

**Identifizierung und Charakterisierung eines Gens für eine autosomal-
rezessive Form der Hypotrichosis simplex:
molekulargenetische, zellbiologische und pharmakologische
Untersuchungen zum *P2RY5*-Gen und P2Y5-Protein**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Sandra Maria Pasternack
aus
Herten

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter Prof. Dr. M. M. Nöthen
2. Gutachter Prof. Dr. W. Witke

Tag der Promotion: 22.12.2010

Erscheinungsjahr: 2011

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver
der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Humangenetik und für Pharmakologie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt und ist in den Zeitschriften *Nature Genetics* (Pasternack *et al.*, 2008), *Archives of Dermatological Research* (Pasternack *et al.*, 2009a; Nahum *et al.*, 2009) und *Journal of Investigative Dermatology* (Pasternack *et al.*, 2009b) und durch die Abgabe von 5 Druckexemplaren in der Hochschulschriftenstelle der Universitäts- und Landesbibliothek, Adenauerallee 39-41 in Bonn, veröffentlicht worden.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 Funktion und Aufbau der Haut	3
2.2 Die Haarentwicklung	4
2.3 Der Haarzyklus.....	7
2.3.1 Anagen.....	8
2.3.2 Katagen.....	9
2.3.3 Telogen	10
2.3.4 Exogen.....	11
2.4 Alopezien/Hypotrichosen	11
2.5 Monogene Alopezien	12
2.6 Hypotrichosis simplex (HS).....	16
2.7 Bislang identifizierte Gene für HS	19
2.7.1 CDSN.....	19
2.7.2 DSG4	20
2.7.3 LIPH	22
2.8 Klinische Darstellung der untersuchten HS-Familie	24
2.9 Identifizierung krankheitsverursachender Gene	25
2.10 Vorarbeiten.....	26
3. ZIELSETZUNG	29
4. MATERIAL	30
4.1 Chemikalien.....	30
4.2 Zellen und Vektorsysteme.....	30
4.2.1 Prokaryoten.....	30
4.2.2 Eukaryoten.....	30
4.2.3 Vektorsysteme	30
4.3 Medien für prokaryotische Zellen.....	31
4.4 Medien, Zusätze und Transfektionsreagenzien für eukaryotische Zellen	31
4.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	32
4.6 Material zur Analyse von Nukleinsäuren.....	34
4.7 Enzyme und Inhibitoren	34
4.8 Material zur Proteinanalyse.....	35
4.9 Software und Datenbanken.....	36
4.10 Oligonukleotide (Primer)	36
5. METHODEN	37
5.1 Molekularbiologische Methoden.....	37
5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Haarfollikeln	37
5.1.2 Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	37
5.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
5.1.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
5.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	40
5.1.5.1 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Reaktionsansätzen	40
5.1.5.2 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen.....	40
5.1.6 Automatische, nicht-radioaktive Sequenzanalyse von DNA	41
5.1.7 Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3	42
5.1.8 Klonierung von cDNA in Expressionsplasmide	43
5.1.8.1 Klonierung von PCR-Produkten in <i>pJET1.2/blunt</i>	43
5.1.8.2 Umklonierung von PCR-Produkten in den <i>pcDNA3.1/V5/His</i> -Vektor	44
5.1.8.3 Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	44
5.1.8.4 5'-Dephosphorylierung von DNA.....	45
5.1.8.5 Ligase-Reaktion.....	45
5.1.8.6 <i>In-vitro</i> Rekombination	45
5.1.9 <i>E. coli</i> : Kultivierung, Transformation und Lagerung.....	46
5.1.9.1 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	46

5.1.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	46
5.1.9.3	Selektion von Bakterienklonen	47
5.1.9.4	Einfrieren und Auftauen von <i>E. coli</i>	47
5.1.10	Plasmid-DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	47
5.1.10.1	Mini-, Midi- und Maxi-Plasmid-Präparation	47
5.1.10.2	BAC-Plasmid-Präparation	48
5.2	Zellbiologische Methoden	49
5.2.1	Kultivierung von adhären wachsenden Mammalia-Zellen	49
5.2.2	Kultivierung von Zellen als Suspensionskultur	50
5.2.3	Transiente Transfektion von Mammalia-Zellen	50
5.3	Immunologische und proteinbiochemische Methoden	50
5.3.1	Immunfluoreszenz-Analyse	50
5.3.2	Western-Blot-Analyse	51
5.3.2.1	Herstellung von Zelllysaten aus Zellkultur für Western-Blot-Analysen	51
5.3.2.2	Diskontinuierliche <i>sodium dodecyl sulfate</i> -PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
5.3.2.3	Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen	52
5.3.2.4	Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)- oder Nitrozellulose-Membran	52
5.3.2.5	Immunreaktion nach dem Chemilumineszenz-Verfahren	53
5.3.3	<i>In-vitro</i> Transkription/Translation	53
5.4	Pharmakologische Untersuchungen	54
5.4.1	Luziferase Reportergen-Assay zur Bestimmung des P2Y5-Liganden	54
5.4.2	Bio-Assay via P2Y5 zur Detektion von LIPH-Produkten im Zellüberstand	55
5.4.3	Bestimmung der LIPH-Enzymfunktion mittels Fluoreszenz-markierter Lipide	57
5.4.4	Proteinbestimmung mittels D _C Protein-Assay	58
5.4.5	Statistische Auswertung der pharmakologischen Daten	59
6.	ERGEBNISSE	60
6.1	Einengung des Genortes	60
6.2	Expressionsanalyse und Mutationssuche in Kandidatengenen	62
6.3	Identifizierung der ursächlichen Gen-Mutation	63
6.4	Expressionsanalysen des <i>P2RY5</i> -Gens	66
6.5	Bioinformatische Untersuchung zur Struktur des P2Y5-Proteins	69
6.6	Funktionelle Analysen des P2Y5-Proteins	71
6.6.1	Immunologischer Nachweis der P2Y5-Proteine	71
6.6.2	<i>In-vitro</i> Transkription/Translation	73
6.6.3	Lokalisation von überexprimiertem P2Y5 in COS7-Zellen	74
6.7	Pharmakologische Analysen des P2Y5-Rezeptors	75
6.7.1	Identifizierung des Liganden und erste funktionelle Untersuchungen zum P2Y5-Rezeptor	76
6.7.2	mRNA-Expression und phylogenetische Analyse verschiedener LPA-Rezeptoren	79
6.7.3	Bio-Assay via P2Y5 zur Bestimmung der LIPH-Aktivität	82
6.7.4	Lipase H-Funktionsbestimmung mittels PED-A1	84
6.7.5	Lipase H-Funktionsbestimmung mittels bis-BODIPY [®] FL C11-PC	87
6.8	Mausmodelle	88
6.8.1	Sequenzanalyse des <i>P2ry5</i> -Gens einer <i>wal^{-/-}</i> -Maus	88
6.8.2	Voruntersuchungen zur Generierung einer <i>P2ry5-knockout</i> -Maus	89
6.8.3	Herstellung eines Plasmides zur Generierung einer <i>P2ry5-knockout</i> -Maus	90
7.	DISKUSSION	94
7.1	Kopplungsanalyse, Einengung der Kandidatenregion und Identifizierung der ursächlichen Mutation	94
7.2	Expression von <i>P2RY5</i> und anderen LPA-Rezeptoren	96
7.3	Protein-Analysen des P2Y5-Proteins	98
7.3.1	Western-Blot-Analysen	98
7.3.2	<i>In-vitro</i> Transkription/Translation	101
7.3.3	Immunfluoreszenz-Analysen	102
7.4	Identifizierung des P2Y5-Liganden	102
7.5	Versuche zur LPA-Signaltransduktion	104
7.6	Welches G-Protein könnte in die Signaltransduktion involviert sein?	106
7.7	Effektoren der G _s -Proteine und mögliche Signaltransduktion	108
7.8	Der P2Y5-Rezeptor als therapeutisches Target zur Regulation des Haarwachstums?	109

7.9 Generierung einer <i>P2ry5-knockout</i> Maus	113
7.10 <i>P2RY5</i> -Mutationen führen beim Menschen zu Veränderungen des Haarwachstums und der Haarstruktur.....	114
7.11 Den Haarausfall an der Wurzel packen	117
8. AUSBLICK	123
9. ZUSAMMENFASSUNG	126
10. EIGENE PUBLIKATIONEN	128
11. LITERATURVERZEICHNIS.....	130
12. ANHANG	X
12.1 Tabellen.....	X
12.2 Vektoren.....	XVIII
12.3 Sequenzen	XX
DANKSAGUNG	XXIX

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	bidestilliertes Wasser (<i>Aqua bidest</i>)
AMP	Adenosin Monophosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	carboxyl-
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA/copy DNA</i>
CIAP	Alkalische Phosphatase (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cy3	Indocarbocyanin 3
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E	embryonaler Tag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
etc.	<i>et cetera</i>

FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggfs.	gegebenenfalls
gr.	griechisch
h	Stunde/n (<i>hora</i>)
het.	heterozygot
H ₂ O	Wasser
hom.	homozygot
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HS	Hypotrichosis simplex
HSG	generalisierte Form der Hypotrichosis simplex (<i>Hypotrichosis simplex generalized form</i>)
HSS	auf die Kopfhaut begrenzte Form der Hypotrichosis simplex (<i>Hypotrichosis simplex of the scalp</i>)
ID	intrazelluläre Domäne
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Kon	Kontrolle
Konz.	Konzentration
L	Liter
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
LPA	Lysophosphatidsäure

μ	mikro
M	molar
m ²	Quadratmeter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute/n
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol (Stoffmenge, 1 mol = 6,022 · 10 ²³ elementare Einheiten)
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
N-	amino-
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
OD	optische Dichte
P	postnataler Tag
PA	Phosphatidsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konz.
PKA	Proteinkinase A
PLA1	Phospholipase A1
PLA2	Phospholipase A2
pmol	picomol (= 10 ⁻¹² mol)
<i>P2RY5</i>	humanes <i>P2RY5</i> -Gen, <i>G protein-coupled purinergic receptor P2Y5</i>
<i>P2ry5</i>	murines <i>P2ry5</i> -Gen
PTT	<i>Protein Truncation Test</i>
PTX	Pertussis-Toxin
P2Y5	P2Y5-Protein, <i>G protein-coupled purinergic receptor P2Y5</i>

RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
[³⁵ S]	Schwefelisotop 35
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde/n
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>Standard Error of the Mean</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembran-Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
U	Enzymeinheit (<i>Unit</i>)
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
V	Volt
v. Chr.	vor Christus
WB	Western-Blot
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

In vielen Kulturen und seit Menschengedenken besitzt das Haar eine besondere Bedeutung. Haare schützen nicht nur vor Wärmeverlust und Hitzeeinwirkung, sondern stellen ein natürliches Schönheitsaccessoire des Menschen dar. Schon im alten Ägypten (1500 v. Chr.) war das Haar ein Statussymbol und ein Kennzeichen für die gesellschaftliche und politische Position einer Person. Die Haarpflege nahm deshalb einen wichtigen Stellenwert ein und aufwändige Frisuren wurden durch komplizierte Flecht- und Verwebtechniken mit Schmuck, Tonperlen und künstlichen Haarteilen kreiert. In den oberen Gesellschaftsschichten wurden sorgfältig gepflegte Echthaarperücken getragen, die häufig sogar mit Goldstaub bestreut wurden. Die symbolische Bedeutung der Haare kann auch gut anhand der keltischen Kultur im 8. Jahrhundert v. Chr. nachvollzogen werden: beim Mann war das lang getragene Haar Ausdruck seiner Stärke, bei der Frau ihrer Fruchtbarkeit. Auch hier wurde die Haarpracht durch Zierlocken oder eingeflochtenen Schmuck verschönert.

Bis heute hat das Haar seine Bedeutung als Symbol der Macht und Vitalität beibehalten. In vielen Gesellschaften gilt volles Kopfhair als Zeichen für Gesundheit, Jugend und Attraktivität. Darüber hinaus wird ihm eine besondere Bedeutung als physisches Medium zur sozialen Kommunikation zugesprochen, da Haarlänge, -farbe und Frisur als Ausdrucksmittel der Persönlichkeit genutzt werden. Haarschäden oder Haarausfall sollten deshalb nicht nur als kosmetisches Problem betrachtet werden, sondern können auch das seelische Gleichgewicht und das allgemeine Wohlbefinden eines Menschen empfindlich stören. Haarverlust führt bei vielen der Betroffenen zu erheblichem Leidensdruck, zwischenmenschlichen Problemen und einer Verringerung des Selbstwertgefühls (Stough *et al.*, 2005; Lemieux *et al.*, 2008). Dies hebt die psychosoziale Wichtigkeit der Haar-Pathologie hervor.

Haarverlust (Alopezie/Hypotrichosis) ist bei Menschen weit verbreitet und hat eine Vielzahl von Ursachen. Diese beinhalten (I) ausschließlich genetische Faktoren, wie bei der androgenetischen Alopezie, (II) multifaktorielle Faktoren, d. h. genetische als auch externe Faktoren, wie bei der Alopecia areata, oder (III) hauptsächlich externe Faktoren, wie bei der Medikamenten-vermittelten Alopezie z. B. nach einer Chemotherapie. Die momentan verfügbaren Therapien sind unbefriedigend und es besteht eine starke Nachfrage nach neuen Behandlungsstrategien (Delamere *et al.*, 2008). Es ist daher erstaunlich, dass über die molekularen Zusammenhänge der Haarbiologie bisher nicht allzu viel bekannt ist. Erst in der letzten Dekade ist die Haarforschung für eine größere Anzahl von Wissenschaftlern interessant geworden, da sich der Haarfollikel als ein einzigartiges Modell zur Untersuchung von komplexen entwicklungsbiologischen und regulatorischen Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Geweben herausgestellt hat (Botchkarev & Kishimoto,

2003). Darüber hinaus hat die Haarfollikel-Biologie zu entscheidenden Entdeckungen geführt, die zum Verständnis der menschlichen Physiologie und Pathophysiologie im Allgemeinen beigetragen haben. Dazu zählen sowohl die Identifizierung und Charakterisierung von adulten Stammzellen in Haarfollikeln (Morris *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004) als auch Fortschritte auf dem Feld der Gentherapie (Hoffman, 2000) und Organtransplantation (Reynolds *et al.*, 1999). Außerdem offenbarten sie die Entdeckung von neuen molekularen Regulationsvorgängen, die Einfluss auf das Verständnis und die Behandlungsmöglichkeiten von verschiedenen Erkrankungen haben könnten.

Ein wichtiger Ansatz, um Vorgänge des Haarwachstums und der Haarphysiologie besser verstehen zu können, ist die Identifizierung von Genen, welche monogenen isolierten Alopezien zugrunde liegen. Die Untersuchung dieser Formen von Haarlosigkeit eröffnet die einzigartige Möglichkeit, Faktoren zu identifizieren, die nicht nur notwendig, sondern spezifisch für das Haarwachstum sind. Das Hauptziel dieser Arbeit besteht daher in der Identifizierung und Charakterisierung eines Gens, das ursächlich für eine isolierte, monogene Form des Haarausfalls ist, der so genannten Hypotrichosis simplex. Dies soll zum besseren Verständnis des Haarwachstums und der Pathophysiologie des Haarverlustes führen und zur Aufklärung von Signaltransduktionsprozessen im Haarfollikel beitragen. Gene, die bereits im Vorfeld für andere Hypotrichosis simplex-Formen bekannt waren, sind das *CDSN*-Gen, welches für Corneodesmosin kodiert (Betz *et al.*, 2000, Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003), das *DSG4*-Gen, welches für Desmoglein 4 kodiert (Kljuic *et al.*, 2003) und das *LIPH*-Gen, welches für Lipase H kodiert (Kazantseva *et al.*, 2006). Trotz des substanziellen Fortschritts auf diesem Forschungsgebiet, ist die komplexe Pathophysiologie des menschlichen Haarwachstums weit entfernt von ihrer Entschlüsselung. Auch im Hinblick auf eine wirkungsvolle Therapie muss ein Durchbruch erst noch erzielt werden. Aus diesem Grund wird die Untersuchung von monogenen Haarerkrankungen auch in Zukunft sehr hilfreich sein für die weitere Skizzierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen, die in das Haarwachstum involviert sind. Ferner kann sie zur Identifizierung von neuen therapeutischen Wirkstoffen führen, die möglicherweise auch bei den häufiger auftretenden Haarerkrankungen, wie der androgenetischen Alopezie oder der Alopecia areata, angewendet werden können.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Funktion und Aufbau der Haut

Die Haut, das größte Organ des Körpers, überzieht den gesamten Organismus und fungiert als Grenzfläche zwischen Körper und Umwelt. Sie schützt ihn so vor äußeren Einwirkungen, besonders vor Kälte bzw. Wärme, mechanischen Belastungen, UV-Strahlung, Pathogenen und Toxinen. Des Weiteren dienen die Wärme-, Schmerz- und Tastreiz-Rezeptoren zur Kommunikation mit der Außenwelt. Weitere Aufgaben sind die Regulierung des inneren Milieus durch Temperatur-Regulation, die Speicherung von Wasser und verschiedene Stoffwechselfunktionen, wie z. B. die Vitamin-D-Synthese. Die Haut hat im Erwachsenenalter eine Fläche von 1,6-2 m² und eine Dicke von 1,5-4 mm (ohne Subkutis). Sie ist in drei Hauptschichten unterteilt: Epidermis, Dermis und Subkutis (s. Abb. 2.1). Die Epidermis (Oberhaut) ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, welches zu ca. 90 % aus Keratinozyten besteht. Sie enthält außerdem melaninbildende Zellen des Pigmentsystems, die so genannten Melanozyten, dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen) und Zellen des peripheren Nervensystems (Merkel-Zellen). Freie Nervenendigungen dringen bis in die unteren Epidermisschichten ein. Die Dermis, auch Lederhaut genannt, ist ein faserreiches, kollagenes und elastisches Bindegewebe, das reich vaskularisiert ist und der Haut ihre mechanische Festigkeit verleiht. Sie beherbergt ein reichhaltiges Netzwerk an feinen Nervenfasern. Des Weiteren enthält sie spezialisierte Sinnesrezeptoren, wie Meißner-Tastkörperchen, die Berührungsempfindungen vermitteln, und Vater-Pacini-Körperchen, die Vibrationen und Beschleunigungen detektieren. Dermis und Epidermis bilden zusammen die Kutis. Unter der Kutis befindet sich die aus Fett- und Bindegewebe bestehende Subkutis. Ihre Dicke variiert je nach Körperbereich und -gewicht. Die Subkutis wirkt isolierend und sie dient als Energiedepot.

Die Haut bildet auch die Hautanhangsorgane, wie Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen.

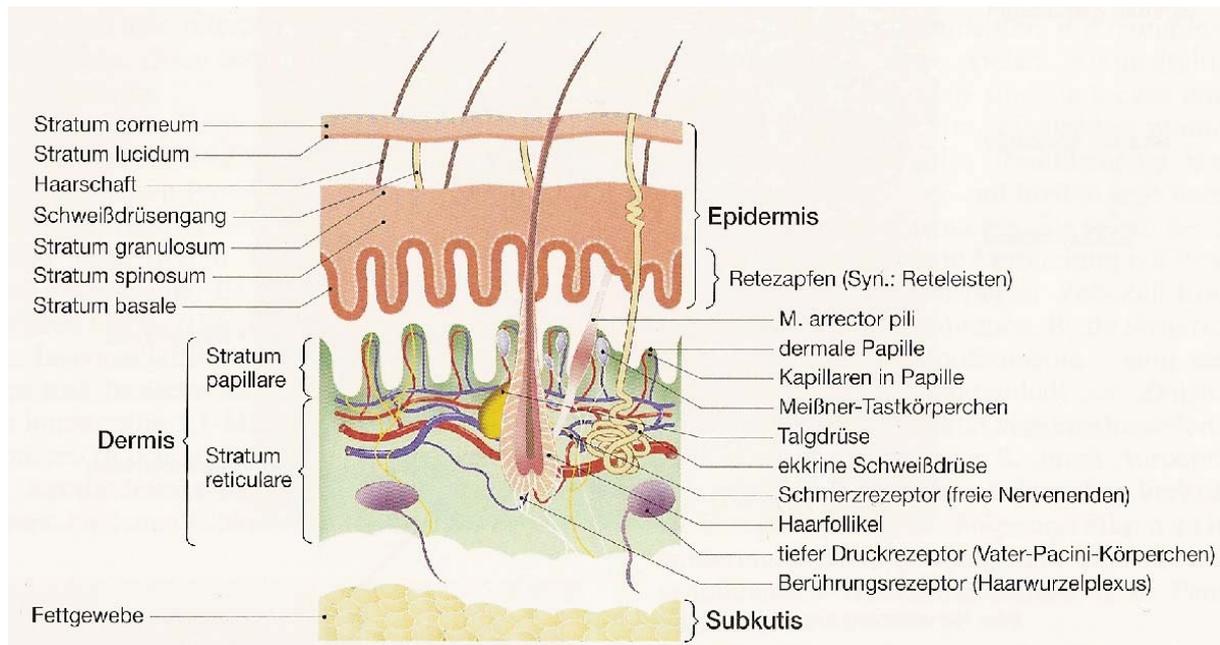


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der menschlichen Haut. Die Haut ist in drei Hauptschichten unterteilt: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis. Der Haarfollikel befindet sich in der mit vielen Blutgefäßen und Nervenfasern ausgestatteten Dermis. Der Haarschaft wächst durch den Haarkanal nach distal, passiert die Epidermis und gelangt so nach außen. Übernommen aus Meves, 2006.

2.2 Die Haarentwicklung

Die Haarfollikel-Entwicklung beruht auf neuroektodermalen-mesodermalen Interaktionen und kann in folgende morphologisch unterscheidbare Stadien unterteilt werden: (I) Induktion, (II) Organogenese und (III) Zelldifferenzierung. Abstände, Polarität und Differenzierungsmuster werden durch Gradienten von Inhibitoren und Aktivatoren festgelegt, welche gemeinschaftlich von Hautepithel und -mesenchym aufgebaut werden. Mittlerweile ist eine Reihe von Substanzen bekannt, die maßgeblich an diesen Prozessen beteiligt sind, darunter Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle (Schmidt-Ullrich & Paus, 2005).

Auf morphologischer Ebene stellt sich die Haarentwicklung wie folgt dar: der Haarfollikel entwickelt sich aus einer Einstülpung der embryonalen Epidermis, welche sich in drei ineinander verschachtelte, zylinderartige Strukturen differenziert. Die innere Schicht bildet den Haarschaft aus. Die äußere Schicht bildet die äußere Wurzelscheide, die den Haarfollikel von der umgebenden Dermis trennt. Die mittlere Schicht wird zur inneren Wurzelscheide. Diese umschließt den Haarschaft und weist ihm den Weg nach außen. Der Haarschaft und die innere Wurzelscheide wandern beim Haarwachstum gemeinsam in Richtung Hautoberfläche (Stenn & Paus, 2001).

Reife Haarfollikel bestehen aus acht zellulären Schichten (von außen nach innen betrachtet): aus der äußeren Haarwurzelscheide, der Glashaut, der Henle's und Huxley's Schicht (diese beiden Schichten bilden die innere Haarwurzelscheide), der Kutikula der inneren Wurzelscheide, der Kutikula des Haarschafts, dem Cortex und der Medulla des Haarschafts (s. Abb. 2.2; Stenn & Paus, 2001).

Alle reifen Haarfollikel folgen einem Wachstumszyklus, der sich aus einer Wachstumsphase (Anagen), einer Umstrukturierungsphase (Katagen), einer Ruhephase (Telogen) und dem Abwurf des Haarschaftes (Exogen) zusammensetzt (s. Abb. 2.3). Dieser Zyklus wiederholt sich vielfach im Laufe des Lebens jedes Individuums.

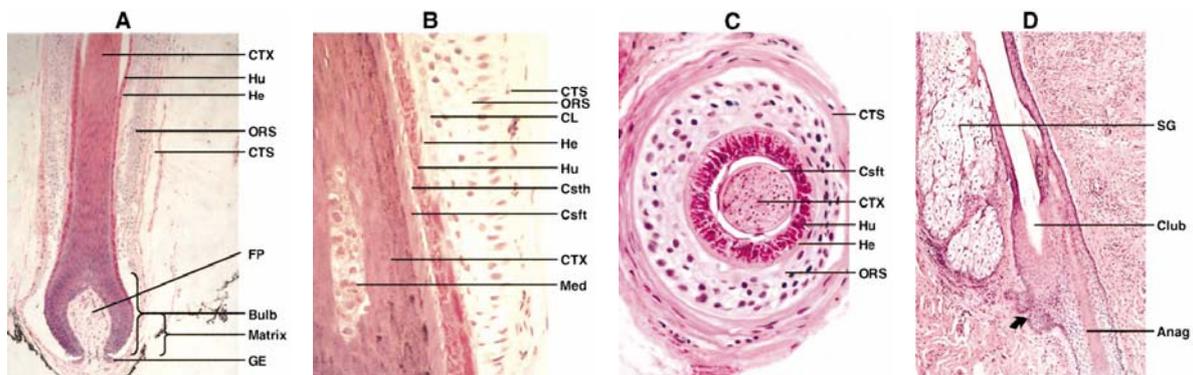


Abb. 2.2: Histomorphologie des menschlichen Haarfollikels. In den vier Abbildungen sind alle acht Zellarten des reifen Haarfollikels dargestellt: die äußere Wurzelscheide (ORS, *outer root sheath*), die Glashaut (CL, *companion layer*), die innere Wurzelscheide, welche sich in Henle's Schicht (He) und Huxley's Schicht (Hu) unterteilt, die Kutikula der inneren Wurzelscheide (Csth, *cuticle of the internal root sheath*), die Kutikula des Haarschafts (Csft, *cuticle of the hair shaft*), der Schaftkortex (CTX) und die Schaftmedulla (Med). **(A)** Vertikaler Schnitt durch proximalen Anagen-Haarfollikel bei niedriger Vergrößerung. **(B)** Vertikaler Schnitt durch proximalen Anagen-Haarfollikel bei höherer Vergrößerung. **(C)** Querschnitt durch proximalen Anagen-Haarfollikel. **(D)** Telogen Haarschaft mit neuem Anagen-Haarfollikel (unten). Das sekundäre Keimepithel an der Basis des Telogen-Haarfollikels ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. CTS: Bindegewebe (*connective tissue sheath*); SG: Talgdrüse (*sebaceous gland*); Club: Telogen Haarschaft; Anag: proximaler Anagen Haarfollikel; FP: folliculäre Papille; GE: Keimepithel (*germinative epithelium*). Übernommen aus Stenn & Paus, 2001.

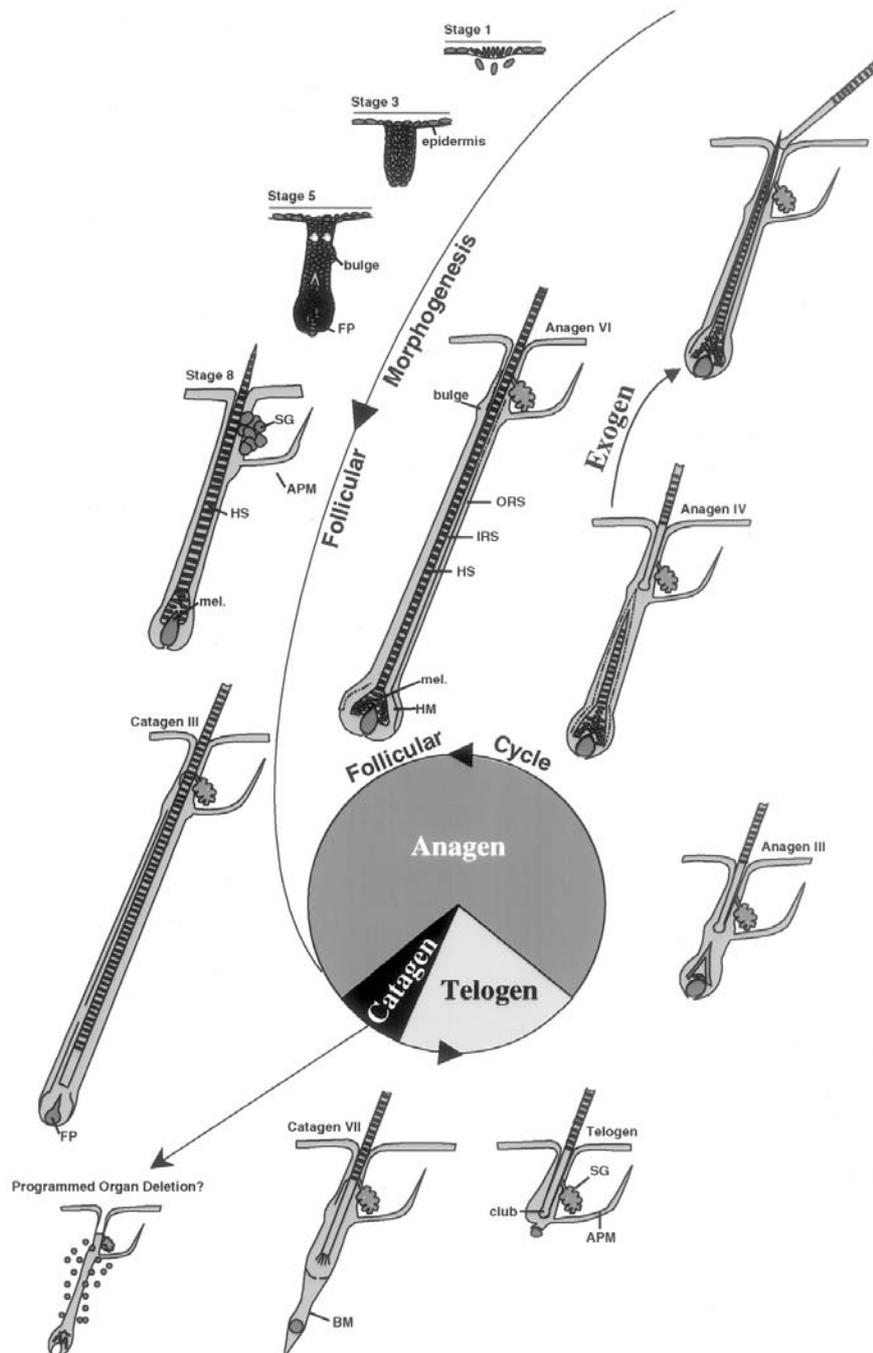


Abb. 2.3: Haarfollikel-Morphogenese und Haarzyklus. Dargestellt ist die initiale, nur einmal im Leben stattfindende Morphogenese des Haarfollikels (oben), welche dann in die sich wiederholenden Haarzyklen übergeht (Kreis). Jeder Zyklus ist unterteilt in Anagen, Katagen und Telogen. Als Exogen wird der Abwurf des Haarschaftes bezeichnet. Das Exogen ist nicht an eine bestimmte Phase des Haarzyklus gekoppelt. DP: Dermalpapille; SG: Talgdrüse (*sebaceous gland*); APM: Haarbalgmuskel (*arrector pili muscle*); HS: Haarschaft; mel: Melanin; BM: Basalmembran; POD: programmierte Organ-Deletion; HF: Haarfollikel; ORS: äußere Wurzelscheide (*outer root sheath*); IRS: innere Wurzelscheide (*internal root sheath*). Übernommen aus Stenn & Paus, 2001.

2.3 Der Haarzyklus

Die Hauterneuerung, inklusive der Hautanhangsorgane, ist dem Integument aller Organismen gemeinsam. Ebenso ist der Haarzyklus ein Charakteristikum jeglicher Behaarung. Er könnte aufgrund verschiedener Anforderungen an den Organismus entstanden sein, darunter (I) das Wachstum, (II) die periodische Erneuerung des Haarkleides, um die Körperoberfläche zu reinigen, (III) die Anpassungsmöglichkeit an unterschiedliche Umweltbedingungen, wie die Jahreszeiten, (IV) die Möglichkeit die Haarlänge an unterschiedlichen Körperstellen zu kontrollieren, (V) die Darstellung sozialer Merkmale und (VII) der Schutz vor maligner Entartung in diesen sich schnell teilenden Zellen (Stenn & Paus, 2001).

Die Länge des gesamten Zyklus, der einzelnen Phasen des Zyklus und die Länge des gebildeten Haarschafts können sich stark unterscheiden (Saitoh *et al.*, 1970; Trotter, 1924). Hier spielen neben genetischen Komponenten auch äußere Faktoren wie Essgewohnheiten, z. B. Diäten, Schwangerschaft oder Medikamenteneinnahme und Krankheiten, wie Schilddrüsenstörungen, eine Rolle (Meves, 2006). Das Wachstum des menschlichen Kopfhaares stellt eine Besonderheit aufgrund der Unabhängigkeit von äußeren Einflüssen und der extrem langen Zyklusdauer von zwei bis sechs Jahren dar. Die Art und der Sitz vom chronobiologischen Taktgeber des Haarzyklus sind bislang unbekannt.

Die Zyklen sind beim Menschen – mit Ausnahme der Zeit vor und um die Geburt (Pecoraro *et al.*, 1964; Sinclair, 1999) – und beim Meerschweinchen asynchron (Chase, 1954), d. h. jeder Haarfollikel hat seinen eigenen Rhythmus. Bei den meisten Säugetieren liegen jedoch größere Einheiten synchronisierter Haarfollikel vor. Doch wie kommt diese Synchronisierung zustande? Es wurde schon zu Beginn der Haarforschung spekuliert, dass der intrinsische und autonome Zyklus mittels eines diffundierenden Faktors durch benachbarte Follikel und/oder endokrine Reize moduliert werden könnte (Ebling & Hervey, 1964; Johnson 1965). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht aufgeklärt und es bestehen eine Reihe von Erklärungsansätzen und Theorien, darunter z. B. oszillierende Signale, Inhibition-Disinhibition, inhärente Taktgeber, Bulge-Zellen-Aktivierung oder Papilla-Zellen Morphogene (Stenn & Paus, 1999).

Der Haarzyklus zeichnet sich durch seine Autonomie, Beständigkeit und Periodizität aus. Jedes Gewebe, welches sich periodisch erneuern muss, ist abhängig von Stammzellen. Diese sind im Falle des Haarfollikels in einer Verdickung der Wurzelscheide lokalisiert, der so genannten *bulge*-Region, die sich auf Höhe des *Musculus arrector pili*-Ansatzes beim Menschen befindet (Cotsarelis *et al.*, 1990; Morris & Potten, 1999). Die Stammzellen bleiben während des gesamten Haarzyklus erhalten, da sie sich in der „permanenten“ Region des Haarfollikels befinden. Sie zeichnen sich durch Multipotenz und proliferative Kapazität aus

(Morris *et al.*, 2004; Blanpain *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1993). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Haarfollikel nach Verwundung auch *de novo* entstehen können. Sie entstehen aus angrenzenden epithelialen Zellen und bauen eine neue Haarfollikel-Stammzellpopulation auf. Wnt-Proteine (*wingless-type MMTV integration site family*) spielen eine essentielle Rolle bei diesem Umprogrammierungs-Prozess. Bei Inhibierung des Wnt-Signalweges durch Dkk1 (Dickkopf1) wurden keine neuen Haarfollikel gebildet, obwohl die Re-Epithelialisierung normal verlief (Ito *et al.*, 2007).

2.3.1 Anagen

Das Anagen stellt die längste Phase des Haarzyklus dar und ist in sechs einzelne Phasen unterteilt (Anagen I-VI; Chase, 1965; Müller-Röver *et al.*, 2001). Normalerweise geht das Anagen spontan aus dem Telogen (s. Kap. 2.3.3) hervor, es kann aber auch durch Verwundung oder Verletzung hervorgerufen werden, z. B. durch Auszupfen der Haare, intensives Rasieren oder durch Chemikalien (Argyris, 1956; Li *et al.*, 1999). Mittlerweile sind einige Substanzen bekannt, die das Anagen induzieren können, darunter die Medikamente Minoxidil (Buhl *et al.*, 1990) und Cyclosporin A (Takahashi & Kamimura, 2001), Keratinozyten- und Hepatozyten-Wachstumsfaktoren (Danilenko *et al.*, 1996; Jindo *et al.*, 1998), der Neurotransmitter Substanz P (Paus *et al.*, 1994) und das Morphogen Sonic hedgehog (Sato *et al.*, 1999). Die genaue Wirkungsweise oder der Stoffwechselweg, in den die Substanzen eingreifen, sind jedoch meist unbekannt.

Als eines der ersten Ereignisse im Anagen (Anagen I) tritt mitotische Aktivität der Zellen in der äußeren Haarwurzelscheide ein. Diese Zellen des sekundären Keimgewebes wandern in die Epidermis ein, wobei das Wachstum entlang eines dermalen Pfades stattfindet, der durch den ersten reifen Haarfollikel in der Dermis markiert wird (Kligman, 1959). Auf diese Weise wird der neue Haarbulbus gebildet (Anagen II). Haben die Zellen eine bestimmte Tiefe erreicht, so ändern sie im zentralen Zylinder ihre Wachstumsrichtung und wachsen nach außen, wodurch sie die innere Wurzelscheide und den Haarschaft formen (Anagen III). Die stattfindenden Zellteilungen sind hierbei auf die tieferen Regionen des Haarfollikels beschränkt (Auber's kritische Ebene). Danach formen sich die unterschiedlichen Schichten des Haarfollikels (s. Kap. 2.2 und Abb. 2.2; Anagen IV). Ist die innere Haarwurzelscheide vollständig ausgebildet, so gleitet sie distal in Richtung Hautoberfläche, bis das neue Haar die Epidermis erreicht (Anagen V). Auf Höhe des Talgdrüsendanges lösen sich Haarschaft und -scheide voneinander. Die Zellen der inneren Wurzelscheide gehen zugrunde und die Zellen der äußeren Wurzelscheide rutschen in den Haarkanal. Im Anagen VI treten keine morphologischen Veränderungen des Haarbulbus auf. Es stellt aber eine Besonderheit dar,

da sich diese Phase in Haarfollikeln aus verschiedenen Körperregionen stark in ihrer Dauer unterscheidet und somit die Haarschaftlänge bestimmt (Trotter, 1924; Saitoh *et al.*, 1970).

Welche Faktoren das Anagen steuern, ist noch nicht komplett erforscht. Die Wechselwirkungen zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen scheinen aber nicht nur für die Morphogenese, sondern auch für das zyklische Haarwachstum von großer Bedeutung zu sein. Wie bei vielen epidermalen-mesenchymalen Interaktionen, ist auch im Haarfollikel die Expression von morphogenetischen Muster-Genen vorzufinden, darunter *fibroblast growth factor* (FGF; Hébert *et al.*, 1994), *transforming growth factor* (TGF)-beta (Heine *et al.*, 1987; Philpott *et al.*, 1990), *sonic hedgehog* (shh; Bitgood & McMahon, 1995; Iseki *et al.*, 1996), *Wingless* (wnt-Stoffwechselweg; Millar *et al.*, 1999), Neurotrophine (Botchkarev *et al.*, 1998a und 1998b) und Homeobox-Genfamilien (hox; Bieberich *et al.*, 1991; Awgulewitsch, 2003; Übersicht in Oro & Scott, 1998). Welchen Anteil die einzelnen Signalmoleküle haben, ist weitgehend unklar. Es ist aber wahrscheinlich, dass das komplexe Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren essentiell für die Funktionalität des Haarfollikels und des Haarzyklus ist.

2.3.2 Katagen

Das Katagen stellt einen Prozess der koordinierten Zelldifferenzierung und Apoptose dar. Hierbei kommt es zur Einstellung des Zellwachstums und der Pigmentierung, zur Lösung der Papille vom Bulbus, zur Auflösung der Schichtung und zur Schrumpfung des tieferen Haarfollikels durch Apoptose. Der Haarfollikel wandert distal Richtung Hautoberfläche, der Haarschaft kapselt sich von der Dermalpapille ab und bildet das Kolbenhaar. All dies dient dem Zweck, die alte „Haarschaft-Fabrik“ zu beseitigen und die induktive Maschinerie der Zelle dazu zu bringen, einen neuen Haarfollikel zu generieren (Stenn & Paus, 2001). Das Katagen ist in acht Subphasen unterteilt, welche im späten Anagen beginnen und im frühen Telogen enden (Müller-Röver *et al.*, 2001).

Zunächst werden Zellausläufer der Papille zurückgebildet, so dass sie den Kontakt mit der umgebenden Basallamina verlieren (De Weert *et al.*, 1982). Die Papille schrumpft, wahrscheinlich durch Verlust von Extrazellulärmatrix, und die Basallamina verdickt sich im Gegenzug. Es kommt zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts des Haarfollikels, wobei die Expression von Trichohyalin, Transglutaminase I und Desmoglein abnimmt (Commo & Bernard, 1997). Während auf der einen Seite die Bulbus-Zellen ihre Zellteilungen einstellen, kommt es auf der anderen Seite zu einer vermehrten Apoptose in bestimmten Teilen des Haarfollikels (Lindner *et al.*, 1997; Botchkareva *et al.*, 2006). Erste Anzeichen von Autolysis sind im Zentrum der epithelialen Säule zu sehen. Am Ende des Katagens treten vermehrt

Makrophagen und Mastzellen auf, die alle tieferliegenden Zellfragmente des Haarfollikels abbauen, so dass sich der Follikel nur noch in der oberen Dermis befindet (Maurer *et al.*, 1995; De Weert *et al.*, 1982).

Welche Faktoren oder Signalstoffe für das Beenden des Anagen und den Beginn des Katagen verantwortlich sind, ist nicht geklärt. Es könnte zu einer Akkumulation von Wachstumsinhibitoren oder pro-apoptotischen Substanzen kommen, zu einer Aktivitätsänderung von Makrophagen und Mastzellen, zu einem Erreichen der Anzahl von möglichen Mitosen in dieser vorübergehenden Zellpopulation oder zu einer Kombination von all diesen Faktoren (Stenn & Paus, 1999). Eine wichtige Rolle scheint ein Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF5) zu spielen: seine Expression nimmt im späten Anagen zu (Pethö-Schramm *et al.*, 1996), bei seiner Abwesenheit ist die Einleitung des Katagen jedoch verzögert. Dies führt zum *angora*-Phänotyp bei Mäusen, der durch ungewöhnlich lange Haare gekennzeichnet ist (Hébert *et al.*, 1994). Des Weiteren spielen einige Neurotrophine, wie z. B. *neurotrophin 3* (NT3), *nerve growth factor* (NGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), eine wichtige Rolle als Signalmoleküle bei der Kontrolle des Katagen (Botchkarev *et al.*, 1998a und 1998b; Botchkareva *et al.*, 2000).

2.3.3 Telogen

Der Telogen-Haarfollikel sitzt als kleine epitheliale Einstülpung in der Dermis. Er besteht aus ruhenden epithelialen Zellen oberhalb einer dichten Ansammlung von Papillen-Fibroblasten. Die Zellen des tieferen Follikels zeigen so gut wie keine DNA- und RNA-Synthese (Silver & Chase, 1970) und ein großer Anteil der DNA des Telogen-Haarfollikels ist degradiert (Opel *et al.*, 2008). Die Produktion der für das Anagen charakteristischen Proteine, z. B. Trichohyalin und Haarkeratine, wird eingestellt, wobei die Synthese von Keratin 14 im epithelialen Sack fortbesteht (Bowden *et al.*, 1998), in dem der bürstenähnliche Telogen-Haarschaft (*club hair shaft*) verankert ist (Pinkus *et al.*, 1981). Die Expression des p75 Neurotrophin-Rezeptors (p75NTR), eines Apoptose fördernden Proteins, nimmt in allen Schichten der äußeren Haarwurzelscheide stark zu (Adly *et al.*, 2009). Bestimmte Adhäsionsmoleküle, wie das Desmoglein 3, und Proteasen, wie das Cathepsin L, scheinen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Telogen-Haarschaftes und dessen Verankerung zu spielen (Koch *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 2000). Spezifische Marker konnten aber bislang nicht für das Telogen identifiziert werden. Obwohl dieses Stadium im Allgemeinen als Ruheperiode bezeichnet wird, müssen doch entscheidende Vorgänge stattfinden, die die Überleitung zum folgenden Anagen herbeiführen. Es ist noch unklar, ob es sich hierbei um stimulierende oder inhibitorische Signale handelt.

2.3.4 Exogen

Im Exogen findet der Abwurf des Haarschafts statt (Stenn & Paus, 2001). Diese Phase ist unabhängig von Anagen, Katagen und Telogen und unterliegt eigenen Kontrollmechanismen (Paus *et al.*, 1999; Stenn & Paus, 1999). Hierbei ist es im Tierreich und auch bei Menschen weit verbreitet, dass neue Haare wachsen, bevor die alten Haare ausgefallen sind. Es können sich somit mehrere Haarschäfte in einem Follikel befinden, aber jeweils nur ein aktiv wachsendes Haar, welches sich im Anagen befindet (Messenger & Dawber, 1997). Während des Exogens ist der Haarschaft in eine keratinisierte Zellmasse eingebettet, die diesen auch verankert (Pinkus *et al.*, 1981). Auch wenn die genauen Regulationsvorgänge noch nicht ermittelt sind, so kommt das Abwerfen des Haarschafts wahrscheinlich durch eine proteolytische Reaktion zustande, da von Talgdrüse und Haarkanal ein Chymotrypsin exprimiert wird (Ekholm & Egelrud, 1998).

2.4 Alopezien/Hypotrichosen

Wie schon in den vorherigen Kapiteln erläutert, handelt es sich beim Haarfollikel um ein komplexes Miniorgan, dessen Funktionalität von vielen internen und externen Faktoren abhängt (Übersicht in Paus & Cotsarelis, 1999). Störungen des sensiblen Gleichgewichts der unterschiedlichen Faktoren können zu Beeinträchtigungen der Haarfollikel-Morphogenese, des Stoffwechsels von Haarfollikelzellen oder des Haarzyklus führen und somit Haarausfall verursachen. Im Allgemeinen spricht man von Haarausfall, wenn mehr als 100 Haare pro Tag ausfallen und wenn es einen deutlichen Unterschied zwischen der Zahl der abgestoßenen und nachgewachsenen Haare gibt.

Generell kann zwischen Hypotrichosen, d. h. einer Verminderung der Haardichte infolge eines diffusen Haarausfalls, und Alopezien, d. h. einem vollständigen Fehlen von Haaren in einem definierten Körperbereich, unterschieden werden. Alopezien/Hypotrichosen können im Rahmen eines Syndroms als ein Merkmal unter vielen vorliegen oder aber isoliert auftreten. Zu den isolierten Formen gehören einerseits die genetisch komplexen Alopezien (z. B. Alopecia areata) und andererseits die monogenen Alopezien (z. B. Atrichia congenita und Hypotrichosis simplex). Bei der polygenen androgenetischen Alopezie, die die häufigste Form der Alopezie darstellt (Rexbye *et al.*, 2005), kommt es durch genetische Prädisposition von mehreren Genen zur progressiven Miniaturisierung der Haarfollikel. Für die androgenetische Alopezie konnte das Androgenrezeptor-Gen (Hillmer *et al.*, 2005), sowie ein Genort auf Chromosom 20p11 [Hillmer *et al.*, 2008a] und auf Chromosom 3q26 [Hillmer *et al.*, 2008b] identifiziert werden. Der Haarverlust beginnt bei Männern an der frontalen Haargrenze und setzt sich über den zentralen Vertex-Bereich des Kapillitiums fort. Im

fortgeschrittenen Stadium bleibt nur ein schmaler okzipitaler Haarkranz zurück. Die androgenetische Alopezie tritt auch bei Frauen auf, wobei neben dem frontalen Haaransatz hauptsächlich der Mittelscheitel-Bereich betroffen ist (Übericht in Olsen *et al.*, 2005). Bei der Alopecia areata handelt es sich um eine gewebespezifische Autoimmun-Erkrankung, die gegen den Haarfollikel gerichtet ist und durch aktivierte T-Zellen vermittelt wird (Übersicht in Alexis *et al.*, 2004). Sie kann als fleckförmiger Haarausfall die Kopf- und Körperbehaarung involvieren (Alopecia circumscripta/reticularis), die gesamte Kopfbehaarung betreffen (Alopecia totalis) oder zum vollständigen Verlust der Kopf- und Körperbehaarung führen (Alopecia universalis; Übersicht in Wasserman *et al.*, 2007). Es konnten Assoziationen mit den Genen *PTPN22* (Kemp *et al.*, 2006; Betz *et al.*, 2008), *Filaggrin* (Betz *et al.*, 2007), *CTLA4* (unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe), *TRAF1* (Redler *et al.*, 2010) und der HLA-Region (Entz *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Auf die monogenen Alopezien wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.5 Monogene Alopezien

Unter monogenen Alopezien versteht man eine Gruppe genetisch und klinisch heterogener Formen von Haarlosigkeit oder Haarverlust. Diese umfasst sowohl kongenitale Alopezien (Atrichien), wie z. B. die Atrichia congenita, als auch Alopezien, die in der Kindheit oder erst im Erwachsenenalter auftreten, wie z. B. die Hypotrichosis simplex (HS). Die HS wird im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben, da ihre Untersuchung Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Darüber hinaus werden Alopezien mit unauffälligem Haarschaft, hierzu zählen die kongenitalen Atrichien und einige HS-Formen, von solchen mit veränderter Struktur des Haarschaftes unterschieden. Zu letzteren werden auch Erkrankungen wie Monilethrix oder Hypotrichosis Typ Marie Unna gezählt, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Das erste Gen, welches als Ursache für eine isolierte Alopezie-Form beschrieben wurde, befindet sich in einem Keratingen-Cluster: Mutationen im *KRT86*-Gen (*Hb6* nach der alten Nomenklatur) führen zur so genannten Monilethrix (Winter *et al.*, 1997), die autosomal-dominant vererbt wird. Hierbei weisen die Haarschäfte ellipsenförmige Nodi normaler Dicke auf, auf die schmalere, dystrophische Einschnürungen folgen, welche durch periodische Verkleinerung des Haarschaft-Durchmessers zustande kommen (s. Abb. 2.4). Diese Einschnürungen stellen Sollbruchstellen dar, an denen es häufig zu Haarbrüchen kommt. Der Name Monilethrix wird von den auffälligen Haarschaft-Veränderungen abgeleitet, die einer Perlenschnur ähneln, und setzt sich aus monile (lat.) = Halskette und trichos (gr.) = Haar zusammen. Mittlerweile sind Mutationen in weiteren Keratin-Genen, wie *KRT81* (*Hb1* [Winter *et al.*, 1997]) und *KRT83* (*Hb3* [van Steensel *et al.*, 2005]) beschrieben worden, die ebenfalls

Monilethrix verursachen. Für eine autosomal-rezessive *monilethrix-like* kongenitale Hypotrichosis wurden Mutationen im *DSG4*-Gen identifiziert (Schaffer *et al.*, 2006; Shimomura *et al.*, 2006; Zlotogorski *et al.*, 2006). Diese Form wird durch Haarschaft-Veränderungen charakterisiert, welche moniliformen Haaren ähneln.

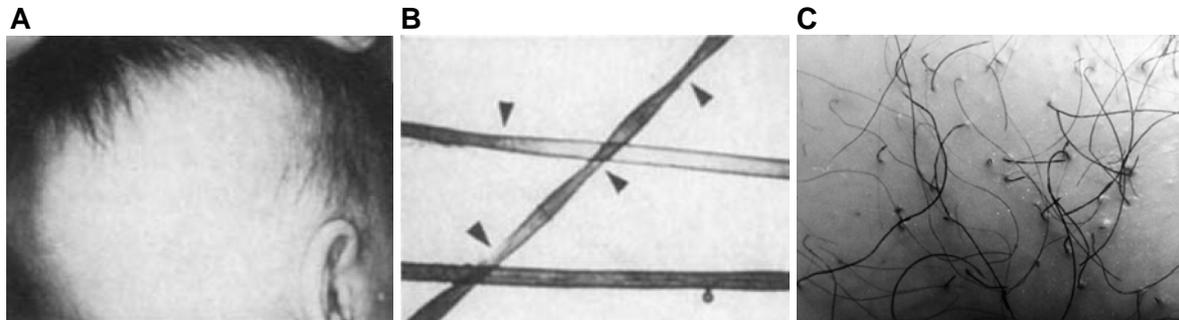


Abb. 2.4: Klinische Manifestation und lichtmikroskopische Untersuchungen bei Monilethrix. **(A)** Alopezie im okzipitalen und temporalen Kopfbereich eines zehn Jahre alten Monilethrix-Patienten. Entnommen aus Winter *et al.*, 1997. **(B)** Lichtmikroskopische Untersuchung (10-fache Vergrößerung) von Haarschäften des in Abb. 2.4 A gezeigten Patienten in einem Alter von sechs Jahren. Die Pfeilspitzen zeigen die periodische Verkleinerung des Haarschaft-Durchmessers an. Entnommen aus Winter *et al.*, 1997. **(C)** Stark dystrophische und abgebrochene Kopfhaare bei einem Monilethrix-Patienten. Entnommen aus Korge *et al.*, 1998.

Die Hypotrichosis Typ Marie Unna wurde initial von der deutschen Dermatologin Marie Unna beschrieben (Unna, 1925) und ist charakterisiert durch fehlende oder spärliche Behaarung bei Geburt und dem Wachstum von dicken, rauhen und drahtigen Haaren während der Kindheit. In der Pubertät kommt es zu einem progredienten Haarverlust, der dem einer androgenetischen Alopezie ähnlich ist (s. Abb. 2.5). In licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte eine abnorme Haarstruktur mit unregelmäßigen Drehungen und Abflachungen nachgewiesen werden. Die Haare sind stark pigmentiert und haben – im Vergleich zu nicht Betroffenen – einen vergrößerten Durchmesser (Roberts *et al.*, 1999). Die Erkrankung wird autosomal-dominant vererbt. Schon 1999 konnte Kopplung zu einem Genort auf Chromosom 8 nachgewiesen werden (van Steensel *et al.*, 1999), doch erst knapp zehn Jahre später wurde die molekulare Ursache identifiziert: die Hypotrichosis Typ Marie Unna wird durch *loss-of-function* Mutationen im *U2HR* hervorgerufen, einem inhibitorischen ORF, welcher sich in der 5'-UTR Region des *hairless*-Gens (*HR*) befindet (Wen *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass *U2HR* als Transkriptionsrepressor von *HR* fungiert, weshalb die beschriebenen Mutationen zu einer gesteigerten Translation – und somit zu einem *gain-of-function* – von *HR* führen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass *U2HR* eine wichtige Rolle bei der Feineinstellung der *HR*-Proteinmenge und somit bei der Kontrolle des Haarwachstums spielt.



Abb. 2.5: Klinisches Erscheinungsbild der autosomal-dominant vererbten Hypotrichosis Typ Marie Unna in verschiedenen türkischen Familien. Die betroffenen Individuen zeigen den charakteristischen, progredienten Haarausfall. **(A)** Betroffener Mann im Alter von 56 Jahren, der einen vollständigen Verlust der Kopf- und Körperbehaarung aufweist. **(B)** Betroffene Frau im Alter von 38 Jahren. **(C)** Betroffenes Mädchen im Alter von acht Jahren. Entnommen aus Düzenli *et al.*, 2009.

Mutationen im *HR*-Gen selbst führen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus zu vollständiger Haarlosigkeit (Atrichia congenita; Ahmad *et al.*, 1998, Cichon *et al.*, 1998; s. Abb. 2.6). Diese ist gekennzeichnet durch einen Verlust der Kopf- und Körperbehaarung und tritt beim Menschen in den ersten Wochen des Lebens mit Beginn des ersten Haarzyklus auf. Die Pathophysiologie der Atrichia congenita ist noch nicht vollständig verstanden, aber es existieren verschiedene Erklärungsansätze: (I) Bei der *hairless*-Maus (*hr/hr*), die eine Mutation im *HR*-Transkriptionsfaktor trägt, wurde eine niedrige Expression des *neural cell adhesion molecule (NCAM)* nachgewiesen (Panteleyev *et al.*, 1998). Die *NCAM*-Expression ist essentiell für die Aggregationsfähigkeit von Papillen-Zellen, da sie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion vermittelt. Vermutlich kommt es bei Atrichia congenita-Patienten direkt nach der Morphogenese zur Disintegration der Papille, da die Zelladhäsion nicht gewährleistet ist (Combates *et al.*, 1997). (II) Ein weiterer Erklärungsansatz involviert den Wnt-Signalweg, der an der Kontrolle des Haarwachstums und der Haarstruktur beteiligt ist (Millar *et al.*, 1999). Das *HR*-Protein fungiert als Transkriptions-Repressor (Potter *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *HR* die Expression von *Wise (Wnt modulator in surface ectoderm)* reduziert, welches wiederum als Inhibitor des Wnt-Signalweges agiert. Folglich soll die *HR*-Expression, welche zeitlich begrenzt während des Haarzyklus auftritt, zur Stimulation des Wnt-Signalweges in Haarfollikel-Zellen führen und somit das Haarwachstum induzieren (Beaudoin *et al.*, 2005). Wenn jedoch kein funktionelles *HR* vorliegt, kommt es zur Erhöhung der *Wise*-Transkription, welche wiederum zur Inhibition des Wnt-Signalweges führt.

Bei der ebenfalls durch *HR*-Mutationen ausgelösten papulären Atrichie, einer klinischen Variante der Atrichia congenita, treten zusätzlich disseminierte Papeln auf, die vor allem an Kopf, Hals und den Gliedmaßen zu finden sind. Auch Mutationen im *VDR*-Gen, welches für

einen Vitamin D-Rezeptor kodiert, können zur Atrichia congenita führen (Miller *et al.*, 2001). Beim VDR handelt es sich um einen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor, der mit HR im Zellkern interagiert (Hsieh *et al.*, 2003). Die physiologische und funktionelle Relevanz der VDR-HR-Interaktion ist bislang aber noch unklar.

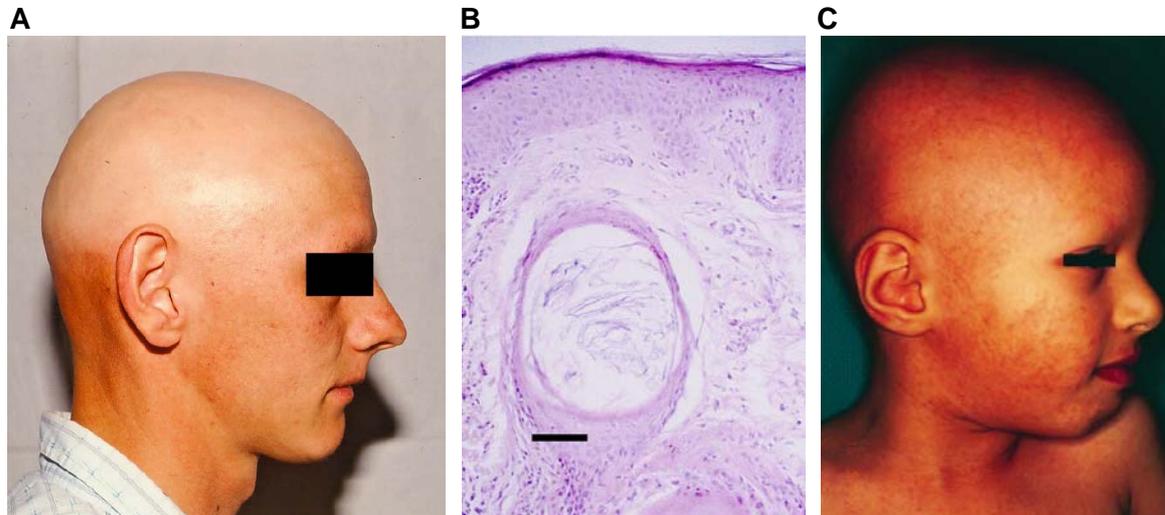


Abb. 2.6: Klinische Darstellung der Atrichia congenita und der papulären Atrichie. **(A)** Erscheinungsbild eines jungen Mannes aus Südtirol, der von der universalen kongenitalen Alopezie (Atrichia congenita) betroffen ist. Zu erkennen ist das Fehlen jeglicher Kopf- und Gesichtsbehaarung, vereinzelt sind noch einige Haare der Augenbrauen vorhanden. Übernommen aus Cichon *et al.*, 2006. **(B)** Biopsie einer papulären Läsion im Bereich der Schulter des in Abb. 2.6 A dargestellten Patienten. Gezeigt ist eine Hematoxylin-Eosin-Färbung. Im Überrest des Haarfollikels ist eine Zyste zu sehen, die mit keratinösem Material gefüllt ist. Der Maßstabsbalken entspricht 0,1 mm. Übernommen aus Cichon *et al.*, 2006. **(C)** Atrichie mit papulären Läsionen bei einem sechs Jahre alten Mädchen. Abgesehen von einigen Wimpern fehlt die Behaarung vollständig. Im Gesicht und am Kopf sind zahlreiche Papeln zu erkennen. Entnommen aus Sprecher *et al.*, 1999.

Im Zusammenhang mit den hier dargestellten Alopezie-Formen, soll noch auf eine weitere Haarerkrankung eingegangen werden, den so genannten *woolly hair*-Phänotyp. Dieses Erkrankungsbild, bei dem charakteristische Veränderungen der Haarstruktur vorliegen, wird im Laufe der vorliegenden Arbeit an Bedeutung gewinnen und soll deshalb hier erläutert werden, obwohl es sich nicht um eine monogene Alopezie handelt. Der *woolly hair*-Phänotyp wurde sowohl als isolierte Form als auch in Zusammenhang mit verschiedenen Syndromen beschrieben. Hierbei erscheint das Haar rau und glanzlos und es ist kraus, wellig oder kleingelockt. Das Haar ist schwer zu kämmen, da es ineinander verkraust. *Woolly hair* kann am gesamten Kopf oder nur partiell auftreten, oft in Zusammenhang mit diffusem Haarverlust. Die Haarstruktur kann fest oder auch brüchig sein.

Der *woolly hair*-Phänotyp wurde bereits 1927 beschrieben (Wise, 1927), seitdem folgten unzählige Beschreibungen von einzelnen Patienten oder familiären Fällen (Lantis & Pepper, 1978; Guidetti *et al.*, 1995; Ferrando & Grimalt, 1999; Prasad, 2002). Oft handelt es sich hierbei um einen isolierten Phänotyp, manchmal wird die Haarstrukturveränderung auch in

Zusammenhang mit anderen Anomalien oder Syndromen dokumentiert (Neild *et al.*, 1984; Taylor, 1990; Tosti *et al.*, 1994; Manoukian *et al.*, 1996; van Steensel *et al.*, 2001). Mutationen in den Genen *DSP*, welches für Desmoplakin kodiert, und *JUP*, welches für Plakoglobin kodiert und mit Desmoplakin interagiert, wurden bei der Naxos disease beschrieben, einer *woolly hair*-Variante, die mit Kardiomyopathie und Keratoderma assoziiert ist (Norgett *et al.*, 2000; McKoy *et al.*, 2000).



Abb. 2.7: *Woolly hair* bei Betroffenen unterschiedlicher Ethnizität. **(A)** Chinesisches Mädchen im Alter von 15 Jahren. **(B)** Türkisches Mädchen im Alter von wenigen Wochen. **(C)** Indisches Mädchen im Alter von 10 Jahren. Bei allen Betroffenen ist das Haar spärlich und der Haarschaft fragil, weshalb die Haare nur eine Länge von wenigen Zentimetern erreichen. (A) entnommen aus Chen *et al.*, 2006; (B und C) entnommen aus Pasternack *et al.*, 2009a.

2.6 Hypotrichosis simplex (HS)

Die Hypotrichosis simplex (HS) stellt eine erbliche Form des diffusen Haarausfalls an Kopf und/oder Körper dar, der für gewöhnlich in der Kindheit beginnt und mit fortschreitendem Alter zunimmt. Aufgrund der fehlenden Nomenklatur wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Begriffe zur Beschreibung dieses klinischen Phänotyps verwendet (*hypotrichosis*, *hereditary hypotrichosis*, *localized autosomal recessive hypotrichosis*). Die Bezeichnung HS sollte im Gegensatz zu Hypotrichosis nur dann verwendet werden, wenn die Haarschäfte keine strukturellen Anomalien aufweisen.

Die HS ist klinisch und genetisch heterogen. Sie kann autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt werden. Bislang konnten drei Gene für unterschiedliche HS-Formen identifiziert werden (*CDSN*, *DSG4*, *LIPH*), welche im folgenden Kapitel ausführlicher beschrieben werden. Aufgrund der Anzahl noch nicht aufgeklärter Alopezie-Familien ist anzunehmen, dass noch weitere Gene identifiziert werden, die das Haarwachstum beeinflussen.

Der erste Bericht einer von HS betroffenen Familie stammt aus dem Jahre 1915 und wurde von dem Dermatologen Hjalmar Petersen verfasst. Er beschrieb eine große dänische

Familie, in der autosomal-dominant vererbter Haarausfall in Kombination mit einer Schilddrüsenunterfunktion auftrat. Petersen bezeichnete die Erkrankung als „Kongenitale familiäre hereditäre Alopezie“ (Petersen, 1915). Heute versteht man unter HS (MIM146520, MIM605389, MIM609239, MIM607903, MIM604379) eine Gruppe von seltenen, genetisch bedingten, nicht-syndromalen, isolierten Alopezien. Die exakte Prävalenz ist nicht bekannt. Betrachtet man die bislang veröffentlichte Fachliteratur zum Thema HS, so ist von mehreren hundert betroffenen Familien und sporadischen Patienten auszugehen. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen (Übersicht in Betz *et al.*, 2006).

Auf klinischer Ebene kann eine auf den Kopf beschränkte Form (*hypotrichosis simplex of the scalp*, HSS; Toribio & Quiñones, 1974; Kohn & Metzker, 1987; Rodríguez Díaz *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 2002) von einer generalisierten Form (*hypotrichosis simplex, generalized form*, HSG) unterschieden werden, bei der neben dem Kopfhaar auch andere behaarte Körperregionen betroffen sind (Pajtas, 1950; Bentley-Phillips & Grace, 1979; Al Aboud *et al.*, 2002). Aufgrund der oftmals vorliegenden intrafamiliären Variabilität ist eine eindeutige Zuordnung zu HSS und HSG nicht immer möglich, so dass in diesen Fällen oft nur von HS gesprochen wird.

HSS-Patienten zeigen bei Geburt und in den ersten Lebensjahren ein normales Haarwachstum. Ab Mitte der ersten Lebensdekade tritt ein gradueller, diffuser und progressiver Verlust des Kopfhaares auf, der bis zum Ende der zweiten Lebensdekade zum Verlust des kompletten Kopfhaares führt (s. Abb. 2.8). In manchen Fällen bleiben wenige, diffus verteilte Haare bestehen. Wimpern, Augenbrauen, Bart und die restliche Körperbehaarung sind jedoch nicht betroffen (Betz *et al.*, 2006).



Abb. 2.8: Klinisches Erscheinungsbild der HSS der von Toribio und Quiñones 1974 beschriebenen spanischen Familie. **(A und B)** Individuum der spanischen HSS-Familie im Alter von 17 Jahren. **(C und D)** Individuum der HSS-Familie im Alter von 48 Jahren. Es ist nur das Kopfhaar vom Haarausfall betroffen, Augenbrauen, Wimpern und Bart sind normal ausgebildet. Entommen aus Betz *et al.*, 2006.

Im Gegensatz hierzu sind bei HSG-Patienten auch andere behaarte Körperregionen betroffen, wie z. B. Augenbrauen, Wimpern, Bart, allgemeine Körperbehaarung, Achsel- und Geschlechtsbehaarung (s. Abb. 2.9). Die Erkrankung kann in den ersten Lebensmonaten (Pajtas, 1950), im Kindesalter oder frühen Erwachsenenalter auftreten (Bentley-Phillips & Grace, 1979). Der Haarverlust ist ebenfalls diffus und progressiv. Das Ausmaß der Beeinträchtigung von Kopf- und Körperbehaarung und das Auftreten der Erkrankung sind variabel, sowohl inter- als auch intrafamiliär (s. Abb. 2.9; Betz *et al.*, 2006). Dies lässt auf modifizierende Faktoren oder unvollständige Penetranz rückschließen.

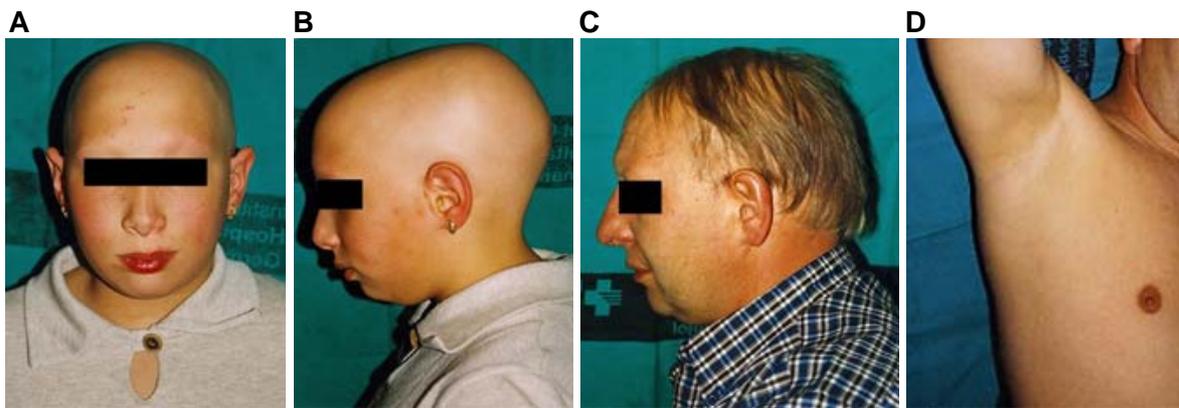


Abb. 2.9: Klinisches Erscheinungsbild der generalisierten HS (HSG). **(A und B)** Betroffene Tochter einer HSG-Familie im Alter von zehn Jahren. **(C)** Betroffener Vater des in Abb. 2.9 A und B gezeigten Kindes im Alter von 40 Jahren. Die HSG ist sowohl intra- (s. A-C) als auch interfamiliär sehr variabel ausgeprägt: während die Tochter komplett haarlos ist, ist beim Vater deutliches Haarwachstum auf dem Kopf zu sehen, nicht jedoch im Bereich der Achseln **(D)**. Übernommen aus Betz *et al.*, 2006.

Im Anfangsstadium zeigen morphologische Untersuchungen an Haaren von Betroffenen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie keine Veränderungen des Haarschaftes. Es können jedoch bei Betroffenen mit fortgeschrittener HS fokale Bereiche mit gestörter kutikulärer Struktur auftreten (Toribio & Quiñones, 1974; Kohn & Metzker, 1987). In einzelnen Studien wurden inselförmige Ansammlungen von Talgdrüsen in Hautbiopsien beobachtet (Ibsen *et al.*, 1991). Die Anzahl der Haarfollikel kann reduziert (Ibsen *et al.*, 1991; Hess und Uno, 1991) oder normal sein (Toribio & Quiñones, 1974). Narbenbildung und inflammatorische Veränderungen sind gewöhnlich nicht vorhanden. Diese Beobachtungen sind nicht allgemeingültig, sondern müssen kritisch betrachtet werden, da in den einzelnen Familien meist nur eine bis zwei Hautbiopsien durchgeführt wurden, die aus unterschiedlichen Erkrankungsstadien stammen. Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven und an Modellorganismen, wie verschiedenen *knockout*-Mäusen, werden diesbezüglich hilfreich sein. Bislang besteht keine Möglichkeit zur Therapie von HS. Aus diesem Grund ist es entscheidend, Gene zu identifizieren, die ursächlich für die Ausprägung der Erkrankung sind,

um die Pathophysiologie der Erkrankung zu verstehen und darauf aufbauend wirkungsvolle Therapien entwickeln zu können.

2.7 Bislang identifizierte Gene für HS

In der letzten Dekade konnten durch die Anwendung molekularer Techniken große Fortschritte beim Verständnis der HS erzielt werden. So wurde das *Corneodesmosin*-Gen (*CDSN*) für eine autosomal-dominante, auf den Kopf beschränkte Form von HS identifiziert (Betz *et al.*, 2000, Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003). Außerdem konnten die Genorte für zwei weitere autosomal-dominant vererbte HS-Formen identifiziert werden, die ursächlichen Gene sind aber bislang noch nicht bekannt. Hierbei kartiert die eine Form, bei der es sich um eine generalisierte HS handelt, auf den kurzen Arm von Chromosom 18 (18p11, Baumer *et al.*, 2000). Für die andere HS-Form konnte ein Genort auf Chromosom 2 identifiziert werden (2p25.1-2p23.2). Diese Erkrankung ist auf die Haare aus den frontalen und okzipitalen Kopfbereichen sowie die Augenbrauen und Wimpern beschränkt (Wang *et al.*, 2007).

Für autosomal-rezessive HS-Formen wurden bislang zwei Gene beschrieben, das *Desmoglein 4*-Gen (*DSG4*, Kljuic *et al.*, 2003) und das *Lipase H*-Gen (*LIPH*, Kazantseva *et al.*, 2006). Im Folgenden sollen die bislang für HS identifizierten Gene ausführlich dargestellt werden.

2.7.1 CDSN

Der Genort für eine auf den Kopf beschränkte, autosomal-dominante HS-Form konnte auf den kurzen Arm vom Chromosom 6 (6p21.3) kartiert werden (Betz *et al.*, 2000), was die Identifizierung des ursächlichen Gens *CDSN* (*Corneodesmosin*) ermöglichte (Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003). Bislang konnten drei Stoppmutationen in vier HS-Familien unterschiedlicher ethnischer Abstammung nachgewiesen werden (Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003, Dávalos *et al.*, 2005).

Bei *Corneodesmosin* handelt es sich um ein Glykoprotein, welches in der Epidermis und in der inneren Wurzelscheide von Haarfollikeln exprimiert wird und als Keratinozyten-Adhäsionsmolekül dient (Jonca *et al.*, 2002). Histologische, immunhistologische und proteinbiochemische Untersuchungen an Kopfhaut-Biopsien von Patienten haben gezeigt, dass eine Anhäufung des trunkierten *CDSN*-Proteins vorliegt, wahrscheinlich als Protein-Aggregate in der oberen Dermis und in der Peripherie der Haarfollikel der tieferen Dermis (Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass die Protein-Aggregate für Haarfollikel-Zellen toxisch sind und deshalb zum Haarverlust führen. Es könnte sich auch um

einen dominant-negativen Effekt handeln, bei dem das trunkierte Protein mit dem Wildtyp-Protein interagiert, wodurch es zum Verlust der Kohäsion der Zellen in der inneren Haarwurzelscheide kommt. Durch Generierung einer *CDSN-knockout* Maus konnte die essentielle Rolle des Corneodesmosin-Proteins für die Haut- und Haar-Physiologie bestätigt werden (Matsumoto *et al.*, 2008). *CDSN* stellt durch seine starken adhäsiven Eigenschaften einen wichtigen Bestandteil der Barriere-Funktion der Haut dar. Die Cre-vermittelte Deletion von *Cdsn* in Mäusen führt postnatal zu einem Verlust der Integrität der Desmosomen, die auch für die Erhaltung der Haarfollikel-Architektur eine große Rolle spielt (Leclerc *et al.*, 2009). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es sich bei der durch *CDSN*-Mutationen ausgelösten HS um eine Amyloid-Erkrankung handelt, bei der die präfibrillären *CDSN*-Oligomere toxisch auf die Keratinozyten wirken (Caubet *et al.*, im Druck).



Abb. 2.10: Klinisches Erscheinungsbild von HSS-Patienten mit *CDSN*-Mutation. Der Haarausfall ist auf den Kopf beschränkt und diffus. **(A und B)** 11-jähriger Betroffener, der der israelischen HS-Familie angehört, bei der initial Mutationen im *CDSN*-Gen nachgewiesen wurden (c.643C>T). **(C und D)** 15-jähriges Mädchen aus einer mexikanischen Familie, das ebenfalls eine *CDSN*-Mutation trägt (c.731C>G). Beide Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stoppkodon. (A und B) entnommen aus Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003. (C und D) entnommen aus Dávalos *et al.*, 2005.

2.7.2 DSG4

Im Jahre 2003 konnte in zwei konsanguinen, pakistanischen Familien mit autosomal-rezessiv vererbter HS Kopplung zum Cadheringen-Cluster auf Chromosom 18 nachgewiesen werden. Daraufhin wurde eine 5-kb Deletion im *DSG4*-Gen (*Desmoglein 4*) als Ursache für die Erkrankung berichtet (Kljuic *et al.*, 2003). Diese führt zu einer Deletion der Exons 5 bis 8, wobei es nicht zu einer Verschiebung des Leserasters kommt, sondern zu einem verkürzten Protein, welchem die Aminosäuren 125 bis 335 fehlen. Mittlerweile sind weitere Mutationen in der Fachliteratur beschrieben (Messenger *et al.*, 2005; Zlotogorski *et al.*, 2006; Shimomura *et al.*, 2006; Wajid *et al.* 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *DSG4*, ebenso wie *DSG1* und *DSG3*, als Autoantigen bei Pemphigus Vulgaris (PV)

fungiert (Nguyen *et al.*, 2000, Kljuic *et al.*, 2003). Das *DSG4*-Gen liegt beim Menschen im *Cadherin*-Gen-Cluster auf Chromosom 18q12, *downstream* von *DSG1* und *upstream* von *DSG3* und *DSG2*, und ist stark in den Zell-Zell-Kontakten der suprabasalen Schichten der Epidermis exprimiert.

Patienten mit *DSG4*-Mutation zeigen eine Hypotrichosis, die sich vornehmlich an Kopf, Brust, Armen und Beinen manifestiert. Augenbrauen und Bart sind weniger dicht als bei nicht Betroffenen. Die Haut der Patienten ist normal, mit Ausnahme von Bereichen der Kopfhaut, wo als Folge von eingewachsenen Haaren kleine Papeln auftreten können. Histologisch zeigen Kopfhaut-Biopsien von Patienten mit *DSG4*-Mutation abnormale Haarfollikel und Haarschäfte. Diese sind dünn, atrophisch und liegen oft aufgekringelt in der Haut vor, da sie die Epidermis nicht durchdringen können. Des Weiteren zeigen sie Schwellungen in der prekortikalen Region, die zu einem Bulbus-Bläschen an der Basis des Haarschafts führen (Kljuic *et al.*, 2003).

Es gibt zwei autosomal-rezessive Hypotrichosis-Mausmodelle, die eine Kopplung zu Loci in der syntenen Region – ebenfalls auf Chromosom 18 – zeigen, *lah/lah* und *lah^J/lah^J* (*lanceolate hair*). Eine Sequenzanalyse des *DSG4*-Gens zeigte eine Baseninsertion in Exon 7 bei der *lah^J/lah^J*-Maus (c.746insT), die zu einer Verschiebung des Leserasters und einer vorzeitigen Termination der Translation führt. Die Sequenzanalyse der *lah/lah*-Tiere führte zur Identifizierung einer A>C Transition an Nukleotid 587, wodurch es im *DSG4*-Protein zu einem Aminosäurewechsel von Tyrosin zu Serin an der Position 196 kommt. Tyr¹⁹⁶ ist weitgehend konserviert unter den verschiedenen Cadherinen und könnte eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellen. Die *lah^J/lah^J*-Maus dient somit als Tiermodell für eine Null-Mutante, wohingegen die *lah/lah*-Maus einen „Hypomorph“ repräsentiert (Kljuic *et al.*, 2003).

Im *lah^J/lah^J*-Mausmodell konnte für *DSG4* eine zentrale Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion nachgewiesen werden. Das Protein ist nicht oder nur schwach in Keratinozyten exprimiert. In Haarfollikeln zeigen sich Keratinisierungsdefekte in der inneren Wurzelscheide des Haarschaftes und eine komplette Ablösung der Keratinozyten in der Henle's und Huxley's Schicht und dem Kortex (Kljuic *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte in *DSG4*-defekten Haarfollikeln eine Verkürzung der Proliferationsphase und eine vorzeitige Differenzierung nachgewiesen werden, was unter anderem auf eine veränderte Expression des *hoxC13*-Gens und der Haarkeratin-Gene *Krt82* und *Krt34* zurückzuführen ist. Diese Gene sind für die Haarschaft-Kutikula und die Kortex-Differenzierung spezifisch (Kljuic *et al.*, 2003; Jave-Suarez *et al.*, 2002). Mutationen im *DSG4*-Gen führen also sowohl zu strukturellen Veränderungen am Haarfollikel als auch zu einer fehlerhaften Signalgebung. Diese hat einen Zusammenbruch der Kommunikation im tieferen Haarfollikel zur Folge und somit eine fehlerhafte Ausführung

des Differenzierungsprogramms der Zellen und führt dadurch zu einem verminderten Haarwuchs (Kljuic *et al.*, 2003).

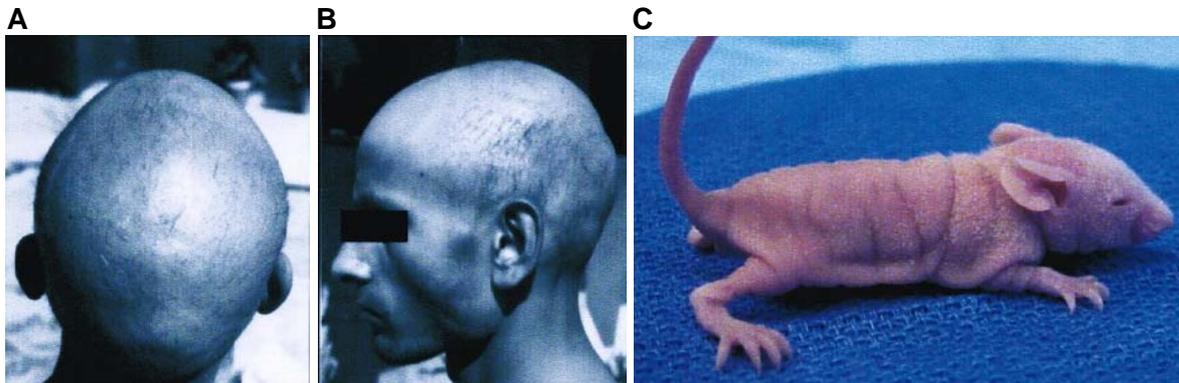


Abb. 2.11: Auswirkungen von *DSG4*-Mutationen bei Mensch und Maus. **(A und B)** Klinisches Erscheinungsbild eines pakistanischen Betroffenen mit autosomal-rezessiver HS, die durch Mutationen im *DSG4*-Gen ausgelöst wird. Die Hypotrichosis manifestiert sich an Kopf, Brust, Armen und Beinen. Die Gesichtsbehaarung, inklusive Augenbrauen und Bart ist nur geringfügig vorhanden, die Wimpern sind allerdings normal ausgeprägt. **(C)** Phänotyp der *lah/lah*-Maus, die eine Mutation im *Dsg4*-Gen trägt. Gezeigt ist ein 13 Tage altes Männchen mit abnormalen Schnurrhaaren und spärlichem Fell am gesamten Körper. Übernommen aus Kljuic *et al.*, 2003.

2.7.3 LIPH

Kazantseva *et. al* identifizierten in einer genetisch-epidemiologischen Studie, welche jeweils mehr als 170.000 Individuen zweier ethnischer Gruppen Russlands umfasste, 50 Familien mit autosomal-rezessiver HS. Alle Betroffenen leiden seit ihrer Kindheit unter Haarausfall, der sich mit fortschreitendem Alter verstärkt. Sie zeigen Störungen des Haarwachstums an Kopf und Körper, aber keine anderen Auffälligkeiten. Das Haarwachstum ist verlangsamt oder ganz zum Stillstand gekommen, was sich in kurzen Haarlängen darstellt. In histopathologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Haarfollikel eine abnormale Morphologie, Dystrophie und Fragilität aufweisen (Kazantseva *et al.*, 2006).

Mittels Mikrosatelliten-Analysen konnte eine Kopplung zu Chromosom 3q26-q27 nachgewiesen werden. Nach maximaler Einengung des Genortes kamen fünf Kandidatengene in Frage, die einer Mutationsanalyse unterzogen wurden. Hierbei konnte bei allen Betroffenen eine Deletion des Exons 4 im *Lipase H (LIPH)*-Gen identifiziert werden (c.527_628del; p.Gly176_Asp209del; Kazantseva *et al.*, 2006), welches die Phospholipase Lipase H kodiert (auch mPA-PLA₁α genannt, *membrane-bound phosphatidic acid-selective phospholipase A1*). Die Deletion führt zwar weder zu einem Stoppkodon noch wird das Leseraster verändert, aber sie eliminiert eine evolutiv konservierte Domäne im Protein, welche die bedeutsame Aminosäure Asp¹⁷⁸ enthält. Diese stellt neben Ser¹⁵⁴ und His²⁴⁸ eine der drei katalytisch wichtigen Aminosäuren des LIPH-Proteins dar (Jin *et al.*, 2002; Sonoda *et al.*,

2002). Eine Veränderung oder Deletion dieser kritischen Aminosäuren führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität des Enzyms und somit zur Funktionslosigkeit (Kubiak *et al.*, 2001; Sonoda *et al.*, 2002; Hiraoka *et al.*, 2005; Hiramatsu *et al.*, 2003).

Es ist bekannt, dass verschiedene Phospholipasen aus Phosphatidsäure (PA) Lyso-phosphatidsäure (LPA) herstellen (Aoki, 2004). LPA ist ein extrazellulärer Mediator bei vielen biologischen Prozessen, wie z. B. Proliferation, Migration, Differenzierung oder anti-apoptotischer Aktivität und wirkt durch Kopplung an verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Bandoh *et al.*, 1999; van Leeuwen *et al.*, 2003; Moolenaar *et al.*, 2004; Piazza *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2007). Die genaue physiologische Funktion von LIPH beim Haarwachstum wurde jedoch nicht weiter untersucht und bleibt somit ungeklärt.

Kurz nach der initialen Beschreibung einer *LIPH*-Mutation bei HS-Patienten von Kazantseva *et al.* (2006) wurden zwei weitere Mutationen im *LIPH*-Gen identifiziert, eine 5 bp-Deletion in Exon 2 (c.346_350del, Ali *et al.*, 2007) und eine 2 bp-Deletion in Exon 5 (c.659_660del, Jelani *et al.*, 2008). Beide Mutationen wurden in pakistanischen Familien identifiziert und führen zu einer Verschiebung des Leserasters. Dies hat eine vorzeitige Termination der Translation und somit ein verkürztes LIPH-Protein zur Folge. Kürzlich konnten wir in unserer Arbeitsgruppe erstmals eine Duplikation (c.280_369dup; Nahum *et al.*, 2009) und *compound-heterozygote* Mutationen im *LIPH*-Gen nachweisen (c.403_409dup/c.280_369dup; Pasternack *et al.*, 2009b). Des Weiteren wurden bis dato verschiedene *Missense*- und *Frameshift*-Mutationen publiziert (c.2T>C und c.322T>C; Naz *et al.*, 2009; c.682delT, c.322T>C, c.624delT und Ex7_8del; Shimomura *et al.*, 2009b; c.1303_1309dupGAAAACG; Shimomura *et al.*, 2009c).

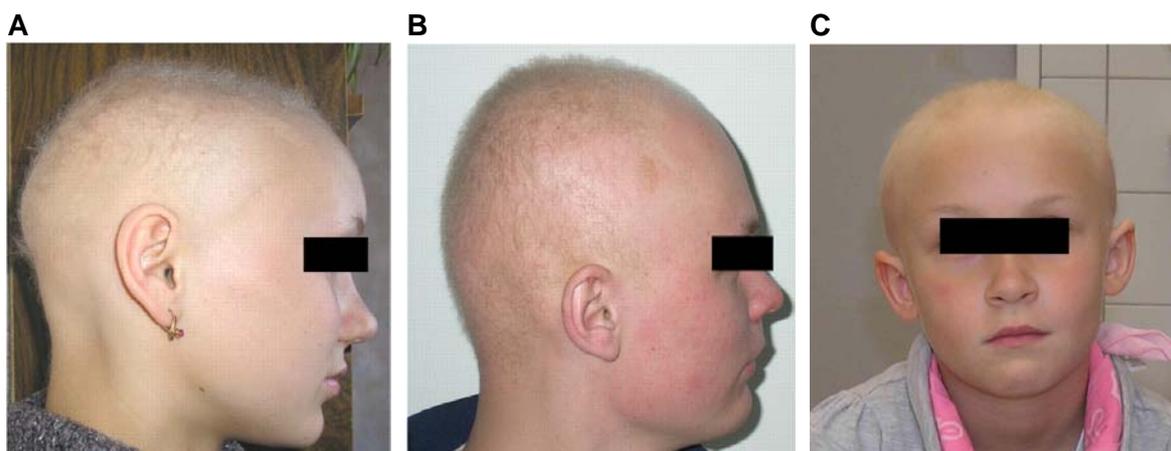


Abb. 2.12: Klinisches Erscheinungsbild von Hypotrichosis-Patienten mit *LIPH*-Mutation. Gezeigt sind **(A)** eine junge Frau russischer Abstammung und **(B)** ein junger Mann, ebenfalls russischer Abstammung. Beide tragen eine Deletion von Exon 4 des *LIPH*-Gens. **(C)** 9-jähriges Mädchen aus Österreich, welches *compound-heterozygote* *LIPH*-Mutationen trägt. Typisch sind bei allen Betroffenen die spärlichen Haare, die aufgrund ihrer Brüchigkeit nur geringe Haarlängen erreichen. Mit fortschreitendem Alter entwickelt sich die Hypotrichosis im Allgemeinen zu einer Alopezie, also einem vollständigen Fehlen der Haare. (A und B) übernommen aus Kazantseva *et al.*, 2006. (C) entnommen aus Pasternack *et al.*, 2009b.

2.8 Klinische Darstellung der untersuchten HS-Familie

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte die molekulare Ursache für eine isolierte, autosomal-rezessiv vererbte Form der HS identifiziert und charakterisiert werden. Als Untersuchungsmaterial standen uns Blutproben von elf Familienmitgliedern einer konsanguinen Familie saudi-arabischen Ursprungs zur Verfügung (im Folgenden als HS-Familie 1 bezeichnet), und zwar von den Eltern und neun Kindern. Vier der insgesamt zehn Kinder sind von HS betroffen (s. Abb. 2.13). Von der gesunden ältesten Tochter (II:1) stand keine Blutprobe und somit auch keine DNA für molekulargenetische Analysen zur Verfügung.

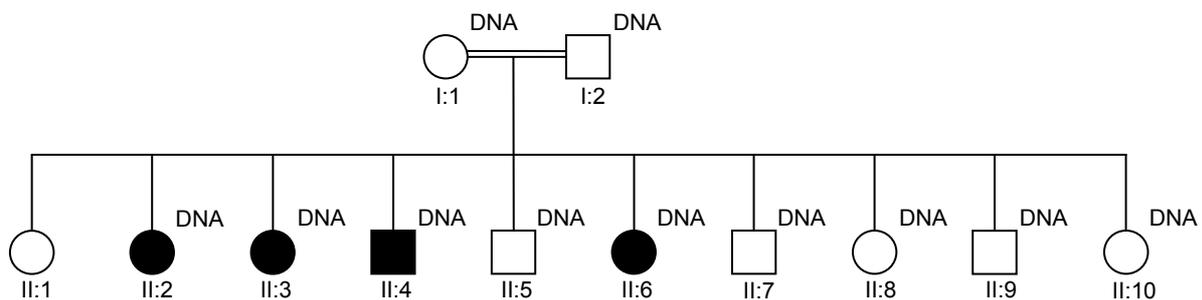


Abb. 2.13: Stammbaum der aus Saudi-Arabien stammenden untersuchten HS-Familie 1. Die Eltern sind Cousin/Cousine 3. Grades. Die Konsanguinität wird durch die Doppellinie zwischen den Eltern dargestellt. Vier der zehn Kinder sind von HS betroffen. Es stand von neun der zehn Kinder und den Eltern DNA als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Betroffene Familienmitglieder sind als schwarze Symbole dargestellt. Kreise und Vierecke zeigen weibliche bzw. männliche Familienmitglieder an.

Die betroffenen Geschwister zeigten normales Haarwachstum bei der Geburt und in den ersten Lebensjahren. Ab einem Alter von ca. drei bis sechs Jahren trat ein diffuser und fortschreitender Verlust des Kopfhaares auf. Die jüngste (II:6) und die älteste Betroffene (II:2) sind nun fast komplett haarlos. Individuum II:2 zeigt eine leichte Ausdünnung der Augenbrauen, ansonsten sind Augenbrauen, Wimpern, Bart, Achsel- und Schambehaarung bei allen Betroffenen unauffällig. Auch Haut, Nägel und Zähne zeigen keine Auffälligkeiten (Al Aboud *et al.*, 2002). Die Beeinträchtigung von Kopf- und Körperbehaarung ist variabel (s. Abb. 2.14). Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen.

Lichtmikroskopisch untersuchte Haare der HS-Patienten zeigten keine strukturellen Anomalien. Den drei betroffenen Frauen wurden 4 mm²-Hautbiopsien im Okzipitalbereich entnommen und untersucht. Hierbei zeigten sich normale Haarfollikel und normale Haarfollikel-Einheiten, die durch Fusion von drei bis fünf Haarfollikeln am Infundibulum entstehen (Al Aboud *et al.*, 2002). Die Anzahl der Haarfollikel in der Hautbiopsie auf Höhe des Infundibulums war reduziert, sie lag zwischen 20 und 35. Bei einem Gesunden liegen im Durchschnitt 40 Haarfollikel in einer 4 mm²-Hautbiopsie vor. Die Talgdrüsen in der Haut

waren normal entwickelt und es konnten keine inflammatorischen Infiltrate nachgewiesen werden (Al Aboud *et al.*, 2002).

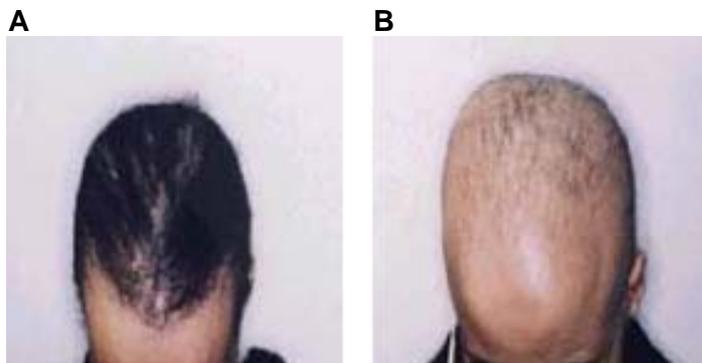


Abb. 2.14: Klinische Darstellung zweier betroffener Frauen der untersuchten HS-Familie 1. **(A)** Foto der Betroffenen II:3 im Alter von 25 Jahren. **(B)** Individuum II:2 der HS-Familie 1 im Alter von 28 Jahren. Die Ausprägung der HS ist sehr variabel. Entnommen aus Al Aboud *et al.*, 2002.

2.9 Identifizierung krankheitsverursachender Gene

Prinzipiell stehen zur Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen zwei Methoden zur Verfügung: Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen. Beide Methoden bedienen sich der Analyse von genetischen Markern. Hierbei handelt es sich um Polymorphismen, die sich in Form von Einzelbasen-Austauschen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), kurzen repetitiven Sequenzen (*short tandem repeats*, STRs) oder längeren repetitiven Sequenzen (*variable number tandem repeats*, VNTRs) darstellen können und deren chromosomale Lage bekannt ist.

Die Kopplungsanalyse wird in der Regel zur Identifizierung ursächlicher Gene bei monogenen Erkrankungen verwendet. Bei genetisch komplexen Erkrankungen ist die Assoziationsuntersuchung die Methode der Wahl, da meist keine genauen Angaben zu Erbgang, Penetranz, Genfrequenzen etc. gemacht werden können, wie es für die Kopplungsanalyse notwendig wäre. Bei der Assoziationsuntersuchung werden meist SNPs verwendet, um Allele von Gesunden und Erkrankten innerhalb einer ethnischen Gruppe zu vergleichen. Bei einer Assoziation tritt ein bestimmtes Allel in der Bevölkerung überzufällig häufig gemeinsam mit der Erkrankung auf.

Für Kopplungsanalysen wurden früher – so auch bei der Identifizierung des Genortes der untersuchten HS-Familie 1 – meist STR-Marker, auch Mikrosatelliten-Marker genannt, verwendet. Diese sind die häufigste Form repetitiver DNA und bestehen aus zwei bis vier Nukleotiden, die 10-100 mal wiederholt werden. Sie sind aufgrund der Mikrosatelliten-Instabilität hochinformativ und liegen über das gesamte Genom verteilt vor. Bei der Analyse wird in der zu untersuchenden Familie die Ko-Segregation von Markern mit dem Krankheits-Phänotyp untersucht. Liegt Kopplung vor, so treten bestimmte Marker überdurchschnittlich

häufig bei den Erkrankten auf, nicht aber bei den Gesunden. Dies beruht auf der örtlichen Nähe der Marker zum Krankheitsloкус, die nicht oder nur sehr selten durch Rekombinationsereignisse getrennt werden.

Der LOD (*logarithmic odds ratio*)-Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob Kopplung von Markern an den Phänotyp vorliegt oder nicht. Ein LOD-Score von ≥ 3 wird als Kopplungsnachweis bei monogenen Erkrankungen angesehen und besagt, dass die Wahrscheinlichkeit, dass Kopplung vorliegt, 1.000 mal größer ist, als dass keine Kopplung vorliegt. Die Berechnung des LOD-Scores erfolgt unter der Annahme verschiedener Rekombinationsfrequenzen und damit unterschiedlicher Abstände zwischen Genort und Marker. Anschließend kann dann mittels weiterer molekularbiologischer Methoden, wie z. B. der Positionsklonierung, nach der für die Krankheit verantwortlichen Mutation gesucht werden.

Seit der Vollendung des Humangenomprojektes und der Einführung und Weiterentwicklung von DNA-Arrays (auch DNA-Chips genannt), werden auch für Kopplungsanalysen zunehmend SNP-Typisierungen durchgeführt. Diese werden immer kostengünstiger und liefern die erforderliche genetische Information um ein vielfaches schneller als die herkömmliche Kopplungsanalyse mittels Mikrosatelliten-Markern.

2.10 Vorarbeiten

In Vorarbeiten waren von PD Dr. Regina C. Betz die bis zu jenem Zeitpunkt bekannten Genorte für verschiedene Haarerkrankungen, welche mit Haarausfall oder Haarwachstumsstörungen in Zusammenhang stehen, mittels Mikrosatelliten-Analysen für die hier untersuchte Familie ausgeschlossen worden (s. Anhang Tab. 12.1.1). Anschließend war mit allen zur Verfügung stehenden DNA-Proben eine genomweite Kopplungsanalyse mittels 320 hochpolymorpher Mikrosatelliten-Marker durchgeführt worden. Es konnte ein neuer Genort für HS auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14.11–13q21.33) mit einem maximalen LOD-Score von 3,9 ($\theta=0,0$) identifiziert werden (s. Abb. 2.15, s. auch Anhang Tab. 12.1.2 für zugehörige *two-point* LOD-Scores). Die somit definierte Kandidatenregion umfasst in etwa 34 Mb (s. Abb. 2.16 A und B).

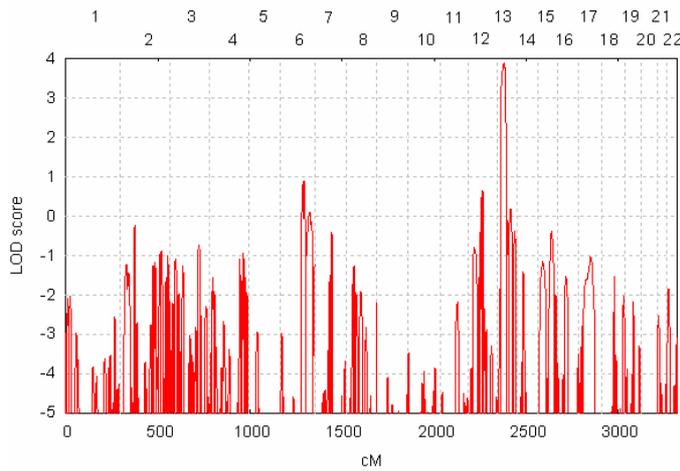


Abb. 2.15: Kopplungsanalyse der HS-Familie 1. Gezeigt ist der Multi-point LOD-Score für die Kopplung von HS an Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 1-22. X- und Y-Chromosom wurden nicht untersucht, da Männer und Frauen gleichermaßen von HS betroffen sind. Die an das Krankheitsbild koppelnde Region auf Chromosom 13 ist deutlich durch den herausragenden Peak erkennbar. Der LOD-Score beträgt 3,9.

A

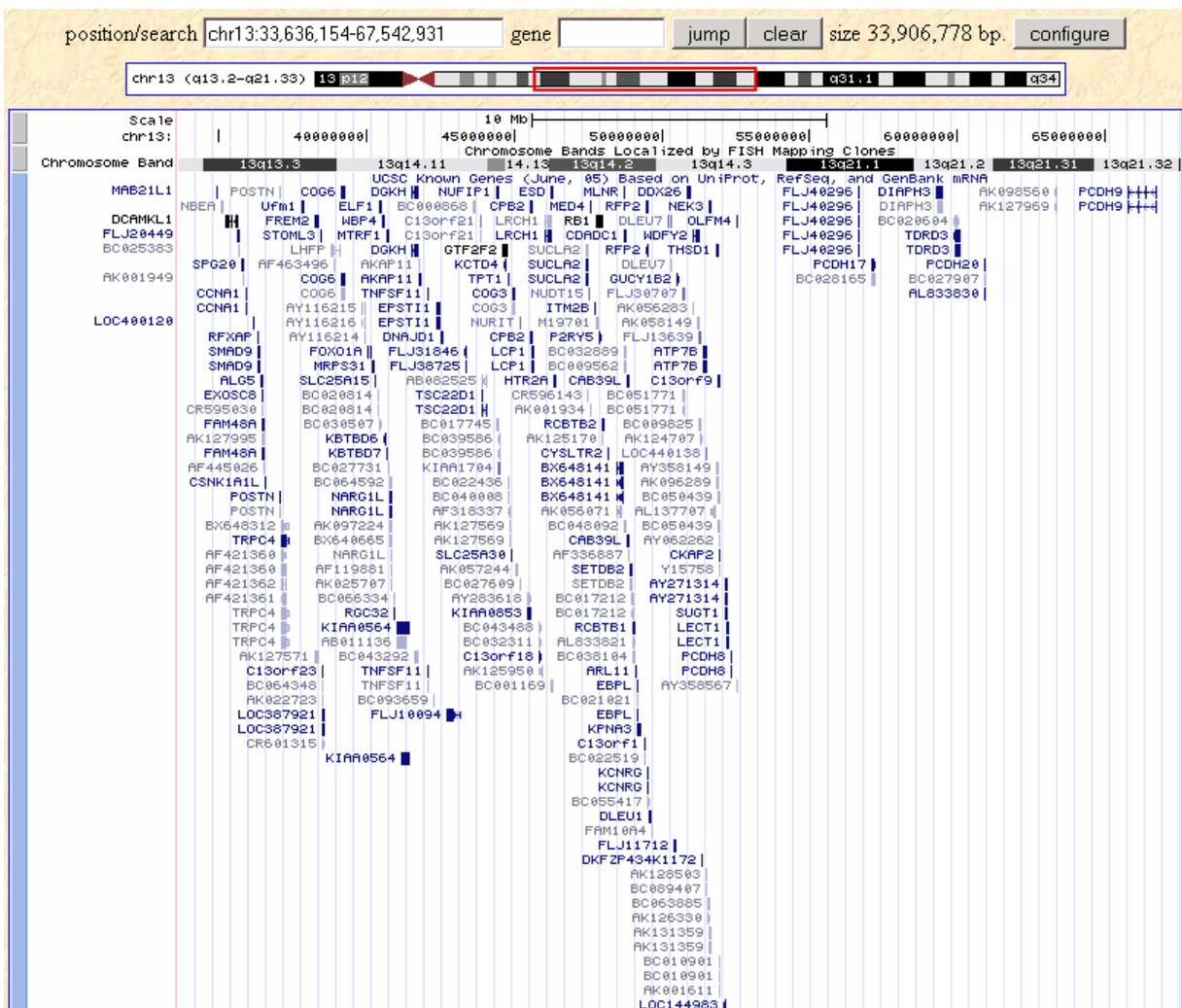


Abb. 2.16: (A) Grafische Darstellung der Kandidatenregion auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14.11–13q21.33). Gezeigt ist ein Screenshot des UCSC genome browsers. Die 34 Mb große Kandidatenregion ist durch ein rotes Kästchen hervorgehoben. Im unteren Bereich der Grafik sind die in der Region liegenden Gene (*known UCSC genes*) gezeigt (NCBI35/hg17). Diese basieren auf den Datenbanken UniProt, RefSeq und Genbank und geben alle bekannten humanen Protein-kodierenden und nicht-Protein-kodierenden Gene an.

B

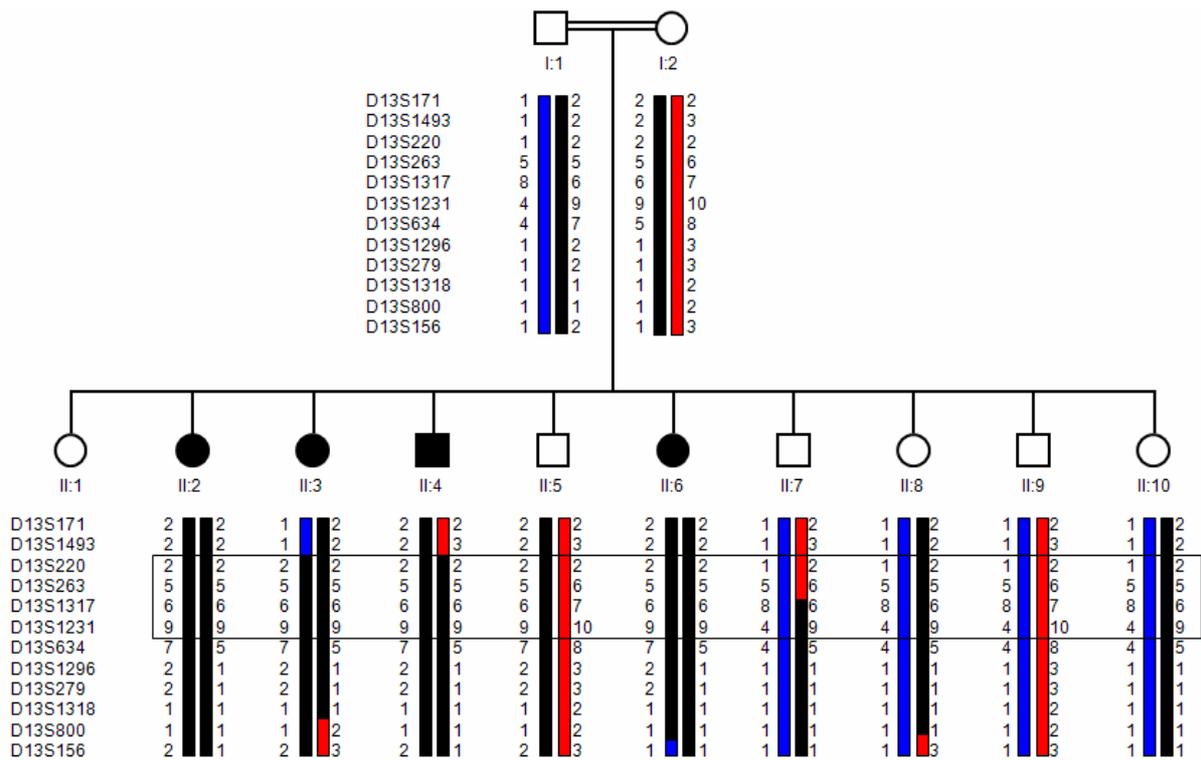


Abb. 2.16: (B) Stammbaum der HS-Familie 1. Nach genomweiter Kopplungsanalyse der DNA-Proben der untersuchten Familie konnte die Kandidatenregion zwischen die Mikrosatelliten-Marker D13S1493 und D13S634 kartiert werden. Marker-Haplotypen, die mit dem HS-Phänotyp gekoppelt sind, sind in Schwarz dargestellt. Als zentromerische Grenze der Kandidatenregion dient eine Rekombination bei Individuum II:4 und die Beobachtung der Heterozygotie im telomerischen Bereich. Familienmitglieder, die von HS betroffen sind, sind an schwarzen Symbolen zu erkennen. Kreise und Vierecke zeigen weibliche bzw. männliche Familienmitglieder an. Die entsprechenden Mikrosatelliten-Marker sind jeweils am linken Rand aufgelistet. Die homozygote Region, die bei allen Betroffenen vorliegt, ist durch einen Kasten hervorgehoben.

3. Zielsetzung

Haarverlust ist bei Menschen weit verbreitet. Obwohl es sich hierbei eigentlich nur um ein kosmetisches Problem handelt, führt er doch bei vielen Betroffenen zu beträchtlichem psychologischem Leidensdruck (Stough *et al.*, 2005; Lemieux *et al.*, 2008). Die momentan vorhandenen Therapien sind unbefriedigend und es besteht eine große Nachfrage nach neuen Behandlungsstrategien. Ein viel versprechender Ansatz um die Pathophysiologie des Haarverlustes zu verstehen, ist die Identifizierung von Genen, welche isolierten, mendelnden Alopezien zugrunde liegen. Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb in der Identifizierung und Charakterisierung der Gen-Mutation, die in einer konsanguinen Familie saudi-arabischen Ursprungs zu einer autosomal-rezessiv vererbten, isolierten Form der HS führt.

Bevor diese Arbeit begonnen wurde, war bereits mittels genomweiter Kopplungsanalyse der DNA-Proben der zu untersuchenden HS-Familie ein neuer Genort für diese Erkrankung auf Chromosom 13 identifiziert worden (unveröffentlichte Daten von PD Dr. Regina C. Betz). Zunächst sollte die Kandidatenregion durch Typisierung zusätzlicher Mikrosatelliten-Marker so weit wie möglich eingengt werden. Zusätzlich sollten die in der Region liegenden Gene auf Expression in Haut und Haarfollikeln von gesunden Probanden untersucht werden. Beruhend auf der Annahme, dass ein Gen in dem Gewebe exprimiert sein sollte, welches pathogene Veränderungen aufweist, können so Kandidatengene indirekt ausgeschlossen werden. Anschließend sollten die Exons (einschließlich Exon-Intron-Grenzen) der Kandidatengene amplifiziert und sequenziert werden, um Veränderungen in der genomischen Sequenz detektieren zu können.

Nach Identifizierung der ursächlichen Mutation sollte die Expression des entsprechenden Gens in verschiedenen Geweben untersucht werden. Zudem sollte das kodierte Protein zellbiologisch untersucht werden, z. B. mittels Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse. Weitere Experimente zur Aufklärung der biologischen Funktion des Proteins und des entsprechenden Pathomechanismus sollten in Abhängigkeit der sich im Laufe der Arbeit ergebenden Ergebnisse durchgeführt werden.

4. Material

4.1 Chemikalien

Soweit möglich, wurden Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysis“ (p. A.) verwendet. Alle Standardchemikalien, organische Substanzen und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen: Avanti Polar Lipids, Alabama (USA); Difco Lab., Michigan (USA); GE Healthcare, München; Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; MWG, Ebersberg; Promega, Mannheim; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; Riedel de Haen AG, Seelze; Sigma Chemie, Taufkirchen; Serva, Heidelberg.

4.2 Zellen und Vektorsysteme

4.2.1 Prokaryoten

E. coli TOP10F' (Invitrogen): F⁻ *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1**araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galJ* *galK* *rpsL*(Str^R) *endA1* *nupG*

E. coli GM2163 (Fermentas): F⁻ *dam-13::Tn9* (Cam^r) *dcm-6* *hsdR2* (*r_k⁻m_k⁺*) *leuB6* *hisG4* *thi-1* *araC14* *lacY1* *galK2* *galT22* *xylA5* *mtl-1* *rpsL136* (Str^r) *fhuA31* *tsx-78* *glnV44* *mcrA* *mcrB1*

4.2.2 Eukaryoten

Immortalisierte Mammalia-Zelllinien:

COS7 *African green monkey kidney*-Zellen (DSMZ)

Flp-In-CHO *Chinese hamster ovary*-Zellen (Invitrogen)

Immortalisierte Lymphozyten aus Blutproben der Individuen III:21, IV:1 und IV:2 der untersuchten HS-Familie 3.

4.2.3 Vektorsysteme

pcDNA3.1/V5-His	eukaryotischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pcDNA5/FRT/V5-His	eukaryotischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pCRE-luc	Luziferase-Reportergen-Vektor (Stratagene)
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor (Fermentas)
pDELBOY	<i>Knockout</i> -Vektor, D. J. Rossi (Universität Helsinki)

4.3 Medien für prokaryotische Zellen

Die Bestandteile der Medien wurden in A. bidest gelöst, autoklaviert und ggfs. vor Gebrauch mit dem entsprechenden Antibiotikum komplementiert.

Luria Bertani-Medium (LB-Medium):

10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 10 g/L NaCl

LB-Platten:

10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar, auf ca. 55°C abkühlen lassen, Antibiotikum zugeben (50µg/ml Ampicillin) und Platten gießen

SOC-Medium:

20 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 0,58 g/L NaCl, 0,19 g/L KCl, 2,03 g/L MgCl₂·6 H₂O, 3,6 g/L Glukose

4.4 Medien, Zusätze und Transfektionsreagenzien für eukaryotische Zellen

Amphotericin B	PAA
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glukose (DMEM)	Cambrex
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche
GlutaMAX™-I	Gibco
Ham's F12 (<i>Nutrient Mixture F12</i>)	Invitrogen
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen
Opti-MEM®	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phytohämagglutinin (PHA-L)	Biochrom
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium)	Pan Biotech
Natriumpyruvat	Biochrom
Trypsin EDTA	PAA
Zeocin	Invitrogen

COS7-Medium:

DMEM mit L-Glutamin und Glukose (Cambrex), 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B

Flp-In-CHO-Medium:

Ham's F12, 10 % FKS, 2 mM GlutaMAXTM-I, 100 µg/ml Zeocin

Medium für immortalisierte Lymphozyten:

RPMI 1640, 20 % FKS, 75 U/ml Penicillin, 75 µg/ml Streptomycin, 2 µg/ml Amphotericin B, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM GlutaMAXTM-I, 2 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA-L)

4.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Die Bestandteile der Lösungen und Verdünnungen wurden, so nicht anders aufgeführt, in A. bidest gelöst.

Ampicillin-Stocklösung:

20 mg/ml Ampicillin, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

BAC-Lösung I:

10 mM EDTA, pH auf 8,0 einstellen

BAC-Lösung II:

0,2 M NaOH, 1 % SDS

BAC-Lösung III:

127 ml H₂O, 23 ml Eisessig, 50 ml 7,5 M KAc

Bromphenol-Blau (BPB):

0,2 % Bromphenol-Blau in Ethanol, Lagerung bei -20°C

Coomassie-Färbe-Lösung:

300 ml Methanol, 60 ml Essigsäure, 1,2 g Coomassie Blue, 240 ml H₂O

Coomassie-Entfärbe-Lösung:

50 ml Methanol, 50 ml Essigsäure, 400 ml H₂O

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs):

10 mM pro dNTP, verdünnt auf 1,25 mM (GeneCraft)

Ethidiumbromid-Lösung, 1 %ig:

10 mg/ml Ethidiumbromid, Lagerung bei 4°C

Hanks' balanced salt solution (HBSS)-Puffer 10 x:

1,4 g/L CaCl₂, 4 g/L KCl, 0,6 g/L KH₂PO₄, 1 g/L MgCl₂·6H₂O, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 80 g/L NaCl, 0,9 g/L Na₂HPO₄·7H₂O, 1 g/L D-Glukose wird direkt vor Gebrauch zu 1 x Puffer zugefügt, pH auf 7,3 einstellen

Phosphate buffered saline (PBS)-Puffer 10 x:

80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14,4 g/L Na₂HPO₄, 2,4 g/L KH₂PO₄, pH auf 7,4 einstellen

PBST-Puffer 10 x:

80 g/L NaCl, 2 g/L KCl, 14,4 g/L Na₂HPO₄, 2,4 g/L KH₂PO₄, 0,2 % Tween 20, pH auf 7,4 einstellen

RIPA-Puffer:

150 mM NaCl, 0,5 % sodium deoxycholate (DOC), 1 % NP-40, 0,1 % SDS, 50 mM Tris/HCl pH 7,4, Protease-Inhibitor Cocktail

20 x SSC:

3 M NaCl, 0,3 M Na₃Citrat·2H₂O, pH auf 7,0 einstellen

Transformation-Buffer I (TfBI)-Puffer:

100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin

Transformation-Buffer II (TfBII)-Puffer:

10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer 10 x:

1 M Tris, 0,83 M Borat, 10 mM EDTA

Tris-EDTA (TE⁻⁴)-Puffer:

0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH auf 8,0 einstellen

4.6 Material zur Analyse von Nukleinsäuren

α -³²P-CTP (Amersham Radiochemicals)
Agarose (Sigma-Aldrich)
Amersham Megaprime™ DNA Labeling System (GE Healthcare)
CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas)
Cot-1 DNA (Invitrogen)
DNA-Längenstandards (Metabion, Fermentas)
DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Qiagen)
ExpressHyb™ Hybridization Solution (BD Biosciences)
Hi-Di™-Formamid (Applied Biosystems)
illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)
Lachs-Testis-DNA (Sigma-Aldrich)
Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3 (BD Biosciences)
Nukleotide (Invitrogen)
Primer und Random Hexamers (Metabion, Invitrogen)
Plasmid Purification Kit „Mini“ (Fermentas), „Midi“ (Invitrogen), „Maxi“ (Qiagen)
RNA^{later}® (Ambion)
RNeasy® Mikro Kit (Qiagen)
Sephadex G-50-Säule (GE Healthcare)

4.7 Enzyme und Inhibitoren

Alkalische Phosphatase (CIAP) (Fermentas)
BioTherm™ Taq DNA Polymerase (GeneCraft)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
CRE-Rekombinase (zur Verfügung gestellt von Dr. Michael Peitz, Universität Bonn)
DNase I (Promega)
Expand Long Template DNA-Polymerase (Roche)
Pwo Super Yield DNA Polymerase (Roche)
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich)
Restriktionsendonukleasen (Fermentas, Roche)
RNase A (Sigma-Aldrich)
RNaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)
SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen)
T4 DNA Ligase (Invitrogen)

4.8 Material zur Proteinanalyse

Amersham Hybond™-P (GE Healthcare)
 bis-BODIPY® FL C₁₁-PC (Invitrogen)
 Blotting-Papier (BioRad)
 BSA (*bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich)
 Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)
 D_c Protein-Assay (Bio-Rad)
 Einbettmedium (Vektorshield)
 Forskolin (Sigma-Aldrich)
 L-[³⁵S]-Methionin (1.000 Ci/mmol; Amersham Radiochemicals)
 LPA (1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphat; Avanti Polar Lipids)
 Magermilchpulver (Sigma-Aldrich)
 MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen)
 NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen)
 PathDetect® in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting System (Stratagene)
 PED-A1 (Invitrogen)
 Pertussis-Toxin (Sigma-Aldrich)
 Phosphatidsäure (Sigma-Aldrich)
 Röntgenfilm X-Omat AR (Kodak)
 SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)
 TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega)
 WesternBreeze® Chemiluminescent Immunodetection System (Invitrogen)

Tab. 4.1: Primäre Antikörper

Epitop	Typ	Firma	Verdünnung	
			WB	IF
anti-V5	monoklonale Maus IgG	Invitrogen	1:5.000	1:500
anti-PDI	polyklonale Kaninchen IgG	Stressgen Biotechnologies	-	1:250
anti-Cadherin	polyklonale Kaninchen IgG	USBiological	-	1:250
SP4556P (anti-P2Y5)	synthetisches Peptid, Kaninchen IgG	Acris	1:1.000	-
Sc-20126 (anti-P2Y5)	polyklonale Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:500	-
Sc-31503 (anti-P2Y5)	polyklonale Ziegen IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:400	-

Tab. 4.2: Sekundäre Antikörper

Epitop	Typ	Firma	Verdünnung	
			WB	IF
Cy3-anti-Maus IgG	polyklonale Ziege IgG	Rockland	-	1:1.000
FITC-anti-Kaninchen IgG	polyklonale Ziege IgG	Dianova	-	1:1.000

4.9 Software und Datenbanken

Chromas Version 2.21	http://www.technelysium.com.au/
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/
Cyrillic Version 2.1.3	Cherwell Scientific Publishing
Ensembl	http://www.ensembl.org/
ExPASy	http://www.expasy.ch/tools/
GraphPad Prism Version 4.03	GraphPad
MGI	http://www.informatics.jax.org/
Molecular Toolkit	http://www.vivo.colostate.edu/molkit/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEB cutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
SeqMan TM II	DNASTAR
Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems
UniProt	http://www.uniprot.org/
UCSC	http://genome.ucsc.edu/
Vector NTI	Invitrogen

4.10 Oligonukleotide (Primer)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und Invitrogen bezogen. Sie wurden in A. bidest in einer Endkonzentration von 10 pmol/μl gelöst.

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in den Tabellen 12.1.5-12.1.8 des Anhangs aufgelistet.

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Haarfollikeln

Das Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA) erfordert, dass der Arbeitsplatz, alle Gerätschaften und Chemikalien RNase-frei sind. Aus diesem Grund wurden der Arbeitsplatz und die Pipetten mit 70 %igem Ethanol gereinigt und RNase-freie Pipettenspitzen verwendet. Alle Chemikalien wurden ausschließlich für Arbeiten mit RNA verwendet. Anstelle von Wasser wurde eine 0,1 %ige DEPC-Lösung benutzt, die ü. N. bei 37°C geschüttelt und anschließend autoklaviert wurde. Ca. 30 Haarfollikel von verschiedenen Individuen wurden mit einer sterilen Pinzette aus der Haut herausgezogen, direkt oberhalb des Haarfollikels abgeschnitten, gepoolt und sofort in *RNAlater*[®]-Lösung gegeben. In dieser RNA-stabilisierenden Lösung können die Zellen *ex-vivo* bis zur Verarbeitung mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Es wurden sowohl Kopfhaare als auch Augenbrauen entnommen, welche getrennt voneinander behandelt wurden. Nach Entfernen der *RNAlater*[®]-Lösung wurde die RNA mit Hilfe des *RNeasy*[®] *Micro Kits* (Qiagen) isoliert. Bei diesem System werden die Zellen lysiert und anschließend RNA-Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, an eine Silica-Membran gebunden. Spuren von DNA werden durch einen *DNase*-Verdau direkt auf der Säule eliminiert. Durch mehrmaliges Waschen mit ethanolhaltigen Puffern werden Verunreinigungen und die *DNase* von der Membran gewaschen. Anschließend wird die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde anschließend durch Messung am Nanodrop-Spektrophotometer (Thermo Scientific) überprüft. Die RNA wurde bei -70°C gelagert oder direkt in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 5.1.2).

5.1.2 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Um eine geeignete DNA-Vorlage, das so genannte *Template*, für PCRs durch die *Taq*-DNA-Polymerase zu erhalten, muss die RNA revers in DNA transkribiert werden. Hierfür wurde eine retrovirale reverse Transkriptase verwendet, die an einzelsträngige RNA-Moleküle einen komplementären DNA-Strang (*complementary* oder *copy* Strang, cDNA) synthetisiert.

Als Primer für die reverse Transkription wurden *random hexamers* verwendet, die sich an vielen Stellen der RNA anlagern können. Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA, 2 µl *random hexamers* (10 pmol/µl), 1 µl 10 mM dNTP-Mix und A. bidest (ad 12 µl) vermengt. Der Ansatz wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, so dass durch Selbstanlagerung

entstandene Sekundärstrukturen der RNA aufgebrochen wurden, und dann sofort für mindestens 2 min auf Eis gestellt, damit die Strukturen entfaltet blieben. Danach wurden 4 µl 5 x *First-Strand Buffer*, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* zugefügt. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde zu dem Ansatz 1 µl *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) hinzugefügt und es erfolgten Inkubationen für 10 min bei 25°C, 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C zum Stoppen der Reaktion. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch am Nanodrop-Spektrophotometer (Thermo Scientific) gemessen. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Durch Messung der optischen Dichte (OD) bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung bestimmt werden. Ein Absorptionswert OD_{260nm} von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA/RNA und 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide (Sambrook & Russell, 2001). Die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung wird durch Bestimmung des Verhältnisses vom OD_{260nm} zum OD_{280nm} -Wert geprüft, da aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} beträgt für reine Nukleinsäuren 1,8. Ist der Wert geringer als 1,7, weist das auf eine Proteinverunreinigung hin. Bei einer reinen RNA-Präparation ist der Quotient $\geq 2,0$ (Sambrook & Russell, 2001).

5.1.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine von Mullis und Faloona (1987) eingeführte *in-vitro* Technik, mit der gezielt DNA-Abschnitte, die von bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigt werden können. Hierfür benötigt man kurze, einzelsträngige DNA-Fragmente, so genannte Oligonukleotide (Primer), die komplementär zur DNA-Matrize (*Template*) sind. Eine DNA-Polymerase, meist die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, verlängert unter bestimmten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entsprechend der einzelsträngigen, durch Hitze denaturierten DNA-Matrize. So wird neue, doppelsträngige DNA synthetisiert, dessen Sequenz komplementär zum *Template* ist.

Der zyklische Temperaturwechsel von 95°C (Denaturierung), 45-65°C (*Annealing* oder Primer-Hybridisierung) und 72°C (Primer-Extension) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung des DNA-Abschnitts. Im Allgemeinen werden 25 bis 35 Zyklen durchgeführt um

eine optimale Ausbeute zu erreichen. Verschiedene Geräte für die Steuerung der Temperaturzyklen, so genannte *Thermocycler* oder PCR-Maschinen, ermöglichen die Automatisierung der PCR.

Als Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktionen wurde genomische DNA, Plasmid-DNA, BAC-DNA oder cDNA eingesetzt. Der in dieser Arbeit verwendete Standard-PCR-Ansatz (s. Tab. 5.1) hat ein Volumen von 25 µl. Im Allgemeinen wurde ein „*touch down*“-Programm verwendet, bei dem die *Annealing*-Temperatur im ersten Zyklus um 6°C und im zweiten Zyklus um 3°C höher liegt als die errechnete *Annealing*-Temperatur des Primerpaares. Erst ab dem dritten Zyklus wurde das *Annealing* bei der optimalen Temperatur durchgeführt (s. Tab. 5.2). Dieses Programm soll die unspezifische Anlagerung der Oligonukleotide an die Ausgangs-DNA verhindern und somit die Amplifikation von unerwünschten Nebenprodukten vermeiden. Die *Annealing*-Temperatur wurde aufgrund der Primersequenzen nach der 2 + 4 Regel berechnet, wonach Adenin und Thymin 2°C und Cytosin und Guanin 4°C zählen. Die aus der Primersequenz resultierende Summe minus 5°C ergibt die ungefähre *Annealing*-Temperatur. Die *Taq*-DNA-Polymerase hat eine DNA-Synthese-Geschwindigkeit von etwa 1.000 Basen/min, so dass die Primer-Extension einer PCR-Reaktion der erwarteten Produktlänge entsprechend angepasst werden muss.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden diese in einem Agarosegel (1,5 %ig in 1 x TBE-Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Länge der DNA-Fragmente, der Konzentration der Agarose im Gel und der angelegten Spannung ab. Die Färbung erfolgte mit dem interkalierenden Acridinfarbstoff Ethidiumbromid, der sich zwischen die einzelnen Basenpaare der DNA einlagert. Bei Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (366 nm) wurden die Amplifikate sichtbar gemacht und deren Länge durch den Vergleich mit einem Längenstandard abgeschätzt.

Tab. 5.1: Standard-PCR-Ansatz

	Mengenangaben der PCR-Komponenten	Endkonzentration
PCR-Mix	2,5 µl 10 x PCR-Puffer (200 mM TrisHCl pH 8,4, 500 mM KCl)	1 x
	0,75 µl MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
	0,5 µl dNTPs (je 10 mM)	0,2 mM je dNTP
	0,2 µl <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 U in 25 µl
	1,0 µl F-Primer (10 pmol/µl)	0,4 pmol/µl
	1,0 µl R-Primer (10 pmol/µl)	0,4 pmol/µl
	H ₂ O ad 23,5 µl	
DNA	1,5 µl (20 ng/µl)	1,2 ng/µl
Endvolumen	25,0 µl	

Tab. 5.2: *Thermocycler-Programm für Standard-PCR*

Wiederholung	Temperatur	Dauer	Reaktion
1 x	95°C	5 min	Initiale Denaturierung
1 x	95°C	30 sec	Denaturierung
	$x^* + 6^{\circ}\text{C}$	30 sec	Primer- <i>Annealing</i>
	72°C	30-90 sec	Primer-Extension
1 x	95°C	30 sec	Denaturierung
	$x^* + 3^{\circ}\text{C}$	30 sec	Primer- <i>Annealing</i>
	72°C	30-90 sec	Primer-Extension
25-35 x	95°C	30 sec	Denaturierung
	x^*	30 sec	Primer- <i>Annealing</i>
	72°C	30-90 sec	Primer-Extension
1 x	72°C	7 min	Finale Primer-Extension
1 x	4°C	∞	Lagerung

*x = errechnete *Annealing*-Temperatur

5.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

5.1.5.1 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Reaktionsansätzen

PCR-Produkte mit einer Größe von 50 bp bis 5 kb wurden mit Hilfe des *illustra GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE Healthcare) aufgereinigt. Bei diesem System wird die spezifische Eigenschaft von DNA genutzt, in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze an eine Silica-basierte Membran zu binden. Salze, überschüssige Primer und dNTPs werden durch einen Waschpuffer von der membrangebundenen DNA entfernt. Die DNA kann anschließend mit Wasser oder 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) eluiert werden.

5.1.5.2 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Sollte nur ein bestimmtes DNA-Fragment aus einem Restriktionsverdau analysiert werden oder im Falle, dass die PCR unerwünschte Nebenprodukte lieferte, wurde der gesamte Ansatz über ein Agarosegel aufgetrennt. Die mit Ethidiumbromid markierte DNA wurde unter UV-Licht bei 366 nm sichtbar gemacht und die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden die Gelstücke in *Capture-Buffer* aufgenommen, bei 65°C aufgeköcht und mit Hilfe des *illustra GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

5.1.6 Automatische, nicht-radioaktive Sequenzanalyse von DNA

Zur Ermittlung der Nukleotidabfolge wurde das Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) angewendet. Hierbei werden neben Standard-dNTPs und nur einem Sequenzier-Primer, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) für die PCR (*Cycle*-Sequenzier-Reaktion) eingesetzt. Die ddNTPs führen zum Abbruch der Synthese, da sie keine 3'-OH-Gruppe tragen, welche für die Kondensation mit dem Phosphat des nächsten dNTPs nötig ist. Die Produkte aller vier Kettenabbruchreaktionen können anhand der spezifischen Emissionscharakteristika der vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten Terminationsnukleotide unterschieden werden. Die Sequenzanalyse wurde auf einem DNA-Sequenzier-Automaten (*Applied Biosystems 3100*) durchgeführt. Das Gerät besteht aus einem 16-Kapillar-Elektrophorese-Modul und einer Analyseeinheit. Bei der Elektrophorese werden die fluoreszenzmarkierten Reaktionsprodukte ihrer Größe nach aufgetrennt, beim Durchlaufen einer Laserschranke detektiert und automatisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen *Sequencing Analysis*, *Chromas* und *SeqManII*.

Von den aufgereinigten PCR-Produkten wurde jeweils 50 ng in der Sequenzier-Reaktion (s. Tab. 5.3) eingesetzt. Anschließend wurde die Sequenzier-Reaktion im *Thermocycler* (PTC-200, MJ Research) durchgeführt (s. Tab. 5.4).

Tab. 5.3: Reaktionsansatz für die nicht-radioaktive Sequenzanalyse

Verwendete PCR-Reagenzien	Mengenangaben der PCR-Komponenten
5 x Sequenzier-Puffer	4,0 µl
Oligonukleotid-Primer	0,5 µl (10 pmol/µl)
DNA	50 ng
<i>BigDye Terminator</i>	1,25 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tab. 5.4: Cycle-Sequenzier-Reaktion

Wiederholung	Temperatur	Dauer	Reaktion
1 x	94°C	5 min	Initiale Denaturierung
25 x	96°C	12 sec	Denaturierung
	50°C	5 sec	Primer- <i>Annealing</i>
	60°C	4 min	Primer-Extension mit Abbrüchen
1 x	60°C	20 min	Finale Primer-Extension mit Abbrüchen
1 x	4°C	∞	Lagerung

Nach der Sequenzier-Reaktion wurden die Proben über *DyeExTM 2.0* Säulen (Qiagen) aufgereinigt, in Hi-DiTM-Formamid 1:10 verdünnt und anschließend im DNA-Sequenzier-Automaten analysiert.

5.1.7 Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3

Um die Expression des *P2RY5*-Gens in vielen verschiedenen Geweben mit einer einfachen und schnellen Methode zu untersuchen, wurde ein *Expression-Array (Multiple Tissue Expression [MTE] Array 3)* von der Firma BD Biosciences verwendet. Hierbei handelt es sich um eine positiv geladene Nylon-Membran, auf welche poly A⁺ RNA von 75 verschiedenen humanen Geweben und acht verschiedene Kontroll-RNAs und DNAs punktförmig aufgetragen und immobilisiert wurden. Mit dem *Array* können sowohl Aussagen über die Expression eines Gens in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien gemacht werden als auch über die relativen mRNA-Mengen in den entsprechenden Geweben.

Da G-Protein-gekoppelte Rezeptoren einige konservierte Domänen enthalten und die Mitglieder einer Untergruppe, wie z. B. die der LPA-Rezeptoren, mitunter eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen können, wurde mit verschiedenen Sonden gearbeitet, die verschiedene Bereiche des Gens abdecken. Die Sonden wurden des Weiteren in der NCBI Datenbank geblastet, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten und somit eine Anlagerung an ähnliche Sequenzen zu vermeiden.

Die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden (Primer für Sonden s. Anhang Tab. 12.1.6) erfolgte mit dem *Amersham MegaprimeTM DNA Labeling System* (GE Healthcare) nach Anleitung des Herstellers. Hierbei wurden zunächst 5 µl der Ausgangs-DNA (5 ng/µl) und 5 µl Primer (10 pmol/µl) denaturiert. Anschließend wurden 16 µl H₂O, 5 µl Reaktionspuffer, 2 µl Enzym (*DNA polymerase 1 Klenow fragment*), 5 µl radioaktiv markierte α-³²P-Nukleotide (hier CTP) und jeweils 4 µl der entsprechenden anderen, unmarkierten Nukleotide zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt und der Reaktionsansatz im Anschluss über eine Sephadex G-50-Säule aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen.

Für die Hybridisierung der Sonden wurde der *Array* mit 10 ml 50-60°C warmer *BD ExpressHybTM Hybridisation-Solution*, zu welcher 1,5 mg durch Hitze denaturierte Lachs-Testis-DNA zugefügt wurden, in ein Hybridisierungsgefäß gegeben und für 30 min bei 65°C prähybridisiert. Derweil wurde die radioaktiv markierte Sonde mit 30 µg Cot-1 DNA, 150 µg Lachs-Testis-DNA und 50 µl 20 x SSC gemischt und zu einem Endvolumen von 200 µl mit H₂O aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Entfernen der

Prähybridisierungslösung wurde das auf 68°C vorgewärmte Gemisch zu 15 ml frischer *BD ExpressHyb™ Hybridisation-Solution* gegeben und der *Array* ü. N. hybridisiert.

Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entsorgt und der *Array* unter stringenten Bedingungen für 20 min bei 65°C gewaschen (fünfmal mit 200 ml Waschlösung 1 [2 x SSC, 1 % SDS] und zweimal für 20 min bei 55°C mit 200 ml der Waschlösung 2 [0,1 x SSC, 0,5 % SDS]). Danach wurde der *Array* aus dem Hybridisierungsgefäß entfernt, in Folie gewickelt und eingeschweißt. Ein Röntgenfilm wurde aufgelegt und der *Array* bei -70°C bis zur Entwicklung, die nach wenigen Tagen stattfand, aufbewahrt.

Zur erneuten Benutzung des *Arrays* können die Sonden durch so genanntes „*Strippen*“ wieder vom Blot entfernt werden. Dies geschieht durch viermaliges Waschen der Membran für 15 min mit 55°C warmer 0,5 %iger SDS-Lösung. Darauf wird die Membran luftblasenfrei in eine Folie eingeschweißt und bis zur erneuten Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

5.1.8 Klonierung von cDNA in Expressionsplasmide

5.1.8.1 Klonierung von PCR-Produkten in *pJET1.2/blunt*

Beim *pJET1.2/blunt* handelt es sich um einen linearisierten Klonierungsvektor mit „*blunt ends*“, d. h. beide Stränge sind an derselben Stelle geschnitten worden, so dass gerade (glatte) Enden vorliegen. Zur Generierung von PCR-Produkten für die Klonierung wurde eine *proofreading-polymerase* (Pwo Super Yield DNA Polymerase, Roche) verwendet, die sich durch eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität auszeichnet. Diese ermöglicht es der Polymerase, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu erkennen und zu korrigieren. Da diese Polymerase keinen T-A-Überhang produziert, kann das PCR-Produkt direkt für die *blunt-end*-Ligation verwendet werden.

Sollte die im *pJET1.2/blunt*-Vektor vorliegende „*multiple cloning site*“ (MCS) nicht für eine Umklonierung in den Expressionsvektor geeignet sein, empfiehlt es sich, die Erkennungssequenz der gewünschten Restriktionsendonuklease(n) und zusätzlich noch zwei bis vier beliebige Basen an das 5'-Ende des F- und R-Primers anzuhängen. Dies dient dem Schutz der Erkennungssequenz vor evtl. vorhandenen Nukleasen und als Ansatzpunkt für die verwendeten Enzyme. Da die MCS des *pJET1.2/blunt*-Vektors nicht zur Umklonierung der DNA-Fragmente in den *pcDNA3.1*-Vektor geeignet war, wurde auch in der vorliegenden Arbeit dem F-Primer eine *HindIII*-Schnittstelle und dem R-Primer eine *XhoI*-Schnittstelle zugefügt (s. Anhang Tab. 12.1.6 und 12.1.8). Durch die Verwendung von zwei Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Überhänge beim Schneiden der DNA erzeugen, wurde eine gerichtete Ligation ermöglicht, wobei das PCR-Produkt nur in einer Orientierung in den Vektor ligiert werden kann.

Die verschiedenen *P2RY5*-Konstrukte wurden mit den in Tab. 12.1.6 des Anhangs angegebenen Primern mit genomischer DNA der Betroffenen der HS-Familien 1 und 2 und einer Kontrolle generiert, da das *P2RY5*-Gen nur ein kodierendes Exon enthält. Die Proteine wurden sowohl N- als auch C-terminal mit dem V5-Epitop (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) fusioniert, damit eine Detektion mit dem V5-Antikörper (Invitrogen) ermöglicht wird. Die *LIPH*-Konstrukte wurden künstlich über rekombinante PCRs aus Haarfollikel-cDNA einer gesunden Kontrollperson generiert (Primer s. Anhang Tab. 12.1.8), da von den Patienten keine RNA zur Verfügung stand.

5.1.8.2 Umklonierung von PCR-Produkten in den *pcDNA3.1/V5/His*-Vektor

Zur proteinbiochemischen Analyse des von der DNA kodierten Proteins muss diese vom Klonierungsvektor in ein Expressionsplasmid umkloniert werden, welches Promotoren für die Expression der DNA in Säugetier-Zellen enthält. Beim *pcDNA3.1/V5/His*-Vektor ist dies der CMV-Promotor (Zytomegalie-Virus), der eine konstitutive und starke Expression des Transgens gewährleistet. Im Folgenden wird der *pcDNA3.1/V5/His*-Vektor der Einfachheit halber als *pcDNA3.1*-Vektor bezeichnet.

Für die Umklonierung wurden zunächst der *pJet1.2*-Klonierungsvektor, welcher die fehlerfrei subklonierte cDNA enthält, und der Expressionsvektor mit der/den gleichen Restriktionsendonuklease/n geschnitten (s. Kap. 5.1.8.3). Danach wurden beide Plasmide auf ein 1 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die gewünschten DNA-Banden (also das Insert des *pJET1.2*-Vektors und der linearisierte *pcDNA3.1*-Vektor) unter UV-Licht ausgeschnitten und aufgereinigt (s. Kap. 5.1.5.2). Anschließend konnten die Ligation angesetzt (s. Kap. 5.1.8.5), chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien mit dem erhaltenen Plasmid transformiert (s. Kap. 5.1.9.2) und die daraus resultierenden Bakterienklone mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert werden (s. Kap. 5.1.8.3 und 5.1.6).

5.1.8.3 Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für den Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Diese Enzyme schneiden ein DNA-Molekül an einer spezifischen, palindromischen Erkennungsstelle. Der Restriktionsverdau erfolgte in der Regel mit 1 U *Fast-Digest* Enzym/ μg DNA in einem vom Hersteller (Fermentas) gestellten Puffersystem unter den empfohlenen Temperaturbedingungen für 5 min bis 1 h. Je nach Größe des Inserts wurde ein Verdau von 2-8 μg DNA mit 2-8 U Enzym in einem Volumen von 20-80 μl

durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Vollständigkeit des Verdau durch eine Agarosegel-Elektrophorese und den Vergleich mit einem DNA-Längenstandard überprüft.

5.1.8.4 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation zu verhindern, müssen die 5'-Enden des linearisierten Plasmids dephosphoryliert werden, z. B. mit der „*calf intestine alkaline phosphatase*“ (*CIAP*, Fermentas). Dies ist vonnöten, wenn Plasmid und Insert nur mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurden, wie es z. B. bei der Klonierung der murinen *P2ry5*-Fragmente in den *pDELBOY*-Vektor durchgeführt wurde (s. Kap. 6.8.3). Die Reaktion erfolgte mit 1 U *CIAP* pro 1-20 pmol freie DNA-Enden für 30 min bei 37°C direkt im Restriktionsansatz. Es empfiehlt sich eine Umpufferung des Reaktionsansatzes, wenn nicht mit einem *Fast-Digest* Enzym gearbeitet wird, damit die *CIAP* optimal arbeiten kann. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 85°C inaktiviert und die DNA wie unter 5.1.5.1 beschrieben aufgereinigt. Alternativ kann die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und dann mit Ethanol präzipitiert werden. Das linearisierte und dephosphorylierte Plasmid kann daraufhin für die Ligation verwendet werden.

5.1.8.5 Ligase-Reaktion

Die T4 DNA-Ligase stammt aus dem Bakteriophagen T4 und katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphatresten und 3'-Hydroxylgruppen benachbarter Nukleotide in Duplex-DNA oder RNA. Die Ligation erfolgte in einem 20 µl-Ansatz. Hierbei wurden zunächst 50 ng Plasmid-DNA mit der dreifachen molaren Menge an Insert-DNA vermischt. Darauf wurden 4 µl Ligationspuffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase (Invitrogen) und die erforderliche Menge an H₂O zugefügt. Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei 25°C inkubiert und anschließend die Ligase durch Hitze inaktiviert (10 min bei 70°C).

5.1.8.6 *In-vitro* Rekombination

Die homologe *in-vitro* Rekombination stellt eine einfache und schnelle Methode dar, um zu überprüfen, ob ein *knockout*-Konstrukt funktionell ist. Hierzu wurde das entsprechende Plasmid zunächst durch einen Restriktionsverdau linearisiert und anschließend einem CRE-Rekombinase-Verdau für 1 h bei 37°C unterzogen (s. Tab. 5.5). Um kontrollieren, ob das zu deletierende Gen durch homologe Rekombination aus dem Konstrukt herausgeschnitten

wurde, wurden zu unterschiedlichen Zeiten Aliquots aus dem Rekombinase-Verdau entnommen und das Enzym durch Phenol-Chloroform-Aufreinigung entfernt. Die aufgereinigten Produkte wurden dann auf ein 0,5 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

Tab. 5.5: CRE-Rekombinase-Verdau

Verwendete Reagenzien	Mengenangaben der Komponenten
10 x CRE-Puffer*	6,0 µl
linearisierte DNA	1,8 µg
CRE-Rekombinase	0,5 µg
H ₂ O	ad 60 µl

*10 x CRE-Puffer: 330 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM Tris-Cl, pH 7,5

5.1.9 *E. coli*: Kultivierung, Transformation und Lagerung

5.1.9.1 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* wurde eine Bakterienkultur in Antibiotikafreiem LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 gezüchtet. Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert, für 15 min bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach Resuspension des Pellets mit 15 ml eiskaltem TfbI-Puffer wurden die Bakterien erneut 10 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet mit 2 ml eiskaltem TfbII-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

5.1.9.2 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Die Einschleusung der zu replizierenden Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte durch eine Transformation mittels Hitzeschock. Hierfür wurden die bei -70°C gelagerten 100 µl-Aliquots der chemisch kompetenten *E. colis* auf Eis aufgetaut und anschließend ca. 1-2 µl des Ligationsansatzes unter vorsichtigem Rühren mit der Pipettenspitze zugegeben. Die Bakterien verblieben für 30 min auf Eis, so dass sich die Plasmid-DNA an die Zellmembran anlagern konnte. Dann wurden sie für 30 sec in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben, was zur Destabilisierung der Zellmembran und zum Eindringen der Plasmide in die Zelle führte. Anschließend wurden die Bakterien direkt wieder auf Eis gestellt, damit die DNA im Inneren der Bakterien verblieb. Nach Zugabe von 300 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C horizontal geschüttelt. Hinterher wurden unterschiedliche Mengen an Bakterien-

suspension auf vorgewärmte LB-Platten, welche das entsprechende Selektionsmedium enthalten, ausplattiert und für 12 bis 16 h bei 37°C inkubiert. Bis zum Picken der Kolonien können die Platten mit Parafilm umschlossen bei 4°C bis zu mehreren Wochen gelagert werden.

5.1.9.3 Selektion von Bakterienklonen

Zur Selektion einzelner Bakterienklone wurde mit einer 10 µl-Pipettenspitze eine Kolonie in eine 15 ml Zentrifugenröhre mit 5 ml LB-Medium inklusive entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt. Die Flüssigkultur wurde für 12 bis 16 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Glycerol-Stock der Bakterienkultur zur Langzeitlagerung angelegt (s. Kap. 5.1.9.4). Mit der restlichen Bakteriensuspension wurde eine Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt (s. Kap. 5.1.10) und die Plasmide daraufhin analysiert.

5.1.9.4 Einfrieren und Auftauen von *E. coli*

Aus einer frischen Bakterienkultur wurden 500 µl entnommen und mit 500 µl 85 %igem Glycerol vermischt. Der so gewonnene Glycerol-Stock wurde bei -70°C gelagert. Zusätzlich wurden 750 µl Bakteriensuspension entnommen und mit 250 µl 85 %igem Glycerol versetzt. Dieser Glycerol-Stock wurde bei -20°C gelagert.

Zum Auftauen wurde mit einer Pipettenspitze etwas Medium vom gefrorenen Bakterienstamm abgekratzt und in LB-Medium mehrfach auf- und abpipettiert. Nach Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums wurden die Bakterien bei 37°C ü. N. vermehrt.

5.1.10 Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Allen angewendeten Präparationsverfahren liegt eine alkalische Lyse der Bakterien zugrunde. Die Methoden machen sich im Weiteren zunutze, dass die genomische Bakterien-DNA mit der Zellwand verhaftet bleibt und durch Zentrifugation und/oder Filtration von der frei in Lösung befindlichen Plasmid-DNA getrennt werden kann.

5.1.10.1 Mini-, Midi- und Maxi-Plasmid-Präparation

Die Mini-Plasmid-Präparationen wurden mit 2 ml frischer Bakterienkultur unter Verwendung des *GeneJETTM Plasmid Miniprep Kits* von Fermentas nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Analog wurden die Midi-Plasmid-Präparationen mit 50 ml Bakterienkultur und

dem *PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit* von Invitrogen und Maxi-Plasmid-Präparationen mit 100 ml Bakterienkultur mit dem *EndoFree® Plasmid Maxi Kit* von Qiagen nach Anleitung durchgeführt.

5.1.10.2 BAC-Plasmid-Präparation

Bei der BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Plasmid-Präparation ist vorsichtiges Arbeiten besonders wichtig, da BAC-DNA – bedingt durch ihre Größe von etwa 150 kb – besonders anfällig für Beschädigung ist. Jegliches unnötige Pipettieren, Vortexen und Mischen ist zu vermeiden. Die Spitzen der Pipetten wurden abgeschnitten, um die Scherkräfte so gering wie möglich zu halten. Es wurde wie folgt vorgegangen:

- Eine Bakterienkultur wird in 250 ml LB-Medium ü. N. gezüchtet und durch 15-minütige Zentrifugation bei 4.000 rpm (4°C) pelletiert.
- Resuspension des Pellets in 20 ml BAC-Lösung I; dann 5 min bei RT stehen lassen.
- 40 ml BAC-Lösung II langsam und unter vorsichtigem Schwenken zufügen, erneut 5 min bei RT stehen lassen.
- 30 ml BAC-Lösung III langsam und unter vorsichtigem Schwenken zufügen, 15 min auf Eis inkubieren (es entstehen weiße Präzipitate).
- 20 min bei 4.000 rpm (4°C) zentrifugieren und den Überstand durch 5 Lagen Mullbinde filtrieren.
- Das Filtrat erneut 20 min bei 4.000 rpm (4°C) zentrifugieren. Den Überstand durch einen Faltenfilter filtrieren und in ein neues Gefäß überführen.
- 45 ml Isopropanol unter vorsichtigem Schwenken zufügen und die Lösung in eine Zentrifugenröhre geben. Zentrifugation für 15 min bei 4.000 rpm.
- Den Überstand verwerfen und das Pellet durch vorsichtiges Schwenken in 9 ml 10 mM Tris/ 50 mM EDTA (auf 37°C vorgewärmt) resuspendieren.
- Die Lösung in eine 50 ml Zentrifugenröhre überführen, 4,5 ml 7,5 M KAc zufügen und mischen.
- Inkubation für 30 min bei -70°C.
- Lösung bei RT auftauen und 10 min bei 4.000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand zu 27 ml 100 %igem Ethanol zufügen und schwenken, bis die Phasen gemischt sind.
- Erneut 10 min bei 4.000 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das Pellet in 700 µl 50 mM Tris/50 mM EDTA resuspendieren.
- 10 µl RNase A (10 mg/ml) zufügen und 60 min bei 37°C inkubieren.

- DNA-Lösung in 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen und 700 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 hinzufügen. Schwenken, bis die Phasen gemischt sind.
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren und obere Phase in frisches Eppendorf-Gefäß geben.
- Erneut 700 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol hinzufügen, mischen und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren. Obere Phase in frisches Eppendorf-Gefäß überführen.
- 700 µl Chloroform zur Plasmid-Lösung geben, 5 min zentrifugieren und obere Phase in frisches Eppendorf-Gefäß überführen.
- 700 µl Isopropanol zufügen, 20 min zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- 500 µl 70 %igen Ethanol zum Pellet geben, 5 min zentrifugieren und den Überstand entfernen.
- Pellet ca. 30 min trocknen lassen und in 100 µl TE pH 8,0 resuspendieren.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Mammalia-Zellen

COS7-Zellen und Flp-In-CHO-Zellen stellten sich zur Durchführung funktioneller Analysen des P2Y5-Rezeptors als sehr geeignet heraus. Es handelt sich hierbei um adhärent wachsende Mammalia-Zellen, die verschiedenen Organismen (Affe, Hamster) entstammen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank in sterilen Zellkulturflaschen oder -schalen. Allgemein wurden im Umgang mit Mammalia-Zellen nur sterile Gebrauchsgegenstände verwendet und es wurde ausschließlich an der Sterilbank gearbeitet, um einer Kontamination durch Bakterien und Pilze so weit wie möglich vorzubeugen. Als Medium wurde DMEM oder F12 verwendet, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) versetzt wurde, um den Nährstoffbedarf der Zellen zu decken. Die Medien sind mit einem pH-Indikator versetzt, so dass sich die Notwendigkeit eines Mediumwechsels durch einen Farbumschlag vom rötlichen ins gelbliche andeutet. Das Splitten der Zellen erfolgte in Abhängigkeit von der Zellteilungsrate ein- bis zweimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10. Hierbei wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Oberfläche der Kulturschale oder -flasche gelöst, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf weitere Zellkulturgefäße aufgeteilt. Nach Möglichkeit wurde ohne Antibiotika oder Fungizide gearbeitet, ggfs. können auch Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B zur Kontaminationsvorbeugung zugesetzt werden.

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in 90 % FKS und 10 % DMSO langsam eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, woraus sie jederzeit wieder in Kultur genommen werden können.

5.2.2 Kultivierung von Zellen als Suspensionskultur

Aus Heparin-Blut von Patienten und Kontrollen wurden immortalisierte Lymphozyten-Kulturen angelegt (Ausubel *et al.*, 2001). Hierbei wurden die Lymphozyten durch *in-vitro* Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus zur permanenten Vermehrung angeregt (Henle *et al.*, 1967). Die Zellen sind nicht adhärent, sondern liegen als Suspensionskultur vor und wurden in RPMI 1640-Medium (s. Kap. 4.4) kultiviert. Es wurde ein- bis zweimal wöchentlich frisches Medium zugegeben, bis eine ausreichend hohe Zelldichte erreicht war. Anschließend wurden die Zellen zur DNA-, RNA- oder Protein-Isolation geerntet.

5.2.3 Transiente Transfektion von Mammalia-Zellen

Um die gewünschten Proteine in Säugetier-Zellen zu exprimieren, wurde zumeist eine transiente Transfektion durchgeführt. Für Western-Blot- und pharmakologische Analysen wurde das *Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen) verwendet, für Immunfluoreszenz-Analysen das *FuGENE HD Transfection Reagent* (Roche), da es sich als zellschonender herausstellte. Beide Transfektions-Reagenzien basieren auf Lipid-Lösungen, welche mit der DNA Komplexe bilden, die dann in die Zielzellen aufgenommen werden.

5.3 Immunologische und proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Immunfluoreszenz-Analyse

Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die eine subzelluläre Lokalisation von Proteinen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluorochromen kann die Kolo-kalisation von verschiedenen Proteinen dargestellt werden. Die Immunfluoreszenz-Analyse wurde wie folgt durchgeführt:

- 24 h nach einer transienten Transfektion werden die Zellen auf kleine Glasplättchen gesplittet, die zuvor am Bunsenbrenner abgeflämmt wurden.
- Nach einer erneuten 24-stündigen Wachstumsphase werden die Zellen mit PBS gewaschen und durch 5-minütige Inkubation in eiskaltem Aceton/Methanol im Verhältnis

1:1 fixiert. Nachdem die Fixierlösung entfernt wurde und die restliche Lösung verdampft ist, werden die Zellkulturschalen mit Parafilm umwickelt und bei -20°C eingefroren oder direkt für die Immunfluoreszenz-Analyse verwendet.

- Ein Deckgläschen mit Zellen wird zunächst für 5 min in PBS gewaschen, danach für 10 min in PBS + 1 % TritonX inkubiert um die Zellmembran zu permeabilisieren und anschließend für 30 min in PBS + 3 % BSA inkubiert, um die Proteine abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern.
- Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt in PBS + 3 % BSA mit folgender Verdünnung: anti-V5 1:500, anti-PDI 1:250, anti-pan-Cadherin 1:250 (s. Tab. 4.1).
- Durch dreimaliges Waschen in PBS wird überschüssiger Primärantikörper entfernt.
- Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt für 1 h in PBS + 3 % BSA in folgender Verdünnung: Cy3-anti-Maus IgG 1:1.000, FITC-anti-Kaninchen IgG 1:1.000 (s. Tab. 4.2).
- Danach wird das Deckgläschen dreimal für 5 min und zweimal für 20 min in PBS gewaschen und anschließend in 10 µl Einbettmedium mit/ohne DAPI 1:5 (Vektorshield) eingedeckelt.
- Die mikroskopische Auswertung erfolgt an einem *Axioplan 2* (Zeiss). Die Aufnahmen werden mit einer *Axiocam HRc-Kamera* (Zeiss) gemacht.

5.3.2 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden Proteine nach erfolgter SDS-PAGE elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Trägermembran übertragen (z. B. aus PVDF oder Nitrozellulose, welche sich besonders gut für kleine Proteine eignet). Anschließend können die zu untersuchenden Proteine durch Antikörper markiert und mittels unterschiedlicher Reaktionen nachgewiesen werden (z. B. durch Farb- oder Chemilumineszenzreaktion).

5.3.2.1 Herstellung von Zelllysaten aus Zellkultur für Western-Blot-Analysen

Zur Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot-Analysen wurden die Zellen ein bis zwei Tage nach erfolgter Transfektion mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber aus der Zellkulturschale herausgekratzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in einem angemessenen Volumen RIPA-Puffer aufgenommen und für ca. 1 min im Ultraschallbad lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate für 5 min bei 90°C denaturiert und dann bei -20°C eingefroren oder direkt für Western-Blot-Analysen benutzt.

5.3.2.2 Diskontinuierliche *sodium dodecyl sulfate*-PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels 4-12 %igen *Bis-Tris NuPAGE*[®] Gradienten-Gelen (Invitrogen). Die Proteine wurden mit 4 x *NuPAGE*[®] *Sample Buffer* und 10 x *NuPAGE*[®] *LDS Sample Reducing Agent* vermischt und 5 min bei 90°C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung fand in einer *XCell Sure Lock*[™]-Kammer (Invitrogen) statt. Zur Kontrolle der Elektrophorese und des anschließenden Elektrotransfers der Proteine auf eine PVDF- oder Nitrozellulose-Membran wurde zusätzlich zum *MagicMark*[™] *XP Western Protein Standard* der colorimetrische Marker *SeeBlue*[®] *Plus2 Pre-Stained Standard* (beide von Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Nach Gelelektrophorese und Blotting (s. Kap. 5.3.2.4) wurden die Proteine durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen.

5.3.2.3 Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen

Nach der Elektrophorese können Proteine mittels Coomassie-Färbung direkt im SDS-PAA-Gel sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das Gel in Proteinfärbelösung gegeben und für ca. 1 min in der Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung gerade zu kochen anfangt. Das Gel wurde unter Schütteln für 10 bis 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde es kurz in H₂O gespült, in Entfärbelösung wieder für 1 min in der Mikrowelle erhitzt und für 15 min bei RT geschüttelt. Der letzte Schritt wurde so oft wiederholt, bis der gewünschte Entfärbegrad erreicht und distinkte Banden sichtbar waren. Nach dem Entfärben wurden die Gele getrocknet. Die untere Nachweisgrenze für Proteine liegt bei dieser Methode bei etwa 250 ng Protein pro Bande.

5.3.2.4 Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)- oder Nitrozellulose-Membran

Nach erfolgter SDS-Page wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt und eine PVDF- oder Nitrozellulose-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Bei Verwendung einer PVDF-Membran musste diese vor Gebrauch in Methanol aktiviert und in Transfer-Puffer äquilibriert werden. Das Gel und die Membran wurden zwischen zwei Blotting-Papiere und zwei Blotting-Schwämme gelegt und anschließend das gesamte *Sandwich* in die Elektrotransfer-Apparatur eingelegt (*XCell II Blot Module*, Invitrogen). Nach einstündigem Elektrotransfer bei 200 V wurde die Membran kurz in H₂O gewaschen und dann direkt für die Immunreaktion eingesetzt.

5.3.2.5 Immunreaktion nach dem Chemilumineszenz-Verfahren

Für die Immunreaktion wurde ein selbst etabliertes Protokoll verwendet, welches sich aus einem Standard Western-Blot-Protokoll und dem *WesternBreeze[®] Chemiluminescent Immunodetection System* von Invitrogen zusammensetzt. Unter diesen Bedingungen war das P2Y5-Protein am besten nachzuweisen. Andere Puffer, verschiedene Magermilch- und BSA-Konzentrationen, der Zusatz von Detergenzien und unterschiedliche Inkubationszeiten und -temperaturen führten zu keiner weiteren Verbesserung der Darstellung der P2Y5-Proteine bei den Western-Blot-Analysen.

Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen durch einstündige Inkubation der Membran in Blocklösung (PBST + 3 % Magermilch) wurde diese für 1 h mit dem Primärantikörper in Blocklösung inkubiert (Verdünnungsfaktor s. Tab. 4.1). Nach viermaligem Waschen in Antikörper-Waschlösung (*Antibodywash, WesternBreeze[®] Kit*) für je 5 min wurde die Membran für 1 h in der Sekundärantikörper-Lösung (*Secondary Antibody Solution, WesternBreeze[®] Kit*) inkubiert, welche alkalische Phosphatase-konjugierte Sekundärantikörper (entweder gegen Maus-, Kaninchen- oder Ziegen-IgG) enthält. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 5 min und zweimal für 20 min in Antikörper-Waschlösung gewaschen, kurz in H₂O geschwenkt und anschließend die Chemilumineszenz-Reaktion mit 1,9 ml Substrat (*WesternBreeze[®] Kit*) durchgeführt. Die Membran wurde im Anschluss in eine Klarsichtfolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm für fünf bis 20 min aufgelegt.

5.3.3 *In-vitro* Transkription/Translation

Die *in-vitro* Transkription und Translation wurde mit dem *TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein zellfreies System, welches eine Kombination aus einer Retikulozyten-Lysat-Lösung mit RNA-Polymerase, Nukleotiden, Salzen und einem Ribonuklease-Inhibitor darstellt. Hierbei wird die gekoppelte Transkription und Translation von Genen ermöglicht, deren cDNA hinter einen T7- oder SP6-RNA-Polymerase-Promotor kloniert wurden. Wenn keine RNA bzw. cDNA von den zu untersuchenden Individuen zur Verfügung stand, so wurde alternativ mit PCR-Produkten gearbeitet, deren F-Primer mit der T7-Promotor-Sequenz fusioniert wurde (s. Anhang Tab. 12.1.6). Das ist in diesem Fall möglich, weil das *P2RY5*-Gen aus nur einem kodierenden Exon besteht und somit keine Introns die kodierende Sequenz unterbrechen. Für den Assay wurden alle Reagenzien auf Eis aufgetaut und anschließend die Reaktionsansätze zusammen pipettiert (s. Tab. 5.6).

Tab. 5.6: Reaktionsansatz für *in-vitro* Transkription/Translation

Verwendete Reagenzien	Mengenangaben der Komponenten
TNT [®] -Mix	20 µl
PCR-Produkt/Plasmid	8 µl/200 ng
Enhancer (nicht bei Plasmid-DNA)	1 µl
L-[³⁵ S]-Methionin	2 µl

Die Reaktionsansätze wurden für 90 min bei 29°C inkubiert, danach mit 25 µl Ladebuffer versetzt, 6 min bei 90°C denaturiert, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-PAA-Gel (4 %iges Sammelgel und 15 %iges Trenngel) aufgetragen. Nach einer 75-minütigen Elektrophorese bei 55 mA wurden die Gele fixiert (Eisessig:Methanol:H₂O im Verhältnis 1:2:4) und getrocknet. Anschließend wurde für drei bis 12 h ein Röntgenfilm aufgelegt.

5.4 Pharmakologische Untersuchungen

Um die Funktionen des P2Y₅-Rezeptors zu untersuchen und später potentielle Wirkstoffe für diesen Rezeptor entwickeln zu können, müssen potente und selektive Agonisten und Antagonisten für diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor gesucht werden. Bisher waren die Liganden dieses Rezeptors unbekannt, daher handelte es sich um einen so genannten Orphan-Rezeptor.

Die Identifizierung und Verifizierung eines P2Y₅-Liganden wurden von Prof. Ivar von Kügelgen und Prof. Gerhard J. Molderings vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn durchgeführt. Der Luziferase Reporter-Gen-Assay wird im Folgenden kurz erläutert, da er einen wichtigen Bestandteil der vorliegenden Arbeit darstellt und weitere Analysen ermöglichte (s. Kap. 5.4.2).

5.4.1 Luziferase Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung des P2Y₅-Liganden

Reporter-Gen-Systeme können zur Erforschung der eukaryotischen Genexpression und der zellulären Physiologie angewendet werden, z. B. bei der Analyse neuer Gene, Rezeptoren und Wirkstoffe oder bei der Analyse der intrazellulären Signalgebung. Das *Firefly* (*Photinus pyralis*) Luziferase-Gen ist für die Verwendung als Reporter hervorragend geeignet, da die Bestimmung des Luziferase-Enzyms sehr sensitiv, schnell, einfach durchführbar und zudem kostengünstig ist.

Für die Identifizierung des P2Y5-Liganden wurde der *cAMP-response element* gesteuerte Luziferase Reporter-Gen-Assay (*PathDetect[®] in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting System*, Stratagene) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein induzierbares Reporter-Plasmid, welches das Luziferase-Reporter-Gen enthält. Dieses wird von einem Basis-Promotor-Element (TATA Box) und einem synthetischen, induzierbaren *cis*-Enhancer-Element gesteuert, in unserem Fall durch die Erkennungssequenz zur Transkriptionsinitiation des zyklischen AMP Steuerungselements (*cyclic AMP response element*, CRE). Transfiziert man das Reporter-Plasmid und das Gen mit unbekannter Funktion gleichzeitig in Säugetier-Zellen, so führt die Aktivierung von endogenen Proteinkinasen, die vom zu untersuchenden Gen gesteuert werden, zur Aktivierung des entsprechenden *trans*-Aktivators. Dieser wiederum stimuliert die Reporter-Gen-Expression. Ebenso können Effekte von extrazellulären Reizen mit Hilfe dieses Systems untersucht werden.

Der CRE-gesteuerte Luziferase Reporter-Gen-Assay zur Bestimmung von P2Y5-Liganden wurde von Prof. Ivar von Kügelgen wie folgt durchgeführt:

- Es werden Flp-In-CHO-Zellen, die den P2Y5-Rezeptor stabil exprimieren (im *pcDNA5/FRT/V5-His*-Vektor; Invitrogen; s. Anhang Abb. 12.2.4), transient mit dem *pCRE-luc*-Plasmid transfiziert.
- Nach der Transfektion mit dem *LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent* werden die Zellen in *Opti-MEM[®]* + 2 % FKS kultiviert.
- Am Folgetag werden die Zellen in *24-well*-Zellkulturplatten gesplittet und 20 h vor dem Experiment mit Pertussis-Toxin bzw. dessen Lösungsmittel behandelt.
- Vor Beginn des Experiments wird das Medium durch *Opti-MEM[®]* ohne FKS ersetzt.
- Dann werden die zu untersuchenden Substanzen bzw. deren Lösungsmittel für 3 h zugesetzt.
- Die Reaktion wird durch Zugabe der *Bright-GloTM* Luziferase-Lösung gestoppt. Diese dient sowohl der Zelllyse als auch der Messung der Luziferase-Aktivität.
- Die relativen Lichteinheiten werden am Luminometer (Berthold) gemessen und als prozentuale Änderung im Bezug auf die Kontrolle (nur mit Lösungsmittel behandelte Zellen) angegeben.

5.4.2 Bio-Assay via P2Y5 zur Detektion von LIPH-Produkten im Zellüberstand

Wie in Kap. 2.7.3 erwähnt, führen auch Mutationen im *LIPH*-Gen, welches die Lipase H kodiert, zu einer autosomal-rezessiv vererbten HS. Durch die Identifizierung des natürlichen Liganden des P2Y5-Rezeptors, der Lysophosphatidsäure (LPA), ist es somit möglich, die

Verbindung zwischen LIPH und P2Y5 herzustellen: LIPH spaltet eine Fettsäure von der Phosphatidsäure (PA) ab und es entstehen LPA und eine freie Fettsäure (s. Abb. 7.2). LPA wiederum aktiviert den G-Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y5. Es wäre daher denkbar, die Funktion des LIPH-Wildtyp-Proteins und verschiedener Mutanten durch den P2Y5-gekoppelten Luziferase Reporter-Gen-Assay zu bestimmen (s. Kap. 5.4.1). Hierfür wurde wie folgt vorgegangen:

- Zunächst werden Flp-In-CHO-Zellen transient mit *LIPH*-Wildtyp, verschiedenen *LIPH*-Mutanten oder dem *pcDNA3.1*-Leerplasmid transfiziert. Des Weiteren werden Flp-In-CHO-Zellen mit *P2RY5*-Wildtyp und *pCRE-luc* kotransfiziert (s. Abb. 5.1).
- Nach der Transfektion mit dem *LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent* werden die Zellen in *Opti-MEM[®]* + 2 % FKS kultiviert.
- Am Folgetag werden die *P2RY5-CRE-luc*-exprimierenden Zellen in 24-well-Zellkulturplatten gesplittet. Die *LIPH*- bzw. Leerplasmid-exprimierenden Zellen werden in 3,5 cm-Zellkulturschalen gesplittet.
- 48 h nach der Transfektion werden alle Zellen dreimal mit 37°C warmem *Opti-MEM[®]* ohne Serum gewaschen. Den Zellen, die das rekombinante *LIPH* exprimieren, wird 100 µM Phosphatidsäure (Sigma-Aldrich) oder Lösungsmittel (Chloroform) in 2 ml *Opti-MEM[®]* zugesetzt (s. Abb. 5.1 Schritt 1).
- Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank wird das Medium von den *P2RY5-CRE-luc*-exprimierenden Zellen entfernt und 500 µl des Überstandes der *LIPH*-exprimierenden Zellen auf die *P2RY5-CRE-luc* Zellen gegeben (s. Abb. 5.1 Schritt 2).
- Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wird das Medium von den *P2RY5-CRE-luc* Zellen entfernt und 75 µl HBSS-Puffer auf die Zellen gegeben.
- Nach Zugabe von 75 µl *Bright-GloTM* Luziferase-Lösung werden die relativen Lichteinheiten am Luminometer (Berthold) gemessen und als prozentuale Änderung im Bezug auf die Kontrolle (nur mit Lösungsmittel behandelte *LIPH*- bzw. Leerplasmid-exprimierende Zellen) angegeben (s. Abb. 5.1 Schritt 3).

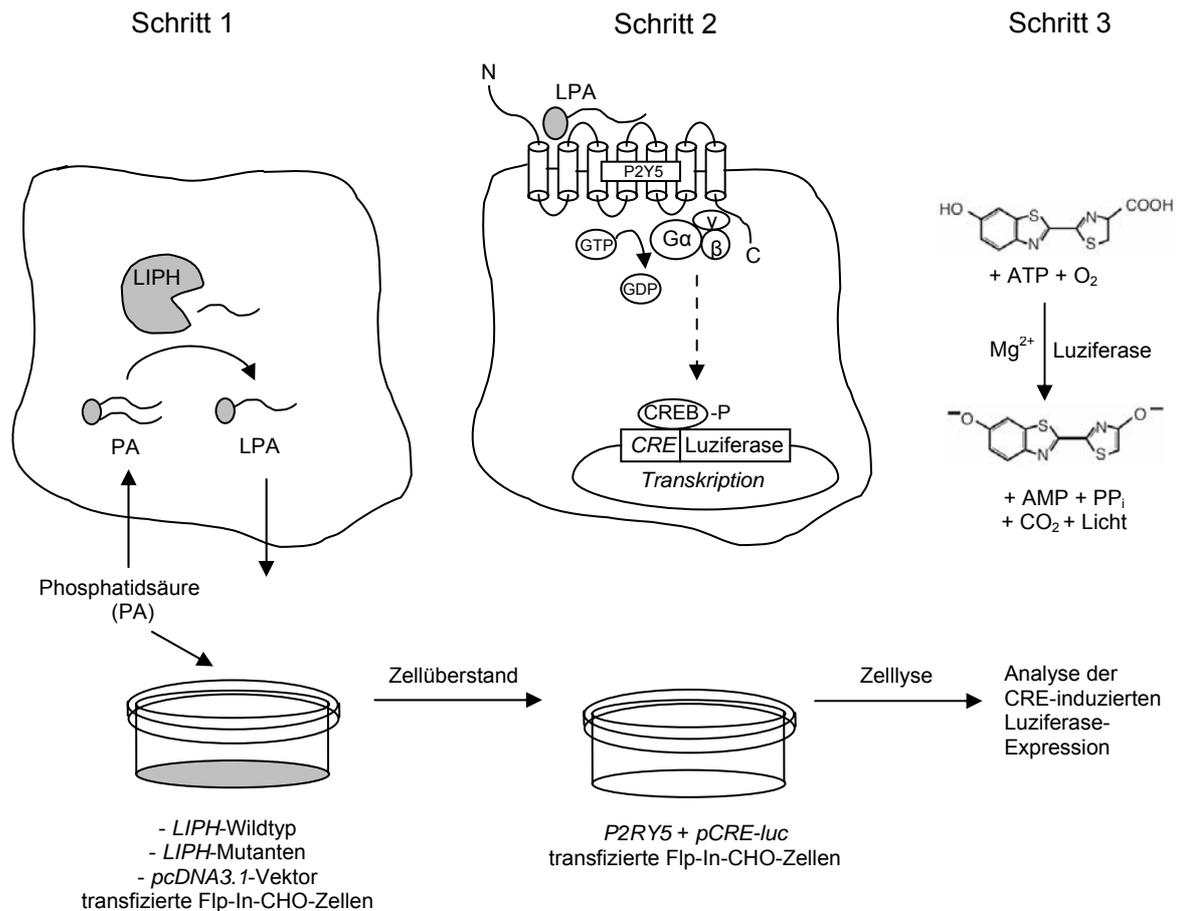


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Zu den *LIPH*-exprimierenden Flp-In-CHO-Zellen (*LIPH*-Wildtyp, p.Gly94_Lys123dup, p.Gln137HisfsX1, p.Gly176_Asp209del, Kontrolle: leerer *pcDNA3.1*-Vektor) wurden entweder 100 μ M Phosphatidsäure oder Lösungsmittel (Chloroform) für 30 Min zugefügt (Schritt 1). Anschließend wurden je 500 μ l des Überstandes der *LIPH*-exprimierenden Zellen zu *P2RY5*- und *pCRE-luc*-exprimierenden Zellen gegeben (Schritt 2). Nach dreistündiger Inkubation wurde dann die *Bright-Glo™* Luciferase-Lösung (Promega) zugegeben. Als Maß für die Luciferase-Aktivität wurden die relativen Lichteinheiten am Luminometer bestimmt (Schritt 3).

5.4.3 Bestimmung der LIPH-Enzymfunktion mittels Fluoreszenzmarkierter Lipide

Um die Ergebnisse des P2Y5-gekoppelten Bio-Assays (s. Kap. 5.4.2) zu bestätigen, wurde ein zweiter, Fluoreszenz-basierter Nachweis der Enzymfunktion von verschiedenen *LIPH*-Konstrukten etabliert. Hierfür wurde das PED-A1-Reagenz (N-((6-(2,4-DNP)amino)hexanoyl)-1-(BODIPY® FL C5)-2-hexyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, Invitrogen) verwendet. Es handelt sich hierbei um Fluoreszenz-markierte Phospholipide, welche ein selektives Substrat der Phospholipase A1 (PLA1) darstellen und in lebenden Zellen angewendet werden können. Da *LIPH* eine hohe Ähnlichkeit zur Phospholipase A1 aufweist (Jin *et al.*, 2002), ist es möglich, dass diese beiden Enzyme eine ähnliche Substratspezifität aufweisen.

Der Versuchsablauf sah wie folgt aus: Flp-In-CHO-Zellen wurden transient mit den verschiedenen *LIPH*-Konstrukten (Wildtyp, p.Gly94_Lys123dup, p.Gln137HisfsX1, p.Gly176_Asp209del) bzw. dem Leerplasmid transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen in eine 96er-Falcon-Zellkulturplatte gesplittet und erneut für 24 h in *Opti-MEM*[®] + 2 % FKS kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt und durch 90 µl 37°C warmen HBSS-Puffer ersetzt. Direkt vor der Fluoreszenz-Intensitätsmessung am *FLUOstar-OPTIMA* Mikrotiterplatten-Lesegerät (BMG Labtech) wurden 10 µl einer 0,1 µM PED-A1-Lösung zugegeben. Anschließend erfolgten 50 Messungen im Abstand von je 2,5 min bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

Die gleichen Messungen wurden auch mit dem bis-BODIPY[®] FL C11-PC-Substrat (1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-sindacene-3-undecanoyl)-*sn*-glycero- 3-phosphocholin, Invitrogen) durchgeführt, welches spezifisch für PLA1 und PLA2 (Phospholipase A2) ist.

5.4.4 Proteinbestimmung mittels D_C Protein-Assay

Für die in Kap. 5.4.1 bis 5.4.3 beschriebenen Experimente ist es wichtig, die gemessenen Lumineszenz- und Fluoreszenzdaten auf die Proteinmenge zu beziehen, um abweichende Zellzahlen in den einzelnen Kulturschalen berücksichtigen zu können. Die Proteinmengen wurden mit dem D_C *Protein-Assay* (Bio-Rad) bestimmt. Es handelt sich hierbei um einen quantitativen, colorimetrischen Test zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge, der sich am Lowry-Assay (Lowry *et al.*, 1951) orientiert. Der Test basiert einerseits auf der Reaktion eines alkalischen Kupfer-Reagenzes mit Proteinen und andererseits auf der nachfolgenden Reduktion des Folin-Reagenzes (Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz) durch die mit Kupfer komplexierten Proteine. Durch die Reduktionen entsteht ein charakteristischer Farbumschlag von gelb nach blau. Die blaue Farbe weist eine charakteristische Absorption bei 750 nm auf, welche am Photometer gemessen werden kann.

Zur Proteinbestimmung wurden die Proben in einer entsprechenden Menge 1 M NaOH aufgenommen (mind. 50 µl). 50 µl dieser Probe wurden mit 250 µl Reagenz A in einer Küvette versetzt und gevortext. Danach wurden 2 ml von Reagenz B zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm am Photometer bestimmt. Anhand einer BSA-Eichkurve wurde im Anschluss die Proteinmenge in den Zellkulturschalen berechnet.

5.4.5 Statistische Auswertung der pharmakologischen Daten

Zur statistischen Auswertung der pharmakologischen Daten wurde das Programm *GraphPad Prism Version 4.03* (GraphPad) verwendet. Für Daten, welche zur Identifizierung des P2Y5-Liganden erhoben wurden, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test oder die Kruskal-Wallis-Analyse von Prof. Ivar von Kugelgen durchgeführt, gefolgt vom Dunn's Post-Test. $P < 0,05$ wurde als Signifikanz-Schwelle angesetzt.

Für Daten, die zur Bestimmung der LIPH-Aktivität erhoben wurden, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) gefolgt vom Bonferroni-Test durchgeführt. Als Signifikanz-Schwelle wurde $P < 0,05$ angesetzt. Für alle Messungen wurde ebenfalls der Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) angegeben.

6. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das ursächliche Gen für eine autosomal-rezessiv vererbte Form von Hypotrichosis simplex (HS) identifiziert und anschließend molekularbiologisch und protein-biochemisch untersucht werden.

6.1 Einengung des Genortes

Ausgehend von den Vorarbeiten war durch eine genomweite Kopplungsanalyse mit den DNA-Proben der HS-Familie 1 ein neuer Genort auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14.11–13q21.33) mit einem maximalen LOD-Score von 3,9 ($\theta=0,0$) identifiziert worden (s. Abb. 2.15, s. auch Anhang Tab. 12.1.2 für zugehörige *two-point* LOD-Scores). Die somit definierte Kandidatenregion, die auf dem kleinsten homozygoten Haplotyp-Segment basiert, das bei allen betroffenen Geschwistern vorliegt (D13S1293-D13S634), umfasst mehr als 34 Mb (s. Abb. 2.16 A und B). Um die Grenzen der chromosomalen Region genauer zu bestimmen und somit den Genort einzuengen, wurden zusätzliche Mikrosatelliten-Marker (D13S1293, D13S305, D13S1253 und D13S1233) aus der Region für alle zur Verfügung stehenden Familienmitglieder typisiert (s. Anhang Tab. 12.1.5). Durch eine Rekombination zwischen D13S1233 und D13S263 bei Individuum II:4 konnte infolgedessen die zentromerische Grenze der Kandidatenregion dem Mikrosatelliten D13S1233 zugeordnet werden (s. Abb. 6.1 A). Die Festsetzung der Grenze der Kandidatenregion im telomerischen Bereich erfolgt aufgrund der Heterozygotie des Mikrosatelliten-Markers D13S634 bei Individuum II:4. Die Kandidatenregion konnte folglich auf knapp 28 Mb eingeeengt werden (s. Abb. 6.1 B).

A

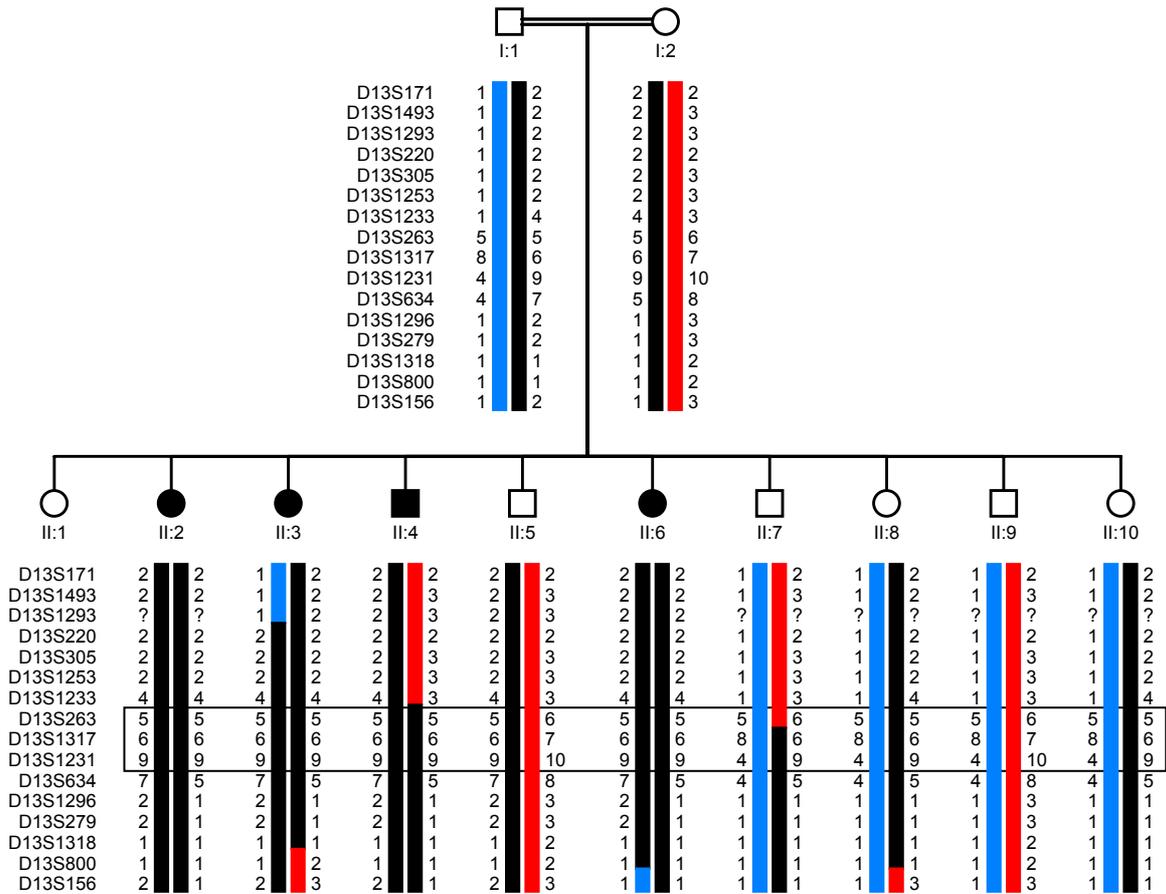


Abb. 6.1: (A) Stammbaum der HS-Familie 1: *Homozygosity-Mapping*. Nach Typisierung von zusätzlichen Mikrosatelliten-Markern konnte die Kandidatenregion zwischen die Marker D13S1233 und D13S634 kartiert werden. Die ursprünglich identifizierte Region konnte somit von mehr als 34 Mb auf knapp 28 Mb eingengt werden. Die homozygote Region, die bei allen Betroffenen vorliegt, ist durch einen Kasten hervorgehoben. Marker-Haplotypen, die mit dem HS-Phänotyp gekoppelt sind, sind in Schwarz dargestellt. Familienmitglieder, die von HS betroffen sind, sind an schwarzen Symbolen zu erkennen. Kreise und Vierecke zeigen weibliche bzw. männliche Familienmitglieder an. Die entsprechenden Mikrosatelliten-Marker sind jeweils am linken Rand aufgelistet.

B

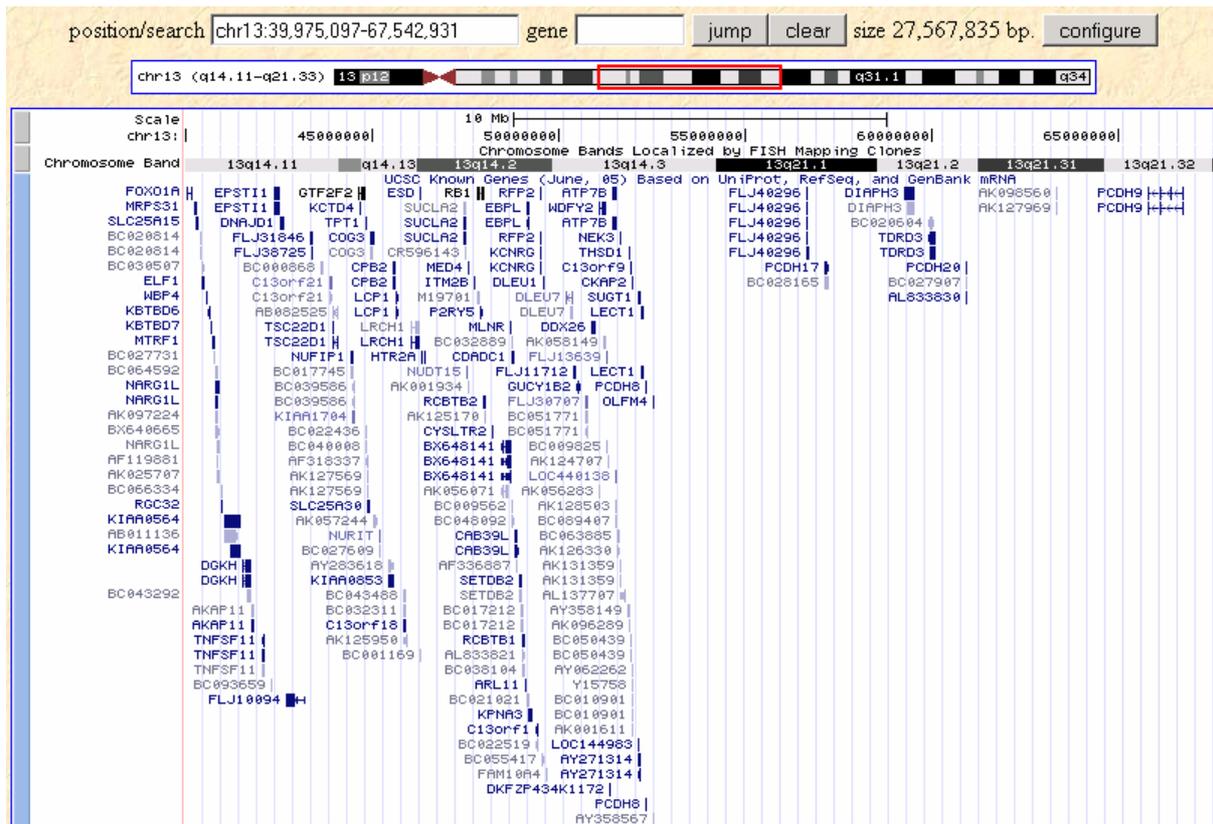


Abb. 6.1: (B) Screenshot des UCSC genome browsers (NCBI35/hg17), der die Kandidatenregion nach Typisierung zusätzlicher Mikrosatelliten-Marker in HS-Familie 1 darstellt. Eine weitere Einengung der Kandidatenregion war aufgrund des großen homozygoten Bereichs bei den Betroffenen (s. Abb. 6.1 A) nicht möglich, obwohl alle in der Region befindlichen Mikrosatelliten-Marker untersucht wurden.

6.2 Expressionsanalyse und Mutationssuche in Kandidatengenen

In der etwa 28 Mb großen Kandidatenregion befanden sich insgesamt 64 bekannte Gene und zahlreiche Pseudogene und hypothetische Proteine. Da zu erwarten ist, dass ein Gen in dem Gewebe exprimiert sein sollte, in dem die pathologischen Veränderungen auftreten, wurden alle 64 Gene der Kandidatenregion auf Expression in Haut und/oder Haarfollikeln von gesunden Kontrollpersonen untersucht. Mit Ausnahme der Gene *EPSTI1* (*epithelial stromal interaction 1*), *MLNR* (*motilin receptor*), *KPNA3* (*karyopherin alpha 3*) und *GUCY1B2* (*guanylate cyclase 1, soluble, beta 2*) sind alle in der Region liegenden Gene in Haut und/oder Haarfollikeln exprimiert (Daten nicht gezeigt). *EPSTI1*, *MLNR*, *KPNA3* und *GUCY1B2* wurden folglich als Kandidatengene ausgeschlossen.

Zur Ermittlung des ursächlichen Gens, welches für die autosomal-rezessiv vererbte Form der HS in der untersuchten saudi-arabischen Familie verantwortlich ist, wurde nach dem Kandidatengen-Ansatz vorgegangen. Hierbei wurden verschiedene Datenbanken (UCSC, NCBI, UniProt) nach Informationen über die in der Kandidatenregion liegenden Gene

durchsucht, um Anhaltspunkte über ihre Funktion zu erhalten. Seit der Vollendung des Humangenomprojektes ist fast die gesamte genetische Information des Menschen in Datenbanken zu finden. Bei vielen der annotierten Gene ist die Funktion jedoch bislang unbekannt. Aus diesem Grund wurden zunächst solche Gene untersucht, die sich aufgrund ihrer Funktion der Haut- und Haarentwicklung oder -physiologie zuordnen ließen. Hierzu zählen die Gene des Protocadherin-Gen-Clusters (*PCDH8*, *PCDH9*, *PCDH17*, *PCDH20*), da diese Proteine maßgeblich an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Außerdem wurde ein mit dem Vitamin-D-Rezeptor interagierendes Protein (*DRIP36*, alternativer Gencode *MED4*) sequenziert, da Mutationen im Vitamin-D-Rezeptor für eine Form der Alopezie (*Atrichia congenita*) identifiziert wurden (Miller *et al.*, 2001). Weiterhin wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren untersucht (*FOXO1A*, *ELF1*, *TSC22D1*, *GTF2F2*), weil Mutationen im *HR* (*hairless*)-Transkriptionsfaktor ebenfalls zur *Atrichia congenita* führen (Ahmad *et al.*, 1998, Cichon *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurden die Sequenzen von hypothetischen Proteinen und Pseudogenen analysiert, um charakteristische Struktur motive zu finden. Dabei fiel ein putatives Protein auf (AK057244), welches Ähnlichkeit zu Trichohyalin zeigt. Trichohyalin ist ein Strukturprotein, das ausschließlich in der Haarwurzelscheide exprimiert wird. In keinem dieser Gene konnte mittels Sequenzanalyse eine homozygote Mutation bei dem Betroffenen II:3 nachgewiesen werden.

Die verbleibenden 50 Gene sollten nun eins nach dem anderen sequenziert werden. Die in Tab. 12.1.3 des Anhangs angegebenen 37 Gene wurden mittels PCR amplifiziert und die kodierende Sequenz einschließlich Exon-Intron-Grenzen bei Individuum II:3 sequenziert. Die für die HS ursächliche Mutation konnte jedoch in keinem dieser Gene nachgewiesen werden.

6.3 Identifizierung der ursächlichen Gen-Mutation

Nach Ausschluss der in Tab. 12.1.3 (s. Anhang) angegebenen Gene konnte schließlich die genetische Ursache des Haarausfalls in der saudi-arabischen Familie identifiziert werden. Die vier von Haarausfall betroffenen Geschwister tragen eine nonsense-Mutation im *P2RY5*-Gen, welches den G-Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y5 kodiert (*G protein-coupled purinergic receptor P2Y5*). Der Begriff *P2RY5* wird nach allgemeiner Nomenklatur für das Gen verwendet, der Begriff P2Y5 bezeichnet das zugehörige Protein (Fredholm *et al.*, 1994; Fredholm *et al.*, 1997). Eigentlich müsste der Begriff p2y5 verwendet werden, da es sich zum Zeitpunkt der Genidentifizierung um einen Orphan-Rezeptor handelte. Der Konsistenz halber wird jedoch in der gesamten Arbeit weiterhin die ursprüngliche Bezeichnung P2Y5 verwendet.

Bei der Mutation handelt es sich um eine homozygote C>T Transition an der cDNA-Position 463 (c.463C>T; s. Abb. 6.2 A), welche zur vorzeitigen Termination der Translation führt (p.Gln155X). Beide Eltern und drei weitere Geschwister (II:5, II:8 und II:10) sind heterozygot für diese Mutation, phänotypisch aber nicht von Trägern des Wildtyp-Allels zu unterscheiden. Sie können jedoch eine defekte Genkopie an ihren Nachwuchs vererben. Die Individuen II:7 und II:9 tragen das Wildtyp-Allel.

Nach der Identifizierung des ursächlichen Gens *P2RY5* wurde nach weiteren Mutationen bei sporadischen HS-Patienten und Individuen kleinerer HS-Familien gesucht. Hierbei wurde eine weitere Mutation in zwei anderen aus Saudi-Arabien stammenden Familien identifiziert (im Folgenden als HS-Familie 2 und 3 bezeichnet): es handelt sich um eine 2 bp-Deletion (c.373_374delAA; s. Abb. 6.2 B), welche zur Verschiebung des Leserasters führt. Nach 37 *Missense*-Aminosäuren kommt es ebenfalls zur vorzeitigen Termination der Translation (p.Lys125AsnfsX37). Der Phänotyp von Betroffenen aus diesen beiden Familien entspricht dem der Betroffenen aus der HS-Familie 1 (s. Abb. 6.3).

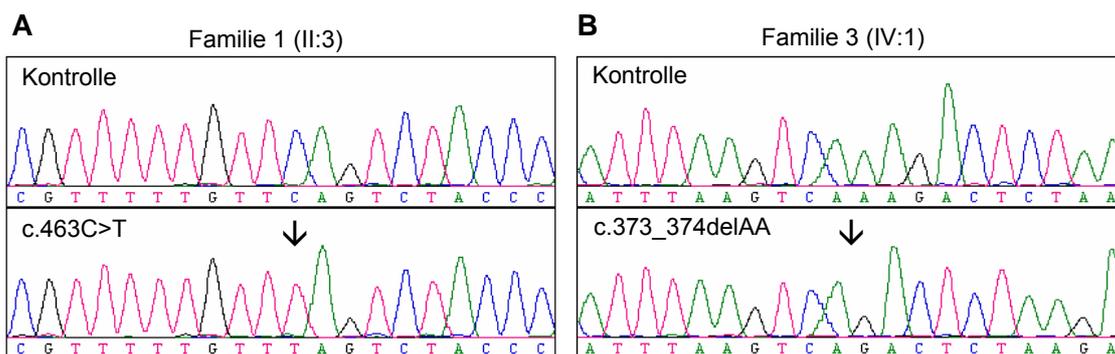


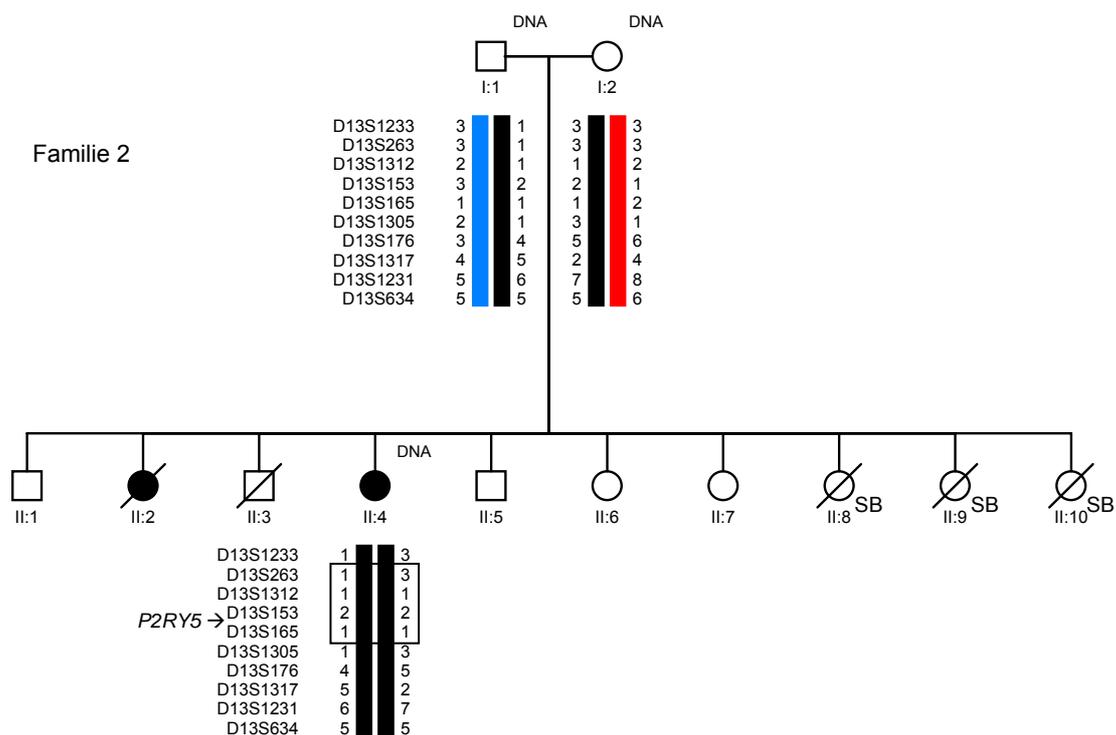
Abb. 6.2: Sequenzanalyse des *P2RY5*-Gens in den HS-Familien 1 und 3. **(A)** Die c.463C>T (p.Gln155X) Mutation führt zur vorzeitigen Termination der Translation, da anstelle der Aminosäure Glutamin (CAG) ein Stoppkodon entsteht (TAG). **(B)** Die c.373_374delAA (p.Lys125AsnfsX37) Mutation führt zur Verschiebung des Leserasters und nach 37 *Missense*-Aminosäuren ebenfalls zur vorzeitigen Termination der Translation an der Aminosäure-Position 161. Beide Mutationen führen somit zu trunkierten Proteinen. (S. auch Abb. 6.9: Schematische Struktur der Domänen des P2Y5-Wildtyp-Proteins und der beiden Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37.)



Abb. 6.3: Klinische Darstellung des Betroffenen II:11 aus der HS-Familie 3 im Alter von 27 Jahren. Die Art des Haarausfalls entspricht dem der Betroffenen aus der HS-Familie 1. Das Foto wurde übernommen aus Al Aboud *et al.*, 2005.

Aufgrund der gleichen Mutation in HS-Familie 2 und 3 stellt sich die Frage, ob die beiden Familien miteinander verwandt sind, die Mutationen also auf eine Gründermutation (*Foundermutation*) zurückzuführen sind, oder ob die Mutationen unabhängig voneinander entstanden sind. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Haplotyp-Analysen mittels eng beieinander liegenden genetischen Markern durchgeführt. Hierfür wurden zusätzlich die Mikrosatelliten-Marker D13S1233, D13S263, D13S1312, D13S153, D13S165, D13S1305, D13S176, D13S1317, D13S1231 und D13S634 typisiert (Mikrosatelliten-Primer s. Anhang Tab. 12.1.5). Die Resultate lassen darauf schließen, dass die Mutation in beiden Familien auf einen gemeinsamen Gründer (*Founder*) zurückzuführen ist, da die Mikrosatelliten D13S263, D13S1312, D13S153 und D13S165 die gleichen Allele aufweisen (s. Abb. 6.4). Es handelt sich somit um einen so genannten Gründereffekt (*Founder effect*). Wir konnten keine der beiden Mutationen bei 303 Kontroll-Personen nachweisen, die 184 Deutsche und 119 Individuen aus dem Nahen Osten umfassten.

A



B

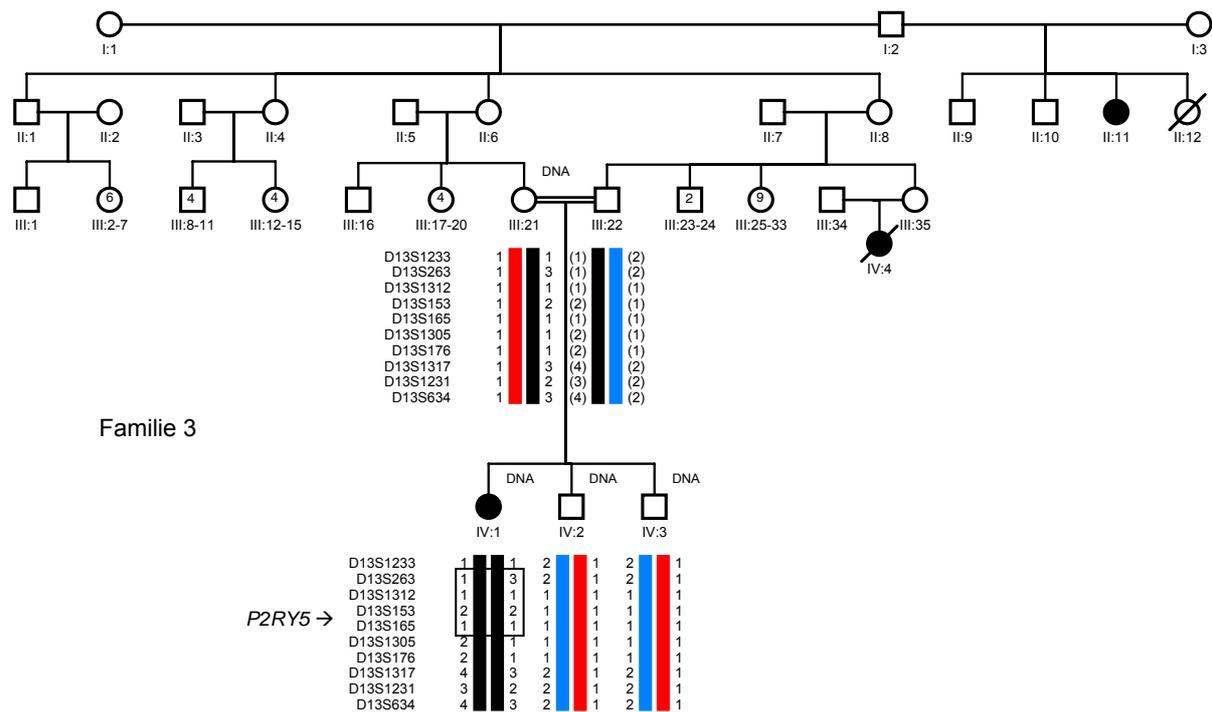


Abb. 6.4: Stammbäume der HS-Familien 2 (A) und 3 (B) mit hochauflösenden Mikrosatelliten-Markern, welche die chromosomale Region um das *P2RY5*-Gen darstellen. Die Mikrosatelliten-Marker, die in beiden Familien jeweils die gleichen Allele aufweisen, sind durch einen Kasten hervorgehoben. Dies lässt auf eine Gründermutation für die c.373_374delAA-Mutation in beiden HS-Familien schließen. Das *P2RY5*-Gen befindet sich zwischen den Markern D13S153 und D13S165, seine Lage ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Zahlen in den Kreisen und Vierecken geben die Anzahl der Kinder des jeweiligen Geschlechts an. Die Haplotypen von Individuum III:22 wurden rekonstruiert, da keine DNA vorlag. Marker-Haplotypen, die mit dem HS-Phänotyp gekoppelt sind, sind in Schwarz dargestellt. Familienmitglieder, die von HS betroffen sind, sind an schwarzen Symbolen zu erkennen. Kreise und Vierecke zeigen weibliche bzw. männliche Familienmitglieder an. Die entsprechenden Mikrosatelliten-Marker sind jeweils am linken Rand aufgelistet. SB = Totgeburt (*still birth*).

6.4 Expressionsanalysen des *P2RY5*-Gens

Das *P2RY5*-Gen besteht aus nur einem kodierenden Exon mit einem putativen offenen Leserahmen von 344 AS (Herzog *et al.*, 1996). Für eine Expressionsanalyse des humanen *P2RY5* in diversen Geweben, wurden zwei verschiedene *cDNA-panels* verwendet (BD Biosciences, s. Abb. 6.5). Zusätzlich wurde die Expression in Haut und Haarfollikeln untersucht (s. Abb. 6.19 A). Da diese cDNAs nicht Bestandteil der *cDNA-panels* sind, wurde RNA aus Haut und Haarfollikeln isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurde die RNA mit *DNase I* verdaut (s. Abb. 6.19 B). Die PCRs wurden mit den Primern *P2RY5* Ex1.1F und *P2RY5* Ex1R durchgeführt (s. Anhang Tab. 12.1.6), so dass die gesamte kodierende Sequenz und angrenzende Teile des 5'-UTRs und 3'-UTRs von *P2RY5* amplifiziert wurden. Um eine Kontamination mit genomischer DNA

beim *cDNA-panel* auszuschließen, wurden die Primer für die Kontrollgene (*GAPDH* und *KRT15*) Intron-überspannend gewählt, d. h. sie befanden sich in verschiedenen Exons. Ein Fragment, welches der Größe genomischer DNA entsprechen würde, konnte nicht detektiert werden (s. Abb. 6.5). Es zeigte sich, dass das *P2RY5*-Gen in allen 20 untersuchten Geweben und Zelllinien exprimiert wird (s. Abb. 6.5 und 6.19 A). Dieses Ergebnis konnte durch *Array*-basierte Untersuchungen zur *P2RY5*-Expression mit dem *Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3* (BD Biosciences) bestätigt werden (s. Abb. 6.6). Nach Hybridisierung des *Arrays* mit einer *P2RY5*-Sonde ist eine schwache, aber ubiquitäre Expression des Gens zu erkennen (s. Abb. 6.6 B). In der letzten Spalte des *Arrays* sind verschiedene Negativkontrollen aufgetragen. Die Kontrollen 12 A-E zeigen wie erwartet kein Signal. Die Kontrollen 12 F-H zeigen allerdings ein starkes Signal, da hier genomische DNA auf die Membran aufgebracht wurde. Da das *P2RY5*-Gen nur ein kodierendes Exon enthält, konnte die *P2RY5*-Sonde nicht Intron-überspannend gelegt werden, was das Signal der genomischen DNA erklärt.

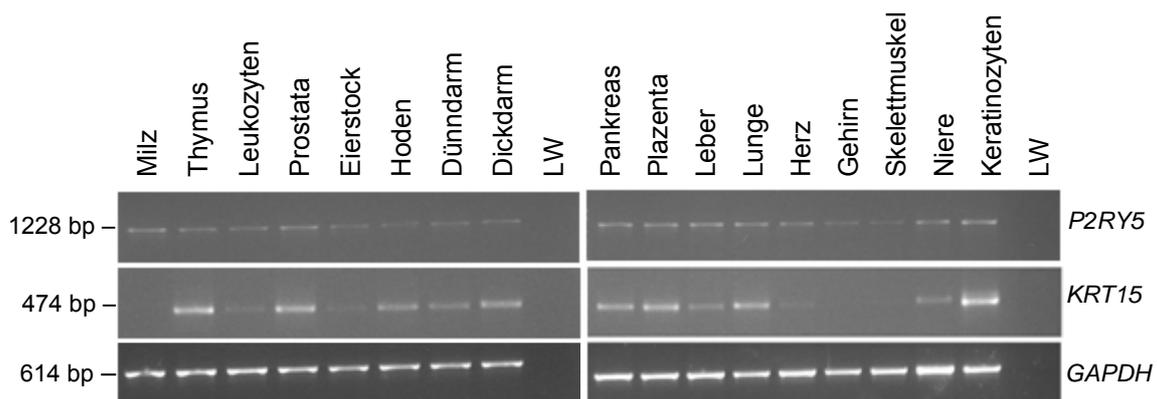


Abb. 6.5: Expression von *P2RY5* und zwei Kontrollgenen (*KRT15* und *GAPDH*) in verschiedenen humanen Geweben und Zellen. Die reverse Transkriptase PCR wurde mit den humanen *MTC Panels I* und *II* (BD Biosciences) und einer humanen Keratinozyten cDNA-Bibliothek (Clontech) durchgeführt. Die letzte Gelspur ist jeweils eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA (LW, Leerwert). *P2RY5* ist in allen untersuchten Geweben exprimiert. Siehe auch Abb. 6.19 A für Expression in Haut und Haarfollikeln verschiedener Körperregionen.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gehirn	Li. Zerebellum	Substantia nigra	Herz	Ösophagus	Schräger Dickdarm	Niere	Lunge	Leber	Leukemia, HL-60	Fetales Gehirn	Hefe RNA
B	Zerebraler Kortex	Re. Zerebellum	Nucleus accumb.	Aorta	Magen	Absteig. Dickdarm	Skelettmuskel	Plazenta	Pankreas	HeLa S3	Fetales Herz	Hefe tRNA
C	Frontallappen	Corpus callosum	Thalamus	Linkes Atrium	Duodenum	Mastdarm	Milz	Blase	Nebenniere	Leukemia, K-562	Fetale Niere	<i>E. coli</i> rRNA
D	Parietallappen	Amygdala	Hypophyse	Rechtes Atrium	Jejunum		Thymus	Uterus	Schilddrüse	Leukemia, MOLT-4	Fetale Leber	<i>E. coli</i> DNA
E	Okzipitalappen	Nucleus caudatus	Rückenmark	Linker Ventrikel	Ileum		Leukozyten	Prostata	Speicheldrüse	Burkitt's Lymphom, Raji	Fetale Milz	Poly r(A)
F	Temporallappen	Hippocampus		Rechter Ventrikel	Ileocecum		Lymphknoten	Testis	Brustdrüse	Burkitt's Lymphom, Daudi	Fetaler Thymus	Humane Cot-1 DNA
G	Parazentr. Gyrus des zerebralen Cortex	Medulla oblongata		Inter-ventrikuläres Septum	Blinddarm		Knochenmark	Ovar		Kolorekt. Adenokarzinom, SW480	Fetale Lunge	100 ng humane DNA
H	Pons	Putamen		Herz Apex	Aufsteig. Dickdarm		Luftrohre			Lungenkarz. 549		500 ng humane DNA

B

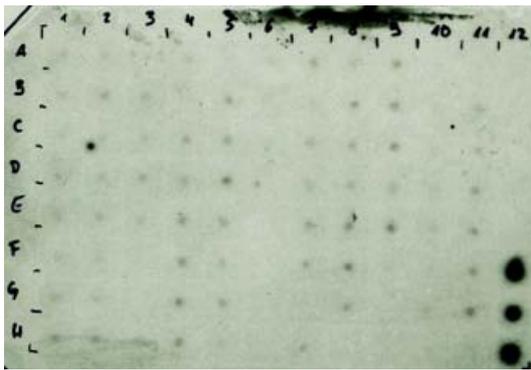
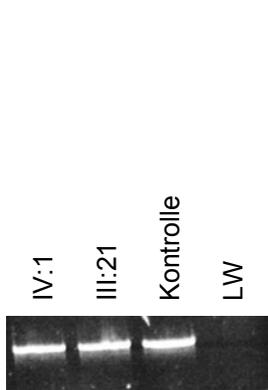


Abb. 6.6: Hybridisierung des *Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3* (BD Biosciences) mit einer *P2RY5*-Sonde (374 bp). **(A)** Schematische Darstellung der Verteilung der 76 aufgetragenen RNAs von Geweben und Kontrollen auf dem *MTE Array*. **(B)** Das *P2RY5*-Gen zeigt eine schwache, aber ubiquitäre Expression auf dem *MTE Array*. Die Negativ-Kontrollen befinden sich in der zwölften Spalte. Die Kontrollen 12 A-E zeigen kein Signal. Die Kontrollen 12 F-H zeigen ein starkes Signal, da hier humane genomische DNA auf die Membran aufgetragen wurde.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die mutierte RNA in Zellen von Patienten vorliegt oder ob sie z. B. durch *nonsense mediated mRNA decay* abgebaut wird. Für diese Untersuchung wurde RNA aus immortalisierten Lymphozyten der Personen III:21 (c.373_374delAA het.) und IV:1 (c.373_374delAA hom.) der HS-Familie 3 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die *P2RY5*-cDNA amplifiziert und sequenziert. Es stellte sich heraus, dass sowohl beim homozygoten Träger, als auch beim heterozygoten Träger die mutierte mRNA vorliegt (s. Abb. 6.7). Das Vorhandensein der mRNA ist Voraussetzung für die Bildung eines entsprechenden Proteins in der Zelle und Grundlage für die im Folgenden beschriebenen funktionellen Analysen.

A



B

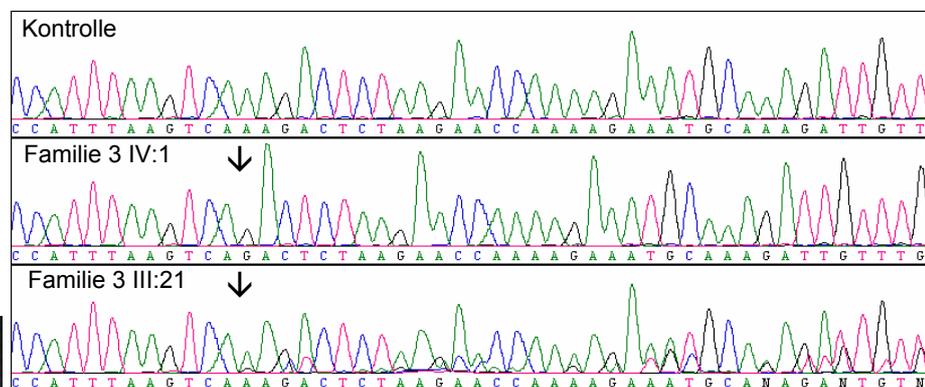


Abb. 6.7: **(A)** Gelbild von *P2RY5* cDNA-PCR-Produkten. Als Ausgangsmaterial dienten cDNAs aus immortalisierten Lymphozyten von Mitgliedern der HS-Familie 3 (IV:1, III:21) und einer Kontrolle. LW, Leerwert (keine cDNA). **(B)** Sequenzanalyse der *P2RY5* cDNA-PCR-Produkte aus cDNA einer Kontrolle, des Indexpatienten aus HS-Familie 3 (IV:1) und dessen Mutter (III:21). Die heterozygote bzw. homozygote 2 bp-Deletion (c.373_374delAA) ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

6.5 Bioinformatische Untersuchung zur Struktur des P2Y5-Proteins

Zur Berechnung der Struktur eines Proteins stehen verschiedene Programme zur Verfügung. Hier wurde *Molecular Toolkit* verwendet, welches kostenlos im Internet zur Verfügung steht (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/>). Es handelt sich hierbei um eine Gruppe von Programmen zur Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren und Proteinsequenzen. Der im Folgenden verwendete Hydrophobizitäts-Plot dient der Darstellung von polaren und apolaren Aminosäuren in der Proteinsequenz und kann somit zur Vorhersage von Transmembran-Domänen benutzt werden.

Der in Abb. 6.8 angelegte Kyte-Doolittle Scale von 20 zeigt Transmembran-Domänen ab einem Wert von +1,6 an (Kyte & Doolittle, 1982). Man kann hier sehr gut die sieben berechneten Transmembran-Domänen erkennen, welche ein Charakteristikum von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind. Aufgrund dieser Vorhersage lässt sich die in Abb. 6.9 dargestellte Domänenstruktur für das P2Y5-Wildtyp-Protein und die beiden Mutanten erstellen. Hierbei stellt sich das Wildtyp-Protein mit einem N- und C-Terminus sowie sieben Transmembran-Domänen dar, die von drei zytoplasmatischen und drei extrazellulären Domänen verbunden werden (s. Abb. 6.9). Diese sechs Domänen, die so genannten *loops*, sind ebenfalls allen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gemein, unterscheiden sich aber in ihrer Länge und Aminosäure-Zusammensetzung. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein besteht die Mutante p.Gln155X nur aus dem N-Terminus mit vier Transmembran-Domänen, welche durch zwei zytoplasmatische und eine extrazelluläre Domäne verbunden werden. Eine weitere extrazelluläre Domäne ist nur partiell vorhanden. Die Mutante p.Lys125AsnfsX37 besteht nur aus dem N-Terminus und drei Transmembran-Domänen, die durch eine zytoplasmatische und eine extrazelluläre Domäne verbunden werden. Eine zweite zytoplasmatische Domäne ist partiell vorhanden und beinhaltet 37 *Missense*-Aminosäuren, also für das Protein falsche Aminosäuren.

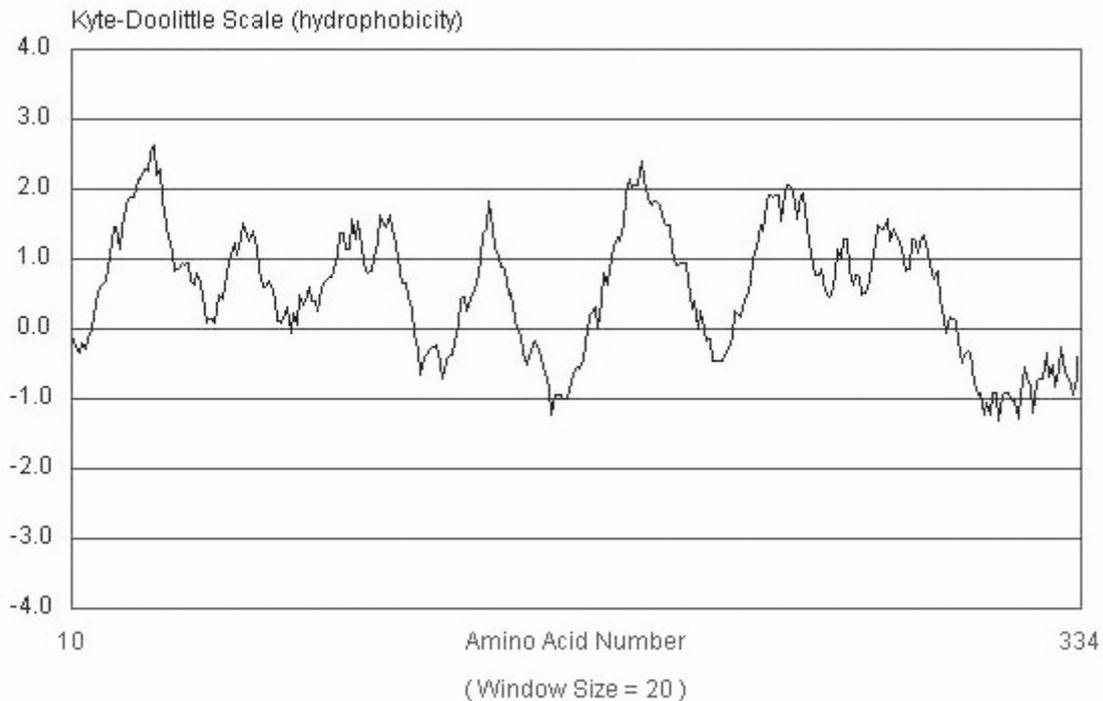


Abb. 6.8: Hydrophobizitäts-Plot des P2Y5-Wildtyp-Proteins, erstellt mit dem Programm *Molecular Toolkit*. Auf der Y-Achse der Kyte-Doolittle-Grafik ist die Hydrophobizität dargestellt, auf der X-Achse die lineare Abfolge der Aminosäuren des P2Y5-Proteins. Die hydrophoben Transmembran-Domänen sind als Peaks ab einem Wert von +1.6 zu erkennen.

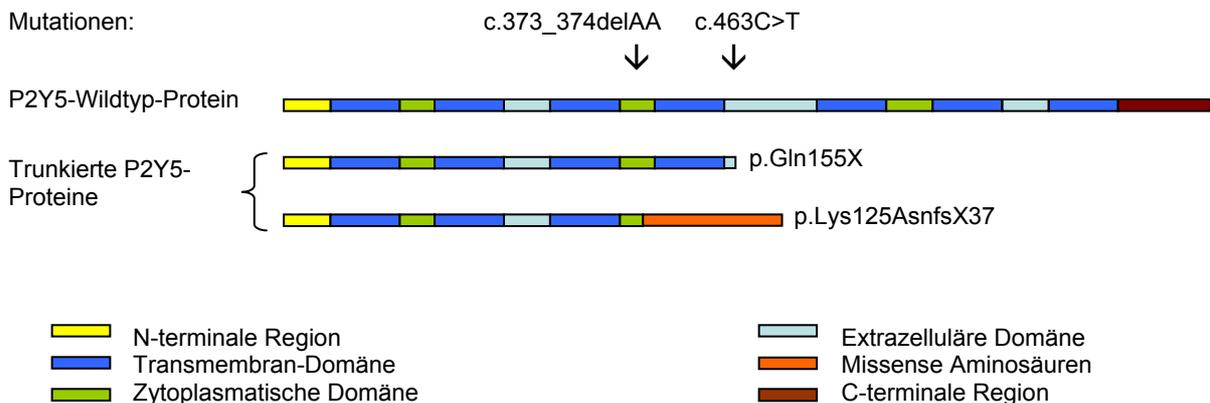


Abb. 6.9: Schematische Struktur der Domänen des P2Y5-Wildtyp-Proteins und der beiden Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37. Die Transition c.463C>T (p.Gln155X) führt zu einem vorzeitigen Stoppkodon in der zweiten extrazellulären Domäne. Die Deletion c.373_374delAA (p.Lys125AsnfsX37) führt zu einer Verschiebung des Leserasters, welche nach 37 *Missense*-Aminosäuren ebenfalls zu einem vorzeitigen Stoppkodon und somit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation in der zweiten zytoplasmatischen Domäne führt.

6.6 Funktionelle Analysen des P2Y5-Proteins

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse werfen die Frage auf, warum die Mutation eines Gens, welches ubiquitär exprimiert wird, zu keinerlei anderen Auffälligkeiten als dem Haar-Phänotyp bei den Patienten führt. Zur Klärung dieser Frage, wurden weiterführende funktionelle Untersuchungen durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben sind.

6.6.1 Immunologischer Nachweis der P2Y5-Proteine

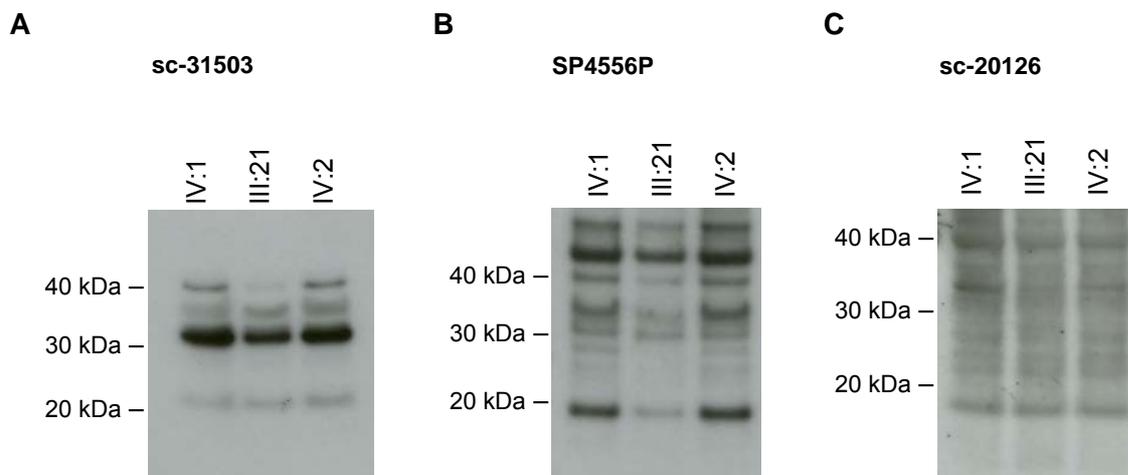
Die Western-Blot-Analyse stellt eine einfache und sensitive, biochemische Methode dar, um Proteine in einem Proteingemisch nachzuweisen und das ungefähre Molekulargewicht durch Vergleich mit einem Größenmarker zu bestimmen.

Als Probenmaterial wurden Proteinlysate der immortalisierten Lymphozyten von den Individuen IV:1 (Indexpatient; homozygote Mutation), IV:2 (gesunder Bruder des Indexpatienten; Wildtyp) und III:21 (gesunde Mutter des Indexpatienten; heterozygote Mutation) der HS-Familie 3 verwendet. Nach SDS-Page und Proteintransfer auf eine Membran, wurden die P2Y5-Proteine durch verschiedene polyklonale Antikörper (sc31503 [Santa Cruz Biotechnology], SP4556P [Acris], sc-20126 [Santa Cruz Biotechnology]) nachgewiesen. Hierbei war bei keinem der verwendeten Antikörper ein Unterschied im Bandenmuster zwischen den untersuchten Proben zu erkennen (s. Abb. 6.10 A, B, C). Zudem stimmte auch das Bandenmuster keiner der anti-P2Y5-Antikörper überein, was dafür spricht, dass die Antikörper unspezifisch sind.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde deshalb das P2Y5-Wildtyp-Protein und die Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 in den *pcDNA3.1*-Vektor kloniert. Der CMV-Promotor des Plasmids gewährleistet eine konstitutive Überexpression und somit eine hohe Proteinausbeute. Die Stoppkodons wurden deletiert und die Proteine C-terminal und *in-Frame* mit dem V5-Epitop kloniert, welches vom *pcDNA3.1*-Vektor kodiert wird (s. Anhang Abb. 12.2.3). Somit können die P2Y5-Proteine durch den monoklonalen V5-Antikörper nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde P2Y5 auch N-terminal mit dem V5-Epitop fusioniert (s. Anhang Tab. 12.3.1). Die Lokalisation des Epitops machte jedoch keinen Unterschied in Bezug auf die Expression und Translation der P2Y5-Proteine in transient transfizierten COS7-Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei dem in Abb. 6.10 D gezeigten Blot ist das P2Y5-Protein N-terminal mit dem V5-Epitop fusioniert. Die Western-Blot-Analyse von COS7-Zell-Lysaten zeigte eine Bande von ca. 30 kDa, die der hypothetischen Proteinmasse des Wildtyp-Proteins entspricht. Beide Mutanten zeigten ebenfalls Banden in den erwarteten Größenbereichen von etwa 15 kDa und 17 kDa (s. Abb. 6.10 D). Zusätzliche Banden waren

sichtbar, die auch unter verschiedenen Färbebedingungen (unterschiedliche Block- und Waschlösungen, verschiedene Antikörper-Konzentrationen und -Inkubationszeiten etc.) nicht eliminiert werden konnten. Zum Vergleich wurde der SP4556P-Antikörper auch bei transfizierten COS7-Zellen verwendet (s. Abb. 6.10 E). Wie in Abb. 6.10 A-C ist auch hier kein Unterschied zwischen P2Y5-Wildtyp und Mutanten zu erkennen. Darüber hinaus entspricht das Bandenmuster auch nicht dem, welches in immortalisierten Lymphozyten bei Verwendung des gleichen Antikörpers vorliegt (s. Abb. 6.10 B).

Immortalisierte Lymphozyten von Individuen der HS-Familie 3



Transient transfizierte COS7-Zellen

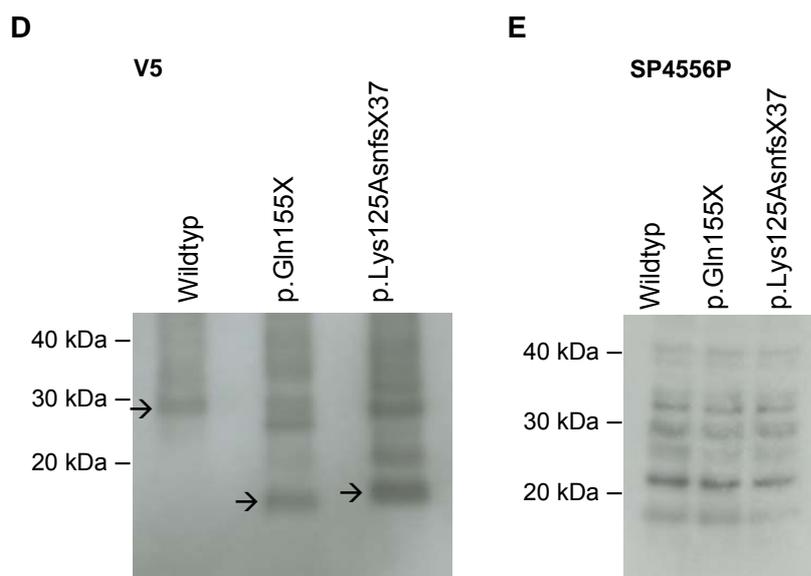


Abb. 6.10: **(A)** Western-Blot-Analyse von Protein-Lysaten aus immortalisierten Lymphozyten der HS-Familie 3 (Individuen III:21, IV:1 und IV:II). Als Primärantikörper wurde sc-31503 (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. **(B)** Western-Blot-Analyse von Protein-Lysaten aus immortalisierten Lymphozyten der HS-Familie 3. Als Primärantikörper wurde SP4556P (Acris) in einer Verdünnung von

1:1.000 verwendet. **(C)** Western-Blot-Analyse von Protein-Lysaten aus immortalisierten Lymphozyten der HS-Familie 3. Als Primärantikörper wurde sc-20126 (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. **(D)** Western-Blot-Analyse von Protein-Lysaten aus COS7-Zellen, die transient mit dem P2Y5-Wildtyp-Protein oder den Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 transfiziert wurden. Es wurde der V5-Antikörper (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet, das V5-Epitop befindet sich N-terminal am P2Y5-Protein. **(E)** Western-Blot-Analyse von Protein-Lysaten aus COS7-Zellen, die transient mit dem P2Y5-Wildtyp-Protein oder den Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 transfiziert wurden (N-terminales V5-Epitop). Es wurde der Antikörper SP4556P (Acris) in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet.

6.6.2 *In-vitro* Transkription/Translation

Da bei den Western-Blot-Analysen des P2Y5-Proteins unter den verschiedensten Versuchsbedingungen immer Nebenbanden detektiert wurden, sollten die Bandengrößen durch eine weitere Methode verifiziert werden. Hierfür wurde mit Hilfe des *TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems* (Promega) ein *Protein Truncation Test* (PTT) durchgeführt. Es handelt es sich hierbei um eine gekoppelte *in-vitro* Transkription und Translation, die dazu dient, das Molekulargewicht des untersuchten Proteins zu bestimmen. Ko- oder posttranslationale Modifikationen werden hierbei nicht durchgeführt, d. h. Phosphorylierung, Glykosylierung, Abspaltung eines evtl. vorhandenen Signalpeptides oder Acetylierung finden nicht statt.

Als Ausgangsmaterial für den PTT wurde die RNA aus immortalisierten Lymphozyten eines homozygoten und eines heterozygoten Mutationsträgers (c.373_374delAA) aus Familie 3 sowie einer Kontrolle verwendet (s. Abb. 6.4 B Individuen III:21, IV:1 und IV:2). Da keine RNA und auch keine immortalisierten Lymphozyten von Familie 1 zur Verfügung standen, wurde der PTT mit genomischer DNA eines homozygoten und eines heterozygoten Familienmitglieds durchgeführt, welche die c.463C>T Transition tragen (s. Abb. 6.1 Individuen II:2 und II:7). Als Kontrolle wurde die DNA der Person II:9 verwendet, die kein Mutationsträger ist. Ermöglicht wurde die Verwendung von genomischer DNA für diesen Test da das *P2RY5*-Gen nur ein kodierendes Exon enthält und die kodierende Sequenz somit nicht durch Introns unterbrochen wird.

Beim PTT zeigten *P2RY5*-Wildtyp-RNA und -DNA von Kontrollen eine Bande bei ca. 30 kDa. Die 2 bp-Deletion (c.373_374delAA) führte zu einem Protein der Größe von etwa 17 kDa und die C>T Transition (c.463C>T) zeigte ein Protein mit einem etwas geringeren Molekulargewicht (s. Abb. 6.11). Diese Ergebnisse entsprechen den der Western-Blot-Analysen. Bei ca. 24 kDa war bei allen Proben eine unspezifische Bande zu erkennen, ansonsten wurden im Gegensatz zu den Western-Blot-Analysen keine weiteren Nebenbanden detektiert.

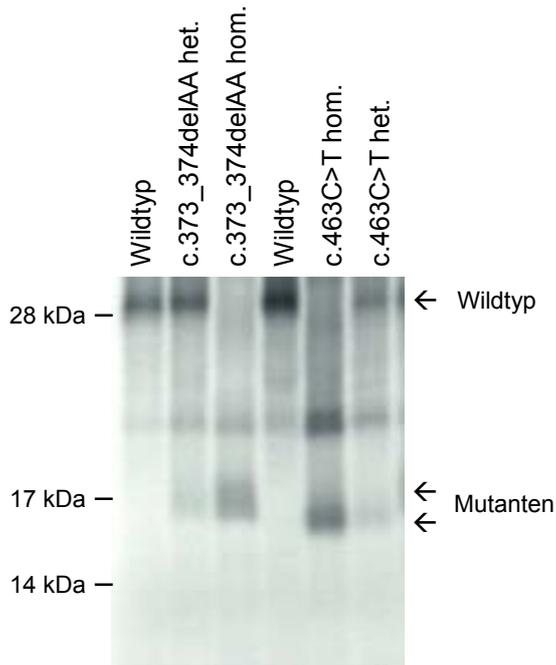


Abb. 6.11: *Protein Truncation Test* (PTT) mit *P2RY5*-Konstrukten. Als Material wurde die RNA aus immortalisierten Lymphozyten eines homozygoten und eines heterozygoten Mutationsträgers (c.373_374delAA) aus HS-Familie 3 sowie einer Kontrolle verwendet. Da keine RNA und keine immortalisierten Lymphozyten von HS-Familie 1 zur Verfügung standen, wurde der PTT mit genomischer DNA eines homozygoten und eines heterozygoten Familienmitglieds (c.463C>T) sowie einer Kontrolle durchgeführt. Hierbei zeigten *P2RY5*-Wildtyp-RNA und -DNA übereinstimmend eine Bande bei ca. 30 kDa. Heterozygote Mutationen führten zu einer Bande bei 15 bzw. 17 kDa und einer Bande auf Höhe des Wildtyp-Proteins. Im Fall von homozygoten Mutationsträgern ist nur das trunkierte *P2Y5*-Protein nachweisbar.

6.6.3 Lokalisation von überexprimiertem *P2Y5* in COS7-Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation des *P2Y5*-Proteins zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden COS7-Zellen, die mit unterschiedlichen *P2RY5*-Konstrukten transfiziert worden sind (*P2Y5*-Wildtyp, p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37) auf Glasplättchen ausgesät. Nach 24 h konnten sie fixiert und anschließend verschiedene Färbungen durchgeführt werden. Da es sich beim *P2Y5*-Rezeptor um ein 7-Transmembran-Domänen-Protein handeln soll (s. Abb. 6.8 und 6.9), wurde angenommen, dass er in der Zellmembran lokalisiert ist. Aus diesem Grund wurde eine Kofärbung von Cadherinen, die sich in der Zellmembran befinden, und dem V5-fusionierten *P2Y5* durchgeführt. Die Kofärbung von *P2Y5*-Wildtyp-Protein und Cadherin bestätigte, dass *P2Y5* in der Zellmembran vorzufinden ist (s. Abb. 6.12 A). Zur Färbung der beiden Mutanten wurde zunächst nur der V5-Antikörper verwendet. Der V5-Antikörper färbte hier eine netzartige Struktur, die sich um den Zellkern herum befindet und große Teile des Zytoplasmas durchzieht. Dies ließ vermuten, dass sich die trunkierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) befinden könnten. Durch eine Kofärbung gegen die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), einem Marker für das ER, konnte nachgewiesen werden, dass die trunkierten *P2Y5*-Proteine im ER akkumulieren (s. Abb. 6.12 B und C). Die Kernfärbung erfolgte mittels DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid).

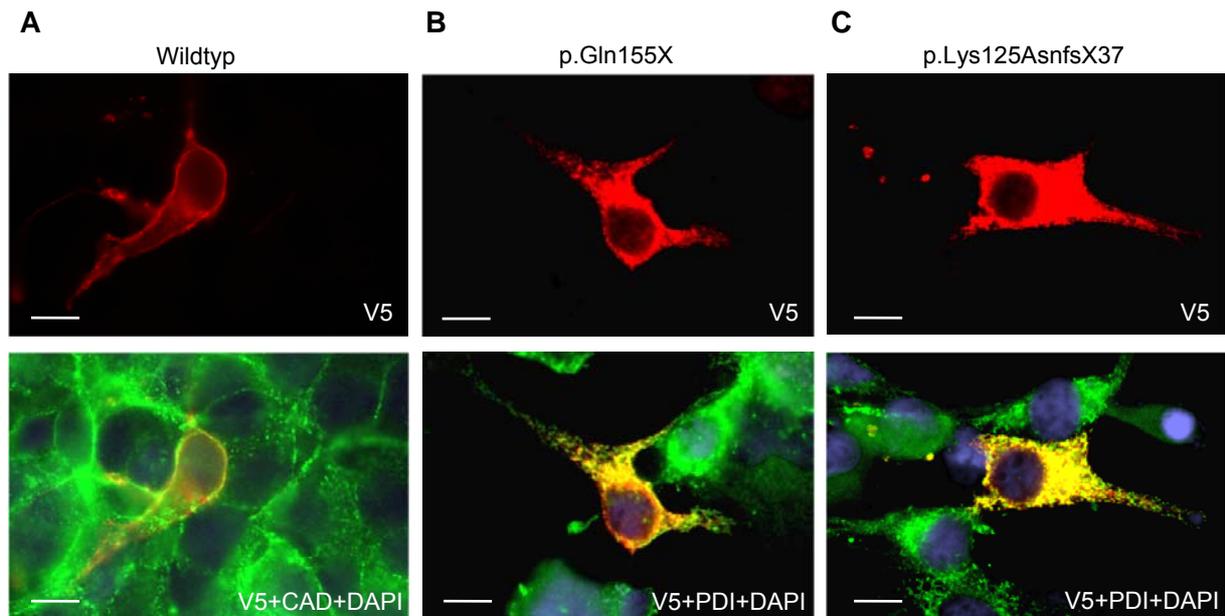


Abb. 6.12: Immunfluoreszenz-Analyse von transient transfizierten COS7-Zellen, welche P2Y5-Wildtyp oder Mutanten exprimieren. Die Zellen wurden mit 4,6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) und Antikörpern gegen das V5-Epitop gefärbt. P2Y5-Wildtyp-Zellen wurden zusätzlich mit einem pan-Cadherin-Antikörper (CAD) und P2Y5-Mutanten mit einem Protein-Disulfid-Isomerase-Antikörper (PDI) gefärbt. Das P2Y5-Wildtyp-Protein ist in der Zellmembran lokalisiert (**A**), im Gegensatz dazu sind die beiden Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 hauptsächlich im ER lokalisiert (**B und C**). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ M.

6.7 Pharmakologische Analysen des P2Y5-Rezeptors

Bei dem P2Y5-Protein handelt es sich um ein 7-Transmembran-Domänen-Protein (s. Abb. 6.8 und 6.9), daher gehört es höchst wahrscheinlich zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Ursprünglich wurde berichtet, dass der P2Y5-Rezeptor extrazelluläre Nukleotide als Liganden binde (Webb *et al.*, 1996), wovon sich auch der Name *G protein-coupled purinergic receptor P2Y5* ableitet. In weiteren Untersuchungen konnte dies jedoch nicht verifiziert werden (Li *et al.*, 1997; von Kügelgen, 2006), weshalb es sich um einen so genannten Orphan-Rezeptor mit bislang unbekannter Funktion und unbekanntem Liganden handelt. Aus diesem Grund ist es sowohl für das Verständnis der Proteinfunktion, der zellulären Signalgebung und der Pathophysiologie von HS, als auch im Hinblick auf eine Wirkstoffentwicklung für therapeutische Anwendungen von Bedeutung, den endogenen Liganden zu identifizieren.

6.7.1 Identifizierung des Liganden und erste funktionelle Untersuchungen zum P2Y5-Rezeptor

Die Identifizierung des Agonisten, d. h. der Substanz, welche den Rezeptor aktiviert, ist unerlässlich um die Funktion und Wirkungsweise eines Rezeptors zu verstehen. Darüber hinaus bietet die Kenntnis des Agonisten ein wirksames Werkzeug, um den Rezeptor für weitere funktionelle Studien zu aktivieren. Ist die Struktur des Agonisten bekannt, bietet dies außerdem die Möglichkeit, nach anderen, möglicherweise noch potenteren Agonisten zu suchen. In ein Krankheitsbild involvierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind auch pharmazeutisch sehr interessant, da bei Kenntnis des Agonisten bzw. Antagonisten eine Manipulation des Rezeptors möglich ist. Aus diesem Grund wurde in Kollaboration mit Prof. Ivar von Kügelgen vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn an der Identifizierung des Liganden gearbeitet. Hierfür wurden Flp-In-CHO-Zellen stabil mit dem P2Y5-Wildtyp-Protein transfiziert. Diese Zellen wurden dann transient mit dem *pCRE-luc*-Plasmid transfiziert, welches das Enzym Luziferase unter einem cAMP-abhängigen Promotor exprimiert (s. Anhang Abb. 12.2.2). Nach Zugabe von potentiellen Liganden wurde anschließend ein Luziferase Reportergen-Assay (*cAMP response element [CRE]-directed luciferase reporter gene assay* [Invitrogen]) durchgeführt, wie schon von Kotarsky *et al.* (2006) beschrieben.

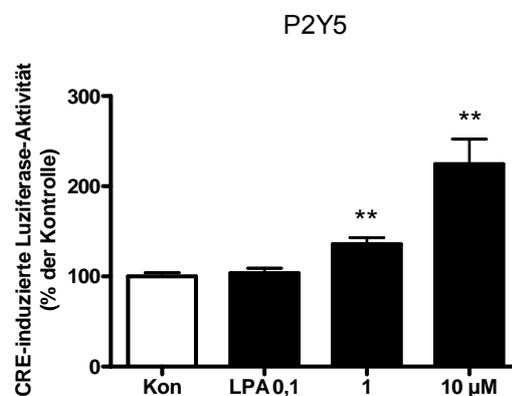


Abb. 6.13: Pharmakologische Untersuchung des P2Y5-Rezeptors. Gezeigt ist der Effekt von oleoyl-L- α -Lysophosphatidsäure (LPA) auf die CRE-gesteuerte Luziferase-Aktivität in Flp-In-CHO-Zellen, die den P2Y5-Rezeptor stabil exprimieren. Nach transienter Transfektion mit dem *pCRE-luc*-Vektor wurde das Lösungsmittel (Kon, weiße Säule) oder LPA (schwarze Säulen) in der auf der X-Achse angegebenen Konzentration für 3 h zugesetzt. Die Lichteinheiten sind prozentual in Bezug auf die Lösungsmittel-Kontrolle dargestellt. Sternchen über den Balken geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle an (** $P < 0,01$; Kruskal-Wallis Analyse gefolgt vom Dunn's post test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 9-23$).

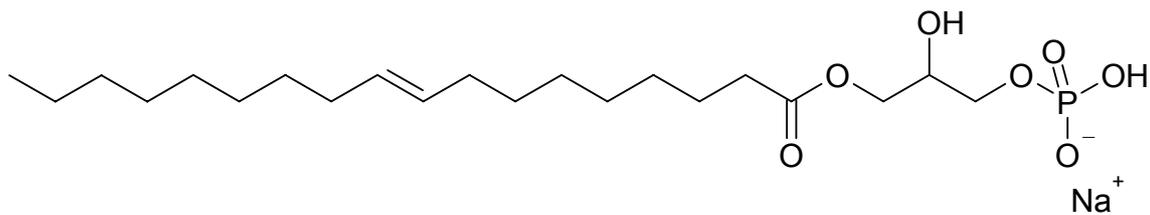


Abb. 6.14: Strukturformel von 18:1 Lysophosphatidsäure (LPA; 1-oleoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphat). Nach Zugabe von LPA konnte eine Aktivierung des P2Y5-Rezeptors im Luziferase Reporter-Gen-Assay nachgewiesen werden.

Nachdem eine Reihe von Substanzen getestet worden war (s. Anhang Tab. 12.1.4), konnte Lysophosphatidsäure (oleoyl-L- α -Lysophosphatidsäure, LPA; s. Abb. 6.14) als Ligand von P2Y5 identifiziert werden. Nach Gabe von unterschiedlichen Konzentrationen für eine Dauer von 3 h zeigte sich eine konzentrationsabhängige Expression der Luziferase als Maß der Aktivierung des P2Y5-Rezeptors (s. Abb. 6.13). Nach Zugabe von 0,1 μ M LPA konnte kein Unterschied im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle festgestellt werden. Nach Zugabe von 1 μ M LPA stieg die CRE-induzierte Luziferase-Aktivität um ca. 50% und nach Zugabe von 10 μ M LPA um ca. 150%, was einen signifikanten Unterschied ($P < 0,01$) zur Lösungsmittel-Kontrolle darstellt. Für Kontroll-Experimente wurden Flp-In-CHO-Zellen stabil mit dem humanen P2Y12-Rezeptor transfiziert. Hierbei handelt es sich um einen G_i-gekoppelten Rezeptor, der durch ADP, nicht aber durch LPA, aktiviert wird (Hollopeter *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden Flp-In-CHO-Zellen stabil mit dem trunkierten P2Y5-Protein p.Lys125AsnfsX37 transfiziert. LPA-Gabe führte in keiner dieser beiden Zelllinien zu einem Effekt (s. Abb. 6.15 A und B).

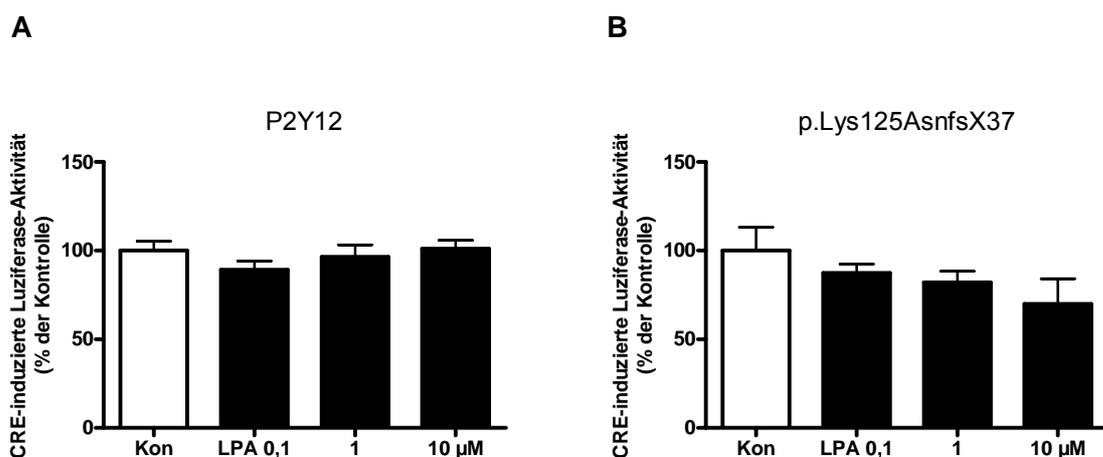


Abb. 6.15: Kontroll-Experimente zur Untersuchung des P2Y5-Rezeptors. Abgebildet ist der Effekt von Lysophosphatidsäure (LPA) auf die CRE-gesteuerte Luziferase-Aktivität in Flp-In-CHO-Zellen, die den P2Y12-Rezeptor (**A**) oder den trunkierten P2Y5-Rezeptor p.Lys125AsnfsX37 (**B**) stabil exprimieren. Nach

transienter Transfektion mit dem *pCRE-luc*-Vektor wurde das Lösungsmittel (Kon, weiße Säule) oder LPA (schwarze Säulen) in der auf der X-Achse angegebenen Konzentration für 3 h zugesetzt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden. Die Lichteinheiten sind prozentual in Bezug auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 6-13).

Die Identifizierung des Liganden ermöglicht weiterführende Untersuchungen des Rezeptors. Es ist bekannt, dass die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch den entsprechenden Liganden eine Aktivierung des intrazellulär gebundenen heterotrimeren G-Proteins (G_i , G_q , G_s oder G_{12}) zur Folge hat. Um heraus zu finden, ob der P2Y5-Rezeptor an ein inhibitorisches G-Protein koppelt, wurde den Zellen 20 h vor LPA-Zugabe Pertussis-Toxin (PTX, 200 ng/mg) zugesetzt, das G_i Proteine inaktiviert. In diesen Zellen konnte nach Zugabe von 1 μ M LPA eine im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle um etwa 100% gestiegene und nach Zugabe von 10 μ M LPA eine um mehr als 300% gestiegene Luziferase-Aktivität gemessen werden (s. Abb. 6.16). Dies entspricht einem statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit $P < 0,01$.

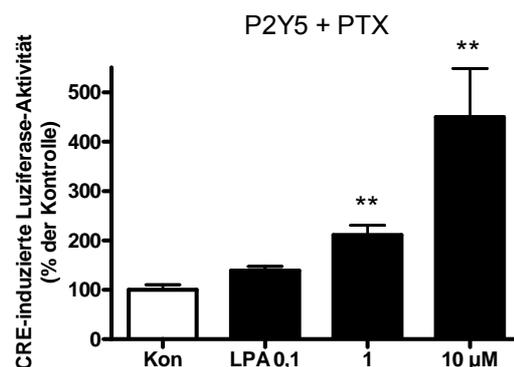


Abb. 6.16: Pharmakologische Untersuchung des P2Y5-Rezeptors. Gezeigt ist der Effekt von Lysophosphatidsäure (LPA) auf die CRE-gesteuerte Luziferase-Aktivität in Flp-In-CHO-Zellen, die den P2Y5-Rezeptor stabil exprimieren. Nach transienter Transfektion mit dem *pCRE-luc*-Vektor wurden die Zellen mit Pertussis-Toxin (PTX, 200 ng/mg für 20 h) behandelt. Das Lösungsmittel (Kon, weiße Säule) oder LPA (schwarze Säulen) wurde in der auf der X-Achse angegebenen Konzentration für 3 h vor Messung der Lichteinheiten zugesetzt. Die Lichteinheiten sind prozentual in Bezug auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle dargestellt. Sternchen über den Balken geben signifikante Unterschiede zur entsprechenden Kontrolle an (** $P < 0,01$; Kruskal-Wallis Analyse gefolgt vom Dunn's post test). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 6-22).

Des Weiteren wurden Zellen gleichzeitig mit LPA (10 μ M) und Forskolin (1 μ M) behandelt, welches Adenylatzyklen stimuliert. Forskolin selbst steigerte die Luziferase-Aktivität (ca. 20-fach, Daten nicht gezeigt) im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel für Forskolin behandelt wurden (DMSO und Ethanol). In den mit LPA und Forskolin behandelten Zellen führte die LPA-Gabe zu einer zusätzlichen Stimulierung der Adenylatzyklase und

somit zur gesteigerten Luziferase-Aktivität (s. Abb. 6.17). Hierbei konnten nach Zugabe von 10 μM LPA und 1 μM Forskolin statistisch signifikante Unterschiede zur Lösungsmittel-Kontrolle ermittelt werden ($P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; s. Abb. 6.17). Die Aktivitätssteigerung nach Zugabe von 0,1 μM und 1 μM LPA war jedoch nicht signifikant abweichend von der Kontrolle (Kruskal-Wallis Analyse gefolgt vom Dunn's post test).

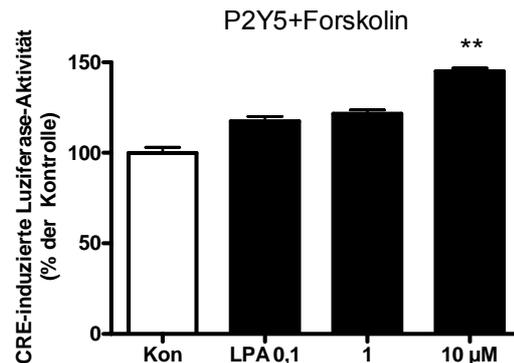


Abb. 6.17: Effekt von Lysophosphatidsäure (LPA) in Anwesenheit von 1 μM Forskolin auf Flp-In-CHO-Zellen, die stabil mit dem P2Y5-Rezeptor transfiziert wurden. Nach transien-ter Transfektion mit dem *pCRE-luc*-Vektor, wurden Zellen mit 1 μM Forskolin und unterschiedlichen LPA-Konzentrationen (schwarze Säulen) oder dem Lösungsmittel (Kon, weiße Säule) für 3 h behandelt. Die Abbildung zeigt die prozentualen Lichteinheiten in Bezug auf die entsprechende Kontrolle (Aktivität von Zellen, die nur mit Forskolin behandelt wurden). LPA steigerte signifikant die Aktivität des Reportergens zusätzlich zu der durch Forskolin selbst vermittelten Luziferase-Aktivität. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 3-5$). Die Sternchen über den Balken geben signifikante Unterschiede zur entsprechenden Kontrolle an (** $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; Kruskal-Wallis Analyse gefolgt vom Dunn's post test).

6.7.2 mRNA-Expression und phylogenetische Analyse verschiedener LPA-Rezeptoren

Es ist bekannt, dass LPA einen stimulierenden Einfluss auf die Proliferation und Migration von Zellen hat (Thoreson *et al.*, 1997). Diese Effekte werden durch verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptoren vermittelt. Bislang waren fünf LPA-Rezeptoren bekannt: LPA1 (Vzg-1/Edg2; Hecht *et al.*, 1996), LPA2 (Edg4; An *et al.*, 1998), LPA3 (Edg7; Bandoh *et al.*, 1999), LPA4 (P2Y9/GPR23; Noguchi *et al.*, 2003) und LPA5 (GPR92; Lee *et al.*, 2006). Aufgrund ihrer Funktion und ihrer phylogenetischen Verwandtschaft weisen LPA-Rezeptoren untereinander z. T. eine hohe Sequenzhomologie auf (s. Abb. 6.18 und 6.20 B).

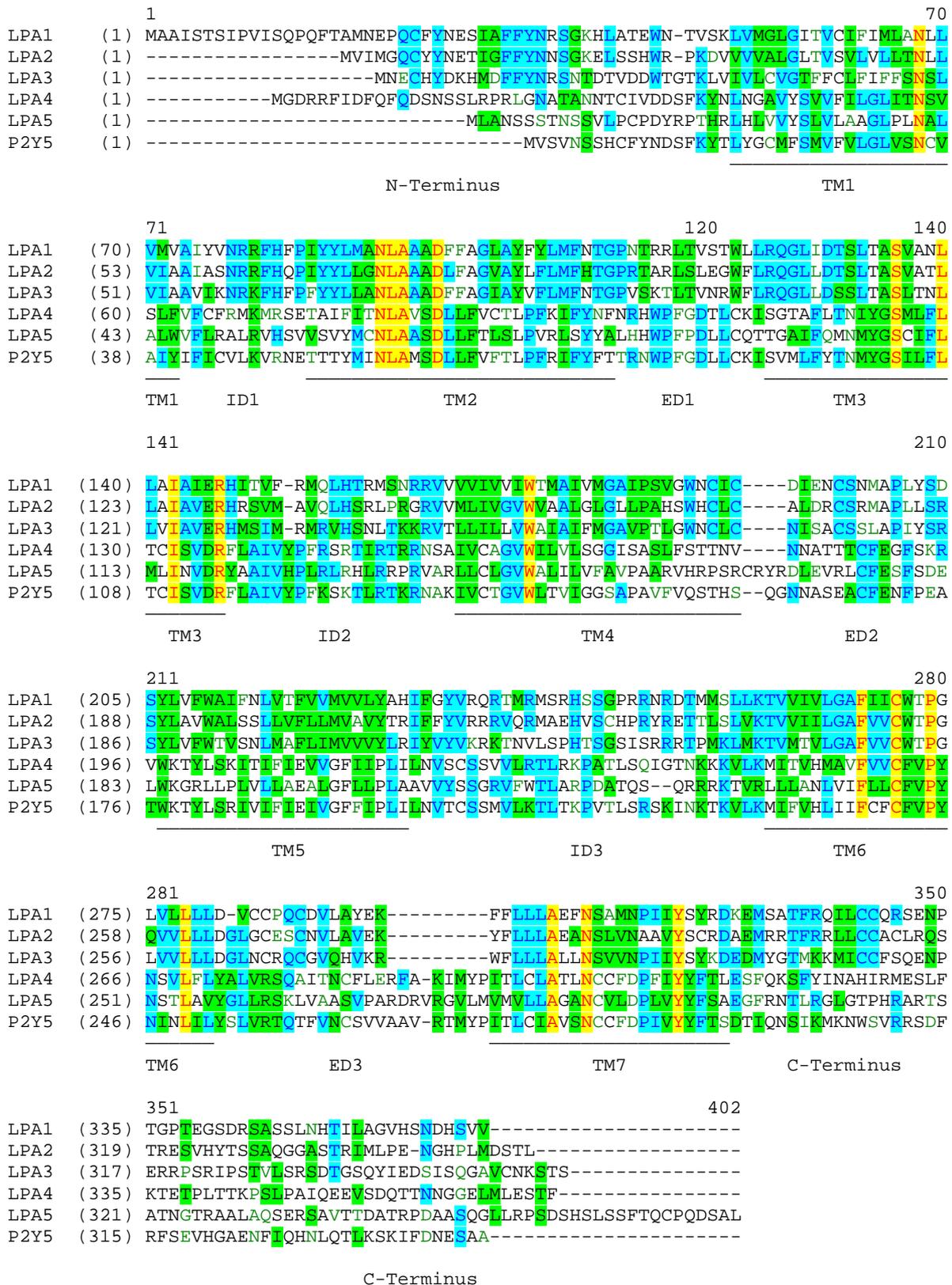


Abb. 6.18: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der humanen LPA-Rezeptoren (LPA1-5) und des P2Y5-Rezeptors mittels Vector NTI (Invitrogen). Identische AS sind in rot dargestellt. Grün/türkis/blau unterlegte oder dargestellte AS zeigen Ähnlichkeit an, wohingegen schwarz dargestellte und nicht unterlegte Aminosäuren nur eine geringe oder keine Ähnlichkeit zeigen. Des Weiteren sind in der Abbildung die vorhergesagten N-terminalen und C-terminalen Aminoäurereste, die Transmembran-Domänen (TM) und die intrazellulären bzw. extrazellulären Domänen (ID/ED) der LPA-Rezeptoren dargestellt. Gut zu erkennen sind die Ähnlichkeiten sowohl zwischen LPA1, LPA2 und LPA3 als auch zwischen LPA4, LPA5 und P2Y5.

Genbank peptide accession-Nummern: Q92633 (LPA1), NP_004711 (LPA2), Q9UBY5 (LPA3), Q99677 (LPA4), NP_065133 (LPA5) und P43657 (P2Y5).

Um Aufschluss über die Expression des P2Y5-Rezeptors und der unterschiedlichen LPA-Rezeptoren in verschiedenen Geweben zu erhalten, wurde cDNA aus Haarfollikeln von unterschiedlichen Stellen des Körpers (Augenbrauen und okzipitale Kopfhaut), Haut und Lymphozyten untersucht (s. Abb. 6.19). Als Kontrollgene wurden *GAPDH* und *KRT15* verwendet. Hierbei zeigte sich, dass sich die unterschiedlichen Rezeptoren durch distinkte Expressionsprofile voneinander unterscheiden. In Haarfollikeln der Kopfhaut sind *LPA1-3* und *P2RY5* exprimiert, nicht jedoch *LPA4* und *LPA5*. In Haarfollikeln der Augenbrauen ist zusätzlich zu diesen Genen auch *LPA5* exprimiert. In Hautzellen sind alle untersuchten LPA-Rezeptoren (*LPA1-5* und *P2RY5*) exprimiert, dieses Gewebe kann folglich als Positiv-Kontrolle dienen. Lymphozyten unterscheiden sich von Hautzellen durch die nicht vorhandene *LPA3*-Expression.

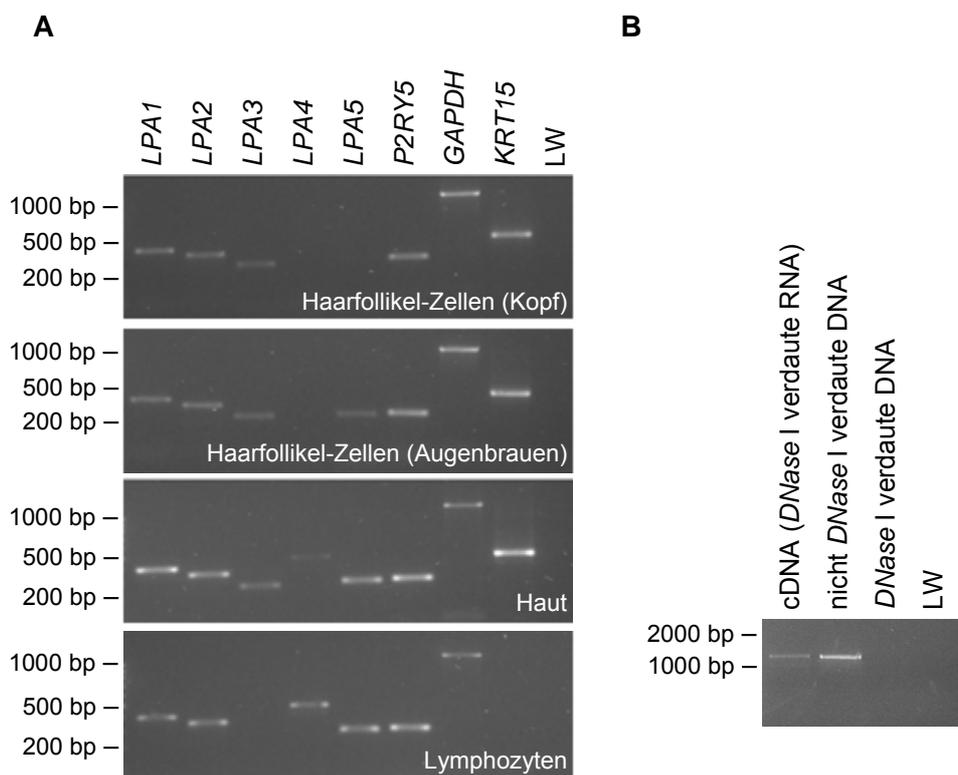


Abb. 6.19: Expression von mRNA kodierend für verschiedene LPA-Rezeptoren (*LPA1-5* und *P2RY5*) und Kontrollgene (*GAPDH* und *KRT15*). **(A)** Expression der untersuchten Gene in Haut, Lymphozyten und Haarfollikel-Zellen aus Augenbrauen und dem okzipitalen Kopfbereich. **(B)** Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurden die selbst isolierten RNAs mit *DNase I* behandelt. Gezeigt sind PCR-Produkte des *P2RY5*-Gens, welche mit den Primern P2RY5 1.1F und P2RY5 1R generiert wurden. LW = Leerwert (keine cDNA/DNA).

Kürzlich wurde postuliert, dass GPR87 (Tabata *et al.*, 2007) und P2Y10 (Murakami *et al.*, 2008) ebenfalls Rezeptoren für LPA oder chemisch nahe verwandte Analoga sind. Daher wurde die Expression von mRNA für diese beiden Rezeptoren zusätzlich in Haut und Haarfollikeln der okzipitalen Kopfhaut untersucht. Hierbei liegt mRNA des GPR87-Rezeptors in Haarfollikeln vor, nicht jedoch des P2Y10-Rezeptors (s. Abb. 6.20 A). Als Positiv-Kontrolle wurde Haut-RNA verwendet. Betrachtet man die phylogenetische Verwandtschaft der bekannten und putativen LPA-Rezeptoren, so ist die Subgruppe P2Y5/LPA4/LPA5 näher mit P2Y10 und GPR87 verwandt als mit LPA1/LPA2/LPA3.

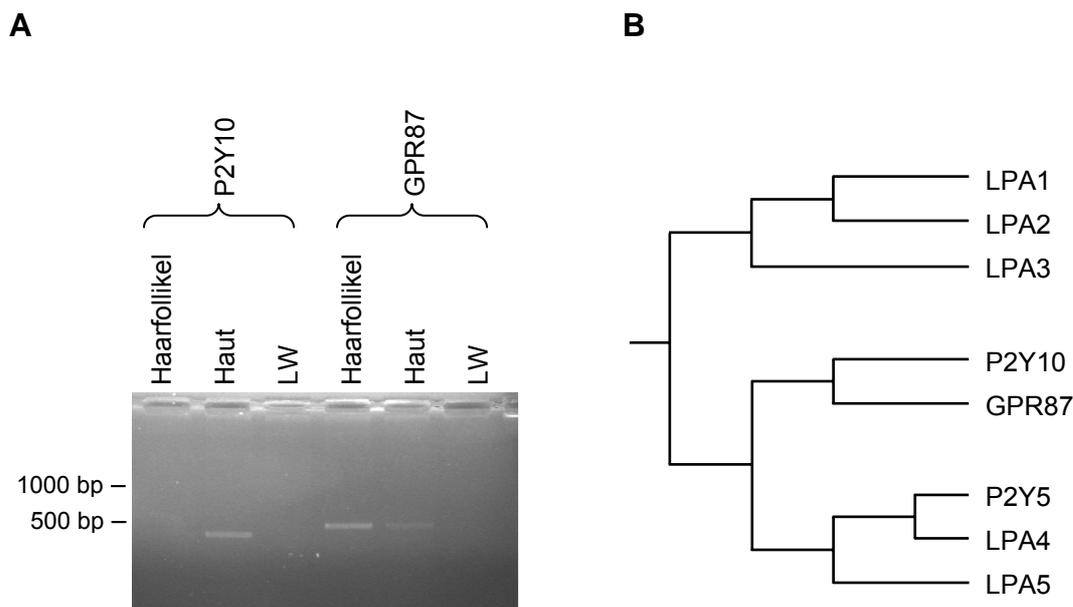


Abb. 6.20: mRNA-Expression und phylogenetische Analyse der putativen LPA-Rezeptoren GPR87 und P2Y10. **(A)** mRNA-Expression der putativen LPA-Rezeptoren GPR87 und P2Y10 in Haut und Haarfollikel-Zellen aus dem okzipitalen Kopf-bereich. GPR87 wird sowohl in Haut als auch in Haarfollikel-Zellen exprimiert. P2Y10 hingegen zeigt keine mRNA-Expression in Haarfollikel-Zellen. LW = Leerwert (keine cDNA). **(B)** Phylogenetischer Baum humaner LPA-Rezeptoren (Clustal W Algorithmus). Die Proteine LPA1, LPA2 und LPA3 lassen sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu einer Subfamilie von LPA-Rezeptoren zusammenfassen. P2Y5, LPA4 und LPA5 gehören zu einer weiteren Subfamilie. Die putativen LPA-Rezeptoren P2Y10 und GPR87 bilden eine dritte Subfamilie. Es ist zu erkennen, dass zwischen P2Y5/LPA4/LPA5 und P2Y10/GPR87 eine größere phylogenetische Verwandtschaft besteht als zu LPA1/LPA2/LPA3.

6.7.3 Bio-Assay via P2Y5 zur Bestimmung der LIPH-Aktivität

Kürzlich wurde beschrieben, dass Mutationen im *Lipase H (LIPH)*-Gen zu einer autosomal-rezessiv vererbten Form der Hypotrichosis simplex führen (Kazantseva *et al.*, 2006). Durch die Identifizierung von LPA als Ligand des P2Y5-Rezeptors ist es möglich, eine Verbindung zwischen dem Enzym Lipase H und diesem LPA-Rezeptor herzustellen: die Lipase H hydrolysiert das Substrat Phosphatidsäure (Sonoda *et al.*, 2002) und es entsteht eine freie Fett-

säure sowie LPA, welches wiederum den G-Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y5 aktiviert (s. Abb. 7.2). Folglich haben wir spekuliert, dass P2Y5 und LIPH einem Stoffwechselweg angehören.

Im Folgenden wurde untersucht, ob es möglich ist, die LIPH-Aktivität durch den Luziferase gekoppelten Reporter-Gen-Assay via P2Y5 zu messen und somit den Einfluss von verschiedenen *LIPH*-Mutationen auf den Lipid-Metabolismus zu bestimmen. Bislang war kein funktioneller Assay bekannt, der in der Lage ist, die Aktivität dieser Phospholipase im zellulären System zu bestimmen. Zur Überprüfung unserer Hypothese haben wir den nachfolgend dargestellten Assay entwickelt.

Zur Durchführung des Assays wurden Flp-In-CHO-Zellen transient mit verschiedenen *LIPH*-Konstrukten transfiziert (s. Anhang Tab. 12.3.3), darunter das Wildtyp-Konstrukt, eine *Frameshift*-Mutation, welche zum vorzeitigen Stoppkodon führt, und alle bis dato bekannten *in-Frame*-Mutationen (c.527_628del [Kazantseva *et al.*, 2006], c.280_369dup [Nahum *et al.*, 2008], c.403_409dup [Pasternack *et al.*, 2009b]). Die Mutationen c.280_369dup und c.403_409dup wurden zwar im eigenen HS-Patientenkollektiv identifiziert (Primer s. Anhang Tab. 12.1.8), es stand aber keine RNA der Patienten zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde nur die Wildtyp-Sequenz direkt durch die Primer LIPH MutagA F und LIPH MutagB R amplifiziert und kloniert, alle anderen Konstrukte wurden künstlich durch rekombinante PCRs mit den in Tab. 12.1.8 des Anhangs angegebenen Primern generiert. Für die pharmakologischen Untersuchungen wurde dem Medium der Zellen 40 h nach erfolgter Transfektion 100 μ M Phosphatidsäure für 30 min zugesetzt. Das Medium wurde anschließend auf *P2RY5-CRE-luc*-exprimierende Zellen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation wurden diese Zellen lysiert und die relativen Lichteinheiten am Luminometer bestimmt.

Es zeigte sich, dass der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Bio-Assay mit *P2RY5-CRE-luc*-exprimierenden Zellen dazu geeignet ist, die Aktivität der Lipase H in *LIPH*-exprimierenden Flp-In-CHO-Zellen zu messen. Hierbei kam es nach Zugabe von 100 μ M Phosphatidsäure in *LIPH*-Wildtyp-exprimierenden Zellen zu einem Aktivitätsanstieg von etwa 20 % im Vergleich zum Leerplasmid und den beiden Mutanten c.527_628del und c.403_409dup ($p < 0,001$), welche nach Phosphatidsäure-Gabe keinen signifikanten Aktivitätsanstieg zeigten (s. Abb. 6.21). Die c.280_369dup *LIPH*-Mutation führt zu einem Anstieg von ca. 8 % im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle. Dies bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp mit $p < 0,05$. Alle Zellen der Lösungsmittel-Kontrollen, sowie alle Phosphatidsäure-stimulierten *LIPH*-Mutanten und Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer LIPH-Aktivität ($p > 0,05$). Die Proteinmengen in den einzelnen Zellkulturschalen betrugen zwischen 15 μ g ± 3 und 29 μ g ± 9 . Die statistische Auswertung zeigte keine Unterschiede bezüglich der Proteinmengen von Zellen, die unterschiedliche *LIPH*-Konstrukte exprimierten.

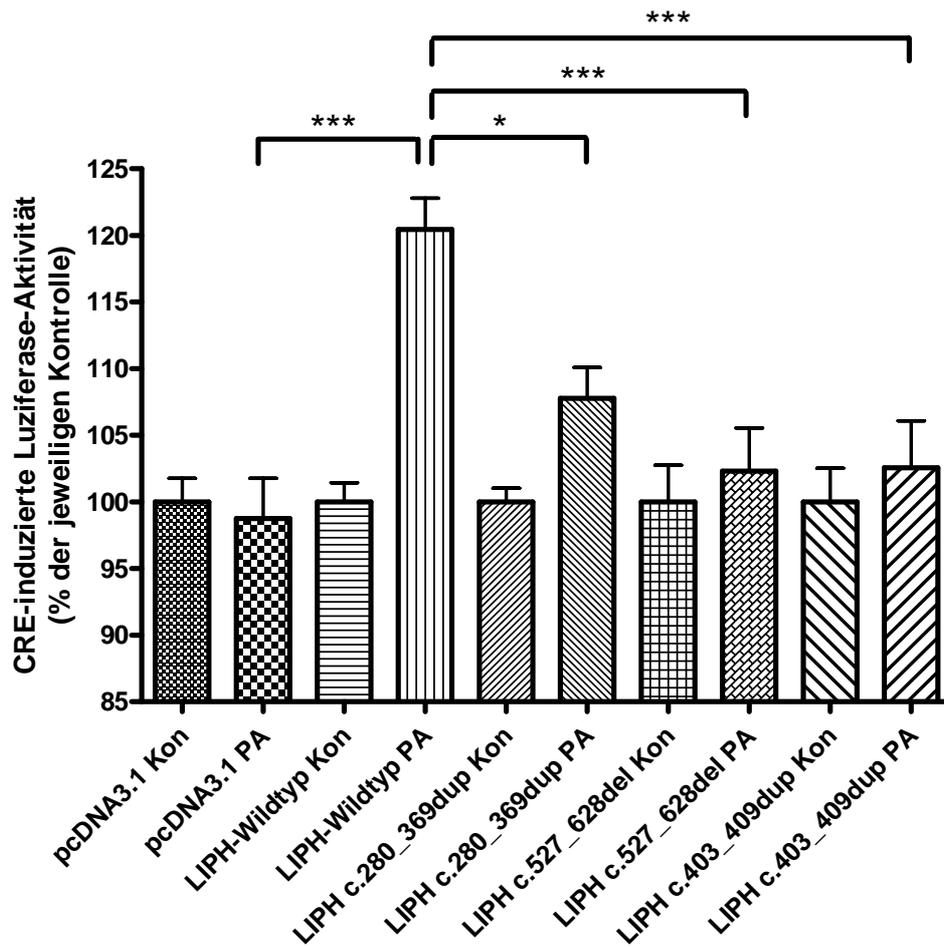


Abb. 6.21: Effekt von LPA, produziert von rekombinanter Lipase H, auf die CRE- (*cAMP response element*) induzierte Luziferase-Aktivität in Flp-In-CHO-Zellen, welche transient mit dem P2Y5-Rezeptor und der CRE-Luziferase transfiziert wurden. Das LPA wurde von LIPH-exprimierenden Flp-In-CHO-Zellen nach Zugabe von Phosphatidsäure (PA), dem Substrat für Lipase H, hergestellt. Anschließend wurde das Medium der LIPH-exprimierenden Zellen auf P2RY5-CRE-luc-exprimierende Zellen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation wurden diese Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Aktivitätsänderung ist prozentual zur jeweiligen Lösungsmittel-Kontrolle (Kon, Chloroform) dargestellt. Die Sternchen geben signifikante Unterschiede zur Wildtyp-Lipase H an (* und *** entsprechen $P < 0,05$ und $P < 0,001$; ANOVA gefolgt vom Bonferroni's Multiple Comparison Test). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 10$).

6.7.4 Lipase H-Funktionsbestimmung mittels PED-A1

Um die durch den erweiterten Luziferase Reporter-Gen-Assay (s. Kap. 6.7.3) erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurde eine weitere Methode angewandt. Hierfür wurden Flp-In-CHO-Zellen transient mit verschiedenen LIPH-Konstrukten (Wildtyp, c.527_628del [Kazantseva *et al.*, 2006], c.280_369dup [Nahum *et al.*, 2008], c.403_409dup [Pasternack *et al.*, 2009b]) oder dem leeren pcDNA3.1-Vektor transfiziert (s. Anhang Tab. 12.3.3). 40 h

nach erfolgter Transfektion wurde den Zellen 0,1 μM PED-A1-Lösung (Invitrogen; s. Abb. 6.22), welche Fluoreszenz-markierte Phospholipide enthält, als Substrat für die Lipase H zugesetzt. PED-A1 besteht aus einem Quencher, der sich an der Glycerophosphoethanolamin-Kopfgruppe befindet, und einer BODIPY[®]-markierten Acyl-Kette an der sn-1 Position. Nach Spaltung des Phospholipid-Moleküls durch eine Phospholipase wird der Quencher freigesetzt und Fluoreszenz wird messbar. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte am *FLUOstar-OPTIMA* Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm über einen Zeitraum von zwei Stunden.

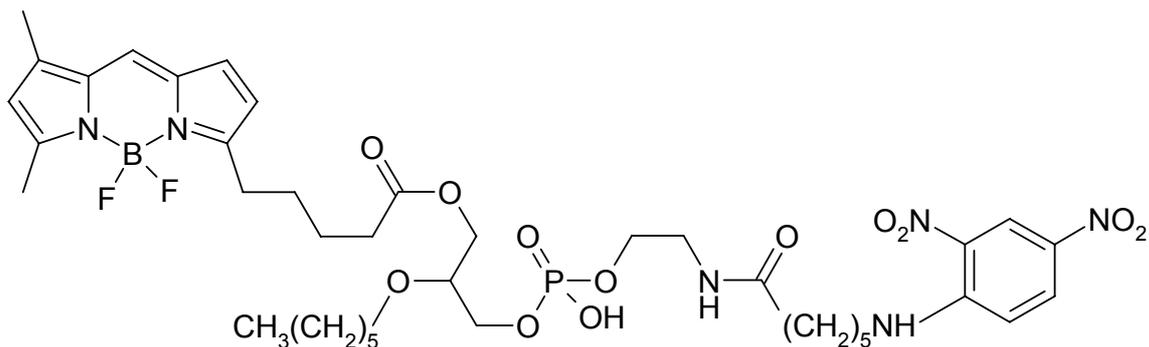


Abb. 6.22: Strukturformel des fluorogenen Phospholipasesubstrats PED-A1 (N-((6-(2,4-DNP amino)hexanoyl)-1-(BODIPY[®]FL C5)-2-hexyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin; Invitrogen), welches zur Bestimmung der LIPH-Aktivität in F1p-In-CHO-Zellen verwendet wurde. Die Summenformel lautet $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}$.

Die Messungen zeigten, dass F1p-In-CHO-Zellen, die mit *LIPH*-Wildtyp transfiziert wurden, das PED-1A-Substrat besser umsetzen, als Zellen, die mit dem Leerplasmid oder einer der drei verschiedenen *LIPH*-Mutanten transfiziert wurden. Hierbei zeigten *LIPH*-Wildtyp-exprimierende Zellen 10 min nach PED-A1-Zugabe einen Aktivitätsunterschied zu allen drei Mutanten ($p < 0,001$) nicht jedoch zum leeren Vektor (s. Abb. 6.23 A). Nach 30 min zeigten die mit dem Leerplasmid transfizierten F1p-In-CHO-Zellen eine ähnliche LIPH-Aktivität wie die Mutanten. Die Aktivität des Wildtyp-Proteins übersteigt diese um etwa 15 % ($p < 0,001$; s. Abb. 6.23 B). Dieser Effekt war auch nach 2 h noch nachweisbar, wenn auch in abgeschwächer Form (s. Abb. 6.23 C). Die Wildtyp-Lipase H zeigt hier etwa eine Steigerung um 12 % im Vergleich zum Leerplasmid, was einem statistisch signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ entspricht. Die drei untersuchten LIPH-Mutanten unterseiden sich ebenfalls signifikant vom Wildtyp (Ex4del und c.280_369dup: $p < 0,05$; c.403_409dup: $p < 0,001$), wohingegen Leerplasmid und die einzelnen Mutanten keinen statistisch signifikanten Unterschied zueinander aufweisen.

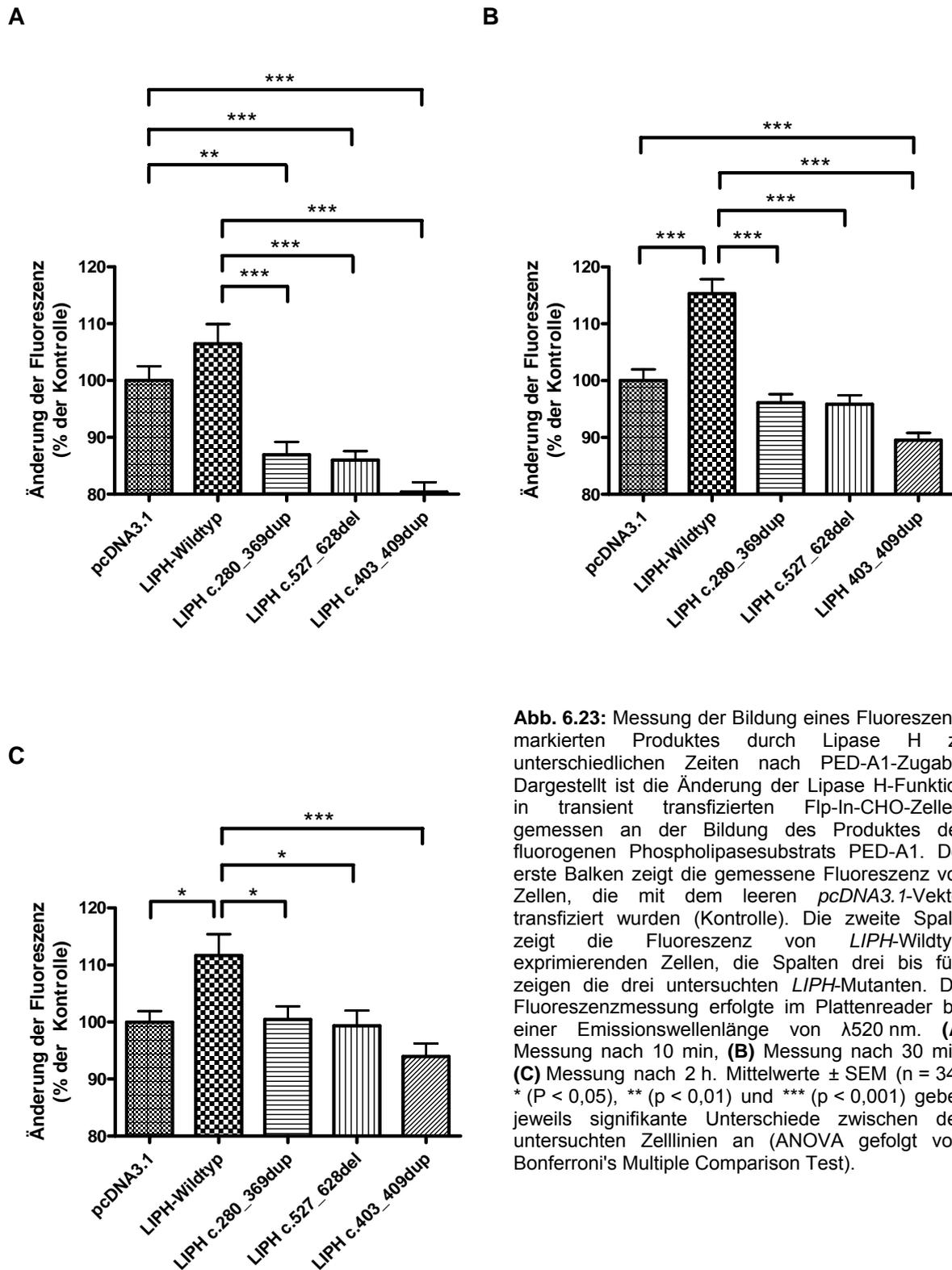


Abb. 6.23: Messung der Bildung eines Fluoreszenzmarkierten Produktes durch Lipase H zu unterschiedlichen Zeiten nach PED-A1-Zugabe. Dargestellt ist die Änderung der Lipase H-Funktion in transient transfizierten Flp-In-CHO-Zellen, gemessen an der Bildung des Produktes des fluorogenen Phospholipasesubstrats PED-A1. Der erste Balken zeigt die gemessene Fluoreszenz von Zellen, die mit dem leeren *pcDNA3.1*-Vektor transfiziert wurden (Kontrolle). Die zweite Spalte zeigt die Fluoreszenz von *LIPH*-Wildtyp-exprimierenden Zellen, die Spalten drei bis fünf zeigen die drei untersuchten *LIPH*-Mutanten. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Plattenreader bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda 520$ nm. **(A)** Messung nach 10 min, **(B)** Messung nach 30 min, **(C)** Messung nach 2 h. Mittelwerte \pm SEM ($n = 34$). * ($P < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) geben jeweils signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien an (ANOVA gefolgt vom Bonferroni's Multiple Comparison Test).

6.7.5 Lipase H-Funktionsbestimmung mittels bis-BODIPY[®] FL C11-PC

Die in Kap. 6.7.4 beschriebenen Messungen wurden auch mit dem fluorogenen Phospholipase-Substrat bis-BODIPY[®] FL C₁₁-PC (1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-sindacen-3-undecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin, Invitrogen) durchgeführt, welches Spezifität gegenüber den Phospholipasen A1 und A2 aufweist. Die Strukturformel der Substanz ist in Abb. 6.24 dargestellt. Es zeigte sich, dass dieses Substrat aufgrund der nicht ausreichenden Spezifität zur Lipase H nicht zur Messung der LIPH-Funktion eingesetzt werden konnte, da hier im Gegensatz zu den in Kap. 6.7.3 und 6.7.4 gezeigten Experimenten keine Unterschiede zwischen *LIPH*-Wildtyp, den drei Mutanten und dem *pcDNA3.1*-Vektor festgestellt werden konnten (s. Abb. 6.25).

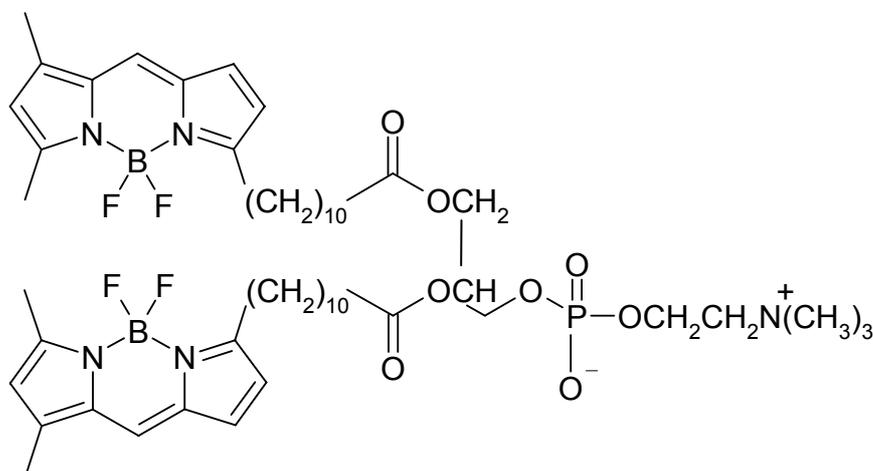


Abb. 6.24: Strukturformel des fluorogenen Phospholipase-Substrats bis-BODIPY[®] FL C₁₁-PC (1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-sindacen-3-undecanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin; Invitrogen), welches zur Bestimmung der LIPH-Funktion in *Fip*-In-CHO-Zellen verwendet wurde. Die Summenformel lautet C₅₂H₇₈B₂F₄N₅O₈P.

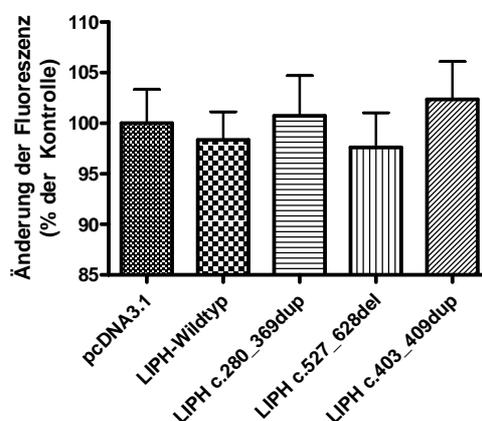


Abb. 6.25: Funktionsbestimmung der Lipase H gemessen an der Bildung des Produktes des fluorogenen Phospholipasesubstrats bis-BODIPY[®] FL C₁₁-PC (Invitrogen). Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenz des

LIPH-Wildtyp-Proteins und dreier Mutanten in Relation zum leeren *pcDNA3.1*-Vektor 30 min nach Zugabe des Substrats. Mittelwerte \pm SEM (n = 14). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Konstrukten festgestellt werden (ANOVA gefolgt vom Bonferroni's Multiple Comparison Test).

6.8 Mausmodelle

Es gibt eine Vielzahl von natürlichen und künstlich generierten Mausmutanten (MGI-Datenbank), deren Analysen zum Verständnis der unterschiedlichsten Erkrankungen beigetragen haben. Da uns keine Hautbiopsien von Betroffenen zur Verfügung standen, könnten histologische Untersuchungen an *P2ry5*-Mausmutanten entscheidend zum Verständnis der Pathophysiologie von Hypotrichosis simplex beitragen.

6.8.1 Sequenzanalyse des *P2ry5*-Gens einer *wal*^{-/-}-Maus

Wie schon im Abschnitt 2.7.2 ersichtlich, stellen Mausmutanten, wie z. B. die *lanceolate hair mouse*, gute Modelle dar, um die Pathophysiologie von Haarerkrankungen zu verstehen. Es gibt eine Reihe von Mausmutanten, welche mit Defekten des Haarwachstums und Hypotrichosis einhergehen (*Dsg3*^{bal}, *Ctstf*^{fs}, *Egfr*^{wa2}; MGI Datenbank). Zur Identifizierung eines möglicherweise bereits bestehendes Mausmodell für die von uns untersuchte HS-Form wurden Mausmutanten in der Literatur und in Datenbanken gesucht, die Kopplung zum Locus der syntenen chromosomalen Region der Maus zeigen. Das humane *P2RY5* befindet sich auf Chromosom 13, das *P2ry5*-Gen liegt bei der Maus auf Chromosom 14. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass die *wal*^{-/-}-Maus an den Genort angrenzt (MGI:98942). Die autosomal-rezessiv vererbte (noch nicht identifizierte) *wal*-Mutation entstand spontan in BALB/c-Mäusen im Jahre 1969 (Stolbovaya breeding nursery, Academy of Medical Sciences, UdSSR) und wurde zuerst von Sorokina und Blandova beschrieben (Sorokina & Blandova, 1980). Die ersten Anzeichen von welligem Fell treten bei *wal*^{-/-}-Mäusen im Alter von zwei Wochen auf. Etwa einen Monat nach dem ersten Haarwechsel kann eine Ausdünnung der Haare festgestellt werden und die Haarschäfte wachsen nur verkürzt nach und haben einen geringeren Durchmesser. Die Alopezie beginnt zwischen den Schulterblättern und breitet sich über den Rücken und die Seiten bis zum Abdomen aus. Im Alter von etwa zwei Monaten ist der Körper fast komplett haarlos, es verbleiben lange, wellige Haare an Schwanz und Kopf, speziell hinter den Ohren. Im Gegensatz zu den männlichen Tieren tritt bei den Weibchen die Alopezie in stärkerem Maße auf (Konyukhov *et al.*, 2004).

Um festzustellen, ob bei diesem Mausstamm eine Mutation im *P2ry5*-Gen für den Haarfall verantwortlich ist, wurde das gesamte Gen einschließlich der UTRs einer *wal*^{-/-}-Maus¹ sequenziert. Die verwendeten PCR- und Sequenzier-Primer können der Tab. 12.1.7 des Anhangs entnommen werden. Als Kontrolle wurde das *P2ry5*-Gen einer C57/BL6-Maus sequenziert und die Daten zusätzlich mit dem *mouse genome browser* der UCSC Datenbank verglichen. In der *wal*^{-/-}-Maus konnte keine Veränderung der Basenabfolge im Vergleich zur murinen Wildtyp-*P2ry5*-Sequenz festgestellt werden.

6.8.2 Voruntersuchungen zur Generierung einer *P2ry5*-knockout-Maus

Da mittels Datenbank-Recherche kein Mausmodell für einen *P2ry5*-Gendefekt identifiziert werden konnte, wurde die Generierung einer *P2ry5*-knockout-Maus angestrebt. Vor der Herstellung des *knockout*-Konstrukts musste zunächst die Frage geklärt werden, ob bei der Maus eine ähnliche Expression von Lpa-Rezeptoren wie beim Menschen vorliegt (s. Abb. 6.19), damit ein *P2ry5*-Ausfall nicht durch *Lpa4* oder *Lpa5* kompensiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden 338 Tage alten C57/BL6-Wildtyp-Mäusen (P338) Haut und Haarfollikel der Rückenhaut entnommen. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Daraufhin konnte die Expression der Gene *Lpa1-Lpa5* und *P2ry5* untersucht werden. Als Kontrolle wurde zum einen genomische DNA und zum anderen die Expression von *Gapdh* untersucht.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten murinen Lpa-Rezeptoren (*Lpa1-Lpa5* und *P2ry5*) in der Maushaut exprimiert sind. Im Gegensatz dazu konnte im murinen Haarfollikel zwar *Lpa1-Lpa3* und *P2ry5*-Expression nachgewiesen werden, nicht aber *Lpa4*- und *Lpa5*-Expression (s. Abb. 6.26). Das Expressionsprofil der murinen Lpa-Rezeptoren entspricht somit dem der humanen LPA-Rezeptoren, da *P2ry5* als einziges Mitglied aus der Gruppe der Lpa-Rezeptoren exprimiert ist, die *Lpa4*, *Lpa5* und *P2ry5* umfasst (s. Abb. 6.19 A und 6.20 B).

¹ Die *wal*^{-/-} DNA-Proben wurden freundlicherweise von Dr. Boris V. Konyukhov (Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt.

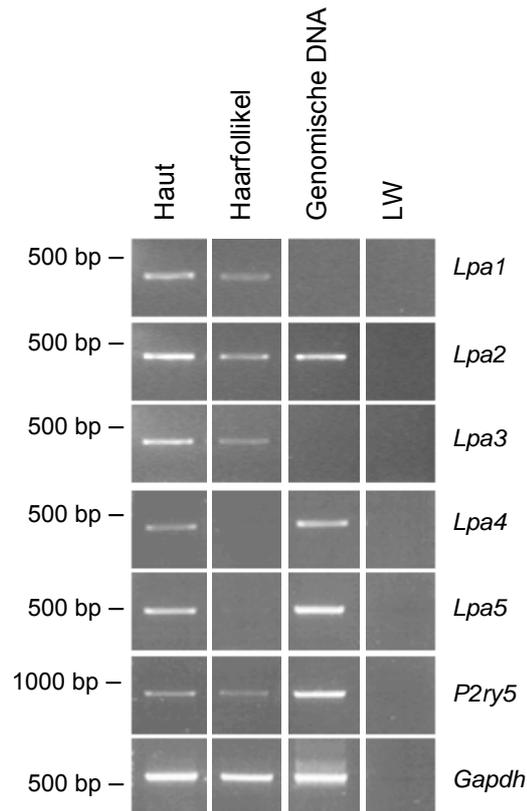


Abb. 6.26: Expression von Lpa-Rezeptoren und Gapdh in Haut und Haarfollikeln bei einer C57/BL6-Wildtyp Maus. Gezeigt ist die Expression von *Lpa1-Lpa5* und *P2ry5* an P338. Als Kontroll-Gen wurde *Gapdh* verwendet. Es ist zu erkennen, dass *Lpa4* und *Lpa5* im Gegensatz zu *Lpa1*, *Lpa2*, *Lpa3* und *P2ry5* nicht im murinen Haarfollikel exprimiert sind. Alle untersuchten Gene sind jedoch in Maushaut exprimiert. Bei Verwendung von genomischer DNA entstand aufgrund der Größe der Amplifikate kein PCR-Produkt für *Lpa1* und *Lpa3*, da sich Introns von 43 kb bzw. 48 kb in der zu amplifizierenden Sequenz befinden.

6.8.3 Herstellung eines Plasmides zur Generierung einer *P2ry5-knockout*-Maus

Aus organisatorischen Gründen ist es uns nicht möglich, Hautbiopsien unserer Patienten aus Saudi-Arabien zu erhalten. Daher wäre eine *P2ry5-knockout*-Maus sehr hilfreich, um die Veränderungen des Haarfollikels, die durch einen *P2ry5*-Ausfall entstehen, im Hautmodell histologisch untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurde ein Plasmid hergestellt, das zur Generierung einer *P2ry5-knockout*-Maus verwendet werden soll. Hierfür wurde die kodierende *P2ry5*-Sequenz, inklusive des 3'-UTRs und des 5'-UTRs, des SV129-Mausstamms mittels PCR amplifiziert. Als Template für die PCRs wurden BAC-DNAs verwendet (BMQ-214N3 und BMQ-235D9, beide von der Firma Geneservice), da die zur Verfügung stehende SV129-DNA aus embryonalen Stammzellen nicht von ausreichender Qualität war. Durch die Primersequenzen wurde das PCR-Produkt beidseitig mit einer *KpnI*-Schnittstelle versehen. Dieses PCR Produkt wurde in den *pJet1.2*-Vektor subkloniert (s. Anhang Abb.

12.2.1; PCR- und Sequenzier-Primer s. Anhang Tab. 12.1.7). Des Weiteren wurden ca. 3 kb große Fragmente der genomischen DNA, welche an den 3'-UTR und den 5'-UTR angrenzen, amplifiziert und ebenfalls subkloniert. Dem 3'-Bereich wurde über die Primer beidseitig eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt, dem 5'-Bereich analog je eine *Sall*-Schnittstelle (s. Anhang Tab. 12.3.2). Anschließend wurden diese Fragmente über die entsprechenden Schnittstellen in den *pDELBOY*-Vektor umkloniert, welcher dann zur Generierung der *knockout*-Maus verwendet werden kann (s. Abb. 6.27 und Anhang Abb. 12.2.5).

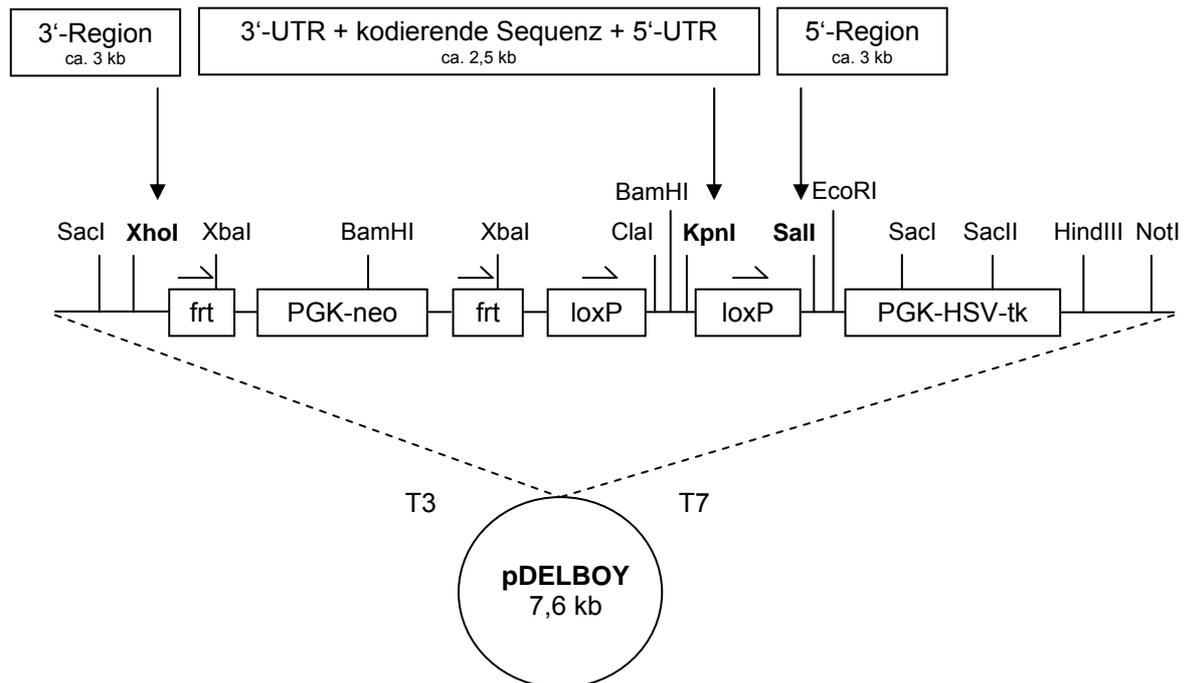


Abb. 6.27: Schematische Darstellung des *pDELBOY*-Plasmides, welches zur Generierung der *P2ry5-knockout*-Maus verwendet werden soll. Die Schnittstellen *XhoI*, *KpnI* und *Sall* sind einzigartig und können deshalb zur Klonierung verwendet werden. Über die *XhoI*-Schnittstelle wird ein ca. 3 kb großes Fragment der murinen 3'-Region des *P2ry5* kloniert, über die *Sall*-Schnittstelle ein ebenfalls ca. 3 kb großes Fragment der murinen 5'-Region des *P2ry5*. Über die *KpnI*-Schnittstelle wird die gesamte kodierende Sequenz inklusive des 3'-UTRs und des 5'-UTRs von *P2ry5* kloniert. Diese Sequenz wird von loxP Stellen flankiert, so dass eine homologe Rekombination stattfinden kann.

Der *pDELBOY*-Vektor² wurde von Dr. Derrick J. Rossi (Rossi *et al.*, 2001) hergestellt und besteht aus einem *Bluescript-Backbone*. Des Weiteren enthält er eine spezielle *multiple cloning site*, welche die Klonierung der drei für die homologe Rekombination erforderlichen Genspezifischen Sequenzen ermöglicht, eine *frt*-flankierte Neomycin-Kassette unter dem Phosphoglycerat-Kinase-Promotor (PGK-neo) zur Positiv-Selektion, ein Herpes simplex Virus Thymidinkinase-Gen unter dem Phosphoglycerat-Kinase-Promotor (PGK-HSV-tk) als negativer Selektionsmarker und zwei Erkennungssequenzen der CRE-Rekombinase („lox-

² Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Schoch-McGovern (Institut für Neuropathologie und Klinik für Epileptologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt.

P“-Erkennungssequenzen). Dieses Konstrukt soll zur Generierung der *knockout*-Maus in embryonale Stammzellen eingebracht werden. Zellen, in denen das *Targeting*-Konstrukt erfolgreich integriert wurde, werden dann in Blastozysten des Mausstammes SV129 injiziert. In heterozygoten „geflochten“ Mäusen wird durch eine Cre/loxP vermittelte Rekombination das Gen deletiert. Dies erfolgt durch ein Kreuzen der „geflochten“ Mäuse mit CRE-exprimierenden Mauslinien. Es empfiehlt sich eine Gewebespezifische Expression, um eine mögliche Letalität zu umgehen. Um eine auf die Haut beschränkte Expression zu erhalten, kann die CRE-Expression z. B. unter die Kontrolle des Keratin 14-Promotors gebracht werden (Gebhardt *et al.*, 2007). Eine andere Möglichkeit zum Zeit- und Gewebespezifischen *knockout* eines Gens bieten Liganden-abhängige Systeme, wie z. B. die Tamoxifen-abhängige CRE-Rekombinase, die gute Resultate speziell in der Haut zeigte (Metzger & Chambon, 2001; Denton *et al.*, 2009).

Es wurde eine *in-vitro* Rekombination durchgeführt (s. Abb. 6.28), um zu überprüfen, ob das klonierte Konstrukt zur Generierung einer *knockout*-Maus tatsächlich geeignet ist. Hierzu wurde das Plasmid zunächst durch einen *HindIII*-Verdau linearisiert und anschließend einem CRE-Rekombinase-Verdau³ unterzogen. Nach jeweils 10 min wurde ein Aliquot entnommen und das Enzym durch eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung entfernt. Die Produkte wurden danach auf ein 0,5 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt.

³ Ein Aliquot des aufgereinigten CRE-Enzyms wurde freundlicherweise von Dr. Michael Peitz (Institut für rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

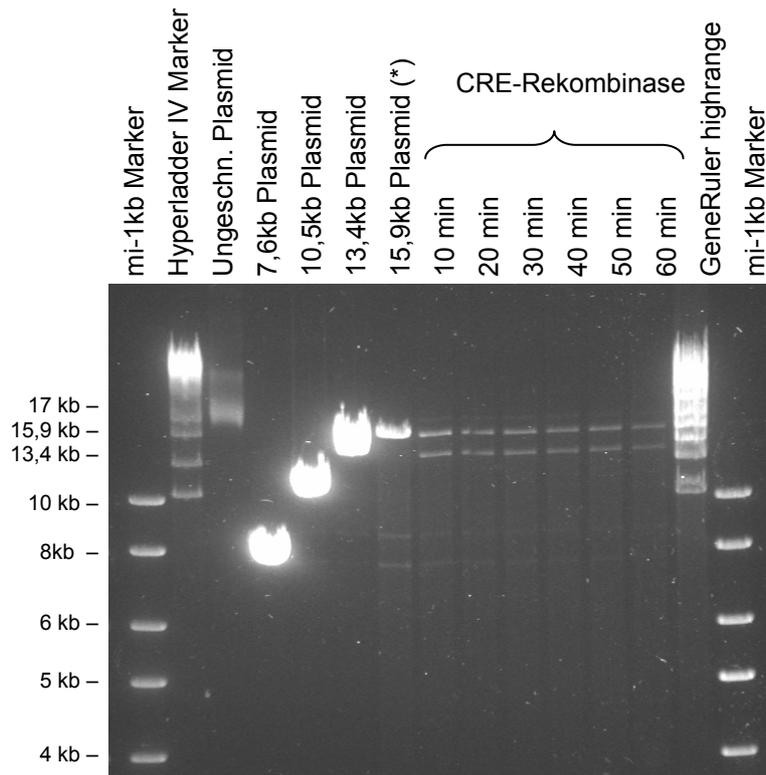


Abb. 6.28: *In-vitro* CRE-Rekombinase-Verdau des *P2ry5-knockout*-Konstrukts. In den beiden äußeren Gelspuren sind unterschiedliche Marker zum Größenvergleich aufgetragen. In der dritten Gelspur ist das ungeschnittene Ausgangsplasmid aufgetragen, in den Spuren 4 bis 6 linearisierte Plasmide unterschiedlicher Größe und in der 7. Gelspur das linearisierte Ausgangsplasmid (*). In den Gelspuren 8 bis 13 ist das mit CRE-Rekombinase behandelte Plasmid nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten dargestellt. Sichtbar ist sowohl das 15,9 kb große Ausgangsplasmid als auch das 13,4 kb große Plasmid, aus welchem das *P2ry5*-Gen durch homologe Rekombination herausgeschnitten wurde.

In Abb. 6.28 ist zu erkennen, dass das *P2ry5*-Gen durch homologe Rekombination aus dem Plasmid durch die CRE-Rekombinase herausgeschnitten wird. Es entstehen somit zusätzlich zu dem 15,9 kb großen Ausgangsplasmid ein 13,4 kb und ein 2,5 kb großes DNA-Fragment. Aufgrund der Größe und Menge des 2,5 kb Fragments war dies im Gelbild nicht zu sehen. Folglich sind die LoxP-Stellen intakt und das Plasmid ist *in-vitro* funktionell. Der *P2ry5-knockout*-Vektor soll anschließend zur Generierung einer *knockout*-Maus verwendet werden, die dann mit verschiedenen analytischen Verfahren phänotypisch und histologisch charakterisiert werden soll (s. Kap. 8).

7. Diskussion

7.1 Kopplungsanalyse, Einengung der Kandidatenregion und Identifizierung der ursächlichen Mutation

Bislang sind noch nicht viele Gene bekannt, die ursächlich für Haarausfall oder Haarwachstumsstörungen sind. Die Erforschung von monogenen Alopezien ist besonders geeignet, um die Pathogenese und Pathophysiologie des Haarwachstums zu verstehen, da Gene identifiziert werden können, die spezifisch für diesen Prozess sind. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb eine autosomal-rezessive Form der Hypotrichosis simplex (HS) aufgeklärt werden. Zur Identifizierung des ursächlichen Gens war bereits vor Beginn der Doktorarbeit eine genomweite Kopplungsanalyse mit den DNA-Proben der untersuchten saudi-arabischen Familie durchgeführt worden. Hierbei konnte ein neuer Genort auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14.11–13q21.33) mit einem maximalen LOD-Score von 3,9 ($\theta=0,0$) identifiziert werden (unveröffentlichte Daten von PD Dr. Regina C. Betz, 2003). Im Jahr 2007 wurde von einer pakistanischen Arbeitsgruppe der gleiche Genort (13q14.11–13q21.32) in zwei großen pakistanischen HS-Familien beschrieben (Wali *et al.*, 2007). Dies bestätigt unsere Kopplungs-Ergebnisse und legt nahe, dass das ursächliche Gen auch in anderen Bevölkerungsgruppen zur Entstehung einer Alopezie beiträgt. Wali *et al.* benannten den neuen Genort mit LAH3 (*localized hereditary hypotrichosis 3*) in Analogie zu den anderen beiden bekannten HS-Genen/Genorten, die von dieser Arbeitsgruppe mit LAH1 und LAH2 bezeichnet werden (*DSG4/LAH1* und *LIPH/LAH2*; Jelani *et al.*, 2008). Wie schon in der Einleitung erörtert (s. Kap. 2.6), gibt es bislang keine allgemeingültige Namensgebung zur Bezeichnung verschiedener Hypotrichosis-Formen. Die momentan verwendeten Begriffe umfassen unter anderem die Bezeichnungen *hypotrichosis*, *hypotrichosis simplex*, *hereditary hypotrichosis* und *localized autosomal recessive hypotrichosis*. Es besteht daher dringender Handlungsbedarf innerhalb der „Haar-Community“, sich auf eine Nomenklatur zu einigen und so die Zuordnung zu und Bezeichnung von Alopezieformen zu erleichtern und zu vereinheitlichen.

Auf den Daten der Kopplungsanalyse aufbauend sollte die Region eingengt werden, um die Zahl der zu untersuchenden Gene zu reduzieren. Hierzu wurden weitere Mikrosatelliten-Marker in den Randbereichen der identifizierten Kandidatenregion auf Chromosom 13 mit den DNA-Proben der HS-Familie 1 typisiert. Auf diese Weise konnte die chromosomale Lokalisation der Rekombination, welche zur Festlegung der Kandidatenregion genutzt wird, eingegrenzt und somit die Kandidatenregion von 34 Mb auf 28 Mb eingengt werden (s. Abb. 6.1 und zum Vergleich Abb. 2.16). Infolgedessen konnte die Anzahl der möglichen Kandidatengene von 82 auf 64 reduziert werden. Bei Expressionsuntersuchungen in Haut

und Haarfollikeln aller 64 Kandidatengene bei gesunden Kontrollpersonen konnte festgestellt werden, dass nur vier Gene nicht exprimiert sind. Diese Gene (*EPSTI1*, *MLNR*, *KPNA3*, *GUCY1B2*) konnten als Kandidatengene ausgeschlossen werden, da eine Involvierung in die Pathophysiologie der Erkrankung unwahrscheinlich ist, weil die entsprechenden Proteine in den untersuchten Geweben nicht gebildet werden. Die Anzahl der möglichen Kandidatengene konnte dadurch auf 60 reduziert werden. Anschließend wurde mit der Kandidatenanalyse begonnen und Individuum II:3 der HS-Familie 1 mittels Sequenzanalyse untersucht. Hierbei wurden zunächst solche Gene präferiert, die sich aufgrund ihrer Funktion der Haut- und Haarentwicklung oder -physiologie zuordnen ließen, wie z. B. Gene des Protocadherin-Gen-Clusters (*PCDH8*, *PCDH9*, *PCDH17*, *PCDH20*), die eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion spielen, oder ein mit dem Vitamin-D-Rezeptor interagierendes Protein (*DRIP36/MED4*), da Mutationen im Vitamin-D-Rezeptor für eine Form der Alopezie (Atrichia congenita) identifiziert wurden (Miller *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren sequenziert (*FOXO1A*, *ELF1*, *TSC22D1*, *GTF2F2*), da Mutationen im *HR*-Transkriptionsfaktor zur Atrichia congenita führen (Ahmad *et al.*, 1998, Cichon *et al.*, 1998). Nachdem in keinem dieser Gene eine homozygote Mutation in der DNA des Individuums II:3 der HS-Familie 1 nachgewiesen werden konnte, wurden die Sequenzen der hypothetischen Proteine und Pseudogene in der Kandidatenregion analysiert, um charakteristische Struktur motive zu finden. Es stellte sich heraus, dass ein putatives Protein (AK057244) Ähnlichkeit zu Trichohyalin zeigt. Bei Trichohyalin handelt es sich um ein Strukturprotein, das ausschließlich in der Haarwurzelscheide exprimiert wird. Allerdings konnte auch in AK057244 keine Mutation nachgewiesen werden, so dass daraufhin systematisch ein Gen nach dem anderen sequenziert werden mußte. Nachdem 37 Gene ausgeschlossen worden waren (s. Anhang Tab. 12.1.3), konnte schließlich eine C>T Transition (c.463C>T) im *P2RY5*-Gen identifiziert werden, welche mit dem Krankheitsphänotyp in der Familie kosegregiert. Die Mutation führt zu einem vorzeitigen Stoppkodon (CAG→TAG) und somit zu einem trunkierten Protein (p.Gln155X). Anschließend wurden 16 weitere Familien und sporadische Fälle unseres HS-Patientenkollektivs, bei denen die Krankheitsursache bislang noch nicht identifiziert worden war, auf Mutationen im *P2RY5*-Gen geprüft. Bei der Sequenzanalyse konnte eine weitere Mutation in zwei ebenfalls aus Saudi-Arabien stammenden HS-Familien (HS-Familie 2 und HS-Familie 3) identifiziert werden. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine 2 bp-Deletion (c.373_374delAA), welche eine Verschiebung des Leserasters zur Folge hat und nach 37 *Missense*-Aminosäuren ebenfalls zur vorzeitigen Termination der Translation führt (p.Lys125AsnfsX37). Da die HS-Familien 2 und 3 die gleiche Mutation tragen, stellte sich die Frage, ob die beiden Familien miteinander verwandt sind und die Mutation somit auf eine Gründermutation (*Foundermutation*) zurückzuführen ist, oder ob beide Mutationen unabhängig voneinander

entstanden sind. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Haplotyp-Analysen mittels eng beieinander liegender genetischer Marker durchgeführt. Vier der untersuchten Mikrosatelliten-Marker wiesen die gleichen Allele in beiden Familien auf. Daher ist davon auszugehen, dass die Familien weitläufig miteinander verwandt sind und die Mutation auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen ist (s. Abb. 6.4). Es handelt sich somit um einen so genannten Gründereffekt (*Foundereffect*).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Sequenzveränderungen um Polymorphismen handeln könnte, wurde die entsprechende Sequenz des *P2RY5*-Gens in 303 Kontroll-DNA-Proben sequenziert, die 184 Deutsche und 119 Individuen aus dem Nahen Osten umfassten. Hierbei konnte keine der beiden Sequenzveränderungen in den Kontrollen nachgewiesen werden. Dies spricht – neben der Tatsache, dass es sich um Stopp-Mutationen handelt, die einen Abbruch des Proteins bewirken und somit meist Krankheitsverursachend sind – für Pathogenität. Diese konnte auch in den darauf durchgeführten funktionellen Untersuchungen bewiesen werden (s. Kap. 7.2 und folgende Kapitel).

7.2 Expression von *P2RY5* und anderen LPA-Rezeptoren

Die Expression von *P2RY5* und zwei Kontrollgenen (*KRT15* und *GAPDH*) wurde zunächst in 17 unterschiedlichen humanen Geweben und Zellen unter Verwendung von kommerziellen *cDNA-panels* untersucht. *P2RY5*-mRNA lag in allen untersuchten Geweben vor, wenn auch teilweise nur in geringen Mengen (s. Abb. 6.5). Zur Verifizierung dieses Befundes und zur Analyse einer größeren Anzahl von Geweben, wurden *Array*-basierte Untersuchungen zur *P2RY5*-Expression mit dem *Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3* durchgeführt. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine schwache, aber ubiquitäre Expression des untersuchten Gens (s. Abb. 6.6). Darüber hinaus wurde auch RNA aus Haut und Haarfollikeln verschiedener Körperregionen (Kopfhaar und Augenbrauen, s. Abb. 6.19) extrahiert und nach erfolgter *cDNA*-Synthese die *P2RY5*-Expression nachgewiesen. Diese Befunde stehen in Einklang mit anderen Studien, welche die ubiquitäre Expression von verschiedenen LPA-Rezeptoren gezeigt haben (Anliker & Chun, 2004). Es stellt sich uns die Frage, warum die Mutation in einem Rezeptor, der ubiquitär exprimiert ist, einen nur auf das Kopfhaar beschränkten Phänotyp verursacht.

Zur Beantwortung dieser Frage war die Identifizierung des *P2RY5*-Liganden von essentieller Bedeutung. Gemäß Kap. 6.7.1 konnte gezeigt werden, dass der *P2RY5*-Rezeptor durch LPA aktiviert wird. Folglich handelt es sich beim untersuchten Protein um einen LPA-Rezeptor. Die Gruppe der LPA-Rezeptoren umfasste bislang fünf Mitglieder (Hecht *et al.*, 1996; An *et al.*, 1998; Bandoh *et al.*, 1999; Noguchi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006). Diese wurden als

LPA1-5 bezeichnet, vor kurzem jedoch in LPAR1-5 (*lysophosphatidic acid receptor 1-5*) umbenannt. Auch der P2Y5-Rezeptor wurde nach der Identifizierung als LPA-Rezeptor analog in LPAR6 (*lysophosphatidic acid receptor 6*) umbenannt. Der Einfachheit halber bleibe ich jedoch in der vorliegenden Arbeit weiterhin bei der alten Schreibweise. Des Weiteren wurde unlängst postuliert, dass zwei weitere Rezeptoren, GPR87 und P2Y10 (Tabata *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2008), Rezeptoren für LPA sind.

Zur Untersuchung der Expression der verschiedenen humanen LPA-Rezeptoren wurde die mRNA aus Haarfollikel-Zellen unterschiedlicher Körperregionen untersucht (s. Kap. 6.7.2). Hierbei zeigte sich, dass in Haarfollikel-Zellen, die aus okzipitaler Kopfhaut isoliert wurden, die Gene *LPA1*, *LPA2*, *LPA3* und *P2RY5* exprimiert sind, nicht jedoch *LPA4* und *LPA5*. Aufgrund der entfernten phylogenetischen Verwandtschaft (s. Abb. 6.20 B), der geringen Sequenzhomologie (s. Abb. 6.18), der *Second Messenger*-Aktivierung und des unterschiedlichen Signaltransduktionsmechanismus (Übersicht in Meyer zu Heringdorf & Jakobs, 2007) ist davon auszugehen, dass LPA1-3 einen Funktionsverlust des P2Y5-Proteins nicht kompensieren können. Es ist aber anzunehmen, dass die stark homologen Proteine LPA4 und LPA5, die zusammen mit P2Y5 eine Subgruppe von LPA-Rezeptoren bilden, einen P2Y5-Funktionsverlust ausgleichen könnten. Diese beiden Proteine sind jedoch nicht in Haarfollikel-Zellen der Kopfhaut exprimiert (s. Abb. 6.19).

In Haarfollikel-Zellen von Augenbrauen hingegen konnte zusätzlich zur *P2RY5*-Expression auch eine *LPA5*-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 6.19). Wahrscheinlich sind diese beiden Proteine redundant in ihrer Funktion und LPA5 übernimmt die Funktion des mutierten, funktionslosen P2Y5-Proteins. Diese Vermutung steht in Einklang mit dem normalen Erscheinungsbild der Augenbrauen bei allen bis auf einen Betroffenen der HS-Familie 1, der eine leichte Ausdünnung der Augenbrauen aufweist (Al Aboud *et al.*, 2002). Leider standen uns von den Betroffenen keine Haarfollikel-Zellen zur Verfügung, so dass wir nicht überprüfen konnten, ob bei dieser Person tatsächlich eine abgeschwächte *LPA5*-Expression in Haarfollikel-Zellen der Augenbrauen vorliegt, was dessen Phänotyp erklären würde. Die Hypothese, dass LPA4, LPA5 und P2Y5 redundant in ihrer Funktion sind, lässt vermuten, dass in allen anderen Geweben, in denen die P2Y5 vermittelte LPA-Signalgebung eine Rolle spielt, zusätzlich entweder *LPA4*, *LPA5* oder ein bislang unbekannter LPA-Rezeptor exprimiert ist. Ein Beispiel hierfür ist die Expression von *LPA4* und *LPA5* in Haut und Lymphozyten (s. Abb. 6.19). Weitere Gewebe wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es konnte jedoch bereits von anderen Gruppen gezeigt werden, dass diese Rezeptoren in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden (Noguchi *et al.*, 2003; Kotarsky *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Dies würde auch erklären, warum die Patienten – abgesehen vom Haarausfall – keine weiteren Auffälligkeiten zeigen.

Ferner wurden die putativen LPA-Rezeptoren GPR87 (Tabata et al., 2007) und P2Y10 (Murakami et al., 2008) auf Expression in Haarfollikeln und Haut untersucht. *P2Y10* zeigte keine Expression in Haarfollikel-Zellen der Kopfhaut, *GPR87* hingegen schon (s. Abb. 6.20 A). Da GPR87 nur entfernt mit P2Y5 verwandt ist (s. Abb. 6.20 B), ist es wahrscheinlich, dass dieser Rezeptor eine andere Funktion und Wirkungsweise hat und den P2Y5-Funktionsverlust in den HS-Patienten nicht kompensieren kann.

7.3 Protein-Analysen des P2Y5-Proteins

7.3.1 Western-Blot-Analysen

Bei der Western-Blot-Analyse handelt es sich um eine biochemische Methode aus dem Bereich der Proteomik, die zum Nachweis von Proteinen (Antigenen) mit Hilfe markierter Antikörper dient. Mit dieser Technik können Aussagen über das ungefähre Molekulargewicht der Proteine gemacht werden oder auch semiquantitative Analysen zum Vorhandensein eines Proteins in bestimmten Proben durchgeführt werden. Sie bietet somit unter anderem die Möglichkeit durch Auswahl spezifischer Antikörper Proteinveränderungen nachzuweisen, die auf Gen-Mutationen beruhen.

Zur Detektion des P2Y5-Rezeptors im Western-Blot wurden verschiedene polyklonale Antikörper gegen P2Y5 verwendet (SP4556P, sc-20126 und sc-31503). Laut den Informationen der jeweiligen Hersteller sollte sc-31503 an die zweite extrazelluläre Domäne des P2Y5-Proteins binden, sc-20126 an eine Peptidkette zwischen den Aminosäuren 121-180 und SP4556P an die C-terminale Domäne. Mit diesen Antikörpern sollte der P2Y5-Rezeptor in immortalisierten Lymphozyten von Individuen der HS-Familie 3 nachgewiesen werden. Diese Zellen tragen die c.373_374delAA-Mutation (p.Lys125AsnfsX37), welche zum *Frameshift* und somit zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz ab Position 125 führt. Expressionsanalysen verschiedener LPA-Rezeptoren haben gezeigt, dass *P2RY5*-mRNA in Lymphozyten vorliegt, dementsprechend sollte das Protein in diesen Zellen synthetisiert werden (s. Abb. 6.5 und 6.19). Für die Experimente wurden Zellen von den Individuen IV:1 (Indexpatient; c.373_374delAA hom.), IV:2 (gesunder Bruder des Indexpatienten; Wildtyp) und III:21 (Mutter des Indexpatienten; c.373_374delAA het.) verwendet. Es ist wahrscheinlich, dass alle drei Antikörper nur das P2Y5-Wildtyp-Protein und nicht das trunkierte Protein detektieren, wobei es nicht auszuschließen ist, dass sc-20126 an die Aminosäuren 121-124 binden könnte (s. Abb. 7.1). Folglich sollte in Probe IV:2 nur das Wildtyp-Protein nachweisbar sein. In Probe III:21 liegt die Mutation im heterozygoten Zustand vor. Hier sollte die halbe Dosis des Wildtyp-Proteins und evtl. das trunkierte Protein bei Verwendung des Antikörpers sc-20126 nachweisbar sein. In Probe IV:1 sollte kein P2Y5-

Protein bzw. im Fall von sc-20126 evtl. das trunkierte Protein nachweisbar sein. Da bei keinem der verwendeten Antikörper ein Unterschied im Bandenmuster der drei untersuchten Proben zu erkennen war, muss davon ausgegangen werden, dass die Antikörper unspezifisch sind und nicht zum Nachweis von P2Y5 verwendet werden können. Dafür spricht auch, dass kein Bandenmuster der verschiedenen Antikörper mit einem der anderen übereinstimmte (s. Abb. 6.10 A-C). Somit wurden jeweils unterschiedliche Proteine durch Antikörper nachgewiesen, die alle gegen ein und dasselbe Protein gerichtet hätten sein sollen. Als Erklärung für die Unspezifität der erworbenen P2Y5-Antikörper könnte die hohe Homologie innerhalb der Gruppe der LPA-Rezeptoren dienen (s. Abb. 6.18 und 6.20 B). Des Weiteren handelt es sich bei den P2Y5-Antikörpern nicht um monoklonale Antikörper, die von einer klonalen B-Lymphozyten-Zelllinie produziert wurden und die sich gegen ein einzelnes Epitop richten. Vielmehr handelt es sich um polyklonale Antikörper, die sich gegen verschiedene Epitope richten und somit auch andere LPA-Rezeptoren oder G-Proteingekoppelte Rezeptoren mit ähnlichen Sequenzmotiven detektieren könnten.

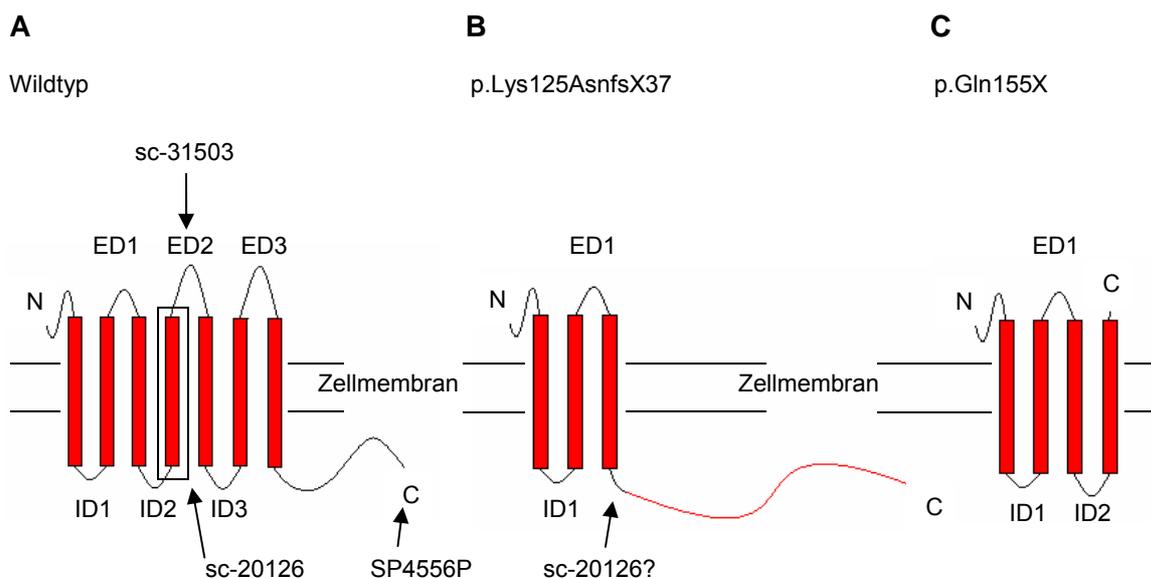


Abb. 7.1: Schematische Darstellung des P2Y5-Wildtyp-Rezeptors (A) und der Mutanten p.Lys125AsnfsX37 (B) und p.Gln155X (C). Die Transmembran-Domänen sind durch rote Säulen gekennzeichnet und die *Missense*-Aminosäuren in p.Lys125AsnfsX37 als dünne rote Linie. Des Weiteren sind die extra- und intrazellulären Domänen (ED/ID), sowie der N- und C-Terminus erkennbar. Im Wildtyp-Protein sind die Epitope durch Pfeile gekennzeichnet, welche durch die Antikörper sc-31503, sc-20126 und SP4556P detektiert werden sollen. Diese Abbildung macht deutlich, dass die verwendeten Antikörper nur zur Detektion des P2Y5-Wildtyp-Proteins und nicht zur Detektion des p.Lys125AsnfsX37-Proteins genutzt werden können, da die zweite extrazelluläre Domäne nicht vorhanden ist.

Zur Lösung dieses Problems wurden Wildtyp und Mutanten in den *pcDNA3.1*-Vektor inkloniert und N-terminal mit einem V5-Epitop fusioniert. Anschließend wurden COS7-Zellen transient mit den Konstrukten transfiziert und P2Y5 durch einen monoklonalen V5-Antikörper detektiert. Die Immundetektion erfolgte mittels einer Kombination aus einem

Standard Western-Blot-Protokoll und dem *WesternBreeze*[®] *Chemiluminescent Immuno-detection System* von Invitrogen (s. Kap. 5.3.2). Hiermit konnten sowohl P2Y5-Wildtyp als auch die Mutanten erstmalig nachgewiesen werden (s. Abb. 6.10 D). Aufgrund der Höhe der Banden lässt sich für das P2Y5-Wildtyp-Protein ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa und für die beiden trankierten Proteine ein Molekulargewicht von ca. 15 und 17 kDa bestimmen. Zusätzlich wurden höhermolekulare Banden im Blot beobachtet, welche auf Homo- oder Heteromere zurückzuführen sein könnten. Die Dimerisierung und Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist vielfach beschrieben (Gomes *et al.*, 2001; Milligan, 2004), ebenso wie ihre Fähigkeit, Hitze- und SDS-resistente Komplexe auszubilden, welche dann Banden auf den entsprechenden Höhen in SDS-PAA Gelen zeigen (Nimchinsky *et al.*, 1997). Höchst wahrscheinlich spielen die Dimerisierung und Multimerisierung eine Rolle bei der Ligandenbindung und der Modulation der Rezeptor-Funktion, wie es für andere Rezeptoren gezeigt werden konnte (Maggio *et al.*, 2003). Die Dimerisierung kann aber auch durch den Liganden selbst hervorgerufen werden (Falsone *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2008). Da COS7-Zellen verschiedene Lipasen wie *LIPH* und *LIPC* exprimieren (Daten nicht gezeigt), ist es wahrscheinlich, dass sie endogenes LPA enthalten, welches die Rezeptor-Dimerisierung hervorrufen kann. Möglicherweise handelt es sich bei den Komplexen auch um Artefakte, welche durch die Überexpression im heterologen Zellsystem zustande kommen. Dagegen spricht, dass die Menge von anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie z. B. die des dimerisierten β_2 -Adrenorezeptors, über einen breiten Bereich von Expressionsleveln unverändert bleibt (Mercier *et al.*, 2002).

Fast alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden durch Phosphorylierung reguliert (Lohse, 1993; Tobin, 2008). Unterschiedliche Phosphorylierungszustände der Proteine könnten ebenfalls für die unterschiedlichen Banden im Western-Blot verantwortlich sein. Erste Anhaltspunkte hierfür könnten durch Analysen mit Antikörpern gegen spezifische Phosphoproteine gewonnen werden. Außerdem wäre es möglich, dass die Überexpression zum Abbau eines Teils der Proteine führt. Die unterschiedlich hohen Banden könnten in diesem Fall ubiquitinierte P2Y5-Proteine darstellen. Diese Hypothesen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Darüber hinaus ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass in den immortalisierten Lymphozyten der HS-Familie 3 nicht ausreichend P2Y5-Protein vorlag, weshalb dieses nicht durch die verwendeten P2Y5-Antikörper detektiert werden konnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Antikörper zudem an Zelllysaten aus transfizierten COS7-Zellen angewendet, bei denen die Proteine durch Anwendung des V5-Antikörpers bereits nachgewiesen werden konnten. Auch hier konnten die P2Y5-Antikörper weder an das Wildtyp-Protein noch an die Mutanten binden. Sie zeigten weiterhin ein identisches Bandenmuster bei den drei Proben (s. Abb. 6.10 E), abweichend von dem bei Verwendung des V5-

Antikörpers (s. Abb. 6.10 D). Eine Detektion von endogenen P2Y5-Rezeptoren in COS7-Zellen ist zwar möglich, allerdings konnten ähnliche Bandenmuster bei Patienten-Lymphozyten gezeigt werden, die nur P2Y5-Wildtyp (IV:2) oder Mutante (IV:1) exprimieren. Die naheliegendste Erklärung ist daher, dass die unspezifischen Banden bei Verwendung der P2Y5-Antikörper auf der Detektion anderer LPA-Rezeptoren beruhen, da diese eine hohe Homologie zueinander aufweisen (s. Abb. 6.18 und 6.20 B). Diese Untersuchungen zeigen folglich, dass die drei polyklonalen Antikörper den P2Y5-Rezeptor nicht spezifisch detektieren. Shimomura *et al.* (2008) verwenden in ihren Western-Blot-Analysen ebenfalls die polyklonalen P2Y5-Antikörper sc-31503 (Shimomura *et al.*, 2008) und SP4556P (persönliche Mitteilung von Dr. Shimomura). Aufgrund fehlender Kontrollen postulieren sie wahrscheinlich fälschlicherweise ein Molekulargewicht von 55 kDa.

7.3.2 *In-vitro* Transkription/Translation

Die *in-vitro* Transkription und Translation wurde als weitere Methode angewendet, um die Ergebnisse der Protein-Analysen zu verifizieren. Bei dieser Technik handelt es sich um ein zellfreies System zur Herstellung von Proteinen anhand einer DNA-Matrize, wobei keine posttranslationalen Modifikationen durchgeführt werden. Die Proteine werden durch Zugabe von L-[³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert, mittels SDS-Page aufgetrennt und nach Trocknung des Gels über Autoradiographie nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden für die Western-Blot-Analysen Proteinlysate aus transient transfizierten COS7-Zellen isoliert und die Proteine nach SDS-Page und Proteintransfer auf eine Membran mittels Antikörpern nachgewiesen.

Mit Hilfe der *in-vitro* Transkription und Translation konnten das P2Y5-Wildtyp-Protein und die trunkierten Proteine p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem konnte die Anzahl der im Western-Blot aufgetretenen zusätzlichen Banden stark reduziert werden (s. Abb. 6.11). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den zusätzlichen Banden in den Western-Blot-Analysen sehr wahrscheinlich um posttranslational modifizierte Proteine oder SDS-resistente Di- bzw. Multimere handelt. So könnte ein Teil der zellulären Antworten des P2Y5-Rezeptors durch Heterodimere, bestehend aus P2Y5 und einem zusätzlichen Rezeptor, hervorgerufen worden sein.

7.3.3 Immunfluoreszenz-Analysen

Mittels Immunfluoreszenz-Analyse kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen durch entsprechende Fluoreszenz-markierte Antikörper in einer Zelle dargestellt werden. Durch zusätzliche Anwendung von ebenfalls Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen Proteinmarker für bestimmte Zellkompartimente kann eine Kollokalisierung dargestellt und somit das zelluläre Kompartiment des untersuchten Proteins ermittelt werden. Es war zu vermuten, dass das P2Y5-Wildtyp-Protein als Membranprotein in der Zellmembran lokalisiert ist. Untersuchungen mittels V5- und Cadherin-Antikörpern, einem Marker für Zellmembranen, zeigten, dass das Wildtyp-Protein in der Zellmembran von transient transfizierten COS7-Zellen lokalisiert ist (s. Abb. 6.12 A). Nach Färbung der Mutanten mit einem V5-Antikörper konnte eine netzartige Struktur detektiert werden, welche sich an den Zellkern anlagert und Teile des Zytoplasmas durchzieht. Dies deutet darauf hin, dass die trunkierten P2Y5-Proteine im ER lokalisiert sein könnten. Mittels Kofärbung durch einen PDI-Antikörper – einem Marker für das ER – konnte bewiesen werden, dass die P2Y5-Mutanten im ER akkumulieren (s. Abb. 6.12 B und C). In Übereinstimmung mit Arbeiten an anderen mutierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigen diese Ergebnisse, dass der Membrantransport der trunkierten Proteine gestört ist (Cogé *et al.*, 1999). Folglich können die P2Y5-Mutanten das extrazelluläre Signalmolekül nicht binden, welches sich normalerweise an den in der Membran sitzenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor anlagert und diesen aktiviert. Demzufolge kann auch die Signaltransduktionskaskade nicht in Gang gesetzt werden, so dass davon auszugehen ist, dass die Mutanten nicht funktionell sind.

7.4 Identifizierung des P2Y5-Liganden

Bei dem P2Y5-Protein handelt es sich um ein 7-Transmembran-Domänen-Protein (s. Abb. 6.8 und 6.9). Dies legt die Vermutung nahe, dass P2Y5 zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Hierbei handelt es sich um Makromoleküle, welche die Aufgabe haben, einen biologischen Wirkstoff, den so genannten Liganden, an sich zu binden. Diese Bindung wird in einen Effekt, also eine Änderung der Zellfunktion, umgesetzt. Im Fall der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren geschieht dies – wie der Name schon sagt – über Bindung an G-Proteine, welche in die meisten Signalwege der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eingebunden sind und die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang setzen.

Ursprünglich wurde berichtet, dass der P2Y5-Rezeptor extrazelluläre Nukleotide als Liganden binde (Webb *et al.*, 1996). Daher leitet sich auch der Name *G protein-coupled purinergic receptor P2Y5* ab. In weiteren Untersuchungen konnte dies jedoch nicht bestätigt

werden (Li *et al.*, 1997; von Kügelgen, 2006). Somit handelte es sich um einen Rezeptor mit bislang unbekannter Funktion und unbekanntem Liganden, der deshalb als so genannter Orphan-Rezeptor bezeichnet wurde. Aus diesem Grund war es sowohl für das Verständnis der Wirkungsweise des Rezeptors und der Pathophysiologie von HS als auch im Hinblick auf eine Wirkstoffentwicklung für therapeutische Anwendungen von enormer Bedeutung, den endogenen Liganden zu identifizieren. Diese Arbeiten wurden von Prof. Ivar von Kügelgen ausgeführt. Zur Identifizierung eines Liganden stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung (Siehler, 2008; Yin *et al.*, 2009). Prof. von Kügelgen entschied sich für den CRE-Luziferase Reporter-Gen-Assay. Hierbei handelt es sich um eine sensitive und einfache Methode, Änderungen der cAMP-Konzentration nach Zugabe eines potentiellen Liganden über Reporter-Gen-Aktivierung und Lichtemission der Luziferase zu messen. Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Suche des Liganden ist ein Einfluss des aktivierten Rezeptors auf Änderungen der Promotoraktivität, im Falle des CRE-Promotors in der Regel durch Änderungen der zellulären cAMP-Konzentration durch Kopplung an die entsprechenden G-Proteine (s. auch Kap. 7.6). Dies traf auf den P2Y5-Rezeptor zu und so wurden keine weiteren Assays durchgeführt, die andere *Second Messenger* detektieren.

Mit Hilfe des Reporter-Gen-Assays wurden zwanzig verschiedene Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (s. Anhang Tab. 12.1.4). Dabei konnte oleoyl-L- α -Lysophosphatidsäure (LPA) als Ligand des P2Y5-Rezeptors identifiziert werden. Nach Zugabe von unterschiedlichen Substanzmengen für 3 h zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Luziferase und somit des P2Y5-Rezeptors (s. Abb. 6.13). Für Kontroll-Experimente wurden Flp-In-CHO-Zellen stabil mit dem humanen P2Y12-Rezeptor transfiziert. Hierbei handelt es sich um einen G_i-gekoppelten Rezeptor, der durch ADP aktiviert wird. Er wird auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert und ist an der Regulation der Blutgerinnung beteiligt (Hollt *et al.*, 2001). Als weitere Negativ-Kontrolle wurden Flp-In-CHO-Zellen stabil mit dem trunkierten P2Y5-Protein p.Lys125AsnfsX37 transfiziert. LPA-Gabe führte in beiden Zelllinien zu keinem Effekt (s. Abb. 6.15 A und B). Infolgedessen wird die gemessene Luziferase-Aktivität durch den rekombinanten P2Y5-Wildtyp-Rezeptor und nicht durch einen endogenen Rezeptor vermittelt. Darüber hinaus wird deutlich, dass die p.Lys125AsnfsX37-Mutation nicht nur zu einer Verringerung, sondern zu einer vollständigen Elimination der P2Y5-Aktivität führt. Die gemessene Luziferase-Aktivität nach LPA-Gabe ist sowohl mit der Lösungsmittel-Kontrolle, als auch mit der Luziferase-Aktivität von P2Y12-transfizierten Zellen vergleichbar. Folglich kann entweder keine Ligandenbindung an den trunkierten Rezeptor stattfinden oder das in die Signalgebung involvierte G-Protein kann nicht an den Rezeptor binden. Beides hat zur Folge, dass die Signaltransduktion unterbrochen wird. Immunfluoreszenz-Analysen haben bereits gezeigt, dass die trunkierten Proteine nicht in der Zellmembran, sondern im ER lokalisiert sind (s.

Abb. 6.12 B und C). Folglich ist davon auszugehen, dass der Ligand nicht an den Rezeptor binden kann. Ferner stellt sich aber die Frage, ob die Mutanten prinzipiell in der Lage sind, LPA zu binden. Hierzu wurden Liganden-Bindungsstudien von Prof. Ivar von K ugelgen und Prof. Gerhard J. Molderings durchgeführt, die außerdem zur Verifizierung der LPA-Bindung dienen können. Bei den an HEK-Zellen durchgeführten Bindungsstudien zeigte sich, dass sowohl P2Y5-Wildtyp als auch beide trunkierten Rezeptoren in der Lage sind, LPA als Liganden zu binden (Pasternack *et al.*, 2008).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durchspannen die Plasmamembran in Form von sieben α -Helices. Liganden können in eine Vertiefung, die die sieben α -Helices durch ihre Anordnung bilden, auf der extrazellulären Seite des Rezeptors binden, oder auch an eine N-terminale Liganden-Bindungs-Domäne (Chauhan *et al.*, 2005). Untersuchungen am LPA1-Rezeptor haben erkennen lassen, dass die Transmembran-Domäne 3 eine essentielle Rolle bei der Ligandenbindung spielt (Wang *et al.*, 2001). Die Ligandenbindung könnte also möglicherweise auch im Falle des P2Y5-Rezeptors durch diese Domäne vermittelt werden, welche sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 vorhanden ist (s. Abb. 6.9 und 7.1). Um Näheres zur Ligandenbindung zu erfahren, könnten in zukünftigen Experimenten spezifische Sequenzmotive des Rezeptors durch Mutagenese verändert und dann die Ligandenbindung untersucht werden.

7.5 Versuche zur LPA-Signaltransduktion

Die Identifizierung des P2Y5-Liganden LPA trägt fundamental zum Verständnis der Pathophysiologie von HS bei. LPA stellt das Bindeglied zwischen zwei autosomal-rezessiv vererbten HS-Formen dar, die durch Mutationen im *LIPH*- und *P2RY5*-Gen verursacht werden. *LIPH* kodiert das Enzym Lipase H (LIPH), eine membrangebundene Phospholipase. Phospholipasen stellen aus Phosphatidsäure (PA) Lysophosphatidsäure (LPA) und eine freie Fettsäure her. Die genaue physiologische Funktion von LIPH oder dessen Metaboliten beim Haarwachstum wurde jedoch bislang nicht weiter untersucht und blieb somit ungeklärt. Aufgrund der neuen Erkenntnisse zum P2Y5-Protein ist es höchst wahrscheinlich, dass die Lipase H aus Phosphatidsäure unter Abspaltung einer Fettsäure LPA herstellt, welche dann wiederum den P2Y5-Rezeptor aktiviert (s. Abb. 7.2).

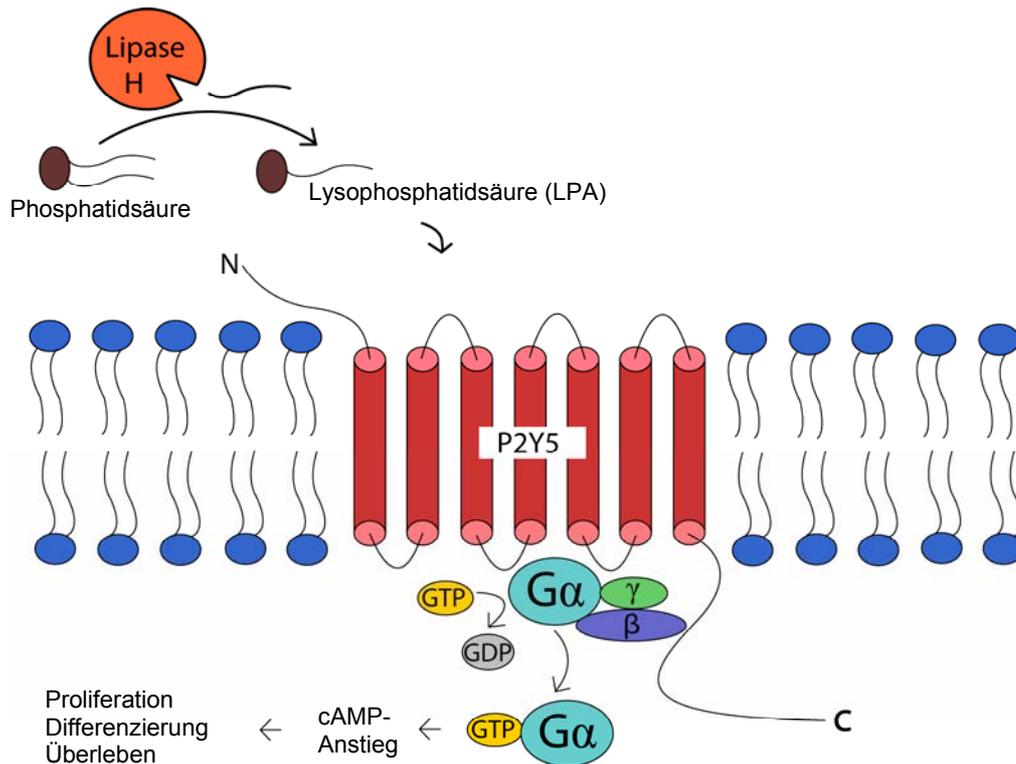


Abb. 7.2: Schematische Darstellung des LPA-Signaltransduktionsweges über den P2Y5-Rezeptor. Das Enzym Lipase H wandelt Phosphatidsäure unter Abspaltung einer Fettsäure in LPA um, woraufhin dieses den G-Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y5 aktiviert. Nach Aktivierung des heterotrimeren intrazellulären G-Proteins könnte es zur Aktivierung der Adenylatzyklase kommen und über bislang noch nicht genau definierte Signaltransduktionswege wahrscheinlich zur Proliferation, Differenzierung und dem Überleben der Haarfollikel-Zellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Assay entwickelt. Hierbei wurde der Luziferase-Assay durch einen vorgeschalteten Versuch erweitert, bei dem in *LIPH*-transfizierten Flp-In-CHO-Zellen (Wildtyp und verschiedene Mutanten: c.527_628del, c.403_409dup und c.280_369dup) aus dem Substrat Phosphatidsäure unter Abspaltung einer Fettsäure LPA synthetisiert wird. Der Zellüberstand dieser Zellen wird dann auf P2Y5- und CRE-luc-exprimierende Zellen gegeben. Nach dreistündiger Inkubation wird die Aktivierung der Luziferase mittels Lumineszenzmessung bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass der Zellüberstand von Zellen, welche das *LIPH*-Wildtyp-Protein exprimieren, signifikant mehr P2Y5-Rezeptor-Aktivierung im Reporter-gen-Assay aufweisen als Zellüberstände von Zellen, die mit den mutierten *LIPH*-Konstrukten transfiziert wurden. Letztere zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied sowohl im Vergleich zu Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, als auch im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Phosphatidsäure stimuliert, sondern nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden (s. Abb. 6.21).

Zur Verifizierung dieses Befundes wurde eine Bestimmung der Lipase H-Enzymfunktion von *LIPH*-exprimierenden Zellen mittels PED-A1, einem fluorogenen Phospholipase-Substrat, durchgeführt. PED-A1 dient eigentlich zur Messung der Enzymaktivität von Phospholipase A1 (PLA1). Aufgrund der Ähnlichkeit von *LIPH* zu PLA1, im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Triglycerid-Lipase-Familie (Jin *et al.*, 2002), wurde eine ähnliche Substratspezifität angenommen. Wie in Abb. 6.23 zu erkennen ist, konnten die Ergebnisse des erweiterten Luziferase-Assays bestätigt werden. Hierbei unterscheidet sich das *LIPH*-Wildtyp-Protein statistisch signifikant sowohl vom Leerplasmid als auch von allen drei untersuchten *LIPH*-Mutanten. Dieser Effekt ist nach 10 min, 30 min und 2 h nachweisbar, wobei die Unterschiede von Wildtyp zu Leerplasmid und allen drei Mutanten nach 30 min am deutlichsten sind. Messungen mittels bis-BODIPY[®] FL C11-PC, welches laut Herstellerangaben zur Messung der PLA1- und PLA2-Aktivität genutzt werden kann, bestätigten diese Ergebnisse nicht. Dies ist wahrscheinlich auf eine unzureichende oder nicht vorhandene Substratspezifität von *LIPH* gegenüber bis-BODIPY[®] FL C11-PC zurückzuführen (s. Abb. 6.25).

Zusammenfassend dienen die erweiterten Luziferase-Assays und die Experimente mittels PED-A1 als pharmakologischer und biochemischer Nachweis, dass die Lipase H und der P2Y5-Rezeptor dem gleichen Stoffwechselweg angehören. Ferner kann die Aussage getroffen werden, dass auf die Umsetzung von Phosphatidsäure zu LPA durch die Lipase H direkt die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors P2Y5 folgt (s. Abb. 7.2). Über die Funktion und Wirkung dieser beiden molekularen Komponenten des LPA-Signaltransduktionsmechanismus herrscht nun weitgehend Klarheit. Zukünftig müssen weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden um zu verstehen, wie diese Vorgänge zeitlich und räumlich im Haarfollikel koordiniert werden und welche Rolle sie im Gesamtkontext des Organismus spielen.

7.6 Welches G-Protein könnte in die Signaltransduktion involviert sein?

Nach der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Liganden findet eine Konformationsänderung des Rezeptors statt. Diese hat eine Aktivierung des intrazellulär gebundenen heterotrimeren G-Proteins zur Folge, wodurch es zu einem Austausch von GDP durch GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit und zur Dissoziation des β - γ -Dimers kommt. Die Aktivierung des G-Proteins führt zur Aktivierung des entsprechenden Effektor-Proteins. Das G-Protein bleibt so lange im aktiven Zustand, bis GTP zu GDP hydrolysiert wird. Nach der Hydrolyse von GTP kommt es zur Inaktivierung des G-Proteins und Rückkehr in den

Grundzustand (Offermanns, 2003). Aber welches G-Protein könnte an den P2Y5-Rezeptor koppeln?

G α -Proteine werden in folgende Klassen unterteilt: G α_i , G α_s , G α_{12} und G α_q . G-Proteine der G α_i -Familie sind mittels Pertussis-Toxin (PTX) inhibierbar. Nach PTX-Gabe kommt es zu einer ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit, die eine Kopplung an den jeweiligen G-Proteingekoppelten Rezeptor verhindert (Locht & Antoine, 1995). Die inhibitorischen G-Proteine G α_{1-3} , G α_0 und G α_z inhibieren die Adenylatzyklase-Aktivität. Wenn P2Y5-exprimierende Zellen mit PTX behandelt wurden, zeigte sich in unseren Experimenten nach Stimulierung des Rezeptors mit LPA eine erhöhte Luziferase-Aktivität (s. Abb. 6.16). Durch diese Ergebnisse gehen wir davon aus, dass der P2Y5-Rezeptor in den von uns untersuchten Zelllinien nicht an ein G α_i -Protein koppelt, ansonsten müsste es nach PTX-Gabe zur Blockierung der P2Y5-Signaltransduktionskaskade kommen. Die erhöhte Luziferase-Aktivität nach Zugabe von PTX könnte dadurch zustande kommen, dass zusätzlich zu den P2Y5-Signalen auch Signale jener Adenylatzyklase-stimulierenden G-Proteine gemessen werden, denen sonst G α_i -Proteine entgegenwirken. Allerdings konnte von einer anderen Arbeitsgruppe ein Anstieg von intrazellulärem Kalzium in CHO- und hBRIE 380i-Zellen (Darmepithelzellen) nach LPA-Stimulation nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit G $\alpha_{\Delta 6qj5myr}$ kotransfiziert wurden (Lee *et al.*, 2009). Außerdem hemmte PTX die Phosphorylierung von ERK1/2 nach P2Y5-Rezeptor-Aktivierung, was für eine Involvierung von G α_i in diesen Zelllinien spricht (Lee *et al.*, 2009).

G-Proteine der G α_s -Familie werden durch Cholera-Toxin konstitutiv aktiviert und stimulieren ihrerseits Adenylatzyklasen, was einen Anstieg des intrazellulären cAMPs zur Folge hat (Cassel & Selinger, 1977). Ausserdem sind alle neun in Säugetieren vorkommenden Adenylatzyklasen (ADCY1-9) durch den Wirkstoff Forskolin direkt aktivierbar. Hierbei handelt es sich um ein pflanzliches Diterpen, welches aus Harfenkraut (*Coleus forskohlii*) gewonnen werden kann (Lindner *et al.*, 1978). Wenn P2Y5-exprimierende Zellen durch Forskolin stimuliert wurden, führte die Gabe von LPA – zusätzlich zur Forskolin-vermittelten Aktivierung der Adenylatzyklasen – zur Stimulierung der Adenylatzyklasen und dadurch zu einem Anstieg des intrazellulären cAMPs (s. Abb. 6.17). Folglich ist eine Kopplung des P2Y5-Rezeptors an ein G α_s -Protein denkbar. Des Weiteren sprechen unsere Ergebnisse für eine Beteiligung von cAMP in der Signaltransduktion nach P2Y5-Aktivierung.

Die erst kürzlich beschriebenen G-Proteine G α_{12} und G α_{13} gehören zur G $_{12}$ -Familie. Beide aktivieren die kleine GTPase Rho, die downstream zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und Phospholipase D (PLD) führt (Offermanns, 2003; Kurose, 2003). Kürzlich konnte von einer japanischen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass P2Y5 an G $\alpha_{12/13}$ koppelt und Rho-abhängige Veränderungen der Zellmorphologie auslöst (Yanagida *et al.*,

2009). Diese Beobachtung kann mit unseren Ergebnissen in Einklang gebracht werden, da CRE nicht nur durch cAMP, sondern auch durch Rho aktiviert wird (Sordella *et al.*, 2002).

G-Proteine der $G\alpha_q$ -Familie koppeln an eine der vier Phospholipase C-Isoformen ($PLC\beta_{1-4}$) und führen so zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und der Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium. In RH7777- und B103-Zellen, die stabil mit dem P2Y5-Rezeptor transfiziert wurden, konnte nach LPA-Gabe keine intrazelluläre Freisetzung von Kalzium nachgewiesen werden (Yanagida *et al.*, 2009).

In Bezug auf die oben dargestellten Daten ist zu berücksichtigen, dass ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor Spezifität gegenüber einem oder mehreren G-Proteinen aufweisen kann. Dies erschwert die Zuordnung zu einem speziellen G-Protein. Es können verschiedene Kopplungskombinationsmöglichkeiten entstehen, z. B. $G\alpha_q/G\alpha_{12}$, $G\alpha_i/G\alpha_{12}$ oder $G\alpha_i/G\alpha_q/G\alpha_{12}$. Systematische Studien zu Kopplungsprofilen gibt es bislang nur für wenige Rezeptoren (Riobo & Manning, 2005). Darüber hinaus koppeln manche Rezeptoren nur an bestimmte Mitglieder einer G-Protein-Subfamilie. So entsteht ein hochkomplexes Signaltransduktionsgefüge, welches sich aus dem spezifischen Expressionsmuster eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors und der verschiedenen G-Proteine, dem individuellen G-Protein-Kopplungsprofil und den verschiedenen Effektorsystemen zusammensetzt. Dies erklärt auch die z. T. kontroversen Ergebnisse in Bezug auf die Signaltransduktion des P2Y5-Rezeptors, die durch die Untersuchung verschiedener Zelllinien gewonnen wurden. Des Weiteren kann nach der Aktivierung eines G-Proteins sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer zur Aktivierung eines Effektors fähig sein und somit nur ein Teil der zellulären Signale erfasst worden sein (Offermanns, 2003). Aufgrund der bisherigen Untersuchungen kann daher momentan keine definitive Aussage über das/die von P2Y5 bevorzugt aktivierte/n G-Protein/e gemacht werden. Möglicherweise bestehen auch in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Haupt- und Nebensignaltransduktionswege. Ob in den entsprechenden Studien ein Haupt- oder lediglich ein Nebenweg detektiert wurde, kann aufgrund der bislang durchgeführten Untersuchungen noch nicht ermittelt werden.

7.7 Effektoren der G_s -Proteine und mögliche Signaltransduktion

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, könnte es nach Aktivierung des P2Y5-Rezeptors und des entsprechenden G-Proteins zur Stimulation der membrangebundenen Adenylatzyklase kommen, welche ATP in cAMP umwandelt. Das so entstandene cAMP könnte dann an die Proteinkinase A (PKA) binden und diese aktivieren. Die PKA liegt in ihrer inaktiven Form als Tetramer vor, welches aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten besteht. Durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten löst sich das

Tetramer und es entstehen neben den beiden regulatorischen Untereinheiten je zwei freie und somit katalytisch aktive Untereinheiten. Diese katalysieren durch ihre Serin/Threonin-Kinaseaktivität den Transfer einer Phosphatgruppe vom ATP auf ein Serin oder Threonin eines anderen Proteins, das dadurch phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind wichtige Komponenten der zellulären Signalweiterleitung. Durch den Phosphorylierungszustand kann das entsprechende Protein aktiviert und inaktiviert werden, es kann für Bindungspartner zugänglich gemacht werden oder seine subzelluläre Lokalisierung ändern. Die verschiedenen Effekte von cAMP auf unterschiedliche Arten von Zellen kommen durch das Repertoire an Proteinen zustande, das durch die jeweilige Zelle synthetisiert wird und somit der PKA als Substrat zur Verfügung steht.

cAMP kann durch Kontrolle der Expression von Genen auch Langzeitwirkungen auf Zellen ausüben. Dies geschieht z. B. durch Phosphorylierung des CREB-Proteins (*Cyclic-AMP Response Element-Binding protein*), wodurch dieses in den Zellkern gelangen und an bestimmte Sequenzmotive der DNA binden kann (*cAMP response elements*). Diese Bindung hat die Transkription von bestimmten Genen zur Folge, wodurch es zur RNA-Synthese und Translation der entsprechenden Proteine kommt (Yamamoto *et al.*, 1988). In Bezug auf das Haarwachstum, bei dem es sich um einen kontinuierlichen Prozess und nicht um eine schnelle Anpassung gegenüber einem externen Stimulus handelt, scheint eine CRE-vermittelte Langzeitwirkung von LPA gut vorstellbar.

Um zu überprüfen, ob die aufgestellten Hypothesen zur Signaltransduktion zutreffen, könnten z. B. P2Y5-exprimierende Zellen mit LPA oder dessen Lösungsmittel behandelt werden. Danach könnten die Zelllysate durch Western-Blot-Analysen mittels Antikörpern gegen PKA untersucht werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen könnte so festgestellt werden, ob das Protein als inaktives Tetramer vorliegt oder ob es nach LPA-Zugabe zur Dissoziation des Komplexes kommt und katalytische sowie regulatorische Einheiten vorliegen. Die Untersuchung der anschließend stattfindenden Phosphorylierung des Zielproteins wird sich als schwierig erweisen, da eine große Anzahl von Proteinen in Frage kommt. Möglicherweise liefert die Aufklärung weiterer HS-Familien durch Identifikation von Mutationen in bislang unbekanntem Genen Hinweise auf die weitere Signaltransduktion.

7.8 Der P2Y5-Rezeptor als therapeutisches Target zur Regulation des Haarwachstums?

Bislang besteht keine Möglichkeit zur Therapie von HS. Aus diesem Grund ist es entscheidend, Gene zu identifizieren, die ursächlich für die Ausprägung der Erkrankung sind. Ist die Mutation bei einem Patienten identifiziert, so kommt zur Verbesserung des

Krankheitsbildes nur eine Gentherapie in Frage. Wenn jedoch darüber hinaus weitere Gene und Proteine bestimmt werden können, die in die Pathophysiologie des Haarausfalls involviert sind, wie z. B. Bindungspartner oder Proteine, die eine Rolle für die weitere zelluläre Signalgebung spielen, so kann dies die Entwicklung von zukünftigen Therapien vorantreiben. Darüber hinaus kann das Verständnis der molekularen Prozesse, die das Haarwachstum kontrollieren, zu neuen Therapieansätzen für die häufigen Alopezie-Formen, wie der androgenetischen Alopezie oder der Alopecia areata, führen. Für diese Erkrankungen gibt es momentan ebenfalls keine befriedigende Therapie. Die Nachfrage nach wirksamen Mitteln ist hier sehr groß, was die florierende „Haar-Industrie“, die Milliarden-Umsätze mit oft unbefriedigenden oder sogar wirkungslosen Mitteln macht, erkennen lässt.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen eine große Superfamilie von Proteinen dar, die mit verschiedenen heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen, kurz G-Proteinen, interagieren. G-Proteine leiten das Signal des Rezeptors an ein oder mehrere Effektor-Proteine weiter, z. B. an Adenylatzyklasen, Phospholipasen, Phosphodiesterasen oder Ionenkanäle. Aufgrund ihrer großen Anzahl und physiologischen Bedeutung spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine wichtige Rolle als Wirkstoff-Ziele (*Drug targets*). Es ist daher nicht verwunderlich, dass ein Großteil der meistverkauften Medikamente auf der Wirkung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beruhen.

Durch die in Kap. 6.7.1 geschilderten Experimente konnten wir zeigen, dass der G-Protein-gekoppelte Rezeptor P2Y5 durch LPA aktivierbar ist. Hierbei handelt es sich um einen körpereigenen Botenstoff, der mittels verschiedener Phospholipasen aus dem Substrat Phosphatidsäure hergestellt werden kann. Haarfollikel-Zellen exprimieren nur eine einzige Phospholipase, die so genannte Lipase H (Kazantseva *et al.*, 2006). In der vorliegenden Dissertation konnte erstmalig der pharmakologische Nachweis erbracht werden, dass das Stoffwechselprodukt der Lipase H den P2Y5-Rezeptor aktiviert (s. Kap. 6.7.3). Bislang wurde nicht direkt nachgewiesen, dass eine Aktivierung oder Überstimulation des P2Y5-Rezeptors tatsächlich zu vermehrtem Haarwachstum beim Menschen führt. Takahashi *et al.* (2003) konnten allerdings zeigen, dass die Anwendung von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure sowohl *in-vitro* wie auch *in-vivo* zu einer Beschleunigung des Haarwachstums bei Mäusen führt. Basierend auf diesen Erkenntnissen erscheint es möglich, dass Phosphatidsäure oder Lysophosphatidsäure auch zur Beschleunigung oder Vermehrung des Haarwachstums beim Menschen genutzt werden können, da sich der murine und der menschliche Haarzyklus sehr ähnlich sind (Porter, 2003). Des Weiteren kann LPA als Leitsubstanz in Wirkstoff-Screenings dienen, um weitere Substanzen zu identifizieren, welche die Aktivität des P2Y5-Rezeptors verändern und somit zur Beeinflussung des Haarwachstums beim Menschen genutzt werden können. So könnte durch eine

Überstimulation des Rezeptors das Haarwachstum bei Haarausfall stimuliert werden oder durch Blockierung des Rezeptors das Haarwachstum bei exzessivem oder ungewolltem Haarwuchs vermindert werden. Möglicherweise ergibt sich hieraus die Chance, durch Stimulation des LIPH-/P2Y5-Pathways auch Patienten mit anderen Haarerkrankungen zu helfen, wie z. B. bei der Alopecia areata oder der weit verbreiteten androgenetischen Alopezie. Um Aussagen diesbezüglich treffen zu können, müssen aber zunächst weitere Experimente und Untersuchungen durchgeführt werden, darunter Wirkungsstudien, klinische Studien etc.

Für HS-Patienten, die eine Mutation im *LIPH*-Gen tragen, zeigen die in Kap. 6.7.1 und 6.7.3 erzielten Resultate vermutlich in der Tat eine Therapie-Möglichkeit auf. Bei diesen Patienten kann in Haarfollikel-Zellen Phosphatidsäure nicht in LPA umgewandelt werden, da hier keine funktionelle Phospholipase exprimiert wird. Durch äußerliche Anwendung einer LPA-Lösung könnte dieses Defizit ausgeglichen und der P2Y5-Rezeptor in Haarfollikel-Zellen stimuliert werden. Dies könnte die unterbrochene Signaltransduktionskaskade wieder aktivieren, was letztendlich zum vermehrten Haarwachstum führen sollte. Bei Patienten mit P2Y5-Mutation hingegen wird die Verabreichung von LPA nicht helfen, da der P2Y5-Rezeptor nicht funktionell ist und somit die LPA-Signaltransduktion unterbrochen ist.

Grundlage für die äußerliche Anwendung eines Wirkstoffes wie LPA oder dessen Analoga ist der Substanztransport in den Haarfollikel. Die Einlagerung von Substanzen in den Haarfollikel konnte durch verschiedene Farbstoffe und anschließende histologische Untersuchungen von mehreren Arbeitsgruppen demonstriert werden. Hierbei beeinflussten viele Parameter den transfollikulären Transport, darunter Substanzgröße und -eigenschaften, Follikeldichte, Trägersubstanz, Hauteigenschaften der zu behandelnden Körperstelle, Temperatur etc. (Lauer *et al.*, 1995; Rougier *et al.*, 1986). Für einen zielgerichteten Transport von Makromolekülen in den Haarfollikel erwiesen sich Liposomen als besonders effektiv (Weiner, 1998). Die *on-line* Visualisierung stellt eine gute Methode zur zeitabhängigen Visualisierung des Diffusionsprozesses von lipophilen Modellsubstanzen in den Haarfollikel und die Hautoberfläche an frischen Biopsien menschlicher Kopfhaut dar. So konnte mittels eines auf die Hautoberfläche aufgetragenen Bodipy-Fluorophors ein Substanztransport in den Haarfollikel nachgewiesen werden, insbesondere in den Haarkanal und die Kutikula (Grams *et al.*, 2005). Da es sich bei LPA ebenfalls um eine lipophile Substanz handelt, ist ihr Eindringen in den Haarfollikel durchaus denkbar. Hierfür sprechen auch die an Mäusen durchgeführten Experimente von Takahashi und Mitarbeitern im Jahre 2003. Talg, der durch die mit den Haarfollikeln assoziierten Talgdrüsen abgesondert wird, könnte die Absorption von lipophilen Wirkstoffen begünstigen, indem er einen lipoiden Zugang ermöglicht (Ebling *et al.*, 1991). Eines der größten Probleme wird hierbei sein, die entsprechenden Substanzen gezielt in den Haarfollikel einzuschleusen, um unerwünschte Nebenwirkungen zu verhindern.

Als geeignetes Tier-Modell für Untersuchungen zum transfollikulären Transport hat sich das Meerschweinchen herausgestellt, da die Haut hinter dessen Ohren keine Haarfollikel aufweist (Wahlberg, 1968). Somit lässt sich in ein und demselben Versuchstier durch Applikation von Substanzen auf verschiedene Körperstellen der Anteil an transfollikulärem und transepidermale Transport vergleichen.

Um unerwünschte Nebenwirkungen auf Haut, Talg- und Schweißdrüsen weitgehend auszuschließen, sollten die entsprechenden Substanzen vor der Anwendung an Tier und Mensch an Zellen in Kultur getestet werden. Anleitungen zur Zellkultur von Keratinozyten, Haut, Haarfollikeln und/oder Talgdrüsen sind in der Literatur zahlreich vertreten, ebenso wie Methoden zu deren Vitalitätsprüfung (Kealey *et al.*, 1986; Li *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1994; Philpott *et al.*, 1996). Die Histokultur von menschlichen Haarfollikel-Zellen in der intakten Haut (z. B. aus Biopsien) kann als sensibles und verlässliches System zur Toxizitätsprüfung bei Wirkstoff-Screenings genutzt werden, da sie im Vergleich zu anderen Assays physiologisch relevantere Daten bietet (Li *et al.*, 1992).

Die Einschleusung von Vektoren in Haarfollikel- oder Hautzellen ist eine interessante Strategie zur gentherapeutischen Behandlung von verschiedenen Erkrankungen. Auch hier zeigten sich Liposomen-Plasmid-DNA-Lösungen *in-vivo* als geeignet, die Permeabilitätsbarriere der Haut und deren Anhangsorgane zu überwinden. Die DNA konnte so in Zielzellen eingebracht und die Zellen transient transfiziert werden (Weiner, 1998). Am Hamster als Modellorganismus konnte gezeigt werden, dass die Expression des transgenen Proteins auf die Gewebe beschränkt ist, welche mit der Liposomen-Plasmid-DNA-Lösung äußerlich behandelt wurden. Die Diffusion des transgenen Proteins findet hierbei nur in der Mikroumwelt der Stelle der Anwendung statt (Weiner, 1998). Dies macht große Hoffnung, dass auch humane Haarfollikel-Zellen mit entsprechenden *LIPH*- oder *P2RY5*-Konstrukten gezielt transfiziert werden können. Da LPA-Gaben bei Patienten mit *P2RY5*-Mutation aufgrund des funktionslosen *P2Y5*-Rezeptors wirkungslos bleiben werden, ist dies momentan die einzig denkbare Therapiemöglichkeit. Eine Alternative wird sich erst bieten, wenn weitere Proteine der nachfolgenden Signalgebung identifiziert und diese auch entsprechend manipuliert werden können. Um die oben genannten Strategien zu verfolgen und zu optimieren, wird es dringend nötig sein, auf geeignete Modellorganismen zurückzugreifen. Die Generierung und histologische Untersuchung einer *P2ry5*- und evtl. auch einer *Liph-knockout*-Maus können hierfür von enormer Bedeutung sein. Möglicherweise geben sie Aufschluss über die pathologischen Veränderungen, die in den Haarfollikel-Zellen auftreten und letztendlich zum Haarverlust führen (s. Kap. 7.9).

Offen bleibt, ob eine auf LPA oder dessen Analoga basierende Therapie bei HS-Patienten jederzeit begonnen werden kann. Sollten durch den LPA-Mangel irreversible Schäden am Haarfollikel entstanden sein, so kann es sein, dass eine Therapie nur dann wirkt, wenn sie

vor Beginn des Haarausfalls – also im frühen Kindesalter – begonnen wird. Eine frühzeitige molekulargenetische Untersuchung bei möglichen Mutationsträgern könnte diesbezüglich von großem Nutzen sein.

7.9 Generierung einer *P2ry5-knockout* Maus

In der Literatur sind Tausende von natürlichen oder künstlichen Mausmutanten zu finden (MGI-Datenbank), deren Analyse vielfach zum Verständnis menschlicher Erkrankungen beigetragen hat. Neben den allgemeinen Vorzügen von Mäusen (relativ einfache Tierhaltung und schnelle Generationsfolge mit vielen Nachkommen) stellen sie ideale Modellobjekte für die medizinisch-genetische Forschung dar, weil sie eine starke genetische, physiologische und anatomische Ähnlichkeit zum Menschen aufweisen. Darüber hinaus ist das murine Genom komplett sequenziert und kann deshalb einfach analysiert und manipuliert werden (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Das kleinste Säugetier der Welt eignet sich im Besonderen als Modell zur Erforschung von Haarerkrankungen, da anzunehmen ist, dass sich der murine Haarzyklus vom menschlichen Haarzyklus, mit wenigen Ausnahmen wie z. B. der spezialisierten Vibrissen und dem synchronen, wellenförmig fortschreitenden Haarwachstum, kaum unterscheidet (Porter, 2003).

Da uns von den untersuchten HS-Patienten keine Hautbiopsien zur Verfügung stehen, ist die Untersuchung der Erkrankung im Tiermodell für das Verständnis der Pathophysiologie von enormer Bedeutung. In den Datenbanken gab es keinen Hinweis auf eine natürliche *P2ry5*-Mausmutante, allerdings koppelt die *wal*^{-/-}-Maus, die die autosomal-rezessiv vererbte (noch nicht identifizierte) *wal*-Mutation trägt, in die Nähe des *P2ry5*-Genortes (MGI:98942). Da die Kopplungsdaten relativ alt sind und zu diesem Zeitpunkt die genetischen Karten noch nicht so exakt waren wie heutzutage, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die *wal*^{-/-}-Maus eine Mutation im *P2ry5*-Gen trägt. Nach Sequenzierung der kodierenden Sequenz und auch der UTRs konnte jedoch keine Mutation in diesem Mausstamm festgestellt werden.

Da es bislang kein bekanntes *P2ry5*-Mausmodell gibt, wird zukünftig von uns die Generierung einer *knockout*-Maus angestrebt. Am Anfang dieses Vorhabens steht die Herstellung eines entsprechenden *knockout*-Plasmides. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden murinen Sequenzen in den *pJet1.2*-Vektor subkloniert und anschließend in den *pDELBOY*-Vektor umkloniert (s. Abb. 6.27). Die klonierten PCR-Fragmente wurden anschließend mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Um zu untersuchen, ob die LoxP-Stellen intakt sind und das Plasmid somit funktionell ist, wurde eine *in-vitro* Rekombination durchgeführt. Hierbei wurde das linearisierte Plasmid einem CRE-Rekombinase-Verdau unterzogen und die Fragmente

mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (s. Abb. 6.28). Im Gelbild sind nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten (10-60 min) bei 37°C zwei Banden zu erkennen: zum einen das *pDELBOY*-Ausgangsplasmid mit einer Größe von 15,9 kb und zum anderen das 13,4 kb große Plasmid, aus welchem die kodierende Sequenz einschließlich der UTRs des *P2ry5*-Gens durch homologe Rekombination herausgeschnitten wurde. Bei der *in-vitro* Rekombination stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Plasmiden ein, da das 2,5 kb große Insert immer wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten und wieder in das Plasmid hinein ligiert wird, solange bis die Enzymaktivität nachlässt. *In-vivo* würde das herausgeschnittene *P2ry5* mit der Zeit von der Zelle abgebaut werden. Daher verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des 13,4 kb großen Plasmids ohne Insert, bis schließlich nur noch dieses vorliegt. Die durchgeführten Tests zeigen, dass das hergestellte Plasmid *in-vitro* funktionell und somit prinzipiell zur Generierung einer *knockout*-Maus geeignet ist.

Die anschließende Generierung der *knockout*-Maus soll in Zusammenarbeit mit dem HET (Haus für Experimentelle Therapie, Bonn) und Prof. Andreas Zimmer (Institut für molekulare Psychiatrie, Uni Bonn) stattfinden. Die resultierenden *knockout*-Mäuse sollen dann mit verschiedenen analytischen Verfahren phänotypisch und histologisch charakterisiert werden (s. Kap. 8).

7.10 *P2RY5*-Mutationen führen beim Menschen zu Veränderungen des Haarwachstums und der Haarstruktur

Das *P2RY5*-Gen kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der als P2Y5-Rezeptor bezeichnet wird. Bei Veröffentlichung der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation (Pasternack *et al.*, 2008) wurden von einer amerikanischen Arbeitsgruppe gleichzeitig Mutationen im *P2RY5*-Gen beschrieben (Shimomura *et al.*, 2008), die zu einer Veränderung des Haarwachstums und der Haarstruktur führen. Shimomura *et al.* (2008) berichten von einem *woolly hair*-Phänotyp mit unterschiedlich starker Hypotrichosis. Beim *woolly hair*-Phänotyp ist das Haar rau, glanzlos und kleingelockt, mitunter auch brüchig. Es ist schwer zu kämmen, da das Haar ineinander verkraust. Bei den von uns beschriebenen Patienten der HS-Familien 1-3 konnten die Dermatologen klinisch jedoch kein *woolly hair* feststellen. Kurz darauf wurden weitere *P2RY5*-Mutationen veröffentlicht (Azeem *et al.*, 2008), die zu einer typischen HS ohne *woolly hair* führen.

Fraglich ist nun, wie es zu den unterschiedlichen Phänotypen bei manchen HS-Patienten kommt. Man könnte vermuten, dass funktionslose Proteine (Stoppmutation) zu einer Hypotrichosis führen, während *Missense*-Mutationen zu einer veränderten Haar-Architektur und somit zum *woolly hair*-Phänotyp führen. Shimomura *et al.* (2008) berichten von den

P2RY5-Mutationen c.69insCATG, c.188A>T, c.562A>T, c.565G>A und einer komplexen Mutation, die aus zwei einzelnen homozygoten Mutationen besteht: c.172-175delAACT und c.177delG. Drei dieser Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zur vorzeitigen Termination der Translation (c.69insCATG, c.172-175delAACT, c.177delG). Die anderen drei Mutationen (c.188A>T, c.562A>T, c.565G>A) führen zu einer Aminosäuresubstitution (p.Asp63Val, p.Ile188Phe, p.Glu189Lys). Shimomura *et al.* (2008) differenzieren nicht den beobachteten Phänotyp, weshalb davon auszugehen ist, dass der *woolly hair*-Phänotyp bei allen berichteten Patienten vorliegt, also nicht an einen bestimmten Typ von Mutation gekoppelt ist.

Azeem *et al.* (2008) berichten ebenfalls von den Mutationen c.69insCATG, c.188A>T und c.565G>A. Darüber hinaus konnten sie vier neue Mutationen identifizieren: c.8G>C, c.36insA, c.160insA und c.436G>A. Da diese Patienten eine typische HS ohne *woolly hair* aufweisen, wäre es denkbar, dass sich die Patienten der beiden Studien in unterschiedlichen Erkrankungsstadien befanden und zu Beginn der Erkrankung zunächst einen *woolly hair*-Phänotyp entwickeln. Genaue Angaben hierzu liegen nicht vor. Mit fortschreitender Erkrankungsdauer könnte sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte Hypotrichosis entwickeln. Kommt es aber erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zur Untersuchung der Patienten, würde der *woolly hair*-Phänotyp nicht registriert, weil bereits die meisten Haare ausgefallen sind.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Existenz von modulierenden Proteinen, wie z. B. anderen LPA-Rezeptoren oder Proteinen, die LPA oder LPA-Analoga produzieren. Die Expression verschiedener LPA-Rezeptoren im Haarfollikel von Patienten ist von Shimomura *et al.* (2008) nicht überprüft worden. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass alle von Shimomura *et al.* (2008) untersuchten Patienten eine gemeinsame, modifizierende Komponente tragen, da sie unterschiedliche Mutationen aufweisen und nicht miteinander verwandt sind. Denkbar wäre dies nur, wenn die Komponente sehr alt und deshalb in der Bevölkerung relativ verbreitet wäre. Eine allen Familien gemeinsame ethnische Komponente ist ebenfalls unwahrscheinlich, weil auch die Patienten von Azeem *et al.* (2008) aus Pakistan stammen und teilweise die gleichen Mutationen wie die von Shimomura *et al.* (2008) vorgestellten Patienten zeigen. Die Existenz eines Gründereffekts scheint hier plausibel, der durch Mikrosatelliten-Analysen untersucht werden könnte.

Weitere Mutationen im *P2RY5*-Gen wurden später von Petukhova *et al.* (2008) und der eigenen Arbeitsgruppe (Pasternack *et al.*, 2009a) beschrieben (s. Tab. 7.1). Petukhova *et al.* (2008) beschreiben eine konsanguine, brasilianische Familie, in der die *P2RY5*-Mutation c.833G>A (p.Cys278Tyr) vorliegt. Die Betroffenen weisen bei Geburt einen *woolly hair*-Phänotyp auf, der sich bis zum Alter von fünf Jahren zu einer schweren Form der Hypotrichosis entwickelt. Auch in den von uns beschriebenen indischen Patientinnen

(c.64_67dupTGCA; p.Phe24HisfsX28), die beide zum Zeitpunkt der Untersuchung zehn Jahre alt waren, konnten die Dermatologen dünnes, trockenes und brüchiges Haar feststellen, welches kleingelockt ist (Pasternack *et al.*, 2009a). Dies trifft auch auf die berichtete türkische Patientin zu (c.472delC; p.His158ThrfsX27), die bei der Untersuchung zwei Jahre alt war. Diese klinischen Merkmale weisen auf einen *woolly hair*-Phänotyp bei jenen Patientinnen hin. Die zum Untersuchungs-Zeitpunkt 55-jährige Großmutter der türkischen Patientin, die ebenfalls betroffen ist, war fast komplett haarlos. Ihre Augenbrauen waren spärlich ausgebildet (Pasternack *et al.*, 2009a). Ebendiese Studien, bei denen auch relativ junge Patienten untersucht wurden, deuten darauf hin, dass bei Patienten mit *P2RY5*-Mutation tatsächlich zunächst Haarstruktur-Veränderungen in Form eines *woolly hair*-Phänotyps auftreten. Der komplette Haarverlust tritt möglicherweise erst mit Fortschreiten der Erkrankung ein. Zur Überprüfung der aufgestellten These sind weitere Untersuchungen notwendig, die eine größere Anzahl von Patienten involvieren. Diese sollten nach Möglichkeit ab einem Alter von wenigen Wochen bis Monaten über einen längeren Zeitraum kontinuierlich untersucht werden, um Veränderungen der Haarstruktur und der Haardichte zu dokumentieren.

Nicht zuletzt besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass ein und dasselbe Gen für zwei unterschiedliche Erkrankungen verantwortlich ist, wie es für das *DSG4*-Gen gezeigt werden konnte. Hierbei führen Mutationen einerseits zu einer typischen generalisierten Hypotrichosis (Kljuic *et al.*, 2003) und andererseits zu einer Hypotrichosis mit charakteristischen Veränderungen der Haarstruktur, die moniliformen Haaren ähneln (*monilethrix-like* kongenitale Hypotrichosis; Schaffer *et al.*, 2006; Shimomura *et al.*, 2006; Zlotogorski *et al.*, 2006). Dieser Aspekt wird im folgenden Kapitel ausführlicher diskutiert.

Tab. 7.1: Übersicht über bislang beschriebene *P2RY5*-Mutationen, die zu Hypotrichosis simplex (HS) und/oder *woolly hair* (WH) führen.

<i>P2RY5</i> -Mutation	Konsequenz der Mutation	Literatur	HS	WH
c.8G>C (p.Ser3Thr)	Aminosäuresubstitution	Azeem <i>et al.</i> , 2008	X	
c.36insA (p.Asp13ArgfsX4)	Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppkodon	Azeem <i>et al.</i> , 2008	X	
c.64_67dupTGCA (p.Phe24HisfsX28)	Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppkodon	Pasternack <i>et al.</i> , 2009a	X	X
c.69insCATGfsX29 (p.24insHisfs52)	Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppkodon	Shimomura <i>et al.</i> , 2008; Azeem <i>et al.</i> , 2008	X	X
c.160insA (p.Thr54AsnfsX5)	Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppkodon	Azeem <i>et al.</i> , 2008	X	
c.172_175delAACT; c.177delG (p.Asn58CysfsX31)	Komplexe Mutation mit Leserasterverschiebung und vorzeitigem Stoppkodon	Shimomura <i>et al.</i> , 2008		X

c.188A>T (p.Asp63Val)	Aminosäuresubstitution	Shimomura <i>et al.</i> , 2008; Azeem <i>et al.</i> , 2008	X	X
c.373_374delAA (p.Lys125AsnfsX37)	Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppkodon	Pasternack <i>et al.</i> , 2008	X	
c.436G>A (p.Gly146Arg)	Aminosäuresubstitution	Azeem <i>et al.</i> , 2008; Shimomura <i>et al.</i> , 2009a	X	X
c.463C>T (p.Gln155X)	Stoppkodon	Pasternack <i>et al.</i> , 2008	X	
c.472delC (p.His158ThrfsX27)	Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppkodon	Pasternack <i>et al.</i> , 2009a	X	X
c.562A>T (p.Ile188Phe)	Aminosäuresubstitution	Shimomura <i>et al.</i> , 2008		X
c.565G>A (p.Glu189Lys)	Aminosäuresubstitution	Shimomura <i>et al.</i> , 2008; Azeem <i>et al.</i> , 2008	X	X
c.833G>A (p.Cys278Tyr)	Aminosäuresubstitution	Petukhova <i>et al.</i> , 2008	X	X

7.11 Den Haarausfall an der Wurzel packen

Das Kopfhhaar wächst jeden Tag ca. 0,4 mm, das macht im Jahr 14,6 cm pro Haar. Auf die Gesamtzahl von durchschnittlich 100.000 Kopfhhaare bezogen, ergibt das 14,6 km Haarwachstum pro Jahr. Wir bemerken diesen kontinuierlichen Prozess im Allgemeinen nicht, denn wir sehen unsere Haarpracht als etwas Normales und Alltägliches an, die wir durch Kämmen, Schneiden, Färben, Verlängern und Dauerwellen unseren Wünschen anpassen. Es ist daher nicht erstaunlich, dass Haarausfall oder die „falsche“ Haarfarbe oder -struktur zu diversen Problemen und psychischen Beeinträchtigungen bei den Betroffenen führen können (Tobin, 2009). Zum Verständnis des Haarwachstums, der Haarstruktur und des Haarausfalls muß man sich zunächst einmal vergegenwärtigen, worum es sich beim Haar eigentlich handelt.

Der äußerlich sichtbare Haarschaft besteht aus totem, differenziertem Zellmaterial, welches hauptsächlich aus proteinösen Fasern besteht. Diese setzen sich aus Keratinfilamenten, Keratin-assoziierten Strukturproteinen und differenzierten Epithelzellen zusammen. Bei dem Haarfollikel, der auch als Haarwurzel bezeichnet wird, handelt es sich um ein komplexes und hochorganisiertes Miniorgan, das sich aus zahlreichen Zellarten zusammensetzt, die sich zwiebelförmig an den Haarschaft anschmiegen. Diese zeichnen sich durch individuelle, zeitlich und örtlich festgelegte Expressionsmuster sowohl innerhalb dieser „Haarzwiebel“ als auch entlang der longitudinalen Wachstumsachse aus. Betrachtet man allein diese Parameter, so werden schnell die Komplexität des Aufbaus des Haarfollikels und die Anforderungen an die notwendigen Differenzierungs- und Regulationsvorgänge sowohl auf

Einzelzell- als auch auf Gewebeebene deutlich. Es ist daher leicht nachvollziehbar, dass Fehlregulation oder Strukturanomalien zu Haar-Phänotypen führen, die von der Norm abweichen. Die Analyse genau dieser Phänotypen ermöglicht es uns, Informationen über das Haarwachstum, die Haarstruktur, die Haarentwicklung und schließlich auch den Haarausfall zu gewinnen.

Zur Untersuchung des Haarausfalls können auch die genetisch komplexen Haarveränderungen herangezogen werden, die weit verbreitet in der Bevölkerung auftreten. Assoziationsuntersuchungen und Kandidatengen-Ansätze haben sowohl bei der Alopecia areata als auch bei der androgenetischen Alopezie in den letzten zehn Jahren zu Fortschritten beigetragen, allerdings konnten erst wenige Gene identifiziert werden, die Einfluß auf die Pathophysiologie haben. Für die androgenetische Alopezie konnte der Androgenrezeptor (Hillmer *et al.*, 2005) als ursächlich für den Haarausfall beschrieben werden, für die Alopecia areata das *PTPN22*-Gen (Kemp *et al.*, 2006; Betz *et al.*, 2008) sowie der HLA-Lokus (De Andrade *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2005; Entz *et al.*, 2006]. Bei diesen Phänotypen sind viele Gene an der Entstehung der Erkrankung beteiligt und der Beitrag jedes einzelnen Gens ist mäßig bis gering und hängt vom genetischen *Background* eines Betroffenen ab. Viele Varianten – besonders die schwachen und somit schwer zu identifizierenden – sind noch nicht bekannt und haben wahrscheinlich nur einen Einfluß auf das Haarwachstum, wenn sie zusammen auftreten. Aus diesem Grund sind die Informationen von besonderer Bedeutung, die uns die Untersuchung der monogenen Haarerkrankungen liefern. Sie offenbaren Faktoren, die nicht nur notwendig, sondern essentiell für das Haarwachstum sind. Im Folgenden sollen einige Schlüsselgene und deren Rolle beim Haarwachstum und der Haarstrukturgebung diskutiert werden.

Die Diversität der monogenen Haarerkrankungen und der bislang identifizierten Gene, die ursächlich für die verschiedenen Phänotypen sind, scheint die Komplexität des Haarfollikels widerzuspiegeln. So führen Veränderungen in Haarkeratin-Filamenten und Keratin-assoziierten Proteinen zu Änderungen der Haarform und -struktur. Beispielsweise wurden Mutationen in drei verschiedenen Keratin-Genen beschrieben (*Krt81*, *Krt83*, *Krt86*, Winter *et al.*, 1997a; Winter *et al.*, 1997b; van Steensel *et al.*, 2005), die zu Monilethrix führen. Hierbei handelt es sich um eine Strukturveränderung des Haarschafts, bei der das Haar charakteristische Verdickungen und Einschnürungen aufweist, woraus eine erhöhte Brüchigkeit resultiert. Es führen aber nicht nur Mutationen, sondern auch eine fehlerhafte Expression von Keratin-Genen zu einer erhöhten Haarbrüchigkeit. Dies ist für den *NUDE/SCID*-Phänotyp beim Menschen und bei der Maus beschrieben, der sich durch Alopezie in Kombination mit einer Immundefizienz auszeichnet (Frank *et al.*, 1999; Adriani *et al.*, 2004). Die Erkrankung ist auf Mutationen im *winged-helix-nude* *FOXN1*-Gen zurückzuführen, welches für einen Transkriptions-Regulator von Keratin-Genen kodiert (Mecklenburg *et al.*, 2001). Bei der

Atrichia congenita liegen ebenfalls Mutationen in einem Transkriptionsfaktor vor. In diesem Fall führen Veränderungen im so genannten *hairless*-Gen (*HR*), welches als Transkriptions-Repressor fungiert (Potter *et al.*, 2001), sowohl beim Menschen als auch bei der Maus zu Haarlosigkeit (Ahmad *et al.*, 1998, Cichon *et al.*, 1998). Diese Art des Haarausfalls ist durch einen vollständigen Verlust der Kopf- und Körperbehaarung gekennzeichnet und tritt mit Beginn des ersten Haarzyklus auf. *Loss-of-function* Mutationen in *U2HR*, einem inhibitorischen ORF, welcher sich in der 5'-UTR Region des *HR*-Gens befindet, führen zur Hypotrichosis Typ Marie Unna (Wen *et al.*, 2009). Diese Erkrankung ist charakterisiert durch spärliche oder fehlende Behaarung bei der Geburt, dem Wachstum von dicken, hyperpigmentierten und drahtigen Haaren während der Kindheit und einem progredienten Haarverlust während der Pubertät. Es wurde gezeigt, dass *U2HR* als Transkriptionsrepressor von *HR* fungiert, weshalb die beschriebenen Mutationen zu einer gesteigerten Translation – und somit zu einem *gain-of-function* – von *HR* führen. Auch Mutationen im *VDR*-Gen, welches für einen Vitamin D-Rezeptor kodiert, können zur Atrichia congenita führen (Miller *et al.*, 2001). Bei *VDR* handelt es sich um einen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor, der mit *HR* im Zellkern interagiert (Hsieh *et al.*, 2003). Diese Beispiele machen deutlich, wie durch die Gen-Identifizierung bei monogenen Alopezien oder Haarstrukturanomalien einzelne Schlüsselproteine identifiziert werden konnten. Diese lassen sich dann Puzzleartig zu Regulationskaskaden zusammensetzen, die für die physiologische Funktion des Haarfollikels notwendig sind.

Neben Transkriptionsregulatoren und Genen für die Strukturgebung der Haare konnten auch Mutationen in Proteinen identifiziert werden, die Zelladhäsion vermitteln, wie z. B. Corneodesmosin, welches bei Patienten mit HSS verändert ist (Levy-Nissenbaum *et al.*, 2003). Es handelt es sich hierbei um ein Glykoprotein, welches in der Epidermis und in der inneren Wurzelscheide von Haarfollikeln exprimiert wird und als Keratinozyten-Adhäsionsmolekül dient (Jonca *et al.*, 2002). Außerdem wurden Mutationen in Genen dokumentiert, die zur Gruppe der Cadherine gehören. Cadherine sind Kalzium-abhängige Glykoproteine und gehören wie das Corneodesmosin zur Gruppe der Adhäsionsproteine, da sie Zell-Zellkontakte vermitteln. Mutationen im *CDH3*-Gen, welches P-Cadherin kodiert, wurden als ursächlich für eine kongenitale Hypotrichosis mit juveniler Makuladystrophie ermittelt (Sprecher *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnten Mutationen im *DSG4*-Gen, welches an der Bildung von Desmosomen beteiligt ist, beim Menschen als Ursache für eine autosomal-rezessive Hypotrichosis identifiziert werden. Desmosomen stellen Zell-Zellkontakte zwischen benachbarten Zellen her und erhöhen den mechanischen Zusammenhalt von Epithelzellen, indem sie die Keratin-Filamente verschiedener Zellen miteinander verbinden. Es konnte gezeigt werden, dass *DSG4*-Mutationen sowohl zu strukturellen Veränderungen am Haarfollikel als auch zu einer fehlerhaften Signalgebung führen. Diese bewirken eine

veränderte Expression von *hoxC13*, *Krt82* und *Krt34*, was letztendlich zu einer fehlerhaften Ausführung des Differenzierungsprogramms der Zellen und dadurch zu einem vermindertem Haarwuchs führt (Kljuic *et al.*, 2003). Interessanterweise verursachen *DSG4*-Mutationen auch eine autosomal-rezessiv vererbte Hypotrichosis mit Haarschaft-Veränderungen, die moniliformen Haaren ähneln (*monilethrix-like* kongenitale Hypotrichosis; Schaffer *et al.*, 2006; Shimomura *et al.*, 2006; Zlotogorski *et al.*, 2006). Dies passt sowohl gut zu den Ergebnissen von Kljuic *et al.*, die eine veränderte Expression der Haarkeratine *Krt82* und *Krt34* bei Individuen mit *DSG4*-Mutation nachweisen konnten (Kljuic *et al.*, 2003), als auch zu den Ergebnissen von Winter *et al.* (1997a und 1997b) und van Steensel *et al.* (2005), die Mutationen in den Haarkeratinen *Krt81*, *Krt83* und *Krt86* als Ursache für die autosomal-dominant vererbte Monilethrix nachweisen konnten. Bei Mäusen führen Mutationen im *DSG4*-Gen ebenfalls zu einem Haarphänotyp: sie haben ein spärliches Fell und abnormale Schnurrhaare. *DSG4* gehört zu einer Subgruppe von Cadherinen, die auch *DSG1*, *DSG2* und *DSG3* umfasst. Bislang konnten keine Mutationen in *DSG1-DSG3* identifiziert werden, die Haarlosigkeit verursachen. *DSG1*-Mutationen führen allerdings zu einer autosomal-dominant vererbten Hauterkrankung beim Menschen (*striate palmoplantar keratoderma*; Rickman *et al.*, 1999) und *DSG3*-Mutationen ebenfalls zu spezifischen Hautveränderungen im Mausmodell (Allen *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (*P2RY5* [*LPAR6*], *P2Y5* [*LPAR6*]) für eine autosomal-rezessiv vererbte Hypotrichosis identifiziert und Abschnitte der dazugehörigen Signaltransduktionskaskade ermittelt werden (Pasternack *et al.*, 2008). Betroffene zeigen einen diffusen progressiven Haarausfall, der die Kopf- und Körperbehaarung betrifft. Strukturanomalien des Haarschaftes konnten bei den Patienten mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen nicht festgestellt werden (Al Aboud *et al.*, 2002). Neben der Identifizierung des ursächlichen Gens konnten wir auch den Liganden des *P2Y5*-Rezeptors identifizieren: LPA. Dies steht in Einklang mit der Identifizierung von *LIPH* für eine ebenfalls autosomal-rezessiv vererbte Hypotrichosis (Kazantseva *et al.*, 2006). *LIPH* kodiert für die Phospholipase Lipase H, auch mPA-PLA₁α genannt (*membrane-bound phosphatidic acid-selective phospholipase A1*), welche aus Phosphatidsäure unter Abspaltung einer Fettsäure Lysophosphatidsäure synthetisiert (s. Abb. 7.2). Betroffene zeigen ein verlangsamtes Haarwachstum mit dystrophen und fragilen Haarschaften, was dazu führt, dass die Haare nur eine geringe Länge erreichen. Interessanterweise konnten sowohl im *P2RY5*- als auch im *LIPH*-Gen Mutationen bei Patienten nachgewiesen werden, die einen *woolly hair*-Phänotyp aufweisen, teilweise in Kombination mit unterschiedlich stark ausgeprägter Hypotrichosis (Shimomura *et al.*, 2008). Hierbei sind Patienten mit *P2RY5*-Mutationen phänotypisch nicht von solchen mit *LIPH*-Mutationen zu unterscheiden. Dies ist verständlich vor dem Hintergrund, dass *P2Y5* und *LIPH* zwei aufeinander folgende Signal-

geber in einer Signaltransduktionskaskade darstellen (s. Kap. 7.5). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass P2Y5 mit K73, einem Keratin, das spezifisch für die Kutikula der inneren Haarwurzelscheide ist, und mit K75, einem Keratin, das spezifisch für die Glashaut ist, kolokalisiert (Shimomura *et al.*, 2008). Wie diese Proteine in Zusammenhang stehen, ist noch unklar. Dieser Befund betont jedoch noch einmal die entscheidende Rolle der Keratine beim Haarwachstum und der Haarstrukturgebung, die schon durch die für Monilethrix und die *monilethrix-like* kongenitale Hypotrichosis identifizierten Keratingene gezeigt werden konnte. Dies ist auch nicht erstaunlich, wenn man sich verdeutlicht, dass Keratine und Keratin-assoziierte Proteine die Hauptbestandteile des Haares darstellen.

In den letzten Jahren konnten einige wichtige Gene aufgefunden gemacht werden, die Haarwachstum und -struktur beeinflussen, und die Zusammenhänge zwischen einzelnen Komponenten werden immer deutlicher. Um zusammenfassend noch einmal einen kurzen Überblick über die bislang identifizierten Gene und deren Beziehung zueinander zu geben, soll die Abb. 7.3 dienen. Sie veranschaulicht, wie Proteine, die als Transkriptionsfaktoren/-regulatoren, Zelladhäsionsmoleküle, Strukturproteine, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Enzyme, z. B. Phospholipasen, in Prozesse der Haarphysiologie involviert sind. Nun stellt sich die Frage, wie all diese, in seltenen, genetischen Haarerkrankungen identifizierten Gene bzw. Proteine Informationen zu Mechanismen liefern können, die das Haarwachstum und die Haarstruktur generell regulieren. Zur Beantwortung dieser Frage kann sicherlich nicht nur ein Gen oder ein genetischer Defekt ausreichend sein, sondern wir müssen die Gesamtheit der bislang identifizierten Schlüsselgene betrachten. Mit jedem weiteren identifizierten Gen kann ein Teil zum Puzzle hinzugefügt werden, bis sich letztendlich ein vollständiges Bild der Physiologie und Pathophysiologie des Haares entwickelt.

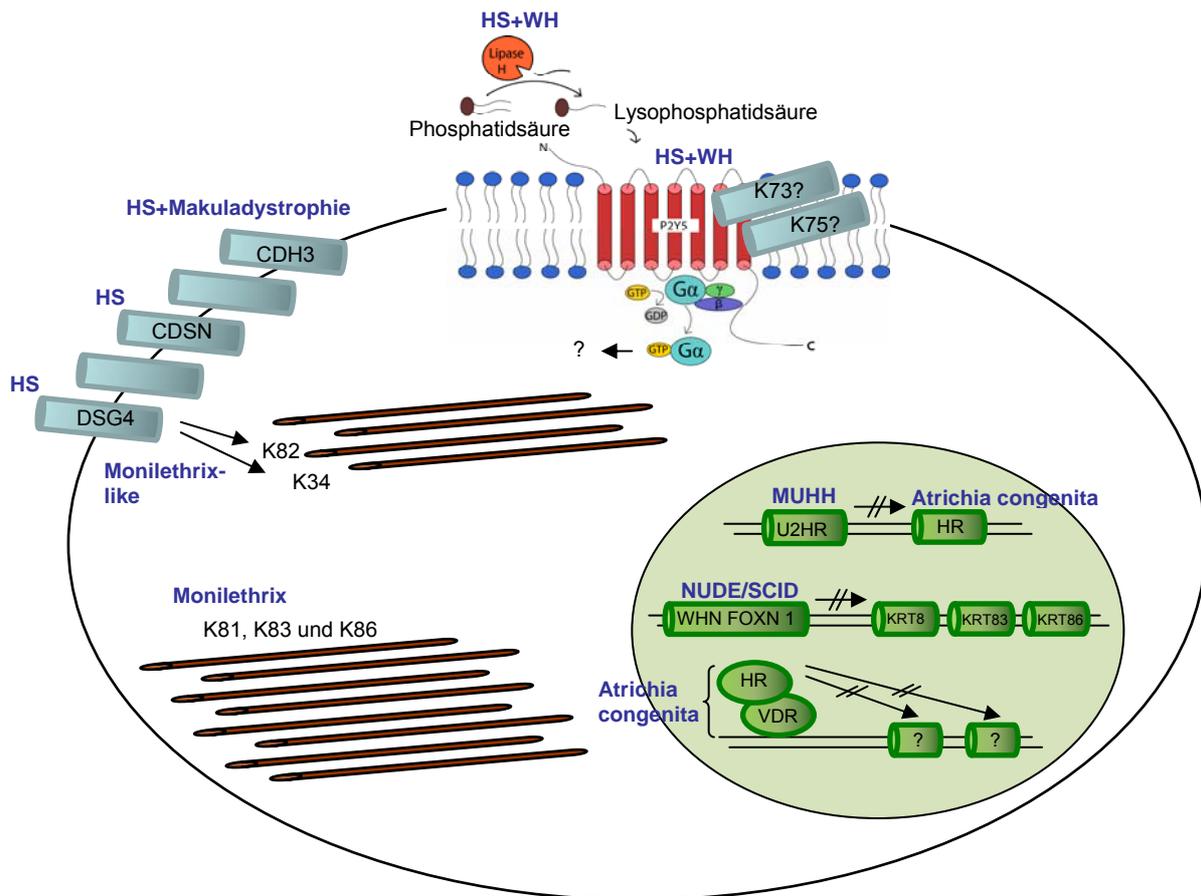


Abb. 7.3: Schematische Darstellung der bislang identifizierten Gene, in denen Mutationen zu Störungen des Haarwachstums und/oder der Haarstruktur führen. Die Phospholipase LIPH und der G-Protein-gekoppelte Rezeptor P2Y5 sind in den Lipidstoffwechsel bzw. die Lipidsignalgebung involviert und führen sowohl zu einer Hypotrichosis (HS) als auch zum *woolly hair*-Phänotyp (WH). Mutationen in verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen wie z. B. CDH3, CDSN und DSG4 sind jeweils für eine HS mit Makuladystrophie, eine *Hypotrichosis simplex of the scalp* (HSS), eine HS und eine *monilethrix-like* kongenitale Hypotrichosis beschrieben. Mutationen in den Haarkeratinen K81, K83 und K86 führen zur Monilethrix. Darüber hinaus sind verschiedene Transkriptionsfaktoren und Regulatoren für verschiedene Haarerkrankungen identifiziert worden, z. B. U2HR für eine Hypotrichosis Typ Marie Unna (MUHH), HR und VDR für die Atrichia congenita und WHN FOXN1 für eine Alopezie in Kombination mit einer Immundefizienz (NUDE/SCID). Verändert nach Sprecher, 2008.

8. Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor als spezifisch und essentiell für das menschliche Haarwachstum beschrieben werden. Darüber hinaus konnte LPA als Ligand, also Aktivator, des P2Y5-Rezeptors identifiziert und somit ein Teil der Signaltransduktion aufgeklärt werden. Aufgrund von Strukturhomologie kann nun nach weiteren P2Y5-Agonisten und -Antagonisten gesucht werden. Vorrangiges Ziel ist es, einen Agonisten zu finden, der stärker oder länger wirkt als LPA selbst. Dieser könnte dann auch als therapeutischer Wirkstoff zur Entwicklung eines Medikaments für Pharmafirmen interessant sein oder als Leitsubstanz für Wirkstoff-Screenings dienen. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob unterschiedliche Fettsäuren die Wirkung von LPA verändern. Für die bisherigen Experimente wurde oleoyl-L- α -Lysophosphatidsäure verwendet. Es könnten darüber hinaus Lysophosphatidsäuren mit Lauroyl-, Myristoyl-, Palmitoyl-, oder Stearoyl-Resten untersucht werden.

Die LPA-Signalgebung spielt in zahlreichen Zelltypen eine wichtige Rolle und produziert eine Vielzahl von zellulären Antworten (Tigyi *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Dottori *et al.*, 2008). Aus diesem Grund ist es von Bedeutung Liganden zu identifizieren, die den P2Y5-Rezeptor spezifisch aktivieren, ohne die Aktivität anderer LPA-Rezeptoren zu verändern. Zur Identifizierung von Agonisten des P2Y5-Rezeptors können verschiedene Standard-Assaysysteme verwendet werden (Siehler, 2008), wie z. B. der in Kap. 5.4.1 beschriebene CRE-Luziferase Reporter-Gen-Assay.

Um ein besseres Verständnis der HS und des Haarzyklus im Allgemeinen zu erlangen, ist es von besonderer Wichtigkeit, die weiteren zellulären Signaltransduktionswege aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Aktivierung des P2Y5-Rezeptors zu einem Anstieg der CRE-induzierten Luziferase-Aktivität im Reporter-Gen-Assay kommt. Somit ist denkbar, dass die Signaltransduktion über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP abläuft. Das Signalmolekül cAMP kann die Proteinkinase A (PKA) aktivieren, welche dann verschiedene Proteine phosphoryliert und so deren Aktivität reguliert. Um herauszufinden, welche Proteine der PKA als Substrat dienen, könnte der Phosphorylierungszustand von Kandidaten nach LPA-Gabe bestimmt werden, z. B. mittels phosphospezifischer Antikörper. Dies setzt allerdings die Kenntnis der Phosphorylierungsstelle und die Verfügbarkeit eines entsprechenden Antikörpers voraus (Osawa *et al.*, 2008). Des Weiteren könnte mittels Western-Blot-Analyse untersucht werden, ob bestimmte Proteine nach LPA-Gabe eine veränderte Expression aufweisen. Takahashi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass MEK1/2 nach Phosphatidsäure-Gabe aktiviert wird und in kultivierten murinen Haarfollikel-Zellen akkumuliert (Takahashi *et al.*, 2003). Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch LPA zur

MEK1/2-Aktivierung und Akkumulation führt oder ob andere zelluläre Mediatoren, wie z. B. Ras oder Rac aktiviert oder inhibiert werden. Untersuchungen an Modellsystemen, beispielsweise an humanen Keratinozyten oder HACAT-Zellen, sind hierbei ebenfalls von besonderem Interesse.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden oftmals Homo- oder Heterodimere. Daher ist die Identifizierung der Bindungspartner elementar um Erkenntnisse zur Funktion des P2Y5-Proteinkomplexes und dessen Regulation zu erhalten. Zur Identifizierung der Bindungspartner von Membranproteinen, kann z. B. das *split-ubiquitin membrane yeast 2-hybrid (MYTH) system* angewendet werden, welches auf zwei getrennten Ubiquitin-Hälften basiert, deren Rekonstitution durch eine spezifische Protein-Protein-Interaktion vermittelt wird (Dirnberger *et al.*, 2008). Grundsätzlich wird hierbei das zu untersuchende Protein mit einem C-terminalen Ubiquitinfragment (Cub) und einem Reporterprotein fusioniert und dann in einem Hefe-Stamm exprimiert. Des Weiteren wird gleichzeitig ein modifiziertes N-terminales Ubiquitinfragment (NubG) mit einer cDNA-Bibliothek fusioniert und ebenfalls exprimiert. Durch Mutation der Aminosäure 13 von Isoleucin zu Glycin wird die Affinität von Nub zu Cub reduziert und es kommt nur dann zur Re-Assoziation der beiden Hälften, wenn sie durch Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine in räumliche Nähe in der Zelle gebracht werden. Durch die Re-Assoziation entsteht aus den zwei Fragmenten Cub und NubG ein natives Ubiquitin, welches als Substrat für Ubiquitin-spezifische Proteasen dient. Durch den Abbau des Ubiquitins wird der Reporter freigesetzt und kann anschließend durch eine Methode der Wahl detektiert werden (Stagljar *et al.*, 1998; Fetchko & Stagljar, 2004). Zur Verifizierung der Interaktion kann der V5-fusionierte P2Y5-Rezeptor mit dem potentiellen Bindungspartner, der mit einem anderen Epitop, z. B. HA (Peptid des Hämagglutinins) oder c-myc (Peptid des Transkriptionsfaktors c-myc) versehen wird, kotransfiziert und anschließend eine Koimmunopräzipitation durchgeführt werden. Im Falle einer Dimerisierung sollte sich P2Y5 über den V5-Antikörper auch nach Immunpräzipitation mit HA oder c-myc auf einer entsprechenden Höhe im Western-Blot nachweisen lassen, wie es auch schon erfolgreich für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren demonstriert werden konnte (Hebert *et al.*, 1996). Zusammen mit der Identifizierung der in die Signaltransduktion involvierten Moleküle werden diese Untersuchungen grundlegend zum Verständnis der Pathophysiologie von HS und des Haarwachstums beitragen.

Darüber hinaus wären histologische Untersuchungen sehr hilfreich, um die Pathophysiologie von HS aufzuklären. Leider stehen uns von den Betroffenen keine Hautbiopsien zur Verfügung. Aus diesem Grund soll die Etablierung einer konditionellen *P2ry5-knockout*-Maus erfolgen. Hierfür wurden bereits die nötigen Maus-DNA Fragmente subkloniert und in den *pDELBOY-conditional targeting* Vektor umkloniert (s. Kap. 6.8). Folgende Untersuchungen sind in Anlehnung an die „Analysis of hair follicles in mutant laboratory mice“ (Sundberg *et*

al., 2005) mit den *P2ry5-knockout*-Mäusen geplant: Den *knockout*-Mäusen sollen an ausgewählten Tagen während der Morphogenese des Haarfollikels Hautbiopsien entnommen werden. Die Biopsien sollen histologisch und mittels quantitativer Histomorphometrie untersucht werden (Embryonaler Tag [E] 16.5, E19.5, Postnataler Tag [P] 1, P8, P12, P17, P19 und P32), um den Ablauf der Stadien des Anagens der Haarfollikelmorphogenese bzw. des Katagens, Telogens und Anagens des ersten Haarzyklus beurteilen zu können. Dazu werden Untersuchungen anhand der Parameter Proliferation (z. B. Ki67, BrdU) und Apoptose (z. B. aktivierte Caspase 3, TUNEL-Assay) an Gewebeschnitten durchgeführt. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zu Veränderungen an der Haarfollikelstruktur sollen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen über Zell-Zellverbindungen bzw. die Keratinisierung der inneren Wurzelscheide und des Haarschaftes ergänzt werden. Darüber hinaus können verschiedene Strukturproteine, wie z. B. Haarkeratine oder Keratin-assoziierte Proteine, mittels immunohistochemischen Untersuchungen oder *in situ*-Hybridisierungen analysiert werden. Ferner kann die Expression von bereits bekannten Regulatoren des Haarwachstums (z. B. BMP, WNT, SHH etc.) untersucht werden. In diesem Zusammenhang wird es besonders interessant sein, den zeitlichen Ablauf von Expressionen in Korrelation mit dem Haarzyklus zu eruieren. Die verschiedenen Fragestellungen und Untersuchungen werden dazu dienen, die Pathophysiologie aufzuklären, welche dem Funktionsverlust des P2Y5-Rezeptors zugrunde liegt, und den daraus resultierenden Einfluss auf das Haarwachstum zu charakterisieren.

9. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die molekulare Ursache einer autosomal-rezessiven Form der Hypotrichosis simplex (HS) – einer seltenen, monogen vererbten Haarerkrankung – identifiziert werden. In verschiedenen HS-Familien wurden unterschiedliche Mutationen (c.463C>T, c.373_374delAA) im *P2RY5*-Gen identifiziert, welches für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kodiert.

P2RY5-Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben zeigten eine ubiquitäre Expression des Gens. RNA-Analysen an immortalisierten Lymphozyten von Betroffenen machten deutlich, dass die mutierte mRNA vorliegt und nicht durch *nonsense-mediated mRNA decay* abgebaut wird. Um mehr über die Pathophysiologie zu erfahren, wurden Protein-biochemische Methoden angewandt. In Western-Blot-Analysen mit Zelllysaten von transient transfizierten COS7-Zellen konnten das Wildtyp-Protein und die beiden trunkierten Proteine p.Gln155X und p.Lys125AsnfsX37 nachgewiesen und das ungefähre Molekulargewicht bestimmt werden. Mittels Immunfluoreszenz-Analysen konnte demonstriert werden, dass das *P2Y5*-Wildtyp-Protein in der Zellmembran lokalisiert ist, wohingegen die trunkierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum vorliegen. Die Aufnahme von adäquaten externen Reizen durch die *P2Y5*-Mutanten ist also nicht möglich, da diese Proteine nicht in die Zellmembran integriert werden.

In Zusammenarbeit mit Prof. Ivar von Kügelgen vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn konnte mittels eines CRE-Luziferase-gekoppelten Reporter-Gen-Assays oleoyl-L- α -Lysophosphatidsäure (LPA), ein bioaktives Lipid, als Ligand des *P2Y5*-Rezeptors identifiziert werden. Bei diesem Assay kam es nach Aktivierung des Rezeptors durch LPA zur Aktivierung der CRE-induzierten Luziferase-Aktivität, d. h. die Signalweiterleitung in der Zelle könnte über den *Second Messenger* cAMP stattfinden. Durch Radioliganden-Bindungsstudien konnte anschließend verifiziert werden, dass der *P2Y5*-Rezeptor LPA bindet. Durch die Identifizierung von *P2Y5* als LPA-Rezeptor wächst die Anzahl der bekannten LPA-Rezeptoren von fünf (LPA1-5/LPAR1-5) auf sechs. Der *P2Y5*-Rezeptor wurde daraufhin entsprechend seiner Funktion in LPAR6 (*lysophosphatidic acid receptor 6*) umbenannt. Der Konsistenz halber wird hier weiterhin die Bezeichnung *P2Y5* verwendet. Basierend auf Homologiestudien ist *P2Y5* in eine Subgruppe von LPA-Rezeptoren einzuordnen, die LPA4 und LPA5 umfasst. Diese beiden Rezeptoren sind nicht im Haarfollikel exprimiert, sodass ein Verlust von *P2Y5* wahrscheinlich nicht durch homologe Rezeptoren kompensiert werden kann und es deshalb zum Haarausfall kommt. In anderen Geweben, wie Haut, Lymphozyten oder Augenbrauen, konnte LPA4- und/oder LPA5-Expression nachgewiesen werden. Da es in keinem dieser Gewebe zu phänotypischen

Veränderungen kommt, ist anzunehmen, dass LPA4, LPA5 und P2Y5 redundant in ihrer Funktion sind und LPA4 und LPA5 den P2Y5-Verlust kompensieren können.

Expressionsuntersuchungen von Lpa-Rezeptoren an murinen Haarfollikeln lassen darauf schließen, dass eine dem Menschen ähnliche Konstellation vorliegt, da *P2ry5*, nicht jedoch *Lpa4* und *Lpa5*, exprimiert sind. Aus diesem Grund wurde der murine P2Y5-Rezeptor in einen *knockout*-Vektor kloniert (s. Kap. 6.8), um eine *knockout*-Maus zu generieren. Da uns keine Haut- oder Haarbiopsien von den Betroffenen der untersuchten HS-Familien zur Verfügung stehen, wird eine *knockout*-Maus dazu dienen, weiterführende histologische Untersuchungen durchführen zu können und die Pathophysiologie des Haarausfalls bzw. des Haarwachstums zu verstehen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig die essentielle Rolle und spezifische Funktion eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (P2Y5) für das menschliche Haarwachstum beschrieben werden. Darüber hinaus konnte durch die Identifizierung des endogenen Liganden ein Modell von der P2Y5-Wirkungsweise erstellt werden. Da diese Rezeptoren geeignete *drug-targets* darstellen, könnten P2Y5 und dessen Ligand LPA zur Herstellung von Wirkstoffen von Bedeutung sein, die pharmazeutisch bei Haarausfall genutzt werden können. Sie könnten auch die Entwicklung neuer lipophiler LPA-Analoga vorantreiben, wodurch Möglichkeiten für neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Haarausfall aufgezeigt werden können. Ob diese dann auch bei anderen Haarerkrankungen, wie der androgenetischen Alopezie oder der Alopecia areata wirkungsvoll sein könnten, muss noch untersucht werden. Aufgrund der Signaltransduktion ist jedoch zu erwarten, dass die Stimulierung des P2Y5-Rezeptors mittels LPA oder dessen Analoga zumindest bei HS-Patienten mit *LIPH*-Mutation wirkungsvoll sein könnte. Diese Patienten können Phosphatid-säure nicht in Lysophosphatidsäure umwandeln, besitzen jedoch einen funktionellen P2Y5-Rezeptor.

10. Eigene Publikationen

Schrameyer T, Dekomien G, **Pasternack SM**, Reinartz BS, Santos EJ, Epplen JT. Long- and short-haired Weimaraner dogs represent two populations of one breed. *Electrophoresis* 26: 1668-72 (2005)

Betz RC, Planko L, Eigelshoven S, Hanneken S, **Pasternack SM**, Bussow H, Van Den Bogaert K, Wenzel J, Braun-Falco M, Rutten A, Rogers MA, Ruzicka T, Nöthen MM, Magin TM, Kruse R. Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease. *Am J Hum Genet* 78: 510-9 (2006)

Lippmann T, **Pasternack SM**, Kraczyk B, Dudek SE, Dekomien G. Indirect exclusion of four candidate genes for generalized progressive retinal atrophy in several breeds of dogs. *J Negat Results Biomed* 5: 19 (2006)

Pasternack SM, von Kügelgen I, Aboud KA, Lee YA, Rüschemdorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 40: 329-34 (2008)

Meissner T, Betz RC, **Pasternack SM**, Eigelshoven S, Ruzicka T, Kruse R, Laitenberger G, Mayatepek E. Richner-Hanhart syndrome detected by expanded newborn screening. *Pediatr Dermatol* 25: 378-80 (2008)

Nahum S*, **Pasternack SM***, Pforr J, Indelman M, Wollnik B, Bergman R, Nöthen MM, König A, Khamaysi Z, Betz RC, Sprecher E. A large duplication in LIPH underlies autosomal recessive hypotrichosis simplex in four Middle Eastern families. *Arch Dermatol Res* 301: 391-3 (2009)

*Diese Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

Pasternack SM, Betz RC, Brandrup F, Gade EF, Clemmensen O, Lund AM, Christensen E, Bygum A. Identification of two new mutations in the TAT gene in a Danish family with tyrosinemia type II. *Br J Dermatol* 160: 704-6 (2009)

Pasternack SM, Murugusundram S, Eigelshoven S, Müller M, Kruse R, Lehmann P, Betz RC. Novel mutations in the P2RY5 gene in a Turkish and two Indian patients presenting with hypotrichosis simplex/woolly hair. *Arch Dermatol Res* 301: 621-4 (2009)

Pasternack SM, von Kugelgen I, Müller M, Oji V, Traupe H, Sprecher E, Nöthen MM, Janecke AR, Betz RC. In-vitro analysis of LIPH mutations causing hypotrichosis simplex: evidence confirming the role of lipase H and lysophosphatidic acid in hair growth. **J Invest Dermatol** 129: 2772-6 (2009)

Düzenli S*, Redler S*, Müller M, Polat M, Dogruer D, **Pasternack SM**, Betz RC. Identification of a U2HR gene mutation in Turkish families with Marie Unna hereditary hypotrichosis. **Clin Exp Dermatol** 34: e953-6 (2009)

*Diese Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

Hanneken S, Rütten A, **Pasternack SM**, Eigelshoven S, El Shabrawi-Caelen L, Wenzel J, Braun-Falco M, Ruzicka T, Nöthen MM, Kruse R, Betz RC. Systematic mutation screening of KRT5 supports the hypothesis that Galli-Galli disease is a variant of Dowling-Degos disease. **Br J Dermatol** 163:197-200 (2010)

11. Literaturverzeichnis

Adly MA, Assaf HA, Hussein MR. Expression pattern of p75 neurotrophin receptor protein in human scalp skin and hair follicles: Hair cycle-dependent expression. *J Am Acad Dermatol* 60: 99-109 (2009)

Adriani M, Martinez-Mir A, Fusco F, Busiello R, Frank J, Telese S, Matrecano E, Ursini MV, Christiano AM, Pignata C. Ancestral founder mutation of the nude (FOXP1) gene in congenital severe combined immunodeficiency associated with alopecia in southern Italy population. *Ann Hum Genet* 68: 265-8 (2004)

Ahmad W, Faiyaz ul Haque M, Brancolini V, Tsou HC, ul Haque S, Lam H, Aita VM, Owen J, deBlaquiere M, Frank J, Cserhalmi-Friedman PB, Leask A, McGrath JA, Peacocke M, Ahmad M, Ott J, Christiano AM. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* 279: 720-4 (1998)

Al Aboud K, Al Hawsawi K, Al Aboud D, Al Githami A. Hereditary hypotrichosis simplex: report of a family. *Clin Exp Dermatol* 27: 654-6 (2002)

Al Aboud D, Al Aboud K, Al Hawsawi K, Al Aboud A. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp: a report of 2 additional families. *Sudan J Dermatol* 3: 128-31 (2005)

Alexis AF, Dudda-Subramanya R, Sinha AA. Alopecia areata: autoimmune basis of hair loss. *Eur J Dermatol* 14: 364-70 (2004)

Ali G, Chishti MS, Raza SI, John P, Ahmad W. A mutation in the lipase H (*LIPH*) gene underlie autosomal recessive hypotrichosis. *Hum genet* 121: 319-25 (2007)

Allen E, Yu QC, Fuchs E. Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *J Cell Biol* 133: 1367-82 (1996)

An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 273: 7906-10 (1998)

Anliker B & Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279: 20555-8 (2004)

Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 15: 477-89 (2004)

- Argyris TS. The effect of wounds on adjacent growing or resting hair follicles in mice. *AMA Arch Pathol* 61: 31-6 (1956)
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. In: Current protocols in molecular biology. Vol. 5, Unit 28. Cambridge, Massachusetts: John Wiley & Sons Inc. (2001)
- Awgulewitsch A. Hox in hair growth and development. *Naturwissenschaften* 90: 193-211 (2003)
- Azeem Z, Jelani M, Naz G, Tariq M, Wasif N, Kamran-UI-Hassan Naqvi S, Ayub M, Yasinzai M, Amin-Ud-Din M, Wali A, Ali G, Chishti MS, Ahmad W. Novel mutations in G protein-coupled receptor gene (P2RY5) in families with autosomal recessive hypotrichosis (LAH3). *Hum Genet* 123: 515-9 (2008)
- Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 274: 27776-85 (1999)
- Baumer A, Belli S, Trüeb RM, Schinzel A. An autosomal dominant form of hereditary hypotrichosis simplex maps to 18p11.32-p11.23 in an Italian family. *Eur J Hum Genet* 8: 443-8 (2000)
- Beaudoin GM 3rd, Sisk JM, Coulombe PA, Thompson CC. Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14653-8 (2005)
- Bentley-Phillips B & Grace HJ. Hereditary hypotrichosis. A previously undescribed syndrome. *Br J Dermatol* 101:331-9 (1979)
- Betz RC, Lee YA, Bygum A, Brandrup F, Bernal AI, Toribio J, Alvarez JI, Kukuk GM, Ibsen HH, Rasmussen HB, Wienker TF, Reis A, Propping P, Kruse R, Cichon S, Nöthen MM. A gene for hypotrichosis simplex of the scalp maps to chromosome 6p21.3. *Am J Hum Genet* 66: 1979-83 (2000)
- Betz RC, König K, Flaquer A, Redler S, Eigelshoven S, Kortüm AK, Hanneken S, Hillmer A, Tüting T, Lambert J, De Weert J, Kruse R, Lutz G, Blaumeiser B, Nöthen MM. The R620W polymorphism in PTPN22 confers general susceptibility for the development of alopecia areata. *Br J Dermatol* 158: 389-91 (2008)
- Betz RC, Kruse R, Cichon S, Nöthen MM. Hypotrichosis simplex. In: Progress in Monogenic Hair Disorders (ed. Sprecher E.), New York: Nova Science Publishers, pp 43-51 (2006)

Betz RC, Pforr J, Flaquer A, Redler S, Hanneken S, Eigelshoven S, Kortüm AK, Tüting T, Lambert J, De Weert J, Hillmer AM, Schmael C, Wienker TF, Kruse R, Lutz G, Blaumeiser B, Nöthen MM. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and alopecia areata: strong risk factor for a severe course of disease in patients comorbid for atopic disease. *J Invest Dermatol* 127: 2539-43 (2007)

Bieberich CJ, Ruddle FH, Stenn KS. Differential expression of the Hox 3.1 gene in adult mouse skin. *Ann N Y Acad Sci* 642: 346-53 (1991)

Bitgood MJ & McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172: 126-38 (1995)

Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118: 635-48 (2004)

Botchkarev VA, Botchkareva NV, Albers KM, van der Veen C, Lewin GR, Paus R. Neurotrophin-3 involvement in the regulation of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 111: 279-85 (1998a)

Botchkarev VA & Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Investig Dermatol Symp Proc* 8: 46-55 (2003)

Botchkarev VA, Welker P, Albers KM, Botchkareva NV, Metz M, Lewin GR, Bulfone-Paus S, Peters EM, Lindner G, Paus R. A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 153: 785-99 (1998b)

Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. Apoptosis in the Hair Follicle. *J Investig Dermatol* 126: 258-64 (2006)

Botchkareva NV, Botchkarev VA, Albers KM, Metz M, Paus R. Distinct roles for nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in controlling the rate of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 114: 314-20 (2000)

Bowden PE, Hainey SD, Parker G, Jones DO, Zimonjic D, Popescu N, Hodgins MB. Characterization and chromosomal localization of human hair-specific keratin genes and comparative expression during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* 110: 158-64 (1998)

Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1984-9 (2008)

- Buhl AE, Waldon DJ, Miller BF, Brunden MN. Differences in activity of minoxidil and cyclosporin A on hair growth in nude and normal mice. Comparisons of in vivo and in vitro studies. *Lab Invest* 62: 104-7 (1990)
- Cassel D & Selinger Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3307-11 (1977)
- Caubet C, Bousset L, Clemmensen O, Sourigues Y, Bygum A, Chavanas S, Coudane F, Hsu CY, Betz RC, Melki R, Simon M, Serre G. A new amyloidosis caused by fibrillar aggregates of mutated corneodesmosin. *FASEB J* (2010) im Druck
- Chen C, LeBoit PE, Price VH. Woolly hair in 4 members of a Chinese family. *J Am Acad Dermatol* 54: 165-6 (2006)
- Chen J, Baydoun AR, Xu R, Deng L, Liu X, Zhu W, Shi L, Cong X, Hu S, Chen X. Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis. *Stem Cells* 26: 135-45 (2008)
- Cichon S, Anker M, Vogt IR, Rohleder H, Pützstück M, Hillmer A, Farooq SA, Al-Dhafri KS, Ahmad M, Haque S, Rietschel M, Propping P, Kruse R, Nöthen MM. Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia. *Hum Mol Genet* 7: 1671-9 (1998)
- Cichon S, Hillmer AM, Betz RC, Kruse R, Nöthen MM. Congenital Atrichia. In: Progress in Monogenic Hair Disorders (ed. Sprecher E.), New York: Nova Science Publishers, pp 77-90 (2006)
- Chase HB. Growth of the hair. *Physiol Rev* 34: 113-26 (1954)
- Chase HB. Cycles and waves of hair growth. In: Biology of the skin and hair growth (eds. Lyne AG, Short BF) Sydney: Angus and Robertson, pp 461-5 (1965)
- Chauhan M, Rajarathnam K, Yallampalli C. Role of the N-terminal domain of the calcitonin receptor-like receptor in ligand binding. *Biochemistry* 44: 782-9 (2005)
- Choi S, Lee M, Shiu AL, Yo SJ, Aponte GW. Identification of a protein hydrolysate responsive G protein-coupled receptor in enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G98-G112 (2007)
- Cogé F, Guenin SP, Renouard-Try A, Rique H, Ouvry C, Fabry N, Beauverger P, Nicolas JP, Galizzi JP, Boutin JA, Canet E. Truncated isoforms inhibit [3H]prazosin binding and cellular trafficking of native human alpha1A-adrenoceptors. *Biochem J* 343: 231-9 (1999)

- Combates NJ, Chuong CM, Stenn KS, Prouty SM. Expression of two Ig family adhesion molecules in the murine hair cycle: DCC in the bulge epithelia and NCAM in the follicular papilla. *J Invest Dermatol* 109: 672-8 (1997)
- Commo S & Bernard BA. Immunohistochemical analysis of tissue remodelling during the anagen-catagen transition of the human hair follicle. *Br J Dermatol* 137: 31-8 (1997)
- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329-37 (1990)
- Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Mol Med Today* 2: 460-7 (1996)
- Dávalos NO, García-Vargas A, Pforr J, Dávalos IP, Picos-Cárdenas VJ, García-Cruz D, Kruse R, Figuera LE, Nöthen MM, Betz RC. A non-sense mutation in the corneodesmosin gene in a Mexican family with hypotrichosis simplex of the scalp. *Br J Dermatol* 153: 1216-9 (2005)
- Delamere FM, Sladden MJ, Dobbins HM, Leonardi-Bee J. Interventions for alopecia areata. *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD004413 (2008)
- Denton CP, Khan K, Hoyles RK, Shiwen X, Leoni P, Chen Y, Eastwood M, Abraham DJ. Inducible lineage-specific deletion of TbetaRII in fibroblasts defines a pivotal regulatory role during adult skin wound healing. *J Invest Dermatol* 129: 194-204 (2009)
- De Andrade M, Jackow CM, Dahm N, Hordinsky M, Reveille JD, Duvic M. Alopecia areata in families: association with the HLA locus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4: 220-3 (1999)
- De Weert J, Kint A, Geerts ML. Morphological changes in the proximal area of the rat's hair follicle during early catagen. An electron-microscopic study. *Arch Dermatol Res* 272: 79-92 (1982)
- Dirnberger D, Messerschmid M, Baumeister R. An optimized split-ubiquitin cDNA-library screening system to identify novel interactors of the human Frizzled 1 receptor. *Nucleic Acids Res* 36: e37 (2008)
- Dottori M, Leung J, Turnley AM, Pébay A. Lysophosphatidic acid inhibits neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 1146-54 (2008)

- Düzenli S, Redler S, Müller M, Polat M, Dogruer D, Pasternack SM, Betz RC. Identification of a U2HR gene mutation in Turkish families with Marie Unna hereditary hypotrichosis. *Clin Exp Dermatol* 34: e953-6 (2009)
- Ebling FJ, Hale PA, Randall VA. Hormones and hair growth. In: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin (ed. Goldsmith LA), Oxford: Oxford Press, pp 660-9 (1991)
- Ebling FJ & Hervey GR. The activity of hair follicles in parabiotic rats. *J Embryol Exp Morphol* 12: 425-38 (1964)
- Ekholm E & Egelrud T. The expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in human anagen hair follicles: further evidence for its involvement in desquamation-like processes. *Br J Dermatol* 139: 585-90 (1998)
- Entz P, Blaumeiser B, Betz RC, Lambert J, Seymons K, Eigelshoven S, Hanneken S, Kruse R, Nürnberg P, Nagy M, Nöthen MM. Investigation of the HLA-DRB1 locus in alopecia areata. *Eur J Dermatol* 16: 363-7 (2006)
- Falsone SF, Kurkela R, Chiarandini G, Vihko P, Kungl AJ. Ligand affinity, homodimerization, and ligand-induced secondary structural change of the human vitamin D receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1180-5 (2001)
- Ferrando J & Grimalt R. Acquired partial curly hair. *Eur J Dermatol* 9: 544-7 (1999)
- Fetchko M & Stagljar I. Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions. *Methods* 32: 349-62 (2004)
- Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, Aita VM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette JL, Christiano AM. Exposing the human nude phenotype. *Nature* 398: 473-4 (1999)
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-56 (1994)
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18: 79-82 (1997)
- Gebhardt A, Kosan C, Herkert B, Möröy T, Lutz W, Eilers M, Elsässer HP. Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. *J Cell Sci* 120: 2586-93 (2007)

- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Rios C, Trapaidze N, Devi LA. G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med* 79: 226-42 (2001)
- Grams YY, Whitehead L, Lamers G, Sturmman N, Bouwstra JA. On-line diffusion profile of a lipophilic model dye in different depths of a hair follicle in human scalp skin. *J Invest Dermatol* 125: 775-82 (2005)
- Guidetti MS, Fanti PA, Piraccini BM, Barbareschi M, Tosti A. Diffuse partial woolly hair. *Acta Derm Venereol* 75: 141-2 (1995)
- Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78: 1017-25 (1994)
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271: 6384-92 (1996)
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 135: 1071-83 (1996)
- Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB. Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 105: 2861-76 (1987)
- Henle W, Diehl V, Kohn G, zur Hausen H, Henle G. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157: 1064-5 (1967)
- Herzog H, Darby K, Hort YJ, Shine J. Intron 17 of the human retinoblastoma susceptibility gene encodes an actively transcribed G protein-coupled receptor gene. *Genome Res* 6: 858-61 (1996)
- Hess RO & Uno H. Hereditary hypotrichosis of the scalp. *Am J Med Genet* 39: 125-9 (1991)
- Hesse M, Zimek A, Weber K, Magin TM. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* 83: 19-26 (2004)
- Hillmer AM, Brockschmidt FF, Hanneken S, Eigelshoven S, Steffens M, Flaquer A, Herms S, Becker T, Kortüm AK, Nyholt DR, Zhao ZZ, Montgomery GW, Martin NG, Mühleisen TW, Alblas MA, Moebus S, Jöckel KH, Bröcker-Preuss M, Erbel R, Reinartz R, Betz RC, Cichon

- S, Propping P, Baur MP, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM. Susceptibility variants for male-pattern baldness on chromosome 20p11. *Nat Genet* 40: 1279-81 (2008a)
- Hillmer AM, Flaquer A, Hanneken S, Eigelshoven S, Kortüm AK, Brockschmidt FF, Golla A, Metzen C, Thiele H, Kolberg S, Reinartz R, Betz RC, Ruzicka T, Hennies HC, Kruse R, Nöthen MM. Genome-wide scan and fine-mapping linkage study of androgenetic alopecia reveals a locus on chromosome 3q26. *Am J Hum Genet* 82: 737-43 (2008b)
- Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, Brockschmidt FF, Flaquer A, Freudenberg-Hua Y, Jamra RA, Metzen C, Heyn U, Schweiger N, Betz RC, Blaumeiser B, Hampe J, Schreiber S, Schulze TG, Hennies HC, Schumacher J, Propping P, Ruzicka T, Cichon S, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM. Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *Am J Hum Genet* 77: 140-8 (2005)
- Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y, Morikawa R, Ishida M, Kasahara K, Sanai Y, Taguchi R, Aoki J, Arai H. Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J Biol Chem* 278: 49438-47 (2003)
- Hiraoka M, Abe A, Shayman JA. Structure and function of lysosomal phospholipase A2: identification of the catalytic triad and the role of cysteine residues. *J Lipid Res* 46: 2441-7 (2005)
- Hoffman RM. The hair follicle as a gene therapy target. *Nat Biotechnol* 18: 20-1 (2000)
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409: 202-7 (2001)
- Hsieh JC, Sisk JM, Jurutka PW, Haussler CA, Slater SA, Haussler MR, Thompson CC. Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem* 278: 38665-74 (2003)
- Ibsen HHW, Clemmensen OJ, Brandrup F. Familial hypotrichosis of the scalp. Autosomal dominant inheritance in four generations. *Acta Derm Venereol* 71: 349-51 (1991)
- Iseki S, Araga A, Ohuchi H, Nohno T, Yoshioka H, Hayashi F, Noji S. Sonic hedgehog is expressed in epithelial cells during development of whisker, hair, and tooth. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 688-93 (1996)

- Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, Cotsarelis G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447: 316-20 (2007)
- Jave-Suarez LF, Winter H, Langbein L, Rogers MA, Schweizer J. HOXC13 is involved in the regulation of human hair keratin gene expression. *J Biol Chem* 277: 3718-26 (2002)
- Jelani M, Wasif N, Ali G, Chishti MS, Ahmad W. A novel deletion mutation in LIPH gene causes autosomal recessive hypotrichosis (LAH2). *Clin Genet* 74: 184-8 (2008)
- Jin W, Broedl UC, Monajemi H, Glick JM, Rader DJ. Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine. *Genomics* 80: 268-73 (2002)
- Jindo T, Tsuboi R, Takamori K, Ogawa H. Local injection of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) alters cyclic growth of murine hair follicles. *J Invest Dermatol* 110: 338-42 (1998)
- Johnson E. Inherent rhythms of activity in the hair follicle and their control. In: *Short Biology of the Skin and Hair Growth* (eds. Lyne AG, Short BF), Amsterdam: Elsevier, pp 491-505 (1965)
- Jonca N, Guerrin M, Hadjiolova K, Caubet C, Gallinaro H, Simon M, Serre G. Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. *J Biol Chem* 277: 5024-9 (2002)
- Kazantseva A, Goltsov A, Zinchenko R, Grigorenko AP, Abrukova AV, Moliaka YK, Kirillov AG, Guo Z, Lyle S, Ginter EK, Rogaev EI. Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH. *Science* 314: 982-5 (2006)
- Kealey T, Lee CM, Thody AJ, Coaker T. The isolation of human sebaceous glands and apocrine sweat glands by shearing. *Br J Dermatol* 114: 181-8 (1986)
- Kemp EH, McDonagh AJ, Wengraf DA, Messenger AG, Gawkrödger DJ, Cork MJ, Tazi-Ahnini R. The non-synonymous C1858T substitution in the PTPN22 gene is associated with susceptibility to the severe forms of alopecia areata. *Hum Immunol* 67: 535-9 (2006)
- Kligman AM. The human hair cycle. *J Invest Dermatol* 33: 307-16 (1959)
- Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, Levy M, Montagutelli X, Ahmad W, Aita VM, Gordon D, Uitto J, Whiting D, Ott J, Fischer S, Gilliam TC, Jahoda CA, Morris RJ, Panteleyev AA, Nguyen VT, Christiano AM. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 113: 249-60 (2003)

- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7391-5 (1993)
- Koch PJ, Mahoney MG, Cotsarelis G, Rothenberger K, Lavker RM, Stanley JR. Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J Cell Sci* 111: 2529-37 (1998)
- Kohn G & Metzker A. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp. *Clin Genet* 32: 120-4 (1987)
- Konyukhov BV, Malinina NA, Martynova MY. The we gene is a modifier of the wal gene in mice. *Genetika* 40: 968-74 (2004). Übersetzt aus dem Russischen: *Russ J Genet* 40: 789-94 (2004)
- Korge BP, Healy E, Munro CS, Pünter C, Birch-Machin M, Holmes SC, Darlington S, Hamm H, Messenger AG, Rees JL, Traupe H. A mutational hotspot in the 2B domain of human hair basic keratin 6 (hHb6) in monilethrix patients. *J Invest Dermatol* 111: 896-9 (1998)
- Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, Nilsson NE, Norberg A, Hansson S, Owman C, Sillard R, Leeb-Lundberg LM, Olde B. Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 619-28 (2006)
- Kubiak RJ, Yue X, Hondal RJ, Mihai C, Tsai MD, Bruzik KS. Involvement of the Arg-Asp-His catalytic triad in enzymatic cleavage of the phosphodiester bond. *Biochemistry* 40: 5422-32 (2001)
- Kurose H. Galph12 and Galph13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci* 74: 155-61 (2003)
- Kyte J & Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-32 (1982)
- Lantis SD & Pepper MC. Woolly hair nevus. Two case reports and a discussion of unruly hair forms. *Arch Dermatol* 114: 233-8 (1978)
- Lauer AC, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND. Transfollicular drug delivery. *Pharm Res* 12: 179-86 (1995)
- Leclerc EA, Huchenq A, Mattiuzzo NR, Metzger D, Chambon P, Ghyselinck NB, Serre G, Jonca N, Guerrin M. Corneodesmosin gene ablation induces lethal skin-barrier disruption and hair-follicle degeneration related to desmosome dysfunction. *J Cell Sci* 122: 2699-709 (2009)

- Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem* 281: 23589-97 (2006)
- Lee M, Choi S, Halldén G, Yo SJ, Schichnes D, Aponte GW. P2Y5 is a G α _i, G α _{12/13} G Protein Coupled Receptor Activated by Lysophosphatidic Acid that Reduces Intestinal Cell Adhesion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2009) im Druck
- Lemieux J, Maunsell E, Provencher L. Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. *Psycho-Oncology* 17: 317-28 (2008)
- Levy-Nissenbaum E, Betz RC, Frydman M, Simon M, Lahat H, Bakhan T, Goldman B, Bygum A, Pierick M, Hillmer AM, Jonca N, Toribio J, Kruse R, Dewald G, Cichon S, Kubisch C, Guerrin M, Serre G, Nöthen MM, Pras E. Hypotrichosis simplex of the scalp is associated with nonsense mutations in CDSN encoding corneodesmosin. *Nat Genet* 34: 151-3 (2003)
- Li L, Margolis LB, Paus R, Hoffman RM. Hair shaft elongation, follicle growth, and spontaneous regression in long-term, gelatin sponge-supported histoculture of human scalp skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8764-8 (1992)
- Li LF, Fiedler VC, Kumar R. Induction of hair growth by skin irritants and its relation to skin protein kinase C isoforms. *Br J Dermatol* 140: 616-23 (1999)
- Li Q, Schachter JB, Harden TK, Nicholas RA. The 6H1 orphan receptor, claimed to be the p2y5 receptor, does not mediate nucleotide-promoted second messenger responses. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 455-60 (1997)
- Lindner E, Dohadwalla AN, Bhattacharya BK. Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskohli*: Forskolin. *Arzneimittelforschung* 28: 284-9 (1978)
- Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Ling G, van der Veen C, Paus R. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151: 1601-17 (1997)
- Locht C & Antoine R. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* 77: 333-40 (1995)
- Lohse MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179: 171-88 (1993)

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75 (1951)
- Maggio R, Scarselli M, Novi F, Millan MJ, Corsini GU. Potent activation of dopamine D3/D2 heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole. *J Neurochem* 87: 631-41 (2003)
- Manoukian S, Lalatta F, Selicorni A, Tadini G, Cavalli R, Neri G. Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: report of an adult without mental retardation. *Am J Med Genet* 63: 382-5 (1996)
- Matsumoto M, Zhou Y, Matsuo S, Nakanishi H, Hirose K, Oura H, Arase S, Ishida-Yamamoto A, Bando Y, Izumi K, Kiyonari H, Oshima N, Nakayama R, Matsushima A, Hirota F, Mouri Y, Kuroda N, Sano S, Chaplin DD. Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6720-4 (2008)
- Maurer M, Paus R, Czarnetzki BM. Mast cells as modulators of hair follicle cycling. *Exp Dermatol* 4: 266-71 (1995)
- McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 355: 2119-24 (2000)
- Mecklenburg L, Nakamura M, Sundberg JP, Paus R. The nude mouse skin phenotype: the role of Foxn1 in hair follicle development and cycling. *Exp Mol Pathol* 71: 171-8 (2001)
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277: 44925-31 (2002)
- Messenger AG, Bazzi H, Parslew R, Shapiro L, Christiano AM. A missense mutation in the cadherin interaction site of the desmoglein 4 gene underlies localized autosomal recessive hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 125: 1077-9 (2005)
- Messenger AG & Dawber RPR. The physiology and embryology of hair growth. In: *Diseases of the Hair and Scalp* (ed. Dawber R), Oxford: Blackwell Science, p 8 (1997)
- Metzger D & Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24: 71-80 (2001)

- Meves A. Funktion und Aufbau der Haut. In: Intensivkurs Dermatologie (eds. Schmelz A, Schmidt S, Kiep B), München: Elsevier, p 15 (2006)
- Meyer zu Heringdorf D & Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768: 923-40 (2007)
- Millar SE, Willert K, Salinas PC, Roelink H, Nusse R, Sussman DJ, Barsh GS. WNT signaling in the control of hair growth and structure. *Dev Biol* 207: 133-49 (1999)
- Miller J, Djabali K, Chen T, Liu Y, Ioffreda M, Lyle S, Christiano AM, Holick M, Cotsarelis G. Atrichia caused by mutations in the vitamin D receptor gene is a phenocopy of generalized atrichia caused by mutations in the hairless gene. *J Invest Dermatol* 117: 612-7 (2001)
- Milligan G. G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol Pharmacol* 66: 1-7 (2004)
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26: 870-81 (2004)
- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* 22: 411-7 (2004)
- Morris RJ & Potten CS. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J Invest Dermatol* 112: 470-5 (1999)
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M,

Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-62 (2002)

Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 117: 3-15 (2001)

Mullis KB & Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50 (1987)

Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 707-12 (2008)

Nahum S, Pasternack SM, Pforr J, Indelman M, Wollnik B, Bergman R, Nöthen MM, König A, Khamaysi Z, Betz RC, Sprecher E. A large duplication in LIPH underlies autosomal recessive hypotrichosis simplex in four Middle Eastern families. *Arch Dermatol Res* 301: 391-3 (2009)

Naz G, Khan B, Ali G, Azeem Z, Wali A, Ansar M, Ahmad W. Novel missense mutations in lipase H (LIPH) gene causing autosomal recessive hypotrichosis (LAH2). *J Dermatol Sci* 54: 12-6 (2009)

Neild VS, Pegum JS, Wells RS. The association of keratosis pilaris atrophicans and woolly hair, with and without Noonan's syndrome. *Br J Dermatol* 110: 357-62 (1984)

- Nguyen VT, Ndoye A, Shultz LD, Pittelkow MR, Grando SA. Antibodies against keratinocyte antigens other than desmogleins 1 and 3 can induce pemphigus vulgaris-like lesions. *J Clin Invest* 106: 1467-79 (2000)
- Nimchinsky EA, Hof PR, Janssen WG, Morrison JH, Schmauss C. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J Biol Chem* 272: 29229-37 (1997)
- Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 278: 25600-6 (2003)
- Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 9: 2761-6 (2000)
- Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83: 101-30 (2003)
- Olsen EA, Messenger AG, Shapiro J, Bergfeld WF, Hordinsky MK, Roberts JL, Stough D, Washenik K, Whiting DA. Evaluation and treatment of male and female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 52: 301-11 (2005)
- Opel KL, Fleishaker EL, Nicklas JA, Buel E, McCord BR. Evaluation and quantification of nuclear DNA from human telogen hairs. *J Forensic Sci* 53: 853-7 (2008)
- Oro AE & Scott MP. Splitting hairs: dissecting roles of signaling systems in epidermal development. *Cell* 95: 575-8 (1998)
- Osawa S, Jo R, Weiss ER. Phosphorylation of GRK7 by PKA in cone photoreceptor cells is regulated by light. *J Neurochem* 107: 1314-24 (2008)
- Pajtas J. Total familial hereditary hypotrichosis in four generations. *Dermatologica* 101: 90-3 (1950)
- Panteleyev AA, van der Veen C, Rosenbach T, Müller-Röver S, Sokolov VE, Paus R. Towards defining the pathogenesis of the hairless phenotype. *J Invest Dermatol* 110: 902-7 (1998)

- Pasternack SM, Murugusundram S, Eigelshoven S, Müller M, Kruse R, Lehmann P, Betz RC. Novel mutations in the P2RY5 gene in one Turkish and two Indian patients presenting with hypotrichosis and woolly hair. *Arch Dermatol Res* 301: 621-4 (2009a)
- Pasternack SM, von Kügelgen I, Aboud KA, Lee YA, Rüschemdorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 40: 329-34 (2008)
- Pasternack SM, von Kügelgen I, Müller M, Oji V, Traupe H, Sprecher E, Nöthen MM, Janecke AR, Betz RC. In Vitro Analysis of LIPH Mutations Causing Hypotrichosis Simplex: Evidence Confirming the Role of Lipase H and Lysophosphatidic Acid in Hair Growth. *J Invest Dermatol* 129: 2772-6 (2009b)
- Paus R & Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 341: 491-7 (1999)
- Paus R, Heinzelmann T, Schultz KD, Furkert J, Fechner K, Czarnetzki BM. Hair growth induction by substance P. *Lab Invest* 71: 134-40 (1994)
- Paus R, Müller-Röver S, Botchkarev VA. Chronobiology of the hair follicle: hunting the "hair cycle clock". *J Invest Dermatol Symp Proc* 4: 338-45 (1999)
- Pecoraro V, Astore I, Barman JM. Cycle of the scalp hair of the new-born child. *J Invest Dermatol* 43: 145-7 (1964)
- Petersen H. Kongenitale familiäre hereditäre Alopezie auf der Basis eines Hypothyreoidismus. *Dermatologische Zeitschrift* 22: 202-8 (1915)
- Pethö-Schramm A, Müller HJ, Paus R. FGF5 and the murine hair cycle. *Arch Dermatol Res* 288: 264-6 (1996)
- Petukhova L, Sousa EC Jr, Martinez-Mir A, Vitebsky A, Dos Santos LG, Shapiro L, Haynes C, Gordon D, Shimomura Y, Christiano AM. Genome-wide linkage analysis of an autosomal recessive hypotrichosis identifies a novel P2RY5 mutation. *Genomics* 92: 273-8 (2008)
- Philpott MP, Green MR, Kealey T. Human hair growth in vitro. *J Cell Sci* 97: 463-71 (1990)
- Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Whole hair follicle culture. *Dermatol Clin* 14: 595-607 (1996)

- Piazza GA, Ritter JL, Baracka CA. Lysophosphatidic acid induction of transforming growth factors alpha and beta: modulation of proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes and mouse skin. *Exp Cell Res* 216: 51-64 (1995)
- Pinkus H, Iwasaki T, Mishima Y. Outer root sheath keratinization in anagen and catagen of the mammalian hair follicle. A seventh distinct type of keratinization in the hair follicle: trichilemmal keratinization. *J Anat* 133: 19-35 (1981)
- Porter RM. Mouse models for human hair loss disorders. *J Anat* 202: 125-31 (2003)
- Potter GB, Beaudoin GM 3rd, DeRenzo CL, Zarach JM, Chen SH, Thompson CC. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. *Genes Dev* 15: 2687-701 (2001)
- Prasad GK. Familial woolly hair. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 68: 157 (2002)
- Redler S, Brockschmidt FF, Forstbauer L, Giehl KA, Herold C, Eigelshoven S, Hanneken S, De Weert J, Lutz G, Wolff H, Kruse R, Blaumeiser B, Böhm M, Becker T, Nöthen MM, Betz RC. The TRAF1/C5 locus confers risk for familial and severe alopecia areata. *Br J Dermatol* 162: 866-9 (2010)
- Rexbye H, Petersen I, Iachina M, Mortensen J, McGue M, Vaupel JW, Christensen K. Hair loss among elderly men: etiology and impact on perceived age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 1077-82 (2005)
- Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CA. Transgender induction of hair follicles. *Nature* 402: 33-4 (1999)
- Rickman L, Simrak D, Stevens HP, Hunt DM, King IA, Bryant SP, Eady RA, Leigh IM, Arnemann J, Magee AI, Kelsell DP, Buxton RS. N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Hum Mol Genet* 8: 971-6 (1999)
- Riobo NA & Manning DR. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci* 26: 146-54 (2005)
- Roberts JL, Whiting DA, Henry D, Basler G, Woolf L. Marie Unna congenital hypotrichosis: clinical description, histopathology, scanning electron microscopy of a previously unreported large pedigree. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4: 261-7 (1999)
- Rodríguez Díaz E, Fernández Blasco G, Martín Pascual A, Armijo M. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp. *Dermatology* 191: 139-41 (1995)

- Rossi DJ, Londesborough A, Korsisaari N, Pihlak A, Lehtonen E, Henkemeyer M, Mäkelä TP. Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking Mat1. *EMBO J* 20: 2844-56 (2001)
- Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, Peters C. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 14: 2075-86 (2000)
- Rougier A, Dupuis D, Lotte C, Roguet R, Wester RC, Maibach HI. Regional variation in percutaneous absorption in man: measurement by the stripping method. *Arch Dermatol Res* 278: 465-9 (1986)
- Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M. Human hair cycle. *J Invest Dermatol* 54: 65-81 (1970)
- Sambrook J & Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol., New York: Cold Spring Harbor Press (2001)
- Sanders DA, Philpott MP, Nicolle FV, Kealey T. The isolation and maintenance of the human pilosebaceous unit. *Br J Dermatol* 131: 166-76 (1994)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7 (1977)
- Sato N, Leopold PL, Crystal RG. Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J Clin Invest* 104: 855-64 (1999)
- Schaffer JV, Bazzi H, Vitebsky A, Witkiewicz A, Kovich OI, Kamino H, Shapiro LS, Amin SP, Orlow SJ, Christiano AM. Mutations in the desmoglein 4 gene underlie localized autosomal recessive hypotrichosis with monilethrix hairs and congenital scalp erosions. *J Invest Dermatol* 126: 1286-91 (2006)
- Schmidt-Ullrich R & Paus R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays* 27: 247-61 (2005)
- Shimomura Y, Garzon MC, Kristal L, Shapiro L, Christiano AM. Autosomal recessive woolly hair with hypotrichosis caused by a novel homozygous mutation in the P2RY5 gene. *Exp Dermatol* 18: 218-21 (2009a)
- Shimomura Y, Sakamoto F, Kariya N, Matsunaga K, Ito M. Mutations in the desmoglein 4 gene are associated with monilethrix-like congenital hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 126: 1281-5 (2006)

- Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, Shapiro L, Petukhova L, Gordon D, Christiano AM. Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair. *Nat Genet* 40: 335-9 (2008)
- Shimomura Y, Wajid M, Petukhova L, Shapiro L, Christiano AM. Mutations in the lipase H gene underlie autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 129: 622-8 (2009b)
- Shimomura Y, Wajid M, Zlotogorski A, Lee YJ, Rice RH, Christiano AM. Founder mutations in the lipase H gene in families with autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 129: 1927-34 (2009c)
- Siehl S. Cell-based assays in GPCR drug discovery. *Biotechnol J* 3: 471-83 (2008)
- Silver AF & Chase HB. DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy (telogen) and activation (early anagen). *Dev Biol* 21: 440-51 (1970)
- Sinclair R. Diffuse hair loss. *Int J Dermatol* 38 Suppl 1: 8-18. Review (1999)
- Sonoda H, Aoki J, Hiramatsu T, Ishida M, Bandoh K, Nagai Y, Taguchi R, Inoue K, Arai H. A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 277: 34254-63 (2002)
- Sordella R, Classon M, Hu KQ, Matheson SF, Brouns MR, Fine B, Zhang L, Takami H, Yamada Y, Settleman J. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev Cell* 2: 553-65 (2002)
- Sorokina JD & Blandova ZK. Hereditary changes of the skin and coat in BALB/C-waY mice. In: Biological characterization of laboratory animals and extrapolation of experimental data to human. Proc. All-Union Conf. Moscow, pp 79-80 (1980)
- Sprecher E. Disentangling the roots of inherited hair disorders. *Nat Genet* 40: 265-6 (2008)
- Sprecher E, Bergman R, Richard G, Lurie R, Shalev S, Petronius D, Shalata A, Anbinder Y, Leibu R, Perlman I, Cohen N, Szargel R. Hypotrichosis with juvenile macular dystrophy is caused by a mutation in CDH3, encoding P-cadherin. *Nat Genet* 29: 134-6 (2001)
- Sprecher E, Lestringant GG, Szargel R, Bergman R, Labay V, Frossard PM, Friedman-Birnbaum R, Cohen N. Atrichia with papular lesions resulting from a nonsense mutation within the human hairless gene. *J Invest Dermatol* 113: 687-90 (1999)

- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5187-92 (1998)
- Stenn KS & Paus R. What controls hair follicle cycling? *Exp Dermatol* 8: 229-33; discussion 233-6 (1999)
- Stenn KS & Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81: 449-94 (2001)
- Stough D, Stenn K, Haber R, Parsley WM, Vogel JE, Whiting DA, Washenik K. Psychological effect, pathophysiology, and management of androgenetic alopecia in men. *Mayo Clin Proc* 80: 1316-22 (2005)
- Sundberg JP, Peters EM, Paus R. Analysis of hair follicles in mutant laboratory mice. *J Investig Dermatol Symp Proc* 10: 264-70 (2005)
- Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 861-6 (2007)
- Takahashi T & Kamimura A. Cyclosporin A promotes hair epithelial cell proliferation and modulates protein kinase C expression and translocation in hair epithelial cells. *J Invest Dermatol* 117: 605-11 (2001)
- Takahashi T, Kamimura A, Hamazono-Matsuoka T, Honda S. Phosphatidic acid has a potential to promote hair growth in vitro and in vivo, and activates mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hair epithelial cells. *J Invest Dermatol* 121: 448-56 (2003)
- Taylor AE. Hereditary woolly hair with ocular involvement. *Br J Dermatol* 123: 523-5 (1990)
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102: 451-61 (2000)
- Thoreson WB, Khandalavala BN, Manahan RG, Polyak IA, Liu JL, Chacko DM. Lysophosphatidic acid stimulates proliferation of human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 16: 698-702 (1997)
- Tigyi G, Dyer DL, Miledi R. Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1908-12 (1994)

- Tobin AB. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: 167-76 (2008)
- Tobin DJ. Woolly antics between the sheaths. *J Invest Dermatol* 129: 540-2 (2009)
- Toribio J & Quiñones PA. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp. Evidence for autosomal dominant inheritance. *Br J Dermatol* 91: 687-96 (1974)
- Tosti A, Misciali C, Piraccini BA, Fanti PA, Barbareschi M, Ferretti RM. Woolly hair, palmoplantar keratoderma, and cardiac abnormalities: report of a family. *Arch Dermatol* 130: 522-4 (1994)
- Trotter M. The life cycles of hair in selected regions of the body. *Am J Phys Antrop* 7: 427-37 (1924)
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303: 359-63 (2004)
- Unna M. Über hypotrichosis congenita hereditaria. *Dermatol Wochenschr* 81: 1167-78 (1925)
- van Leeuwen FN, Giepmans BN, van Meeteren LA, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem Soc Trans* 31: 1209-12 (2003)
- van Steensel M, Smith FJ, Steijlen PM, Kluijft I, Stevens HP, Messenger A, Kremer H, Dunnill MG, Kennedy C, Munro CS, Doherty VR, McGrath JA, Covello SP, Coleman CM, Uitto J, McLean WH. The gene for hypotrichosis of Marie Unna maps between D8S258 and D8S298: exclusion of the hr gene by cDNA and genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 65: 413-9 (1999)
- van Steensel MA, Koedam MI, Swinkels OQ, Rietveld F, Steijlen PM. Woolly hair, premature loss of teeth, nail dystrophy, acral hyperkeratosis and facial abnormalities: possible new syndrome in a Dutch kindred. *Br J Dermatol* 145: 157-61 (2001)
- van Steensel MA, Steijlen PM, Bladergroen RS, Vermeer M, van Geel M. A missense mutation in the type II hair keratin hHb3 is associated with monilethrix. *J Med Genet* 42: e19 (2005)
- Vázquez MR, Rodríguez RR, Tapia AG, Diez LI. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp. *Pediatr Dermatol* 19: 148-50 (2002)
- von Kügelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110: 415-32 (2006)

- Wahlberg JE. Transepidermal or transfollicular absorption? In vivo and in vitro studies in hairy and non-hairy guinea pig skin with sodium (^{22}Na) and mercuric (^{203}Hg) chlorides. *Acta Derm Venereol* 48: 336-44 (1968)
- Wajid M, Bazzi H, Rockey J, Lubetkin J, Zlotogorski A, Christiano AM. Localized autosomal recessive hypotrichosis due to a frameshift mutation in the desmoglein 4 gene exhibits extensive phenotypic variability within a Pakistani family. *J Invest Dermatol* 127: 1779-82 (2007)
- Wali A, Chishti MS, Ayub M, Yasinzai M, Kafaitullah, Ali G, John P, Ahmad W. Localization of a novel autosomal recessive hypotrichosis locus (LAH3) to chromosome 13q14.11-q21.32. *Clin Genet* 72: 23-9 (2007)
- Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, Liliom K, Tigyi G, Parrill AL. A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J Biol Chem* 276: 49213-20 (2001)
- Wang PG, Gao M, Cui Y, Xiao FL, Zhu YG, Ren YQ, Yan KL, Du WH, Zhang KY, Yang S, Huang W, Zhang XJ. A new clinical variant of hereditary localized alopecia: report of a Chinese family mapped to chromosome 2p25.1-2p23.2. *J Invest Dermatol* 127: 1776-9 (2007)
- Wasserman D, Guzman-Sanchez DA, Scott K, McMichael A. Alopecia areata. *Int J Dermatol* 46: 121-31 (2007)
- Webb TE, Kaplan MG, Barnard EA. Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y5. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 105-10 (1996)
- Weiner N. Targeted follicular delivery of macromolecules via liposomes. *Int J Pharm* 162: 29-38 (1998)
- Wen Y, Liu Y, Xu Y, Zhao Y, Hua R, Wang K, Sun M, Li Y, Yang S, Zhang XJ, Kruse R, Cichon S, Betz RC, Nöthen MM, van Steensel MA, van Geel M, Steijlen PM, Hohl D, Huber M, Dunnill GS, Kennedy C, Messenger A, Munro CS, Terrinoni A, Hovnanian A, Bodemer C, de Prost Y, Paller AS, Irvine AD, Sinclair R, Green J, Shang D, Liu Q, Luo Y, Jiang L, Chen HD, Lo WH, McLean WH, He CD, Zhang X. Loss-of-function mutations of an inhibitory upstream ORF in the human hairless transcript cause Marie Unna hereditary hypotrichosis. *Nat Genet* 41: 228-33 (2009)

- Winter H, Rogers MA, Gebhardt M, Wollina U, Boxall L, Chitayat D, Babul-Hirji R, Stevens HP, Zlotogorski A, Schweizer J. A new mutation in the type II hair cortex keratin hHb1 involved in the inherited hair disorder monilethrix. *Hum Genet* 101: 165-9 (1997b)
- Winter H, Rogers MA, Langbein L, Stevens HP, Leigh IM, Labrèze C, Roul S, Taieb A, Krieg T, Schweizer J. Mutations in the hair cortex keratin hHb6 cause the inherited hair disease monilethrix. *Nat Genet* 16: 372-4 (1997a)
- Wise F. Woolly hair nevus. A peculiar form of birthmark of the hair of the scalp, hitherto undescribed, with report of 2 cases. *Med J Rec* 125: 545 (1927)
- Xiao FL, Zhou FS, Liu JB, Yan KL, Cui Y, Gao M, Liang YH, Sun LD, Zhou SM, Zhu YG, Zhang XJ, Yang S. Association of HLA-DQA1 and DQB1 alleles with alopecia areata in Chinese Hans. *Arch Dermatol Res* 297: 201-9 (2005)
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334: 494-8 (1988)
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem* 284: 17731-41 (2009)
- Yin H, Chu A, Li W, Wang B, Shelton F, Otero F, Nguyen DG, Caldwell JS, Chen YA. Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay. *J Biol Chem* 284: 12328-38 (2009)
- Zhang Z, Liu Z, Meier KE. Lysophosphatidic acid as a mediator for proinflammatory agonists in a human corneal epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: 1089-98 (2006)
- Zlotogorski A, Marek D, Horev L, Abu A, Ben-Amitai D, Gerad L, Ingber A, Frydman M, Reznik-Wolf H, Vardy DA, Pras E. An autosomal recessive form of monilethrix is caused by mutations in DSG4: clinical overlap with localized autosomal recessive hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 126: 1292-6 (2006)

12. Anhang

12.1 Tabellen

Tab. 12.1.1: Initialer Ausschluss der zum damaligen Zeitpunkt bekannten Kandidaten-Loci für Haarlosigkeit durch Kopplungsanalyse mittels Mikrosatelliten in HS-Familie 1.

Krankheits-Gen	Chromosomale Lokalisation	Literatur
<i>Corneodesmosin (CDSN)</i>	6p21.3	Levy-Nissenbaum <i>et al.</i> 2003
<i>Hairless (HR)</i>	8p21	Ahmad <i>et al.</i> 1998 Cichon <i>et al.</i> 1998
<i>Winged-helix-nude (WHN)</i>	17q11.2	Frank <i>et al.</i> 1998
<i>Cadherin 3 (CDH3)</i>	16q22.1	Sprecher <i>et al.</i> 2001
?	18p11	Baumer <i>et al.</i> 2000
<i>Vitamin D receptor (VDR)</i>	12q13.11	Miller <i>et al.</i> 2001
<i>Keratin-Gen-Cluster (KRT)</i>	Chromosom 12 & 17	Hesse <i>et al.</i> 2004

Tab. 12.1.2: Berechnete *two-point* LOD-Scores zwischen HS und den angegebenen Markern auf Chromosom 13 nach genomweiter Kopplungsanalyse der HS-Familie 1.

Chr.	Pos.	Locus	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40
13	14.7	D13S221	-15,158	-3,310	-1,993	-1,294	-0,849	-0,544	-0,329	-0,079
13	27.3	D13S171	-2,263	0,233	0,338	0,331	0,287	0,228	0,165	0,053
13	27.9	D13S1493	-5,271	-0,148	0,184	0,276	0,276	0,232	0,169	0,049
13	30.7	D13S220	1,338	1,193	1,050	0,906	0,760	0,610	0,456	0,156
13	35.3	D13S894	0,004	0,003	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000
13	40.4	D13S263	1,221	1,063	0,913	0,770	0,632	0,497	0,364	0,119
13	41.0	D13S325	0,004	0,003	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000
13	43.7	D13S291	1,013	0,907	0,801	0,692	0,580	0,463	0,342	0,112
13	47.5	D13S1325	2,658	2,352	2,049	1,749	1,448	1,146	0,841	0,274
13	47.5	D13S788	1,338	1,193	1,050	0,906	0,760	0,610	0,456	0,156
13	47.5	D13S262	2,788	2,455	2,127	1,805	1,488	1,172	0,859	0,279
13	47.5	D13S153	1,013	0,907	0,801	0,692	0,580	0,463	0,342	0,112
13	51.2	D13S1309	1,338	1,193	1,050	0,906	0,760	0,610	0,456	0,156
13	51.9	D13S1317	2,627	2,308	1,995	1,687	1,382	1,078	0,778	0,240
13	56.6	D13S800	-3,288	-0,639	-0,386	-0,253	-0,168	-0,109	-0,067	-0,016
13	57.3	D13S156	-3,166	0,433	0,701	0,729	0,661	0,545	0,407	0,132

Tab. 12.1.3: Ausschluss von positionellen Kandidatengenen in der chromosomalen Region 13q14.11-13q21.33 durch direktes Sequenzieren der angegebenen Gene.

Forkhead box protein O1A (<i>FOXO1A</i>)
E74-like factor 1 (Ets domain transcription factor) (<i>ELF1</i>)
Kelch repeat and BTB (POZ) domain-containing 6 (<i>KBTBD6</i>)
Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7 (<i>KBTBD7</i>)
Response gene to complement 32 (<i>RGC32</i>)
Homo sapiens DGKH-1 mRNA for diacylglycerol kinase eta1 (<i>DGKH</i>)
A-kinase anchor protein 11 (<i>AKAP11</i>)
Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (<i>TNFSF11</i>)
Epithelial stromal interaction 1 (<i>EPST11</i>)
DnaJ homolog subfamily C member 15 (<i>DNAJC15</i>)
Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1 (<i>ENOX1</i>)
TSC22 domain family protein 1 (<i>TSC22D1</i>)
General transcription factor IIF, polypeptide 2 (<i>GTF2F2</i>)
Potassium channel tetramerisation domain (<i>KCTD4</i>)
Tumor protein, translationally-controlled 1 (<i>TPT1</i>)
AK057244 (weakly similar to TRICHOHYALIN)
L-plastin (<i>LCP1</i>)
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (<i>HTR2A</i>)
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4 (Vitamin D3 receptor-interacting protein complex 36 kDa component) (<i>MED4/DRIP36</i>)
Regulator of chromosome condensation and BTB (<i>RCBTB2</i>)
Fibronectin type-III domain-containing protein 3a (<i>FNDC3A</i>)
Motilin receptor (G protein-coupled receptor 38) (<i>MLNR</i>)
PHD finger protein 11 (<i>PHF11</i>)
ADP-ribosylation factor-like protein 11 (<i>ARL11</i>)
Emopamil binding related protein, delta8-delta7 (<i>EBPL</i>)
Tripartite motif-containing protein 13 (Ret finger protein 2) (<i>TRIM13</i>)
Putative potassium channel regulatory protein (<i>KCNRG</i>)
Integrator complex subunit 6 isoform b (<i>INTS6</i>)
NIMA-related kinase 3 (<i>NEK3</i>)
Thrombospondin type I domain-containing 1 (<i>THSD1</i>)
Cytoskeleton-associated protein 2 (<i>CKAP2</i>)
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog (<i>SUGT1</i>)
Protocadherin-8 isoform 1 precursor (<i>PCDH8</i>)
Protocadherin-17 precursor (<i>PCDH17</i>)
Diaphanous homolog 3 isoform a (<i>DIAPH3</i>)
Protocadherin-20 precursor (<i>PCDH20</i>)
Protocadherin-9 precursor (<i>PCDH9</i>)

Tab. 12.1.4: Substanzen, die zu keinem Anstieg der Luziferase-Aktivität beim *cAMP response element* gesteuerten Luziferase Reporter-Gen-Assay in Flp-In-CHO-Zellen führten, welche den P2Y5-Rezeptor stabil exprimieren. Die Zellen wurden 48 h vor dem Experiment transient mit dem *pCRE-luc*-Vektor transfiziert und dann für 3 h mit der entsprechenden Substanz inkubiert. Angegeben ist jeweils die höchste getestete Konzentration. Alle Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich erworben.

Substanz	Höchste getestete Konzentration
Adenin	10 µM
Adenosin	10 µM
Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)	10 µM
Adenosin-5'-monophosphat (AMP)	100 µM
Cytidin-5'-triphosphat (CTP)	10 µM
N-Formyl-Met-Leu-Phe	10 µM
Zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP)	10 µM
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)	10 µM
1-Hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholin (lyso-PAF)	10 µM*
Inosin-5'-triphosphat (ITP)	100 µM
Leukotrien C4 (LTC)	1 µM
Lysophosphatidylcholin (LPC)	10 µM
Serotonin	10 µM
Sphingosin-1-phosphat (S1P)	10 µM
Phosphatidsäure	10 µM
Phosphoryletholamin	10 µM
Platelet activating factor (PAF)	10 µM
Uridin	10 µM
Uridin-5'-diphosphatglukose (UDPG)	10 µM

*führte zu einer Verringerung in der Reporter-Gen-Aktivität

Tab. 12.1.5: Mikrosatelliten-Primer⁴. Die folgenden Primer wurden für die Kopplungsanalyse auf Chromosom 13 verwendet. Die genomweite Kopplungsanalyse wurde nur mit DNA der HS-Familie 1 durchgeführt, eine Kopplung lag zwischen den rekombinanten Markern D13S1233 und D13S634 vor. Weitere Mikrosatelliten-Studien wurden mit DNA der HS-Familien 2 und 3 in der gekoppelten Region durchgeführt, um einen möglichen Gründer-Effekt zu untersuchen.

Primer-Bezeichnung	Sequenz	Fam 1	Fam 2+3
D13S171F	5'-CCTACCATTGACACTCTCAG-3'	x	
D13S171R	5'-TAGGGCCATCCATTCT-3'	x	
D13S1493F	5'-ACCTGTTGTATGGCAGCAGT-3'	x	
D13S1493R	5'-GGTTGACTCTTTCCCAACT-3'	x	
D13S1293F	5'-TGCAGGTGGGAGTCAA-3'	x	
D13S1293R	5'-AAATAACAAGAAGTGACCTTCCTA-3'	x	
D13S220F	5'-CCAACATCGGGAAGT-3'	x	
D13S220R	5'-TGCATTCTTTAAGTCCATGTC-3'	x	
D13S305F	5'-TTGAGGACCTGTGCTTACG-3'	x	
D13S305R	5'-TTATAGAGCAGTTAAGGCACA-3'	x	
D13S1253F	5'-CCTGCATTTGTGTACGTGT-3'	x	
D13S1253R	5'-CAGAGCCGTGGTAGTATATTTTT-3'	x	
D13S1233F	5'-AGGACTANAGATGAATGCTC-3'	x	x
D13S1233R	5'-GACATGACTCCATGTTTGGT-3'	x	x
D13S263F	5'-CCTGGCCTGTTAGTTTTATTGTTA-3'	x	x
D13S263R	5'-CCCAGTCTTGGGTATGTTTTTA-3'	x	x
D13S1312F	5'-TCTTCCCAGAATATATGGGA-3'		x
D13S1312R	5'-AGCTGTAAAAGTGTGTTTGATGT-3'		x
D13S153F	5'-AGCATTGTTTCATGTTGGTG-3'		x
D13S153R	5'-CAGCAGTGAAGGTCTAAGCC-3'		x
D13S165F	5'-GTTTCGCCAAGCCTGTT-3'		x
D13S165R	5'-GTTGACAATAAAATACGCCACA-3'		x
D13S1305F	5'-GATGGCACCATTGCAC-3'		x
D13S1305R	5'-CAGCACATCCAAACAAGG-3'		x
D13S176F	5'-CTGTGGGATTCCTTAGTGATAC-3'		x
D13S176R	5'-ATATTCAGACAAAAGCCAAGTTA-3'		x
D13S1317F	5'-CTTGAAACCAACAAGTCAC-3'	x	x
D13S1317R	5'-ATTTTGCCACCTAGAACGG-3'	x	x
D13S1231F	5'-ACAGTTTTTCGAGGCCATATC-3'	x	x
D13S1231R	5'-GGTTAAATAAATCTCCATCCAGAAG-3'	x	x
D13S634F	5'-TCCAGATAGGCAGATTCAAT-3'	x	x
D13S634R	5'-CCTTCTTCTTCCCATTGATA-3'	x	x
D13S1296F	5'-TGCAGAAATGTGAGCC-3'	x	
D13S1296R	5'-TCCACCTAGAGCAACTACC-3'	x	
D13S279F	5'-TGGTTTGTGTCAGAAAGCACAC-3'	x	
D13S279R	5'-TTGGGCCTTGTCACCTTCATA-3'	x	
D13S1318F	5'-GGCAAAGCCTTGCTCTTAAT-3'	x	
D13S1318R	5'-GGCTGTGCTCTTCCAAAATA-3'	x	
D13S800F	5'-AGGGATCTTCAGAGAAACAGG-3'	x	
D13S800R	5'-TGACACTATCAGCTCTCTGGC-3'	x	
D13S156F	5'-ATTAGCCCAGGTATGGTGAC-3'	x	
D13S156R	5'-GCTGTGGTATGAGTTACTTAAACAC-3'	x	

⁴ Reihenfolge der Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 13 vom Zentromer zum Telomer laut *UCSC genome browser* (<http://genome.ucsc.edu>)

Tab. 12.1.6: Primer zur Amplifikation, Sequenzierung, Expressionsanalyse und Klonierung des humanen *P2RY5*-Gens, zur *P2RY5*-Sondenherstellung und zur Expressionsanalyse von humanen LPA-Rezeptoren (inklusive Kontroll-Genen).

Primer-Bezeichnung	Sequenz
Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden und untranslatierten Regionen von <i>P2RY5</i>	
P2RY5 Ex1.1F	5'-TGGAGGTTATAGAGGTTATAATC-3'
P2RY5 Ex1.2F	5'-TTATACCAACATGTACGGAAGC-3'
P2RY5 Ex1R	5'-TGTTAATTTCTTTTGGAGGTGG-3'
P2RY5 5'UTR 7F	5'-TTGTGTGTCTTTAAGACCCTCC-3'
P2RY5 5'UTR 7R	5'-TCCTGCCTGGGCCGAGAGC-3'
P2RY5 5'UTR 6F	5'-AAATGATACCGATAGACTTATGG-3'
P2RY5 5'UTR 6R	5'-TCTTTGATGACACCTATGAATAGC-3'
P2RY5 5'UTR 5F	5'-TTATAGGTGTGAACCACAGATCC-3'
P2RY5 5'UTR 5R	5'-TGTTGCCATAATGACCTTGTAG-3'
P2RY5 5'UTR 4F	5'-TGGGGTTTCTGTGTGGAAGTCC-3'
P2RY5 5'UTR 3R	5'-TCTCTATTTCCAACCTGAGGTACCC-3'
P2RY5 5'UTR 2R	5'-AATGGATAGATCACTATTTGTTG-3'
P2RY5 5'UTR 1F	5'-AGGAAGTGCAAACAACTGGG-3'
P2RY5 5'UTR 1R	5'-AGCAGTGGGAGCTGTTAACG-3'
P2RY5 3'UTR R	5'-AAAGGAATTCAAAGACATTACAG-3'
Primer für die Expressionsanalyse von LPA-Rezeptoren (inklusive der Kontroll-Gene <i>GAPDH</i> und <i>KRT15</i>)	
LPA1 Expr F	5'-AGCATGACTTCGATCTGATCAGC-3'
LPA1 Expr R	5'-TGAGATAGAAGTAGGCCAACCC-3'
LPA2 Expr F	5'-ATTTTCTTCTACGTGCGCGG-3'
LPA2 Expr R	5'-TGTATAGTGGACAGACTCGCGG-3'
LPA3 Expr F	5'-ATCTACGTGTACGTCAAGAGG-3'
LPA3 Expr R	5'-TTGTAGGAGTAGATGATGGGG-3'
LPA4 Expr F	5'-TCGTAATAATTAGGACTAGGAGG-3'
LPA4 Expr R	5'-ACAACAGTTCAGAGTTGCAAGG-3'
LPA5 Expr F	5'-TGTAATACTTTAGCGCCGAGGG-3'
LPA5 Expr R	5'-AGAACGAGAGGCGTTGGGAGTC-3'
P2RY5 Expr F	5'-TGGAGGTTATAGAGGTTATAATC-3'
P2RY5 Expr R	5'-TGTTAATTTCTTTTGGAGGTGG-3'
GAPDH Expr F	5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'
GAPDH Expr R	5'-TCCTCTTGTGCTCTTGCTGGG-3'
KRT15 Expr F	5'-GGGTTTTGGTGGTGGCTTTG-3'
KRT15 Expr R	5'-TCGTGGTCTTCTTCAGGTAGGC-3'
Primer zur Klonierung von <i>P2RY5</i> (V5 N- [Zeile 1-4] und C-terminal [Zeile 5-8]) (eingefügte Restriktionsschnittstellen sind in fett dargestellt)	
Klonierung F V5 + HindIII	5'-CGAAGCTTCCGCCGCCATGGGTAAGCCTATCCC TAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGATGGTAAG CGTTAACAGCTCCC-3'
Klonierung Wildtyp R + XhoI + Stop	5'-GCCTCGAGTCAGGCAGCAGATTCATTGTC-3'
Klonierung c.463C>T R + XhoI +	5'-GCCTCGAGCTAAACAAAAACGGCGGGTGC-3'

Stop	
Klonierung c.373_374delAA R + XhoI + Stop	5'-GCCTCGAGTTACCCTGAGAGTGGGTAGAC-3'
Klonierung F + HindIII	5'-CGAAGCTTCCGCCGCCATGGTAAGCGTTAACAGCTC-3'
Klonierung Wildtyp R + XhoI	5'-CGCTCGAGGCAGCAGATTCATTGTCAAATATC-3'
Klonierung c.463C>T R + XhoI	5'-CGCTCGAGGCAACAAAAACGGCGGGTGCACCTCC-3'
Klonierung c.373_374delAA R + XhoI	5'-CGCTCGAGGCCCCTGAGAGTGGGTAGACTGAAC-3'
Primer zur <i>in-vitro</i> Transkription/Translation von <i>P2RY5</i>	
P2RY5 PTT Ex1F	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCA CCATGGTAAGCGTTACCAGCTCCC-3'
P2RY5 Ex1R	5'-TGTTAATTTCTTTTGGAGGTGG-3'
Primer zur <i>P2RY5</i>-Sondenherstellung für die Hybridisierung des <i>Multiple Tissue Expression (MTE) Array 3</i>	
Sonde1 F	5'-ATCCAAAGATCCAGATAATTTGC-3'
Sonde1 R	5'-GTTTTCCATGTGGCTTCTGG-3'
Sonde2 F	5'-TTATACCAACATGTACGGAAGC-3'
Sonde2 R	5'-TTGCTTCTACTTAATGTAACAGG-3'

Tab. 12.1.7: Primer zur Amplifikation, Sequenzierung, Expressionsanalyse und Klonierung des murinen *P2ry5*-Gens und für die Analyse von murinen Lpa-Rezeptoren (inklusive Kontroll-Gen *Gapdh*).

Primer-Bezeichnung	Sequenz
Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden und untranslatierten Regionen des murinen <i>P2ry5</i>-Gens	
m P2ry5 Ex1.1F	5'-ACCACATCTGAATAGCAAAGG-3'
m P2ry5 Ex1.2F	5'-TAACCTGTATCAGTGTAGATCG-3'
m P2ry5 Ex1R	5'-TTGGAGCCGGAGAGATAGTTCC-3'
m P2ry5 5'UTR 1F	5'-AATCCCCGGAAGCATTTTGG-3'
m P2ry5 5'UTR 1R	5'-ACTGGGAGCCATTGGAGC-3'
m P2ry5 3'UTR 1F	5'-AGATATTTGATAATGAATCTGC-3'
m P2ry5 3'UTR 1R	5'-TAGTTGATCTAAAGTGAGAGAGG-3'
m P2ry5 3'UTR 2F	5'-TAGATTAAGTACTTATCATGC-3'
m P2ry5 3'UTR 2R	5'-AACTGCAGTAGTCTCTTGGAGG-3'
Primer für die Expressionsanalyse muriner Lpa-Rezeptoren (inklusive Kontroll-Gen <i>Gapdh</i>)	
m Lpa1 Expr F	5'-AGGATGTCTCGGCATAGTTCTGG-3'
m Lpa1 Expr R	5'-TTAGGGTTCTCGTTGCGCTGG-3'
m Lpa2 Expr F	5'-TGGACACCGGGCCAGGTGG-3'
m Lpa2 Expr R	5'-TGAAGAGCCATGCATCTGCTG-3'
m Lpa3 Expr F	5'-TTCATCATGGTGGCGGTATACG-3'
m Lpa3 Expr R	5'-TAGATGATGGGGTTCATGACGG-3'
m Lpa4 Expr F	5'-TTCCTCACCAACATCTATGGG-3'
m Lpa4 Expr R	5'-AGGCTTGCGGAGGGTTCTAAGC-3'
m Lpa5 Expr F	5'-ACACATCGTTTGCATATGGTGG-3'

m Lpa5 Expr R	5'-TGAAGCTCTCGAAGCACAGGC-3'
m P2ry5 Expr F	5'-ACCACATCTGAATAGCAAAGG-3'
m P2ry5 Expr R	5'-TTGGAGCCGGAGAGATAGTTCC-3'
m Gapdh Expr F	5'-CGGCAAATTCAACGGCACAGTCA-3'
m Gapdh Expr R	5'-GGTTTCTCCAGGCGGCACGTCA-3'
Primer zur Klonierung des murinen <i>P2ry5</i>-Gens zur Generierung einer <i>knockout</i>-Maus (eingefügte Restriktionsschnittstellen sind in fett dargestellt)	
m P2ry5 F + Sall	5'-TCCTTT CTCGAC AGCCAAGAAGCCAGAGTCCC-3'
m P2ry5 R + Sall	5'-GTACC CTCGAC GCTTGCAAATGGTCACTGGCTGCCAGC-3'
m P2ry5 F + KpnI	5'-TCCTAG GTACCT TCCAGCAGACACATTATCAGAT TAAAGG-3'
m P2ry5 R + KpnI	5'-AATAAG GTACCT AGCAAGATAACATTTTC-3'
m P2ry5 F + XhoI	5'-CC CTCGAG TTATTTTGAAAGTACAATAAAAACC-3'
m P2ry5 R + XhoI	5'-CC CTCGAG TTGGAAAGAAGGCTCAGAGG-3'
Zusätzliche Primer zur Sequenzierung der einklonierten PCR-Fragmente zur Generierung der <i>P2ry5-knockout</i>-Maus	
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'
Seq aus Sall R	5'-TCTGCTTGTCTTTTCAGTCC-3'
Sall Seq 1F	5'-AGATCCTGTGCACTAAAATGG-3'
Sall Seq 2R	5'-AAAGGACATTTGTTATTAGC-3'
Intern F	5'-ACCTAGGTATAAGGATTAAAGG-3'
Intern R	5'-AAAGGGTACTAATTTGCTGGG-3'
Sall Seq 3F	5'-ATTGGCTGTTTTTCCTAAGG-3'
Sall Seq 4F	5'-AAAGGAGAATAAAATCATGG-3'
Sall Seq 5R	5'-AGCATAGTGGGAAAGTGTGC-3'
Seq aus KpnI R	5'-TGGGTTTGGACAAAGGAAGG-3'
m P2ry5 Ex1.2 R	5'-CGTACAGAGTGTACTTAAAGG-3'
XhoI Seq 7F	5'-AAAACAGACAAAGGCATGGC-3'
XhoI o.M. 2F	5'-CCCTCGAGCTGCAATGATTTTTGACAAAGC-3'
XhoI 7F	5'-GAAAGGCAGTCATCAAATAACCG-3'
XhoI Seq 1F	5'-AATGACAGTATCAATCCTGCC-3'
XhoI Seq 5F	5'-AGAGTTCATACTTCCAATGC-3'
Seq aus XhoI F	5'-ATACTGTGAACTGACCTTGGG-3'

Tab. 12.1.8: Primer zur Amplifikation, Sequenzierung und Klonierung des humanen *LIPH*-Gens.

Primer-Bezeichnung	Sequenz
Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden Regionen des humanen <i>LIPH</i>-Gens	
LIPH Ex1F	5'-ACTCGTCATTCTGCAGATGC-3'
LIPH Ex1R	5'-TGTTAAGGAAATGATACAGGC-3'
LIPH Ex2F	5'-AGGAACATAAGAAGAACTCC-3'
LIPH Ex2R	5'-ATGTTGCAATATAGGCCTCC-3'
LIPH Ex3F	5'-CTCCAAAGTCAACAGCCAGG-3'
LIPH Ex3R	5'-GGTTAGGTAATTGGAGCTGG-3'
LIPH Ex4F	5'-CATGGAAAGGAGTCCTGGCC-3'
LIPH Ex4R	5'-AGAGGAACCTGATCTGCTCC-3'
LIPH Ex5F	5'-AACCTAGTTGGAAATCATTGC-3'
LIPH Ex5R	5'-GCACTCTAATTCTTGTCTGC-3'
LIPH Ex6F	5'-ATACACTGAAAGAGCGCAGG-3'
LIPH Ex6Rp (für PCR)	5'-CGGTCTCAGCTCACTGTATCC-3'
LIPH Ex6Rs (für Sequenzierung)	5'-TACATGATAAAGTGGTCTGG-3'
LIPH Ex7F	5'-GTTTCTCTCAGAAGTGGTGG-3'
LIPH Ex7R	5'-GTCAAATGACTTCACCAAGG-3'
LIPH Ex8F	5'-ATTAGAACTTCTGCCCTGG-3'
LIPH Ex8R	5'-AACCAGGGAAGCAACTAAGC-3'
LIPH Ex9F	5'-AGCTTACCAGTGACTTGCAGG-3'
LIPH Ex9R	5'-TCTTGGATTACTGGGCTACC-3'
LIPH Ex10R	5'-TCCTGGGCTCTAGTACTGCC-3'
LIPH Ex10R	5'-CTGGCTATTTCTGACTTGCCC-3'
Primer zur Klonierung des humanen <i>LIPH</i>-Gens (eingefügte Restriktionsschnittstellen sind in fett dargestellt)	
LIPH MutagA F + HindIII	5'-GT AAGCTT CCGCCGCCATGTTGAGATTCTACTTAT TCATCAG-3'
LIPH MutagA R - c.280_369dup	5'-CAGAGAGCAAACCCTTACTAGAGGCATGGGTATATATT- 3'
LIPH MutagA R - c.403_409dup	5'-TCTGGTCAATGGTCAATAAATTCCTTCAAGACC-3'
LIPH MutagA R - c.527_628del	5'-TGTAGCCAGTGCTGTAATTCTCCCAGCCATC-3'
LIPH MutagB F - c.280_369dup	5'-TGCCTCTAGTAAGGTTTGTCTCTCTGTTGAAGACATG-3'
LIPH MutagB F - c.403_409dup	5'-TTATTGACCATTGACCAGATGTTGGCAGAAGG-3'
LIPH MutagB F - c.527_628del	5'-GGGGAGAATTACAGCACTGGGCTACAAGGAGCC-3'
LIPH MutagB R + XhoI	5'-CG CTCGAG TTACAACCTGCAACTCTGGGCAAAG-3'
Primer zur Sequenzierung der klonierten <i>LIPH</i>-Konstrukte	
LIPH cDNA 1F Seq	5'-GGCTGATGCTCTACACAAGG-3'
LIPH cDNA 2F Seq	5'-GACCAGATGTTGGCAGAAGG-3'
LIPH cDNA 3F Seq	5'-TCCCTGTGACTCCTACCAGG-3'
LIPH cDNA 1R Seq	5'-AAGTCATCCATCCAAACAGG-3'

12.2 Vektoren

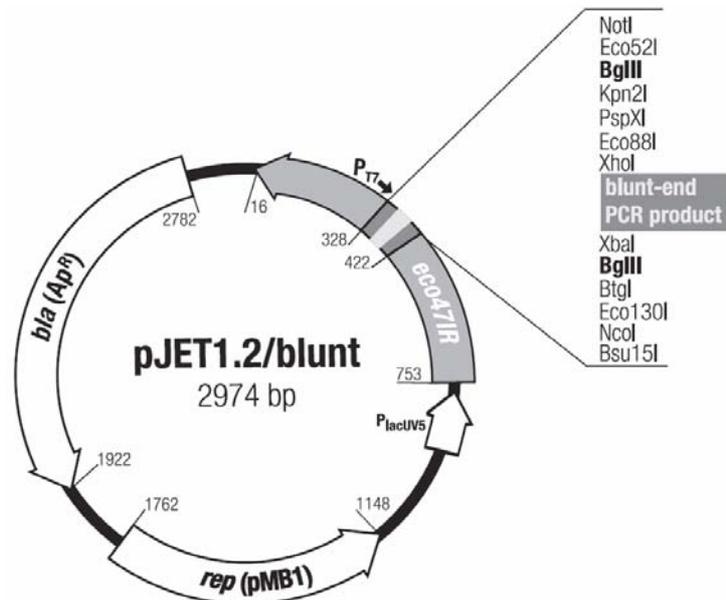


Abb. 12.2.1: Schematische Darstellung des zirkulären Klonierungsvektors *pJET1.2/blunt* (Fermentas). *Blunt-end* PCR-Produkte können direkt mittels einer Ligase in den Vektor kloniert werden. Rezirkularisierte Vektoren ohne Insert exprimieren nach Transformation in Bakterien ein letales Restriktionsenzym, wodurch es nicht zur Vermehrung der jeweiligen Bakterien kommt. Folglich wachsen nur rekombinante Klone, die ein Insert tragen.

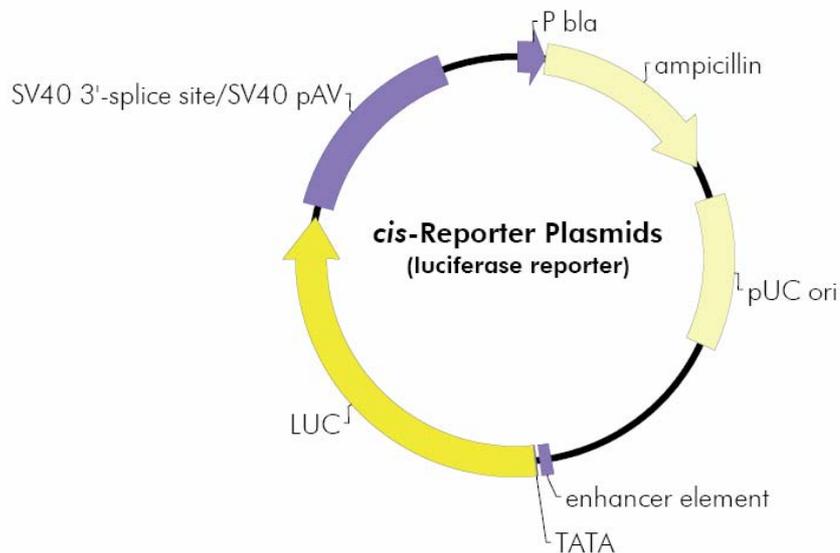


Abb. 12.2.2: Schematische Darstellung des zirkulären cis-Reporter Plasmids (*pCRE-luc*) aus dem *PathDetect in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting System* der Firma Stratagene. Die Expression des *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) Luziferase-Gens in dem Reporter-Plasmid ist unter Kontrolle eines synthetischen Promotors, welcher die Konsensus-Sequenz für das *cAMP response element* (CRE) enthält.

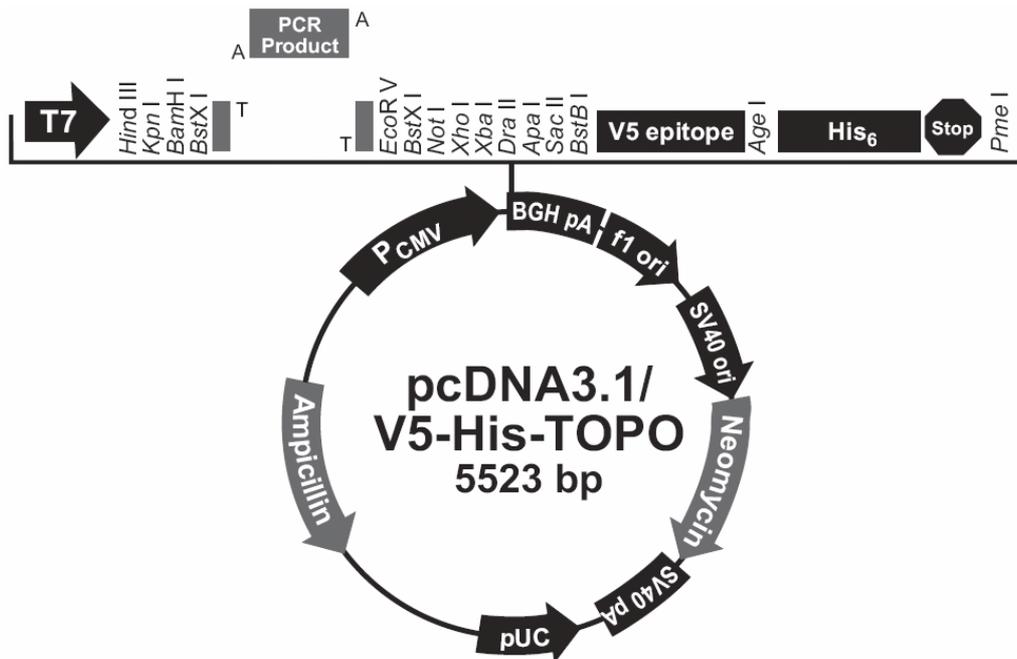


Abb. 12.2.3: Schematische Darstellung des *pcDNA3.1/V5-His*-Vektors (Invitrogen). Dieser Expressionsvektor kann zur Klonierung von PCR-Produkten mit T-A-Überhang verwendet werden, z. B. PCR-Produkte, die von einer *Taq*-Polymerase generiert wurden. Er enthält einen CMV-Promotor für eine starke, konstitutive Expression, ein C-terminales V5-Epitop zur Detektion rekombinanter Proteine mit einem V5-Antikörper und eine C-terminale Polyhistidin-Sequenz (6 x His) zur Aufreinigung über Nickel-haltige Säulen und zur Detektion mit einem His-Antikörper.

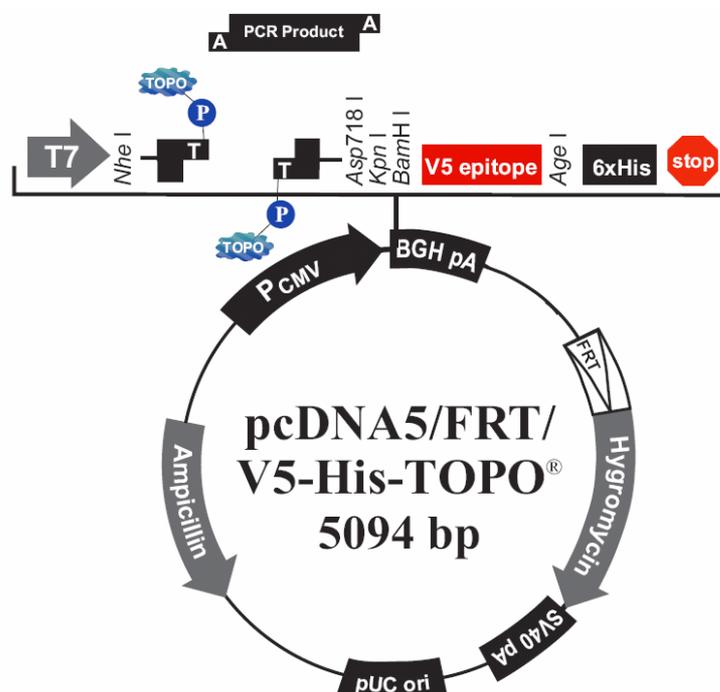


Abb. 12.2.4: Schematische Darstellung des *pcDNA5/FRT/V5-His*-Vektors (Invitrogen). Dieser Vektor kann ebenso wie der *pcDNA3.1-V5-His*-Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mit T-A-Überhang verwendet werden. Er enthält ebenfalls einen CMV-Promotor, ein C-terminales V5-Epitop und eine C-terminale Polyhistidin-Sequenz (6 x His). Darüber hinaus beinhaltet er das Flp-In-System, welches bei Kotretransfektion mit dem pOG44-Vektor (Invitrogen) zur Generierung stabiler Zelllinie verwendet werden kann.

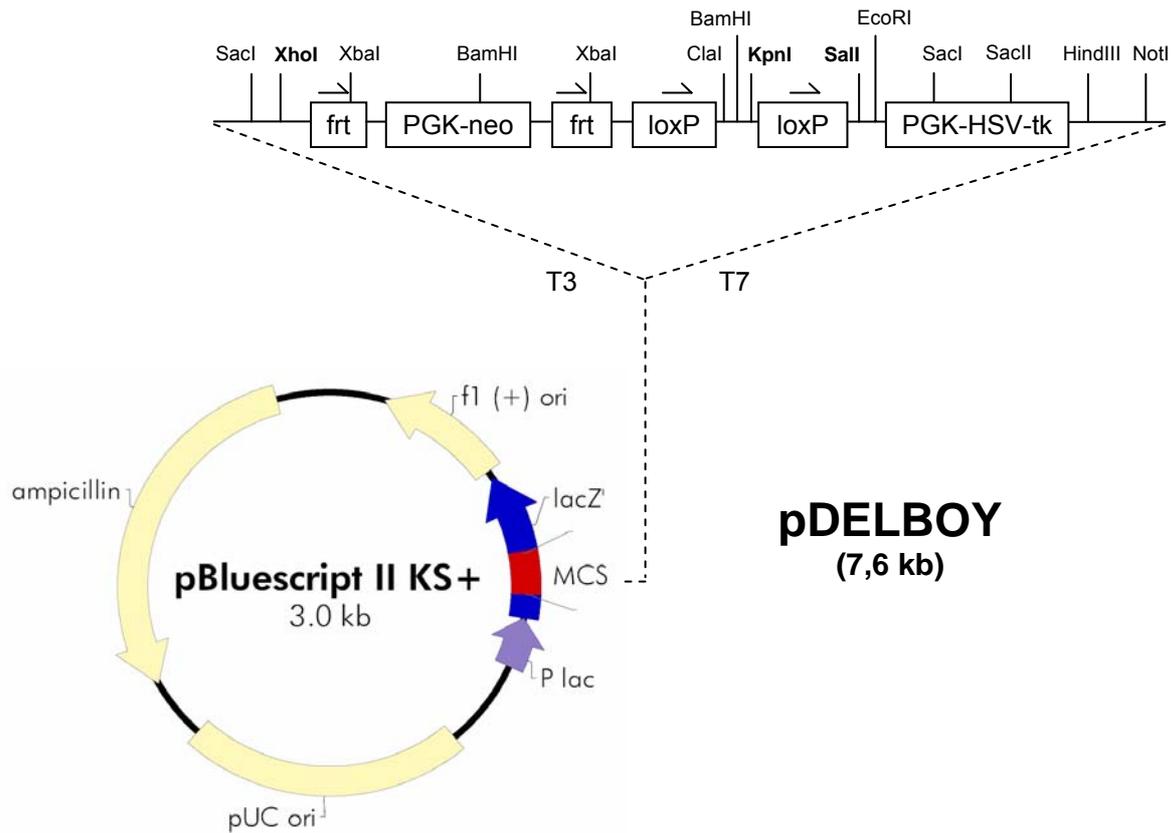


Abb. 12.2.5: Schematische Darstellung des pDELBOY-Vektors, welcher durch Modifikation aus einem pBluescript-Vektor entstand. Er enthält eine spezielle *multiple cloning site*, welche die Klonierung der drei für die homologe Rekombination erforderlichen Genspezifischen Sequenzen ermöglicht, eine *frt*-flankierte Neomycin-Kassette unter dem Phosphoglycerat-Kinase-Promotor (PGK-neo) zur Positiv-Selektion, ein Herpes simplex Virus Thymidinkinase-Gen unter dem Phosphoglycerat-Kinase-Promotor (PGK-HSV-tk) als negativen Selektionsmarker und zwei Erkennungssequenzen der CRE-Rekombinase („lox-P“-Erkennungssequenzen).

12.3 Sequenzen

Tab. 12.3.1: Humane P2RY5-Sequenzen, die in den pcDNA3.1-Vektor einkloniert wurden. Die humane P2RY5-Wildtyp-Sequenz sowie die Sequenz mit den Mutationen c.463C>T und c.373_374delAA wurden über eine *HindIII*- und *XhoI*-Schnittstelle in den *pcDNA3.1*-Vektor einkloniert. In 3'-Richtung der *HindIII*-Schnittstelle wurde eine Enhancer-Sequenz (CCGCCGCC) zur Steigerung der Transkriptionseffizienz kloniert. Jedes Konstrukt wurde einmal C-terminal und einmal N-terminal mit dem V5-Epitop fusioniert.

<p>P2RY5-Wildtyp im pcDNA3.1-Vektor (V5 N-terminal)</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCG ATTCTACGATGGTAAGCGTTAACAGCTCCCACTGCTTCTATAATGACTCCT TTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTTCAGCATGGTGTGTTGTGCTTGGGT TAATATCCAATTGTGTTGCCATATAACATTTTCATCTGCGTCCCTCAAAGTCC GAAATGAACTACAACCTTACATGATTAACCTGGCAATGTCAGACTTGCTTT TTGTTTTTACTTTACCCTTCAGGATTTTTTACTTCACAACACGGAATTGGC CATTTGGAGATTTACTTTGTAAGATTTCTGTGATGCTGTTTTATAACCAACA TGTACGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATTAGTGTAGATCGATTTCTGG CAATTGTCTACCCATTTAAGTCAAAGACTCTAAGAACCAAAGAAATGCAA AGATTGTTTGCACTGGCGTGTGGTTAACTGTGATCGGAGGAAGTGCACCCG CCGTTTTTGTTCAGTCTACCCACTCTCAGGGTAACAATGCCTCAGAAGCCT GCTTTGAAAATTTTCCAGAAGCCACATGGAAAACATATCTCTCAAGGATTG TAATTTTCATCGAAATAGTGGGATTTTTTATTCTCTAATTTTAAATGTAA CTTGTTCTAGTATGGTGCTAAAAACTTTAACCAAACCTGTTACATTAAGTA GAAGCAAAATAAACAAAACCTAAGGTTTTTAAAATGATTTTTGTACATTTGA TCATATTCTGTTTCTGTTTGTTCCTTACAATATCAATCTTATTTTATATT CTCTTGTGAGAACACAAACATTTGTTAATTGCTCAGTAGTGGCAGCAGTAA GGACAATGTACCCAATCACTCTCTGTATTGCTGTTTCCAACCTGTTGTTTTG ACCTTATAGTTTACTACTTTACATCGGACACAATTCAGAATTCATAAAAA TGAAAACTGGTCTGTCAGGAGAAGTGACTTCAGATTCTCTGAAGTTCATG GTGCAGAGAATTTTATTTCAGCATAACCTACAGACCTTAAAAAGTAAGATAT TTGACAATGAATCTGCTGCCTGACTCGAG</p>	<p><i>HindIII</i> V5 Epitop Start- kodon</p> <p>Stopp- kodon <i>XhoI</i></p>
<p>P2RY5 c.463C>T im pcDNA3.1-Vektor (V5 N-terminal)</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCG ATTCTACGATGGTAAGCGTTAACAGCTCCCACTGCTTCTATAATGACTCCT TTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTTCAGCATGGTGTGTTGTGCTTGGGT TAATATCCAATTGTGTTGCCATATAACATTTTCATCTGCGTCCCTCAAAGTCC GAAATGAACTACAACCTTACATGATTAACCTGGCAATGTCAGACTTGCTTT TTGTTTTTACTTTACCCTTCAGGATTTTTTACTTCACAACACGGAATTGGC CATTTGGAGATTTACTTTGTAAGATTTCTGTGATGCTGTTTTATAACCAACA TGTACGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATTAGTGTAGATCGATTTCTGG CAATTGTCTACCCATTTAAGTCAAAGACTCTAAGAACCAAAGAAATGCAA AGATTGTTTGCACTGGCGTGTGGTTAACTGTGATCGGAGGAAGTGCACCCG CCGTTTTTGTTTAGCTCGAG</p>	<p><i>HindIII</i> V5 Epitop Start- kodon</p> <p>Stopp- kodon <i>XhoI</i></p>
<p>P2RY5 c.373_374delAA im pcDNA3.1-Vektor (V5 N-terminal)</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCG ATTCTACGATGGTAAGCGTTAACAGCTCCCACTGCTTCTATAATGACTCCT TTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTTCAGCATGGTGTGTTGTGCTTGGGT TAATATCCAATTGTGTTGCCATATAACATTTTCATCTGCGTCCCTCAAAGTCC GAAATGAACTACAACCTTACATGATTAACCTGGCAATGTCAGACTTGCTTT TTGTTTTTACTTTACCCTTCAGGATTTTTTACTTCACAACACGGAATTGGC CATTTGGAGATTTACTTTGTAAGATTTCTGTGATGCTGTTTTATAACCAACA TGTACGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATTAGTGTAGATCGATTTCTGG CAATTGTCTACCCATTTAAGTCAAGACTCTAAGAACCAAAGAAATGCAAAG ATTGTTTGCACTGGCGTGTGGTTAACTGTGATCGGAGGAAGTGCACCCGCC GTTTTTGTTCAGTCTACCCACTCTCAGGGTAACTCGAG</p>	<p><i>HindIII</i> V5 Epitop Start- kodon</p> <p>Missense AS Stoppko- don, XhoI</p>

<p>P2RY5-Wildtyp im pcDNA3.1-Vektor (V5 C-terminal)</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGGTAAGCGTTAACAGCTCCCAGCTCCCAGCTGCTTCTATAATG ACTCCTTTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTCAGCATGGTGTTTGTGC TTGGGTTAATATCCAATTGTGTTGCCATATACATTTTCATCTGCGTCCTCA AAGTCCGAAATGAAACTACAACTTACATGATTAACTTGGCAATGTCAGACT TGCTTTTTGTTTTTACTTTACCCTTCAGGATTTTTTACTTCACAACACGGA ATTGGCCATTTGGAGATTTACTTTGTAAGATTTCTGTGATGCTGTTTTATA CCAACATGTACGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATTAGTGTAGATCGAT TTCTGGCAATTGTCTACCCATTTAAGTCAAAGACTCTAAGAACCAAAAGAA ATGCAAAGATTGTTTGCAGTGGCGTGTGGTTAACTGTGATCGGAGGAAGTG CACCCGCCGTTTTTGTTCAGTCTACCCACTCTCAGGGTAACAATGCCCTCAG AAGCCTGCTTTGAAAATTTTCCAGAAGCCACATGGAAAACATATCTCTCAA GGATTGTAATTTTCATCGAAATAGTGGGATTTTTTATTCCTCTAATTTTAA ATGTAACTTGTCTAGTATGGTGCTAAAAACTTTAACCAAACCTGTTACAT TAAGTAGAAGCAAATAAACAAACTAAGGTTTTAAAAATGATTTTTGTAC ATTTGATCATATTCTGTTTCTGTTTTGTTCTTACAATATCAATCTTATTT TATATTCTCTGTGAGAACACAACAATTTGTTAATTGCTCAGTAGTGGCAG CAGTAAGGACAATGTACCCAATCACTCTCTGTATTGCTGTTTCCAACTGTT GTTTTGACCCTATAGTTTACTACTTTACATCGGACACAATTCAGAATTCAA TAAAAATGAAAACTGGTCTGTCAGGAGAAGTGACTTCAGATTCTCTGAAG TTCATGGTGCAGAGAATTTTATTCAGCATAACCTACAGACCTTAAAAAGTA AGATATTTGACAATGAATCTGCTGCCTCGAG</p>	<p><i>HindIII</i> Start- kodon</p> <p><i>XhoI</i></p>
<p>P2RY5 c.463C>T im pcDNA3.1-Vektor (V5 C-terminal)</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGGTAAGCGTTAACAGCTCCCAGCTCCCAGCTGCTTCTATAATG ACTCCTTTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTCAGCATGGTGTTTGTGC TTGGGTTAATATCCAATTGTGTTGCCATATACATTTTCATCTGCGTCCTCA AAGTCCGAAATGAAACTACAACTTACATGATTAACTTGGCAATGTCAGACT TGCTTTTTGTTTTTACTTTACCCTTCAGGATTTTTTACTTCACAACACGGA ATTGGCCATTTGGAGATTTACTTTGTAAGATTTCTGTGATGCTGTTTTATA CCAACATGTACGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATTAGTGTAGATCGAT TTCTGGCAATTGTCTACCCATTTAAGTCAAAGACTCTAAGAACCAAAAGAA ATGCAAAGATTGTTTGCAGTGGCGTGTGGTTAACTGTGATCGGAGGAAGTG CACCCGCCGTTTTTGTTCAGTCTACCCACTCTCAGGGTAACAATGCCCTCAG</p>	<p><i>HindIII</i> Start- kodon</p> <p>GC⁵ <i>XhoI</i></p>
<p>P2RY5 c.373_374delAA im pcDNA3.1-Vektor (V5 C-terminal)</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGGTAAGCGTTAACAGCTCCCAGCTCCCAGCTGCTTCTATAATG ACTCCTTTAAGTACACTTTGTATGGGTGCATGTTCAGCATGGTGTTTGTGC TTGGGTTAATATCCAATTGTGTTGCCATATACATTTTCATCTGCGTCCTCA AAGTCCGAAATGAAACTACAACTTACATGATTAACTTGGCAATGTCAGACT TGCTTTTTGTTTTTACTTTACCCTTCAGGATTTTTTACTTCACAACACGGA ATTGGCCATTTGGAGATTTACTTTGTAAGATTTCTGTGATGCTGTTTTATA CCAACATGTACGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATTAGTGTAGATCGAT TTCTGGCAATTGTCTACCCATTTAAGTCAGACTCTAAGAACCAAAAGAAAT GCAAAGATTGTTTGCAGTGGCGTGTGGTTAACTGTGATCGGAGGAAGTGCA CCCGCCGTTTTTGTTCAGTCTACCCACTCTCAGGGGCCTCGAG</p>	<p><i>HindIII</i> Start- kodon</p> <p>Missense AS GC⁵ <i>XhoI</i></p>

⁵ Diese zwei Nukleotide wurden eingefügt, damit sich das V5-Epitop im Leserahmen mit dem P2RY5-Gen befindet.

Tab. 12.3.2: Murine *P2ry5*-Sequenzen, die in den *pDELBOY knockout*-Vektor einkloniert wurden. Folgende murine *P2ry5*-Sequenzen wurden zur Generierung einer *knockout*-Maus zunächst in den *pJet1.2*-Klonierungsvektor vorkloniert und anschließend in den *pDELBOY knockout*-Vektor umklont. PCR- und Sequenzier-Primer sind farbig gekennzeichnet, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind kursiv dargestellt. Start- und Stoppkodon sind durch fette Schrift gekennzeichnet.

<i>SalI</i>-Fragment im <i>pDELBOY</i>	
<p><i>GTCGAC</i>agccaagaagccagagtccc cacaggagcaaaggaaaaggactga aaaggacaagcagagttctctgctgggagctctttgcactgcattttccta ctccccgacccccttagaaaaagatgtatagtctctttttattgcctacag cacatgctttattcatgcataaagaatctacactagtaaaagacagtctag attccttctagatttttctatagagaaaacccttcaagtgtttcagggatt tgttttgagaatagcagatagttttggagaatagctagcaaggcttgaaa tcctccttcaaactctgcttcttgtgtgctctgagtcattggtgtctcagagt tcagaaaaggtaggataaaaaccagggcccaaggaaggagatttcaagggcc ctggagtcagatcctgtgcactaaaatggtaaactttactctgcactgaac catatatagttaatctaccaactgataaatatgcttagctagaattgtagtt tgacatttgatgcttttctaaaacaaagctaataacaaatgtcctttcgc aactaagtatttttgtcaacaggaagcacacacatggatacacatgtgaa gatccatagtgcatttcagagctgaaaggagactttcccggatactcttat tacataaaggcaacacatacacagttctaaaataaaatgtatcagattcct gccatcataaaccttctttgtgtctcagactaccatatcgtttttatttt accactgtgtaataaattattatttaagattttatttttagttaacactta ttacatttaactgaataatgtttagaatggatttgtttagaatggtgta gagtttcaactaatcacttgctgggatgctggagtctgagcacagggcctc ctacatggagctccaacactgttccaacctgcaaatcttaagtaaaaacc ttttgtaagttttttccccctgtgtatgagtgttttgccttcttgatg tctgtgcactgagtgacgcagtgacctgcagagtcagacgtgggtactgga tatcctgggactggagttacagacaggactgagctgccattgggtgctgac aatcaaacctgggccccttgaaagaacaggaagtaactccaaaatgctaaga catctttccagcatgcccacctagggtataaggattaaaggcatgtactacc acgcccagcaaattagtaacccttttagacagactttcctctacaactcct tttcaactaaggatataatctacatatcacaacatcctaaaaatcagctgaca gtatattttacttattttattttaagacctattttattttatgtgtataag tgctggcctgcatatatgcatgtatatcacattcatgcatgttttcacaat gaaagtaaacatggacagtagcaggacataaaaacgattataatttgtaaaa atgacaataagggggctggcaagatagctcagagggttaagcacattggctg tttttcctaaggtcctgagttcagttcccagcaaccacatggtgctcataa ccatctatagtgagatctggtgccctcttctgaactgtaggtgtacatgca agcaaaacactgtatacataataaatcgttttttaaataagcaataaggaa acttaaaagtggatcactcaaattttatatttttctaaaataactattaa cagaaaagtttcttcatggagaagaaaatgttattaagtgtcccttttttc attactgcactcaaagttcccactctccaataggaacacatttgcatctgt tttccacaccaaaccacaaagcaagaagttcagacctcaatctttaccgc ctataagactgtattatttgatcatagatgacttccctaatcaaaacaataa aaagattataattcaccatcaaaagtaatacaatttaaaaggtatagaaca catgatacatgctcttaagtatacatcttaatatgtaaaactaagggtgtcta tagagaaacttgctctgaaatgccttcaactgaccccaaatgaagggtttca gcttcaaatttagagatgaaagtagatctggaatataccccaacacacagc caacatgtaaaagaaactgaaggggagagacggaggaaaggagaataaaatc</p>	<p>m <i>P2ry5</i> F + <i>SalI</i> Seq aus <i>SalI</i> R</p> <p><i>SalI</i> Seq1F <i>SalI</i> Seq2R</p> <p>Intern F Intern R</p> <p><i>SalI</i> Seq3F</p> <p><i>SalI</i> Seq4F</p>

<p>atggaactacatttagacaaaacagtagaactgagattctctgctgtaagt tatttcaattaactcagaaggggggagcccgttttacaaagcacaactttcc cactatgcttatattaagtgtggtgggcaaaagactgacactgtactaaaagt aaaagttttggagtactattctcactactgagttataatcctccggggggg gggcatacttaatgtagtctttggtgtattaaaattgaactagctctagaa aattagtttcaaagaaaaatgtagaacattatttatcaaaaactaaagag atccaggattaaagctactcacaatcatgccaattaagttaaagtctggag agcaattaaaaaacaccagatactaagagaagcaggactgctgcctcagt caaaggctttatataaactcttaagggttctgccttcaggcacaacagttc ttaatgtgccactcatatcgctacatttcaatttataaacatatataca cccatctgcattttatctttaaagaaggcaatatccaactacaagagc aatagaagagaaagaatctaccttatgtttcttcttcttcttacttatta ctaactaaagcaaatcaaaccactttggagaagttgtcagaaatccccggaa agcattttggcataaaaagaggttaacacccaactcagctgggcagccagt accatttgcaagcGTCGAC</p>	<p>SalI Seq5R</p> <p>m P2ry5 5'UTR 1F m P2ry5 R + SalI</p>
<p>KpnI-Fragment im pDELBOY</p> <p>GGTACCttcccagcagacacattatcagattAAAGGAAGTCAAACAAGT GGTTGAAGCCTTCCTTTGTCCAAACCCAGCCTCTTCTTCCTGTGATGTCAT ATTACAAATCTGGGAAGGCTTTCTTGCTCACTTCAGAGACAGCCCATCTCA CAATACAGCTGGCAACCTCCGAAAGGCCTCTCCATTCAGCAAGCGCGAACA TGCTTAGGAATTTATCTGGGATCCCTTAAACGACTGCCTATCGCCGTCCGG AATCAATGTAGAAATACAAAGTTTGAGAATAAAAAGAAGGAAGAAGTACCC GAGGACGACGGGCGGACGGACGCACGGCGAGTGTGTTGTGACTGAAGTAAAG CTGGTTTGGACCCTGGCGGCTGAAGCACAAGTTTCCACGCGGACTGGTCTG GTCCGACTTGGAACAGTTTTTTCCTTACACTTTCAGCTTTATGGGTGGCTT CCTTGACTGCATTTTCTGTGCTAAGTAACTAACTCCAGACTCATGGATTTTC TCGACCAGAAAATCAGACTATTTTTCCTGAATAATCTACTAGAACTTTTAC GGAACACATTTTCATGTTTCTTTGAAGAGTTAAGAGAAGAAAGTATTTGTA AGAACAGGAAAAGAAACAAATACTTTGCAAATAAACTGGCTGCTGCTGTGA CCACATCTGAATAGCAAAGCGATCGATCAAGCGCTGCGGACAAAAGGCCT CCTGTAAGCTGCACTGCCTGACAATGGTAAGCTCCAATGGCTCCCAGTGCC CTTATGACGACTCCTTTAAGTACACTCTGTACGGTGCATGTTTCAGCATGG TCTTCGTGCTTGGGCTGATATCCAAGTGTGTTGCGATATAACATTTTCATCT GTGCCCTCAAAGTGAGAAATGAACTACAACGTACATGATTAACCTGGCAA TGTCAGATTTACTTTTTCGTCTTTACTTTGCCATTTTCGGATTTTTTACTTTG CAACACGGAATTGGCCATTTGGAGATCTACTCTGTAAGATTTTCAGTAATGC TGTTTTACACCAATATGTATGGAAGCATTCTGTTCTTAACCTGTATCAGTG TAGATCGATTTCTGGCAATTGTCTACCCATTTAAGTCAAAGACTTTAAGAA CGAAACGAAATGCAAAGATCGTTTGCATTGCTGTGTGGTTTCACAGTGATGG GAGGAAGTGCCTGCAGTTTTTCTTTCAGTCGACCCACTCTCAGGGGAACA ATACCTCAGAAGCCTGCTTTGAGAACTTTCCAGCGGCCACATGGAAAACCTT ATCTCTCCAGGATTTGTGATTTTCATTGAAATAGTGGGCTTTTTTATCCCTC TCATTTTGAACGTAACCTTGTCTAGTATGGTGCTAAGAACTTTAAATAAAC CTGTTACATTAAGTAGAAGCAAATGAACAAAACCTAAGGTTTTAAAATGA TTTTTGTCCACTTGGTCATCTTCTGTTTCTGTTTTGTGCCCTACAACATCA ACCTCATTTTGTACTCGCTCATGAGGACACAGACCTTTGTAACTGCTCTG TGGTGGCGGCAGTGAGGACCATGTACCCGATCACTCTCTGCATCGCTGTTT CCAAGTCTGCTTTGACCCTATGTTTACTACTTCACCTCAGACACAATTC AGAACTCAATAAAAATGAAAACCTGGTCCGTTAGAAGAAGTGACTCCAGGT</p>	<p>m P2ry5 F + KpnI Seq aus KpnI R</p> <p>m P2ry5 Ex1.1F Start- kodon m P2ry5 Ex1.2 R</p> <p>m P2ry5 Ex1.2F</p>

<p>TCTCTGAAGTTCAGGGCACTGAGAATTTTATCCAACACAACCTACAGACCT TAAAAAATAAGATATTTGATAATGAATCTGCAATATATAAGCTGCCTGACTAA GCCACTGGGACTGCTCCGTGTTCAACTGTGAAAACCTGTGTTCTTGGGAAC ATCTCTCCGGCTCCAACAGAAAATATTTTTAAAGGAAGTTTGTGTCTGATG TGTAAACATTAAAATATATTCTATTCTTGTATGCACGCCATTTTACTTTC TTGAACCACTTTAACGTGTTTTTTCCTCATTAAAAAATAAACTCCATAA AGTTAAGGTCTAAAAGCAATTATGATTTAAATAATGTGATATATCTGTACG TTTAAATTTTGTATATCATGAAATGATTTAATCAGAAATCTGTTAAATGG TTTTTATACTGAACCGAGATGTTGTTTACGGAATAGTTTACTAAGTAGATTT CACTTATATTTTATTTTAGATTAAAAGTACTTATCATGCCTTAAACTGTAA ACAGTGAAGAAAACCAGTTTGAAGTACTCACACAGTTTGTAGAGCATTCTC CCAAGAGACTACTGCAGTTTTCTGCATGACATTTTATCTTTTGTAGGCAACT CATAAAAAGAAAAGGTATCTAACTATATAGTATATTTTGAAATTACTATT TTGATTTATATTCTGGCTGCAACACCCAATTTCAAATGATATATAGTATA AAAACCTTAGCATAAAGAACTAATGAAATGTTATCTTGCTAGGTACC</p>	<p>Stopp- kodon m P2ry5 Ex1R</p> <p>3' UTR 2F 3' UTR 2R</p> <p>m P2ry5 R + KpnI</p>
<p>XhoI-Fragment im pDELBOY</p> <p>CTCGAGTTATTTTGAAGTACAATAAAAACCTTGTATTTTCaagaatggtg gtctagaaatcaccaggacagtgaagtgcctgagtttttagaatgtgatac atagctaagatTTTTTTTTTacttcttttcctctctcacttttagatcaac tacagagtgcctgaaaatggttatttcaagtggaaaaaaacctttaaaaat gttaaacgtataaagtaagacatagttctttacatagagagcaacaatc tagaaagacaaattactaagcacaattatattttcattatacaaaacagac aaaggcatggctttgagacagaaaaataccaactacatcaaaactttcatt ttccaacacatcctcttctaatttaaggcattttgcaaagttttaatttta gaaaaatgatatacatttgaattcagttagcctgtatggtaaaacaagtta atctttcaagtctgaatacagcatgaacacacacacacacacacacaca tatgtatgtatatgtgtgtttatgtatgtatatatatatgtatacatat atatacatatatacatatatacatatatacatatatacatatataatgtttgtt tgtttgtttgtttgttttggagacacggtttctctgtatagccct ggctgtcctggagctcgctttgtagaccaggctggcctcgaactcagaaat ccacctgcctctgcctcccaagtgcctgggattaaaggcatgtgccaccaca cctggcgaacataatattttataatacataaattactttttctgagtttg ggctgcaatgatttttgacaaagcatagtcattttctatcttaataagtc tctttgtaataaatagcacatacatggatgttttctttcaatacccatggt tttttataggtaaagctaaatgaaaataaacctgtaacaaaagcaaacta atgaaaaataagcatatcctaagagatgtatatgttccacacacatacaca cactgtgaagtttacttcagttgcctatagttcctgtacttgatgtcact ccaaaagaatgagatgcatgtagcagtccttagatatacactgtagagttga aaagcagtgagcagtcactgatcaagaggaaaggatcatggagttctgca tttctccgaactttctatgtgcaggggtcatgagaaaaccctaaggaggaa tctcaaggcatgtgtcttactttaaagtcctagaaaggcagtcacaaata accgtactactagactcagtgagagaagatcttattgcccttgtctgaaca acaacatgagtcaaaagttttgtaaaattctttaaattttttgttttttc aagacagggtttctttgtgtagtcggttgccttggaaacttgctctgtag atcaggctgccttgaactcaagagatctacctgcctctgcctcctgggtg ctagcatcaaactgatgcaccaccactgggcaactttggtaagattcttaa caaagtgtcacaatagattaaaaagttgtaattttctcatgttgatcaaat atgaagggcaggtgatacagccgggtgtacagagcttacctatatgtgaaga ccctaggtttaataccaactaccgaaaaagaaatttaaaataactgggta</p>	<p>m P2ry5 F + XhoI 3' UTR 1R</p> <p>XhoI Seq 7F</p> <p>XhoI o.M. 2F</p> <p>XhoI 7F</p>

<p>GCACGTCACAAAAAGAGTCCTGTCCCCTTCTGGGCTATTATGCTGATAATT GGAAAGACCATCTAAGGGGGAAAGATCCTCCAATGACGAAGGCATTCTTTG ACACAGCTGAGGAGAGCCCATTTCTGCATGTATCATTACTTTGTGGATATTA TAACATGGAACAAGAATGTAAGAAGAGGGGACATTACCATCAAATTGAGAG ACAAAGCTGGAAACACCACAGAATCCAAAATCAATCATGAACCCACCACAT TTCAGAAATATCACCAAGTGAGTCTACTTGCAAGATTTAATCAAGATCTGG ATAAAGTGGCTGCAATTTCCCTTGATGTTCTCTACAGGATCTCTAATAGGCC CAAGGTACAAGCTCAGGATTCTCCGAATGAAGTTAAGGTCCCTTGCCCATC CGGAGAGGCCTCAGCTGTGTCGGTATGATCTTGTCTGATGGAAAACGTTG AAACAGTCTTCCAACCTATTCTTTGCCAGAGTTGCAGTTGTAACCTCGAG</p>	<p>LIPH MutagB R Stopp XhoI</p>
<p>LIPH c.280_369dup im pcDNA3.1-Vektor</p> <p>AAGCTTCGCGCCATGTTGAGATTCTACTTATTCATCAGTTTGTTGTGCT TGTC AAGATCAGACGCAGAAGAAACATGTCCTTCATTCACCAGGCTGAGCT TTCACAGTGCAGTGGTTGGTACGGGACTAAATGTGAGGCTGATGCTCTACA CAAGGAAAAACCTGACCTGCGCACAAACCATCAACTCCTCAGCTTTTGGGA ACTTGAATGTGACCAAGAAAACCACCTTCATTGTCCATGGATTCAGGCCAA CAGGCTCCCCTCCTGTTTGGATGGATGACTTAGTAAAGGGTTTGCTCTCTG TTGAAGACATGAACGTAGTTGTTGTTGATTGGAATCGAGGAGCTACAACCT TAATATATACCCATGCCTCTAGTAAGGGTTTGCTCTCTGTTGAAGACATGA ACGTAGTTGTTGTTGATTGGAATCGAGGAGCTACAACCTTAATATATACCC ATGCCTCTAGTAAGACCAGAAAAGTAGCCATGGTCTTGAAGGAATTTATTG ACCAGATGTTGGCAGAAGGAGCTTCTCTTGATGACATTTACATGATCGGAG TAAGTCTAGGAGCCCACATATCTGGGTTTGTGGAGAGATGTACGATGGAT GGCTGGGGAGAATTACAGGCCTCGACCCTGCAGGCCCTTTATTCAACGGGA AACCTCACCAAGACAGATTAGATCCCAGTGATGCGCAGTTTGTGATGTCA TCCATTCCGACACTGATGCACTGGGCTACAAGGAGCCATTAGGAAACATAG ACTTCTACCCAAATGGAGGATTGGATCAACCTGGCTGCCCCAAAACAATAT TGGGAGGATTTCAAGTATTTTAAATGTGACCACCAGAGGTCTGTATACCTGT ACCTGTCTTCCCTGAGAGAGAGCTGCACCATCACTGCGTATCCCTGTGACT CCTACCAGGATTATAGGAATGGCAAGTGTGTCAGCTGCGGCACGTCACAAA AAGAGTCTGTCCCCTTCTGGGCTATTATGCTGATAATTGGAAAGACCATC TAAGGGGGAAAGATCCTCCAATGACGAAGGCATTCTTTGACACAGCTGAGG AGAGCCCATTCTGCATGTATCATTACTTTGTGGATATTATAACATGGAACA AGAATGTAAGAAGAGGGGACATTACCATCAAATTGAGAGACAAAGCTGGAA ACACCACAGAATCCAAAATCAATCATGAACCCACCACATTTTCAGAAATATC ACCAAGTGAGTCTACTTGCAAGATTTAATCAAGATCTGGATAAAGTGGCTG CAATTTCCCTTGATGTTCTCTACAGGATCTCTAATAGGCCCAAGGTACAAGC TCAGGATTCTCCGAATGAAGTTAAGGTCCCTTGCCCATCCGGAGAGGCCTC AGCTGTGTCGGTATGATCTTGTCTGATGGAAAACGTTGAAACAGTCTTCC AACCTATTCTTTGCCAGAGTTGCAGTTGTAACCTCGAG</p>	<p>HindIII Start LIPH MutagA F</p> <p>30 AS- Duplika- tion</p> <p>LIPH MutagB R Stopp XhoI</p>
<p>LIPH c.403_409dup im pcDNA3.1-Vektor</p> <p>AAGCTTCGCGCCATGTTGAGATTCTACTTATTCATCAGTTTGTTGTGCT TGTC AAGATCAGACGCAGAAGAAACATGTCCTTCATTCACCAGGCTGAGCT TTCACAGTGCAGTGGTTGGTACGGGACTAAATGTGAGGCTGATGCTCTACA CAAGGAAAAACCTGACCTGCGCACAAACCATCAACTCCTCAGCTTTTGGGA ACTTGAATGTGACCAAGAAAACCACCTTCATTGTCCATGGATTCAGGCCAA CAGGCTCCCCTCCTGTTTGGATGGATGACTTAGTAAAGGGTTTGCTCTCTG TTGAAGACATGAACGTAGTTGTTGTTGATTGGAATCGAGGAGCTACAACCT</p>	<p>HindIII Start LIPH MutagA F</p>

<p>TAATATATACCCATGCCTCTAGTAAGACCAGAAAAGTAGCCATGGTCTTGA AGGAATTTATTGACCATTGACCAGATGTTGGCAGAAGGAGCTTCTCTTGAT GACATTTACATGATCGGAGTAAGTCTAGGAGCCACATATCTGGGTTTGT GGAGAGATGTACGATGGATGGCTGGGAGAAATTACAGGCCTCGACCCTGCA GGCCCTTTATTCAACGGGAAACCTCACCAAGACAGATTAGATCCCAGTGAT GCGCAGTTTGTGATGTCATCCATTCCGACACTGATGCACTGGGCTACAAG GAGCCATTAGGAAACATAGACTTCTACCCAAATGGAGGATTGGATCAACCT GGCTGCCCAAACAATATTGGGAGGATTTTCAGTATTTTAAATGTGACCAC CAGAGGTCTGTATACCTGTACCTGTCTTCCCTGAGAGAGAGCTGCACCATC ACTGCGTATCCCTGTGACTCCTACCAGGATTATAGGAATGGCAAGTGTGTC AGCTGCGGCACGTCACAAAAGAGTCTGTCCCCTTCTGGGCTATTATGCT GATAATTGAAAGACCATCTAAGGGGGAAAGATCCTCCAATGACGAAGGCA TTCTTTGACACAGCTGAGGAGAGCCATTCTGCATGTATCATTACTTTGTG GATATTATAACATGGAACAAGAATGTAAGAAGAGGGGACATTACCATCAAA TTGAGAGACAAAGCTGGAAACACCACAGAATCCAAATCAATCATGAACCC ACCACATTTAGAAATATCACCAAGTGAGTCTACTTGCAAGATTTAATCAA GATCTGGATAAAGTGGCTGCAATTTCTTGATGTTCTCTACAGGATCTCTA ATAGGCCCAAGGTACAAGCTCAGGATTCCTCGAATGAAGTTAAGGTCCTT GCCCATCCGGAGAGGCCTCAGCTGTGTCCGGTATGATCTTGTCTGATGGAA AACGTTGAAACAGTCTTCCAACCTATTCTTTGCCCAGAGTTGCAGTTGTAA CTCGAG</p>	<p>7bp Duplika- tion (inkl. vorzeiti- gem Stopp- kodon)</p> <p>LIPH MutagB R Stopp XhoI</p>
<p>LIPH c.527_628del im pcDNA3.1-Vektor</p> <p>AAGCTTCCGCCGCCATGTTGAGATTCTACTTATTCATCAGTTTGTGTTGTGCT TGTC AAGATCAGACGCAGAAGAAACATGTCCTTCATTACCAGGCTGAGCT TTCACAGTGCAGTGGTTGGTACGGGACTAAATGTGAGGCTGATGCTCTACA CAAGGAAAAACCTGACCTGCGCACAAACCATCAACTCCTCAGCTTTTGGGA ACTTGAATGTGACCAAGAAAACCACCTTCATTGTCCATGGATTTCAGGCCAA CAGGCTCCCCTCCTGTTTGGATGGATGACTTAGTAAAGGGTTTGCTCTCTG TTGAAGACATGAACGTAGTTGTTGTTGATTGGAATCGAGGAGCTACAACCTT TAATATATACCCATGCCTCTAGTAAGACCAGAAAAGTAGCCATGGTCTTGA AGGAATTTATTGACCAGATGTTGGCAGAAGGAGCTTCTCTTGATGACATTT ACATGATCGGAGTAAGTCTAGGAGCCACATATCTGGGTTTGTGGAGAGA TGTACGATGGATGGCTGGGAGAAATTACAG/CACTGGGCTACAAGGAGCCA TTAGGAAACATAGACTTCTACCCAAATGGAGGATTGGATCAACCTGGCTGC CCCAAACAATATTGGGAGGATTTTCAGTATTTTAAATGTGACCACCAGAGG TCTGTATACCTGTACCTGTCTTCCCTGAGAGAGAGCTGCACCATCACTGCG TATCCCTGTGACTCCTACCAGGATTATAGGAATGGCAAGTGTGTGAGCTGC GGCACGTCACAAAAGAGTCTGTCCCCTTCTGGGCTATTATGCTGATAAT TGAAAGACCATCTAAGGGGGAAAGATCCTCCAATGACGAAGGCATTCTTT GACACAGCTGAGGAGAGCCATTCTGCATGTATCATTACTTTGTGGATATT ATAACATGGAACAAGAATGTAAGAAGAGGGGACATTACCATCAAATGAGA GACAAAGCTGGAAACACCACAGAATCCAAATCAATCATGAACCCACCACA TTTCAGAAATATCACCAAGTGAGTCTACTTGCAAGATTTAATCAAGATCTG GATAAAGTGGCTGCAATTTCTTGATGTTCTCTACAGGATCTCTAATAGGC CCAAGGTACAAGCTCAGGATTCCTCGAATGAAGTTAAGGTCCTTGCCCAT CCGGAGAGGCCTCAGCTGTGTCCGGTATGATCTTGTCTGATGGAAAACGTT GAAACAGTCTTCCAACCTATTCTTTGCCCAGAGTTGCAGTTGTAACTCGAG</p>	<p>HindIII Start LIPH MutagA F</p> <p>/=Del Ex4</p> <p>LIPH MutagB R Stopp XhoI</p>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Regina C. Betz, die es mir ermöglichte, diese Arbeit im Institut für Humangenetik der Universität Bonn durchzuführen. Sie hat mich immer unterstützt und gefördert und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Sie ermöglichte mir die Besuche mehrerer nationaler und internationaler Kongresse und gab mir das Vertrauen, über das Projekt der Dissertation hinaus an verschiedenen Projekten zu arbeiten.

Des Weiteren ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Markus M. Nöthen und Herrn Prof. Dr. Peter Propping für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Forschungsbelangen. Darüber hinaus ein Dankeschön an Herrn Prof. Nöthen für die Übernahme des 1. Referats.

Herrn Prof. Dr. Walter Witke, Institut für Genetik der Universität Bonn, danke ich für die Übernahme des 2. Referats.

Herrn Prof. Dr. Jörg Höfeld, Institut für Zellbiologie der Universität Bonn, danke ich für die Übernahme des 3. Referats.

Ich möchte mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn für den mehrmonatigen Forschungsaufenthalt in seinem Labor bedanken, bei dem ich sehr viel gelernt habe. Ich danke ihm für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und darüber hinaus für die Übernahme des 4. Referats. Herrn Prof. Dr. Gerhard J. Molderings danke ich für die Durchführung der Ligandenbindungsstudien. Des Weiteren Danke für die tatkräftige Unterstützung der Mitarbeiterinnen der Pharmakologie, Frau Kristina Hofmann und Frau Petra Spitzlei.

Mein Dank gilt auch allen Kollegen des Instituts für Humangenetik und der Genomic-Plattform des Life&Brain Centers, besonders Melanie Müller, Niklas Schäfer, Sigfried Ulhaas, Dietlinde Stienen, Rami Abou Jamra, Lucie Florin, Axel Hillmer, Felix Brockschmidt, Alfredo Ramirez und allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Schwester danke ich für die sehr hilfreiche Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Eltern, meiner Schwester und ganz besonders meiner Großmutter danke ich für ihre immerwährende Hilfe und Unterstützung.