, Y. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology.* 1981;31:1241

Moser, HW, Moser, AB, Kawamura, N, Murphy, J, Suzuki, K, Schaumburg, H und Kishimoto, Y. Adrenoleukodystrophy: elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. *Ann Neurol.* 1980;7:542-549

- Moser, HW, Moser, AB, Naidu, S und Bergin, A. Clinical aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Dev Neurosci.* 1991;13:254-261
- Moser, HW, Moser, AB, Powers, JM, Nitowsky, HM, Schaumburg, HH, Norum, RA und Migeon, BR. The prenatal diagnosis of adrenoleukodystrophy. Demonstration of increased hexacosanoic acid levels in cultured amniocytes and fetal adrenal gland. *Pediatr Res.* 1982;16:172-175
- Moser, HW, Moser, AB, Smith, KD, Bergin, A, Borel, J, Shankroff, J, Stine, OC, Merette, C, Ott, J, Krivit, W und et al. Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J Inherit Metab Dis.* 1992;15:645-664
- Moser, HW, Moser, AE, Trojak, JE und Supplee, SW. Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy. *J Pediatr.* 1983;103:54-59
- Moser, HW, Smith, KD und Moser, AB. X-linked Adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic and molecular base of inherited disease.* New York: McGraw-Hill Information Services Company, 2001:3257-3301
- Moser, HW, Tutschka, PJ, Brown, FR, 3rd, Moser, AE, Yeager, AM, Singh, I, Mark, SA, Kumar, AA, McDonnell, JM, White, CL, 3rd und et al. Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology.* 1984;34:1410-1417
- Mosser, J, Douar, AM, Sarde, CO, Kioschis, P, Feil, R, Moser, H, Poustka, AM, Mandel, JL und Aubourg, P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature.* 1993;361:726-730
- Naidu, S, Bresnan, MJ, Griffin, D, O'Toole, S und Moser, HW. Childhood adrenoleukodystrophy. Failure of intensive immunosuppression to arrest neurologic progression. *Arch Neurol.* 1988;45:846-848

- Nowaczyk, MJ, Saunders, EF, Tein, I, Blaser, SI und Clarke, JT. Immunoablation does not delay the neurologic progression of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Pediatr.* 1997;131:453-455
- Pouwels, PJ, Kruse, B, Korenke, GC, Mao, X, Hanefeld, FA und Frahm, J. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of childhood adrenoleukodystrophy. *Neuropediatrics.* 1998;29:254-264
- Powers, JM und Schaumburg, HH. Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder's disease). A pathogenetic hypothesis based on ultrastructural lesions in adrenal cortex, peripheral nerve and testis. *Am J Pathol.* 1974;76:481-491
- Powers, JM und Schaumburg, HH. A correlative study of the adrenal cortex in adreno-leukodystrophy--evidence for a fatal intoxication with very long chain saturated fatty acids. *Invest Cell Pathol.* 1980;3:353-376
- Rasmussen, M, Moser, AB, Borel, J, Khangoora, S und Moser, HW. Brain, liver, and adipose tissue erucic and very long chain fatty acid levels in adrenoleukodystrophy patients treated with glyceryl trierucate and trioleate oils (Lorenzo's oil). *Neurochem Res.* 1994;19:1073-1082
- Rhodin, J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Aktiebolaget Godvil.* Stockholm, 1954
- Roels, F. Peroxisomes in human tissues. In: Roels, F, ed. *Peroxisomes, a personal account.* Vol. 23. (Brussel: VUB Press), 1991
- Santos, MJ, Imanaka, T, Shio, H und Lazarow, PB. Peroxisomal integral membrane proteins in control and Zellweger fibroblasts. *J Biol Chem.* 1988;263:10502-10509
- Santos, MJ, Kawada, ME, Espeel, M, Figueroa, C, Alvarez, A, Hidalgo, U und Metz, C. Characterization of human peroxisomal membrane proteins. *J Biol Chem.* 1994;269:24890-24896

- Schad, A, Fahimi, HD, Volkl, A und Baumgart, E. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive in situ hybridization with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF). *J Histochem Cytochem.* 2003;51:751-760
- Schaumburg, HH, Powers, JM, Raine, CS, Suzuki, K und Richardson, EP, Jr. Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol.* 1975;32:577-591
- Schaumburg, HH, Powers, JM, Suzuki, K und Raine, CS. Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder disease). Ultrastructural demonstration of specific cytoplasmic inclusions in the central nervous system. *Arch Neurol.* 1974;31:210-213
- Schram, AW, Strijland, A, Hashimoto, T, Wanders, RJ, Schutgens, RB, van den Bosch, H und Tager, JM. Biosynthesis and maturation of peroxisomal beta-oxidation enzymes in fibroblasts in relation to the Zellweger syndrome and infantile Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:6156-6158
- Shani, N und Valle, D. Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol.* 1998;292:753-776
- Shapiro, E, Krivit, W, Lockman, L, Jambaque, I, Peters, C, Cowan, M, Harris, R, Blanche, S, Bordigoni, P, Loes, D, Ziegler, R, Crittenden, M, Ris, D, Berg, B, Cox, C, Moser, H, Fischer, A und Aubourg, P. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet.* 2000;356:713-718
- Shapiro, E, Lockman, L, Balthazor, M, Loes, D, Rajanygam, V, Ziegler, R, Peters, C und Krivit, W. Neuropsychological and neurologic function and quality-of-life before and after bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy. In: Ringdon, R, Hobbs, J.R., Steward, C.G., ed. *Correction of Diseases by Transplantation.* Vol. IV. London: Cogent Trust, 1997:52

- Shinnoh, N, Yamada, T, Yoshimura, T, Furuya, H, Yoshida, Y, Suzuki, Y, Shimozawa, N, Orii, T und Kobayashi, T. Adrenoleukodystrophy: the restoration of peroxisomal beta-oxidation by transfection of normal cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;210:830-836
- Siemerling, E und Creutzfeldt, HG. Bronzkrankheit und sklerosierende Enzephalomyelitis. *Arch Psychiatrie.* 1923;68:217
- South, ST und Gould, SJ. Peroxisome synthesis in the absence of preexisting peroxisomes. *J Cell Biol.* 1999;144:255-266
- Subramani, S. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol.* 1993;9:445-478
- Suggs SV, HT, Myake EH, Kawashima MJ, Johnson KI, Wallace RB. Using purified genes. *ICN-UCLA Symp Mol Cell Biol.* 1981;23:683-693
- Suzuki, Y, Isogai, K, Teramoto, T, Tashita, H, Shimozawa, N, Nishimura, M, Asano, T, Oda, M, Kamei, A, Ishiguro, H, Kato, S, Ohashi, T, Kobayashi, H, Eto, Y und Kondo, N. Bone marrow transplantation for the treatment of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23:453-458
- Suzuki, Y, Orii, T, Takiguchi, M, Mori, M, Hijikata, M und Hashimoto, T. Biosynthesis of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes. *J Biochem (Tokyo).* 1987;101:491-496
- Swinkels, BW, Gould, SJ, Bodnar, AG, Rachubinski, RA und Subramani, S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Embo J.* 1991;10:3255-3262
- Swinkels, BW, Gould, SJ und Subramani, S. Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett.* 1992;305:133-136



- Tager, JM, Van der Beek, WA, Wanders, RJ, Hashimoto, T, Heymans, HS, Van den Bosch, H, Schutgens, RB und Schram, AW. Peroxisomal beta-oxidation enzyme proteins in the Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;126:1269-1275
- Tsuji, S, Suzuki, M, Ariga, T, Sekine, M, Kuriyama, M und Miyatake, T. Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J Neurochem.* 1981;36:1046-1049
- Unger, ER, Sung, JH, Manivel, JC, Chenggis, ML, Blazar, BR und Krivit, W. Male donor-derived cells in the brains of female sex-mismatched bone marrow transplant recipients: a Y-chromosome specific in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1993;52:460-470
- van den Bosch, H, Schutgens, RB, Wanders, RJ und Tager, JM. Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:157-197
- van der Knaap, MS und Valk, J. *Magnetic Resonance of Myelin, Myelination and Myelin Disorders*: Springer, 1995:196-200
- Vassilopoulos, G, Wang, PR und Russell, DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003;422:901-904
- Walkley, SU, Thrall, MA, Dobrenis, K, Huang, M, March, PA, Siegel, DA und Wurzelmann, S. Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:2970-2974
- Wanders, RJ, Barth, PG und Heymanns, HS. Single peroxisomal enzyme deficiencies. In: Scriver CR, BA, Sly WS, Valle D, ed. *The metabolic and molecular base of inherited disease*. New York: McGraw-Hill Information Services Company, 2001:3219-3256

- Wanders, RJ, Kos, M, Roest, B, Meijer, AJ, Schrakamp, G, Heymans, HS, Tegelaers, WH, van den Bosch, H, Schutgens, RB und Tager, JM. Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123:1054-1061
- Wanders, RJ, Schutgens, RB und Tager, JM. Peroxisomal matrix enzymes in Zellweger syndrome: activity and subcellular localization in liver. *J Inherit Metab Dis.* 1985;8 Suppl 2:151-152
- Wang, X, Willenbring, H, Akkari, Y, Torimaru, Y, Foster, M, Al-Dhalimy, M, Lagasse, E, Finegold, M, Olson, S und Grompe, M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003;422:897-901
- Waterham, HR, Titorenko, VI, Swaving, GJ, Harder, W und Veenhuis, M. Peroxisomes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* do not necessarily derive from pre-existing organelles. *Embo J.* 1993;12:4785-4794
- Whitcomb, RW, Linehan, WM und Knazek, RA. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J Clin Invest.* 1988;81:185-188



# Lebenslauf



GEBURTSDATUM 30.4.1974  
GEBURTSORT Düsseldorf  
FAMILIENSTAND ledig  
STAATSANGEHÖRIGKEIT deutsch

SCHULAUSBILDUNG 1984-1993 Leibniz-Gymnasium, Düsseldorf  
Abschluß: allgemeine Hochschulreife  
1980-1984 katholische Grundschule Pempelfort, Düsseldorf

MEDIZINSTUDIUM 04/1994-05/2001  
PRAKTISCHES JAHR Zentrum für operative Medizin I,  
Zentrum für Innere Medizin und Neurologie,  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

EXAMINA 05/2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
03/2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
03/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/1996 Ärztliche Vorprüfung

BERUFLICHE LAUFBAHN 03/2003- Assistenzarzt  
Klinik für Kinderonkologie,  
-hämatologie und -immunologie  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10/2001-03/2003 Arzt im Praktikum  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

## WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Schönberger S, Roerig P, Schneider DT, Reifenberger G, Göbel U, Gärtner J. Adrenoleukodystrophy - Genotype&protein expression after hematopoietic stem cell transplantation. **Arch of Neurology 2006 (in press)** (Impact Factor: 4.835)

Schönberger S, Niehues T, Laws HJ, Kögler G, Wernet P, Göbel U, Dilloo D. Transplantation of haematopoietic stem cells derived from cord blood, bone marrow or peripheral blood: a single centre matched-pair analysis in a heterogeneous risk population. **Klin Pädiatr 2004; 216(6):356** (Impact Factor: 0.615)

Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with Maple Syrup Urine Disease. **Mol Genet Metab. 2004 May;82(1):69-75** (Impact Factor: 2.502)

# Zusammenfassung

Die hier vorliegende klinisch-experimentelle Arbeit untersucht die Auswirkungen der Blutstammzelltransplantation (SZT) bei der zu den peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen zählenden, X-chromosomal vererbten Adrenoleukodystrophie (X-ALD). Dabei wurden sechs Mitglieder einer Familie mit einer klinisch und biochemisch diagnostizierten X-ALD untersucht. Bei zwei Familienmitgliedern wurde bei Progression der neurodegenerativen Erkrankung die Indikation zur Durchführung einer allogenen-unverwandten SZT gestellt. Neben EDTA-Blut der sechs Familienmitglieder lag eine humane Fibroblastenzelllinie eines Familienmitgliedes und in Paraffin eingebettetes Gewebe aus unterschiedlichen Organen von dessen Stiefbruder vor, der an Komplikationen der bei ihm durchgeführten SZT verstarb.

In der molekulargenetischen Untersuchung ließ sich bei vier der sechs Familienmitglieder eine 8516 Basenpaare umfassende Deletion (948-9462del) als krankheitsverursachende Mutation im ALD-Gen ermitteln, die zu einem vollständigen Verlust des Genproduktes führt. Eine Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp konnte nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zu dem verstorbenen Familienmitglied, zeigt dessen Cousin zwei Jahre nach durchgeführter SZT einen guten klinischen Zustand, bei dem kein weiterer Progress der neurodegenerativen Erkrankung zu erkennen ist. Die zwei weiteren betroffenen Familienmitglieder sind bislang nicht neurologisch auffällig.

Die molekulargenetische Analyse der verschiedenen Paraffingewebe zeigt für jedes einzelne Gewebe einen gemischten Chimärismus mit gleichzeitigem Nachweis der vorliegenden Mutation und nicht mutierter DNA. In der immunhistochemischen Anfärbung des Adrenoleukodystrophieproteins (ALDP) im Paraffingewebe gelingt in allen 23 unterschiedlichen Geweben ein Nachweis, wobei neben organspezifischen Strukturen auch Endothelzellen und perivaskuläre Zellen angefärbt sind. Dabei besteht hinsichtlich Verteilungsmuster und Intensität der Anfärbung kein Unterschied zwischen dem Patienten- und Kontrollgewebe.

Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, daß durch eine SZT der genetische Defekt auf genomischer und - bei zu vermutender mangelnder Spezifität der ALDP-Färbung - mit Einschränkungen auch auf proteinomischer Basis behoben werden kann. Diese experimentelle Beobachtung bietet somit wichtige Anhaltspunkte, auf dessen Grundlage der therapeutische Effekt der SZT bei X-ALD zu erklären ist.