

# **Identifizierung des peroxisomalen Targeting-Signals des Adrenoleukodystrophie-Proteins**

Pablo S. LANDGRAF

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. D. REINHARDT

# **Identifizierung des peroxisomalen Targeting-Signals des Adrenoleukodystrophie-Proteins**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Pablo S. LANDGRAF

aus

München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
Der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A.A. ROSCHER  
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. St. LINDER

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. DIEBOLD  
Prof. Dr. med. A. MAYERHOFER

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. A. HOLZINGER  
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. PETER

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Peroxisomenfunktion und peroxisomale Erkrankungen allgemein.....	1
1.2	Die X-gebundene Adrenoleukodystrophie, eine peroxisomale Stoffwechselerkrankung .....	3
1.2.1	Unterschiedliche Formen der X-gebundenen Adrenoleukodystrophie .....	3
1.2.2	Diagnose und Therapieansätze.....	6
1.3	Das Adrenoleukodystrophie-Protein - ein ABC-Transporter .....	9
1.3.1	Die ABC-Transporter Superfamilie, Bedeutung und allgemeine Charakteristika .....	9
1.3.2	Eigenschaften des Adrenoleukodystrophie-Proteins .....	11
1.4	Peroxisomales Targeting .....	12
1.4.1	Das Targeting von peroxisomalen Matrix-Proteinen .....	13
1.4.2	Das Targeting von peroxisomalen Membran-Proteinen .....	16
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
3.1	Organismen und Plasmide .....	22
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	23
3.2.1	Die Polymerase-Kettenreaktion .....	23
3.2.2	Horizontale DNA-Elektrophorese im Agarosegel.....	25
3.2.3	Reinigung von PCR-Fragmenten .....	26
3.2.4	Modifikation von DNA.....	27
3.2.5	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Stämmen (MC1061 und DH5 $\alpha$ ) .....	29
3.2.6	Isolierung von Plasmiden aus <i>E.coli</i> Zellen .....	33
3.2.7	DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode .....	34
3.2.8	Identifikation von positiven Bakterienklonen.....	36
3.2.9	Konstruktplanung: Untersuchung des peroxisomalen Targetings .....	37
3.3	Zelltransfektion .....	41
3.3.1	Transiente Zelltransfektion .....	41
3.3.2	Stabile Zelltransfektion.....	42
3.4	Fluoreszenzmikroskopie .....	43
3.4.1	Prinzipien .....	43
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbung .....	44
3.5	Statistische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie .....	46
3.6	Bioinformatische Werkzeuge .....	46
3.6.1	Protein-Sequenzvergleich .....	46
3.6.2	Protein-Motivsuche in Proteindatenbanken .....	47
3.6.3	Prädiktion von Protein-Sekundärstrukturen.....	47
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
4.1	Expressions-Tags - eine Methode zur Sublokalisierung von Proteinen.....	49
4.1.1	Expressions-Tags beeinträchtigen das peroxisomale Targeting nicht .....	49
4.1.2	Zelluläre Sublokalisierung des humanen peroxisomalen ABC-Transporters PMP69 .....	50

---

<b>4.2</b>	<b>Identifizierung des Targeting-Motivs des Adrenoleukodystrophie-Proteins.....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Der NH <sub>2</sub> -Terminus und der COOH-Terminus sind nicht für das Targeting notwendig.....	51
4.2.2	Weitergehende Identifizierung durch Grün Fluoreszierende Protein-Fusionsproteine .....	52
4.2.3	Die Targeting-Region ist funktionell konserviert.....	57
4.2.4	Bioinformatische Identifizierung von möglichen Targeting-Motiven.....	58
4.2.5	Einfluß gerichteter Mutationen im Targeting-Motiv .....	61
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>80</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>87</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>88</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Flußschema zur Diagnosefindung der X-ALD.....	8
Abbildung 1.2. Bildgebende Diagnostik der X-ALD.....	8
Abbildung 1.3. Die intrazelluläre Lokalisation von eukaryontischen ABC-Transportern.....	10
Abbildung 1.4. Dreidimensionales Modell eines ABC-Transporters .....	11
Abbildung 1.5. Anordnung der Transmembransegmente und „Nuklear Binding Folds“ in ABC-Transportern .....	11
Abbildung 1.6. ALDP - ein peroxisomaler ABC-Halbtransporter.. .....	12
Abbildung 1.7. PTS1- und der PTS2-Targeting-Weg von Matrix-Proteinen. ....	16
Abbildung 3.1. Verwendete Expressions-Tags.. .....	37
Abbildung 4.1. PMP69-HA in Cos7 Zellen.....	50
Abbildung 4.2. Das ALDP-Targeting-Signal ist im NH <sub>2</sub> -Teil des Proteins lokalisiert .....	52
Abbildung 4.3. Die verwendeten GFP-Fusionsproteine. ....	55
Abbildung 4.4. Konstrukte zur Eingrenzung der ALDP-Targeting-Region.....	55
Abbildung 4.5. Eingrenzung der ALDP-Targeting-Region .....	56
Abbildung 4.6. Konservierung der Targeting-Region.....	58
Abbildung 4.7. Die Lage der computergestützt identifizierten Motive.....	60
Abbildung 4.8. Ein konserviertes Motiv in unterschiedlichen Species .....	60
Abbildung 4.9. Experimentelle Bestätigung des möglichen Targeting-Motivs. ....	61
Abbildung 4.10. Lokalisation ausgetauschter Aminosäuren im ALDP-Protein.....	62
Abbildung 4.11. Effekt einer Deletion auf das ALDP-Targeting .....	63
Abbildung 9.1. Vektorenkarten, der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.....	80
Abbildung 9.2. Die Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Vektors .....	81

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1. Erkrankungen, an denen ABC-Transporter ursächlich beteiligt sind.....</b>	<b>10</b>
<b>Tabelle 3.1. Verwendete <i>E.coli</i> Bakterienstämme .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 3.2. Verwendete eukaryontische Zelllinien .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 3.3. Verwendete Plasmide .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 4.1. Subzelluläre Verteilung peroxisomaler ABC-Transporter.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 4.2. NH<sub>2</sub>-terminale ALDP-Deletionskonstrukte .....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 4.3. ALDP Targeting-Effektivität .....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 4.4. Bioinformatische Identifizierung von möglichen Motiven.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 9.1. Konstrukte und Primer peroxisomaler ABC-Transporter mit Tags.....</b>	<b>82</b>
<b>Tabelle 9.2. GFP-Fusionsprotein Konstrukte und Primer .....</b>	<b>85</b>
<b>Tabelle 9.3. Expressions-Tag-Konstrukte.....</b>	<b>86</b>

## 1 Einleitung

In dieser Dissertationsarbeit wird das peroxisomale Targeting von ABC-Transportern insbesondere des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) untersucht. Das ALDP ist involviert in der peroxisomalen Fettstoffwechselerkrankung Adrenoleukodystrophie, die X-gebunden vererbt wird. Zunächst soll ein kurzer Abriss über die Peroxisomen Funktion und peroxisomale Erkrankungen gegeben werden um dann zu der X-gebundenen Adrenoleukodystrophie überzuleiten. Danach wird kurz auf ABC-Transporter im Allgemeinen und das ALDP im Besonderen eingegangen. Für weitergehende interessante Details über die ABC-Transporter Protein-Superfamilie verweise ich auf die einschlägige Fachliteratur. Am Schluss der Einleitung wird das peroxisomale Protein-Targeting besprochen, das Gegenstand dieser Arbeit ist.

### **1.1 Peroxisomenfunktion und peroxisomale Erkrankungen allgemein**

Peroxisomen sind Zellorganellen umgeben von einer Biomembran, die aus einer Doppellipidschicht besteht. Peroxisomen sind involviert in viele lebenswichtige katabole und anabole biochemische Stoffwechselwege.

Zu den **katabolen Stoffwechselwegen** gehören:

- $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, langkettigen Fettsäuren, langkettige Dicarboxyl-Acyl-CoA, Prostaglandinen, Xenobiotika und die  $\beta$ -Oxidation der Seitenketten des Cholesterins.
- Zellatmung basierend auf  $H_2O_2$ -Metabolismus einer Vielzahl von Substraten unter Bildung von  $H_2O_2$  (De Duve and Baudhuin, 1966).  $H_2O_2$  wird dann durch Katalase, die zu über 99% im Peroxisom lokalisiert ist, abgebaut.
- Die Oxidation von Pipecolinsäure zu  $\alpha$ -Aminoacidat beim Menschen und Primaten, ein Zwischenschritt im Lysin Abbau (Mihalik and Rhead, 1991).
- Teilnahme am Polyamin Katabolismus: Spermin und Spermidin werden durch die peroxisomale Polyamin Oxidase zu Putrescin, 3-Aminopropionaldehyd und  $H_2O_2$  oxidiert (Holttta, 1977).



Peroxisomen sind unter anderem bei folgenden **anabolen Stoffwechselwegen** beteiligt:

- Oxalatsynthese durch die peroxisomale Alanin-Glyoxalat Aminotransferase (De Duve and Baudhuin, 1966, Noguchi and Takada, 1979).
- Glukoneogenese aus Aminosäuren durch die Serine:Pyruvat- und Alanin:Glyoxalat Aminotransferasen (Noguchi and Takada, 1978, Noguchi and Takada, 1979).
- Synthese von Cholesterin und anderen Isoprenoiden (Krisans, 1992).
- Teilnahme an der Bildung von Gallensäure aus Cholesterin durch die  $\beta$ -oxidative Spaltung von Seitenketten (Pedersen and Gustafsson, 1980, Krisans et al., 1985).

Durch die Teilnahme von Peroxisomen an diesen vielfältigen Stoffwechselwegen ist es somit nicht verwunderlich, dass Peroxisomen für eine Reihe von Krankheiten verantwortlich sind und eine eigene Krankheitsgruppe konstituieren: die peroxisomalen Erkrankungen (Lazarow, 1995, Wanders et al., 1988a). Diese lassen sich in drei verschiedene Gruppen einteilen:

1. Die peroxisomalen Biogenese Defekte, bei denen keine Peroxisomen existieren, sondern lediglich Membranüberreste (sog. „peroxisomale ghosts“ oder „remnants“). Diesen Erkrankungen liegt ein Defekt der peroxisomalen Biogenese-Proteine, sog. Peroxine oder Pex-Proteine, zugrunde. Krankheitsbilder: Cerebro-hepato-renales Syndrom (Zellweger Syndrom), neonatale Adrenoleukodystrophie, infantile Refsum Erkrankung, hyperpipecolische Azidämie.
2. Peroxisomen existieren, aber mehrere Funktionen sind defekt. Krankheitsbilder: Rhizomelische Form der Chondrodysplasia punctata, kombinierte peroxisomale  $\beta$ -Oxidation Enzymdefekte.
3. Peroxisomen existieren, aber eine einzig peroxisomale Funktion ist defekt. Krankheitsbilder: X-gebundene Adrenoleukodystrophie (X-ALD), peroxisomaler Thiolase Defekt (Pseudo-Zellweger Syndrom), Acyl-CoA Oxidase Defekt (Pseudo neonatale Adrenoleukodystrophie), Alanin-Glyoxalat Aminotransferase Defekt (primäre Hyperoxalurie Typ I).

## **1.2 Die X-gebundene Adrenoleukodystrophie, eine peroxisomale Stoffwechselerkrankung**

Die X-gebundene Adrenoleukodystrophie (X-ALD) stellt eine X-chromosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1:20.000 (Moser et al., 2001, Gärtner et al., 1998, Bezman et al., 2001) dar. Der Genlocus wurde auf Chromosom Xq28 kartiert (Mosser et al., 1994). Bisher sind 662 verschiedene Mutationen bekannt (Stand: Juni 2004, <http://www.x-ald.nl/>), die meisten darunter kommen als so genannte private Mutationen nur in einer Familie vor. 53% aller Mutationen werden sogar nur bei einzelnen Patienten gefunden (<http://www.x-ald.nl/>). Alle Patienten mit X-ALD leiden an einer eingeschränkten Fähigkeit sehr langkettige Fettsäuren (*very long chain fatty acids*; VLCFA) durch  $\beta$ -Oxidation zu spalten und somit zu degradieren (Singh et al., 1984, Rizzo et al., 1984, Poulos et al., 1986, Wanders et al., 1987). Dabei ist die Acyl-CoA Synthetase Aktivität in Peroxisomen dieser Patienten verringert (Wanders et al., 1988b, Lazo et al., 1988). Allerdings kodiert das X-ALD Gen nicht dieses Enzym selber sondern ein Genprodukt, das Adrenoleukodystrophie-Protein, das nicht direkt für diese Aktivitätsminderung verantwortlich ist (Mosser et al., 1993). Es konnte zudem in einem Maus-Modell gezeigt werden, dass bei X-ALD Mäusen weder das Expressionsmuster in Geweben noch die subzelluläre Distribution der Acyl-CoA Synthetase verändert sind (Heinzer et al., 2002). Da Peroxisomen das hauptsächliche Zellorganell für die  $\beta$ -Oxidation von VLCFAs darstellen, akkumulieren die überlangkettigen Fettsäuren in verschiedenen Geweben und in allen Körperflüssigkeiten.

### **1.2.1 Unterschiedliche Formen der X-gebundenen Adrenoleukodystrophie**

Der biochemische Defekt der X-ALD ist eng umschrieben. Auch findet sich bei jedem Patienten eine Mutation im X-ALD Gen. Allerdings besteht keine Genotyp-Phänotyp Korrelation und somit kann eine einzelne Mutation sich in einer Familie durch alle bekannten verschiedenen Phänotypen ausdrücken. So wurden Mitglieder von Familien beschrieben, die zwar alle die gleiche Mutation besaßen, aber unterschiedliche klinische Formen aufwiesen.

Die Adrenoleukodystrophie wird in sechs verschiedene Phänotypen unterteilt.

Bei der Kinderform der cerebralen Adrenoleukodystrophie (engl. Childhood Cerebral Adrenoleukodystrophie, Abk.: ccALD oder cALD) treten die ersten klinischen Anzeichen der Erkrankung im Alter von zwei bis zehn Jahren meist in Form von progressiven neurologischen Dysfunktionen (wie Seh- und Hörschwierigkeiten) oder von psychoneurologischen Auffälligkeiten auf (z.B. Konzentrationsschwäche in der Schule, Verhaltensänderungen wie emotionale Labilität, Hyperaktivität oder Zurückgezogenheit). Bei 85% der Patienten wird zu diesem Zeitpunkt zusätzlich eine verminderte Antwort auf ACTH Stimulation festgestellt. Eine Nebennierenrindeninsuffizienz tritt meist erst später klinisch in Erscheinung. Alle Kinder weisen im Verlauf der Erkrankung Krampfanfälle auf, bei 7% sind sie als Erstsymptom beschrieben worden. Die Progression der Krankheit findet sehr schnell statt, ein kompletter Sehverlust durch Optikusatrophy tritt in den Spätstadien auf, ein vegetatives Stadium wird erreicht nach  $1,9 \pm 2$  (0,5 bis 10,5) Jahren und die Kinder versterben  $9,4 \pm 2,7$  Jahren nach Symptombeginn (van Geel et al., 1997, Moser et al., 2001).

Die adoleszente cerebrale Form von X-ALD manifestiert sich zwischen dem elften und 22. Lebensjahr, wobei sie sich im klinischen Bild weiterhin nicht von der ccALD-Form unterscheidet (Moser et al., 2001, van Geel et al., 1997).

Bei einem Erstmanifestationsalter über dem 21. Lebensjahr wird die ALD mit zerebraler, aber ohne lumbaler, Beteiligung als adulte cerebrale ALD (Abk.: acALD oder aALD) bezeichnet. Diese seltene Art der X-ALD zeigt die Symptome einer Schizophrenie entweder mit einer unspezifischen Demenz oder anderen zerebralen Defiziten. Hierauf beruhen die häufigen Fehldiagnosen, die zu einer Dunkelziffer der acALD führen. Das Vorliegen einer Addison Erkrankung zusammen mit psychiatrischen Auffälligkeiten ist jedoch ein wichtiger Hinweis auf acALD, die Diagnose kann durch biochemische Analyse der VLCFA und durch CT und NMR gesichert werden. Das Intervall zwischen den ersten neurologischen Symptomen und dem vegetativen Stadium oder Tod beträgt drei bis vier Jahre (Moser et al., 2001, van Geel et al., 1997).

Die Adrenomyeloneuropathie (Abk.: AMN) ist eine andere Form der X-ALD, die nur in 50% der Fälle das Großhirn betrifft. Sie manifestiert sich in der zweiten bis vierten Lebensdekade, wobei eine Rückenmarksbeteiligung obligat ist. Der Beginn

stellt eine spastische Diparese der Beine dar, als Begleiterscheinungen können allgemeine Schwäche, Gewichtsverlust, Erbrechen und Ausscheidungsstörungen hinzutreten. Nach 5 bis 15 Jahren verschlimmern sich die Gangstörungen. Eine Nebennierenrindeninsuffizienz tritt bei 70% aller Betroffenen auf. Bei Patienten ohne Gehirnbeteiligung bleiben die intellektuellen Fähigkeiten intakt, allerdings wird bei zunehmender Verschlechterung des Krankheitsbildes eine erhöhte Inzidenz an Depressionen und emotionalen Störungen festgestellt (van Geel et al., 1997, Moser et al., 2001).

10 bis 20% aller X-ALD Patienten (diagnostiziert durch erhöhte Fettsäurewerte im Plasma) haben bei Diagnosestellung keine Anzeichen einer neurologischen Beteiligung sondern lediglich die Symptome einer Addison Erkrankung. Diese Gruppe entspricht der Gruppe des Addison-only Typs (Abk.: ADD). Die Dunkelziffer dürfte allerdings hoch liegen, da nach Einschätzung von Moser et al. ca. 40% aller Addison-Patienten ALD haben (Moser et al., 2001). Viele dieser Patienten werden im Laufe des Lebens eine geringe neurologische Symptomatik entwickeln, wie Hyperreflexie, verminderter Vibrationssinn, Auffälligkeiten in neuropsychologischen Tests und in der Kernspintomographie nachweisbare geringfügige morphologische Abweichungen (Moser et al., 2001, van Geel et al., 1997).

Es wurden immer wieder asymptomatische Fälle von X-ALD beschrieben. Viele dieser zunächst asymptomatischen Patienten mussten jedoch im Laufe ihres Lebens einer der oben genannten X-ALD Formen zugeordnet werden. Die ältesten asymptomatischen Patienten waren allerdings zwischen 60 und 70 Jahre alt (Moser et al., 2001).

Neben den männlichen Patienten existieren weibliche heterozygote Symptomenträger. Für X-ALD heterozygote Frauen haben zu mehr als die Hälfte Symptome, die von milder AMN über mittel schwere Formen bis hin zu schwerster AMN reichen (Moser et al., 2001).

### 1.2.2 Diagnose und Therapieansätze

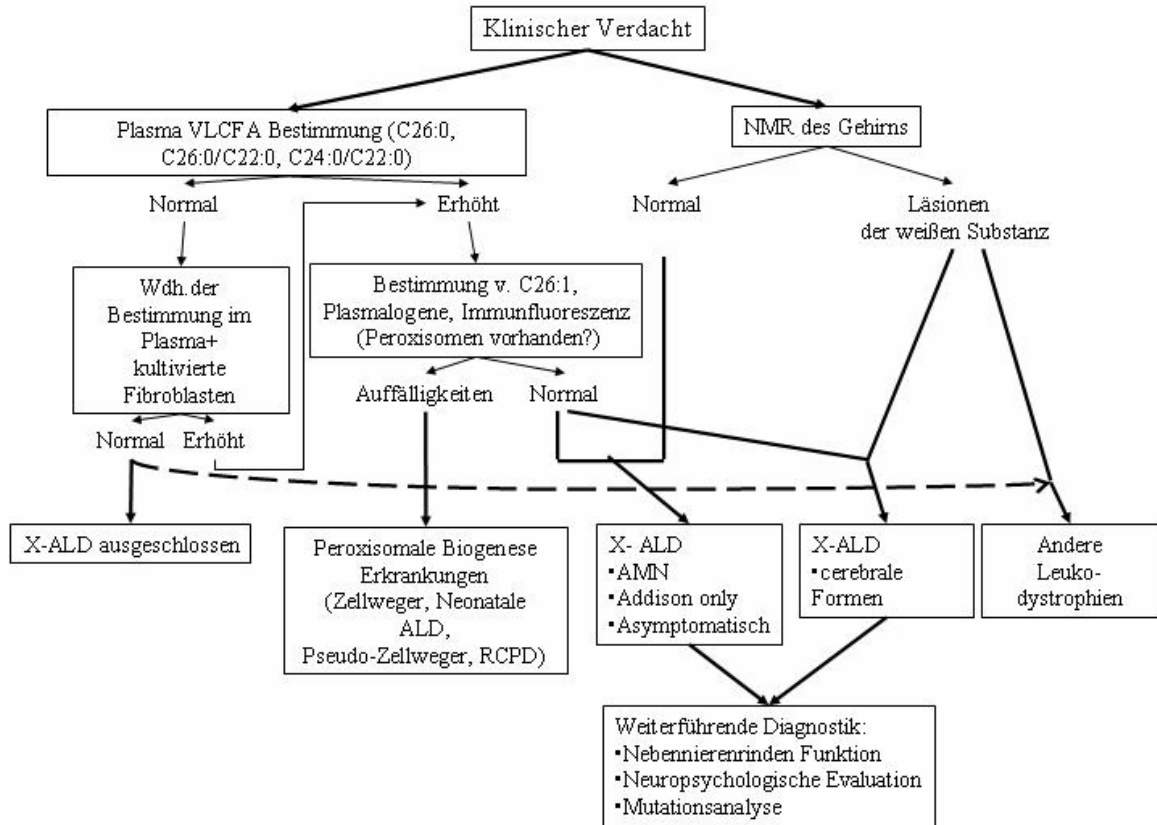
Die Diagnose der X-ALD beruht auf der Klinik, bildgebenden Verfahren und biochemischen Laboruntersuchungen. Einen Überblick gibt das Flussdiagramm der Abbildung 1.1 (Seite 8). Die Diagnose wird durch bildgebende Verfahren erhärtet. Dabei übertrifft das NMR das CT, da durch NMR subkortikale und im Hirnstamm befindliche typische Läsionen besser erfasst werden und eine Differenzierung zur Multiplen Sklerose möglich ist. Die charakteristischen Läsionen betreffen die weiße Substanz, sind kontinuierlich und meistens symmetrisch angeordnet und sind oft im Corpus callosum und in der periventrikulären parieto-occipitalen Region lokalisiert. Bei der Multiplen Sklerose dagegen präsentieren sich die Läsionen der weißen Substanz oft fleckförmig (Moser et al., 2001, Gärtner et al., 1998). Im Nativ-CT zeigen sich hypodense bilaterale Areale, die sich nach intravenöser Kontrastmittelgabe durch girlandenförmige Anreicherungen nach ventral und dorsal abgrenzen. Beide Methoden sind in Abbildung 1.2 (Seite 8) gegenübergestellt.

Die Nebennierenrindeninsuffizienz bei X-ALD wird durch eine Steroidsubstitution effektiv behandelt. Alle anderen Therapieverfahren sind experimentell und beinhalten Immunsuppression, Knochenmarkstransplantation und in situ Implantation von genetisch korrigierten Zellen. Eine Diät mit einer 4:1 Mischung von der Triglycerid Form der Ölsäure (GTO) und Erukasäure (GTE), das bekannter ist unter dem Namen „Lorenzo's Öl“ (Rizzo et al., 1989), kann den Plasmaspiegel der langkettigen Fettsäuren innerhalb eines Monats auf Normalwerte senken. Allerdings vermag sie nicht die neurologische Progression und die Funktion der Nebennierenrinde zu beeinflussen, wenn bereits neurologische Symptome vorhanden sind. Neurologisch asymptomatische Patienten können durch die dietätische Therapie profitieren, da dann der neurologische Abbau langsamer als erwartet stattfindet (Moser, 1997). Als Nebenwirkungen sind Thrombozytopenie und der Mangel an essentiellen Fettsäuren bekannt.

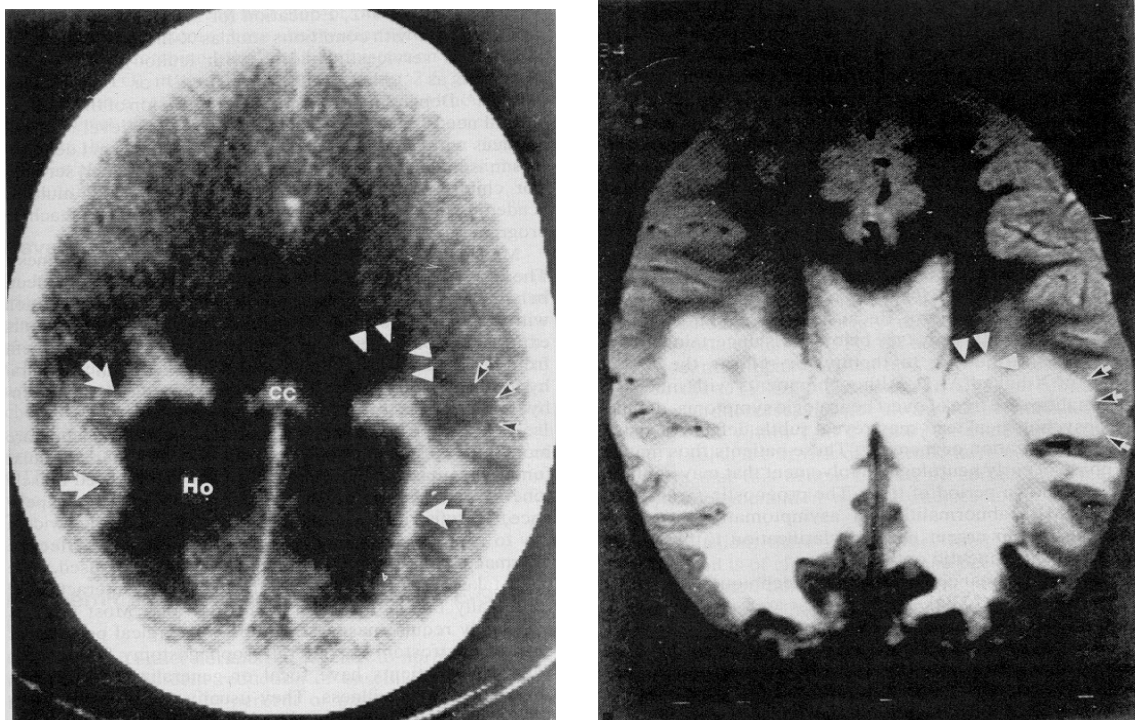
Da das Ausmaß und die Ausdehnung der Läsionen in der weißen Substanz mit der Entzündungsantwort durch reaktive Astrozyten, Makrophagen, T-Zellen und Zytokinen im Gehirn korrelieren, ist bereits seit einigen Jahren eine

Immunmodulation in Diskussion (Powers et al., 1992). So zeigten Singh et al. an Fibroblasten von X-ALD Patienten, dass Lovastatin und Phenylacetat die Konzentration von überlangkettigen Fettsäuren vermindern (Singh et al., 1998). Lovastatin kann die Induktion von postinflammatorischen Zytokinen in Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen in vitro verhindern. In einer kleinen klinischen Studie mit 12 Patienten konnten erste Erfolge mit Lovastatin (40 mg/d) erzielt werden: Nach einer Therapiedauer von 6 Monaten sank der erhöhte Anteil an VLCFAs in Erythrozytenmembranen bei 6 Patienten um über 50%. Allerdings verschlechterte sich der neurologische Zustand eines 10-jährigen Patienten mit fortgeschrittener ccALD. Bei den AMN Patienten wurde eine Verschlechterung nicht beobachtet (Pai et al., 2000). Es bleibt abzuwarten unter welchen Bedingungen und bei welchen Patienten diese Therapie sinnvoll ist.

Ein weiterer Therapieansatz ist die Knochenmarkstransplantation, die bis jetzt bei Erfolg als einzige Therapie Heilung verspricht. Ca. 30% der Transplantierten versterben jedoch an graft versus host Reaktionen, der Immunsuppression oder an der rapiden neurologischen Progression der Erkrankung. Allerdings stabilisieren oder verbessern sich über 50% der überlebenden Patienten, so dass die Knochenmarkstransplantation bei Patienten mit sehr früher Beteiligung des Großhirns in Betracht gezogen werden muss, wenn entsprechende Spender zur Verfügung stehen (Gärtner et al., 1998).



**Abbildung 1.1.** Fluss-Schema zur Diagnosefindung der X-ALD (modifiziert nach Moser, Gould und Gärtner (Moser et al., 2001, Gould et al., 2001, Gärtner et al., 1998)).



**Abbildung 1.2.** Bildgebende Diagnostik der X-ALD. Links: Kontrastmittel angereicherte CT Abnormalitäten mit einem symmetrischen hyperdensen Areal (Ho). CC: Corpus callosum. Rechts: T2-gewichtetes NMR desselben Patienten. Hier kommen die subkortikalen Läsionen besser zum Ausdruck (Bilder aus Kumar et al. (Kumar et al., 1987)).

### **1.3 Das Adrenoleukodystrophie-Protein - ein ABC-Transporter**

Der erste Teil dieses Kapitels beschreibt die Bedeutung und allgemeine Charakteristika der ABC-Transporterfamilie, während der zweite Teil wichtige Eigenschaften des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) zusammenfasst.

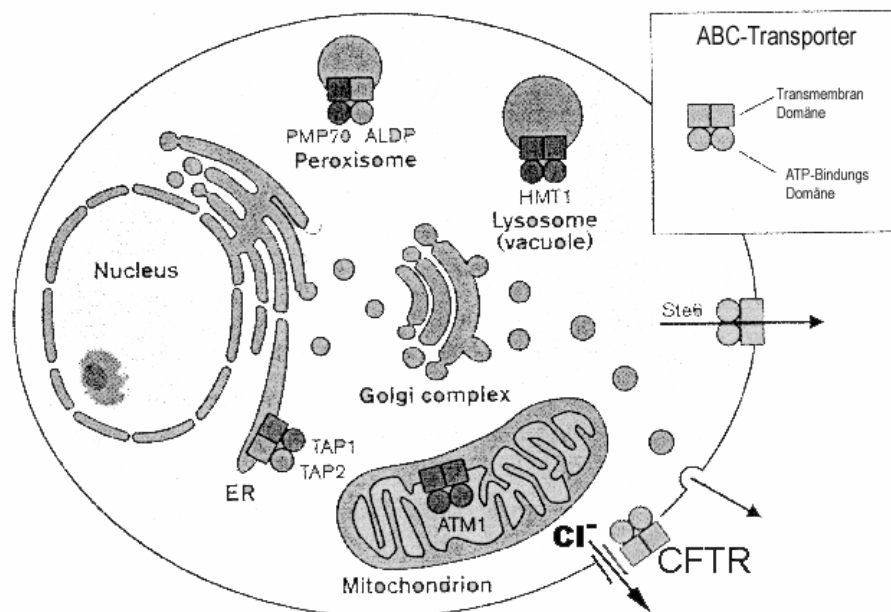
#### **1.3.1 Die ABC-Transporter Superfamilie, Bedeutung und allgemeine Charakteristika**

Die ATP-binding cassette (ABC) Transporter Familie (Hyde et al., 1990) ist eine der größten Protein-Superfamilien mit Vorkommen in den meisten Organismen. ABC-Transporter sind Transmembran-Proteine, die entweder als Importer oder Exporter fungieren. Mitglieder dieser Proteinfamilie bewerkstelligen durch den ATP-abhängigen Transport einer Vielzahl von Molekülen nicht nur die Aufnahme von Nährstoffen, sondern sind auch involviert in Signaltransduktion, Proteinsekretion, Medikamenten- und Antibiotika-Resistenzen, Antigenprozessierung und -präsentation (Higgins, 1992). In Anbetracht dieser vielfältigen Aufgaben ist das Vorkommen von ABC-Transportern an vielen Orten der Zelle nicht verwunderlich (Abbildung 1.3, Seite 10). Beim Menschen sind ABC-Transporter in einer Vielzahl von Krankheiten involviert (Tabelle 1.1, Seite 10). Auch in der Medikamenten-Resistenz von Tumorzellen (Protein Pgp = MDR1 und MRP Proteine) spielen ABC-Transporter eine große Rolle und sind deshalb Ziel intensiver Forschung.

ABC-Transporter sind aufgebaut aus vier Teilen, zwei sehr konservierte Enzym-Anteile, den ABC-ATPasen oder „Nuklear Binding Folds“ (NBF) (Higgins et al., 1986, Hyde et al., 1990, Ames et al., 1990) und zwei weniger konservierten Membran-Domänen (Abbildung 1.4, S. 11). Dabei beinhaltet eine Membran-Domäne sechs Transmembran-Domänen (TMD) (Higgins, 1992). Diese vier Bausteine eines Transporters können in unterschiedlichen Kombinationen zusammengesetzt sein (Abbildung 1.5, Seite 11). Meist sind sie jedoch als Dimere aufgebaut und binden entweder an ein gleiches Molekül (Abbildung 1.5 F, H) oder an einen anderen ABC-Halbtransporter (Abbildung 1.5 G), wie bei den in dieser Arbeit untersuchten peroxisomalen ABC-Transportern (Liu et al., 1999). Neben diesen charakteristischen Domänen charakterisieren mehrere konservierte



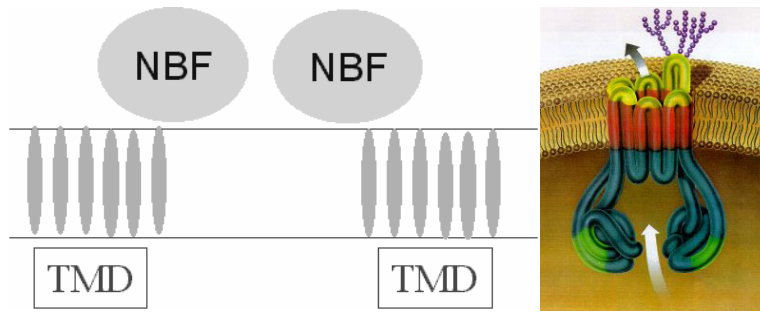
Motive die Zugehörigkeit eines Proteins zu der ABC-Transporter Familie. Die NBF wird charakterisiert und begrenzt von den beiden Walker-Motiven, Walker A und B (Walker et al., 1982). Unmittelbar COOH-terminal der NBF befindet sich außerdem die charakteristische Signatursequenz [LSGGQ] (Ames et al., 1990, Hyde et al., 1990, Holland and Blight, 1999). Bei denjenigen ABC-Transportern, die als Importer agieren - so auch den peroxisomalen ABC-Transportern, kommt noch das EAA-Motiv ([EAA(X)<sub>3</sub>G(X)<sub>9</sub>IXLP]) bei den Prokaryonten (Dassa and Hofnung, 1985) und ein EAA-like Motiv bei den Eukaryonten hinzu (Shani et al., 1996).



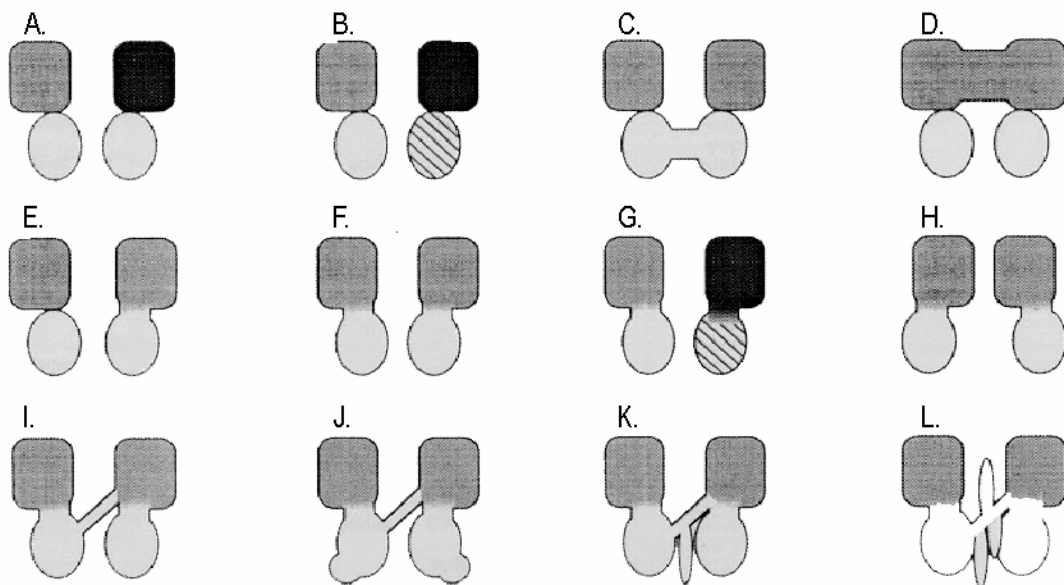
**Abbildung 1.3.** Die intrazelluläre Lokalisation von einigen eukaryontischen ABC-Transportern (Cleves et al., 1996).

Erkrankung	Beteiligter ABC-Transporter
Zystische Fibrose	CFTR
Dubin-Johnson Syndrom	cMOAT
Hyperinsulinämische Hypoglykämie	SUR1
Stargardt Erkrankung (Form der rezessiven Makula Dystrophie)	RIM/ABCR
Progressive familiärer intrahepatische Cholestase	SPGP
Adrenoleukodystrophie	ALDP

**Tabelle 1.1.** Eine Auswahl an Erkrankungen, an denen ABC-Transporter ursächlich beteiligt sind.



**Abbildung 1.4.** Schematisches Bild (links) und dreidimensionales Modell (rechts) eines ABC-Transporters.



**Abbildung 1.5.** Die verschiedenen Möglichkeiten der Anordnung der Transmembran-Domänen (dunkle Rechtecke) und „Nuklear Binding Folds“ (ovale Bereiche) in ABC-Transportern. ALDP heterodimerisiert sowohl mit sich selbst (wie in F), als auch mit anderen Proteinen (wie in G) (Holland and Blight, 1999).

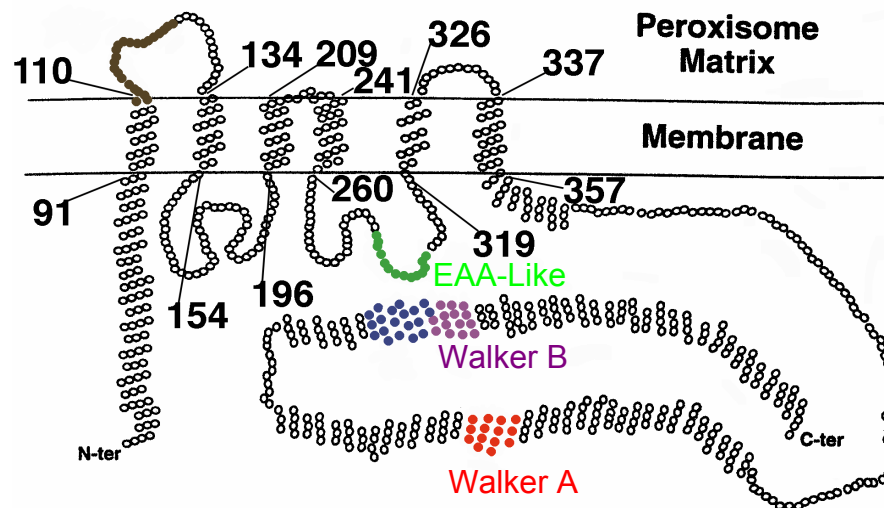
### 1.3.2 Eigenschaften des Adrenoleukodystrophie-Proteins

Beim Menschen sind vier peroxisomale ABC-Transporter bekannt, das Adrenoleukodystrophie-Protein (ALDP, syn. ABCD1) (Mosser et al., 1994), das Adrenoleukodystrophie-related-Protein (ALDRP, syn. ABCD2) (Holzinger et al., 1997a), das 70kDa peroxisomale Membran-Protein (PMP70, syn. ABCD3, PXMP1) (Kamijo et al., 1990) und das 69kDa peroxisomale Membran-Protein (PMP69, syn. ABCD4, PXMP1-L, P70R) (Holzinger et al., 1997b, Shani et al., 1997, Holzinger et al., 1998b).

ALDP ist ein 75kDa großer ABC-Transporter, der mit der peroxisomalen Membran assoziiert ist (Mosser et al., 1993, Mosser et al., 1994). Die ATP

Bindungsdomäne mit den Walker Motiven ist zwischen Aminosäuren 540-670 gelegen und reicht ins Zytoplasma hinein (Contreras et al., 1996). Das ALDP stellt einen ABC-Halbtransporter dar (Abbildung 1.6) und braucht als funktionellen Transporter einen Bindungspartner. ALDP bildet sowohl mit sich selbst als auch mit PMP70 und ALDRp Homo- bzw. Heterodimere (Liu et al., 1999).

Die Funktion des ALDP ist noch unklar. Sie überlappt aber mit denen des ALD-related-Protein (ALDRp), das eine 66% Aminosäure Identität zu ALDP besitzt. In Fibroblasten von X-ALD Patienten kann eine Überexpression von ALDRp den biochemischen Defekt beseitigen, ohne direkt ALDP zu stabilisieren (Kemp et al., 1998, Netik et al., 1999, Flavigny et al., 1999).



**Abbildung 1.6.** ALDP - ein peroxisomaler ABC-Halbtransporter. Die Ziffern bezeichnen die in dieser Arbeit durch Computeranalyse identifizierten Transmembransegmente (modifiziert nach (Shani et al., 1996).

#### 1.4 Peroxisomales Targeting

Als Protein-Targeting wird das Sortieren von neu synthetisierten Proteinen an einen definierten intrazellulären Ort bezeichnet. Das Protein-Targeting geschieht auf verschiedensten Ebenen. Die meisten Proteine in Mitochondrien und Chloroplasten und alle Proteine der anderen Organellen werden von DNA im Zellkern kodiert und im Zytoplasma entweder an freien oder Membran-gebundenen Ribosomen synthetisiert. Für ihren Weg zu ihrem Wirkungs-Ort benötigen sie eine Vielzahl an Targeting-Signalen und Sortierschritten. Dabei wird das Protein anhand von Targeting-Signalen entweder direkt oder mittels anderer Rezeptorproteine an das richtige Zellorganell geleitet. Einige wenige

mitochondriale und Chloroplasten-Proteine benötigen keine Targeting-Signale, da sie von mitochondrialer bzw. Chloroplasten-DNA kodiert werden und mit Hilfe von in diesen Organellen befindlichen Ribosomen direkt an ihrem Zielort synthetisiert werden.

#### **1.4.1 Das Targeting von peroxisomalen Matrix-Proteinen**

Peroxisomale Matrix-Proteine werden an freien Ribosomen synthetisiert (Goldman and Blobel, 1978, Lazarow and Fujiki, 1985) und durch ein peroxisomales Targeting-Signal (PTS) an das Peroxisom geleitet. Dort werden sie durch eine spezifische Maschinerie in das Peroxisom importiert, wobei dieser Import nicht von einem vorherigen Entfalten dieser Polypeptide abhängig ist (Walton et al., 1995).

Für das Targeting von peroxisomalen Matrix-Proteinen wurden zwei verschiedene Wege beschrieben. Ein Großteil der Proteine wird durch das peroxisomale Targeting-Signal 1 (PTS1) an das Peroxisom geleitet, während andere durch ein peroxisomales Targeting-Signal 2 (PTS2) an das Peroxisom gebracht werden. Die beiden Wege vereinen sich an der peroxisomalen Membran durch eine gemeinsame Andockstelle. Nur wenige peroxisomale Matrix-Proteine werden weder durch ein PTS1, noch durch ein PTS2 an das Peroxisom geleitet sondern über andere interne Targeting-Signale.

Targeting-Signale können über die Evolution konserviert vorkommen (Keller et al., 1991). Allerdings wurde anhand der Schwein- und humanen Alkyl-dihydroxy-acetonphosphat Synthase einerseits (beide tragen ein PTS2 Signal) und dem entsprechenden Hefeprotein andererseits (ein PTS1 Signal tragend) gezeigt, dass Targeting-Signale während der Evolution auch ausgetauscht werden können (=“evolutionary switching,“) (de Vet et al., 1997, de Vet et al., 1998).

Im Folgenden werden die einzelnen peroxisomalen Targeting-Signale und ihr gemeinsamer Weg skizziert und in der Abbildung 1.7 (S.16) dargestellt.

##### **1.4.1.1 Das peroxisomale Targeting-Signal 1 (PTS1)**

Das peroxisomale Targeting-Signal 1 (PTS1) kommt am COOH-terminalen Ende der meisten Matrix-Proteine vor und besteht in der Regel aus drei Aminosäuren mit der Konsensus Sequenz [(S/A/C/K/N)(K/R/H/Q/N/S)(L/F/I)] (Gould et

al., 1987, Moller et al., 1999, Amery et al., 1998, Jones et al., 1999). Im Fall von humaner Katalase, ein peroxisomaler Marker, besteht das PTS1 jedoch aus dem COOH-terminalen Tetrapeptid (KANL) (Purdue and Lazarow, 1996). PTS1 Motive sind zwar allein für das peroxisomale Targeting ausreichend, die Targeting-Effektivität kann jedoch durch zusätzliche umgebende Aminosäuren gesteigert werden (Miyazawa et al., 1989, Miura et al., 1992).

Nach der Synthese binden PTS1-tragende Proteine im Zytosol an den löslichen Rezeptor Pex5p, der diese an eine Andockstelle an die peroxisomale Membran lenkt (McCollum et al., 1993, Van der Leij et al., 1993, Terlecky et al., 1995, Wiemer et al., 1995). Das Targeting und die nachfolgende Translokation in das Peroxisom von PTS1 tragenden Proteinen unterliegen einer Sättigungscharakteristik, verbrauchen ATP und sind temperaturabhängig (Wendland and Subramani, 1993).

#### 1.4.1.2 Das peroxisomale Targeting-Signal 2 (PTS2)

Das NH<sub>2</sub>-terminale peroxisomale Targeting-Signal 2 (PTS2) kommt bei einer geringeren Anzahl von Proteinen vor als das PTS1 und wird bei einigen Proteinen vor dem Protein-Import in das Peroxisom abgespalten (Osumi et al., 1991, Swinkels et al., 1991, Bout et al., 1988, Fairbairn and Tanner, 1989, Gietl et al., 1990, Gietl et al., 1994, Faber et al., 1995, Subramani, 1992). Folgende Consensus Sequenz des PTS2 Signals kann aus der Zusammenschau der Daten ermittelt werden (Subramani, 1998): [(R/K)(L/V/I)X<sub>5</sub>(Q/H)(L/A)]. Wenige PTS2 tragenden Proteine (*H.polymorpha* Pex8p, *S.cerevisiae* Citrat Synthetase 2) besitzen zusätzlich noch ein funktionelles PTS1 an ihrem COOH-Terminus. Beide Signale agieren unabhängig von einander als peroxisomale Targeting-Signale (Waterham et al., 1994, Lee et al., 2000).

Pex7p ist der lösliche zytosolische Rezeptor für PTS2 tragende Proteine (Zhang and Lazarow, 1996, Rehling et al., 1996, Marzioch et al., 1994, Braverman et al., 1997, Motley et al., 1997, Purdue et al., 1997). Er ist zwischen Hefen und Mensch konserviert. Andere Pex-Proteine werden spezifisch für den PTS2 Targeting-Weg benötigt. So sind Pex18p und Pex21p für die Translokation von Pex7p an die peroxisomale Membran vonnöten (Purdue et al., 1998).

#### 1.4.1.3 Andere peroxisomale Targeting-Signale für Matrix-Proteine

Einige Matrix-Proteine werden durch Targeting-Regionen innerhalb von Proteinen zum Peroxisom geleitet. So hat die *Saccharomyces cerevisiae* Carnitin-Acetyltransferase sowohl ein PTS1 als auch eine innere Targeting-Sequenz (Elgersma et al., 1995). Die Katalase A der gleichen Hefe wie auch die *Candida tropicalis* Acyl-CoA-Oxidase weisen ebenfalls zwei unterschiedliche interne Targeting-Domänen auf (Kragler et al., 1993, Small et al., 1988).

Die *S.cerevisiae* Carnitin-Acetyltransferase wird über einen Pex5p abhängigen Weg zum Peroxisom gebracht (Elgersma et al., 1995). Deswegen postulieren Rachubinski und Subramani, dass interne Targeting-Signale nicht selbständig peroxisomales Targeting vermitteln, sondern dass vielmehr solche Proteine durch Aggregatbildung mit PTS1 Proteinen an das Peroxisom gebracht werden könnten (Rachubinski and Subramani, 1995).

#### 1.4.1.4 Gemeinsamer Membran-Andock-Komplex (Membrane docking site)

Der PTS1 wie auch der PTS2 Targeting-Weg münden in einen gemeinsamen Weg, den Membran-Andock-Komplex. Dabei vermittelt der PTS1-Rezeptor (Pex5p) die Bindung des PTS2-Rezeptors (Pex7p) an diesen Komplex (Braverman et al., 1998, Fujiki, 2000, Otera et al., 2000). Der Membran-Andock-Komplex besteht aus Pex14p, Pex13p und Pex17p (Abbildung 1.7, Seite 16). Pex13p und Pex17p sind an der Bindung von sowohl PTS1- als auch PTS2-Rezeptoren beteiligt (Elgersma et al., 1996, Girzalsky et al., 1999, Gould et al., 1996, Huhse et al., 1998, Snyder et al., 1999b). Dieser Membran-Andock-Komplex bindet an einen Import-Komplex bestehend aus Pex2p, Pex10p, Pex12p und Pex8p (Rehling et al., 2000, Johnson et al., 2001, Sacksteder and Gould, 2000). Eine Beteiligung von weiteren Peroxinen wie Pex16p, Pex15p und Pex19p wird diskutiert (Eitzen et al., 1995, Elgersma et al., 1997, Fransen et al., 2004). Eine bemerkenswerte Eigenschaft des peroxisomalen Importsystems ist der Transport von vollständig gefalteten Proteinen in die peroxisomale Matrix. Damit ist das Targeting und der Import von peroxisomalen Matrix-Proteinen abgeschlossen, der Rezeptor wird danach wiederverwertet und steht für die Akzeptanz weiterer Targeting-Signale im Zytosol zur Verfügung.

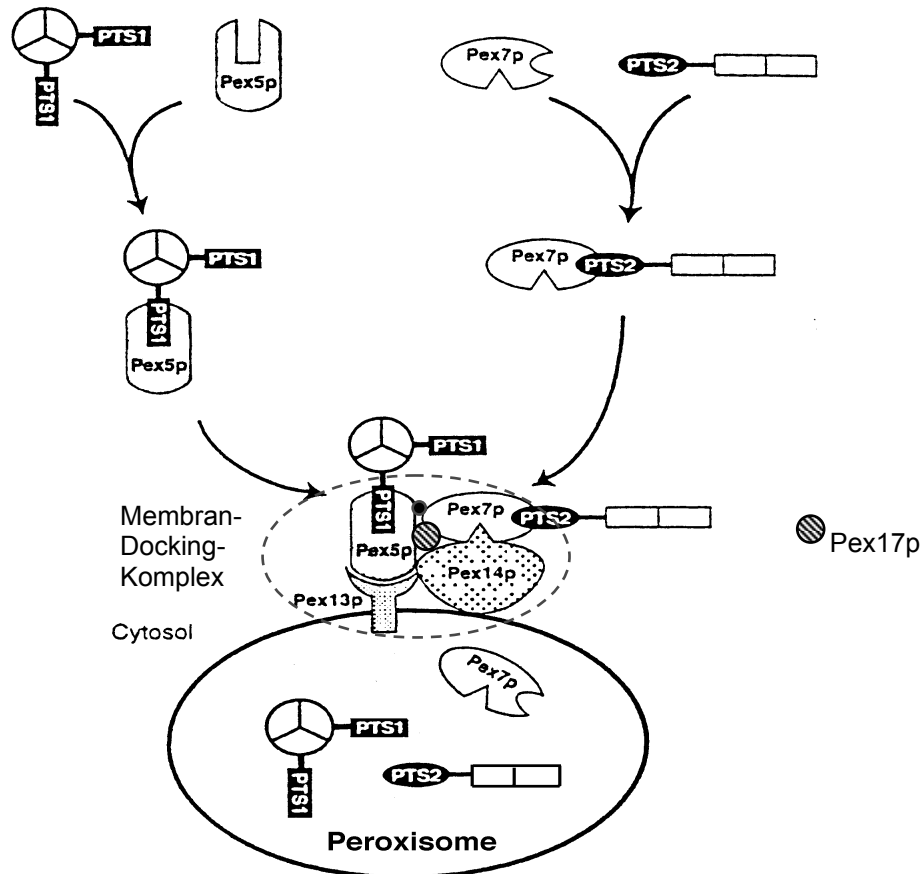


Abbildung 1.7. Der PTS1- (links) und der PTS2- (rechts) Targeting-Weg münden in einen gemeinsamen Membran-Docking-Komplex. Targeting-Signale sind schwarz hinterlegt, Pex-Proteine symbolisch dargestellt und beschriftet (modifiziert nach (Subramani, 1998).

#### 1.4.2 Das Targeting von peroxisomalen Membran-Proteinen

Zu Beginn dieser Arbeit war das Targeting von peroxisomalen Membran-Proteinen noch weitgehend unbekannt. Peroxisomale Membran-Proteine (PMPs) werden ebenfalls an freien Ribosomen im Zellplasma synthetisiert (Just and Hartl, 1987, Imanaka et al., 1996, Bodnar and Rachubinski, 1991, Fujiki et al., 1984, Suzuki et al., 1987) und an das Peroxisom geleitet (Bodnar and Rachubinski, 1991, Fujiki et al., 1984, Suzuki et al., 1987).

Über die eigentlich für das Targeting verantwortlichen peroxisomalen Targeting-Signale für Transmembran-Proteine (mPTS) ist wenig bekannt und eine einheitliche Nomenklatur ist noch nicht definiert. In Zusammenschau der Literatur liegt der in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur der Übersichtsartikel Titorenkos und Rachubinskis und die Publikation von Wang et al. zugrunde (Titorenko and Rachubinski, 2001, Wang et al., 2001). Die Komplexität des Targetings von peroxisomalen Membran-Proteinen im Vergleich

zu den peroxisomalen Matrix-Proteinen kann mit der Notwendigkeit erklärt werden, dass peroxisomale Membran-Proteine nicht nur durch Targeting-Signale an das Peroxisom geleitet, sondern in einem nächsten Schritt in die Membran integriert werden müssen. Im Gegensatz dazu werden peroxisomale Matrix-Proteine nach dem Targeting in die peroxisomale Matrix von der Wand des Zellorganells physikalisch zurückgehalten, ein komplizierter Membran-Insertions Mechanismus fehlt.

Die Kinetik des Targetings von peroxisomalen Membran-Proteinen wurde anhand des Ratten-PMP70-Proteins untersucht (Imanaka et al., 1996). Das Targeting an das Peroxisom geschieht mit einer Halbwertszeit von drei Minuten. Der Einbau in die peroxisomale Membran wird dann etwas verzögert und ist nach 15 Minuten vollständig abgeschlossen. Diese Kinetik ist temperatur- nicht jedoch ATP abhängig.

#### 1.4.2.1 Peroxisomale Targeting-Signale von Membran-Proteinen der Gruppe 1 (mPTS1)

Die Gruppe von peroxisomalen Targeting-Signalen von Membran-Proteinen 1 (mPTS1) wird charakterisiert von einer Häufung basischer Aminosäuren (sog. Cluster), die meist in Richtung der peroxisomalen Matrix ausgerichtet sind, und von einer zytosolischen Domäne, die vor einem Transmembransegment liegt.

Dieses Signal wurde zuerst bei PMP 47, ein peroxisomales Membran-Protein der Hefe, als eine zwischen den Transmembransegmente 4 und 5 gelegene Targeting-Region beschrieben (McCammon et al., 1994, Dyer et al., 1996). Diese beinhaltet im Zentrum einen Block basischer Aminosäuren (KIKKR), der wichtig für das Targeting ist (McCammon et al., 1994, Wang et al., 2001). Dabei spielt neben der Gesamtladung vor allem die Position der basischen Aminosäuren wie auch die Seitenketten eine funktionelle Rolle (Wang et al., 2001). Interessanterweise sind nur zwei basische Aminosäuren hintereinander für die Funktionalität dieses Clusters ausreichend. Für ein effektives Targeting werden zudem das Transmembransegment 2 und die unmittelbar NH<sub>2</sub>-terminal gelegenen Abschnitte benötigt (Wang et al., 2001). Die gleiche Targeting-Region wurde im PMP47 Ortholog des Menschen, PMP34, identifiziert (Honsho and Fujiki, 2000). Allerdings beschreiben Jones et al. zwei andere unabhängige Targeting-Bereiche



im PMP34 (Jones et al., 2001). Diese zwei beschriebenen Targeting-Bereiche sind in den ersten 147 Aminosäuren des Proteins und in den 63 COOH-terminalen Aminosäuren lokalisiert. Die Diskrepanz der mit vergleichbaren Methoden durchgeführten Untersuchungen von Honsho und Fujiki einerseits und von Jones et al. andererseits könnte in der Interpretation der Daten liegen, da Honsho und Fujiki negative experimentelle Ergebnisse als Ausschluss eines Targeting-Signals interpretierten. Ein fehlendes Targeting kann aber auch auf Instabilität, Fehlfaltung und Aggregatbildung zurückzuführen sein.

Ein anderer Vertreter der mPTS1 Gruppe ist Pex15p der Hefe *S.cerevisiae*. Pex15p ist ein peroxisomales Transmembran-Protein mit einer einzigen Transmembran-Domäne. Dabei beinhaltet der in das Peroxisom gerichtete COOH-Terminus einen Bereich (Aminosäuren 302-371), der in der Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu PMP47 aufweist und für das peroxisomale Targeting notwendig ist (Elgersma et al., 1997, Wang et al., 2001). Dieses Signal wurde durch Sequenzvergleiche auch in PMP24 gefunden (Reguenga et al., 1999).

Die Aminosäuren 16-37 des Ratten-PMP22 stellen einen weiteren Vertreter dieser Gruppe von Targeting-Signalen dar (Pause et al., 2000). Dieser Proteinbereich ist für das Targeting notwendig und beinhaltet ebenfalls eine Anzahl von basischen Aminosäuren mit der Konsensussequenz: [YX<sub>3</sub>LX<sub>3</sub>PX<sub>3</sub>(KQN)]. Interessanterweise scheinen PMP22 wie auch PMP34 von zwei unabhängigen Targeting-Signalen an das Peroxisom geleitet zu werden (Brosius et al., 2001, Jones et al., 2001).

#### 1.4.2.2 Peroxisomale Targeting-Signale von Membran-Proteinen der Gruppe 2 (mPTS2)

In einer zweiten Gruppe von peroxisomalen Targeting-Signalen von Transmembran-Proteinen (mPTS2) ist alle Targeting-Information in einem aus basischen Aminosäuren bestehenden Cluster lokalisiert, der in die peroxisomale Matrix hereinreicht. Außerdem benötigen diese Signale ein anschließendes Transmembransegment zur Verankerung. Vertreter dieser Gruppe sind das Pex3-, Pex17-, Pex22-, Pex13- Protein.

Das *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* Pex3-Protein wird durch die 40 NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren an das Peroxisom geführt (Wiemer et al., 1996, Baerends et al., 2000, Kammerer et al., 1998). Die humane Form von Pex3p weist in Analogie

zu dem Hefe-PMP47 und zu den Pex3-Proteinen der Hefen in den 16 NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren einen basischen Bereich auf, der für das Targeting wahrscheinlich verantwortlich ist. Folgende Konsensussequenz kann als Targeting-Signal abgeleitet werden (Kammerer et al., 1998): [(L/I/V)XR(X/K/R)XKX(L/I)]. Andere Vertreter der mPTS2 Signale sind die in den NH<sub>2</sub>-terminalen 56 Aminosäuren von *Pichia pastoris* Pex17p (Snyder et al., 1999a), den 25 Aminosäuren von *P. pastoris* Pex22p (Koller et al., 1999, Snyder et al., 2000) und in den Aminosäuren 145-233 des humanen Pex13-Proteins (Fransen et al., 2001) und seinem Hefe Ortholog (Snyder et al., 2000) gelegenen Targeting-Sequenzen.

#### 1.4.2.3 Peroxisomale Targeting-Signale ohne Zuordnung

Andere Targeting-Signale von Membran-Proteinen sind in der Literatur erwähnt, aber noch nicht näher charakterisiert und deshalb noch keiner der beiden obigen Gruppen zuzuordnen.

Dies beinhaltet die menschlichen Proteine Pex12p und Pex16p mit verschiedenen internen Targeting-Bereichen (Fransen et al., 2001) ebenso wie das humane PMP70 (Sacksteder et al., 2000). Dabei ist PMP70 der einzige peroxisomale ABC-Transporter für den ein Targeting-Signal während der Entstehung dieser Arbeit beschrieben wurde. Es werden bei PMP70 die NH<sub>2</sub>-terminalen 61 Aminosäuren benötigt und reichen aus um PMP70 an das Peroxisom zu führen (Sacksteder et al., 2000). Allerdings wird hier auch eine mitochondriale Lokalisation gesehen, die bei einem längeren Fragment der ersten 124 Aminosäuren nicht beobachtet werden kann.

#### 1.4.2.4 Pex19-Protein, ein möglicher mPTS-Rezeptor

Sacksteder et al. untersuchten umfassend die Bindung des humanen Pex19 mit verschiedenen peroxisomalen Membran-Proteinen, darunter auch ABC-Transportern. Das humane Pex19 bindet an eine Reihe von Peroxinen (Pex3, Pex10, Pex11 $\beta$ , Pex12, Pex13, Pex14) und an andere Transmembran-Proteine (PMP34, PMP70 und ALDR) (Sacksteder et al., 2000). Ob die Pex19-Bindungsregion in Pex13 für das peroxisomale Targeting von Pex13 notwendig und funktionell von Bedeutung ist wird kontrovers diskutiert (Fransen et al., 2004, Rottensteiner et al., 2004). Sacksteder et al. demonstrierten außerdem, dass

Pex11 $\alpha$ , Pex16, Pex22 und Pex 24 sowie ALDP durch ein Pex19 Konstrukt mit nukleärem Targeting-Signal in den Zellkern umgeleitet werden kann (Sacksteder et al., 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeitgleich die Interaktion des humanen Pex19p mit ALDP, ALDRp und PMP70 zeigen (Gloeckner et al., 2000). Dabei konnte mit Hilfe eigener Arbeiten gezeigt werden, dass die in ALDP interagierende Region (Aminosäuren 67-186) mit der für das Targeting notwendigen Region überlappt. So liegt die Hypothese nahe, dass Pex19p als Targeting-Rezeptor für mPTS Signale fungiert. Dies konnte im Falle von einigen peroxisomalen Membran-Proteinen bestätigt werden (Jones et al., 2004). Dass dies jedoch nicht für alle peroxisomalen Membran-Proteine gilt zeigen zwei Arbeiten: (i.) Humanes Pex19p agiert mit Pex3p und Pex12p an Stellen, die nicht für das Targeting benötigt werden (Fransen et al., 2001). Außerdem konnte in derselben Arbeit durch Mutationsanalysen für Pex13p und Pex16p gezeigt werden, dass zwar die Bindungsstelle für Pex19p und die Targeting-Region physikalisch überlappen, aber funktionell verschieden sind. (ii.) Auch das *Pichia pastoris* Pex19p bindet nicht in den für das Targeting verantwortlichen Regionen mehrerer Pex-Proteine (Pex3p, Pex10p, Pex13p, Pex22p) (Snyder et al., 2000). Lediglich bei Pex2p fiel die Interaktionsregion mit der für das Targeting verantwortlichen Region zusammen.

## 2 Fragestellung

Unter den humanen peroxisomalen ABC-Transportern verursachen Mutationen im Adrenoleukodystrophie-Gen die häufigste peroxisomale Stoffwechselerkrankungen, die X-gebundene Adrenoleukodystrophie (X-ALD). Die Auswirkungen dieser Mutationen auf Proteinebene sind noch weitgehend unverstanden. Als Voraussetzung für das genaue pathogenetische Verständnis der X-ALD war es Aufgabe dieser Arbeit, das bisher ungeklärte „Targeting-Motiv“ im Adrenoleukodystrophie-Protein zu identifizieren.

Spezifische Ziele dieser Dissertation waren:

1. Untersuchung der Möglichkeiten der Detektion von peroxisomalen ABC-Transportern mittels Tags und fluoreszierender Proteine ohne Beeinträchtigung des peroxisomalen Targetings.
2. Identifikation und Charakterisierung des Targeting-Signals des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) durch:
  - 2.1. Ausschluss von Proteinregionen, die für das Targeting keine Rolle spielen.
  - 2.2. Eingrenzung einer Targeting-Region mittels Fusionsproteinen.
  - 2.3. Untersuchung der evolutionären Konservierung der identifizierten Targeting-Region.
  - 2.4. Charakterisierung eines Targeting-Motivs innerhalb der identifizierten Proteinregion.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Organismen und Plasmide

In Tabelle 3.1 sind die Eigenschaften der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Bakterienstämme und in Tabelle 3.2 die benutzten eukaryontischen Zelllinien aufgelistet.

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> MC 1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>araABC-leu</i> )7679, <i><math>\Delta</math>lacX74</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	Meissner et al. 1987
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , <i><math>\Delta</math>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan 1983; Bethesda Research Laboratories 1986

**Tabelle 3.1.** Die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Bakterienstämme

Stamm	Zellart	Herkunft/Referenz
3T3	Immortalisierte Mausfibroblasten	National Institute of Health, USA
Cos7	Immortalisierte Affennierenzellen, Afrikanischer grüner Affe	Hofmann, Sodroski, Dana- Faber Cancer Institute, Harvard University

**Tabelle 3.2.** Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryontischen Zelllinien

Die DNA-Plasmide, die in dieser Arbeit für Klonierungen verwendet wurden, sind mit ihren Eigenschaften in Tabelle 3.3 aufgeführt. Besondere Beachtung fand dabei die bakterielle Resistenz, sowie das Selektionsagens für die Entwicklung stabiler Zelllinien in eukaryontischen Zellen. Entsprechende Vektorkarten sind für die am meisten verwendeten Plasmide im Anhang abgebildet (Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2, Seiten 80 und 81). Für diese Arbeit wurde der pcDNA3.1/*mycHis* (-) Version B Vektor benützt, der sich von der (+) Variante in der Orientierung der Multiple Cloning Site unterscheidet. Die verschiedenen Versionen A/B/C unterscheiden sich in dem Leseraster des darauf folgenden Tags. Von pcDNA3.1/*zeo* wurde die (+) Variante benützt. Jeder Vektor weist einen CMV Promotor auf, der für die eukaryontische Translation in das Protein zuständig ist. Für die prokaryontische Replikation besitzt der pEGFP-N1 Vektor eine pUCori Stelle, alle anderen Vektoren haben eine ColE1 Stelle.

Plasmid	Größe (kb)	Resistenz <i>E.coli</i>	Selektionsagens für Eukaryonten	Herkunft
pfastBac	4,8	Ampicillin	Gentamycin	GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein
pcDNA3	5,1	Ampicillin	Neomycin	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1/zeo(+)	5,0	Ampicillin/Zeo mycin	Zeomycin	Invitrogen
pcDNA3.1/ <i>myc</i> -His (-) Version B	5,5	Ampicillin	Neomycin	Invitrogen
pEGFP-N1	4,7	Kanamycin	Neomycin	Clontech, Heidelberg

**Tabelle 3.3.** Die verwendeten Plasmide mit der jeweiligen Größe in Kilobasen, sowie der bakteriellen Resistenz und dem Selektionsagens für eukaryontische Zellen.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten definierter Länge von einer Vorlage (=Template). Dazu muss zunächst der Template Doppelstrang bei einer Temperatur von 94°C getrennt werden (=Denaturierung). Danach werden am Anfang und am Ende des zu vervielfältigenden DNA-Stückes in vitro synthetisierte DNA-Einzelstränge (=Primer) von einer Länge von 18-50 Basenpaaren angelagert (=Annealing). Diese Primer definieren das zu amplifizierende Fragment, wobei der Forward Primer die Sequenz des kodierenden Stranges wiedergibt und der Reverse Primer die des dazu komplementären Stranges. Die Temperatur der Annealing Reaktion hängt von der Länge und der Zusammensetzung der Primer ab. Als Anhaltspunkt wurde die Annealing Temperatur errechnet nach der Formel: 4°C für jedes Guanosin (G) und Cytosin (C), 2°C für jedes Adenosin (A) und Thymin (T). Von der so errechneten Temperatur wurden jeweils 5-10°C abgezogen. Siehe Anhang Primerliste Tabelle 9.1, Seite 82 für die Expressions-Tag-Konstrukte und Primerliste Tabelle 9.2, S. 85 für die GFP Fusions-Konstrukte. Alle Primer wurden

von der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert. Im Falle der GFP-Fusionsproteine ist die Temperatur des Primer Teils, der spezifisch an das Template bindet, niedriger als die Annealing Temperatur des gesamten Primers. Um unspezifische Bindungen am Anfang der PCR-Reaktion zu vermeiden, wurden nach einigen Zyklen mit der erniedrigten Temperatur die überwiegende Anzahl der Zyklen mit der erhöhten Temperatur durchgeführt.

Im nächsten Schritt verlängert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase die Nukleinsäure Sequenz zwischen den Primern (=Elongation). Diese enzymatische Reaktion ist temperaturabhängig und wurde je nach Enzym zwischen 68-74°C (nach Herstellerangaben) durchgeführt. Es wurden insgesamt 20-30 Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation) durchgeführt.

Die Auswahl der verwendeten Polymerase richtete sich nach der Lesegenauigkeit („proof reading activity“). Die Lesegenauigkeit bezeichnet die Fehlerquote bei der Verlängerung von Nukleotidketten durch Polymerasen. Für einfache Test-PCRs wurde die Taq-DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) benutzt. Wenn es auf Lesegenauigkeit ankam, wurde die Expand High Fidelity (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim), die PWO Polymerase (Boehringer, Mannheim), die Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs, Hitchin Herts, UK) und die PFU Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Effizienz der einzelnen Polymerasen wurde experimentell ausgetestet.

Pro 50µl Ansatz wurden verwendet:

- xµl Polymerase (nach Herstellerangaben eingesetzt)
  - 5µl 10fach Enzympuffer (mitgeliefert)
  - 1µl Primer (10pmol)
  - 0,5µl dNTP's (Stocklösung 20mM)
  - 5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM Stocklösung) falls nicht im Puffer bereits vorhanden
- H<sub>2</sub>O bidest. ad 50µl

Bei der PCR zum Clonescreen (siehe Kapitel 3.2.8) wurde lediglich ein 20µl Ansatz benötigt und alle Volumina außer der des Primers entsprechend angeglichen. Die Primer wurden bei jeder PCR in gleichen Volumina eingesetzt.

### 3.2.2 Horizontale DNA-Elektrophorese im Agarosegel

#### Die verwendeten Puffer:

<b>TBE (Tris-Borat-EDTA) 10fach</b>	510g	Tris
	275g	Borsäure
	37,2g	EDTA

H<sub>2</sub>O bidest. ad 5000ml

Für die Elektrophorese 200ml 10fach Puffer mit H<sub>2</sub>O bidest. ad 2000ml auffüllen und mit 60µl Etidium Bromid (10mg/ml) versetzen.

<b>DNA loading Buffer 6fach</b>	6g	Ficoll
	18,1ml	TBE 10fach

Auf 30ml mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen und mit Bromthymolblau einfärben.

#### Prinzipien und Durchführung:

Die DNA wird im horizontalen Agarosegel gemäß ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei hängt die Konzentration des Gels von der Größe der aufzutrennenden Fragmente ab. In dieser Arbeit wurden bei Fragmenten über 1500bp 0,8%ige Gele, bei Fragmenten zwischen 600-1500bp 1%ige, bei Fragmenten zwischen 300-600bp 2,5%ige und bei Fragmenten <300bp 3%ige Gele verwendet. Die entsprechende Menge DNA-Agarose (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) bzw. für die 2,5-3%igen Gele Small DNA-Agarose (Biozym) wurde in 100ml TBE Puffer mit Ethidiumbromid Zusatz bei ca. 50-60°C vollständig aufgelöst und dann in eine horizontale Wanne von 10 cm Länge mit entsprechenden Kämmen gegossen. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur. Wenn DNA aus dem Gel extrahiert und gereinigt werden sollte, wurde bei Fragmenten ≥1000bp 0,8%iges, bei Fragmenten <1000bp 1,5%iges SeaKem® Agarosegel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) benutzt.

Die DNA-Proben wurden mit sechsfach Loading Buffer gemischt und bei DNA-Präparationen aus dem Gel ein Volumen bis zu 40µl, ansonsten 10µl in die Geltaschen aufgetragen. Es wurde zudem ein geeigneter Marker (1 kb Ladder; Invitrogen, Karlsruhe bzw. Marker V; Boehringer, Mannheim) mit aufgetragen. Die Fragmente wurden bei 100V (10V/cm Laufstrecke) und 80-120mA aufgetrennt und danach unter UV-Licht photographiert. Durch den Farbstoff Etidiumbromid,



das zwischen den Basensprossen der DNA-Helix interkaliert und bei UV-Anregung leuchtet, kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 3.2.3 Reinigung von PCR-Fragmenten

DNA-Fragmente aus der PCR wurden direkt mittels des Qiaquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) gereinigt, wenn lediglich die Primer und Puffer entfernt werden sollten. Wenn eine spezifische Bande von unspezifischen Produkten oder vom Template bei starkem Template-Überschuss gereinigt werden sollte, wurde zuerst eine Auftrennung auf einem präparativen SeaKem® Agarosegel durchgeführt und dann eine Reinigung der mit einem Skalpell herausgetrennten Banden mittels QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN) angeschlossen.

Beide Methoden basieren auf der Adsorption von DNA an speziellen Silikatmembranen bei hoher Salzkonzentration, die Größe der adsorbierten Fragmente ist dabei pufferabhängig. Bei dem QIAquick™ PCR Purification Kit werden DNA-Fragmente der Größen 100bp bis 10kb gebunden, bei dem QIAquick™ Gel Extraction Kit 70bp bis 10kb. Bei dem letzteren wurden zunächst nach elektrophoretischer Auftrennung die entsprechenden Bande unter UV-Licht ausgeschnitten, dann nach dem Herstellerprotokoll mit einem Puffer die Agarose aufgelöst. Die Fragmente wurden an die Silikatmembran mit dem vom Hersteller gelieferten Puffer gebunden, die Membran mit entsprechendem Puffer gewaschen und die DNA mit H<sub>2</sub>O bidest. von der Säule eluiert. Das Eluatvolumen betrug jeweils 50µl.

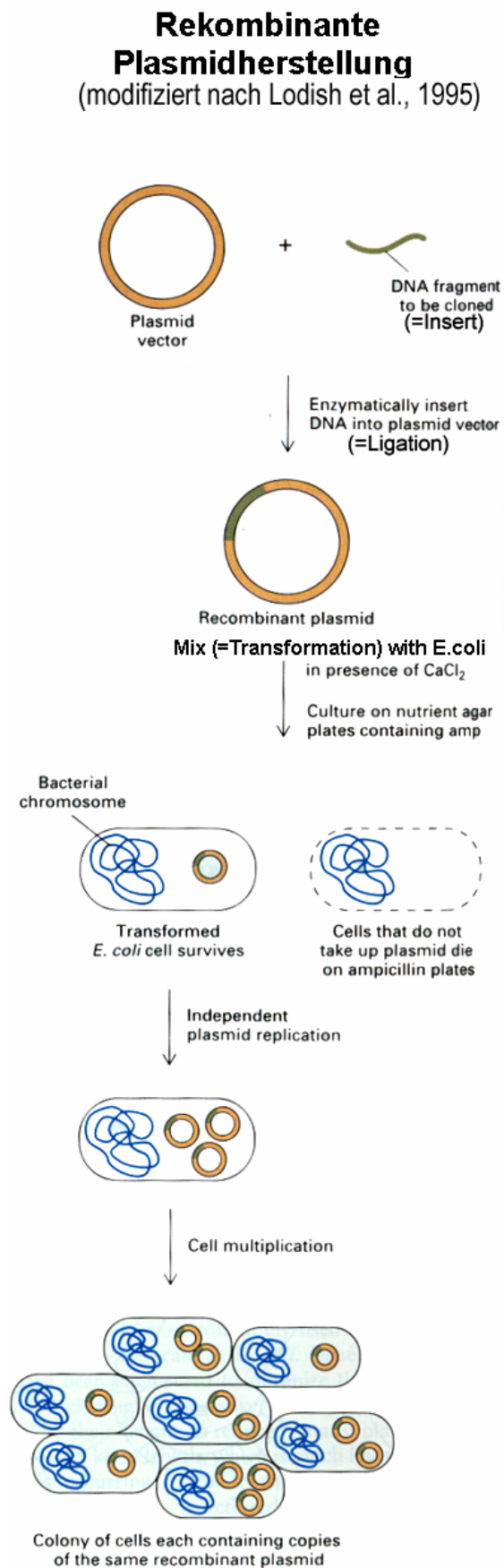
### 3.2.4 Modifikation von DNA

Das Prinzip der rekombinanten Plasmidherstellung (=Klonierung) ist in nebenstehender Abbildung schematisch erläutert (modifiziert nach (Lodish et al., 1995). Dabei wird zunächst ein DNA-Fragment durch eine enzymatische Reaktion in einen durch Restriktionsenzyme vorher geschnittenen Vektor inseriert (=Ligation) und das so gewonnene rekombinante Plasmid in *E. coli* Zellen gebracht (=Transformation). Da das rekombinante Plasmid zusätzlich zu einem prokaryontischen Promotor ein Resistenz-Gen enthält, sterben Bakterien, die das Plasmid nicht enthalten, auf einem Selektivagar, während die durch das Plasmid resistenten Bakterien das Plasmid durch den eingebrachten Promotor vervielfältigen.

#### 3.2.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Aus Prokaryonten stammende Restriktionsendonukleasen besitzen eine hohe Spezifität in der Erkennung von meist hexa- oder oktameren Sequenzen in einem DNA-Strang. Nach Bindung an die Erkennungssequenz wird die

Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen an definierter Stelle hydrolysiert.



Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Restriktionsenzyme der Firmen BOEHRINGER Mannheim, Gibco BRL und Pharmacia-Amersham Biosciences Europe (Freiburg) verwendet.

Sowohl die zu klonierenden DNA-Fragmente (=Insert) als auch die Plasmidvektoren, in die das Insert ligiert werden sollte, wurden mit zwei gleichen Restriktionsendonukleasen gespalten, damit im nächsten Schritt das Insert in den Vektor ligiert werden konnte.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

DNA (Plasmidvektoren oder gereinigtes PCR-Produkt)	5-10 µg
10 fach Reaktionspuffer	3 µl
Restriktionsendonukleasen	0,25-1 Unit
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 30µl Gesamtvolumen

Bestimmte Restriktionsendonukleasen erfordern noch einen Zusatz von Albumin, gewonnen aus Rinderserum (3 µl). Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde in einem bewegten 37°C Wasserbad inkubiert mit der Ausnahme von Reaktionen an der die Restriktionsendonuklease *Sma*I beteiligt war, da diese ihr Reaktionsoptimum bei Raumtemperatur (25°C) besitzt. Bei wechselnden Gesamtvolumina zwischen 20-60µl wurde der Ansatz entsprechend angeglichen.

Nach Verdau von leeren Plasmid-Vektoren wurden die überhängenden Phosphorgruppen mit alkalischer Phosphatase abgespalten, um ein spontanes Religieren zu verhindern. Dazu wurde die Reaktion mit 0,5 µl alkalischer Phosphatase des Kalbes (Calf intestinal phosphatase, 10Units/µl; Amersham Biosciences Europe, Freiburg) eine halbe Stunde bei 37°C versetzt.

Nach den enzymatischen Verdauungsprozessen wurde die DNA mittels QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) gereinigt.

#### 3.2.4.2 Ligation

Das Enzym Ligase katalysiert die ATP-abhängige Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen den freien 3'-Hydroxylgruppen eines Nukleinsäure-Moleküls und der 5'-Phosphatgruppe eines anderen Nukleinsäure-Fragments. Zur Vorbereitung der Ligation wurden zunächst die relativen Konzentrationen von Insert und Vektor auf einem Agarose Gel abgeschätzt. Dabei wurden die aufgetragenen Mengen so gewählt, dass bei gleicher Konzentration die gleiche

Signalintensität auf dem Gel zu erwarten ist. Die Signalintensität ist dabei nicht nur von der DNA-Konzentration, sondern auch von der Länge der DNA abhängig, da bei längeren DNA-Fragmenten mehr Ethidiumbromid zwischen den Basen eingelagert werden kann. Um dies auszugleichen, muss das Basenverhältnis Insert/Vektor gebildet werden und dieser der Vektor entsprechend des Quotienten eingesetzt werden. Ein Beispiel:  $\text{Insert/Vektor} = 2000 \text{ bp}/4000 \text{ bp} = \frac{1}{2}$ . Bei einem aufgetragenen Insertvolumen von  $10 \mu\text{l}$  muss  $\frac{1}{2} \times 10 \mu\text{l} = 5 \mu\text{l}$  des Vektors aufgetragen werden, wenn bei gleicher Konzentration gleiche Signalintensität erreicht werden soll.

Allgemeiner Reaktionsansatz zur Ligation:

$x$ =Volumen an Vektor entsprechend  $0,2-0,6 \mu\text{g}$ ;  $y$ =Volumen an Insert entsprechend der 5-fachen Menge des eingesetzten Vektors.

Plasmidvektor	$x \mu\text{l}$
Insert	$y \mu\text{l}$
T <sub>4</sub> DNA-Ligase (Fa. Promega, Madison, Wi, USA)	$1 \mu\text{l}$
T <sub>4</sub> DNA-Ligase 10fach Puffer	$1 \mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad $10 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen

Für eine optimale Ligationseffizienz wurden  $0,2-0,6 \mu\text{g}$  Vektor eingesetzt, da Mengen über  $1 \mu\text{g}$  die Ligase inhibieren. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis pipettiert, und 18 Stunden in einem bewegten  $15^\circ\text{C}$  Wasserbad inkubiert.

### 3.2.5 Transformation von kompetenten *E.coli* Stämmen (MC1061 und DH5 $\alpha$ )

#### 3.2.5.1 Die verwendeten Medien und Puffer

Die Sterilisation aller verwendeter Medien erfolgt bei  $121^\circ\text{C}$  und 1 bar für 30 min im Autoklaven. Für Festmedien wird ein Zusatz von 15 g Agar pro Liter Medium verwendet. Der Zusatz von sterilfiltrierten Hemmstoffen erfolgt nach der Sterilisation der Medien. Dabei muss auf eine genügende Abkühlung der Medien (auf ca.  $50^\circ\text{C}$ ) geachtet werden. Für Selektivmedien wurden jeweils  $100\text{mg/l}$  Ampicillin oder  $50\text{mg/l}$  Kanamycin zugesetzt.

<b>LB (Luria- Bertani) Medium</b>	Trypton	10 g/l	
	Hefe Extrakt	5 g/l	
	NaCl	10 g/l	
	Auffüllen auf das Endvolumen mit H <sub>2</sub> O bidest., pH adjustieren auf pH=7,0 mit 5N NaOH		
<b>SOC Medium</b>	Trypton	20 g/l	
	Hefe Extrakt	5 g/l	
	NaCl	0,5 g/l	
	KCl 250mM Lösung	10 ml/l	
	Auffüllen auf das Endvolumen mit H <sub>2</sub> O bidest., pH adjustieren auf pH=7,0 mit 5N NaOH, autoklavieren und abkühlen auf ca. 50°C, Zusatz von 1M Glukose Lösung (20ml/l).		
<b>SOB Medium</b>	Zu 950 ml deionisiertem H <sub>2</sub> O:		
	Trypton	20 g	
	Hefe Extrakt	5 g	
	NaCl	0,5 g	
	Mischen bis zu vollständigen Auflösung		
	250 mM Lösung KCl	10 ml	
	pH einstellen auf 7,0 mit 5 N NaOH, auf 1 Liter auffüllen mit H <sub>2</sub> O deion., autoklavieren, vor Gebrauch 5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> Lösung (19g MgCl <sub>2</sub> ad 100 ml H <sub>2</sub> O deion.) zufügen		
	<b>TFB1:</b>	K-Acetat	0,295 g
		MnCl * 4 H <sub>2</sub> O	0,99 g
		RbCl	1,21 g
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O		0,15 g	
Glycerin		15 ml	
pH auf 5,8 einstellen mit HCl, ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest., abschließend steril filtrieren.			

<b>TFB2:</b>	MOPS	0,21 g
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,103 g
	RbCl <sub>2</sub>	0,121 g
	Glycerin	15 ml
	pH mit NaOH auf 7 einstellen	
	ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest.	
	Abschließend steril filtrieren	

### 3.2.5.2 Prinzipien und Durchführung der Transformation

Die Transformation von Plasmiden in Bakterien dient zur Vervielfältigung der Plasmide, die dann in großer Menge, Konzentration und Reinheit isoliert werden können.

Die Plasmidvektoren wurden in dieser Arbeit mittels der CaCl<sub>2</sub>- Methode in *E.coli* aufgenommen. Dazu müssen zuerst die Bakterienzellen durchlässig gemacht werden (=kompetente Zellen) bevor sie die DNA aufnehmen können (=Transformation). Die so transformierten Zellen werden dann auf einer Selektiv-Agarplatte angezüchtet.

In dieser Arbeit fanden zwei Arten von kompetenten Zellen Anwendung: transiente kompetente und stabile kompetente Zellen.

Transiente kompetente Zellen wurden wie folgt hergestellt:

1. eine Kultur von *E.coli* Stämmen (MC1061 oder DH5 $\alpha$ ) wird 1:50 in LB Medium verdünnt und in einem Wärmerüttler bei 37°C 3 Stunden inkubiert. In dieser Arbeit wurden jeweils 500  $\mu$ l Kultur mit 25 ml LB Medium versetzt. Zur Abschätzung der Bakteriendichte wird eine Quecksilber- Extinktionsmessung bei 578 nm durchgeführt und die Kultur so lange weiter inkubiert bis eine Dichte von  $E_{578}=0,5$  bis 0,6 erreicht wird.
2. Die so gewonnen Bakterienzellen wird bei 1700xg (=3000 U/min) für 15 min bei 4°C zentrifugiert.
3. Das Pellet wird mit 2 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>- Lösung resuspendiert und auf 100 ml Endvolumen mit eiskalter 100mM CaCl<sub>2</sub>- Lösung aufgefüllt
4. Zentrifugation bei 1700xg für 15 min bei 4°C.

5. Das Pellet wird in 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgelöst und auf Eis gestellt.

Die so kompetent gemachten Zellen sind bei 4°C 24-48 Stunden verwendbar.

Um die *E.coli* MC1061 Zellen stabil kompetent zu machen, wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Die Starterkultur wird in 1,5 ml SOB Medium, bei 37°C über Nacht initiiert.
2. Ein 500 µl Aliquot wird mit 100 ml SOB Medium versetzt.
3. Die Kultur wird bei 37°C 2-3 Stunden im Wärmerüttler bis zu einer Dichte  $E_{578}=0,4-0,6$  inkubiert (alle 20 min Dichte messen).
4. Die Kultur wird auf 50 ml Falconröhrchen verteilt und 15 min auf Eis abgekühlt.
5. Die Zellen werden 10 min bei 1700xg und 4°C pelletiert.
6. Das Pellet wird in 15 ml TFB1 Medium resuspendiert und
7. 10 min bei 1700xg, 4°C zentrifugiert.
8. Das Pellet wird in 4 ml TFB2 Medium aufgelöst und
9. 15 min auf Eis gekühlt. Inzwischen werden 1,5 ml-Röhrchen in einem Trockeneis-Bad mit vergelltem Ethanol vorgekühlt.
10. 100 µl der Zellsuspension werden in die vorgekühlten Röhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Die so stabilen kompetenten Zellen sind unbegrenzt bei -80°C haltbar und werden vor der Transformation schonend auf Eis aufgetaut.

Für die Transformation werden

1. 5-10µl des Ligationsgemisches (zur Herstellung siehe S. 29) mit 100µl kompetenten Zellen auf Eis gemischt und 30 min auf Eis inkubiert.
2. Um die Plasmid-Aufnahme zu aktivieren, werden die Zellen in einem 42°C Wasserbad für 1 min geschockt,
3. 2 min auf Eis wieder abgekühlt und mit 200µl LB- Medium versetzt. Alternativ fand zur erhöhten Ausbeute anstatt LB Medium auch SOC Medium Anwendung.
4. Das Resistenzgen zur Selektion der transformierten Bakterien wird ½ bis 1h in einem 37°C bewegtem Wasserbad exprimiert.

- Die Bakterien werden auf einer selektiven Agarplatte ausplattiert und über Nacht in einem 37°C Brutschrank bebrütet. Die Selektivität richtet sich dabei nach dem Resistenzgen des transformierten Vektors.

### 3.2.6 Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* Zellen

Die verwendeten Puffer:

<b>TE- Puffer</b>	1M Tris	5 ml
	0,5M EDTA	1 ml
	H <sub>2</sub> O bidest. ad 500ml	
	pH auf 8,0 einstellen mit HCl	

#### Prinzipien und Durchführung:

Nach der Vervielfältigung der in Bakterien transformierten Plasmidvektoren durch die prokaryontische Replikationsmaschinerie wurden die Plasmide durch ein Adsorptionsverfahren an Silikat-Membranen mittels des QIAprep® Kits bei hohen Salzkonzentrationen isoliert. Die so gebundene DNA (bis zu 20µg) wird von der Membran mit H<sub>2</sub>O nach Entfernung der Salze mit den entsprechenden Puffern (QIAGEN®, Hilden) eluiert. Für größere Mengen an Plasmiden wurden diese aus den Bakterienzellen mittels Bindung der DNA an eine QIAGEN® Anionen-Austauschsäule bei niedriger Salzkonzentration und pH Bedingungen gewonnen. Die Eluation der gebundenen DNA erfolgt dann bei hoher Salzkonzentration und erfordert danach eine Präzipitation der Plasmid-DNA durch Isopropanol. Mit dem QIAGEN® bzw. dem QIAfilter® Plasmid Purification Midi-Kit können bis zu 100 µg, mit dem QIAGEN® bzw. QIAfilter® Plasmid Purification Maxi-Kit bis zu 500 µg DNA isoliert werden.

Für die oben beschriebene Plasmid Isolierung wurden Kulturen der positiven Klone angelegt. Dafür wurden für die Minipräparationen jeweils 5-7 ml selektives LB-Medium (Ampicillin bzw. Kanamycin enthaltend) mit den in Wasser suspendierten Klonen beimpft, für die Midi- und Maxipräparationen wurden 50 ml bzw. 100 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektivstoffen mit 1 ml einer Vorkultur beimpft. Alle Kulturen wurden über Nacht bei 37°C im Wärmerüttler bebrütet. Ein Glycerinstock der positiven Zellklone wurde angelegt, indem 1 ml Kultur mit 250µl 85%-igem Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert wurde.



Die Eluation bei den Minipreps erfolgte in 50 µl H<sub>2</sub>O bidest., während die DNA bei den Midi- bzw. Maxipräparationen mit 3,5 ml bzw. 10,5 ml Isopropanol ausgefällt wurde. Das Präzipitat wurde bei 17600 x g (=15000 U/min mit einem Beckmann JA20-Rotor) bei 4°C für 30 min in einer Beckmann High Speed Zentrifuge pelletiert, das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. 70%-iger Ethanol wurde benutzt um Isopropanol zu verdrängen, da Ethanol leichter verdunstet als Isopropanol. Das Präzipitat wurde in einer Tischzentrifuge bei 12000 U/min 3min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 2 min Dauer und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet bei 60°C für 15 min getrocknet um Ethanolreste vollständig zu entfernen. Anschließend wurde es je nach Präzipitat-Größe in 70-200 µl TE Puffer aufgenommen.

Die DNA-Konzentration wurde nur bei den Midi- und Maxipräparationen photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktion von 1,0 einer Nukleotidsäurekonzentration von 50 µg/ml, bei Einzelstrang-DNA 33 µg/ml und bei Einzelstrang RNA 40 µg/ml. Die zu messende DNA-Lösung wurde 1:100 in Wasser verdünnt und deren Extinktion gegen Wasser gemessen.

### **3.2.7 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode**

Es existieren zwei verschiedene DNA-Sequenzierungsmethoden nach der Kettenabbruchmethode (modifiziert nach Sanger et al., 1977): die radioaktive Form und die nicht-radioaktive Form. Bei beiden wird mit einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer neben Desoxynukleotiden (dNTP's) auch Didesoxynukleotide (ddNTP's) in den neu synthetisierten Strang eingebaut. Durch die fehlende 3'-OH Gruppe des ddNTP's kann der Strang nicht verlängert werden und bricht ab. Dabei muss die Konzentration der ddNTP's hoch genug gewählt werden, dass an jeder Stelle der zu sequenzierenden DNA genügend Kettenabbrüche stattfinden. Die so entstandenen Fragmente haben unterschiedliche Längen und werden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Um das Ende eines jeden Fragmentes basenspezifisch sichtbar zu machen, muss entweder der Primer oder das ddNTP-Nukleotid markiert sein.

In dieser Arbeit wurden mit Rhodamin-Farbstoffen markierte ddNTP's (Rhodamin dye terminator Kit; Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet, wobei jede Base mit einer unterschiedlichen Farbe markiert ist. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Einfachheit und Schnelligkeit der Handhabung, da ein Reaktionsansatz für alle vier Basen genügt. Es wurden entweder Insert-spezifische oder Vektor-spezifische Primer benutzt, die ca. 40bp vor der zu sequenzierenden Stelle liegen. Mit dieser Methode ist eine Länge von 500- 600bp in guter Qualität zu sequenzieren.

Sequenzieransatz:

Gereinigte Plasmid DNA	0,5-2 µl (0,5-2 µg)
Primer (10µM)	1 µl
Ready Reaction Mix	2 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 5 µl

Sequenzierungsprogramm:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklenanzahl
Denaturierung	94	15	25 x
Annealing	53	15	
Elongation	60	240	

Die DNA wird zur Reinigung mit 0,1-fachem Volumen 3M Na-O-Acetat (pH=5,2) und 2,5-fachem Volumen 98%-igem Ethanol in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min gefällt, das Pellet vorsichtig mit 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und durch eine achtminütige Zentrifugation auf den Boden eines Eppendorfgefäßes präzipitiert. Im Wärmeschrank wird das Präzipitat nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes 30 min bei 60°C getrocknet.

Die Proben wurden auf einem 377 Sequenzer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Sequence Analysis“ (Applied Biosystems/Perkin Elmer).

### 3.2.8 Identifikation von positiven Bakterienklonen

Einzelne Bakterienklone wurden von Agarplatten mit einer Pipette aufgenommen und jeweils separat in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest. suspendiert. Um zu prüfen, ob in dem transformierten Vektor wirklich das gewünschte Insert vorhanden ist, wurden zwei Methoden herangezogen: der PCR-Screen und der Restriktionsenzymverdau.

#### 3.2.8.1 Der PCR- Screen für das Überprüfen von Klonen

Für den PCR-Screen wurden jeweils ein Vektorprimer und (falls vorhanden) ein Insert spezifischer Primer benutzt. Als Template diente 1  $\mu\text{l}$  aus der Lösung mit dem suspendierten Klon.

Vorgehensweise:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]	Zyklusanzahl
Vordenaturierung	94	600	1x
Denaturierung	94	40-60	25x
Annealing	55	40-60	
Elongation	72	40-60	
Abschließende Elongation	72	300	1x

Das PCR-Produkt wurde auf ein der Größe entsprechendes Agarosegel aufgetragen und das Vorhandensein sowie die korrekte Länge bestimmt. Die Rate der positiven Klone (Insert vorhanden) lag bei ca. 90%.

#### 3.2.8.2 Der Restriktionsenzymverdau für das Überprüfen von Klonen

Für den Verdau mit Restriktionsendonukleasen wird ein gereinigtes Plasmid benötigt. Es wurden jeweils 20 $\mu\text{l}$  Gesamtvolumina angesetzt:

5  $\mu\text{l}$  gereinigtes Plasmid

0,5  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonuklease 1

0,5  $\mu\text{l}$  Restriktionsendonuklease 2

2  $\mu\text{l}$  10fach Puffer (je nach Restriktionsenzym)

12  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Dabei wurden als Restriktionsendonukleasen 1 und 2 jeweils Enzyme gewählt, von denen eine nur einmal an einer bestimmten Stelle im Insert, die andere ebenfalls nur einmal im Vektor schneidet. So kann nach anschließender Agarose-

Gelelektrophorese nicht nur das Vorhandensein, sondern auch die Richtung des Inserts durch die Länge bestimmt werden.

### 3.2.9 Konstruktplanung: Untersuchung des peroxisomalen Targetings

#### 3.2.9.1 Expressions-Tags

Die Generierung von spezifischen und sensitiven Antikörpern gegen peroxisomale Membran-Proteine ist schwierig, kostspielig und zeitaufwendig. Deshalb werden in der Forschung sogenannte Expressions-Tags benutzt. Expressions-Tags sind kleine Polypeptidsequenzen, die auf DNA-Ebene an zu untersuchende Proteine COOH-terminal oder NH<sub>3</sub>-terminal gehängt werden und gegen die es monoklonale sensitive Antikörper zu erwerben gibt. Somit ist ein Nachweis von Proteinen auch ohne die Generierung von Protein-spezifischen Antikörpern möglich.

Zuerst wurde untersucht, ob Expressions-Tags das peroxisomale Targeting von humanen peroxisomalen ABC-Transportern stören. Dazu wurden Konstrukte der drei bis dahin bekannten humanen peroxisomalen ABC-Transporter (ALDP, ALDRp und PMP70) mit drei verschiedenen Tags (*myc-Tag*, (His)<sub>6</sub>-Tag und Hämagglutinin (HA)-Tag) auf DNA-Ebene kloniert, so dass die Expressions-Tags COOH-terminal der ABC-Transporter exprimiert wurden. Diese markierten Konstrukte wurden in Zellkulturen transfiziert und deren subzelluläre Lage konsekutiv mit Immunfluoreszenz analysiert. Abbildung 3.1 gibt eine Übersicht der verwendeten Expressions-Tags.

<u>HA Tag:</u>										
5'-	TAC	CCA	TAC	GAC	GTC	CCA	GAC	TAC	GCT	-3'
H <sub>3</sub> N-	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	-COOH
<u>Myc Tag:</u>										
5'-	GAA	CAA	AAA	CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG -3'
H <sub>3</sub> N-	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu -COOH
<u>(HIS)<sub>6</sub>- Tag:</u>										
5'-	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	-3'			
H <sub>3</sub> N-	His	His	His	His	His	His	-COOH			

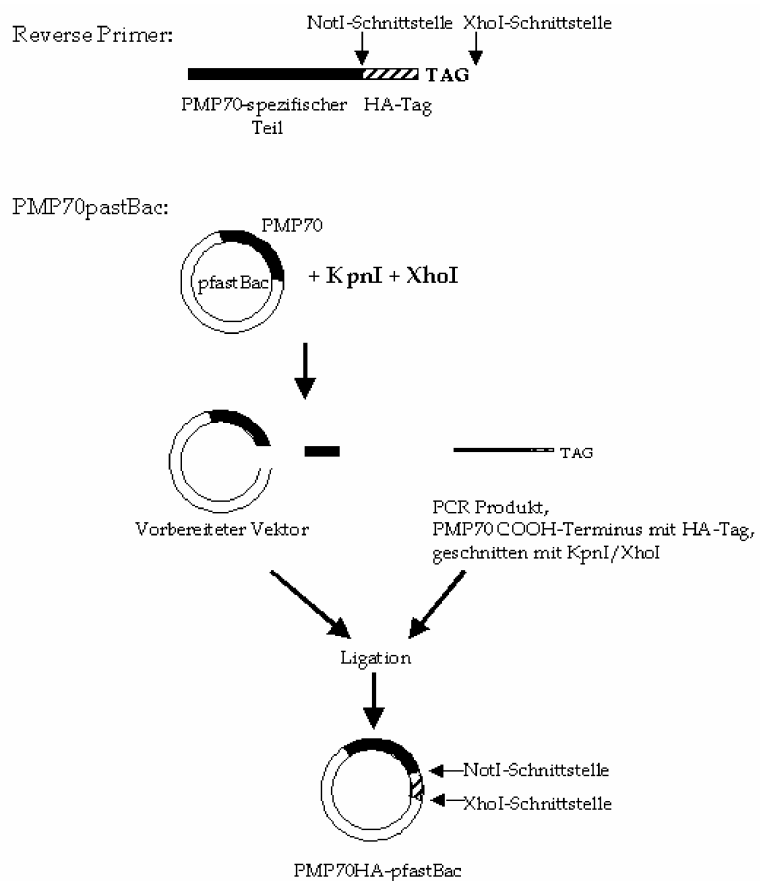
**Abbildung 3.1.** Die verwendeten Expressions-Tags. Kodierende DNA- und Aminosäuresequenzen im drei-Buchstaben Code.

Für die Generierung von Konstrukten mit kombiniertem *myc*- und His-Tag stand der pcDNA3.1/*mycHis*-Vektor zur Verfügung, der den „Tag“ bereits angrenzend an die „Multiple Cloning Site“ beinhaltet, so dass lediglich die Stop-Codons des zu klonierenden Inserts mit spezifischen Primern weggenommen und das Insert dann mit Restriktionsenzymverdau in die vorbereiteten Vektoren kloniert werden musste. Bei dieser Gelegenheit wurde mit dem gleichen Primer eine zusätzliche Schnittstelle eingeführt, um das PCR-Produkt in den vorbereiteten Vektor zu ligieren.

Für Konstrukte mit His-Tag wurde ein Reverse Primer verwendet, der die cDNA Sequenz für das (His)<sub>6</sub>-Epitope, gefolgt von einem Stop-Codon und einer zusätzliche Restriktionsenzym-Schnittstelle beinhaltet. Die Anheftung des „Tags“ wurden im *pfastBac*-Vektor durchgeführt mit anschließender Umklonierung in *pcDNA3*-Vektor, der dann für die Transfektion von eukaryontischen Zellen zur Verfügung stand.

Für die HA-Tags wurden ebenfalls spezifische Reverse Primer generiert. Das PMP70-HA Konstrukt wurde mit einem spezifischen Primer folgendermaßen hergestellt (siehe Skizze):

Der Reverse Primer enthielt einen PMP70 spezifischen Teil, eine eingefügte *NotI*-Schnittstelle, die HA-cDNA, ein Stop-Codon (TAG) gefolgt von einer *XhoI*-Schnittstelle. Der vorliegende PMP70-*pfastBac* Vektor wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten. In gleicher Weise wurde mit dem PCR-Produkt verfahren



und dann das geschnittene PCR-Produkt in den geschnittenen PMP70-*pfastBac*-

Vektor kloniert. Das Ergebnis: PMP70 mit angehängter NotI-Schnittstelle und HA-Tag im pfastBac-Vektor. Das Insert wurde dann in pcDNA3 umkloniert. Für das ALD-HA Konstrukt musste nun lediglich das PMP70-Insert vor dem HA-Tag mit NotI aus pcDNA3 herausgeschnitten werden und das ALD-Insert ohne Stop-Codon eingefügt werden.

Das von unserer Gruppe neu identifizierte PMP69 (syn.: PXMP1-L, ABCD4) (Holzinger et al., 1997b, Holzinger et al., 1998a) wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit einem HA-Tag durch einen spezifischen Primer versehen. So konnte seine subzelluläre Verteilung in der Immunfluoreszenz identifiziert werden.

Die Primer sind in Tabelle 9.2 (Anhang Seite 85), die Vektoren in Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2 (Anhang Seite 80 bzw. 81) sowie Tabelle 3.3 (Seite 23) aufgeführt. Die Konstrukte mit den klonierten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 9.3 (Anhang Seite 86) aufgelistet.

#### 3.2.9.2 ALDP-Deletionskonstrukte

Zur Eingrenzung der Targeting-Region des Adrenoleukodystrophie-Proteins wurden zunächst interne Start-Codons der ALD-cDNA benutzt, um NH<sub>2</sub>-terminale Deletionskonstrukte herzustellen. Dazu wurden die entsprechenden Teile der cDNA mit PCR amplifiziert und in der beschriebenen Weise in den pcDNA3 Vektor kloniert. So wurden die Konstrukte  $\Delta 66$  ALDP,  $\Delta 185$  ALDP und  $\Delta 281$  ALDP hergestellt.

#### 3.2.9.3 GFP-Fusionsproteine

Zur weiteren Eingrenzung der für das Targeting verantwortlichen Region im ALDP wurden verschiedene Teile der ALD-cDNA mit PCR amplifiziert, dabei zusätzliche Schnittstellen eingefügt und im Leserahmen in den vorbereiteten pEGFPN1-Vektor (Clontech, Heidelberg) mit HindIII/EcoRI kloniert. So wird ein ALDP-GFP Fusionsprotein mit GFP am COOH-terminalem Ende der ALDP Fragmente kodiert. Neben verschiedenen ALDP-GFP Fusionsproteinen wurden die zu 67-164 ALDP-GFP homologen Bereiche der anderen drei humanen peroxisomalen ABC-Transporter in gleicher Weise kloniert und mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der homologe Teil des Hefe-Orthologs *Saccharomyces cerevisiae* Pxa1 wurde mit den Restriktionsenzym-schnittstellen XhoI/EcoRI in den vorbereiteten pEGFPN1-Vektor kloniert.

#### 3.2.9.4 Mutagenese des Targeting-Motivs

Der Aminosäurenaustausch innerhalb des untersuchten Targeting-Motivs wurde mittels spezifischen PCR-Primern durchgeführt. Dabei beinhalteten die Primer jeweils entweder eine definierte Base oder ein variables Element (N). So konnten an spezifischen Stellen der cDNA Basen ausgetauscht werden. Für diese Studie wurde dabei immer das 67-164 ALDP-GFP Konstrukt mit Mutationen verändert. Dieses Konstrukt wurde gewählt, da dieses Konstrukt ein starkes peroxisomales Signal zeigte und deshalb mikroskopisch gut nachweisbar war. Es wurden an definierten Positionen des ALDP Aminosäuren folgendermaßen verändert: (i) Konservierter Aminosäurenaustausch, d.h. Seitenketten der Aminosäuren haben ähnliche Polarität und ähnliche Säure- bzw. Baseneigenschaften an Position F71V, L78P, L78I, L81V; (ii) Nicht konservierter Aminosäurenaustausch, d.h. Seitenketten haben verschiedene Polarität und Säure- bzw. Baseneigenschaften an Position R74W, R74G, P84A.

Während des Fortganges dieser Dissertationsarbeit wurde eine neue Mutation beschrieben, die innerhalb des möglichen Targeting-Motivs liegt (Wichers et al., 1999). Diese Mutationen wurden bei zwei Patienten identifiziert, die an Adrenomyeloneuropathie (AMN), einer milden Form der X-gebundenen ALD, erkrankten. Dabei handelt es sich um eine in-frame Deletion ihrer DNA resultierend in einer Deletion von drei Aminosäuren auf Proteinebene ( $\Delta$ LLR, Aminosäuren 78-80). Um den Einfluss dieser Deletion auf das Protein-Targeting zu untersuchen, wurde die entsprechende Region der Patienten DNA mit spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert und in einen entsprechend vorbereiteten pEGFPN1-Vektor kloniert. Das daraus resultierende DNA-Konstrukt wurde in Cos7-Zellkulturen transfiziert und das Fusionsprotein (67-164 ALDP-delLLR-GFP) mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

### 3.3 Zelltransfektion

Die Konstrukte (Plasmidvektor mit Insert) wurden von einer Lipidhülle umgeben in eukaryontische Zellen gebracht (=Transfektion). Dabei wurden alle Konstrukte transient transfiziert, ALDpcDNA3 und ALDHispcDNA3 wurden zusätzlich noch stabil transfiziert, so dass stabile Zelllinien entstanden.

#### 3.3.1 Transiente Zelltransfektion

##### Verwendete Puffer und Reagenzien:

Dulbecco's modifiziertes Minimal Eagle's Medium (DMEM) (GibcoBRL/Life Technologies, Eggenstein)

Fetal Calf Serum (FCS) (PromoCell GmbH, Heidelberg)

Antibakterieller Zusatz von Penicillin/Streptomycin 10000U/500ml DMEM

##### Prinzipien und Durchführung:

Für die meisten Transfektionen wurden Affen-Nierenzellen der Linie Cos7 verwendet. Bei den Deletionskonstrukten wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kreuzreaktion im Western Blot nach SDS-Page zwischen dem Maus-anti-humanes ALD 1D6-Antikörper (Euromedex, Souffelweyersheim, Frankreich) und dem Affen-ALDP beobachtet. Um solch eine Reaktion bei der Interpretation der Daten auszuschließen, wurden deshalb bei diesen Konstrukten Maus-Fibroblasten vom Typ „NIH 3T3“ verwendet. Die von der Firma Lifetechnologies vorgegebenen Protokolle wurden befolgt ([www.lifetech.com](http://www.lifetech.com)):

1. Die Zellen wurden auf einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche konfluierend gezüchtet. Danach wurden die Zellen auf Glasobjektträgern in einer „Six-well“-Zellkulturschale verteilt. Die Zellen wurden dann 18 Stunden mit 2 ml DMEM bei 37°C in 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde mit einem Durchlichtmikroskop ihre Konfluenz geprüft, die zwischen 70- 80% liegen sollte.
2. Es wurden folgende Lösungen hergestellt (Mengenangaben pro well):

Für die Transfektion von Cos7-Zellen:

Lösung A: 2µg Plasmid-DNA in 375µl Serum freies DMEM

Lösung B: 6µl Lipofectamin Reagenz (Lifetechnologies) in 375 µl Serum freies DMEM



Für die Transfektion von NIH 3T3 Zellen:

Lösung A: 2 µg Plasmid-DNA in 100µl Serum freies DMEM

Lösung B: 6µl Lipofectamin in 100µl Serum freies DMEM

3. Lösung A und B wurden jeweils gemischt und 30 min bei Raumtemperatur zur Bildung von DNA-Lipidkomplexen inkubiert.
4. Die auf dem Objektträger herangewachsenen Zellen wurden mit 2 ml Serum-freiem DMEM pro well gewaschen.
5. Für jede Transfektion wurde für Cos7-Zellen 750µl, für NIH 3T3-Zellen 800µl Serum-freies DMEM den Lösungen mit den DNA-Lipidkomplexen zugefügt, gemischt und die Zellen vorsichtig damit überlagert (Start der Transfektion). Die Zellen wurden so in einem CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert.
6. Fünf Stunden nach Start der Transfektion wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit jeweils 2,5ml DMEM mit 10% Fetales Kälberserum (FCS)-Zusatz versetzt.
7. 18-24h nach Start der Transfektion wurde wiederum das Medium mit DMEM/10% FCS gewechselt.
8. 48h nach Start der Transfektion wurden die Zellen der Fluoreszenz-mikroskopie zugeführt.

### 3.3.2 Stabile Zelltransfektion

**Verwendete Puffer:**

Siehe Kapitel 3.3.1. Zusätzlich wurde Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) benötigt.

<b>PBS:</b>	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g

Ad 1000ml mit Aqua dest., pH auf 7,4 mit HCl einstellen

**Prinzipien und Durchführung:**

Für ALDpcDNA3 und ALDHispcDNA3 wurden zusätzlich noch stabile Zelllinien etabliert. Dabei muss das Plasmid mit dem Insert in das Zellgenom integriert werden, da eukaryontische Zellen im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen

Plasmide nicht replizieren können. Es wurde nach dem gleichen Transfektionsprotokoll wie bei der transienten Transfektion verfahren. Die Zellen wurden aber nicht auf Deckgläschen, sondern direkt auf dem Boden der 6-Well-Platten angezchtet. 72h nach Transfektionsbeginn wurden die transfizierten Zellen auf 75 cm<sup>2</sup> Flaschen verteilt. Dort wurden sie unter Zusatz von 500µg Geneticin (G418; Invitrogen, Groningen, Niederlande) pro ml Medium in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank kultiviert. G418 ist ein Analog von Neomycinsulfat und interferiert mit der Funktion von 80S-Ribosomen und blockiert somit die Protein-Synthese von Eukaryonten. Bei Vorhandensein von transfiziertem Vektor mit Neomycin bzw. Geneticin Resistenzgenen wird G418 inaktiviert. Zellen, die diese Resistenzgene in ihrer genomischen DNA integriert haben, besitzen auch über mehrere Zellzyklen einen Selektionsvorteil. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Die Zellkultur wurde insgesamt drei Wochen mit Selektivmedium weitergeführt, wobei das Medium alle 2 Tage gewechselt wurde.

### **3.4 Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.4.1 Prinzipien**

Sowohl bei den Konstrukten mit „Tag“ als auch bei den NH<sub>2</sub>-terminalen Deletionskonstrukten des ALDPs wurde das Protein in der Zelle durch einen primären Antikörper detektiert, der entweder gegen den „Tag“ gerichtet ist oder direkt gegen den COOH-Terminus des ALDP. Überschüssige Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Der primäre Antikörper wird mit einem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff des sekundären Antikörpers mit einem engen spezifischen Lichtspektrum angeregt. Der Farbstoff leuchtet daraufhin mit einem spezifischen nicht überlappenden Emissionsspektrum. Sollen zwei verschiedene Proteine mit zwei Farben doppel-gefärbt werden, müssen die primären Antikörper von zwei unterschiedlichen Spezies (z.B. Maus und Kaninchen) verwendet werden. Zur Detektion werden Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper einer dritten Spezies (z.B. Ziege) verwendet, deren Exzitations- und Emissionsspektren weit

genug auseinander liegen. Die verschiedenen Exzitations- und Emissionswellenlängen werden mit spezifischen Filtern herausgefiltert. Das Signal wird mit einem geeigneten Photosystem dokumentiert. In dieser Arbeit wurde die Doppelimmunfluoreszenzfärbung für das zu untersuchende Protein und Katalase als peroxisomaler Marker angewandt. Nur durch die Übereinstimmung der Punktmuster der beiden Färbungen kann der Beweis einer peroxisomalen Lokalisation des zu untersuchenden Proteins erbracht werden.

Bei den Fusionsproteinen ist eine solche Immunfärbung zur Detektion des transfizierten Proteins nicht nötig, da das fusionierte GFP selbst bei einem Exzitationsmaximum von 488nm mit einem Emissionsmaximum von 507nm leuchtet. Es wurde ebenfalls eine Immunfluoreszenzfärbung der Katalase als peroxisomaler Marker vorgenommen.

### **3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung**

#### **Verwendete Puffer:**

Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4

Fixierungslösung: 3% Formalin in PBS

Permeabilisierungslösung: 1% TritonX-100 in PBS

#### **Durchführung:**

1. Die transfizierten Zellen werden 48h nach Beginn der Transfektion zweimal mit PBS (je well 2,5ml) gewaschen, um FCS-Reste, die die Immunfluoreszenzfärbung stören, auszuwaschen.
2. Danach werden die Zellen in der Fixierungslösung (1ml/well) für 30 min fixiert und daraufhin wiederum mit PBS einmal gewaschen.
3. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt durch das Einwirken des Detergenz 1% TritonX-100/PBS (1ml/well) für 5 min. Dabei werden die Zellmembranen durchlöchert, so dass der primäre Antikörper in die Zelle und in Substrukturen eindringen kann. Nach der Permeabilisierung werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.
4. Als primärer Antikörper für die Deletionskonstrukte wurde der monoklonale Maus-IgG-Antikörper ALD 1D6 (Euromedex, Souffelweyersheim, Frankreich) benutzt, der mit hoher Affinität und Spezifität an den COOH-Terminus des ALDP bindet. Für die Konstrukte mit „Tags“ wurden die jeweiligen

Antikörper gegen diese „Tags“ benutzt. Für die GFP-Fusionsproteine wurde keine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Katalase wurde als peroxisomaler Marker mit einem Kaninchen-IgG-Antikörper (Bioscience Resource Project, Sacramento, CA, USA) detektiert. Die primären Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:100 in PBS eingesetzt. Dazu wurde auf einen Streifen Parafilm 50µl Antikörperlösung aufgetropft, Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf diesen Tropfen gelegt und im Dunkeln 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Gläschen mit der bewachsenen Seite nach oben wieder in das 6-Well überführt.

5. Der nicht gebundene primäre Antikörper wurde aus den Zellen durch 10maliges Waschen mit 2,5ml PBS pro Well entfernt.
6. Als sekundärer Antikörper wurde zur Detektion der transfizierten Proteine (außer der GFP-Fusionsproteine) ein Tetra-*rhodamin*-isocyanat (TRITC)-konjugierter Ziegen-Antikörper gegen Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA, USA) benutzt. Die Katalase wurde mit einem Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-markierten Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.) gefärbt. Die Verdünnung lag bei beiden sekundären Antikörpern bei 1:50 in PBS und die Deckgläschen wurden in gleicher Weise wie bei dem ersten Inkubationsschritt für 60 min inkubiert.
7. Der nicht gebundene sekundäre Antikörper wurde in 10 Waschschritten mit jeweils 2,5ml PBS pro Well abgewaschen.
8. Die Zellen wurden danach auf Objektgläsern in 5µl eines anti-fading Reagenz (Vectashield; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) eingebettet und mit Nagellack abgeschlossen.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiovert 135 invertierten Mikroskop (Zeiss, Göttingen) mit entsprechenden Immunfluoreszenzfiltern durchgeführt. Dabei lag für TRITC das Exzitationswellenmaximum bei 552nm, für FITC und GFP bei 495nm, die Emissionswellenlänge für TRITC bei 570nm, für FITC und GFP bei 520nm. Zur Dokumentation wurde eine Digitalkamera der Firma Zeiss mit der Software Axiovision benutzt.

### **3.5 Statistische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie**

In Zellpopulationen von 130 bis 410 transfizierten Zellen wurde die Anzahl von Zellen mit ausschließlichem peroxisomalem Targeting bestimmt. Unterschiede in der Targeting-Effektivität wurde durch den Vier-Felder- $\chi^2$ -Test (kontinuitäts-korrigiert nach Yates) statistisch abgeschätzt. Dabei wurden COOH-terminal verkürzte und mutagenisierte ALDP-GFP Fusionsprotein-Konstrukte mit dem 67-164 ALDP-GFP Fusionskonstrukt verglichen. Dieses Konstrukt wurde ausgewählt, da es mit großer Zuverlässigkeit ein peroxisomales Targeting zeigte.

### **3.6 Bioinformatische Werkzeuge**

Die Katalogisierung und Analyse von Proteinen kann durch Computer-gestützte Datenbanken erfolgen, die schon bekannte Proteinstrukturen und -funktionen zusammenfassen und diese durch bestimmte Algorithmen mit der Struktur und Funktion von unbekanntem Proteinen vergleichen. In dieser Arbeit wurden die Aminosäuren von Proteinen verglichen, indem übereinstimmende Aminosäure-Bereiche übereinander gelegt wurden (**Alignment**). In Proteinen mit peroxisomaler Lokalisation wurde nach möglichen konservierten Bereichen mit Motivcharakter gesucht. Des Weiteren wurde die Sekundärstruktur des ALDP durch die computergestützte Analyse von Aminosäurenpolaritäten vorausgesagt. (Für eine Auswahl an Proteomics Werkzeugen siehe <http://www.expasy.ch/sitemap.html>).

#### **3.6.1 Protein-Sequenzvergleich**

Die Aminosäuresequenzen von peroxisomalen bekannten ABC-Transportern wurden mit den Programmen MultAlign und mit dem ClustalW1.8 Algorithmus übereinander gelegt (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html> bzw. <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>). Die dafür benötigten Aminosäuresequenzen wurden auf zwei Arten gesucht: Das ALDP wurde über pBLAST (Blast Search Server, National Institute of Health; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?form=1>) auf Übereinstimmungen gegen Proteindatenbanken durchsucht. So konnten verwandte Proteine herausgefiltert werden. Des Weiteren wurde über den SwissProt Server (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de?ABC>) nach bekannten

peroxisomalen ABC-Transportern gesucht. Für das Alignment wurden lediglich eukaryontische peroxisomale ABC-Transporter verwendet. Außerdem wurden stark ähnliche Proteine wie die Maus-Homologen zum Menschen herausgenommen. Zur graphischen Verdeutlichung von Aminosäurekonservierungen wurden ähnliche Stellen des Alignments mit dem Programm BOXSHADE 3.21 angefärbt (<http://www.ch.embnet.org/software/>), wobei mindestens 2/5 der übereinander gelegten Aminosäuresequenzen übereinstimmen mussten. So konnten konservierte Bezirke identifiziert werden.

### 3.6.2 Protein-Motivsuche in Proteindatenbanken

Zur Motivsuche wurden oben beschriebene Alignments mit dem MAST Programm (Motif Alignment and Search Tool; <http://www.sdsc.edu/MEME>) (Bailey and Gribskov, 1998) analysiert, um mögliche Motive zu identifizieren. Zum Ausschluss unspezifischer Motive wurden die identifizierten Motive gegen eine Proteindatenbank (Mast Datenbank) aus 354.731 Peptiden und 108.277.285 Peptidteilen verglichen und der E-Wert ermittelt. Der E-Wert gibt hierbei die erwartete Anzahl der Sequenzen in einer zufälligen Datenbank gleicher Größe an, die genauso gut mit dem Motiv übereinstimmen wie die gefundene Sequenz und ist somit ein statistisch-mathematischer Parameter für die Zufälligkeit eines Datenbanktreffers.

### 3.6.3 Prädiktion von Protein-Sekundärstrukturen

Die Sekundärstruktur des ALDP ist bis jetzt nicht exakt beschrieben. So sind die Ausmaße der Transmembransegmente nicht exakt bestimmt und mussten durch verschiedene Programme erst postuliert werden. Die Lage der Transmembransegmente war für die Konstruktplanung von Bedeutung, da die Konstrukte so gewählt wurden, dass sie Transmembransegmente zur Verankerung des Proteins am Peroxisom komplett mit einschließen.

Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit die möglichen Transmembransegmente durch fünf verschiedene Programme vorhergesagt:

- (1) Tmpredict ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html));
- (2) DAS der Stockholm Universität (Cserzo et al., 1994) (<http://www.biokemi.su.se/~server/DAS>);

(3) PHDsec der Universität Heidelberg (Rost and Sander, 1993, Rost and Sander, 1994) (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>);

(4) Hydrophobieanalyse nach der Methode von Kyte-Doolittle (auf dem Server des Weizmann Institute of Science; [http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/plot\\_hydroph.html](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/plot_hydroph.html)) und

(5) nach den experimentellen Daten von Contreras et al. (Contreras et al., 1996).

Von den gering variierenden Ergebnissen wurden jeweils die sechs Transmembransegmente am großzügigsten bemessen, um sicherzugehen, dass sie intakt bleiben. Außerdem wurde bei dem PHDsec die Helixstruktur bedacht, da Targeting-Signale meistens auf einer  $\alpha$ -Helix liegen (persönliche Mitteilung von Prof. Just, Universität Heidelberg).

Alle Konstrukte wurden nach schon bekannten Targeting-Motiven mit dem PSORT Programm der Universität Heidelberg und dem Swiss Institute of Bioinformatics (<http://psort.nibb.ac.jp/>) durchsucht. Dies diente der Vermeidung von Fehlinterpretation der Fluoreszenzmikroskopie-Ergebnisse, da durch die Proteinfragmente eventuelle andere Targeting-Signale (mitochondriale etc.) erst erreichbar und dadurch funktionell gemacht werden könnten.

## 4 Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde methodisch geklärt, inwiefern Expressions-„Tags“ das peroxisomale Targeting von ABC-Transportern stören und wie diese für die Untersuchung des Targetings verwendbar sind. Im zweiten Teil wurde das Targeting-Motiv des Adrenoleukodystrophie-Proteins identifiziert, sowie die Konservierung innerhalb der Evolution untersucht. Außerdem wurde die mögliche Signifikanz des Motivs bei Patienten mit X-Adrenoleukodystrophie beleuchtet.

### 4.1 Expressions-Tags - eine Methode zur Sublokalisierung von Proteinen

Es wurde zuerst untersucht, ob das peroxisomale Targeting durch Anheftung von Expressions-„Tags“ an peroxisomalen ABC-Transportern gestört wird. Dies ist insofern von großer Bedeutung, da mittels Expressions-„Tags“ durch einfache Klonierungsschritte ein neues Protein in der Zelle eindeutig sublokalisiert werden kann, da es Antikörper in hoher Affinität und Spezifität gegen die Expressions-„Tags“ käuflich zu erwerben gibt.

#### 4.1.1 Expressions-Tags beeinträchtigen das peroxisomale Targeting nicht

Zunächst wurden cDNA-Konstrukte generiert, die zur Expression von diversen „Tags“ COOH-terminal des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) führen. Die Sublokalisierung in transfizierten Zellen des so markierten ALDP wurde mit nativem ALDP verglichen, gegen dessen COOH-Terminus ein monoklonaler Antikörper existiert. Sowohl ein Hexamer von Histidinen (His Tag), wie auch ein kombinierter *myc*-His Tag und ein Hämagglutinin (HA)-Tag zeigen eine typische peroxisomale Verteilung des Proteins mit Aussparung des Zellkerns. In der doppelten Immunfluoreszenzfärbung wurde die peroxisomale Lokalisation dieses Konstrukts bestätigt, da das Punktmuster deckungsgleich mit dem der Katalase, einem peroxisomalen Marker, war. Die zwei weiteren bis dahin bekannten humanen peroxisomalen ABC-Transporter (ALDRp und PMP70) wurden in gleicher Weise getestet. Das peroxisomale Targeting wurde von keinem der Tags gestört (Tabelle 4.1, Seite 50).

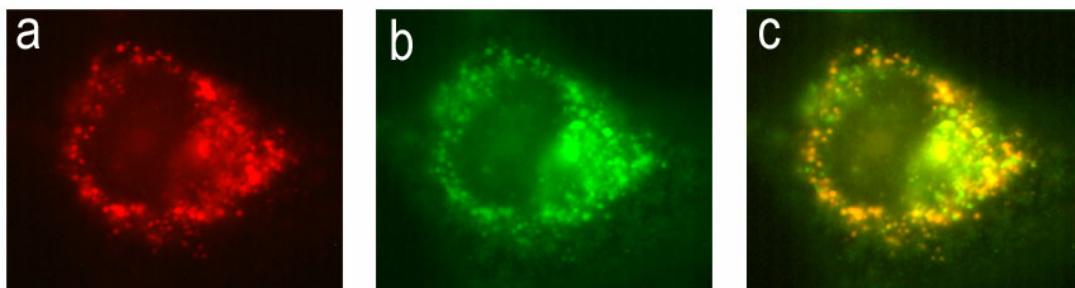


Konstrukt	Expressions-Tag	Lokalisation in der Zelle
ALDHis	(His) <sub>6</sub>	Peroxisom
ALDHA	HA	Peroxisom
ALD <i>myc</i> His	<i>myc</i> , (His) <sub>6</sub>	Peroxisom
PMP70His	(His) <sub>6</sub>	Peroxisom
PMP70 <i>myc</i> His	<i>Myc</i> , (His) <sub>6</sub>	Peroxisom
PMP70HA	HA	Peroxisom
ALDR <i>myc</i> His	<i>Myc</i> , (His) <sub>6</sub>	Peroxisom

**Tabelle 4.1.** Subzelluläre Verteilung der verschiedenen humanen peroxisomalen ABC-Transporter, jeweils COOH-terminal fusioniert mit diversen Expressions-„Tags“. (His)<sub>6</sub>: Histidine-„Tag“, HA: Hämaggglutinin-„Tag“, *myc*: *myc*-„Tag“.

#### 4.1.2 Zelluläre Sublokalisierung des humanen peroxisomalen ABC-Transporters PMP69

Unsere Forschungsgruppe identifizierte den bis dahin unbekanntenen humanen peroxisomalen ABC-Transporter PMP69 (syn. PXMP1-L, P70R) (Holzinger et al., 1997b) und bestimmte die genomische Struktur desselben (Holzinger et al., 1998b). Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurde im Rahmen dieser Arbeit dessen COOH-terminales Ende mit einem HA-Tag fusioniert und die Verteilung in Cos7-Zellen bestimmt. Das rot gefärbte PMP69-HA zeigte eine typische peroxisomale Verteilung mit Aussparung des Zellkerns und eine Deckungsgleichheit mit dem Punktmuster des Markerenzym Katalase als Beweis für die peroxisomale Lokalisation (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1.** PMP69-HA in Cos7-Zellen. Die Übereinstimmung des TRITC-gefärbten PMP69-HA- (a) und der FITC-gefärbten Katalase- (b) Punktmusters beweist die peroxisomale Lokalisation des PMP69. c. zeigt a und b übereinander gelegt.

## **4.2 Identifizierung des Targeting-Motivs des Adrenoleukodystrophie-Proteins**

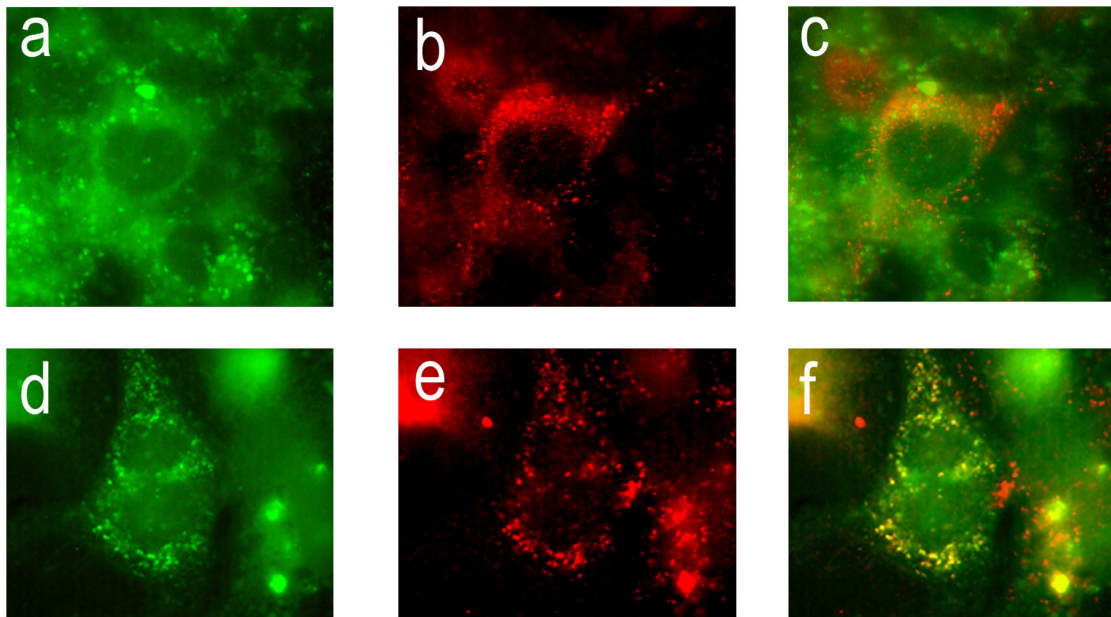
Um das Targeting-Signal des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) zu identifizieren, wurden zunächst Proteinregionen, die für das Targeting nicht notwendig sind, mit Deletionskonstrukten ausgeschlossen. Die verbleibende Region wurde daraufhin mit GFP-Fusionsproteinen weiter auf die minimale Targeting-Region eingegrenzt, die nötig und ausreichend für das peroxisomale Targeting des ALDP ist. Die Konservierung der Targeting-Region innerhalb der Evolution wurde untersucht. Mögliche Targeting-Motive wurden durch bioinformatische Methoden gesucht und das Targeting-Motiv anschließend experimentell bestätigt. Dabei wurden sowohl künstlich eingeführte Punktmutationen wie auch bei Patienten vorkommende Mutationen innerhalb des Targeting-Motivs untersucht. Bei zwei X-ALD Patienten konnte die molekulare Pathogenese für ihre Erkrankung beschrieben werden.

### **4.2.1 Der NH<sub>2</sub>-Terminus und der COOH-Terminus sind nicht für das Targeting notwendig**

Zunächst wurden unter Zuhilfenahme von internen Start-Codons drei Konstrukte ohne NH<sub>2</sub>-Terminus untersucht. Dabei hatte lediglich die Deletion von 66 NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren keinen Einfluss auf das Targeting, wohingegen die Deletion von 186 und 281 NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren das Targeting störte (Tabelle 4.2, Seite 52). Gleiche Ergebnisse wurden mit entsprechenden ALDP-GFP Fusionsproteinen erzielt (Abbildung 4.2 a-c, Seite 52). Außerdem zeigte ein Konstrukt mit fehlendem COOH-Terminus (1-281 ALDP-GFP) in 86,7% der transfizierten Zellen ausschließlich ein peroxisomales Punktmuster, wie in Abbildung 4.2 d-f dargestellt. Diese Experimente demonstrieren, dass weder der NH<sub>2</sub>-Terminus noch der COOH-Terminus für das Targeting des ALDP notwendig ist.

Konstruktname	Kloniert mit (Restriktions- enzyme 5'/3')	Aminosäure Ausmaß des kodierten Proteins	Transfizierter Zelltyp	Peroxisomale Lokalisation
Δ66ALD	HindIII/EcoRI	67-745	3T3 (Maus- Fibroblasten)	Positiv
Δ185ALD	HindIII/EcoRI	186-745	3T3	Negativ
Δ281ALD	HindIII/EcoRI	282-745	3T3	Negativ

**Tabelle 4.2.** Die NH<sub>2</sub>-terminalen ALDP-Deletionskonstrukte.



**Abbildung 4.2.** Das ALDP Targeting-Signal ist im NH<sub>2</sub>-Teil des Proteins lokalisiert. a-c. 282-745 ALDP-GFP. Ein um 281 NH<sub>2</sub>-terminal verkürztes Fusionsprotein zeigt kein peroxisomales Targeting (a). d-f. 1-281 ALDP-GFP. Der vordere Teil des ALDP (d) ist für ein Targeting an das Peroxisom ausreichend. b und e zeigen die jeweiligen Gegenfärbungen mit Katalase, während c und f die jeweilige Übereinanderlagerung der Bilder darstellt.

#### 4.2.2 Weitergehende Identifizierung durch Grün Fluoreszierende Protein-Fusionsproteine

Am Beginn dieser Arbeit war das einzige in der Literatur beschriebene Targeting-Signal für peroxisomale Membran-Proteine die Aminosäuresequenz zwischen Transmembransegment 4 und 5 des *Candida boidinii* PMP47 (Dyer et al., 1996). Um zu prüfen, ob ein ähnliches Targeting-Signal beim ALDP vorliegt, wurden die Aminosäuresequenzen zwischen Transmembransegment 2, 3, 4, 5 und 6 mit den jeweils benachbarten Transmembransegmenten getestet (Konstrukte 124-219 ALDP-GFP, 186-270 ALDP-GFP und 231-336 ALDP-GFP). Es konnte kein

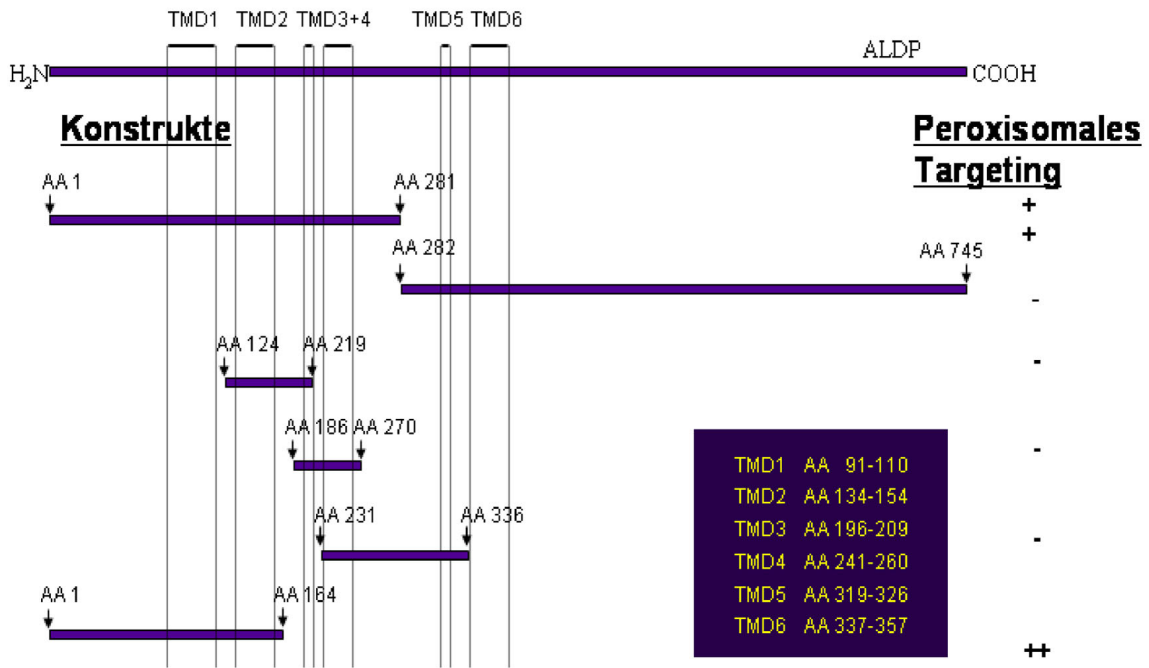
peroxisomales Targeting der Konstrukte festgestellt werden. Dagegen wurde das 1-164 ALDP-GFP-Protein, das neben Transmembransegment 1 und 2 mit dazwischen liegenden Aminosäuren auch den NH<sub>2</sub>-Terminus des ALDP erfasste, in 83,7% der transfizierten Zellen ausschließlich an das Peroxisom transloziert (Tabelle 4.3, Seite 54). Die Ergebnisse wurden in Abbildung 4.3 (Seite 55) mit der dazugehörigen ALDP-Topologie dargestellt.

Zur genaueren Eingrenzung des Targeting-Signals wurden Teile dieser Region als ALDP-GFP-Fusionsproteine getestet (Abbildung 4.4, Seite 55). Ein Konstrukt (110-134 ALDP-GFP) bestehend aus der Aminosäure-Sequenz zwischen Transmembransegment 1 und 2 zeigte kein Targeting. Ein zusätzliches Transmembransegment (Transmembransegment 1) zur Verankerung (Konstrukt 91-134 ALDP-GFP) und Ergänzung mit zusätzlichen NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren zur möglichen Stabilisierung und Membraninsertion des Konstruktes (Konstrukt 67-134 ALDP-GFP) zeigten keinen Effekt auf das peroxisomale Targeting. Dagegen konnte peroxisomales Targeting in 51,1% der mit dem 67-164 ALDP-GFP Konstrukt transfizierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.5 a-c, Seite 56 und Tabelle 4.3, Seite 54). Dieses Konstrukt enthält neben den ersten zwei Transmembransegmenten mit dazwischen liegender Aminosäuresequenz jeweils flankierende Aminosäuren. Ein Konstrukt, das den NH<sub>2</sub>-Terminus und das Transmembransegment 1 einschließt (1-110 ALDP-GFP) zeigte in 81,8% der transfizierten Zellen ein peroxisomales Muster (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5 d-f).

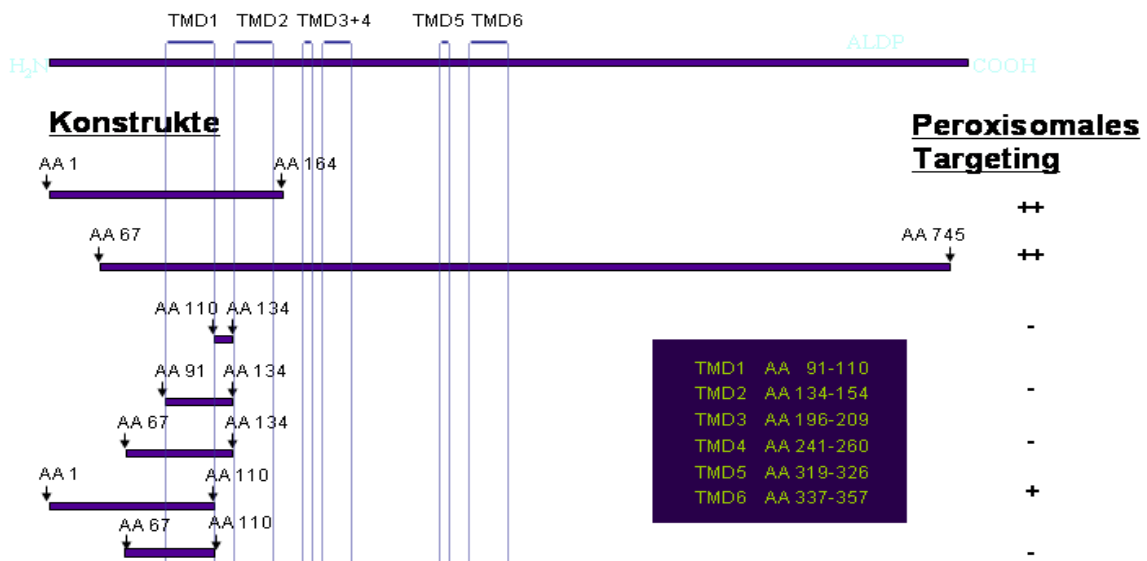
Diese Experimente zeigen, dass das Targeting-Signal in einer Region zwischen den Aminosäuren 67 und 110 liegt. Diese Region alleine (67-110 ALDP-GFP) ist aber nicht in der Lage GFP an das Peroxisom zu translozieren (Abbildung 4.5 g-i).

Konstrukt	n	Peroxisomales Targeting (%)
1-281 ALDP-GFP <sup>1</sup>	361	86.7
1-164 ALDP-GFP <sup>1</sup>	331	83.7 *
1-110 ALDP-GFP <sup>1</sup>	132	81.8 *
282-745 ALDP-GFP	218	0 *
67-164 ALDP-GFP	176	51.1
67-134 ALDP-GFP	275	0 *
78-164 ALDP-GFP <sup>2</sup>	247	0.8 *
87-164 ALDP-GFP <sup>2</sup>	206	0.5 *
67-164 ALDP(F71S)-GFP <sup>3</sup>	363	39.4
67-164 ALDP(F71V)-GFP <sup>3</sup>	203	44.3
67-164 ALDP(R74W)-GFP <sup>3</sup>	218	40.8
67-164 ALDP(R74G)-GFP <sup>3</sup>	277	44.4
67-164 ALDP(L78F)-GFP <sup>3</sup>	315	32.7 *
67-164 ALDP(L81V)-GFP <sup>3</sup>	363	54.8
67-164 ALDP(P84A)-GFP <sup>3</sup>	413	47.5
67-164 ALDP-delLLR-GFP <sup>4</sup>	224	0 *

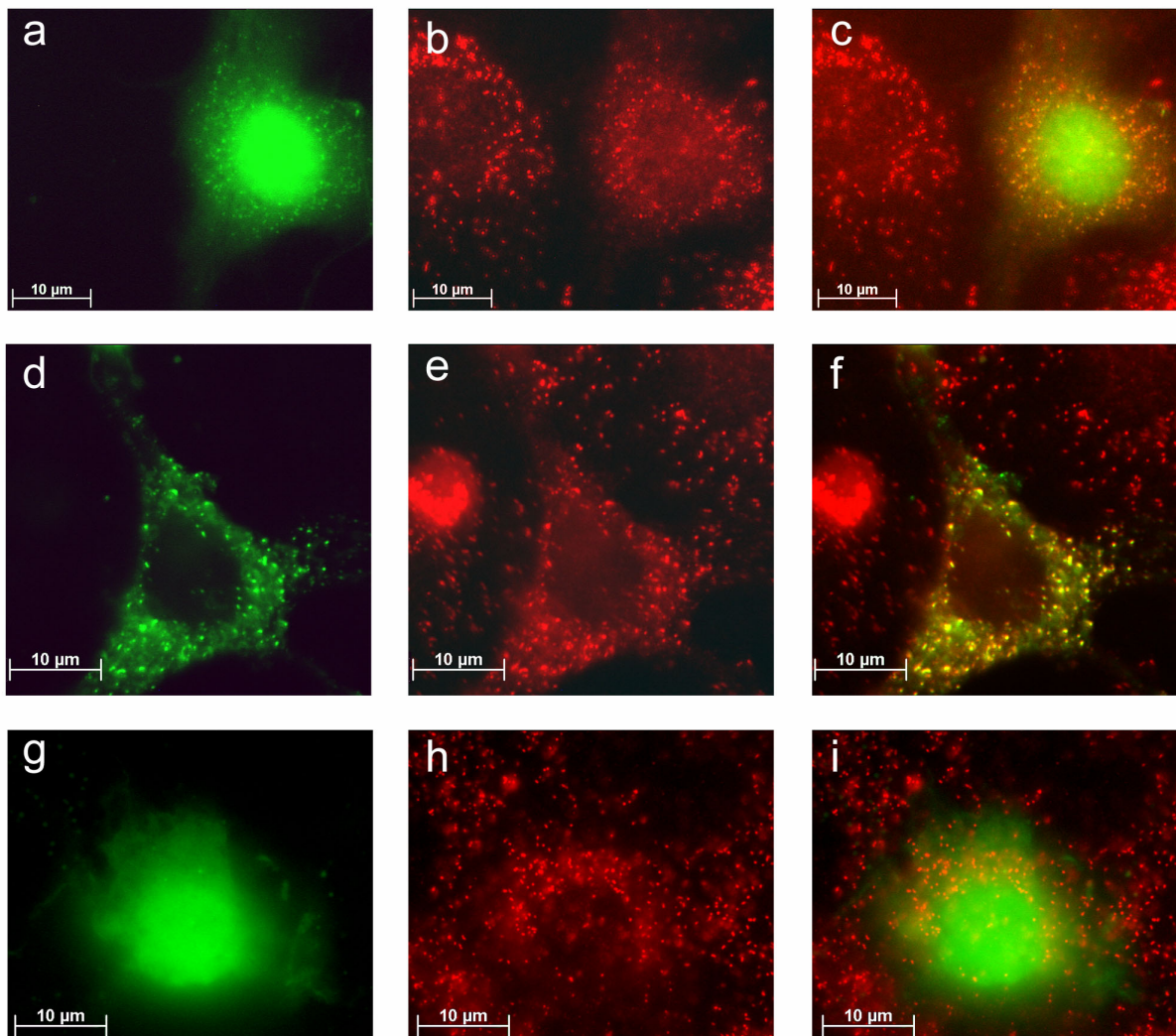
**Tabelle 4.3.** Anzahl der Zellen (n), die mit verschiedenen ALDP-GFP Fusionsproteinen transfiziert wurden, und deren Fraktion, die ein ausschließliches peroxisomales Targeting zeigen. Dabei wurde die Targeting-Effektivität mit der von 67-164 ALDP-GFP (grau hinterlegt) verglichen (\*: signifikanter Unterschied;  $p < 0,01$ ). Die untersuchten Konstrukte beinhalten solche, die den NH<sub>2</sub>-Terminus tragen (<sup>1</sup>), solche bei denen das mögliche Targeting-Motiv beschnitten wurde (<sup>2</sup>) und ein Konstrukt, bei dem 3 Aminosäuren innerhalb des Targeting-Motivs deletiert wurden (<sup>3</sup>).



**Abbildung 4.3.** Schematische Darstellung des ALDP sowie der verschiedenen GFP-Fusionsproteine (GFP-Anteil ist nicht abgebildet). Lediglich die NH<sub>2</sub>-terminalen 164 Aminosäuren beinhalten das Targeting-Signal. Die Lage der Transmembran-Domänen (TMD) ist mit Balken gekennzeichnet, und ihr Aminosäure-Ausmaß (AA) angegeben.



**Abbildung 4.4.** Konstrukte zur Eingrenzung der ALDP-Targeting-Region (67-164) im Verhältnis zur ALDP Transmembran-Topologie. Das peroxisomale Targeting ist durch Pluszeichen dargestellt.



**Abbildung 4.5.** Eingrenzung der ALDP-Targeting-Region. Die peroxisomale Lokalisation (punktiertes Muster) von ALDP-GFP-Fusionsproteine (**a, d, g**) wurde durch die Doppelfärbung mit Katalase (**b, e, h**), einem peroxisomalen Marker, veranschaulicht, wobei das GFP und das Katalase-Signal in den Bildern **c, f, i** übereinander gelegt wurde. **a-c.** 67-164 ALDP-GFP (**a**) wird größtenteils an das Peroxisom transloziert (**b, c**), wobei auch der Nucleus angefärbt wird. **d-f.** 1-110 ALDP-GFP zeigt ein punktiertes Muster (**d**), das mit dem Katalasemuster (**e**) übereinstimmt (**f**). **g-i.** Die Targeting-Region allein (67-110; **g**) ist nicht in der Lage GFP an das Peroxisom (**h**) zu translozieren, sondern zeigt ein diffuses zytoplasmatisches Muster mit Anfärbung des Nucleus.

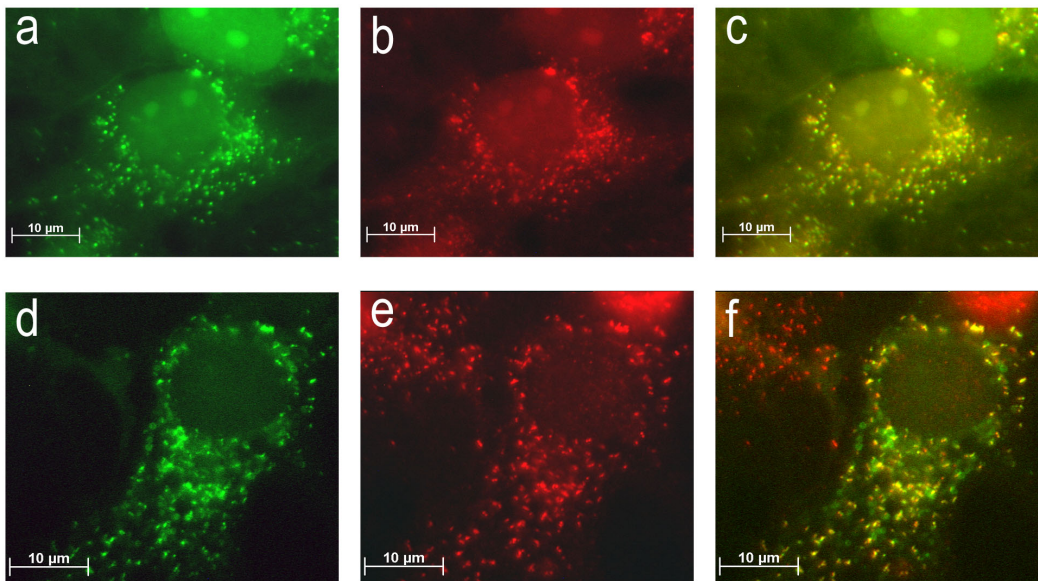


### 4.2.3 Die Targeting-Region ist funktionell konserviert

Da viele Targeting-Signale von peroxisomalen Matrix-Proteinen konserviert sind, wurde die funktionelle Konservierung der ALDP-Targeting-Region untersucht. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des humanen ALDP (Aminosäuren 67-164) mit den Aminosäuresequenzen weiterer humaner peroxisomaler ABC-Transporter (ALDRp, PMP70, PMP69), mit peroxisomalen ABC-Transportern der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* PXA1p) und mit den peroxisomalen ABC-Transportern des Fadenwurms *C.elegans* (*C.el.* PMP70, *C.el.* PMP69, *C.el.* ALDR) übereinander gelegt und verglichen. GFP-Fusionsprotein-Konstrukte der so identifizierten homologen Regionen verschiedener Proteine (16-113 PMP69-GFP, 59-156 PMP70-GFP, 71-168 Pxa1-GFP) wurden in der Fluoreszenzmikroskopie auf ihre intrazelluläre Lage untersucht. PMP69 ist ein zu ALDP nah verwandter humaner peroxisomaler ABC-Transporter mit 26,1% Aminosäuren-Identität (Holzinger et al., 1997b, Shani et al., 1997). Ein 16-113 PMP69-GFP Konstrukt wird peroxisomal lokalisiert (Abbildung 4.6 a, Seite 58) wie die Co-Lokalisation mit Katalase zeigt (Abbildung 4.6 b, c). Das entsprechende 59-156 PMP70-GFP Konstrukt wird nicht an das Peroxisom transloziert. Diese Experimente zeigen die funktionelle Konservierung der Targeting-Region zwischen humanem ALDP und PMP69, aber nicht zwischen ALDP und PMP70.

Das ALDP Hefe-Ortholog Pxa1 besitzt eine Aminosäure-Identität von 28% zum humanen ALDP (Shani et al., 1995). Ein 71-168 Pxa1-GFP Konstrukt zeigt auch in eukaryontischen Zellen ein punktiertes Fluoreszenzmuster (Abbildung 4.6 d), das durch die Überlappung mit Katalase (Abbildung 4.6 e, f) als ein für Peroxisomen typisches Muster identifiziert wurde. Dies zeigt exemplarisch die Konservierung des Targetings der peroxisomalen ABC-Transporter nicht nur innerhalb einer Spezies zwischen ALDP und PMP69, sondern auch innerhalb einer Proteinfamilie zwischen verschiedenen Spezies wie im Falle von *Saccharomyces cerevisiae* Pxa1. Dies ist der erste Hinweis auf eine solche Konservierung der Targeting-Region innerhalb der peroxisomalen ABC-Halbtransporter.





**Abbildung 4.6.** Konservierung der zu 67-164 ALDP homologen Targeting-Region des humanen PMP69 (**a-c**) und *Saccharomyces cerevisiae* Pxa1 (**d-f**). Peroxisomen wurden durch einen Katalase-Antikörper rot gefärbt (**b, e**). **c** und **f** zeigen die jeweilig vorangehenden Bilder als Überlagerung. **a-c**. 16-113 PMP69-GFP (**a**) zeigt ein zu Katalase deckungsgleiches peroxisomales Verteilungsmuster (**b, c**). **d-f**. 71-168 Pxa1-GFP (**d**) zeigt ebenfalls ein peroxisomales Muster (**e, f**).

#### 4.2.4 Bioinformatische Identifizierung von möglichen Targeting-Motiven und experimentelle Eingrenzung auf ein Targeting-Motiv

Zur Identifikation eines Targeting-Motivs innerhalb der eingegrenzten Targeting-Region wurden bioinformatische Methoden verwendet. Die zu 1-164 ALDP homologen Regionen verschiedener ABC-Transporter wurden mit dem MAST-Programm (Motif Alignment and Search Tool) (Bailey and Gribskov, 1998) nach möglichen Motiven durchsucht (Tabelle 4.4, Seite 59). Der Vergleich der MAST-Analyse mit den experimentellen Daten ergab zwei Motive (Motiv 2 und 5), die in der Targeting-Region des ALDP liegen. Dabei findet sich das Motiv 5 (Konsensussequenz [ETGxLALHS]) lediglich im humanen ALDP, ALDRp, PMP70 und *C.el.*ALDRp, wogegen sich Motiv 2 (Konsensussequenz [F (F/L) x (R/Q/K) (L/F) (L/I/K) x LLKIL (F/I/V) P]) in 8 der 10 analysierten Proteine befindet (Abbildung 4.7, Seite 60 und Abbildung 4.8, Seite 60).

Um die Spezifität dieser beiden Motive zu untersuchen, wurde eine Protein- und Peptiddatenbank (MAST Programm) mit den Motiven getrennt durchsucht. Dabei wurde ein E-Wert von  $E \leq 0,061$  vorausgesetzt, da bei höheren E-Werten die falsch positive Trefferquote in der Datenbank zu hoch liegt. Die Datenbank umfasste zum Zeitpunkt der Untersuchung insgesamt 354.731 Proteinsequenzen und 108.277.285 Aminosäurestücke. Mit Motiv 2 wurden nur peroxisomale Proteine in dieser Datenbank identifiziert. Motiv 5 erzielte weitaus weniger Treffer in der gleichen Datenbank.

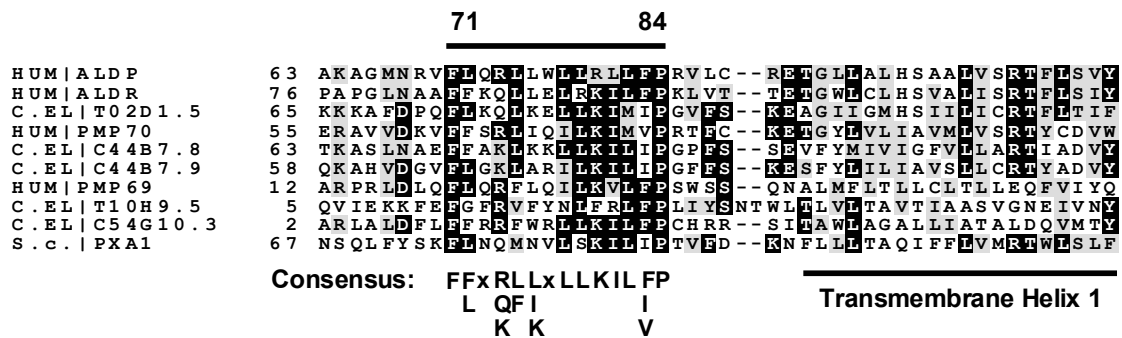
Aus diesem Grund wurde Motiv 2 experimentell untersucht. Die Deletion dieses Motivs in einem ALDP-GFP Fusionsprotein (Konstrukt 87-164 ALDP-GFP) resultiert tatsächlich in einem Verlust des peroxisomalen Targetings (Abbildung 4.8, Seite 60 und Abbildung 4.9 a, b, Seite 61). Bei dem Konstrukt 78-164 ALDP-GFP, das die NH<sub>2</sub>-terminale Hälfte des Motivs nicht enthält, kann ebenfalls keine peroxisomale Lokalisation des resultierenden Fusionsproteins festgestellt werden (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9 c, d). Mit diesen Experimenten konnten Hinweise gesammelt werden, dass es sich beim Motiv 2 um das Targeting-Signal des ALDP-Proteins handelt.

Motiv-nummer	Größe	Sequenz
1	13	WMLIAIPATFVNS
<b>2</b>	<b>14</b>	<b>FFQRLWWLLKILFP</b>
3	13	RTFLSIYVAQLDG
4	9	IVEKDPRCF
<b>5</b>	<b>9</b>	<b>ETGWLALHS</b>
6	8	CDVWMIQN
7	12	YQVGIIPSQYYV
8	12	DDSKANNGTDKK
9	12	EASGIGPKKAGK
10	12	EKEGKKGHHKMED

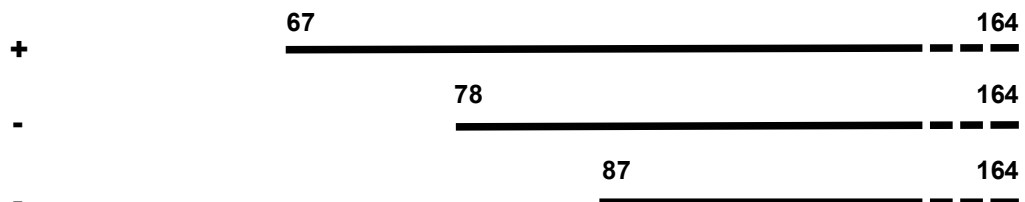
**Tabelle 4.4.** Bioinformatische Identifizierung von möglichen Motiven. Die Motivnummern wurden nach dem kleinsten E-Wert durchgehend nummeriert. Die am besten zu den verschiedenen Sequenzen passende Motivsequenz ist aufgeführt. Fett gedruckte Motive liegen im Bereich der ALDP-Targeting-Region.

Name	Expect	Motifs
C. el. ALDRp	2,5e-53	9 10 8 2 5 3 4 1
hs ALDRp	1,9e-46	9 2 5 3 4 1
hsALDP	1,1e-42	9 2 5 3 4 1
hsPMP70	5e-34	9 10 2 5 6 4
Hefe Pxa1p	1,1e-32	8 4 2 3 1
Hefe-Pxa2	5,1e-32	7 8 10 3 1
C.el. PMP70	1,1e-19	9 2 6 4
C.el. PMP69	5,2e-18	2 7 4
hsPMP69	6,5e-17	2 7 4

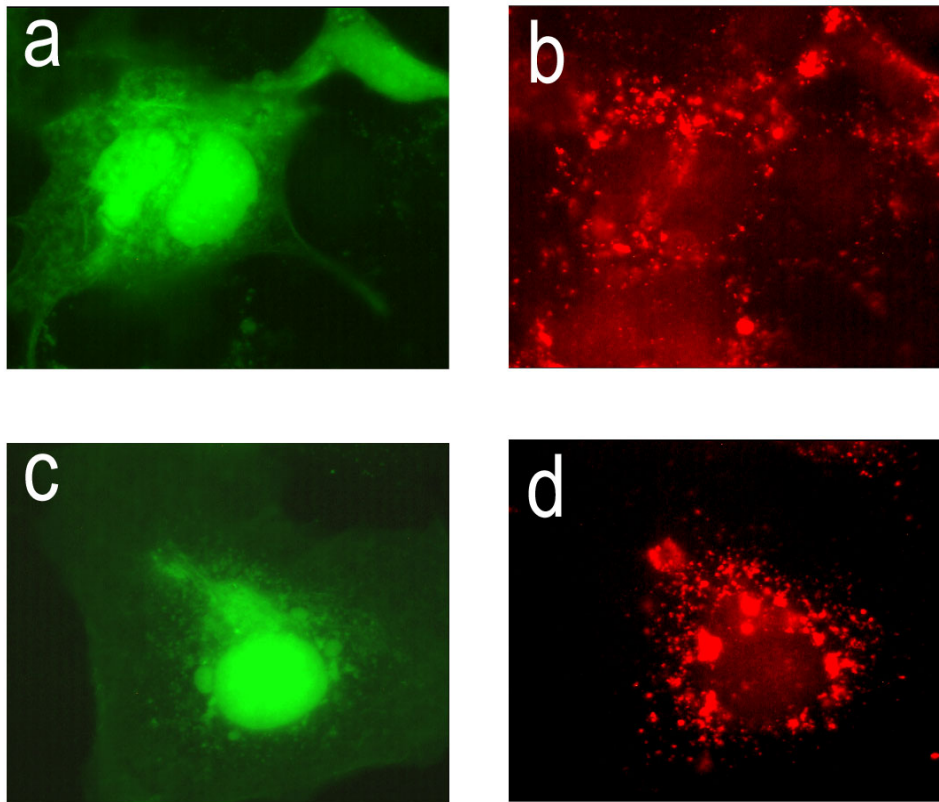
**Abbildung 4.7.** Die Lage der Computer-gestützt identifizierten Motive in den untersuchten Proteinen. Namen von Organismen sind abgekürzt (C.el= C.elegans, hs=homo sapiens). Die beiden experimentell in Frage kommenden Motive 5 und 2 sind unterschiedlich konserviert.



**Peroxisomale Lokalisation**



**Abbildung 4.8.** Humane, Hefe und C.elegans ABC-Transporter beinhalten ein konserviertes Motiv (schwarzer Balken über dem Alignment). Die Consensus Sequenz im Ein-Buchstaben-Code und die Position der Transmembran-Helix 1 ist unter dem Alignment angegeben. Die ALDP-Anteile von Fusionsproteinen werden durch Balken mit ihrer peroxisomalen Lokalisation dargestellt. Das 67-164 Konstrukt, das das Targeting-Signal beinhaltet, zeigt eine peroxisomale Lokalisation wogegen Konstrukte, bei denen die NH<sub>2</sub>-terminale Hälfte des Targeting-Signals (78-164 ALDP-GFP) oder das gesamte Targeting-Signal fehlt (87-164 ALDP-GFP), nicht peroxisomal lokalisiert werden.



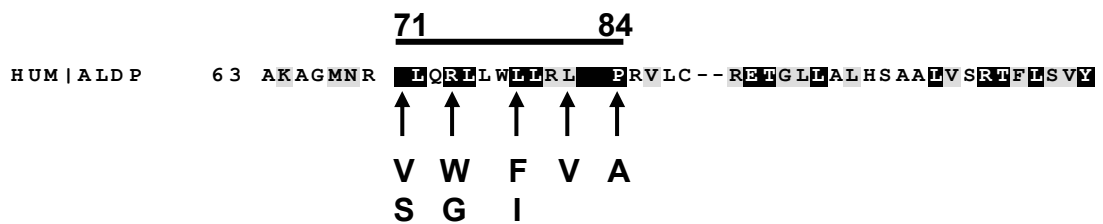
**Abbildung 4.9.** Experimentelle Bestätigung des möglichen Targeting-Motivs (Aminosäuren 71-85). Die Peroxisomen wurden jeweils rot gefärbt (**b, d**). **a, b**. Das Fehlen des möglichen Targeting-Motivs in einem 87-164 ALDP-GFP-Fusionsprotein resultiert in einer Anfärbung des Zytoplasmas und des Nukleus (**a**). **c, d**. 78-164 ALDP-GFP. Ein Fehlen der NH<sub>2</sub>-terminalen Hälfte des Motivs führt ebenfalls zu einem Verlust des peroxisomalen Targetings (**c**).

#### 4.2.5 Einfluß gerichteter Mutationen im Targeting-Motiv

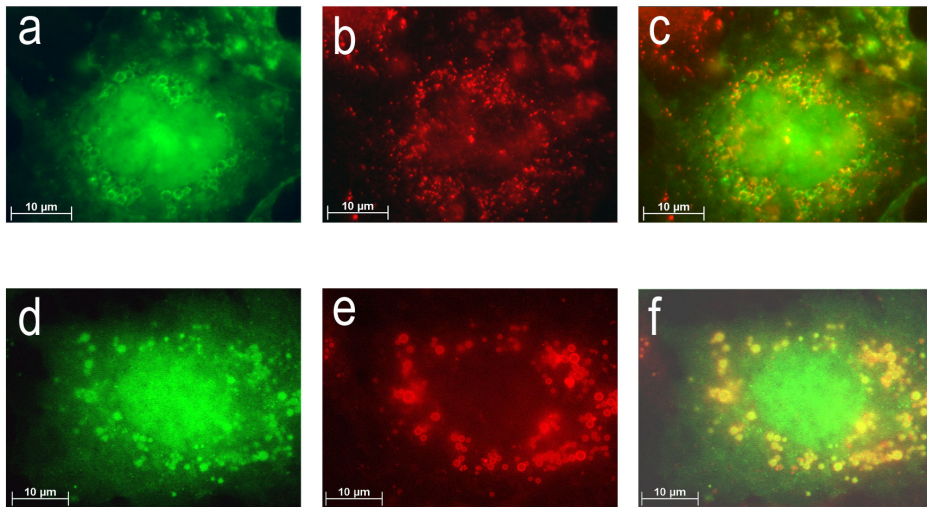
Zur genaueren Charakterisierung des Targeting-Motivs wurden verschiedene Fusionsprotein-Konstrukte in der Fluoreszenzmikroskopie getestet, die einen Austausch von einzelnen konservierten Aminosäuren innerhalb des Targeting-Motivs tragen (Abbildung 4.10, Seite 62). Die konservierten Aminosäuren wurden entweder durch Aminosäuren mit gleicher Ladung oder durch Aminosäuren mit unterschiedlicher Ladung ausgetauscht. Lediglich in Zellen, die mit dem 67-164 ALDP(L78F)-GFP Konstrukt transfiziert wurden, wurde im Vergleich zum Wild-Typ (67-164 ALDP-GFP-Protein) in signifikant weniger Zellen eine ausschließliche peroxisomale Lokalisation des Fusionsproteins beobachtet (Tabelle 4.3, Seite 54). Während des Fortgangs dieser Arbeit wurden zwei Geschwister mit Adrenomyeloneuropathie, einer milden Form der X-gebundenen Adrenoleukodystrophie, beschrieben (Wichers et al., 1999). Diese Patienten weisen beide die gleiche in-frame Deletion innerhalb des Targeting-Motivs auf (del78-80LLR).

Durch PCR-Amplifikation und Klonierung in den pEGFPN1-Vektor wurde ein 67-164 ALDP-GFP Fusionsprotein geklont, das diese Deletion beinhaltet (67-164 ALDP-delLLR-GFP). Nach Transfektion in Cos 7-Zellen war ein kompletter Verlust des ALDP-Targetings zu beobachten (Tabelle 4.3, Seite 54 und Abbildung 4.11 a-c, Seite 63). Dagegen fand eine Anfärbung des Kerns und anderer zytoplasmatischer Strukturen statt (Abbildung 4.11 a, d), die durch Doppelfärbung mit einer Mitochondrienfärbung (MitoTracker®) als Mitochondrien identifiziert wurden (Abbildung 4.11 e, f).

Somit ergab der Austausch von einzelnen Aminosäuren nur beim Austausch von Leucin nach Phenylalanin in Position 78 eine signifikante Änderung in der Targeting-Effektivität. Dagegen bewirkte die Deletion von drei Aminosäuren (del78-80LLR), die bei zwei Geschwistern mit X-ALD beschrieben wurde, eine Fehllokalisierung des Fusionsproteins in den Nucleus und die Mitochondrien.



**Abbildung 4.10.** Lokalisation der einzelnen ausgetauschten Aminosäuren im ALD-Protein (markiert durch Pfeile). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben. Die Ausdehnung des Targeting-Motivs (Aminosäuren 71-84) ist durch einen waagrecht Balken über der Aminosäuresequenz angegeben.



**Abbildung 4.11.** Effekt einer bei Patienten vorkommenden Deletion auf das ALDP-Targeting. Zellen wurden mit dem 67-164 ALDP-delLLR-GFP Fusionsprotein transfiziert (**a, d**) und entweder mit dem peroxisomalen Marker Katalase (**b**) oder mit Mito Tracker® (**e**) gegengefärbt. **c** und **f** zeigen die Überlappungen der jeweils vorangegangenen Bilder. Die transfizierten Zellen zeigen ein Fluoreszenzmuster (**a**), das von Katalase verschieden ist (**b, c**). Dieses Muster stellt Strukturen dar (**d**), die durch die Überlappung mit den angefärbten Mitochondrien (**e, f**) als solche identifiziert werden konnten. Außerdem wird der Kern angefärbt (**d, f**).

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Targeting des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) als exemplarisches Beispiel für das Targeting von humanen peroxisomalen ABC-Transportern untersucht. ALDP gehört zu der Gruppe der vier bisher bekannten humanen peroxisomalen ABC-Transporter (ALDP, ALDRp, PMP70, PMP69) und ist in der X-gebundenen Adrenoleukodystrophie (X-ALD), einer schweren neurodegenerativen Erkrankung (Moser, 1997, Gärtner et al., 1998), defekt. Diese Erkrankung ist zwar klinisch und morphologisch gut definiert, allerdings sind die Kenntnisse über die Pathogenese und die Vielfalt von Erscheinungsformen bei fehlender Genotyp-Phänotyp Korrelation nur unzureichend erklärt. Ebenso ist unklar, warum bei 67% von insgesamt 80 untersuchten X-ALD Patienten kein ALDP nachgewiesen werden konnte, obwohl bei allen mRNA vorhanden war (Smith et al., 1999). Das Fehlen von detektierbarem Protein kann in diesen Fällen am ehesten durch Protein-Instabilität als durch RNA Instabilität erklärt werden. Neben anderen Ursachen für Protein-Instabilität wäre ein fehlgeleitetes Targeting als Ursache für dieses Phänomen denkbar.

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Targeting-Mechanismen peroxisomaler ABC-Transporter bekannt. Seitdem konnte gezeigt werden, dass PMP70 seine 61 NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuren für das Targeting an das Peroxisom benötigt (Sacksteder et al., 2000). Peroxisomale Targeting-Signale der Membranproteine (mPTS) der anderen drei humanen peroxisomalen ABC-Transporter und der Targeting-Mechanismus waren unbekannt.

Als experimentelle Voraussetzung wurde zuerst gezeigt, dass künstlich an ein Protein angehängte Expressions-„Tags“ das peroxisomale Targeting für alle vier humanen ABC-Transporter nicht beeinträchtigen. Die angehängten Epitope können in nachfolgenden Experimenten somit von einem gegen sie gerichteten Antikörper erkannt und im Western Blot wie auch in der Immunfluoreszenz intrazellulär nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere wichtig, da die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen peroxisomale Proteine äußerst langwierig und geldaufwendig ist. Außer in dieser Arbeit fand diese Erkenntnis

bereits Anwendung bei der peroxisomalen Lokalisation des von unserer Arbeitsgruppe neu klonierten PMP69 (syn. PXMP1-L) (Holzinger et al., 1998b). Zur Identifizierung des mPTS des ALDP wurde im zweiten Teil dieser Dissertation die Targeting-Region eingegrenzt. Zuerst konnte mit NH<sub>2</sub>-terminalen Deletionskonstrukten gezeigt werden, dass die ersten 66 Aminosäuren des ALDP keine für das Targeting relevanten Informationen beinhalten. Zur weiteren Eingrenzung auf die minimale Targeting-Region wurden relevante Teile des ALDP COOH-terminal mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) in Fusionsprotein-Konstrukten verbunden und die intrazelluläre Lokalisation durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Dabei wurden das 1-110 ALDP-GFP-Fusionsprotein wie auch ein Fusionsprotein, das die Aminosäuren 67-164 einschließt, in Cos7 Zellen korrekt an das Peroxisom transferiert. Andere Fusionsprotein-Konstrukte zeigten keine peroxisomale Lokalisation. Daraus kann geschlossen werden, dass die Region von 44 Aminosäuren (67-110) des ALDP für das Targeting notwendig ist. Allerdings ist diese Region alleine nicht ausreichend, das GFP-Protein an das Peroxisom zu translozieren, wie dies verschiedene sich anschließende Experimente mit kleineren Fusionsproteinen in dieser Arbeit veranschaulichten. ALDP scheint umgebende Aminosäuresequenzen für die Translokation an das Peroxisom zu benötigen. Ein ähnliches Phänomen wurde für das peroxisomale Membran-Protein Pex15p (Elgersma et al., 1997) wie auch für einige PTS1-tragende peroxisomale Matrix-Proteine (Lametschwandtner et al., 1998) postuliert. Umgebende Aminosäuresequenzen scheinen auch bei in menschlichen Zellen exprimierten *C. boidinii* PMP47 notwendig zu sein, das mit zwanzig Aminosäuren zwar in Hefezelllinien eine peroxisomale Lokalisation aufweist (Dyer et al., 1996), nicht aber in humanen Zelllinien (Sacksteder et al., 2000). Es ist zudem denkbar, dass benachbarte Transmembran-Segmente für die richtige Faltung der Targeting-Region notwendig sind. Pause et al. beschrieben bei Ratten-PMP22 eine Rekonstitution des Targetings mit einem Konstrukt, das neben der Targeting-Region noch eine zusätzliche Transmembran-Domäne enthält, die selbst keine Targeting-Information beinhaltet (Pause et al., 2000). Vielleicht braucht eine Targeting-Region für die volle Funktionalität auch Membran-



insertions-Signale, wie für PMP70 und PEX11 $\beta$  bereits gezeigt werden konnte (Sacksteder et al., 2000).

In dieser Arbeit konnten keine Hinweise für das Bestehen von zwei verschiedenen Targeting-Signalen innerhalb des ALDP erhoben werden. In anderen Studien wurden jedoch zwei voneinander unabhängige Targeting-Signale in einigen peroxisomalen Membran-Proteinen wie PMP34, PMP47 und PMP22 beschrieben (Jones et al., 2001, Wang et al., 2001, Brosius et al., 2002). Da bei den in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteinen das GFP COOH-terminal an das ALDP angehängt wurde, könnte theoretisch ein mögliches COOH-terminal gelegenes Targeting-Signal durch das GFP maskiert werden. Eine solche Maskierung wurde für PMP22 beschrieben (Brosius et al., 2002). Allerdings wurden NH<sub>2</sub>-terminale „native“ Deletionskonstrukte ohne Fusionsprotein (186-745 ALDP und 282-745 ALDP) ebenfalls nicht an das Peroxisom geleitet, so dass ein zweites COOH-terminal gelegenes Targeting-Signal höchst unwahrscheinlich erscheint.

Als Sekundärstruktur wird für die in ALDP identifizierte Targeting-Region (67-110) eine  $\alpha$ -Helix durch das Programm PHDsec vorausgesagt (Rost and Sander, 1993). Konservierte Aminosäuren sind auf einer Seite dieser Helix lokalisiert und könnten den Kern eines möglichen Targeting-Signals darstellen. Außerdem sind sechs basische Aminosäuren in der ersten Helix zwischen Transmembran-Segment 1 und 2 lokalisiert, von denen drei ein so genanntes basisches „Cluster“ bilden [RKXXR] (Aminosäuren 124-128). Das Vorhandensein eines basischen Clusters mit Ausrichtung in die peroxisomale Matrix wurde als ein wichtiges Element für das Targeting von peroxisomalen Membran-Proteinen (Gruppe mPTS1) diskutiert (Wang et al., 2001). Es existiert zusätzlich ein zweiter in das Zytosol gerichteter Cluster basischer Aminosäuren am NH<sub>2</sub>-Terminus des ALDP [RXRX<sub>2</sub>RX<sub>4</sub>KR] (Aminosäuren 6-17). Diese Ansammlung von basischen Aminosäuren könnte ein Element für die Verstärkung eines Targeting-Signals darstellen, da Konstrukte, die den NH<sub>2</sub>-Terminus beinhalten (1-110 ALDP-GFP und 1-164 ALDP-GFP), signifikant mehr an das Peroxisom transloziert werden als das Konstrukt ohne NH<sub>2</sub>-Terminus (67-164 ALDP-GFP) (Tabelle 4.3, Seite 54).

Allgemein wird angenommen, dass essentielle biologische Mechanismen zwischen gleichartigen Proteinen hoch konserviert sind. So konnte für

peroxisomale Matrix-Proteine gezeigt werden, dass eine Konservierung des PTS1-Signals innerhalb der Evolution besteht (Keller et al., 1991). In der vorliegenden Arbeit ließ sich die funktionelle Konservierung der Targeting-Region zwischen dem humanen ALDP und seinem orthologen Hefe-Protein Pxa1 zeigen. Dabei wurde die 67-164 ALDP entsprechende Region in *S. cerevisiae* (71-168 Pxa1) in Säugetierzellen an das Peroxisom transloziert. *S. cerevisiae* ist bereits als ein Modellorganismus für die Untersuchung der Peroxisomen Biogenese etabliert. Der direkte Nachweis der Konservierung des Targeting-Mechanismus zwischen Mensch und Hefe ist der erste Hinweis für eine Konservierung des Targetings auch bei peroxisomalen Membran-Proteinen und bestätigt zudem den Nutzen dieses Organismus bei zukünftigen Protein-Targeting- und Import-Studien. Innerhalb der peroxisomalen humanen ABC-Transporter konnten Hinweise für die Konservierung der Targeting-Region zwischen ALDP und PMP69 erhoben werden. PMP69 ist ein von unserer Arbeitsgruppe und Shani et al. identifizierter peroxisomaler ABC-Transporter, der eine Aminosäuren-Identität von 26,1% mit ALDP zeigt (Holzinger et al., 1997b, Shani et al., 1997). PMP70 ist ein weiterer humaner peroxisomaler ABC-Transporter, der an der Oxidation von langkettigen Fettsäuren beteiligt sein könnte. Eine Konservierung der entsprechenden Region zwischen ALDP und PMP70 (Aminosäuren 59-156) konnte in dieser Arbeit experimentell nicht bestätigt werden. Dies entspricht den von Sacksteder et al. publizierten Ergebnissen, denen zufolge die NH<sub>2</sub>-terminalen 61 Aminosäuren des PMP70 die für das Targeting nötige Information beinhalten (Sacksteder et al., 2000). Das Targeting des ALDP ist also innerhalb der Subgruppe der humanen peroxisomalen ABC-Transporter nur teilweise konserviert.

Im dritten Teil der Arbeit wurde innerhalb der identifizierten Region gezielt nach dem Targeting-Motiv gesucht. Ein neues 14 Aminosäuren umfassendes Motiv konnte dabei durch Computer-gestützte Analysen identifiziert werden (Aminosäuren 71-84 im ALDP, Abbildung 4.8, Seite 60). Mit diesem Motiv wurde eine umfassende Proteindatenbank durchsucht, wobei nur Ergebnisse mit einem E-Wert von  $\leq 0,061$  akzeptiert wurden. Der E-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit von zufälligen und damit unspezifischen Suchergebnissen in Proteindatenbanken an und wurde klein genug gewählt, um die Anzahl unspezifischer Ergebnisse bei der

Datenbanksuche zu minimieren. Da das 14 Aminosäuren umfassende Motiv ausschließlich peroxisomale ABC-Transporter in der Datenbank identifizierte, kann postuliert werden, dass es sich um ein für peroxisomale ABC-Transporter wichtiges Motiv handelt. Bei Konstrukten, die dieses Motiv entweder nicht beinhalten (87-164 ALDP-GFP) oder die nur eine Hälfte des Motivs beinhalten (78-164 ALDP-GFP), wurde kein peroxisomales Targeting in der Fluoreszenzmikroskopie festgestellt und somit die funktionelle Relevanz dieses Motivs als mögliches Targeting-Signal des ALDPs unterstrichen. Dieses Motiv liegt unmittelbar vor dem ersten Transmembran-Segment in einem Transmembran-Topologie-Modell des ALDP. Unter verschiedenen einzelnen Aminosäure-Substitutionen wurde die Targeting-Effizienz lediglich bei dem 67-164 ALDP(L78F)-GFP Konstrukt signifikant im Vergleich zu dem nicht mutierten 67-164 ALDP-GFP Konstrukt vermindert. Bei einem Konstrukt, bei dem drei Aminosäuren innerhalb des Targeting-Motivs deletiert sind (del78-80LLR), wird kein peroxisomales Targeting beobachtet. Dieses Fusionsprotein wird in Strukturen, die als Mitochondrien identifiziert werden konnten, sowie in den Zellkern fehlgeleitet. Die del78-80LLR in-frame Deletion wurde im Verlauf dieser Dissertationsarbeit bei zwei Geschwistern beschrieben, die an einer milderer Form der X-ALD, der Adrenomyeloneuropathie, leiden (Wichers et al., 1999). Dies stellt somit die erste X-ALD Mutation dar, bei der die molekulare Pathogenese (fehlendes Targeting) für die Erkrankung geklärt werden konnte. Interessanterweise sind die wenigen bekannten Mutationen innerhalb des Targeting-Motivs entweder Deletionen oder Insertionen von mehr als einer Aminosäure (78-80delLLR (Wichers et al., 1999); 80-81insFA (E. Maier, nicht publizierte Daten); 81-82insLRL (Smith et al., 1999)). Einzelne Aminosäure-Mutationen innerhalb des Targeting-Motivs wurden bis jetzt bei X-ALD Patienten nicht beschrieben und stören die Funktion dieser Region wahrscheinlich nicht. Das Targeting-Motiv des ALDP zeigt keine primären Strukturähnlichkeiten zu anderen bekannten peroxisomalen Targeting-Sequenzen. Seine Lage innerhalb des ALDP Topologie Modells hat aber die Charakteristika eines mPTS1 Motivs: (i) die Targeting-Information ist lokalisiert in einem dem Zytoplasma zugewandten Aminosäuren-Bereich; (ii) die Targeting-Region ist lokalisiert NH<sub>2</sub>-terminal zu

einem Transmembran-Segment, das vielleicht für die Verankerung und die Insertion in die peroxisomale Membran notwendig ist; (iii) ein Cluster aus basischen Aminosäuren ist notwendig für das Targeting.

Das hier neu identifizierte peroxisomale Targeting-Signal kann entweder ALDP selbst an das Peroxisom leiten oder es kann die Bindungsstelle für einen Rezeptor darstellen. Solche Rezeptoren wurden für peroxisomale Matrix-Proteine identifiziert (Pex5p und Pex7p), die PTS1 bzw. PTS2-tragende Proteine binden und an das Peroxisom translozieren. Unsere und andere Arbeitsgruppen publizierten die Interaktion des Pex19-Protein mit ALDP (Gloeckner et al., 2000) sowie mit einer Vielzahl anderer peroxisomaler Membran-Proteine (Snyder et al., 2000, Sacksteder et al., 2000, Brosius et al., 2002). Beide Regionen, die Targeting-Region und die Pex19p-Bindungsregion, liegen innerhalb der NH<sub>2</sub>-terminalen 281 Aminosäuren. Dies kann zur Hypothese führen, dass Pex19p ein Targeting-Rezeptor für ALDP ist. Gegen diese Hypothese sprechen die Ergebnisse von zwei anderen Arbeitsgruppen, die im Falle von humanen und Hefen-Pex3p, Pex12p sowie von Hefen-Pex10p, Pex13p und Pex22p unterschiedliche Regionen für das Targeting und die Pex19p-Bindung identifizierten (Fransen et al., 2001, Snyder et al., 2000). Fransen et al. beschrieben zudem, dass bei humanem Pex13p und Pex16p die Pex19p-Bindungsregionen und die Targeting-Regionen zwar physisch überlappen, aber dennoch funktionell unterschiedlich sind (Fransen et al., 2001). Die Rolle des Pex19p als Rezeptor für Targeting-Signale peroxisomaler Transmembran-Proteine muss daher in weiteren Studien geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

Peroxisomales Targeting und Import von Proteinen in Peroxisomen sind für die Entstehung, Wachstum und Funktion von Peroxisomen entscheidend. Ziel dieser Dissertation war, die Region und das Aminosäure-Motiv innerhalb des Adrenoleukodystrophie-Proteins (ALDP) zu identifizieren, welches für das peroxisomale Targeting erforderlich ist. Dieses peroxisomale Membran-Protein ist defekt oder fehlend bei der X-gebundenen Adrenoleukodystrophie, einer überwiegend in der Kindheit auftretenden letalen neurodegenerativen Erkrankung. Unter Verwendung von Deletions- und GFP-Fusionsprotein-Konstrukten konnte die für das peroxisomale Targeting notwendige Region des humanen ALDP auf die Aminosäuren 67-110 eingegrenzt werden. Dabei sind die NH<sub>2</sub>-terminalen 66 Aminosäuren des ALDP für das peroxisomale Targeting zwar nicht notwendig, sie erhöhen jedoch die Targeting-Effektivität insgesamt. Die für das Targeting notwendige Region ist allerdings alleine nicht ausreichend, um ein Fusionsprotein an das Peroxisom zu leiten. Zusätzliche Aminosäuren scheinen für die Stabilisierung und Insertion in die peroxisomale Membran notwendig zu sein, da die Aminosäure-Regionen 1-110 und 67-164 ein Fusionsprotein an das Peroxisom dirigieren können. GFP-Fusionsproteine der dem 67-164 ALDP entsprechenden Regionen des humanen peroxisomalen Membran-Proteins 69 und des Pxa1 der Hefe wurden ebenfalls an das Peroxisom geführt. Damit konnte eine partielle Konservierung der Targeting-Region innerhalb der humanen peroxisomalen ABC-Transporter und zwischen Hefe und Mensch gezeigt werden. Die Targeting-Region beinhaltet ein 14 Aminosäuren (71-84) umfassendes konserviertes Motiv. Eine Deletion des gesamten Motivs oder von Teilen dieses Motivs führt zu einem Verlust des peroxisomalen Targetings des ALDP. Von den getesteten Mutationen einzelner Aminosäuren bewirkt lediglich die Substitution L78F eine signifikante Verminderung der Targeting-Effektivität. Dagegen führt die bei zwei X-ALD Patienten beobachtete Deletion von drei Aminosäuren innerhalb des Motivs zu einem Verlust des peroxisomalen Targetings mit einer partiellen Anreicherung des GFP-Fusionsproteins in Mitochondrien und gibt somit Aufschluss über die molekulare Ätiologie ihrer Erkrankung.

## 7 Literaturverzeichnis

- Amery, L., Brees, C., Baes, M., Setoyama, C., Miura, R., Mannaerts, G. P. and Van Veldhoven, P. P. (1998) *Biochem J*, **336**, 367-371.
- Ames, G. F., Mimura, C. S. and Shyamala, V. (1990) *FEMS Microbiol Rev*, **6**, 429-46.
- Baerends, R. J., Faber, K. N., Kram, A. M., Kiel, J. A., van Der Klei, I. J. and Veenhuis, M. (2000) *J Biol Chem*, **275**, 9986-9995.
- Bailey, T. L. and Gribskov, M. (1998) *Bioinformatics*, **14**, 48-54.
- Bezman, L., Moser, A. B., Raymond, G. V., Rinaldo, P., Watkins, P. A., Smith, K. D., Kass, N. E. and Moser, H. W. (2001) *Ann Neurol*, **49**, 512-7.
- Bodnar, A. G. and Rachubinski, R. A. (1991) *Biochem Cell Biol*, **69**, 499-508.
- Bout, A., Teunissen, Y., Hashimoto, T., Benne, R. and Tager, J. M. (1988) *Nucleic Acids Res*, **16**, 10369.
- Braverman, N., Dodt, G., Gould, S. J. and Valle, D. (1998) *Hum Mol Genet*, **7**, 1195-205.
- Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S. J. and Valle, D. (1997) *Nat Genet*, **15**, 369-76.
- Brosius, U., Dehmel, T. and Gartner, J. (2001) *J Biol Chem*, **5**, 5.
- Brosius, U., Dehmel, T. and Gartner, J. (2002) *J Biol Chem*, **277**, 774-84.
- Cleves, A. E., Cooper, D. N., Barondes, S. H. and Kelly, R. B. (1996) *J Cell Biol*, **133**, 1017-26.
- Contreras, M., Sengupta, T. K., Sheikh, F., Aubourg, P. and Singh, I. (1996) *Arch Biochem Biophys*, **334**, 369-79.
- Cserzo, M., Bernassau, J. M., Simon, I. and Maigret, B. (1994) *J Mol Biol*, **243**, 388-96.
- Dassa, E. and Hofnung, M. (1985) *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **136A**, 281-8.
- De Duve, C. and Baudhuin, P. (1966) *Physiol Rev*, **46**, 323-57.
- de Vet, E. C., Prinsen, H. C. and van den Bosch, H. (1998) *Biochem Biophys Res Commun*, **242**, 277-81.
- de Vet, E. C., van den Broek, B. T. and van den Bosch, H. (1997) *Biochim Biophys Acta*, **1346**, 25-9.
- Dyer, J. M., McNew, J. A. and Goodman, J. M. (1996) *J Cell Biol*, **133**, 269-80.

- Eitzen, G. A., Aitchison, J. D., Szilard, R. K., Veenhuis, M., Nuttley, W. M. and Rachubinski, R. A. (1995) *J Biol Chem*, **270**, 1429-36.
- Elgersma, Y., Kwast, L., Klein, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., Metzigg, B., America, T., Tabak, H. F. and Distel, B. (1996) *J Cell Biol*, **135**, 97-109.
- Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W. B., Distel, B., Subramani, S. and Tabak, H. F. (1997) *Embo J*, **16**, 7326-41.
- Elgersma, Y., van Roermund, C. W., Wanders, R. J. and Tabak, H. F. (1995) *Embo J*, **14**, 3472-9.
- Faber, K. N., Keizer-Gunnink, I., Pluim, D., Harder, W., Ab, G. and Veenhuis, M. (1995) *FEBS Lett*, **357**, 115-20.
- Fairbairn, L. J. and Tanner, M. J. (1989) *Nucleic Acids Res*, **17**, 3588.
- Flavigny, E., Sanhaj, A., Aubourg, P. and Cartier, N. (1999) *FEBS Lett*, **448**, 261-4.
- Fransen, M., Vastiau, I., Brees, C., Brys, V., Mannaerts, G. P. and Van Veldhoven, P. P. (2004) *J Biol Chem*, **279**, 12615-24.
- Fransen, M., Wylin, T., Brees, C., Mannaerts, G. P. and Van Veldhoven, P. P. (2001) *Mol Cell Biol*, **21**, 4413-24.
- Fujiki, Y. (2000) *FEBS Lett*, **476**, 42-46.
- Fujiki, Y., Rachubinski, R. A. and Lazarow, P. B. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 7127-31.
- Gärtner, J., Braun, A., Holzinger, A., Roerig, P., Lenard, H. G. and Roscher, A. A. (1998) *Neuropediatrics*, **29**, 3-13.
- Gietl, C., Faber, K. N., van der Klei, I. J. and Veenhuis, M. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3151-5.
- Gietl, C., Lehnerer, M. and Olsen, O. (1990) *Plant Mol Biol*, **14**, 1019-30.
- Girzalsky, W., Rehling, P., Stein, K., Kipper, J., Blank, L., Kunau, W. H. and Erdmann, R. (1999) *J Cell Biol*, **144**, 1151-1162.
- Gloeckner, C. J., Mayerhofer, P. U., Landgraf, P., Muntau, A. C., Holzinger, A., Gerber, J. K., Kammerer, S., Adamski, J. and Roscher, A. A. (2000) *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 144-150.
- Goldman, B. M. and Blobel, G. (1978) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 5066-70.
- Gould, S. G., Keller, G. A. and Subramani, S. (1987) *J Cell Biol*, **105**, 2923-31.
- Gould, S. J., Kalish, J. E., Morrell, J. C., Bjorkman, J., Urquhart, A. J. and Crane, D. I. (1996) *J Cell Biol*, **135**, 85-95.

- Gould, S. J., Raymond, G. V. and Valle, D. (2001) In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. 2 (Eds, Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D.) McGraw-Hill, New York, pp. 3181-3217.
- Heinzer, A. K., Kemp, S., Lu, J. F., Watkins, P. A. and Smith, K. D. (2002) *J Biol Chem*, **4**, 4.
- Higgins, C. F. (1992) *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 67-113.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W. and et al. (1986) *Nature*, **323**, 448-50.
- Holland, I. B. and Blight, M. A. (1999) *J Mol Biol*, **293**, 381-99.
- Holttä, E. (1977) *Biochemistry*, **16**, 91-100.
- Holzinger, A., Kammerer, S., Berger, J. and Roscher, A. A. (1997a) *Biochem Biophys Res Commun*, **239**, 261-4.
- Holzinger, A., Kammerer, S. and Roscher, A. A. (1997b) *Biochem Biophys Res Commun*, **237**, 152-7.
- Holzinger, A., Muntau, A., Mayerhofer, P., Kammerer, S., Albet, S., Bugaut, M. and Roscher, A. A. (1998a) *FEBS Lett*, **433**, 179-83.
- Holzinger, A., Roscher, A. A., Landgraf, P., Lichtner, P. and Kammerer, S. (1998b) *FEBS Lett*, **426**, 238-42.
- Honsho, M. and Fujiki, Y. (2000) *J Biol Chem*, **19**, 19.
- Huhse, B., Rehling, P., Albertini, M., Blank, L., Meller, K. and Kunau, W. H. (1998) *J Cell Biol*, **140**, 49-60.
- Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E. and Higgins, C. F. (1990) *Nature*, **346**, 362-5.
- Imanaka, T., Shiina, Y., Takano, T., Hashimoto, T. and Osumi, T. (1996) *J Biol Chem*, **271**, 3706-13.
- Johnson, M. A., Snyder, W. B., Lin Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S. and Cregg, J. M. (2001) *Yeast*, **18**, 621-41.
- Jones, J. M., Morrell, J. C. and Gould, S. J. (2001) *J Cell Biol*, **153**, 1141-50.
- Jones, J. M., Morrell, J. C. and Gould, S. J. (2004) *J Cell Biol*, **164**, 57-67.
- Jones, J. M., Nau, K., Geraghty, M. T., Erdmann, R. and Gould, S. J. (1999) *J Biol Chem*, **274**, 9216-23.



- Just, W. W. and Hartl, F. U. (1987) *Peroxisomes in Biology and Medicine*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. and Hashimoto, T. (1990) *J Biol Chem*, **265**, 4534-40.
- Kammerer, S., Holzinger, A., Welsch, U. and Roscher, A. A. (1998) *FEBS Lett*, **429**, 53-60.
- Keller, G. A., Krisans, S., Gould, S. J., Sommer, J. M., Wang, C. C., Schliebs, W., Kunau, W., Brody, S. and Subramani, S. (1991) *J Cell Biol*, **114**, 893-904.
- Kemp, S., Wei, H. M., Lu, J. F., Braiterman, L. T., McGuinness, M. C., Moser, A. B., Watkins, P. A. and Smith, K. D. (1998) *Nat Med*, **4**, 1261-8.
- Koller, A., Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Rangell, L., Keller, G. A., Subramani, S., Lumb, M. J., Drake, A. F., Danpure, C. J., Ofman, R., Hogenhout, E. M. and Wanders, R. J. (1999) *J Cell Biol*, **146**, 99-112.
- Kragler, F., Langeder, A., Raupachova, J., Binder, M. and Hartig, A. (1993) *J Cell Biol*, **120**, 665-73.
- Krisans, S. K. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol*, **7**, 358-64.
- Krisans, S. K., Thompson, S. L., Pena, L. A., Kok, E. and Javitt, N. B. (1985) *J Lipid Res*, **26**, 1324-32.
- Kumar, A. J., Rosenbaum, A. E., Naidu, S., Wener, L., Citrin, C. M., Lindenberg, R., Kim, W. S., Zinreich, S. J., Molliver, M. E., Mayberg, H. S. and et al. (1987) *Radiology*, **165**, 497-504.
- Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J. and Hartig, A. (1998) *J Biol Chem*, **273**, 33635-43.
- Lazarow, P. B. (1995) *J Neuropathol Exp Neurol*, **54**, 720-5.
- Lazarow, P. B. and Fujiki, Y. (1985) *Annu Rev Cell Biol*, **1**, 489-530.
- Lazo, O., Contreras, M., Hashmi, M., Stanley, W., Irazu, C. and Singh, I. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7647-51.
- Lee, J. G., Cho, S. P., Lee, H. S., Lee, C. H., Bae, K. S. and Maeng, P. J. (2000) *J Biochem (Tokyo)*, **128**, 1059-1072.
- Liu, L. X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R. and Aubourg, P. (1999) *J Biol Chem*, **274**, 32738-43.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. and Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York.

- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. and Kunau, W. H. (1994) *Embo J*, **13**, 4908-18.
- McCammon, M. T., McNew, J. A., Willy, P. J. and Goodman, J. M. (1994) *J Cell Biol*, **124**, 915-25.
- McCollum, D., Monosov, E. and Subramani, S. (1993) *J Cell Biol*, **121**, 761-74.
- Mihalik, S. J. and Rhead, W. J. (1991) *J Comp Physiol [B]*, **160**, 671-6.
- Miura, S., Kasuya-Arai, I., Mori, H., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T. and Fujiki, Y. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 14405-11.
- Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Ohno, K., Miura, S. and Fujiki, Y. (1989) *Mol Cell Biol*, **9**, 83-91.
- Moller, G., Luders, J., Markus, M., Husen, B., Van Veldhoven, P. P. and Adamski, J. (1999) *J Cell Biochem*, **73**, 70-8.
- Moser, H. W. (1997) *Brain*, **120**, 1485-508.
- Moser, H. W., Smith, K. D. and Moser, A. B. (2001) In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. 2 (Eds, Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, S. W. and Valle, D.) McGraw-Hill, New York, pp. 3257-3301.
- Mosser, J., Douar, A. M., Sarde, C. O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L. and Aubourg, P. (1993) *Nature*, **361**, 726-30.
- Mosser, J., Lutz, Y., Stoeckel, M. E., Sarde, C. O., Kretz, C., Douar, A. M., Lopez, J., Aubourg, P. and Mandel, J. L. (1994) *Hum Mol Genet*, **3**, 265-71.
- Motley, A. M., Hetteema, E. H., Hogenhout, E. M., Brites, P., ten Asbroek, A. L., Wijburg, F. A., Baas, F., Heijmans, H. S., Tabak, H. F., Wanders, R. J. and Distel, B. (1997) *Nat Genet*, **15**, 377-80.
- Netik, A., Forss-Petter, S., Holzinger, A., Molzer, B., Unterrainer, G. and Berger, J. (1999) *Hum Mol Genet*, **8**, 907-13.
- Noguchi, T. and Takada, Y. (1978) *J Biol Chem*, **253**, 7598-600.
- Noguchi, T. and Takada, Y. (1979) *Arch Biochem Biophys*, **196**, 645-7.
- Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S. and Hashimoto, T. (1991) *Biochem Biophys Res Commun*, **181**, 947-54.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N. and Fujiki, Y. (2000) *J Biol Chem*, **14**, 14.
- Pai, G. S., Khan, M., Barbosa, E., Key, L. L., Craver, J. R., Cure, J. K., Betros, R. and Singh, I. (2000) *Mol Genet Metab*, **69**, 312-22.

- Pause, B., Saffrich, R., Hunziker, A., Ansorge, W. and Just, W. W. (2000) *FEBS Lett*, **471**, 23-28.
- Pedersen, J. I. and Gustafsson, J. (1980) *FEBS Lett*, **121**, 345-8.
- Poulos, A., Singh, H., Paton, B., Sharp, P. and Derwas, N. (1986) *Clin Genet*, **29**, 397-408.
- Powers, J. M., Liu, Y., Moser, A. B. and Moser, H. W. (1992) *J Neuropathol Exp Neurol*, **51**, 630-43.
- Purdue, P. E. and Lazarow, P. B. (1996) *J Cell Biol*, **134**, 849-62.
- Purdue, P. E., Yang, X. and Lazarow, P. B. (1998) *J Cell Biol*, **143**, 1859-69.
- Purdue, P. E., Zhang, J. W., Skoneczny, M. and Lazarow, P. B. (1997) *Nat Genet*, **15**, 381-4.
- Rachubinski, R. A. and Subramani, S. (1995) *Cell*, **83**, 525-8.
- Reguenga, C., Oliveira, M. E., Gouveia, A. M., Eckerskorn, C., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (1999) *Biochim Biophys Acta*, **1445**, 337-41.
- Rehling, P., Marzioch, M., Niesen, F., Wittke, E., Veenhuis, M. and Kunau, W. H. (1996) *Embo J*, **15**, 2901-13.
- Rehling, P., Skaletz-Rorowski, A., Girzalsky, W., Voorn-Brouwer, T., Franse, M. M., Distel, B., Veenhuis, M., Kunau, W. H. and Erdmann, R. (2000) *J Biol Chem*, **275**, 3593-602.
- Rizzo, W. B., Avigan, J., Chemke, J. and Schulman, J. D. (1984) *Neurology*, **34**, 163-9.
- Rizzo, W. B., Leshner, R. T., Odone, A., Dammann, A. L., Craft, D. A., Jensen, M. E., Jennings, S. S., Davis, S., Jaitly, R. and Sgro, J. A. (1989) *Neurology*, **39**, 1415-22.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) *J Mol Biol*, **232**, 584-99.
- Rost, B. and Sander, C. (1994) *Proteins*, **19**, 55-72.
- Rottensteiner, H., Kramer, A., Lorenzen, S., Stein, K., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R. and Erdmann, R. (2004) *Mol Biol Cell*, **15**, 3406-17.
- Sacksteder, K. A. and Gould, S. J. (2000) *Annu Rev Genet*, **34**, 623-652.
- Sacksteder, K. A., Jones, J. M., South, S. T., Li, X., Liu, Y. and Gould, S. J. (2000) *J Cell Biol*, **148**, 931-944.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.

- Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M. and Valle, D. (1997) *Hum Mol Genet*, **6**, 1925-31.
- Shani, N., Sapag, A. and Valle, D. (1996) *J Biol Chem*, **271**, 8725-30.
- Shani, N., Watkins, P. A. and Valle, D. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6012-6.
- Singh, I., Moser, A. E., Moser, H. W. and Kishimoto, Y. (1984) *Pediatr Res*, **18**, 286-90.
- Singh, I., Pahan, K. and Khan, M. (1998) *FEBS Lett*, **426**, 342-6.
- Small, G. M., Szabo, L. J. and Lazarow, P. B. (1988) *Embo J*, **7**, 1167-73.
- Smith, K. D., Kemp, S., Braiterman, L. T., Lu, J. F., Wei, H. M., Geraghty, M., Stetten, G., Bergin, J. S., Pevsner, J. and Watkins, P. A. (1999) *Neurochem Res*, **24**, 521-35.
- Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Koller, A., GH, L. e., Rangell, L., Keller, G. A. and Subramani, S. (1999a) *Mol Biol Cell*, **10**, 1745-1761.
- Snyder, W. B., Koller, A., Choy, A. J., Johnson, M. A., Cregg, J. M., Rangell, L., Keller, G. A. and Subramani, S. (1999b) *Mol Biol Cell*, **10**, 4005-19.
- Snyder, W. B., Koller, A., Choy, A. J. and Subramani, S. (2000) *J Cell Biol*, **149**, 1171-1178.
- Subramani, S. (1992) *J Membr Biol*, **125**, 99-106.
- Subramani, S. (1998) *Physiol Rev*, **78**, 171-88.
- Suzuki, Y., Orii, T., Takiguchi, M., Mori, M., Hijikata, M. and Hashimoto, T. (1987) *J Biochem (Tokyo)*, **101**, 491-6.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. and Subramani, S. (1991) *Embo J*, **10**, 3255-62.
- Terlecky, S. R., Nuttley, W. M., McCollum, D., Sock, E. and Subramani, S. (1995) *Embo J*, **14**, 3627-34.
- Titorenko, V. I. and Rachubinski, R. A. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 357-68.
- Van der Leij, I., Franse, M. M., Elgersma, Y., Distel, B. and Tabak, H. F. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11782-6.
- van Geel, B. M., Assies, J., Wanders, R. J. and Barth, P. G. (1997) *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **63**, 4-14.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982) *Embo J*, **1**, 945-51.
- Walton, P. A., Hill, P. E. and Subramani, S. (1995) *Mol Biol Cell*, **6**, 675-83.

- Wanders, R. J., Heymans, H. S., Schutgens, R. B., Barth, P. G., van den Bosch, H. and Tager, J. M. (1988a) *J Neurol Sci*, **88**, 1-39.
- Wanders, R. J., van Roermund, C. W., van Wijland, M. J., Nijenhuis, A. A., Tromp, A., Schutgens, R. B., Brouwer-Kelder, E. M., Schram, A. W., Tager, J. M., van den Bosch, H. and et al. (1987) *Clin Chim Acta*, **165**, 321-9.
- Wanders, R. J., van Roermund, C. W., van Wijland, M. J., Schutgens, R. B., van den Bosch, H., Schram, A. W. and Tager, J. M. (1988b) *Biochem Biophys Res Commun*, **153**, 618-24.
- Wang, X., Unruh, M. J. and Goodman, J. M. (2001) *J Biol Chem*, **276**, 10897-905.
- Waterham, H. R., Titorenko, V. I., Haima, P., Cregg, J. M., Harder, W. and Veenhuis, M. (1994) *J Cell Biol*, **127**, 737-49.
- Wendland, M. and Subramani, S. (1993) *J Cell Biol*, **120**, 675-85.
- Wichers, M., Kohler, W., Brennemann, W., Boese, V., Sokolowski, P., Bidlingmaier, F. and Ludwig, M. (1999) *Hum Genet*, **105**, 116-9.
- Wiemer, E. A., Terlecky, S. R., Nuttley, W. M. and Subramani, S. (1995) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 637-48.
- Wiemer, E. A. C., Luers, G. H., Faber, K. N., Wenzel, T., Veenhuis, M. and Subramani, S. (1996) *J Biol Chem*, **271**, 18973-80.
- Zhang, J. W. and Lazarow, P. B. (1996) *J Cell Biol*, **132**, 325-34.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding cassette-Transporter
acALD	Adulte cerebrale Form der X-ALD
ALDP	Adrenoleukodystrophie-Protein
ALDRp	Adrenoleukodystrophie-related-Protein
AMN	Adrenomyeloneuropathie, eine milde Form der X-ALD
ATP	Adenosin-tri-Phosphat
ccALD	Childhood Cerebral X-ALD
CT	Computertomographie
ddNTP	di-desoxy-Nukleotid-tri-Phosphat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-tri-Phosphat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
mPTS	Peroxisomales Targeting-Signal von Membran-Proteinen
NBF	Nuclear binding folds
NMR	Nuclear magnet resonance tomography
PCR	Polymerasen Kettenreaktion
Pex	Kurzbezeichnung für Peroxine
PMP	Peroxisomales Membran-Protein
PMP69	Peroxisomales Membran-Protein 69 kDa
PMP70	Peroxisomales Membran-Protein 70 kDa
PTS	Peroxisomales Targeting-Signal
RNA	Ribonukleinsäuren
TMD	Transmembran-Domäne
VLCFA	Very long chain fatty acids; überlangkettige Fettsäuren
X-ALD	X-gebundene Adrenoleukodystrophie

9 Anhang

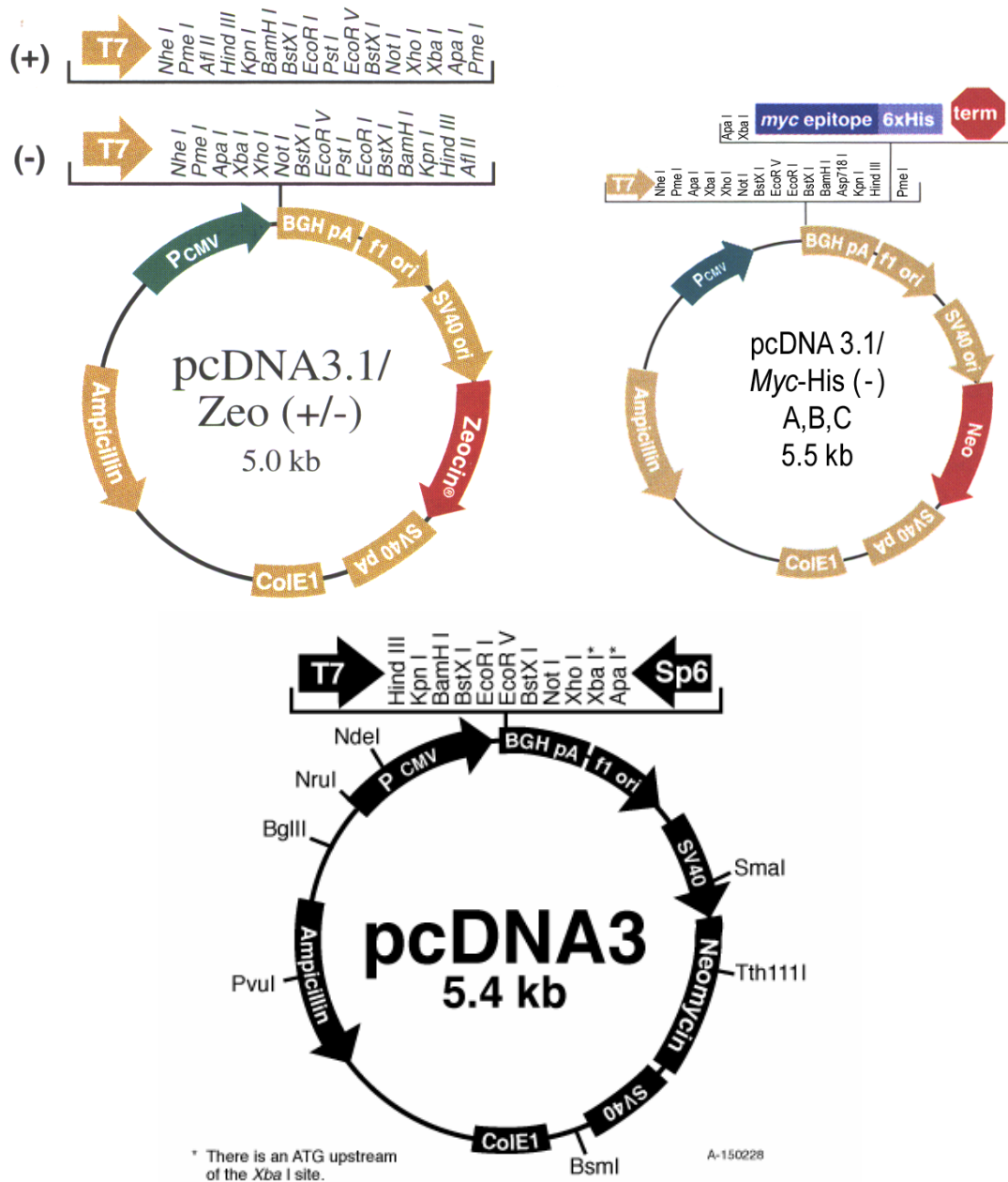
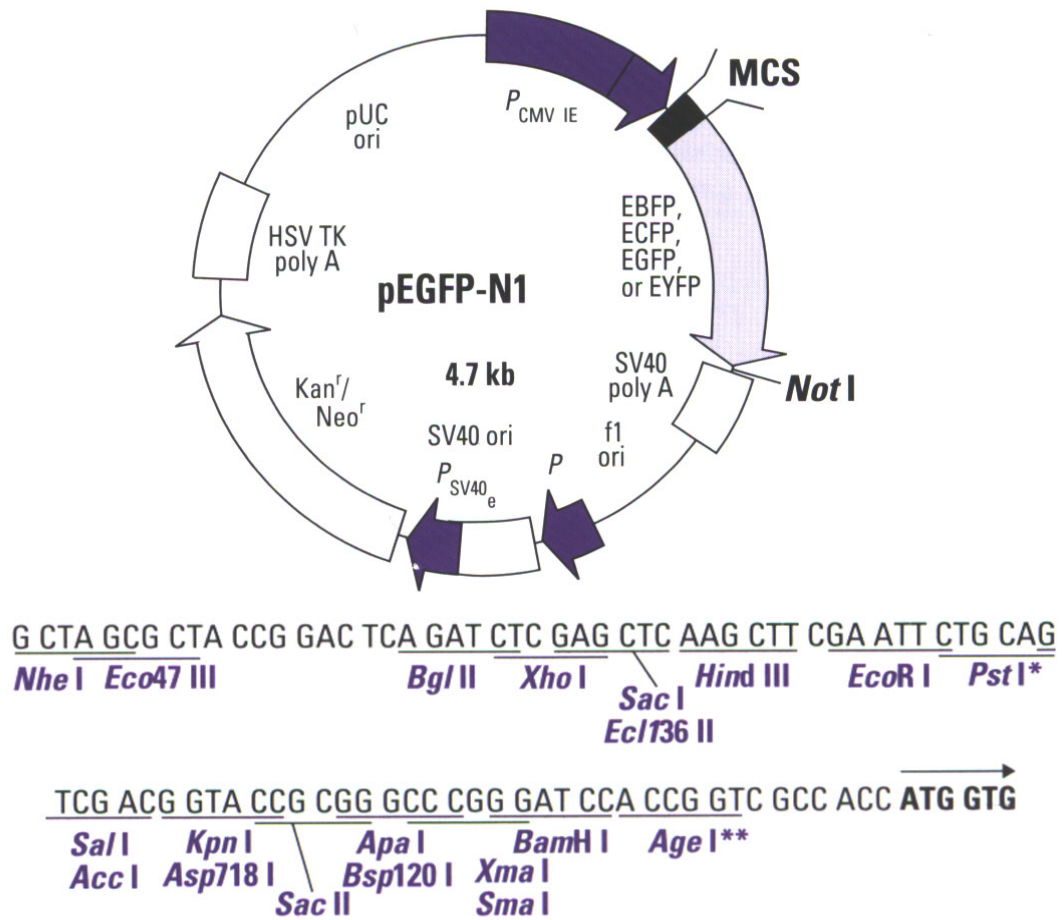


Abbildung 9.1. Vektorenkarten der in dieser Arbeit verwendeten pcDNA Vektoren mit den Restriktionsschnittstellen der Multiple Cloning Site (MCS)



**Abbildung 9.2.** Die Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Fusionsprotein-Vektors mit den Restriktionsschnittstellen der Multiple Cloning Site (MCS).



Konstrukt	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperatur [°C]	Fragmentlänge [bp]
ALDHis pcDNA3	„ALD30“ 5'-GGC ATG CAT CTG CTC ATC A-3'	„ALDHisStopKpnI“ 5'-GC <u>GGT ACC</u> CTA (ATG) <sub>6</sub> GGT GGA GGC ACC CTG GAG GCC ACC A-3'	56	758
ALDHA pcDNA3	„ALD18“ 5'-ATC CGA GGC CAG GTG GTG-3'	„ALD no Stop NotI SphI reverse“ 5'-AA <u>GCA TGC GCG</u> <u>GCC GC</u> GGT GGA GGC ACC CTG GAG GCC-3'	55	848
ALDRpcDNA3.1(-)/ mycHis VersionB	„ALDRXbaI forward“ 5'-GC <u>TCT AGA</u> ATG ACA CAT ATG CTA AAT GCA G-3'	„ALDR XbaI reverse“ 5'-CG <u>TCT AGA</u> GAT GTC TCA TCT TCA TTT TTA ATT G-3'	60	2300
PMP70His pcDNA3	„PMP5“ 5'-TTG GAT GGA CGT ACT CAG TG-3'	„PMPHis StopStopXhoI“ 5'-G <u>CTC GAG</u> TCA CTA (ATG) <sub>6</sub> AGA GCC AAA CTC AAC TGT ATC-3'	56	310
PMP70HA pcDNA3.1/ Zeo(+)	„PMP5“ siehe oben	„P70NotIHA StopXhoI reverse“ 5'-G <u>CTC GAG</u> CTA <b>AGC GTA GTC TGG</b> <b>GAC GTC GTA TGG</b> <b>GTA T<sup>*</sup>GC GGC CGC</b> AGA GCC AAA CTC AAC TGT ATC-3'	60	278
PMP70 pcDNA3.1(+)/ mycHis Version A	„T7 Vektorprimer“	„P70 no Stop XhoI reverse“ 5'-G <u>CTC GAG</u> AGA GCC AAA CTC AAC TGT ATC	60	2000

**Tabelle 9.1.** Konstrukte und Primer peroxisomaler ABC-Transporter mit Tags. Die Tabelle zeigt Konstrukt-spezifische Primer, Sequenzen und Eigenschaften der verwendeten Primerpaare, sowie Fragmentlängen der amplifizierten Fragmente. Der Forward-Primer gibt die Sequenz des kodierenden Strangs wieder, während der Reverse-Primer die Sequenz des komplementären Strangs wiedergibt. Die Sequenzen der **Tags** sind dick gedruckt, die der Restriktionsenzym-schnittstellen unterstrichen und die der eingefügten *Start/Stop* Codons kursiv gedruckt.

Konstrukt	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperatur [°C]	Fragmentlänge [bp]
281-745ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> -843 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG CAC TCG CGT GTG GTG GCC-3'	„ALD no Stop <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* GGT GGA GGC ACC CTG GAG GCC-3'	66 (5 Zyklen) 72 (20 Zyklen)	1392
1-281ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> Start forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG CCG GTG CTC TCC AGG CCC-3'	„ALD843 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-G <u>GAA TTC</u> T* GTA GCG CAG CTC CCC CTT CC	66 (5 Zyklen) 72 (20 Zyklen)	840
1-164 ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> Start forward“ siehe oben	„ALD491 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* GCT GCG GAA CGA CAG GGC-3'	55 (5 Zyklen) 74 (20 Zyklen)	491
124-219ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> ATG 369 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG CGC AAG GAC CCG CGG GCT-3'	„ALD656 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* GAG TGG CTT GGT CAG GTT G-3'	55 (5 Zyklen) 74 (20 Zyklen)	287
186-270ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> -555 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG GAC GGG CGG CTT CGC-3'	„ALD809 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* TGC CAC CAG CTC CCC GAA-3'	55 (5 Zyklen) 74 (20 Zyklen)	254
231-336ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> ATG 690 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG CGG GCG GCC CGC TCC CGT-3'	„ALD1007 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* CTT CAT GAG GAA CTG CTC CAG-3'	55 (5 Zyklen) 74 (20 Zyklen)	317
1-110ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> Start forward“ siehe oben	„ALD330 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* ATA CAC CGA CAG GAA GGT GC-3'	55 (5 Zyklen) 72 (20 Zyklen)	349

Konstrukt	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperatur [°C]	Fragmentlänge [bp]
91-134ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> ATG 271 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG ACG GGG CTG CTG GCC CTG-3'	„ALD402 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* CAG CTG CCA GCC AAA AGC C-3'	55 (5 Zyklen) 72 (20 Zyklen)	150
110-134ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> ATG 328 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG TAT GTG GCC CGC CTG GAC-3'	„ALD402 <u>EcoRI</u> reverse“ siehe oben	55 (5 Zyklen) 72 (20 Zyklen)	93
67-134ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> 199 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG AAC CGG GTA TTC CTG CA-3'	„ALD402 <u>EcoRI</u> reverse“ siehe oben	55 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	203
78-164ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> ATG 232 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG CTC CTG CGG CTG CTG TTC-3'	„ALD491 <u>EcoRI</u> reverse“ siehe oben	56 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	261
87-164ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> ATG 259 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG CTG TGC CGG GAG ACG GGG-3'	„ALD491 <u>EcoRI</u> reverse“ siehe oben	56 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	234
67-164ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> 199 forward“ siehe oben	„ALD491 <u>EcoRI</u> reverse“ siehe oben	55 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	293
67-110ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> 199 forward“ siehe oben	„ALD330 <u>EcoRI</u> reverse“ siehe oben	55 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	144
67-87ALD pEGFPN1	„ALD <u>HindIII</u> 199 forward“ siehe oben	„ALD261 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T CAG GAC CCG GGG GAA CAG-3'	55 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	72

Konstrukt	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing Temperatur [°C]	Fragmentlänge [bp]
16-113PMP69 pEGFPN1	„PMP69 <u>HindIII</u> 46 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG TTA GAT CTG CAA TTT CTC CAG-3'	„PMP69 339 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* CTT CCT CCA GCT CAC ATA-3'	50 (5 Zyklen) 72 (25 Zyklen)	294
59-156 PMP70 pEGFPN1	„PMP70 <u>HindIII</u> 175 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG GTG GAC AAA GTG TTT TTC T-3'	„PMP70 468 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* TAC TCG GAA GCA CAG TTT-3'	47 (5 Zyklen) 68 (25 Zyklen)	294
80-177ALDR pEGFPN1	„ALDR <u>HindIII</u> 238 forward“ 5'-CG <u>AAG CTT</u> ATG GTG AAT GCA GAT TTC TTC A-3'	„ALDR531 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* AGT TCT GAA GGC CAA AGC-3'	47 (5 Zyklen) 68 (25 Zyklen)	294
71-168Pxa1 pEGFPN1	„Pxa1 <u>XhoI</u> 211 forward“ 5'-C <u>CTC GAG</u> ATG TTC TAC TCA AAA TTT TTA AAC C-3'	„Pxa1 504 <u>EcoRI</u> reverse“ 5'-C <u>GAA TTC</u> T* TAC CCT AAA GTT TAA ACT CA-3'	47	293

**Tabelle 9.2.** GFP-Fusionsprotein Konstrukte und Primer. Die Tabelle zeigt Konstrukt-spezifische Primer, Sequenzen und Eigenschaften der verwendeten Primerpaare, sowie Fragmentlängen der amplifizierten Fragmente. Der Forward-Primer gibt die Sequenz des kodierenden Strangs wieder, während der Reverse-Primer die Sequenz des komplementären Strangs wiedergibt. Die Sequenzen der **Tags** sind dick, die der Restriktionsenzymschnittstellen unterstrichen und die der eingefügten *Start/Stop* Codons kursiv gedruckt. Die zusätzlichen Basen für den Leserahmen sind mit einem Asterix gekennzeichnet. Wenn bei der Annealing-Temperatur zwei verschiedene Temperaturen angegeben sind, bezeichnet die niedrigere die spezifische Bindungstemperatur an das Template während die höhere die Bindungstemperatur des gesamten Primers darstellt. Die jeweiligen Zyklen sind in Klammern angegeben.

Konstrukt	Insert	Vektor	Kloniert mit (Restriktions- enzyme 5'/3')	Resultierendes Expressions- Tag
ALDHis pcDNA3	ALDHis	pcDNA3	HindIII/ HindIII	(His) <sub>6</sub>
ALDHA pcDNA3	ALD no <i>Stop</i>	pcDNA3 NotI- HA- <i>Stop</i> - XhoI	HindIII/ NotI	HA
ALD pcDNA3.1(+)/ <i>mycHis</i> Version C	ALD no <i>Stop</i>	pcDNA3.1(+)/ <i>mycHis</i> Version C	HindIII/ NotI	<i>Myc</i> und (His) <sub>6</sub>
PMP70His pcDNA3	PMP70His	pcDNA3	BamHI/ XhoI	(His) <sub>6</sub>
PMP70 pcDNA3.1(+)/ <i>mycHis</i> Version A	PMP70 no <i>Stop</i>	pcDNA3.1(+)/ <i>mycHis</i> Version A	BamHI/ XhoI	<i>Myc</i> und (His) <sub>6</sub>
PMP70HA pcDNA3.1/ Zeo(+)	PMP70 no <i>Stop</i>	pcDNA3.1/ Zeo(+)	BamHI/ XhoI	HA
ALDRpcDNA3.1(-)/ <i>mycHis</i> Version B	ALDR no <i>Stop</i>	pcDNA3.1(-)/ <i>mycHis</i> Version B	XbaI/ XbaI	<i>Myc</i> und (His) <sub>6</sub>
PMP69HA pcDNA3.1/ Zeo(+)	PMP69HA	pcDNA3.1/ Zeo(+)	EcoRI/ NotI	HA

**Tabelle 9.3.** Die Expressions-Tag-Konstrukte mit Insert, Vektor, klonierten Restriktionsenzym-schnittstellen und dem resultierenden Expressions-Tag.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. H.B. Hadorn, ehem. Direktor des Dr. v. Haunerschen Kinderspitals, und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt für die Möglichkeit, an ihrer Klinik promovieren zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. A. Roscher für das Überlassen dieses interessanten Themas, die Unterstützung und den Zuspruch während dieser Arbeit. Ich danke meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. A. Holzinger, der mich in die Grundlagen der molekulargenetischen Arbeitsweisen einwies.

Für interessante Diskussionen sowie Rat und Tat bei der experimentellen Durchführung danke ich Herrn Dr. S. Kammerer, Frau Dr. E. M. Maier und Herrn Dr. P. U. Mayerhofer. Ich danke ausserdem Frau Dr. E. Auerswald für die Bereitstellung der Sequenzierereinrichtungen sowie Frau H. Hinz und L. Popp für die technische Unterstützung dabei.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Ehefrau Johanna für die nicht abbreißende Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

(Ro-727/2-2).

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN:

---

Name: Pablo S. Landgraf  
 Geburtsdatum: 26.04.1974  
 Geburtsort: München  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

### AUSBILDUNG

---

1980 - 1984	Grundschule in Gauting
1984- 1988	Otto- v.- Taube- Gymnasium Gauting (Neusprachliches Gymnasium)
1988	Wechsel an das Feodor- Lynen- Gymnasium Planegg (Mathematisch- naturwissenschaftliches Gymnasium)
1990 - 1991	Schüleraustauschjahr in Sonora, Kalifornien, USA
1991 - 1993	Wiedereintritt in das Feodor- Lynen- Gymnasium Planegg.
1993	Abitur (Leistungsfächer: Englisch, Biologie. Grundkurse: Chemie, evangelische Religionslehre)
1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Sept. 1996	Physikum
April 1998	1. Staatsexamen
April 2000	2. Staatsexamen
Aug-Dez.2000	PJ-Tertial Innere Medizin am Inselspital in Bern, Schweiz.
Dez-März 2001	PJ-Tertial Pädiatrie in der Haunerschen Kinderklinik.
März-Juli 2001	PJ-Tertial Chirurgie in der Chirurgischen Klinikum Innenstadt LMU München
Nov. 2001	3. Staatsexamen
Jan. 2002 -Juli 2003	AiP im Dr. v. Haunerschen Kinderspital
Ab Juli 2003	Assistenzarzt im Dr. v. Haunerschen Kinderspital

### ERSATZDIENST

---

1993 - 1994	Rettungsdienst beim Bayrischen Roten Kreuz (BRK), Kreisverband Starnberg. Ausbildung zum Rettungs sanitäter.
-------------	--

### ANDERE TÄTIGKEITEN

---

1993 - 1995	ehrenamtliche Tätigkeit im Katastrophenschutz und Rettungsdienst beim BRK Gauting.
-------------	---

- 1995-1999 Arbeit im Rettungsdienst München als Rettungs-  
sanitäter
- Sommersemester 1998: Co- Assistenz bei den anatomischen Kolloquien  
der Anatomischen Anstalt, LMU München.
- 1998-2000 Nachtwachen im PTCA- Überwachungszimmer,  
Klinikum Großhadern (Halbintensive Überwachung  
von Patienten mit Ballondilatation, Stent bzw. nach  
diagnostischem Herzkatheter).

## STIPENDIEN

---

- Februar 1999 FEBS Youth Travel Fellowship (Teilnahme am 2nd FEBS  
Advanced Lecture Course „ABC-Transporters“)
- Februar 2001 FEBS Youth Travel Fellowship (Teilnahme am 3rd FEBS  
Advanced Lecture Course „ABC Transporters“)
- April 2004 i-lab award (Aventis) (Reise zu einem Keystone Meeting  
in Colorado, USA)

## VERÖFFENTLICHUNGEN

---

- Neckel W, **Landgraf P**, Piehlmeier W, Scheuer R, Landgraf R. Die  
diabetische Hand. Eine neue Methode zur Quantifizierung und der  
Einfluß einer Langzeitglukosenormalisierung auf das diabetische  
Handsyndrom. Diabetes und Stoffwechsel 3: 134, 1994.
- Neckel W, Piehlmeier W, **Landgraf P**, Scheuer R, Kiess W, Landgraf R.  
Effect of long-term normalization of glucose metabolism on the diabetic  
hand syndrome. Diabetologia 37 (1): A 149, 1994.
- Holzinger A, Roscher AA, **Landgraf P**, Lichtner P, Kammerer S.  
Genomic organization and chromosomal localization of the human  
peroxisomal membrane protein-1-like protein (PXMP1-L) gene encoding  
a peroxisomal ABC transporter. FEBS Lett 426 (2): 238-42, 1998.
- Gloeckner CJ, Mayerhofer PU, **Landgraf P**, Muntau AC, Holzinger A,  
Gerber JK, Kammerer S, Adamski J, Roscher AA. Human  
Adrenoleukodystrophy Protein and Related Peroxisomal ABC  
Transporters Interact with the Peroxisomal Assembly Protein PEX19p.  
Biochem Biophys Res Commun 271 (1): 144-150, 2000.
- Landgraf P**, Mayerhofer PU, Polanetz R, Roscher AA, Holzinger A.  
Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the  
peroxisomal membrane by an internal region containing a highly  
conserved motif. Eur J Cell Biol 2003; 82:401-10.
- Landgraf P**, Bidlingmeier C, Kurnik K, Borkhardt A. Gene therapy  
options in paediatric haematology and oncology. State of the art and  
perspectives. Pädiatrische Praxis 2004; accepted.

München, Juli 2004