

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Peroxisomen und ihre Stoffwechselfunktionen	1
1.1.1 Entdeckung der Peroxisomen	1
1.1.2 Bedeutung der Peroxisomen im Lipidmetabolismus	1
1.1.3 Schutzfunktion der Peroxisomen vor reaktiven Sauerstoffspezies.....	5
1.2 Kooperation von Peroxisomen und Mitochondrien in Stoffwechselprozessen	6
1.3 Peroxine und die peroxisomale Biogenese	8
1.3.1 Übersicht der bisher bekannten Peroxine	8
1.3.2 Der peroxisomale Matrixproteinimport	11
1.3.3 Die peroxisomale Membranbiogenese.....	12
1.4 Peroxisomale Proliferation.....	13
1.4.1 Der Prozess der Vermehrung von Peroxisomen.....	13
1.4.2 Die PEX 11-Isoformen	14
1.4.2.1 PEX11 α	15
1.4.2.2 PEX11 β	16
1.4.2.3 PEX11 γ	16
1.5 Peroxisomale Funktionsstörungen	17
1.5.1 Peroxisomale Biogenesestörungen	17
1.5.2 Peroxisomale Einzelenzymdefekte	18
1.5.3 Therapiemöglichkeiten	19
1.6 Tiermodelle zur Erforschung von peroxisomalen Biogenesedefekten	20
1.6.1 Bekannte Tiermodelle mit peroxisomalen Gendefekten	20
1.6.2 Details über die <i>Pex11β</i> -Knockoutmaus	20
1.7 Der Prozess der Odontogenese.....	22
1.7.1 Das Knospenstadium	22
1.7.2 Das Kappenstadium.....	23
1.7.3 Das Glockenstadium.....	24
1.7.4 Die Differenzierung der Odontoblasten.....	25
1.7.5 Die Differenzierung der Ameloblasten.....	26
1.7.6 Die Differenzierung der Zahnwurzel und der Zahndurchbruch	27
1.8 Kraniofaziale und dentoalveoläre Auswirkungen von peroxisomalen Biogenesestörungen....	28
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2 Material und Methodik	31
2.1 Versuchstiere, deren Fixierung und Einbettung der Präparate.....	31
2.1.1 Versuchstiere	31
2.1.2 Gewebefixierung.....	32
Fixantien und Puffer	32

Inhaltsverzeichnis

1.	PBS (phosphate buffered saline) 10x Stammlösung:	32
2.	Fixierungs-Lösung:	32
2.1.3	Paraffineinbettung.....	32
2.2	Laborgeräte und Chemikalien	33
2.2.1	Laborgeräte	33
2.2.2	Verbrauchsmaterialien	35
2.2.3	Chemikalien	37
2.3	Herstellung der Schnitte für die verschiedenen Färbungen	39
2.4	Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung und Bildverarbeitung.....	39
2.5	Immunfluoreszenz.....	40
2.5.1	Entparaffinieren und Rehydrieren:	40
2.5.2	Antigenfreisetzung.....	40
2.5.3	Citratpuffer	41
2.5.4	Blocken der unspezifischen Bindungsstellen	41
2.5.5	Primärantikörper	41
2.5.6	Sekundärantikörper.....	42
2.5.7	Doppelimmunfluoreszenzen	43
2.5.8	Kernfärbung mit Hoechst und TOTO	43
2.5.9	Eindecken und Lagerung der Präparate	43
2.6	Fluoreszenzmikroskopie	44
2.7	Bestimmung der Infiltration der Schnitte durch die Antikörper	44
2.8	Statistische Analyse	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Komplettaufnahmen der ersten Molaren der Mäuse zur Beurteilung vorhandener Unterschiede in den Zellen der Zähne	46
3.1.1	HE-Aufnahmen der ersten Molaren.....	47
3.1.2	Hoechst-Zellkernaufnahmen.....	48
3.1.3	statistische Auswertung der Zellkernaufnahmen	50
3.2	Vergleich der mitotischen Aktivität in den ersten Molaren der drei Genotypen mithilfe des Ki-67-Antikörpers.....	53
3.3	Charakterisierung und Quantifizierung der peroxisomalen Proteine in den ersten Molaren der drei Genotypen mittels Immunfluoreszenz	56
3.3.1	Nachweis der Katalase in den ersten Molaren der Mäuse	56
3.3.2	Nachweis des peroxisomalen Matrixproteins PEX14 in den dentalen Zellen.....	60
3.3.3	Immunfluoreszenz der ersten Molaren mit dem peroxisomalen Matrixprotein PEX13.....	64
3.3.4	Ausprägung des PTS1-Matrixprotein-Rezeptorproteins PEX5 in den dentalen Zellen	67
3.3.5	Untersuchung der Ausprägung von PEX19 in den ersten Molaren der Mäuse	68
3.3.6	Immunfluoreszenz der ersten Molaren mit PEX3	72
3.3.7	Fazit zum peroxisomalen Kompartiment in dentalen Zellen der verschiedenen Genotypen	73

Inhaltsverzeichnis

3.4	Charakterisierung und Quantifizierung der Veränderungen in den Mitochondrien der ersten Molaren	73
3.4.1	Immunfluoreszenz mit den mitochondrialen Atmungskettenkomplex IV (OxPhos)	73
3.4.2	Ausprägung des mitochondrialen SOD2 in den dentalen Zellen der Mäuse	75
3.5	Zytoskelettale Komponenten in Ameloblasten und Odontoblasten der Inzisiven und ersten Molaren	79
3.5.1	Nachweis von Vimentin in den dentalen Zellen	79
3.5.2	Nachweis von Cytokeratinen in den dentalen Zellen	83
3.5.3	Nachweis von Amelogenin als Marker für die Schmelzmineralisierung	88
3.6	Charakterisierung und Vergleich der Odontoblasten und des Alveolarknochens der drei Genotypen anhand geeigneter Marker	91
3.6.1	Markierung der Osteoblasten und des Alveolarknochens mithilfe eines Osteopontinmarkers	91
3.6.2	Markierung der Odontoblasten und des Alveolarknochens mit Osteokalzin	93
4	Diskussion	96
4.1	Vergleich der mitotischen Aktivität von Wildtypmäusen mit den transgenen Mäusen	96
4.2	Ausprägung der Katalase in Ameloblasten und Odontoblasten der transgenen Mäuse und deren Auswirkung auf die Redox-Balance	97
4.3	Ausprägung und Funktion des peroxisomalen Kompartiments in den verschiedenen Zellen der Zähne in den untersuchten Genotypen	99
4.3.1	Reduktion der Peroxisomenanzahl in den <i>Pex11β</i> -Knockoutmäusen	99
4.3.2	Wachstums- und Transkriptionsfaktoren und deren Einfluss auf die Peroxisomale Biogenese und die Odontogenese	101
4.3.3	Mögliche Bedeutung der Peroxisomen im Lipidstoffwechsel der Zahngewebe	103
4.4	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und deren Funktion im Zusammenspiel von Peroxisomen und Mitochondrien	104
4.4.1	OxPhos-Komplex IV- Herunterregulierung in den <i>PEX11β</i> -Knockoutmäusen	104
4.4.2	SOD2-Hochregulierung in den Ameloblasten der <i>Pex11β</i> -Knockoutmäuse	106
4.4.3	Mitochondriale Morphologie und Proliferation bei peroxisomalen Biogenesestörungen	107
4.5	Beziehung der Peroxisomen zu Intermediärfilamenten in den Zahngeweben	109
4.6	Hypomineralisationserscheinungen in den Hartgeweben der <i>Pex11β</i> -Knockoutmäuse	111
4.6.1	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) für die Odontogenese	111
4.6.2	Connexin 43 und seine Bedeutung für die Mineralisation von Hartgeweben	113
4.6.3	Hypomineralisation des Dentins und des Alveolarknochens in den <i>Pex11β</i> -Knockoutmäusen	114
4.6.4	Schmelzhypomineralisation und Zusammenhang mit Hypomineralisation des Alveolarknochens und Dentins	116
4.6.5	Bedeutung der Peroxisomen im Ca ²⁺ -Haushalt von Schmelz, Dentin und Knochen	117
4.7	Der menschliche <i>PEX11β</i> -Gendefekt im Vergleich zu den <i>Pex11β</i> -Knockoutmäusen	119

Inhaltsverzeichnis

4.8 Patienten mit peroxisomalen Biogenesestörungen im klinischen Alltag 120

4.9 Ausblick 123

5 Zusammenfassung 125

6 Summary (englische Zusammenfassung) 127

7 Abkürzungsverzeichnis 129

8 Abbildungsverzeichnis 132

9 Tabellenverzeichnis 135

10 Literaturverzeichnis 136

11 Erklärung zur Dissertation 160

12 Danksagung 161