

# Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion von alpha-hydroxylierten Sphingolipiden anhand von Mausmodellen

Dissertation

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

vorgelegt von  
Inge Zöller  
aus  
Papenburg

Bonn 2007

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

1. Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. K. Mohr

Tag der Promotion: 21.09.2007

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.

*Aristoteles*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungen .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 Sphingolipide .....	1
1.2 Neuroglia des Nervensystems .....	3
1.2.1 Oligodendrozyten und Schwannzellen .....	4
1.3 Myelin: Die Myelinisierung und die wichtigsten Komponenten des Myelins ..	5
1.3.1 Die Myelinisierung .....	6
1.3.2 Die Myelin-spezifischen Proteine und ihre Funktionen .....	7
1.3.3 Die Myelin-spezifischen Lipide und ihre Funktionen .....	8
1.4 Die Haut und der Haarfollikel .....	10
1.4.1 Aufbau der Haut .....	11
1.4.2 Aufbau des Haarfollikels .....	12
1.4.3 Lipidkomponenten in der Haut und deren Funktion .....	13
1.5 Genomische Organisation und molekularer Aufbau der FA2H .....	16
1.6 Transgene Mausmodelle .....	18
1.6.1 Herstellung transgener Tiere durch Vorkerninjektion .....	18
1.6.2 Gezielte Genveränderung durch homologe Rekombination .....	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	20
2 Material .....	21
2.1 Geräte .....	21
2.2 Chemikalien .....	22
2.3 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.4 Medien und Lösungen .....	23
2.4.1 Allgemeine Lösungen und Puffer .....	23
2.4.2 Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen .....	24
2.4.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur .....	25
2.4.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	26
2.4.4.1 Medien und Lösungen für die ES-Zellkultur .....	26
2.4.4.2 Medien und Lösungen für die Kultur embryonaler Mausfibroblasten	27
2.4.5 Lösungen für histologische Färbungen und Nachweise .....	27
2.5 Eukaryotische Zell-Linien .....	29
2.6 Bakterienstamm .....	29
2.7 Plasmide .....	29
2.8 Primer .....	30
2.9 Antikörper .....	31
2.10 Versuchstiere .....	32
2.10.1 Wildtyp-Kontrolltiere .....	32
2.10.2 PLP-CGT transgene Mäuse .....	32
2.10.3 CGT-Knock-Out-Mäuse .....	32
3 Methoden .....	33
3.1 Nukleinsäure Präparationen .....	33
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	33
3.1.1.1 Plasmid Mini Präparation .....	33
3.1.1.2 Plasmid Midi Präparation .....	34
3.1.1.3 Plasmid Maxi Präparation .....	34
3.1.2 Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen .....	34

---

3.1.3	Präparation genomischer DNA aus Mausgeweben .....	35
3.1.4	Präparation von RNA aus Mausgeweben .....	35
3.1.5	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion ....	36
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	36
3.1.6.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	36
3.1.6.2	Konzentrationsabschätzung im Gel .....	37
3.2	Arbeiten zur Herstellung rekombinanter Plasmide .....	37
3.2.1	Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente .....	37
3.2.1.1	Spaltung von Plasmiden mittels Restriktionsendonukleasen .....	37
3.2.1.2	Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel .....	37
3.2.2	Modifikationen und Ligation von DNA-Molekülen .....	37
3.2.2.1	Auffüllen von überhängenden Enden (blunten) .....	37
3.2.2.2	Dephosphorylieren von Vektoren .....	38
3.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten .....	38
3.2.2.4	Sequenzierung doppelsträngiger DNA .....	39
3.2.3	Transformation .....	39
3.2.3.1	Transformation in XL-1 blue E. coli Bakterien .....	39
3.3	Zellkultur .....	40
3.3.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	40
3.3.2	HM1 embryonale Stammzellen der Maus .....	40
3.3.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	40
3.3.2.2	Stabile Transfektion zur homologen Rekombination .....	41
3.3.2.3	Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination .....	42
3.3.2.4	Karyotypanalyse homolog rekombinierter ES-Zellklone .....	43
3.3.3	Primäre Embryonale Mausfibroblasten .....	43
3.4	Nachweise der Genotypen homolog rekombinierter ES-Zellklone und transgener Mäuse .....	44
3.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	44
3.4.1.1	PCR zum Nachweis der homologen Rekombination von pLRlacZpA/MCINeopA.delfa2h.HSV-TK in ES-Zellen .....	45
3.4.1.2	Genotypisierung von FA2H-KO Mäusen .....	45
3.4.1.3	Genotypisierung von PLP-CGT/GalT-KO-Mäusen .....	46
3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	46
3.4.3	Southern-Blot-Hybridisierung .....	47
3.5	Biochemische Nachweise .....	48
3.5.1	Northern-Blot-Hybridisierung .....	48
3.5.2	<i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	49
3.5.2.1	Herstellung der RNA-Gensonden .....	49
3.5.2.2	<i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	49
3.5.3	Nachweise von Proteinen .....	50
3.5.3.1	Proteinbestimmung .....	50
3.5.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
3.5.3.3	Western-Blot nach dem Semi Dry Verfahren .....	51
3.5.3.4	Immunfluoreszenznachweis von Proteinen in Gefrierschnitten .....	52
3.5.4	Lipidanalyse .....	52
3.5.4.1	Extraktion von Lipiden aus Geweben .....	52
3.5.4.2	Auftrennen von Lipiden auf Dünnschichtchromatographie-Platten ...	54
3.5.4.3	DE MALDI-TOF (Delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight analysis) .....	54
3.6	Histochemische Färbungen und Nachweise .....	54

3.6.1	Färbungen der Sebozyten an Gefrierschnitten .....	55
3.6.1.1	OilRedO®-Färbung .....	55
3.6.1.2	Nile Red-Färbung .....	55
3.6.2	AP-Färbung.....	55
3.7	Expressionsanalyse des LacZ-Reportergens.....	55
3.8	Tierexperimentelles Arbeiten .....	56
3.8.1	Nervenleitgeschwindigkeitsmessung .....	56
3.8.2	Verhaltenstests an Mäusen .....	56
3.8.2.1	Rotarod Experimente .....	56
3.8.2.2	„Open field“-Test .....	56
4	Ergebnisse .....	57
4.1	Inaktivierung des FA2H-Gens der Maus .....	57
4.1.1	Klonierung des Austauschvektors pIZ1-LacZ .....	57
4.1.1.1	Klonierung der 5`-homologen Region.....	57
4.1.1.2	Klonierung der 3`-homologen Region sowie des PCR-Testvektors..	58
4.1.1.3	Klonierung eines Zwischenschrittvektors mit beiden homologen Regionen .....	58
4.1.1.4	Klonierung des Endvektors pIZ1-LacZ .....	58
4.1.2	Herstellung und Überprüfung homolog rekombinierter ES-Zellen.....	60
4.1.3	Generierung FA2H-defizienter Mäuse .....	62
4.2	Expressionsanalysen an Mäusen mit mutierten FA2H-Allelen.....	64
4.2.1	Nachweis der fehlenden Expression der mRNA für FA2H.....	64
4.2.2	Expressions-Analysen der FA2H durch Detektion des Reporterproteins Cyt-b5-β-gal .....	65
4.2.2.1	Expression des Reporterproteins Cyt-b5-β-gal im Gehirn im Vergleich zur Expression der FA2H-mRNA im Gehirn .....	65
4.2.2.2	Entwicklungsabhängige Expression des Reporterproteins Cyt-b5-β- gal in verschiedenen Geweben .....	67
4.3	Biochemische Analysen an FA2H-Knock-Out-Mäusen.....	69
4.3.1	Analyse der Sphingolipidzusammensetzung im Nervensystem.....	69
4.3.2	Analyse Myelin-assoziiertes Proteins im Gehirn.....	72
4.4	Strukturelle und funktionelle Analyse des Myelins .....	75
4.4.1	Elektronenmikroskopische Analyse des Nervensystems von FA2H- Knock-Out-Mäusen .....	75
4.4.2	Verhaltenstests mit adulten FA2H-Knock-Out Mäusen.....	77
4.4.3	Messung der Nervenleitgeschwindigkeit.....	79
4.5	Analyse des Haut- und Haarphänotyps FA2H defizienter Mäuse .....	79
4.5.1	Aufklärung der zellulären Lokalisation der FA2H-Expression in der Haut 80	
4.5.2	Veränderungen des Aufbaus der Haut und der Haarfollikel in FA2H- Knock-Out- Mäusen .....	83
4.5.2.1	Anzeichen für Haarfollikeldystrophie in FA2H-Knock-Out-Mäusen ..	83
4.5.2.2	Veränderte Dicke der Haut in FA2H-Knock-Out-Mäusen .....	85
4.5.2.3	Unterschiede in den Talgdrüsen der Haut zwischen Wildtyp und FA2H defizienten Mäusen .....	89
4.5.2.4	Unterschiede im Haarzyklus in FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle.....	95
4.5.3	Analyse der Lipidzusammensetzung der Haut FA2H defizienter Mäuse 98	

---

4.6	Generierung und Analyse einer transgenen Mauslinie mit oligodendrozyten-spezifischer Expression der CGT .....	100
4.6.1	Generierung einer transgenen Maus mit oligodendrozyten-spezifischer Expression der CGT.....	100
4.6.2	Biochemische Analyse der CGT/cgt(-/-) transgenen Maus .....	102
4.6.2.1	Analyse der MBP-Level im Gehirn von CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen	103
4.6.2.2	Analyse der Lipide des Gehirns von CGT/cgt(-/-)- Mäusen.....	105
4.6.2.3	Expressionsanalyse für FA2H und MAL in CGT/cgt(-/-)-Mäusen ...	107
5	Diskussion.....	109
5.1	Der Knock-Out des FA2H-Gens.....	109
5.1.1	Der FA2H-Knock-Out und seine Auswirkungen auf das Nervensystem	109
5.1.1.1	Generierung einer FA2H defizienten Maus mittels eines Knock-In ergibt die Möglichkeit der Expressionsanalyse anhand des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal.....	109
5.1.1.2	In der Zusammensetzung verändertes Myelin zeigt weitestgehend normale Funktionen .....	111
5.1.2	Auswirkungen der FA2H-Defizienz auf Haut und Haare .....	116
5.1.2.1	Mittels des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal ist eine Lokalisierung der FA2H-Expression in der Haut möglich.....	117
5.1.2.2	Die FA2H-Defizienz führt zu einer Zunahme der Hautdicke und zu einer Talgdrüsenhypertrophie.....	118
5.1.2.3	FA2H-Knock-Out-Mäuse weisen Anzeichen von Haarfollikeldystrophie auf und zeigen einen desynchronisierten Haarzyklus	119
5.2	Oligodendrozyten-spezifische Expression der CGT.....	126
5.2.1	Das PLP-CGT Transgen hebt den Phänotyp der CGT defizienten Mäuse auf .....	126
5.3	Ausblick.....	128
6	Zusammenfassung.....	130
7	Literaturverzeichnis .....	131

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung	NCAM	Neurales
AK	Antikörper		Zelladhäsionsmolekül
ATP	Adenosintri-phosphat	NCS	Neugeborenen-Kälberserum
bp	Basenpaare	OD	optische Dichte
BSA	Rinderserum-Albumin	PBS	Phosphat-gepufferte
cAMP	zyklisches		isotonische Salzlsg.
	Adenosinmonophosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cDNA	DNA-Kopie einer RNA	PFA	Paraformaldehyd
CNPase	2',3'-zyklisches Nukleotid 3'- Phosphohydrolase	PGK	Phosphoglyzerat Kinase
		PNS	peripheres Nervensystem
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PLP	Proteolipid Protein
		RNase	Ribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s	Sekunde
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
		SSC	Natriumzitronensäuresalz- Puffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TBS	Tris-gepufferte isotonische Salzlsg.
ES-Zellen	embryonale Stammzellen		
FA2H	Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
FCS	Fötale Kälberserum		
h	Stunde	Tris-HCl	Tris mit Salzsäure
kb	Kilobasen	U	Enzym-Aktivitätseinheiten
kDa	Kilodalton	Upm	Umdrehungen pro Minute
KO	Knock Out	UV	ultraviolettes Licht
LB	Luria-Bertani	V	Volt
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor	Vol.	Volumen
Lsg.	Lösung	WT	Wildtyp
$\mu$ Ci	Mikrocurie	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid
mA	Milliampère		
MBP	Myelin basisches Protein	ZK	Zellkultur
min	Minuten	ZNS	Zentrales Nervensystem
MW	Molekulargewicht		
NaCl	Natriumchlorid		
NaOH	Natriumhydroxid		

## Abbildungsverzeichnis

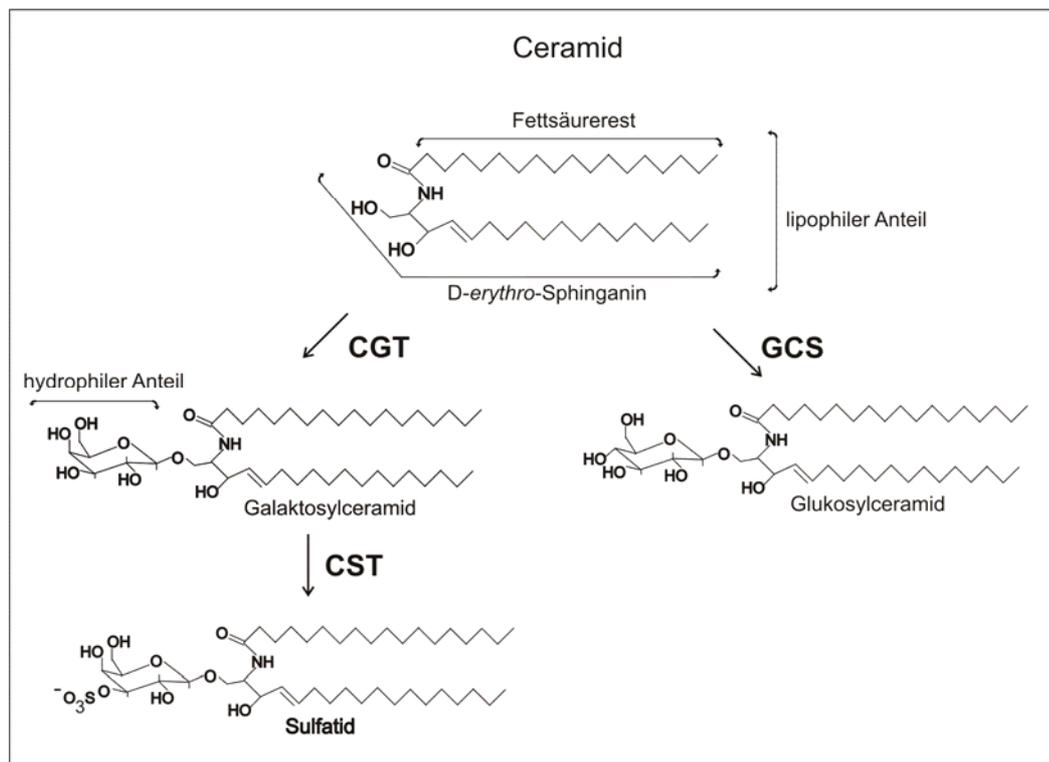
Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Aufbaus einiger Sphingolipide .....	1
Abb. 1-2: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten.....	5
Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Biosynthese einiger Glykosphingolipide.....	9
Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Haarfollikels .....	13
Abb. 1-5: Ceramid als Grundgerüst der Sphingolipide der Haut .....	14
Abb. 1-6: Vorschlag zum Strukturmodell der murinen FA2H .....	17
Abb. 4-1: Klonierungsstrategie für die Herstellung des Austauschvektors pIZ1-LacZ.....	59
Abb. 4-2: Restriktionsanalyse des Austauschvektors pIZ1-LacZ mit verschiedenen Restriktionsenzymen .....	60
Abb. 4-3: Homologes Rekombinationsschema in den WT-Lokus des FA2H-Gens von ES- Zellen .....	61
Abb. 4-4: Überprüfung der homologen Rekombination mittels Southern-Blot-Hybridisierung.....	62
Abb. 4-5: Beispiel einer chimären Maus .....	63
Abb. 4-6: Southern-Blot-Hybridisierung genomischer BglII-Verdauter DNA aus Mausschwänzen mit externer 3`-Sonde .....	63
Abb. 4-7: Nachweis der Abwesenheit des FA2H-Gens in FA2H-Knock-Out-Mäusen mittels Northern-Blot-Hybridisierung .....	64
Abb. 4-8: Vergleichende Expressionsanalyse im Gehirn 4 Wochen alter Mäuse.....	66
Abb. 4-9: Expression des Reporterfusionsproteins Cyt-b5-β-gal an Gefrierschnitten verschiedener Organe .....	67
Abb. 4-10: β-Galaktosidase Färbereaktion an ganzen Embryonen des Entwicklungsstadiums dpc 16,5.....	68
Abb. 4-11: Analyse der Sphingolipide des Nervensystems 4 Wochen alter Mäuse .....	70
Abb. 4-12: DE-MALDI-TOF Massen-Spektrum der verseiften Lipide aus dem Gehirn .....	71
Abb. 4-13: Expressionsanalyse Myelin-assoziiierter Proteine des Gesamtgehirns.....	73
Abb. 4-14: Analyse der Oligodendrozytendifferenzierung mittels <i>In-situ</i> -Hybridisierung für PLP und PDGF .....	74
Abb. 4-15: Elektronenmikroskopische Analyse des optischen Nervs und des Ischiasnervs .	76
Abb. 4-16: Ergebnisse der Verhaltenstests mit adulten FA2H-Knock-Out-Mäusen .....	78
Abb. 4-17: Lokalisation der FA2H-Expression in der Haut .....	81
Abb. 4-18: Co-Färbung FA2H-Antiserum und CD34 in der Haut.....	82
Abb. 4-19: Verzögerte Haarentwicklung, zyklischer Haarverlust und Anzeichen für Haarfollikeldystrophie in FA2H defizienten Mäusen .....	84
Abb. 4-20: Veränderte Hautdicke bei FA2H-Knock-Out-Mäusen .....	86
Abb. 4-21: Keratinfärbungen an der Haut FA2H defizienter Mäuse .....	88
Abb. 4-22: Vergleich der Flächen, die durch die Sebozyten eingenommen werden .....	90
Abb. 4-23: Ki67 positive Zellen in den Talgdrüsen .....	92
Abb. 4-24: Elektronenmikroskopische Analyse der Talgdrüse FA2H defizienter Mäuse.....	94
Abb. 4-25: Verschiebungen im Haarzyklus in FA2H defizienten Mäusen .....	96
Abb. 4-26: Analyse der Epidermislipide neugeborener und adulter FA2H defizienter Mäuse.....	98
Abb. 4-27: PLP-CGT/cgt(-/-) transgene Mäuse .....	101
Abb. 4-28: MBP-Expression in CGT-Knock-Out- und CGT/cgt(-/-)-Mäusen .....	103
Abb. 4-29: Elektronenmikroskopische Analyse des optischen Nervs von CGT-Knock-Out- Mäusen und CGT/cgt(-/-)-Mäusen.....	104
Abb. 4-30: Lipidanalyse des Gehirns von CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen .....	105
Abb. 4-31: Quantitative Auswertung der Lipide in CGT/cgt(-/-)-Mäusen .....	106
Abb. 4-32: Northern-Blot-Analyse der FA2H- und MAL-Expression im Gehirn .....	108

# 1 Einleitung

## 1.1 Sphingolipide

Sphingolipide sind Bausteine der Plasmamembran eukaryotischer Zellen. Der große lipophile Anteil der Sphingolipide ist in die Membran eingebettet. An diesen lipophilen Teil können vielfältige Moleküle, wie z.B. Kohlenhydrate, verknüpft sein, die so, trotz eventueller starker Hydrophilie der verknüpften Moleküle selbst, in der Membran verankert werden (Kolter und Sandhoff, 2003).

In Abb. 1-1 ist eine schematische Übersicht über den grundsätzlichen Aufbau von Sphingolipiden ausgehend von Ceramid aufgezeigt. Die Verknüpfung mit einem Zucker und die beteiligten Enzyme zur Synthese der beispielhaft dargestellten Glykosphingolipide sind ebenfalls dargestellt.



**Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Aufbaus einiger Sphingolipide**

Ausgehend vom Ceramid und dessen grundlegenden Bestandteilen sind die Wege zur Biosynthese wichtiger Glykosphingolipide gezeigt. Galaktosylceramid und Sulfatid sind die häufigsten Lipidbestandteile der Myelinmembran. Glukosylceramid kommt besonders häufig in der Haut vor. Glykosphingolipide mit einer Fettsäure mit 18 C-Atomen, wie hier gezeigt, sind vor allem im Gehirn anzutreffen. Die Fettsäurekettenlängen der Glykosphingolipide in der Haut sind deutlich größer und liegen in Bereichen von 30-36 C-Atomen.

CGT = Cerebrosid-Galaktosyltransferase, CST = Cerebrosid-Sulfotransferase, GCS = Glukosylceramid-synthase

Neben der Aufgabe als Bausteine der Plasmamembran zu dienen, sind die Sphingolipide an der Signaltransduktion beteiligt (Huwiler et al., 2000). Sie sind darüber hinaus essentiell für

den Aufbau der Myelinscheiden des peripheren und zentralen Nervensystems. Dementsprechend führen Defekte in Stoffwechselwegen, die an der Biosynthese oder dem Ab- und Umbau der Sphingolipide beteiligt sind, zu schwerwiegenden degenerativen Erkrankungen des Nervensystems (Kolter und Sandhoff, 1999). Als Beispiel für eine lysosomale Speichererkrankung sei hier die Metachromatische Leukodystrophie genannt. Bei ihr liegt eine Defizienz des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA) vor (Gieselmann et al., 1998; von Figura et al., 2001). Dieses Enzym ist für den Abbau des Sulfatids verantwortlich und daher kommt es bei Defizienz der ASA zur Akkumulation von Sulfatid. Die Speicherung des Sulfatids verursacht eine Degeneration der Oligodendrozyten und führt zu einer fortschreitenden Demyelinisierung, begleitet von neurologischen Symptomen. Auf eine erbliche humane Erkrankung, die die Biosynthese von Sphingolipiden betrifft, wird an einer späteren Stelle eingegangen werden (siehe 1.3.3).

Sphingolipide helfen des Weiteren beim Aufbau der Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut (Wertz, 1998). Wie essentiell ein funktionierender Sphingolipidstoffwechsel für das Überleben der Individuen an Land ist, zeigt sich bei seltenen Fällen der Gaucher'schen Erkrankung. Die Gaucher'sche Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine Mutation im Gen der Glukoceribrosidase, die für die Umsetzung von Glukosylceramid zu Ceramid verantwortlich ist (Kolter et al., 2006). Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Glukosylceramid, welches in der Haut als Vorläufer von Ceramid dient und in dieser Funktion bedeutend am Aufbau der Wasserbarriere der Haut beteiligt ist. Je nachdem, wie entscheidend die Mutation für die Funktion der Glukoceribrosidase ist, kann die Krankheit in sehr verschiedenen Ausprägungen auftreten. Sie kann völlig symptomlos verlaufen oder aber ein sehr schwerwiegendes Krankheitsbild aufzeigen. In seltenen und dann sehr schwerwiegenden Fällen der Gaucher'schen Erkrankung kommt es zu einem kompletten Ausfall des Enzyms Glukoceribrosidase, Glukosylceramid akkumuliert drastisch und wird nicht zu Ceramid umgebaut. Die Wasserbarriere der Haut kann nicht aufgebaut werden. Dadurch kommt es zu einem massiven transepidermalen Wasserverlust und innerhalb weniger Stunden nach der Geburt zum Tode der Patienten (Lui et al., 1988).

Die unterschiedlichen Formen der Sphingolipide sind artspezifisch und darüber hinaus spezifisch für die verschiedenen Zelltypen (van Meer und Lisman, 2002). Im Myelin und in der Haut kommen spezifische Formen der Sphingolipide vor, die wie im Beispiel des Galaktosylceramids wegen ihrer Spezifität gar als Marker für ein Entwicklungsstadium der myelinbildenden Zellen dienen (Pfeiffer et al., 1993). Sie unterscheiden sich in ihrem lipophilen Anteil, der häufig Teil der Membran ist. Zudem sind viele Sphingolipide mit Zuckerbausteinen verknüpft. Dabei können die Art und Zahl und die Verknüpfungsart variieren (Kolter und Sandhoff, 1999). Die im Ceramid als einem möglichen lipophilen Anteil vorhandenen Fettsäuren wiederum unterscheiden sich in der Länge, dem Grad der Sättigung

und dem Hydroxylierungsstatus. Im Myelin kommt ausschließlich Hydroxylierung am  $\alpha$ -C-Atom des Fettsäurerestes vor. Die Fettsäurereste der Sphingolipide der Haut sind vor allem in der  $\omega$ -Position hydroxyliert, daneben gibt es aber auch  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäurereste. Bislang ist die Funktion dieser  $\alpha$ -Hydroxylierung nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Biosynthese und der Funktion der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide im Nervensystem und in der Haut anhand von Mausmodellen. Daher wird im Folgenden das Myelin als die Struktur des ZNS, die  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide aufweist, beschrieben, und es wird näher auf die myelinbildenden Zellen eingegangen. Der Aufbau der Haut und der Haarfollikel sowie der Ablauf des Haarzyklus sind weitere an dieser Stelle zu behandelnde Themen, da ein Einfluss der  $\alpha$ -Hydroxylierung auf diese Strukturen denkbar ist. Sowohl für das Nervensystem als auch für die Haut wird das Vorkommen der verschiedenen Lipide näher betrachtet. Ein kurzer Überblick über den derzeitigen Wissensstand zum Enzym Fettsäure- $\alpha$ -Hydroxylase (FA2H), welches verantwortlich zeichnet für die  $\alpha$ -Hydroxylierung in den betrachteten Organen (Alderson et al., 2004; Eckhardt et al., 2005; Alderson et al., 2007), soll einen Einstieg in die Thematik ermöglichen. Methodisch wird kurz auf die gezielte Ausschaltung von Genen eingegangen.

## 1.2 Neuroglia des Nervensystems

Neben Nervenzellen, die beim Menschen nur ca. 10% und bei Nagetieren nur etwa 35% aller Zellen im Nervensystem ausmachen (Baumann und Pham-Dinh, 2001), sind die verschiedenen Neurogliazelltypen deutlich zahlreicher. Die glialen Zellen werden als unterstützende Zellen für die Neuronen angesehen. Es sind dies die Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten im ZNS und die Schwannschen, Enterischen und Satellitenzellen im PNS. Eine alternative Unterteilung der Neuroglia kann in Mikroglia und Makroglia erfolgen (Baumann und Pham-Dinh, 2001), wobei zur Makroglia die Astrozyten und die Oligodendrozyten gezählt werden, die sich aus gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln (Rao, 1997).

Die Mikroglia sind die zerebralen Makrophagen, die zum monozytischen Phagozytensystem gehören (Benninghoff, 1994). Etwa 5-20% aller Gliazellen des ZNS sind Mikroglia (Kettenmann und Ransom, 2005). In ihrer passiven Form sind sie bipolar oder haben viele verzweigte Zellfortsätze (ramifiziert; Lawson et al., 1990). Sie gelten als Sensoren des ZNS für pathologische Veränderungen und werden z.B. durch Verletzungen oder den Befall mit Fremdorganismen im ZNS aktiviert (Kreutzberg, 1996). Daraufhin verändern sie sich morphologisch zu amöboiden Zellen, die stark motil werden und Phagozytose betreiben können (Bechmann und Nitsch, 1997). In der Entwicklung übernehmen sie die Entsorgung apoptotischer Zellen (Streit, 2001; Raivich und Banati, 2004).

Die Astrozyten sind die „Stützzellen“ des ZNS. Ihren Namen verdanken sie ihrer sternenförmigen Morphologie. Sie sind für die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und für die Entsorgung eventueller giftiger Stoffe notwendig (Vannucci et al., 1997; Tamai und Tsuji, 2000).

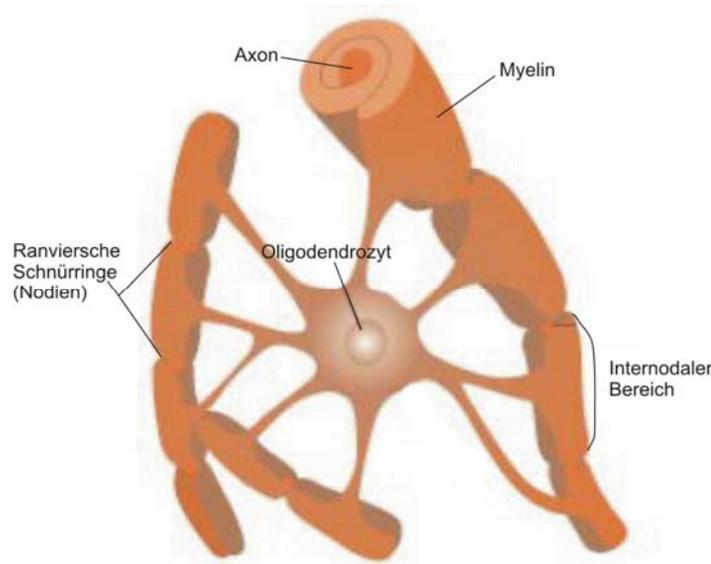
### **1.2.1 Oligodendrozyten und Schwannzellen**

Im ZNS wird das Myelin von Oligodendrozyten gebildet. Diese lipidreiche Isolierung trägt entscheidend zur saltatorischen Erregungsleitung bei. Zusätzlich kommen den Oligodendrozyten unterstützende Funktionen für Nervenzellen zu. Der Kontakt von Oligodendrozyten zu myelinisierten Axonen ist in vivo für die hoch spezialisierte axolemmale Organisation an Ranvierschen Schnürringen notwendig (Kaplan et al., 1997). Außerdem ist bekannt, dass für axonales Wachstum und Determinierung der Anzahl der axonalen Fortsätze sowohl der Kontakt mit dem Oligodendrozyten als auch der Prozess der Myelinisierung notwendig sind (Colello, 1994). Einem von den Oligodendrozyten gebildeten Protein, dem Myelin-assoziierten Glykoprotein (MAG), wird eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des Axondurchmessers zugeschrieben, so dass die Oligodendrozyten über diesen Weg ebenfalls auf die Ausbildung des Durchmessers der Nervenfasern Einfluss üben (Yin et al., 1998).

Man unterscheidet myelinisierende Oligodendrozyten, nicht-myelinisierende Satellitenzellen und Oligodendrozyten-Vorläufer. In der Literatur werden bereits für frühe Entwicklungsstadien verschiedene Populationen von Oligodendrozyten-Vorläufern beschrieben (Pfeiffer et al., 1993). Die Differenzierung und Reifung der Oligodendrozyten verläuft in verschiedenen Stadien, die durch deutliche Veränderungen der Zellmorphologie und der Expression unterschiedlicher Marker gekennzeichnet sind. Das Stadium der unreifen, post-mitotischen, jedoch nicht-myelinisierenden Oligodendrozyten ist zu unterscheiden vom Stadium der differenzierten, myelinisierenden Oligodendrozyten (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Nur differenzierte Oligodendrozyten sind in der Lage, Myelin zu bilden, wohingegen undifferenzierte Oligodendrozytenvorläuferzellen ein höheres Potential zur Migration besitzen als differenzierte. Einige Vorläuferzellen differenzieren während ihrer Entwicklung nicht aus und verbleiben als adulte Oligodendrozytenvorläuferzellen subventrikulär. Sie können eine Ressource für die Remyelinisierung darstellen (Wolswijk et al., 1989; Miller et al., 2002).

Myelinisierende Oligodendrozyten des adulten Gehirns sind durch einen auffälligen Polymorphismus gekennzeichnet. Sie entsenden zwischen einem und bis zu fünfzig feine Fortsätze zu den Axonen verschiedener Neurone (Bjartmar et al., 1994). Im peripheren Nervensystem entsprechen Schwannzellen den Oligodendrozyten in der Funktion, jedoch

umhüllt eine Schwannzelle jeweils nur ein Axon, wodurch sie sich morphologisch von Oligodendrozyten unterscheidet (Arroyo und Scherer, 2000). Kommen diese Fortsätze mit einem nicht-myelinisierten Axon in Kontakt, so beginnt der betroffene Oligodendrozyt oder die Schwannzelle als Reaktion auf ein axonales Mitogen zu proliferieren. Es wurden verschiedene Mitogene beschrieben, die auf das Oligodendrozyten- bzw. Schwannzellwachstum wirken können (DeVries et al., 1983; Chen und DeVries, 1989), z.B. die Proteinfamilie der Hereguline (Morrissey et al., 1995) oder andere Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor) (Stewart et al., 1991). Am Axon angekommen, verbreitern sich die Fortsätze, wickeln sich mehrfach (bis zu 160 mal) um einen Abschnitt des jeweiligen Axons und bilden so die Markscheide (Pannese, 1994). Myelinisierte Abschnitte (Internodien) werden von kleinen Bereichen nicht myelinisierter Abschnitte (Nodien, Ranviersche Schnürringe) unterbrochen. Abbildung 1-2 gibt eine schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten.



**Abb. 1-2: Schematische Darstellung eines myelinisierenden Oligodendrozyten**

Dargestellt ist ein Oligodendrozyt mit Fortsätzen, die mehrere Axone erreichen und deren internodale Bereiche myelinisieren (modifiziert nach Bear et al., 2001).

### **1.3 Myelin: Die Myelinisierung und die wichtigsten Komponenten des Myelins**

Die Myelinmembran wird von differenzierten Oligodendrozyten produziert. Sie ist vor allem aus Lipiden und Proteinen aufgebaut, welche charakteristisch für das Myelin sind. Im folgenden Abschnitt soll der Prozess der Myelinisierung dargestellt und auf die wichtigsten Komponenten des Myelins eingegangen werden.

### 1.3.1 Die Myelinisierung

Die Myelinisierung setzt bei Nagetieren im Gehirn kurz nach der Geburt ein (Frank et al., 1999). Beim Menschen hingegen beginnt sie bereits im letzten Drittel der fötalen Entwicklung zuerst im Rückenmark (Kettenmann und Ransom, 2005). Die Myelinisierung erfordert die Koordination der Expression von Genen, die für die Proteine des Myelins kodieren, und solchen, die für die Enzyme kodieren, welche für den Lipidstoffwechsel notwendig sind (Campagnoni und Macklin, 1988).

Die Fortsätze der myelinisierenden Zellen erkennen die Axone über Zelloberflächenrezeptoren. Diese Rezeptoren produzieren daraufhin intrazelluläre Signale in den Oligodendrozyten, wodurch die Oligodendrozyten zur Umwindung des Axons befähigt werden (Umemori et al., 1999). Nach der Umwindung eines axonalen Abschnittes wird das Myelin kompaktiert. Das Zytoplasma verbleibt in der innersten axonahen (periaxonalen) und in der äußersten (abaxonalen) Myelinwindung, sowie in einem mikrotubulireichen Kanalsystem im Myelin (Schmidt-Lantermann-Kanäle). Diese Kanäle stellen auch Verbindungen zum Zellkörper der myelinisierenden Zelle her und gewährleisten den Stoffaustausch (Baumann und Pham-Dinh, 2001).

Die isolierende Eigenschaft des Myelins liegt in seinem hohen Lipidgehalt begründet. 70-85% der Myelintrockenmasse sind Lipide (Sastry, 1985). Davon sind etwa 26% Cholesterol, 32% Glykolipide und 42% Phospholipide (Morell und Norton, 1980). Die Isolierung durch das Myelin und die hoch organisierte Verteilung spannungssensitiver Ionenkanäle in der Axonmembran sind Voraussetzungen für die saltatorische Erregungsleitung. In der axonalen Membran der Ranvierschen Schnürringe liegen Natriumkanäle in besonders hoher Dichte vor. Die schnellen Kaliumkanäle haben die höchste Dichte im paranodalen Bereich. Im nicht myelinisierten Axon ist die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung hingegen proportional zum Axondurchmesser (Kettenmann und Ransom, 2005).

Es ist jedoch noch nicht eindeutig festgestellt worden, welche Signale bestimmen, welches Axon myelinisiert wird. Eine mögliche Determinierung könnte im Durchmesser des Axons liegen, der einen bestimmten Wert überschreiten muss, bevor die Myelinisierung beginnt. Es ist aber auch denkbar, dass Axone selbst an der Regulierung beteiligt sind, da bewiesen wurde, dass das Axon die Myelindicke mitbestimmt und dass ein Oligodendrozyt mehrere Axone gleichzeitig myelinisiert, obwohl diese unterschiedliche Durchmesser aufweisen (Waxman und Sims, 1984). Neuere Arbeiten haben eine Beteiligung der Neureguline an diesem Prozess aufgezeigt (Übersicht in Nave, 2006). Die Neureguline wirken als axonale Liganden an glialen ErbB-Rezeptoren und scheinen darüber das Wachstum der Schwannzellmembran zu regulieren. Dadurch kann die Myelindicke so eingestellt werden, dass sie zum Axondurchmesser passt (Nave, 2006). Auch Astrozyten spielen bei der Myelinisierung eine entscheidende Rolle. Nach Ausschalten des Gens für das Protein GFAP

(glial fibrillary acidic protein) in der Maus zeigte diese Mausmutante veränderte Fortsätze der Astrozyten, abnormale Myelinisierung und zahlreiche nicht-myelinisierte Axone (Liedtke et al., 1996). Eine transgene Mauslinie, die das humane GFAP überexprimiert, stirbt am zweiten Tag nach der Geburt an den Folgen einer drastischen Enzephalopathie (Brenner et al., 2001; Hsiao et al., 2005). Die Myelinisierung ist demnach von der Koordination in den Oligodendrozyten selbst, aber auch von den Astrozyten und Neuronen abhängig; dies unterstreicht die Komplexität des Prozesses.

### 1.3.2 Die Myelin-spezifischen Proteine und ihre Funktionen

Einige Myelin-spezifische Proteine haben im ZNS und PNS ein sehr genau determiniertes zeitliches und räumliches Expressionsmuster (Kettenmann und Ransom, 1995). Daher werden bei ihnen spezifische Aufgaben vermutet. Ein wichtiges Myelin-spezifisches integrales Membranprotein ist das Proteolipid Protein (PLP). Zusammen mit seiner kleineren Spleißvariante DM-20 (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Spörkel et al., 2002) bildet es 50% des Gesamtmyelinproteins. Es bewirkt die gegenseitige Verankerung der gestapelten Myelinschichten (Griffiths et al., 1995; Coetzee et al., 1998). Die verschiedenen Isoformen des basischen Myelinproteins (MBP) machen 30-40% des Gesamtmyelinproteins aus (Hildebrand et al., 1993). Sie sind auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert und bewirken durch die Verankerung der gegenüberliegenden Membranseiten jeweils eines Ausläufers die Kompaktierung des Myelins (Deber und Reynolds, 1991; Campagnoni und Skoff, 2001). Die 2'-3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNPase) ist ein zytoplasmatisches Membran-assoziiertes basisches Protein des nicht-kompaktierten Myelins. Dieses Protein wird bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Oligodendrozytendifferenzierung exprimiert und gilt daher als einer der frühesten Marker der Oligodendrozytenlinie (Scherer et al., 1994). Die Menge an CNPase ist auch im Myelin gering, es kommt jedoch zu einem gehäuften Auftreten dieses Enzyms im Bereich der Ranvierschen Schnürringe. Hier macht es 4% des Gesamtproteins aus (Kozlov et al., 2002), weshalb eine wichtige Rolle der CNPase bei der Aufrechterhaltung der Axon-Glialen Interaktion in den Ranvierschen Schnürringen vermutet wird (Rasband et al., 2005).

Das Fehlen der Myelinproteine kann zu schweren Myelinisierungsstörungen führen. Als Beispiel sei hier das Pelizaeus-Merzbacher-Syndrom genannt, welches durch eine Veränderung des PLP-Gens verursacht wird (Inoue et al., 1996). Diese erbliche Krankheit ist mit schweren Beeinträchtigungen wie spastischen Lähmungen, Bewegungsstörungen sowie stark herabgesetzter Intelligenz verbunden, die durch den Schwund der Myelinscheiden vor allem in den Großhirnhemisphären hervorgerufen werden. Im Mausmodell führt eine entsprechende Mutation des PLP-Gens zum sogenannten „jimpy“-Phänotyp (Schneider et

al., 1995). Eine Mutation des MBP-Gens ruft bei Mäusen den „shiverer“-Phänotyp hervor (Roach et al., 1985). In beiden Mausmodellen konnte eine starke Störung der Myelinbildung nachgewiesen werden, die als ursächlich für den Phänotyp angesehen wurde (Coetzee et al., 1998). Diese Beispiele unterstreichen zum einen die Wichtigkeit der Myelinproteine für die einwandfreie Funktion des Myelins, und zum anderen zeigen sie, dass Mutationen in Mäusen als Modelle für erbliche Erkrankungen beim Menschen verwendet werden können.

### 1.3.3 Die Myelin-spezifischen Lipide und ihre Funktionen

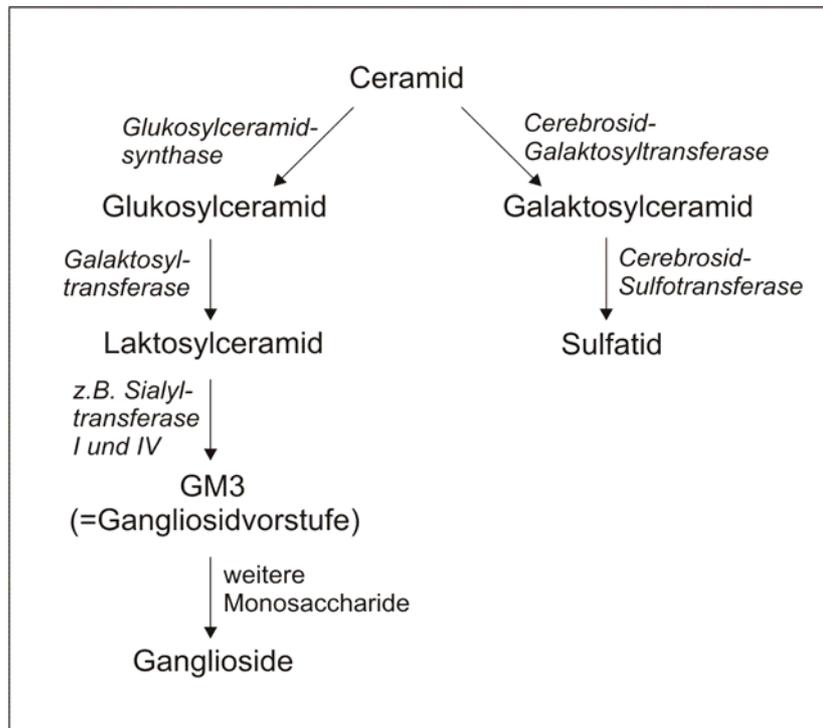
Etwa 70-80% des Myelintrockengewichts sind Lipide der Myelinmembran (Übersicht in Stoffel et al., 1997). Die Hauptbestandteile dieser Lipide sind Cholesterol, Phospholipide und Glykosphingolipide. Als Glykosphingolipide werden die glykosylierten Derivate der Ceramide bezeichnet. Das gehäufte Vorkommen der Glykosphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid unterscheidet das Myelin von anderen Plasmamembranen, wobei die Kohlenhydratreste fast ausschließlich an der Aussenseite der Membran zu finden sind. Damit liegt eine deutlich asymmetrische Verteilung vor (Stoffel et al., 1997).

Der lipophile Hauptbestandteil der Sphingolipide in der Plasmamembran ist das Ceramid. Es wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Dabei wird durch Kondensation von L-Serin mit einer Coenzym-A-aktivierten Fettsäure Sphinganin gebildet. Dieses wird zunächst reduziert und anschließend mit einer zweiten Fettsäure zu Ceramid verknüpft (Hakomori, 1986). Ceramid ist der Ausgangsstoff für den Aufbau der Glykosphingolipide und von Phosphosphingolipiden, zu denen Sphingomyelin zählt. Durch Reaktion der Hydroxylgruppe des Ceramids mit Phosphatidylcholin entsteht Sphingomyelin. Reagiert diese Hydroxylgruppe mit aktivierten Kohlenhydraten, resultieren die Glykosphingolipide. Je nach verknüpften Kohlenhydraten können daraus die Cerebroside Glukosylceramid oder Galaktosylceramid entstehen.

Die komplexen Glykosphingolipide werden hieraus gebildet, wenn weitere Monosaccharide mit diesen Cerebroside verknüpft werden. Ausgehend von Glukosylceramid entsteht zunächst Laktosylceramid durch Verknüpfung mit einem weiteren Galaktoserest. Wird in der weiteren Reaktion Sialinsäure in das Molekül eingebaut, resultieren die Ganglioside, die auf der Zelloberfläche der Neuronen an der Wechselwirkung mit glialen Zellen beteiligt sind (Kolter, 1999). Ist in der verknüpften Zuckerkette der komplexen Glykosphingolipide keine Sialinsäure enthalten, handelt es sich um die Globoside.

Wird ein Galaktosylceramid mit einem Sulfatrest verestert, resultiert daraus Sulfatid (Kolter, 1999). Im Myelin sind ein Drittel der Lipide Galaktosylceramid und sein sulfatiertes Derivat Sulfatid (Coetzee et al., 1998). Damit ist der Anteil dieser Glykosphingolipide hier besonders hoch und diese Tatsache stellt somit ein besonderes Merkmal der Myelinmembran dar.

Abb. 1-3 gibt einen schematischen Überblick über einige mögliche Glykosphingolipide, die ausgehend von Ceramid entstehen können. Dabei sind die notwendigen Enzyme für die entsprechenden Reaktionen an den Pfeilen angegeben.



**Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Biosynthese einiger Glykosphingolipide**

Ausgehend von Ceramid sind 2 mögliche Biosynthesewege für die Entstehung von Glykosphingolipiden aufgezeigt. Die beteiligten Enzyme sind an den Pfeilen vermerkt.

Mit Hilfe von gezieltem Ausschalten einzelner Gene in der Maus, die für Enzyme kodieren, die im Stoffwechsel der Sphingolipide eine entscheidende Rolle spielen, konnte die Wichtigkeit der Sphingolipide für den Organismus der Wirbeltiere gezeigt werden. Beispielhaft seien hier die Glukosylceramidsynthase-Knock-Out-Maus und die CGT-Knock-Out-Maus genannt. Bei ersterer fehlen das Glukosylceramid und daraus resultierend alle komplexen Ganglioside. Diese Mausmutante ist embryonal letal (Yamashita et al., 1999). Der CGT-Knock-Out-Maus (CGT = Cerebrosid-Galaktosyl-Transferase) fehlen die Glykosphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid. Eine Myelinisierung wird in diesen Mäusen dennoch durchgeführt. Das gebildete Myelin ist instabil und es kommt zu einer progressiven Demyelinisierung mit fortschreitendem Alter. Dies äußert sich zum Beispiel in schwerwiegenden motorischen Koordinationsdefekten (Bosio et al, 1996; Coetzee et al. 1996). Aber auch die Überexpression von Genen, die am Sphingolipidstoffwechsel beteiligt sind, kann schwerwiegende Folgen für das Myelin haben, wie am Beispiel der CGT-überexpressierenden Mausmutante zu beobachten ist (Fewou et al., 2005). Diese Mäuse weisen eine transgene Überexpression des Enzyms CGT unter der Kontrolle des PLP-Promotors auf, d. h. vor allem in Oligodendrozyten. Das Myelin dieser Mausmutante erwies

sich als instabil und die Mäuse zeigten eine fortschreitende Demyelinisierung (Fewou et al., 2005).

Als einzige bislang bekannte erbliche Erkrankung beim Menschen, die auf einem Defekt in der Sphingolipid-Biosynthese beruht, wurde eine GM3-Synthase-Defizienz nachgewiesen. Diese erbliche Erkrankung, die durch ein Epilepsie-Syndrom gekennzeichnet ist, wird einem Defekt in der GM3-Synthase zugeordnet (Simpson et al., 2004). Im Plasma der Patienten konnte keinerlei GM3-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden. Entsprechend kommt es zu einem kompletten Verlust der GM3-Ganglioside. Die Krankheit äußert sich in einem Epilepsie-Syndrom, welches mit einer Entwicklungsstagnation und Blindheit einhergeht.

Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Glykosphingolipide in großen Mengen in den epithelialen Zellen des Gastrointestinaltraktes vorkommen (Simons und van Meer, 1988). Der Gastrointestinaltrakt ist ständigen Zug- und Druckkräften ausgesetzt, weshalb man eine Beteiligung der Glykosphingolipide an der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität der Plasmamembran vermutet. Über den Zuckerrest könnten die Glykosphingolipide an Zell-Zell-Erkennungsvorgängen beteiligt sein und es besteht die Möglichkeit der Beeinflussung von Signalprozessen an der Plasmamembran durch die Glykosphingolipide (Sheikh et al., 1999; Takamiya et al., 1996).

Die einzelnen Zuckerbausteine, die an das Ceramid gebunden sind, können sich nach Art, Zahl und Verknüpfung unterscheiden. Die Fettsäuren im Ceramid variieren in der Länge, dem Grad der Sättigung und dem Hydroxylierungsstatus. Die Hydroxylierung im Myelin findet ausschließlich am  $\alpha$ -C-Atom des Fettsäurerestes statt. Die  $\alpha$ -Hydroxylierung läuft in der mikrosomalen Fraktion in einem NAD(P)H- und  $O_2$ -abhängigen Mechanismus ab (Kishimoto, 1986; Singh und Kishimoto, 1979). In der Myelinscheide sind die  $\alpha$ -hydroxylierten Cerebroside die am häufigsten vertretenen Lipide (Kishimoto und Radin, 1966; Sastry, 1985). Umso erstaunlicher ist es, dass über ihre Funktion bislang nur Vermutungen vorliegen. Die  $\alpha$ -Hydroxylierung in Sphingolipiden könnte zusätzliche Bindungsstellen für Ionen und Wasserstoffbrückenbindungen liefern und somit die Stabilität der Myelinscheiden unterstützen (Graf et al., 2002; Koshy et al., 1999). Ein Beweis für diese Vermutung steht bis heute jedoch noch aus.

Es bleibt damit festzuhalten, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Sphingolipide im Myelin eine sehr häufig vorkommende Modifikation ist, deren Funktion unbekannt ist.

## 1.4 Die Haut und der Haarfollikel

Auch in der Haut stellen Ceramide einen wichtigen Anteil der Lipidkomponenten dar. Diese Ceramide können  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren enthalten und könnten somit ebenfalls von einer Ausschaltung der  $\alpha$ -Hydroxylierung betroffen sein, die durch Ausschaltung der FA2H

erreicht werden soll. Um mögliche Effekte in der Haut analysieren zu können, sollen die Haut und der Haarfollikel in Aufbau und Zusammensetzung dargestellt werden.

Die Haut als größtes Organ der Säugetiere bedeckt die gesamte Körperoberfläche. In sie sind die Anhangsgebilde wie die Nägel und die Haare eingebaut. Die Haut erfüllt zahlreiche Funktionen: Sie grenzt den Organismus von der Außenwelt ab und schützt ihn vor schädigenden Einflüssen. Neben der Regulation von Temperatur und Stoffwechsel ist sie vor allem für den Wasserhaushalt essentiell. Sie dient zudem der Immunabwehr pathogener Erreger.

### 1.4.1 Aufbau der Haut

Die Haut (Cutis) lässt sich in die Oberhaut (Epidermis) und die darunter liegende Lederhaut (Dermis) gliedern. Funktionell, jedoch nicht strukturell, wird noch die Unterhaut (Subcutis) mit einem durch Bindegewebssepten stabilisierten Fettgewebe als Verschiebeschicht zur Haut gezählt. Sie verbindet die Dermis mit den darunter gelegenen Strukturen.

Die Epidermis ist ein gefäßloses, stratifizierendes, verhornendes Epithel, welches in erster Linie aus Keratinozyten gebildet wird. Diese wandern ausgehend von einer sich teilenden Basalzellschicht (*Stratum basale*) nach außen, wobei sie zunehmend differenzieren und durch die Expression von strukturell verschiedenen Keratinen stabilisiert werden, um schließlich als undurchlässige Hornschicht (*Stratum corneum*) den protektiven Abschluss zur Umgebung zu bilden (Mack et al., 2005; Li et al., 2007). Komplett verhornte Zellen des *Stratum corneum* besitzen keine Zellkerne mehr und werden abgeschilfert. Die terminal differenzierten Keratinozyten des *Stratum corneum* werden Korneozyten genannt (Downing, 1992; Eckert et al., 2005). Zehn Prozent der epidermalen Zellpopulation sind zudem pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhans-Zellen und sensorisch aktive Merkel-Zellen.

Die unter der Oberhaut gelegene Dermis dient der Verankerung und der Ernährung der gefäßfreien Epidermis. Die Dermis enthält reißfeste Kollagenfasern und elastische Fasern. Zudem sind zahlreiche Blut- und Lymphgefäße in die Lederhaut eingeflochten. Die Drüsen der Haut, wie z.B. die Talg- und die Schweißdrüse, sind in diesem Teil der Haut lokalisiert, ebenso wie die meisten Sinnesrezeptoren der Haut. Die Dermis wird nochmals unterteilt in das *Stratum papillare* (Zapfenschicht) und das *Stratum reticulare* (Netzschicht). Beim *Stratum papillare* handelt es sich um eine kapillarreiche Schicht. Die Zellzwischenräume dieser Schicht sind weit und mit einer Flüssigkeit gefüllt (Interstitium), die durch das hier beginnende Lymphgefäßsystem drainiert wird. Unterschiedliche Zellen können sich in diesem Gewebe relativ frei bewegen. Die Grenze zwischen Lederhaut und Oberhaut verläuft wellenartig und wird Papillarkörper genannt. Die vielfachen Einstülpungen der Lederhaut in

die Oberhaut vergrößern die Oberfläche und sorgen damit für eine feste mechanische Verbindung dieser beiden Gewebsschichten. Der Papillarkörper hat in behaarten Abschnitten der Haut relativ flache Papillen, da hier auch die Haarfollikel an der Verankerung der Oberhaut mitwirken. In der Netschicht befindet sich vor allem extrazelluläres Bindegewebe, welches zum großen Teil aus elastischen Fasern besteht.

### **1.4.2 Aufbau des Haarfollikels**

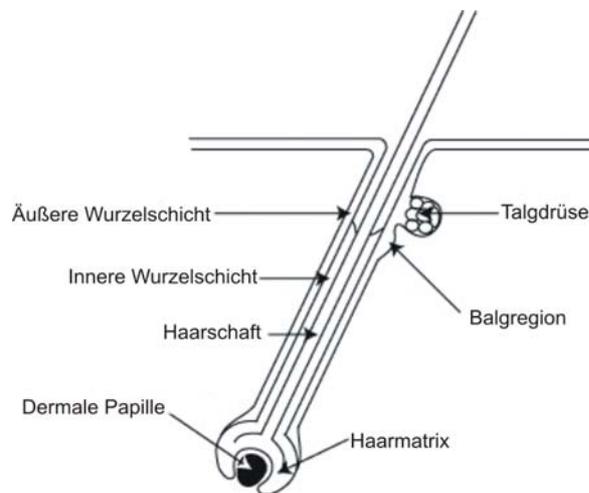
Haare sind ein Beispiel für sogenannte epidermale Anhänge. In Säugetieren produzieren die Haarfollikel Haare, welche ihrerseits eine Reihe von Funktionen für den Organismus wahrnehmen. Die Haare sind beteiligt an der Thermoregulation, an der Gewinnung von sensorischen Informationen, der sozialen Kommunikation und dem Schutz vor der Außenwelt (Botchkarev und Paus, 2003). Das Nervensystem und das Haarfollikel-epithel haben einen gemeinsamen ektodermalen Ursprung (Botchkarev et al., 1998). Die Haare detektieren mechanische Stimuli an der Hautoberfläche, und schon kleinste Bewegungen an den Haaren aktivieren Neurorezeptoren im Follikel, wodurch wichtige sensorische Informationen an das Nervensystem weitergeleitet werden (Paus und Cotsarelis, 1999).

Die einzelnen Stufen der Haarentwicklung und die Aufrechterhaltung des Haarfollikels sind komplex. Generell wird das Wachstum der Haare sowie ihre Morphologie vom Haarfollikel aus kontrolliert (Stenn und Paus, 2001). Die Morphogenese des Haarfollikels nimmt ihren Ausgangspunkt bei einer Ansammlung von epidermalen Keratinozyten, welche nach und nach die einzelnen Strukturen des Haarfollikels ausbilden (Paus et al., 1999). Die Formierung von Haarfollikeln erfolgt als Ergebnis von Signalen sowohl aus dem Epithel der Epidermis als auch aus dem darunter liegenden Mesoderm. Das Epithelium wandert als so genannter „Plug“ nach unten in die Dermis. An dessen proximalen Ende, dieses ist in der Haut als das untere Ende definiert, findet eine mesenchymale Kondensation statt, die die Bildung der Dermalen Papille bedingt (Stenn und Paus, 2001). Von der Dermalen Papille gehen aktivierende Signale aus, die das Wachstum des Haarfollikels beeinflussen (Panteleyev et al., 2001).

Die Formierung der Haarfollikel findet im Organismus normalerweise nur einmal statt, so dass ein Säugetier bereits bei seiner Geburt eine feststehende Anzahl an Haarfollikeln aufweist, die über seine Lebensspanne nicht mehr ansteigt. Es kann aber zu einer Veränderung in der Größe der Haarfollikel und der Haare kommen. Die Neubildung von Haarfollikeln wurde im wachsenden Organismus jedoch auch nach der Geburt noch beobachtet, z.B. nach einer Verheilung von Wunden beim Kaninchen.

Aus der Morphogenese geht der vollständig geformte Haarfollikel hervor, der eine proximale Region und eine distale (obere) Region aufweist. Die distale Region des Haarfollikels ist

permanent, die proximale Region unterliegt hingegen zyklischen Veränderungen während des Haarzyklus. Abb. 1-4 gibt einen Überblick über den Aufbau des vollständig geformten Haarfollikels:



**Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Haarfollikels**

Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung des vollständig geformten Haarfollikels in longitudinaler Ansicht mit einer groben Einteilung der verschiedenen Schichten und einem Einblick in die Lokalisation der Talgdrüse in der Haut (modifiziert nach <http://www.dermatology.org.uk/portal/activities/images/hair-follicle-parts.jpg>).

Nachdem der Haarfollikel während der Morphogenese vollständig geformt wurde, tritt er in den ersten Haarzyklus ein. Dieser beginnt bei der Maus im Bereich der unteren Rückenhaut mit der ersten catagenen Phase etwa am 16. Tag nach der Geburt (Alonso und Fuchs, 2006). Ein normaler Haarzyklus durchläuft drei Stadien: Die anagene Phase als Phase des raschen Wachstums, die catagene Phase, in der der Haarfollikel stark verkürzt wird, und die telogene Phase, die ein Ruhestadium darstellt (Müller-Röver et al., 2001). Mehr als 100 regulierende Proteine und Strukturproteine konnten in den Bereichen des epithelialen und mesenchymalen Kompartiments des Haarfollikels lokalisiert werden (Stenn und Paus, 2001). Deren Expressionsmuster ist örtlich und zeitlich reguliert und unterliegt dramatischen Veränderungen während des Haarzyklusses. Die Dauer der einzelnen Phasen und die Übergänge zwischen den Phasen können deutlich beeinflusst werden von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen, aber auch von Medikamenten (Paus et al., 1996; Paus und Cotsarelis, 1999).

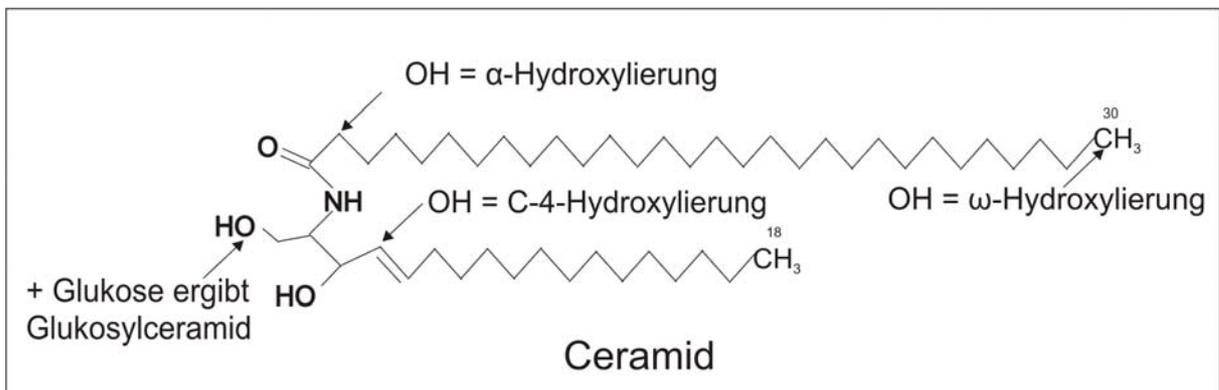
### 1.4.3 Lipidkomponenten in der Haut und deren Funktion

Die Lipide in der Haut haben vor allem die Aufgabe, die Barrierefunktion der Haut gegen transepidermalen Wasserverlust aufrecht zu erhalten und somit das Leben der Wirbeltiere an

Land zu ermöglichen. Die Barriere wird durch strukturierte extrazelluläre Lipidlamellen im *Stratum corneum* der Epidermis aufgebaut (Madison, 2003).

Als Sphingolipide kommen in der Epidermis Ceramide, Glukosylceramide und Sphingomyelin vor. Ceramide werden als die wichtigsten Komponenten der Wasserbarriere in Säugern angesehen (Jennemann und Sandhoff et al., 2007). Die Ceramide kommen in verschiedenen Derivaten vor, je nach Länge, Sättigung und Hydroxylierungsstatus der verbundenen Fettsäuren. Entsprechend diesen Variationsmöglichkeiten wurden 9 unterschiedliche Ceramide im Stratum corneum der menschlichen Haut entdeckt und bezeichnet (Madison, 2003). Spezifisch für die Epidermis tritt ein großer Teil der Ceramide mit  $\omega$ -hydroxylierten, sehr langen Fettsäuren auf, die zwischen 30 und 36 C-Atomen besitzen. Diese Ceramide und auch die freien  $\omega$ -hydroxylierten Fettsäuren scheinen vor allem am Aufbau der Lipidumhüllung der Korneozyten beteiligt zu sein (Doering et al., 2002). Die Korneozyten sind von einer Proteinhülle umgeben, wobei Involucrin ein Protein dieser Hülle ist, welches besonders intensiv untersucht wurde. An diese Proteinhülle ist eine Umhüllung aus Lipiden kovalent gebunden. Die Lipidhülle besteht fast ausschließlich aus Hydroxyceramiden, in denen die  $\omega$ -hydroxylierten, sehr langen Fettsäuren über Amidbindungen an Sphingosin gebunden sind (Downing, 1992). Die kovalente Verknüpfung der Lipide an die Proteine erfolgt über die  $\omega$ -Hydroxylgruppe der Fettsäurereste.

Abb. 1-5 zeigt ein Ceramidmolekül als Grundgerüst für die in der Haut vorkommenden Sphingolipide. Stellen für mögliche Substitutionen verdeutlichen die daraus resultierende Vielfalt der Ceramidderivate der Haut.



**Abb. 1-5: Ceramid als Grundgerüst der Sphingolipide der Haut**

Ausgehend vom Ceramidmolekül sind einige mögliche Positionen für Substitutionen im Molekül aufgezeigt.

Die am häufigsten vorkommende Hydroxylierung in den Ceramiden der Epidermis ist die 4-Hydroxylierung. Diese führt zur Bildung des Phytosphingosin (Sandhoff und Kolter, 2003). Die veresterten Fettsäuren kommen mit oder ohne  $\omega$ -Hydroxylierung vor. Zusätzlich oder separat kommt es zur  $\alpha$ -Hydroxylierung der Ceramide und auch die Vorstufen, d.h. die Glukosylceramide, können als  $\alpha$ -hydroxylierte Derivate auftreten. Kürzlich wurde der Beweis erbracht, dass die FA2H für die Bildung der  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und der  $\alpha$ -

hydroxylierten Glukosylceramide in der Haut verantwortlich ist (Uchida et al., 2007). In der Haut wird für die zusätzlichen Hydroxylgruppen vermutet, dass sie zur Erhöhung der Steifheit der interzellulären Lipidaggregate beitragen, da intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt auftreten können (Shah et al., 1995). Die Level an 4-Hydroxysphingonin sind bei Psoriasispatienten erniedrigt. Die Psoriasis geht mit einem Defekt der Barrierefunktion der Haut einher, so dass ein Zusammenhang zwischen dieser Hydroxylierung und der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut vermutet wird. Die Beobachtungen, die bei einer Mausmutante gemacht wurden, die defekt für den Transkriptionsfaktor Arnt ist (Takagi et al., 2003), unterstützen diese Hypothese. In dieser Mausmutante sind sowohl die 4- als auch die  $\alpha$ -Hydroxylierung deutlich reduziert und gleichzeitig kommt es zum Zusammenbruch der Wasserbarrierefunktion der Haut, was bald nach der Geburt letal ist. Ob dafür jedoch die 4- oder die  $\alpha$ -Hydroxylierung verantwortlich ist, ist nicht bekannt.

Als häufigstes Glykosphingolipid der Epidermis wurde das Glukosylceramid gefunden. Es macht etwa 4% der totalen epidermalen Lipidmenge aus (Madison et al., 1986). Je nachdem, ob in der Sphingobase eine C-4-Hydroxylierung vorliegt oder nicht, spricht man vom Phytosphingosin- (mit C-4-Hydroxylierung) oder Sphingosin- (ohne C-4-Hydroxylierung) Grundgerüst der Glukosylceramidderivate. Des Weiteren können Unterschiede in der Länge, Sättigung und Hydroxylierung der verbundenen Fettsäuren auftreten. Glukosylceramide werden als intrazelluläre Vorstufe und Träger für die extrazellulären Ceramide angesehen, welche durch Deglukosylierung entstehen. Glukosylceramide sind die Hauptkomponenten der sogenannten „Lamellar Bodies“ (LBs), welche in den Zellen des *Stratum granulosum* gefunden wurden. Die LBs werden in die extrazellulären Spalten des darüber gelegenen *Stratum corneum* extrudiert und dort zu Ceramiden hydrolysiert (Doering et al., 1999). Damit sind die Korneozyten eingebettet in eine Matrix aus Lipiden (Downing, 1992). Tatsächlich konnte mit Hilfe einer spezifischen Ausschaltung der Glukosylceramidsynthese in der Epidermis der Maus gezeigt werden, dass Glukosylceramid und auch seine Hydrolyse zu Ceramid essentiell für die Wasserbarriere der Haut und damit für das Überleben der Wirbeltiere an Land sind (Jennemann und Sandhoff et al., 2007). Daneben konnten zwei Derivate des Sphingomyelins (SM-1 und SM-3) als Vorläufer für zwei spezifische Ceramide (Cer 2 und Cer 5), die im *Stratum corneum* extrazellulär auftreten, ausgemacht werden (Uchida et al., 2000). Einige bekannte Hautkrankheiten wie Psoriasis oder atopische Dermatitis zeigen verminderte epidermale Ceramidlevel, die zur Schwere der Krankheit und zum Fortschreiten entscheidend beitragen könnten (Holleran et al., 2006).

Die Ceramide stellen etwa die Hälfte der Lipide im *Stratum corneum*. Des weiteren kommen als polare Lipide der Epidermis vor allem Cholesterol und in geringerem Maße sulfatierte

Derivate und Fettsäureester des Cholesterol vor. Etwa 12% der Lipide des *Stratum corneum* sind freie Fettsäuren, die vor allem als sehr lange Fettsäuren mit 20 bis 28 C-Atomen vorkommen. Triacylglycerole stellen 1-2% der Lipide des *Stratum corneum* dar. In den Lipiden ist zudem etwa 0,5% freies Sphingosin enthalten, welches als Inhibitor der Proteinkinase C und der Zellteilung eine wichtige Rolle in der Modulierung der Zellproliferationsrate spielen könnte (Übersicht in Downing, 1992).

Die extrazellulären Lipide des *Stratum corneum* sind äquimolar aus den verschiedenen Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren aufgebaut (Downing, 1992). Dieses Verhältnis scheint besonders wichtig für die Homöostase der epidermalen Barriere zu sein (Holleran et al., 2006).

Neben diesen polaren Lipiden findet man immer auch einen großen Anteil an unpolaren Lipiden, die von der Talgdrüse gebildet werden. Sie werden in den Haarkanal abgegeben und gelangen von dort auf die Hautoberfläche. Dieses Lipidgemisch wird als Sebum bezeichnet. Da die Lipide des Sebums eine geringe Polarität aufweisen, ist es unwahrscheinlich, dass sie in die epidermale Barriere eingebaut werden, und daher wird ihnen keine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Barriere gegen den transepidermalen Wasserverlust zugeschrieben (Downing, 1992). Ihre Unpolarität wird auf der Haaroberfläche genutzt, um Wasser abzuweisen und so das Fell vor Durchnässung zu schützen (Westerberg et al., 2004).

Etwa 25% der Lipide aus der Talgdrüse sind Wachsester (Pappas et al., 2001). Diese Lipidform wird nur von den Zellen der Talgdrüse synthetisiert. Des Weiteren kommen Triglyceride, Sterolester, freie Fettsäuren und Squalene vor. Die freien Fettsäuren werden zur Synthese der Wachsester benötigt und gehören zur Gruppe der langkettigen Fettsäuren mit mehr als 20 C-Atomen. Sie können verzweigt, methyliert und hydroxyliert sein. Die verschiedenen Varianten der Fettsäuren sind hochspezifisch für die unterschiedlichen Säugetierspezies (Stewart and Downing, 1991).

## **1.5 Genomische Organisation und molekularer Aufbau der FA2H**

Die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäuren in Glykosphingolipiden im ZNS und PNS wird durch das Enzym FA2H katalysiert (Eckhardt et al., 2005 für die murine FA2H; Alderson et al., 2004 für die humane FA2H). Wie bereits unter 1.4.3 erwähnt, konnte kürzlich gezeigt werden, dass die FA2H auch für die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Ceramiden und seinen Derivaten in humanen Keratinozyten verantwortlich ist (Uchida et al., 2007).

Sphingolipide mit  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren können in fast allen Organismen gefunden werden. Dazu gehören Pflanzen, Hefen, Würmer, Wirbeltiere und einige Bakterienspezies (Alderson et al., 2004). Ausgehend von der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte das Enzym FA2H identifiziert werden (Alderson et al., 2004; Eckhardt et al., 2005). In der Bäckerhefe liegen nahezu alle Sphingolipide mit einer  $\alpha$ -Hydroxylierung vor. In diesem Organismus hängt die Hydroxylierung von dem Scs7p Gen ab (Haak et al., 1997). Die Sequenz des Hefegens wurde für die Suche nach einer orthologen  $\alpha$ -Hydroxylase in Säugetieren verwendet. Das dabei identifizierte humane FA2H Gen zeigt 36% Identität und 46% Ähnlichkeit zum Scs7p Gen der Bäckerhefe (Alderson et al., 2004). Auf dem gleichen Weg wurde die murine FA2H identifiziert (Eckhardt et al., 2005).

Das Protein FA2H gehört zur Familie der membrangebundenen Lipiddesaturasen und Lipidhydroxylasen. Das FA2H Gen der Maus ist aus 7 Exons aufgebaut und umspannt etwa 50 kb auf Chromosom 8. Das kodierte Protein ist 43 kDa groß und besteht aus 372 Aminosäuren (Eckhardt et al., 2005). Es besitzt eine N-terminale Cytochrom-b5-Domäne und 4 konservierte Histidin-Motive. Die Histidin-Motive bestehen aus der Abfolge H-XXX-H, wobei zu Beginn des Motivs 2 Histidine aufeinander folgen können, so dass sich die Abfolge H-HXX-H ergeben kann. Die Histidin-Motive sind charakteristisch für die Familie der membrangebundenen Lipiddesaturasen und Lipidhydroxylasen (Ternes et al., 2002), wobei die meisten Lipiddesaturasen nur 3 Histidinmotive aufweisen und 4 dieser Motive vor allem bei den Lipidhydroxylasen auftreten. Diese Motive werden wahrscheinlich zur Bildung von Oxo-di-Eisen-Zentren genutzt, welche Elektronen von der Cytochrom-b5-Domäne auf das Substrat übertragen können. Es wurden mehrere hydrophobe Regionen im Protein ausgemacht und die Anwendung des TMHMM Algorithmus sagte 4 Transmembrandomänen hervor. Aus diesen Zusammenhängen ergibt sich das in Abb. 1-6 dargestellte hypothetische Modell über den Aufbau der FA2H.

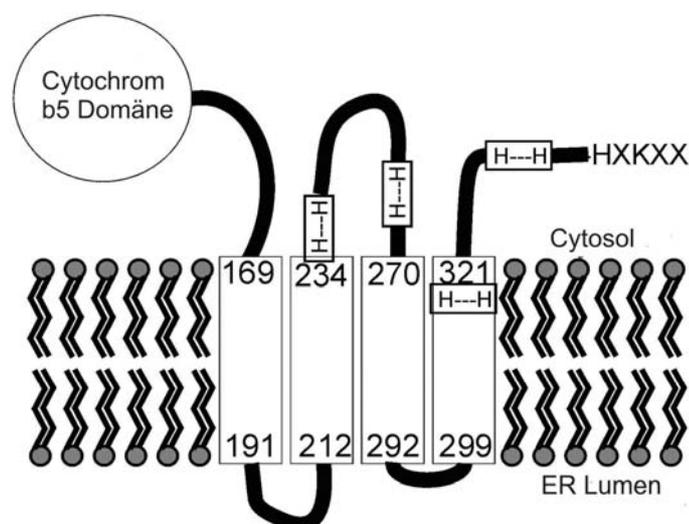


Abb. 1-6: Vorschlag zum Strukturmodell der murinen FA2H

Dargestellt ist die vermutete Membrantopologie der murinen FA2H. Die Nummern der ersten und letzten Aminosäure sind für jede Transmembrandomäne angezeigt. Die 4 konservierten Histidinmotive sind als „H---H“ gekennzeichnet. Am C-Terminus ist ein potentiell ER Rückhaltessignal (HXKXX) vorhanden (modifiziert nach Eckhardt et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym FA2H im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist (Eckhardt et al., 2005). Das Protein weist am C-Terminus ein ER-Rückhaltessignal auf. Diese Beobachtungen passen zu der Tatsache, dass die Synthese der Ceramide und des  $\alpha$ -hydroxylierten Galaktosylceramids ebenfalls im ER stattfinden. Das direkte Substrat der FA2H scheinen die freien Fettsäuren und nicht die Ceramide zu sein, wie kürzlich gezeigt werden konnte (Alderson et al., 2004).

## 1.6 Transgene Mausmodelle

Zur Klärung der Funktion von Genen und deren Produkten *in vivo* sowie zur Erforschung von menschlichen Erbkrankheiten werden häufig Mausmutanten erzeugt, in welchen gezielte Gendefekte oder fremde Gensequenzen in das Genom eingebracht werden. Die resultierenden Tiere werden deshalb als „transgen“ bezeichnet.

### 1.6.1 Herstellung transgener Tiere durch Vorkerninjektion

Eine Möglichkeit zur Herstellung transgener Tiere stellt die Vorkerninjektion von DNA in befruchtete Eizellen dar. Die Vorkerninjektion führt zu einer zufälligen Integration injizierter DNA in das Genom und resultiert in variabler Expression des Transgens in Abhängigkeit der verwendeten Promotor-Sequenzen sowie des Integrationsortes und der Kopienzahl (Nagy et al., 2003). Auf diese Art erzeugte Mäuse sollten immer hemizygot gezüchtet werden (heterozygot bezüglich des Integrationsortes), um eventuelle Phänotypen durch die Zerstörung eines endogenen Gens auf beiden Chromosomen zu vermeiden. Mit dieser Methode werden in der Regel Überexpressionseffekte sichtbar gemacht. Mit Hilfe dieser Technik wurde z.B. die PLP-CGT transgene Mauslinie hergestellt (Fewou et al., 2005).

### 1.6.2 Gezielte Genveränderung durch homologe Rekombination

Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung transgener Mäuse erfolgt über die gezielte Veränderung von endogenen Sequenzen des Genoms in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus. Diese Veränderungen werden durch homologe Rekombination einer mutierten Sequenz mit dem jeweiligen Wildtyp-Lokus erreicht (Nagy et al., 2003). Mit Hilfe totipotenter ES-Zellen aus der inneren Zellmasse von Mausembryonen lassen sich durch die

Technik der Morula-Aggregation oder der Blastozysteninjektion chimäre Mäuse erzeugen, die den veränderten Genlokus an Nachkommen weitergeben können. Eine Variation der Blastozysteninjektion stellt die Tetraploidtechnik dar (Schwenk et al., 2003), welche direkt in heterozygoten Nachkommen resultiert.

Zur genetischen Veränderung von ES-Zellen werden meist sogenannte Austauschvektoren mit homologen Bereichen verwendet, die den manipulierten nicht-homologen Bereich exogener (transgener) Sequenzen flankieren. Durch ein doppeltes Überkreuzen („Crossing over“) der flankierenden Bereiche mit den endogenen Homologiebereichen kann die Zielgensequenz durch die transgenen Sequenzen chromosomal ersetzt werden.

Die Länge der homologen Region hat Einfluss auf die Effizienz der homologen Rekombination (Hasty et al., 1991). Für einen beschränkten Längenbereich von 4-8 kb (Lu et al., 2003) gilt, dass die Wahrscheinlichkeit der Integration durch homologe Rekombination steigt, je größer die homologe Region des Vektors ist (Thomas et al., 1987). Trotzdem ist die Frequenz der homologen Rekombination sehr niedrig (ein Ereignis in ca. 5 Millionen Fällen), so dass eine Anreicherung jener Zellen durchgeführt wird, in denen der Austauschvektor homolog rekombiniert wurde. Es kann eine positive oder eine negative Selektion oder eine Kombination beider Methoden angewandt werden. Bei der positiven Selektion erfolgt die Anreicherung der ES-Zellen, die den Austauschvektor eingebaut haben, durch eine Selektion auf ein in den exogenen Sequenzen enthaltenes Resistenzgen gegen ein Antibiotikum, wie etwa das Neomyzinderivat G418. Die negative Selektion sondert jene ES-Zellen aus, in denen der Austauschvektor zufällig und nicht homolog rekombiniert in das Genom integriert wurde. Dafür wird z. B. eine Thymidin-Kinase-Kassette des Herpes Simplex Virus an ein Ende des Austauschvektors kloniert. Bei homologer Rekombination fällt dieser Teil des Vektors weg, bei zufälliger Integration des Austauschvektors ist die Thymidin-Kinase aktiv und kann aus zugesetztem Ganciclovir ein toxisches Produkt freisetzen, was zum Absterben des betreffenden Klonen führt (Sugimoto et al., 1997).

Bei der konventionellen Methode zur Ausschaltung von Genen wird die kodierende Region des Zielgens im Genom von ES-Zellen durch eine Selektionskassette und gegebenenfalls ein Reportergen ersetzt. Die resultierenden transgenen Mäuse können das Zielgenprodukt des mutierten Genlokus nicht mehr exprimieren und werden im homozygoten Zustand als „Knock-out-Mäuse“ bezeichnet (Nagy et al., 2003). In diesen Mäusen wird das Zielgenprodukt in keinem Gewebe und zu keiner Zeit exprimiert. Sie können Aufschluss über die Funktion des untersuchten Genprodukts *in vivo* geben und durch die Verwendung eines Reportergens den Ort der Expression des Zielgens anzeigen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Enzym FA2H ist erwiesenermaßen verantwortlich für die Bildung  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide im Nervensystem und in der Haut. Die Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung der Sphingolipide ist bislang jedoch noch weitestgehend unklar. Diese Funktion näher aufzuklären war ein grundlegendes Ziel dieser Arbeit.

Für die Analyse der Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung der Sphingolipide sollte durch homologe Rekombination eine transgene Maus hergestellt werden, die nach entsprechender Deletion von Teilen des FA2H-Wildtyp-Lokus keine funktionale FA2H mehr exprimiert. Dadurch sollten transgene Mäuse generiert werden, denen  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide fehlen.

Zur Erreichung dieses Ziels sollte die konventionelle Strategie des Totalen Knock-Outs angewandt werden, bei der ein Reporter gen in den Wildtyp-Lokus der FA2H eingeführt werden sollte. Mit Hilfe des sich ergebenden Reporterproteins sollte es möglich sein, in den resultierenden FA2H-Knock-Out-Mäusen die FA2H-Expression in den unterschiedlichen Zelltypen der Organe, die FA2H exprimieren, zu lokalisieren.

Die Analyse der generierten FA2H-Knock-Out-Mäuse sollte erste Einblicke in die Effekte der FA2H-Defizienz bringen. Dabei war ein Fokus auf der Analyse der zentralnervösen Strukturen angestrebt. Hier sollte vor allem analysiert werden, ob das Fehlen der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide Einfluss auf den Prozess der Myelinisierung und die Struktur des Myelins hat. Im peripheren Nervensystem sollte untersucht werden, ob sich eine Veränderung der Nervenleitgeschwindigkeit ergibt, wenn in den Schwanzzellen  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide nicht länger vorhanden sind. Des Weiteren sollten die Auswirkungen des Fehlens  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide auf die Haut untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob eine exklusive Expression der CGT und damit ein exklusives Vorkommen der Glykosphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid in Oligodendrozyten ausreichend für eine normale Myelinisierung und eine normale Funktion des Myelins ist. Glykosphingolipide kommen im ZNS in Oligodendrozyten vor, aber auch in geringem Maße in Astrozyten und Neuronen. Um zu analysieren, welchen Einfluss ein selektives Fehlen der Glykosphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid in Astrozyten und Neuronen hat, sollte eine transgene Mauslinie durch Verpaarungen aus bestehenden Mauslinien erzeugt und analysiert werden, die das Enzym CGT, welches zur Generierung von Galaktosylceramid und Sulfatid notwendig ist, im ZNS ausschließlich in Oligodendrozyten exprimiert. Ein Vorkommen der entsprechenden Glykosphingolipide in Astrozyten und Neuronen sollte damit ausgeschlossen sein.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

- Brutschrank Forma Scientific, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
- Dampfsterilisator Varioklav EC, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
- Digital-pH-Meter 646, Knick, Berlin, Deutschland
- Eismaschine, Ziegra, Isernhagen, Deutschland
- Elektrophoresekammern für Agarosegele, Eigenbau
- Elektrophoresekammern für PAGE
  - Klein: Mini Protean 3 Gelkammer, BioRad, Hercules, CA, USA
  - Groß: Proteax Xi, BioRad, Hercules, CA, USA
- Filmentwickler-Automat Curix 60, AGFA, Mortsel, Belgien
- Fluoreszenzscanner Odyssey, Leicor
- Gefrierschrank -20°C Öko Arctis Super electronic, AEG, Nürnberg, Deutschland
- Gefriertruhe -80°C Sanyo Ultra low, Sanyo Scientific, Newcastle, UK
- Heizblock, Stuart Scientific, Newcastle, UK
- Kryostat Leica CM 1510S, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Kühlschrank Öko Santo Super electronic, AEG, Nürnberg, Deutschland
- Magnetrührer Ikamag RET, Ika-Werke, Staufen, Deutschland
- MALDI Voyager-DE STR mass spectrometer, PE Biosystems, Warrington, Cheshire, UK
- Mikroplattereader GENios, Tecan, Zürich, Schweiz
- Mikroskope
  - Lichtmikroskop: Zeiss Telaval 31, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
  - Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axiovert 100M, AxioCam HRm, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- PCR-Gerät T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland
- Phosphorimager BAS-1800II, Fujifilm, Straubenhardt, Deutschland
- Präparierbesteck, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Reacti Therm „Heating and stirring module“, Pierce, Rockford, Illinois, USA
- Schüttelinkubator, New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
- Sequenzierer ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
- Semidry Westernblot Transblot SD Cell, BioRad, Hemel Hempstead, UK
- Spektralphotometer DU 640, Beckmann, München, Deutschland
- Sterilbank BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
- Sterilbank Clean Air Technik, JA Woerden, Niederlande

- 
- Sterilbank Labgard class II, Typ A/B3, Nuair, Plymouth, USA
  - "TLC-Sampler" 4, Camag, Berlin, Deutschland
  - Ultraturrax T25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
  - Ultraschallwasserbad Branson, Branson, Danbury, Connecticut, USA
  - UV-Handlampe, Konrad Benda Laborgeräte und UV-Strahler, Wiesloch, Deutschland
  - Vortexer Unimag Zx3 Classic, UniEquip, Martinsried, Deutschland
  - Waagen
    - Analysenwaage: CP 124S-OCE, Sartorius, Göttingen, Deutschland
    - Waage: PC 4400, Mettler, Giessen, Schweiz
  - Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q plus, Millipore, Billerica, MA, USA
  - Wasserbad 1083, GFL, Burgwedel, Deutschland
  - Zentrifugen
    - Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
    - Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
    - Beckmann Ultrazentrifuge Optima, Fullerton, CA, USA

## 2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma und Merck bezogen.

- BigDye Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA
- Chloroform, JTBaker, Phillipsburg, New Jersey, USA
- Glaswolle, Hasenmüller Labortechnik, Bonn, Deutschland
- Klenow-Fragment, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- Megaprime DNA-labeling Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Milchpulver, Reformhaus
- [<sup>32</sup>P]dCTP, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Phusion® Taq-Polymerase, Finnzymes, Finnland
- Restriktionsendonukleasen, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- Stickstoff, Linde Gas, Pullach, Deutschland
- X-Gal, QBiogene/MP Biomedicals, Heidelberg, Germany

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien, Plastikwaren und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Merck (Darmstadt) und Sarstedt (Nürnberg) bezogen.

## 2.4 Medien und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser angesetzt und bei RT gelagert.

### 2.4.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

10 x PBS	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 1,5 M NaCl 25 mM KCl
10 x TBS	100 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 300 ml 5 M NaCl auf 1 l mit destilliertem H <sub>2</sub> O auffüllen, pH 8,0
DEPC-H <sub>2</sub> O	bidest. H <sub>2</sub> O wird mit 0,1% DEPC gemischt, über Nacht bei RT gerührt und anschließend gerührt.
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH wird auf 7,0 eingestellt
Hybridisierungs- puffer Southern-Blot	50% Formamid 4,8 x SSC 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1% SDS 1 x Denhardt`s Lösung (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) 10% Dextransulfat 100 µg/ml hitzedenaturierte Lachsspermien-DNA
Hybridisierungs- puffer <i>In-situ</i>	50% Formamid 1% Denhardt`s Lösung 0,2% SDS 0,25 mg/ml Lachsspermien-DNA 10% Hybridisierungssalz (3 M NaCl, 0,1 M PIPES, 0,1 M EDTA)

50x TAE	2,5 M Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
10 x TE	100 mM Tris-HCl, pH 7,6 10 mM EDTA
Ethidiumbromid-Isg.	5 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)
DC-Färbelösung	625 mM Kupfersulfat 9,4% konzentrierte Phosphorsäure
DC-Laufmittel Sphingolipide	60 Teile Chloroform 27 Teile Methanol 4 Teile H <sub>2</sub> O
DC-Laufmittel Ganglioside	60 Teile Chloroform 35 Teile Methanol 8 Teile 0,22% CaCl <sub>2</sub>
DC-Laufmittel Haarlipide	80 Teile Hexan 20 Teile Ether 1 Teil Essigsäure
DC-Laufmittel Ceramide	190 Teile Chloroform 90 Teile Methanol 1 Teil Essigsäure

## 2.4.2 Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen

Homogenisierungspuffer	5 mM EDTA 1 mM PMSF in H <sub>2</sub> O 4°C verdünnen
Acrylamid	40% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
APS	10% (w/v) Ammoniumperoxydisulfat
ECL-Lösung	2,5 mM Luminol (Fluka) in DMSO 0,4 mM p-Coumarsäure (Fluka) in DMSO 100 mM Tris-HCL pH 8,5 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

---

10 x Laufpuffer	250 mM Tris-Base 1,9 M Glycin pH auf 8,6 einstellen 1% SDS
4 x Probenpuffer	8% SDS 40% Glycerol 240 mM Tris-HCl, pH 6,8 4% Bromphenolblau 4% $\beta$ -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS
Blotpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin auf pH 8,5 einstellen 0,037% SDS 20% (v/v) Methanol
Ponceau-Lsg.	0,2% Ponceau S 3% Trichloressigsäure
TBS/T	1 x TBS 0,5% Tween

### 2.4.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium	1% NaCl 1% Hefe-Extrakt 0,5% Trypton pH 7,5 einstellen und autoklavieren
Agarplatten	LB-Medium 1,5% Agar Lösung autoklavieren, auf 50°C abkühlen und in Petrischalen giessen
Ampizillin	100 $\mu$ g/ ml
Kanamyzin	50 $\mu$ g/ml

## 2.4.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Die Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma und Gibco BRL bezogen.

### 2.4.4.1 Medien und Lösungen für die ES-Zellkultur

1% Gelatine-Stock	5 g Gelatine in 500 ml ZK-H <sub>2</sub> O lösen, 1 h autoklavieren, die Lösung mischen und nochmals 1 h autoklavieren. Die 0,1%ige Arbeitslösung wird per Verdünnung mit ES-PBS hergestellt.
Monothioglycerol	1 ml Stocklösung (92,4 mM) mit 99 ml ZK-H <sub>2</sub> O mischen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.
ES-EDTA-Lsg.	0,925 g EDTA (5 mM) in 500 ml ES-PBS lösen, pH 7-8 durch Zugabe von 200 µl 10 N NaOH einstellen, 1 h autoklavieren.
ES-Trypsin	400 ml ES-PBS 100 ml ES-EDTA-Lösung (1 mM) 5 ml Chicken-Serum (1%) 5 ml Trypsin 2,5% (0,025%) Aliquotieren und bei -20°C lagern.
ES-WT-Medium	500 ml Glasgow-MEM 28 ml FCS (5%), ES-Zellkultur-getestet 28 ml NCS (5%), ES-Zellkultur-getestet 5,6 ml Na-Pyruvat 100 mM (1 mM) 5,6 ml Glutamin 200 mM (2 mM) 5,6 ml Aminosäuren 100 x (1 x) 570 µl LIF (0,1%) 910 µl Monothioglycerol (0,15 mM) Aliquotierte Zutaten unter der Sterilbank zugeben; Lagerung bei 4°C für etwa 4 Wochen möglich; vor Gebrauch erwärmen.
HBS-Puffer	100 ml ES-PBS 2 ml HEPES 1 M (20 mM) 240 µl Glucose 100 x (2,5 M) Aliquots à 10 ml bei -20°C lagerbar
ES-Einfriermedium	17,5 ml ES-WT-Medium 2,5 ml FCS (20%), ES-Zellkultur-getestet 5 ml Dimethylsulfoxid (20%) (Merck)

G418-Stock	125 mg/ml G418 Sulfat in H <sub>2</sub> O gelöst
Ganciclovir-Stock	0,5 mg/ml Ganciclovir in ES-PBS gelöst
ES-Selektions- medium	579 ml ES-WT-Medium 1,62 ml G418-Stock (350 µg/ml) 579 µl Ganciclovir-Stock (0,5 µg/ml)
Lysis-Puffer	0,2 Vol. GC-Puffer (Finnzymes, Espoo, Finland) 0,001 Vol. Triton-X-100 200 µg/ml Proteinase K
isotonische KCl-Lsg.	0,56% Kaliumchlorid in ZK-H <sub>2</sub> O
Puromyzin-Stock	100 mg Puromyzin (0,05%) in 200 ml ZK-H <sub>2</sub> O lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern.
ES-Puro-Medium	579 ml ES-WT-Medium 1,25 ml Puromyzin-Stock (1,2 µg/ml)

#### **2.4.4.2 Medien und Lösungen für die Kultur embryonaler Mausfibroblasten**

PBS und Trypsin werden entsprechend den Angaben unter 2.4.4.1 verwendet.

MEF- Kulturmedium	DMEM-Zellkulturmedium 10% FCS 2 mM L-Glutamat 100 IU Penicillin 100 µg Streptomycin
MEF- Einfriermedium	40 ml MEF-Kulturmedium 5 ml FCS 5 ml Dimethylsulfoxid (Merck)

#### **2.4.5 Lösungen für histologische Färbungen und Nachweise**

EosinY-Lsg.	0,1% EosinY 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml Färbelösung
Hämatoxylin-Lsg.	Mayer`s Hämalaunlösung unverdünnt (Merck)

Hoechst-Lsg.	25 mg Hoechst 33258 (0,05%) ad 50 ml mit H <sub>2</sub> O aliquotieren und bei -20°C lagern.
4% PFA	20 g Paraformaldehyd Zugabe von 430 ml H <sub>2</sub> O Erhitzen auf 60°C und Zugabe von 1-2 Tropfen 1 N NaOH unter Rühren bis die Lösung klar wird. Nach Abkühlen Zugabe von 50 ml 10 x PBS pH 7,2 einstellen Aliquots bei -20°C lagern.
AP-Inkubations- Lsg.	20 mg Naphthol-AS-MX in 0,5 ml Dimethylformamid lösen zu 50 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5 mischen 50 mg Fast Red TR zugeben und durchlösen lassen. Mittels Faltenfilter filtrieren und sofort verwenden. Nicht lagerbar.
Baker`s Lösung	1 Vol. 10% CaCl <sub>2</sub> 1 Vol. 37% Formaldehyd 1 Vol. H <sub>2</sub> O
OilRedO <sup>®</sup> - Stamm-Lsg. A	0,5 g OilRedO <sup>®</sup> in 100 ml 99%igem Isopropanol lösen
OilRedO <sup>®</sup> - Stamm-Lsg. B	60 ml Stammlösung A 40 ml H <sub>2</sub> O Stammlösung B nach Mischen 24 h stehen lassen und kurz vor Gebrauch mittels Faltenfilter filtrieren.
Nile Red Stock-Lsg.	500 µg/ml in Aceton Lagerung bei 4°C
Nile Red Arbeits-Lsg.	10 µl Nile Red Stock-Lösung 1 ml 70% Glycerol Die Arbeitslösung wird jeweils frisch hergestellt.
LacZ- Fixierungspuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 5 mM EGTA 2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2% Glutaraldehyd Der Fixierungspuffer wird bei 4°C aufbewahrt.

LacZ-	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3
Waschpuffer	2 mM MgCl <sub>2</sub>
X-Gal-Stock-Lsg.	50 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid lösen Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
LacZ-	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3
Färbepuffer	2 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 1 mg/ml X-Gal (aus der X-Gal-Stocklösung verdünnen)

## 2.5 Eukaryotische Zell-Linien

HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv 129P2/OlaHsd (Magin et al., 1992)
MEF	Embryonale Fibroblasten der Maus, gewonnen aus ASA-Knockout Mäusen, resistent gegen Neomycin

## 2.6 Bakterienstamm

Bezeichnung	Genotyp und Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1,	Bullock et al., 1987
MRF	relA1, lac [F <sup>+</sup> proAB <sup>+</sup> , lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10 (tet <sup>r</sup> ) Vermehrung von Plasmiden	

## 2.7 Plasmide

- pBluescript Klonierungsvektor mit T3- und T7-Promotor (Stratagene)
- pCDNA3-FA2H Klonierungsvektor, der die codierende Region des fa2h-Gens enthält; zur Herstellung von RNA-Sonden verwendet.
- pLRlacZpA/MCINeopA Eukaryotischer Expressionsvektor, der die codierende Region des lacZ-Gens und eine Neomycin-Resistenz-Kassette enthält.

## 2.8 Primer

Oligonukleotid-Primer wurden bei MWG bestellt, mit H<sub>2</sub>O auf 100 pmol/μl verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Nummern entsprechen fortlaufend vergebenen Nummern einer institutsinternen Primer-Liste.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
1411	FH1	CTTCAGTAAGGAGGACTAGAAG CTGG	Klonierung des FA2H Total KO Targeting-Vektors
1412	FH2	CAGCAGAGGTTTCTGCCAGTCC	Klonierung des FA2H Total KO Targeting-Vektors
1413	FH3	GTACGTCAGCTGGTCCTACTAC C	Klonierung des FA2H Total KO Targeting-Vektors
1414	FH4	CCAAATCTGAAGCCGGTGTCTC C	Klonierung des FA2H Total KO Targeting-Vektors
1573	Total KO Sonde sense	CCCGGAGCACCTGGAGACCTAC TT	Klonierung der Southern-Blot Sonde
1574	Total KO Sonde antisense	CTGGCTGGCTCATGCATCCTTC TC	Klonierung der Southern-Blot Sonde
1630	FHneo neu	ATTCGCAGCGCATCGCCTTCTA TC	Neo sense Primer für ES-Zell- Genotypisierung und Genotypisierungen des FA2H- KO
1414	FH4	CCAAATCTGAAGCCGGTGTCTC C	FA2H antisense Primer für ES- Zell-Genotypisierung des Total KO
1972	FHshort arm anti	GCTCTTCTTCAAGAGCCATCC	FA2H antisense Primer für Genotypisierungen des Total KO
1973	FHwt sense 1	GTGCTGTACCTCAGCTGGTC	FA2H sense Primer für Genotypisierungen des Total KO
1276	GalT anti	TAACCAAGGAGTTCAGCAAACC	Genotypisierung der PLP- cgt/GalT-KO Mäuse
1278	GalTsense	CCTCTCAGAAGGCAGAGACATT G	Genotypisierung der PLP- cgt/GalT-KO Mäuse
1277	Neo reverse	TCTGCACGAGACTAGTGAGACG	Genotypisierung der PLP- cgt/GalT-KO Mäuse
712	Rat CGT2	AACTGTGCTGTGCGTACTCC	Genotypisierung der PLP- cgt/GalT-KO Mäuse

818	CGT883	GCTGGTGTCAACTATCTGTC	Genotypisierung der PLP-cgt/GalT-KO Mäuse
1272	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	Sequenzierung
1273	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
1297	SP6	CTAGCATTTAGGTGACACTATA G	Sequenzierung

## 2.9 Antikörper

Zur Detektion von Proteinen im Western-Blot und in der Immunohistochemie wurden folgende Antikörper verwendet:

- Polyklonaler Anti-MBP Antikörper aus Kaninchen, Chemicon, Hofheim, Deutschland
- Anti-2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNPase) Antikörper aus Mäusen, Chemicon, Hofheim, Deutschland
- Anti-GFAP Antikörper aus Mäusen, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Monoklonaler Anti- $\beta$ -Aktin Antikörper aus Mäusen, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Anti-Ki67 Antikörper aus Ratte, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Anti-CD34 Antikörper aus Ratte, AbD Serotec, Oxford, UK
- Monoklonaler Anti-NCAM Antikörper aus Ratte, H28 (BSP2), freundlicherweise überlassen von Rita Gerardy-Schahn
- Anti-FA2H-Antiserum aus Kaninchen, affinitätsgereinigt, Pineda, Berlin, Deutschland
- Anti-K1 Antikörper aus Kaninchen, Babco, Los Angeles, CA
- Anti-K5 Antikörper aus Kaninchen, Babco, Los Angeles, CA
- Peroxidase gekoppelter Anti-Maus Antikörper aus Ziegen, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
- Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper aus Ziegen, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Peroxidase gekoppelter Anti-Ratte Antikörper aus Ziegen, Jackson Laboratories, USA
- Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Alexa Fluor 488 anti-Ratte-IgG-Antikörper aus Ziegen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Cy2-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen, Jackson Laboratories, USA
- Cy3 gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen, Jackson Laboratories, USA

## **2.10 Versuchstiere**

### **2.10.1 Wildtyp-Kontrolltiere**

Als Kontrollen wurden Tiere der Stämme C57BL/6 und 129/SV verwendet. Die Tiere wurden von Charles River bezogen und entstammten weiterhin der eigenen Zucht.

### **2.10.2 PLP-CGT transgene Mäuse**

Diese Mausmutante wurde von Simon Fewou (Fewou et al., 2005) generiert. Mittels Vorkerninjektion (siehe Einleitung) wurde ein Vektor mit der CGT-Sequenz aus Ratte unter der Kontrolle des PLP-Promotors in das Mausgenom eingefügt. Daraus resultierten verschiedene transgene Mauslinien, die je nach Integrationshäufigkeit des PLP-CGT-Transgens eine unterschiedliche starke transgene Expression aufwiesen. Eine dieser Mauslinien mit einer niedrigen transgenen Expression wurde in der vorliegenden Arbeit für die Verpaarungen mit CGT-Knock-Out-Mäusen verwendet.

### **2.10.3 CGT-Knock-Out-Mäuse**

Die CGT-Knock-Out-Mäuse wurden freundlicherweise von Brian Popko zur Verfügung gestellt (Coetzee et al., 1996). Zur Erhaltung der Mauslinie wurden die heterozygoten Mäuse verpaart.

## 3 Methoden

Alle nicht aufgeführten Methoden wurden nach Standardmethoden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Enzyme und Reagenziensätze wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Der Umgang mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen erfolgte gemäß den Grundregeln des sauberen mikrobiologischen Arbeitens. Gentechnisch veränderte Organismen wurden nach ihrer Erzeugung erfasst und durch Autoklavieren vernichtet, wenn sie nicht mehr benötigt wurden.

### 3.1 Nukleinsäure Präparationen

#### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe der Qiagen Kits basiert auf einer modifizierten alkalischen Zelllyse (Birnboim and Doly 1979). Bei der alkalischen Lyse wird das unterschiedliche Denaturierungsverhalten der Nukleinsäuren genutzt, um Plasmid-DNA von chromosomaler DNA zu trennen.

Je nach gewünschter Ausbeute werden drei verschiedene Kits der Firma Qiagen zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendet. Die Zusammensetzung der in den unterschiedlichen Kits enthaltenen Puffer ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

##### 3.1.1.1 *Plasmid Mini Präparation*

Diese Methode mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit® ermöglicht eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien. Sie wird vor allem angewandt, um Bakterienkolonien auf positive Plasmide zu überprüfen.

5 ml LB-Medium mit der Resistenz des verwendeten Plasmids entsprechendem Antibiotikum werden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 250 Upm inkubiert. 2 x 2 ml der Kultur werden in einem 2 ml Reagiergefäß bei 6.800 x g für 5 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 und leichtes Schwenken werden die Bakterien lysiert. Die Zugabe von 350 µl Puffer N3 und erneutes leichtes Schwenken beenden die Lyse. 10 min Zentrifugation bei 16.550 x g führt zur Sedimentation der Zellreste, einschließlich der chromosomalen DNA. Die Plasmid-DNA verbleibt im Überstand, welcher auf eine Qia-Spin®-Säule gegeben wird und 1 min bei 16.550 x g zentrifugiert wird. Die an die Säule gebundene DNA wird mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Der Waschpuffer wird durch zweimaliges

Zentrifugieren entfernt und die DNA mit 50 µl EB-Puffer von der Säule durch nochmaliges Zentrifugieren eluiert. Die Lagerung der so gewonnenen DNA erfolgt bei -20°C.

### **3.1.1.2 Plasmid Midi Präparation**

Auch diese Methode ermöglicht eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, jedoch mit einer größeren Ausbeute. Hierzu erfolgt die Isolierung mit einem Qiagen Plasmid Midi Kit®. 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum werden mit 100 µl einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 250 Upm inkubiert. Die Zellen werden für 15 min bei 6.800 x g pelletiert, das Zellpellet wird in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, 4 ml Lysepuffer P2 werden zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird mit 4 ml Puffer P3 neutralisiert und bei 4°C für 15 min inkubiert. Zentrifugation für 30 min bei 18.620 x g (Rotor F34-6-38) führt zur Sedimentation präzipitierter Membranen und Proteine. Eine Qiagen Tip 100® Säule wird mit QTB Puffer äquillibriert und der Überstand nach der Zentrifugation auf die Säule aufgetragen. Nach vollständigem Durchlaufen der Probe wird die Säule 2 x mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wird mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert und anschließend mit 3,5 ml Isopropanol gefällt. Erneute Zentrifugation für 30 min bei 18.620 x g liefert das DNA-Pellet, welches mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 100 µl EB-Puffer gelöst wird.

### **3.1.1.3 Plasmid Maxi Präparation**

Die größte Menge an Plasmid-DNA kann mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kit® gewonnen werden. Der Ablauf erfolgt analog der zuvor beschriebenen Midi Präparation, jedoch mit größeren Bakterienkultur- und Puffermengen und mit einer Säule, die eine größere Kapazität aufweist. So können Mengen von bis zu 500 µg Plasmid-DNA erhalten werden.

Diese Methode wird angewandt, um die zur stabilen Transfektion der embryonalen Stammzellen benötigten Plasmide zu isolieren.

## **3.1.2 Präparation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen**

Für eine erste rasche Analyse auf homologe Rekombination in ES-Zellen mit Hilfe einer PCR wird beim Picken der HM1-Klone nach etwa 12tägiger Selektion (siehe 3.3.2.3) eine Hälfte des jeweiligen Klons nach intensivem Vereinzeln der Zellen durch Auf- und Abpipettieren in ein 1,5 ml Reagiergefäß abgezweigt. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 Upm sedimentiert und nach Absaugen des Überstandes mit 50 µl Lysepuffer versetzt. Die Lyse erfolgt für 1 h bei 65°C und 5 µl des Lysats dienen als Ausgangsmaterial für die Genotypisierungs-PCR der ES-Zellklone.

Um die DNA der ES-Zellen einer Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse unterziehen zu können, wird eine mit ES-Zellen konfluent bewachsene T25-Flasche eingesetzt, um eine hinreichende DNA-Ausbeute sicherzustellen. Die pelletierten Zellen werden zunächst in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend mit 750 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Die Lyse erfolgt bei 56°C über Nacht unter Schütteln. Proteine und Zellreste werden 3 x mit je 1 Volumen Phenol extrahiert. Phenolreste werden durch zweimalige Extraktion mit Chloroform entfernt. Die wässrige Phase enthält die DNA, welche mit Isopropanol gefällt wird.

### 3.1.3 Präparation genomischer DNA aus Mausgeweben

Für die Genotypisierung von Mäusen wird eine 0,5-0,8 cm lange Schwanzspitze verwendet. Diese wird über Nacht in 750 µl Lysepuffer plus 5 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) bei 56°C lysiert. Das Lysat wird mit 250 µl 6N NaOH versetzt und weitere 5 min bei 56°C geschüttelt. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugieren (13.000 Upm, 10 min) abgetrennt und 750 µl des reinen Überstandes in ein neues Reagiergefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und mehrmaliges Schwenken wird ein DNA-Präzipitat sichtbar, welches mit einer gelben Spitze aus dem Gefäß herausgenommen, in 70%igem Ethanol gewaschen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird. Nach Trocknung für etwa 15 min bei RT erfolgt die Zugabe von mindestens 200 µl HPLC-H<sub>2</sub>O zur Durchlösung der DNA. Für PCR-Analysen werden 1-2 µl dieser Lösung eingesetzt.

### 3.1.4 Präparation von RNA aus Mausgeweben

Mit dieser Methode wird die Gesamt-RNA (rRNA, tRNA, hnRNA und mRNA) aus Geweben isoliert. Das verwendete Reagenz TRIzol™ ist eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (Chomczynski und Sacchi, 1987). Diese Lösung sorgt dafür, dass die RNA während der Homogenisation und Zelllysis unversehrt bleibt.

Die Gewebe werden nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation rasch präpariert und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung dieser Gewebe erfolgt nur bei -80°C. Das noch tiefgefrorene Gewebe wird in TRIzol™ überführt und für 30 Sekunden mittels Ultra Turrax auf Eis homogenisiert. Nicht homogenisierte Gewebereste werden durch Zentrifugieren für 10 min bei 18.514 x g abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Reagiergefäß überführt und mit 0,2 Volumen BCP versetzt. Danach wird für 30 Sekunden zur vollständigen Durchmischung gevortext. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min, woraufhin sich ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 18.514 x g und 4°C anschließt. Der klare wässrige Überstand wird in ein neues 15 ml Röhrchen überführt, und durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol und eine erneute Durchmischung

und anschließende Inkubation bei RT wird die RNA gefällt. Zentrifugieren bei 18.514 x g und 4°C pelletiert die RNA. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1 Volumen 75%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird anschließend bei RT für etwa 10 min getrocknet und schließlich in 200 µl DEPC aufgenommen. Die Durchlösung der RNA erfolgt für 10 min bei RT und für 15 min bei 65°C. 7,5 µl werden zur photometrischen Konzentrationsbestimmung abgenommen. Der Rest wird bei -80°C gelagert.

### **3.1.5 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient dazu, Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Zellbestandteilen zu befreien. Hierzu wird die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) versetzt und kräftig gemischt. Dies denaturiert die Proteine und trennt sie von den in der wässrigen Phase zurückbleibenden Nukleinsäuren. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm wird die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reagiergefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wird nochmals mit Chloroform versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand enthält die gereinigten Nukleinsäuren und wird abgetrennt. Die Nukleinsäuren werden anschließend präzipitiert und je nach Bedarf weiter verarbeitet oder gelagert.

### **3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

#### ***3.1.6.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung***

Sowohl Konzentration als auch Reinheit der Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm, das der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm.

Die Messung erfolgt bei 260 und 280 nm gegen Tris-HCl pH 8,0 in einer Quarzküvette der Länge 1 cm. Die Extinktion bei 260 nm gibt die Konzentration an, der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 gibt Auskunft über die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Unter diesen Bedingungen entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA.

### **3.1.6.2 Konzentrationsabschätzung im Gel**

Mit dieser Methode kann neben der Konzentrationsabschätzung zeitgleich eine Kontrolle der Qualität der Nukleinsäuren erfolgen. Zudem ist eine Abschätzung von Nukleinsäuremengen möglich, die für die photometrische Bestimmung zu gering wären.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über einen Vergleich der Bandenintensität zwischen der Probe unbekannter Konzentration und einer Probe bekannter Nukleinsäurekonzentration. Es werden 400 ng  $\lambda$ -DNA-Molekulargewichts-Marker aufgetragen und die zur Konzentration proportionale Leuchtintensität einer Bande in einem Ethidiumbromid-Agarosegel mit derjenigen des Referenzstandards verglichen.

## **3.2 Arbeiten zur Herstellung rekombinanter Plasmide**

### **3.2.1 Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente**

#### **3.2.1.1 Spaltung von Plasmiden mittels Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen und spalten an diesen die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Mit einem solchen Restriktionsverdau können gezielt DNA-Fragmente aus Plasmid-DNA isoliert werden, die z.B. für Klonierungen benötigt werden.

#### **3.2.1.2 Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das QIAquick Gelextraction Kit® von der Firma Qiagen verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wird mit einem Skalpell unter Verwendung einer UV-Handlampe aus dem ethidiumbromidhaltigen Gel ausgeschnitten, in ein Reagiergefäß überführt, in Puffer QG bei 50°C gelöst und auf QIAquick Säulen aufgetragen. Unter hoher chaotroper Salzkonzentration adsorbiert DNA an die Silika-Gelmembran dieser Säulen und kann so von den Gelbestandteilen getrennt werden. Die Elution erfolgt mit 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Die erhaltene DNA-Lösung ist bei -20°C lagerbar.

### **3.2.2 Modifikationen und Ligation von DNA-Molekülen**

#### **3.2.2.1 Auffüllen von überhängenden Enden (blunten)**

Klonierungen erfordern mitunter, durch Restriktionsendonukleasen erzeugte, nicht kompatible, überhängende Enden zu glätten, um eine anschließende Ligation über glatte Enden zu ermöglichen. Das Auffüllen von überhängenden Enden wird mit dem Klenow

Fragment® von der Firma Fermentas durchgeführt. Das Klenow Fragment ist eine DNA Polymerase Typ I, die eine 5'→3' Polymeraseaktivität und eine 3'→5' Exonukleaseaktivität besitzt. Um die Polymeraseaktivität des Enzyms zu ermöglichen, wird dem Reaktionsansatz neben 5 Einheiten Klenow Fragment auch ein dNTP Mix zugegeben und der Ansatz wird für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Inaktivierung des Klenow Fragments erfolgt durch eine anschließende Inkubation bei 70°C für 10 min.

### **3.2.2.2 Dephosphorylieren von Vektoren**

Die aus einer Restriktionsspaltung oder einer Auffüllreaktion erhaltenen DNA-Moleküle besitzen an ihrem 5'-Ende Phosphatgruppen. Diese ermöglichen es dem Vektor, auch ohne Integration des einzuklonierenden Fragments eine Religation durchzuführen und vermehrungsfähige Plasmide zu erzeugen, wenn die vorhandenen Enden des Vektors miteinander kompatibel sind. Um diese Religation zu vermeiden und den Anteil an Plasmiden, die ein Insert tragen, zu erhöhen, werden die freien 5'-Phosphatgruppen durch Dephosphorylieren mit einer alkalischen Phosphatase entfernt. Dazu werden die Ansätze für 30 min bei 37°C mit der Calf Intestine Alkaline Phosphatase von der Firma Fermentas inkubiert. Eine Inkubation für 15 min bei 80°C stoppt die Reaktion.

### **3.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Durch Ligation kann die durch einen Restriktionsverdau linearisierte Vektor-DNA mit einem anderen DNA-Fragment, dem sogenannten Insert, verknüpft werden und es entstehen rekombinante Plasmide aus Vektor- und Insert-DNA. Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphatende des einen und der 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-Moleküls. Die Bildung von Phosphodiesterbindungen erfolgt unter der Hydrolyse von ATP. Die Ligation von zwei DNA-Molekülen kann sowohl bei kompatiblen kohäsiven als auch bei glatten Enden ablaufen.

Die Ligation von DNA-Fragmenten wird mit der T4-DNA-Ligase der Firma Fermentas durchgeführt. Es werden äquimolare Mengen an Vektor- und Insert-DNA und je Reaktionsansatz 1 Weiss-Einheit T4-DNA-Ligase eingesetzt. Die Inkubation erfolgt optimalerweise bei 16°C für 4 h oder über Nacht. Der inkubierte Ansatz kann anschließend zur Transformation eingesetzt werden.

#### **3.2.2.4 Sequenzierung doppelsträngiger DNA**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgt nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung des Big Dye Cycle Sequencing Kit und des Genetic Analyzers von ABI PRISM.

Die vier Didesoxynukleotide sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der Ansatz besteht aus 500 ng DNA-Template, 5 pmol Primer, 2 µl Puffer und 2 µl Big Dye Mix und wird zu 10 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Im Big Dye Mix sind die markierten Didesoxynukleotide und die Polymerase enthalten. Nach Durchlaufen der Reaktion wird die DNA mit Ethanol gefällt, in Template Suppressing Reagent resuspendiert und 2 min auf 90°C erhitzt. Die anschließende Kapillargelelektrophorese im Sequenzer trennt die DNA und die Fragmente der Reihe nach auf.

### **3.2.3 Transformation**

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier DNA von prokaryotischen Zellen. Dieser Vorgang wird im Labor mit Hilfe speziell hergestellter kompetenter Bakterien durchgeführt, deren Zellwand durch Schwermetalle porös gemacht worden ist, wodurch sie leichter freie DNA aufnehmen können (Hanahan, Jeese et al., 1991). Im Gegensatz zu linearisierter DNA muss Plasmid-DNA für die Replikation nicht in das Bakterienchromosom integrieren, sondern kann als eigenständiges Plasmid verdoppelt und von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien trägt das Plasmid ein Gen, das dem Bakterium eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum vermittelt.

#### **3.2.3.1 Transformation in XL-1 blue E. coli Bakterien**

Für eine Transformation werden zunächst 100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Ein Drittel des wie in 3.2.2.3 hergestellten Ligationsansatzes bzw. 10 ng reinen Vektors werden hinzugefügt und sehr vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz wird für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 40 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Es folgt eine sofortige Abkühlung auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum wird der Ansatz für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 250 Upm inkubiert. 100 µl der Bakterienkultur werden auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und die Platte umgedreht über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.3 Zellkultur**

Die Kultivierung aller Zellen erfolgt in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen. Sämtliche Arbeiten mit den Säugerzellen finden unter sterilen Bedingungen statt, und es werden ausschließlich sterile Einmalplastikmaterialien verwendet. Sämtliche Puffer, Medien und Lösungen werden stets vor Gebrauch auf 37°C aufgewärmt.

#### **3.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Eingefrorene Zellen werden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren werden die Zellen pelletiert, im Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Zum Durchfrieren werden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff umgelagert. Zum Auftauen werden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz im 37°C-Wasserbad erwärmt und die Erwärmung unterbrochen, solange noch ein Teil des Mediums gefroren ist. Daraufhin werden die Zellen aus dem Einfrierröhrchen gespült und sedimentiert. Das so erhaltene Zellpellet wird in frischem Medium aufgenommen, und die Zellen werden in eine Zellkulturflasche ausgesät.

#### **3.3.2 HM1 embryonale Stammzellen der Maus**

HM1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd isoliert (Magin et al., 1992). Sie wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart von löslichem LIF. Die Kultur in Abwesenheit von Fibroblasten ist möglich, in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auf die Kultur mit Fibroblasten als „feeder“-Zellen (im Weiteren als „Feeder Zellen“ bezeichnet) zurückgegriffen.

##### **3.3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

HM1 Zellen werden in ES-WT-Medium kultiviert, welches mindestens alle 2 Tage gewechselt wird. Geteilt werden HM1 Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 bis 100% durch eine Trypsinisierung und anschließender neuer Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:2 bis 1:3. Bei einer Kulturgröße von 48-Loch- und 24-Loch-Kulturschalenvertiefungen werden die Zellen ohne eine Zentrifugation geteilt, ab einer Kulturgröße von 6-Loch-Kulturschalenvertiefungen werden sie nach dem Trypsinisieren abzentrifugiert. Für eine Trypsinisierung wird das alte Kulturmedium abgesaugt, und die Zellen werden einmal mit ES-PBS und einmal mit ES-Trypsin gewaschen. Anschließend wird 0,1 Volumen des

Kulturmediums an ES-Trypsin zugegeben und für 5 min bei 37°C im Inkubator inkubiert. Durch Zugabe von ES-WT-Medium wird daraufhin das Trypsin verdünnt und dann werden die Zellen gründlich vereinzelt. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei 800 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand, der noch Trypsin enthält, wird abgesaugt und das Zellpellet in entsprechender Menge ES-WT-Medium oder ES-Selektionsmedium resuspendiert. Es folgt die Ausplattierung in Verdünnung auf gelatinisierten und mit Fibroblasten versehenen Kulturschalen. Die Kulturschalen werden wie folgt vorbereitet: Zunächst erfolgt die Beschichtung mit Gelatine durch Inkubation für 5 min mit 0,1%iger Gelatinelösung. Diese wird entfernt, und die Fibroblasten werden direkt in entsprechender Dichte ausgesät, wie es in der Tabelle für die verschiedenen Kulturschalen angegeben ist:

Kulturschale	Anzahl auszusäender Feeder Zellen
48-Loch-Kulturschalenvertiefungen	75.000
24-Loch-Kulturschalenvertiefungen	100.000
6-Loch-Kulturschalenvertiefungen	500.000
T25- Kulturflasche	1.300.000
T75- Kulturflasche	3.800.000
10 cm- Schale	3.000.000

Die neuen Kulturschalen werden anschließend mit frischem ES-Medium auf das entsprechende Kulturvolumen aufgefüllt. Die Passagezahl erhöht sich pro Trypsinisierung um eine Anzahl, die auf dem Kulturgefäß zu notieren ist.

### **3.3.2.2 Stabile Transfektion zur homologen Rekombination**

Als Transfektion bezeichnet man die Aufnahme freier DNA-Moleküle von eukaryotischen Zellen. Bei der stabilen Transfektion selektioniert man auf die stabile Integration der transfizierten DNA in die genomische DNA der Ausgangszellen. Die stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen erfolgt mit Hilfe der Elektroporation von linearisiertem Plasmid. Dazu werden 300 µg des aufgereinigten Austauschvektors eingesetzt, der durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, gefällt, zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen und in 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. ES-Zellen mit möglichst niedriger Passagezahl werden unter Standardbedingungen kultiviert und bis zur Konfluenz einer T75-Kulturflasche herangezogen. Die ES-Zellen werden wie zur Passage trypsinisiert, auf einer mit Gelatine beschichteten Kulturflasche ausgesät und 20 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit setzen sich die meisten Feeder Zellen bereits wieder am Boden der Kulturflasche ab, die ES-Zellen schwimmen jedoch noch weiterhin im Medium. Damit kann eine gewisse Abtrennung der

Feeder Zellen vor der Elektroporation erreicht werden. Das Medium mit den ES-Zellen wird abgenommen, ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer verwendet und der Rest in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen sedimentiert. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in soviel HBS-Puffer aufgenommen, dass in 800 µl  $3 \times 10^7$  Zellen enthalten sind. Die 800 µl Zellsuspension werden zur linearisierten DNA gegeben und diese Mischung in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgt durch Anlegen eines Stromimpulses des Biorad-Gene Pulser (Biorad, München) von 800 Volt mit einer Kapazität von 3 Mikروفarad. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT werden die Zellen vorsichtig in 10 ml ES-WT-Medium resuspendiert. Auf zehn 10 cm-Schalen, die gelatinisiert und mit Feeder Zellen belegt sind, werden je 9 ml ES-WT-Medium vorgelegt, und es wird jeweils 1 ml der Zellsuspension je Schale ausgesät.

### **3.3.2.3 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination**

Die Selektion auf Anwesenheit des in dem Austauschvektor integrierten Selektionsmarkers Neomycin wird 24 h nach der Elektroporation durch Zugabe von 350 µg/ml G418 begonnen. Die Negativselektion wird 2 Tage später gestartet, indem das Medium gegen ES-Selektionsmedium, in dem G418 und Ganciclovir enthalten sind, ausgetauscht wird. Ab diesem Zeitpunkt wird alle 2 Tage das Medium mit den abgestorbenen Zellen durch neues ES-Selektionsmedium ersetzt. Etwa 12 Tage nach dem Start der Selektion auf Neomycin sind resistente Klone einer Größe auf den Zellkulturschalen vorhanden, die eine Isolierung einzelner Zellklone möglich macht. Dazu werden jeweils einzelne Klone mit Hilfe einer 200 µl Kolbenhubpipette und einer gelben Spitze von der Kulturschale abgeschabt und in etwa 140 µl Medium aufgesogen. Der Klon wird mit dem Medium in eine Vertiefung einer gelatinisierten 48-Loch-Kulturschale überführt und dort durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Etwa die Hälfte dieser Zellsuspension wird für die anschließende Genotypisierungs-PCR abgenommen und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt (siehe 3.1.2). Die verbleibende Zellsuspension wird mit einer Zellsuspension in ES-Selektionsmedium versetzt, die die entsprechende Menge Feeder Zellen für die 48-Loch-Kulturschalenvertiefung enthält. Abschließend erfolgt ein Wechseln des Selektionsmediums wiederum alle 2 Tage, bis der Zellklon eine ausreichende Dichte zum Trypsinisieren hat und auf eine 24-Loch-Kulturschalenvertiefung geteilt werden kann. Diese Teilung erfolgt nur noch mit denjenigen Klonen, die sich in der Genotypisierungs-PCR inzwischen als wahrscheinlich erfolgreich homolog rekombiniert erwiesen haben. Die weitere Expansion wird von der 24-Loch-Kulturschalenvertiefung über eine 6-Loch-Kulturschalenvertiefung zu 2 T25-Kulturflaschen betrieben. Von diesen dient eine als Ausgangsmaterial für die Karyotypanalyse und die Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse. Hierfür werden die Zellen

nochmals auf 2 T25-Kulturflaschen geteilt. Die Zellen aus der anderen Flasche werden eingefroren, um später gegebenenfalls in der Blastozysteninjektion eingesetzt zu werden.

#### **3.3.2.4 Karyotypanalyse homolog rekombinierter ES-Zellklone**

Für die Gewinnung von keimbahngängigen Chimären nach der Blastozysteninjektion ist es essentiell, dass die ES-Zellen ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen während der Kulturphase beibehalten. Aus diesem Grund werden alle potentiell für die Blastozysteninjektion vorgesehenen ES-Zellklone zuvor einer Karyotypanalyse unterzogen.

Hierfür werden die Zellen einer konfluenten T25-Kulturflasche verwendet. Das Medium wird von den Zellen entfernt, und mittels Zugabe von 1 ml Medium mit 10 µl Colchicin-Lösung von Sigma und Inkubation dieser Lösung für 1 h bei 37°C im Inkubator werden die Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert. Die Zellen werden anschließend mit ES-PBS gewaschen, trypsinisiert und in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen pelletiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet durch Klopfen gelöst. Die Resuspendierung erfolgt in 1 ml 0,56%iger KCl-Lösung durch nochmaliges Klopfen am Zentrifugationsröhrchen. Während einer zehnminütigen Inkubationsphase bei RT schwellen die Zellen osmotisch an. Anschließend werden die Zellen erneut durch Zentrifugieren für 5 min bei 700 Upm pelletiert. Das Pellet wird mit eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig (3:1) durch Klopfen resuspendiert. Durch eine Inkubation von 5 min bei RT findet eine erste Fixierung statt, die nach einer erneuten Sedimentation noch zweimal mit dem Methanol:Eisessig-Gemisch wiederholt wird. Nach der letzten Sedimentation werden die Zellen in 1 ml Methanol:Eisessig aufgenommen und zu einer homogenen Suspension resuspendiert. Die Suspension wird aus etwa 100 cm Höhe auf gereinigte Objektträger getropft. Die Chromosomen werden durch eine Inkubation von 1 min mit Giemsa Färbelösung angefärbt und die Färbung durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser differenziert. Nach dem Trocknen werden überschüssige Färbereste mit Wasser entfernt, und es wird erneut getrocknet. Die Objektträger werden mit DPX und Deckgläsern eingedeckelt. Mindestens 20 auswertbare Chromosomenanhäufungen je ES-Zellklon werden an einem Zeiss-Axiophot Mikroskop mit Phasenkontrastoptik ausgezählt.

#### **3.3.3 Primäre Embryonale Mausfibroblasten**

Diese Zellen werden als Feeder Zellen für die ES-Zellkultur benötigt. Sie wurden von Matthias Eckhardt aus ASA-Knockout Mausembryonen, in deren Genom eine Resistenz gegen Neomycin enthalten war, isoliert und entstammen wie die HM1 ES-Zellen einem Sv129P2/Ola Stamm. Damit sie als sogenannte „feeder layer“ für die ES-Zellen dienen können, müssen sie zuvor wachstumsinhibiert werden. Dazu werden sie zunächst

folgendermaßen expandiert: Nach dem Auftauen werden die primären embryonalen Mausfibroblasten zunächst für 4 Tage auf 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Danach werden sie 1:10 geteilt und weitere 3 Tage kultiviert. Daraufhin werden alle Zellen pelletiert und in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen zusammengefügt. Auf Eis werden die Zellen bis zur  $\gamma$ -Bestrahlung aufbewahrt. Die Bestrahlung erfolgt für 8 min bei 15 Gy und führt zur Inaktivierung der Zellen.

Anschließend werden die Zellen erneut unverdünnt auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät und am folgenden Tag nach Pelletieren in Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen eingefroren.

### **3.4 Nachweise der Genotypen homolog rekombinierter ES-Zellklone und transgener Mäuse**

Ausgangsmaterial für die folgenden Nachweise ist genomische DNA, die entsprechend der zuvor beschriebenen Methoden 3.1.2 und 3.1.3 aus den verschiedenen Materialien isoliert wurde.

#### **3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Fragmente (Mullis und Faloona, 1987). Aus einem bekannten DNA-Bereich werden zwei Startermoleküle, die im folgenden mit „Primer“ bezeichnet werden, abgeleitet. Die DNA wird durch Hitze denaturiert und damit einzelsträngig gemacht. Während der anschließenden Abkühlung binden die Primer spezifisch an den komplementären Bereich der einzelsträngigen Matrize. In der nachfolgenden Verlängerungsreaktion wird in der Anwesenheit von dNTPs durch eine spezielle thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) die Matrize zu einem Doppelstrang aufgefüllt. Durch die Wiederholung des Zyklus ergibt sich eine exponentielle Anreicherung der zwischen den Primern gelegenen Matrizen-DNA. Die Amplifikation wird zumeist in einem 25  $\mu$ l-Ansatz durchgeführt. Eine Analyse der amplifizierten DNA-Sequenzbereiche erfolgt über eine Agarosegelelektrophorese (siehe 3.4.2).

Für die im Folgenden aufgeführten, zur Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendeten, PCRs werden 10 x Puffer, 25 mM  $MgCl_2$ , 10 mM dNTP-Mix und Primer eingesetzt, die nach Herstellerangaben in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l gelöst wurden. Die Genotypisierungen der transgenen Mäuse werden mit der Taq-Polymerase der Firma Fermentas durchgeführt. Die Genotypisierungen der ES-Zellklone erfolgen mit der Phusion® Taq-Polymerase der Firma Finnzymes. Hier werden 5 x Puffer und kein

zusätzliches MgCl<sub>2</sub> verwendet. Ansonsten wird wie bei der Genotypisierung der transgenen Mäuse verfahren.

### 3.4.1.1 PCR zum Nachweis der homologen Rekombination von pLRlacZpA/MCINeopA.delfa2h.HSV-TK in ES-Zellen

Ein Amplikon von 2,1 kb zeigt die homologe Rekombination des Vektors pLRlacZpA/MCINeopA.delFa2h.HSV-TK in HM1 ES-Zellen an.

PCR-Ansatz = 20 µl		PCR-Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
5,0 µl	DNA-Lysat	95 °C	5 min	1
4,0 µl	5 x GC-Puffer	98°C	15 s	
2,0 µl	dNTP-Mix	64°C	40 s	35
0,2 µl	FH4	72°C	2 min	
0,2 µl	FHneo neu	72°C	10 min	1
0,2 µl	Phusion® Taq	4°C	∞	1
8,4 µl	H <sub>2</sub> O			

### 3.4.1.2 Genotypisierung von FA2H-KO Mäusen

Ein Amplikon von 1045 bp zeigt das Vorhandensein des FA2H-wt Allels an. Ist in der genomischen DNA ein FA2H-ko Allel vorhanden, ergibt sich mit dieser PCR ein 685 bp Amplikon.

PCR-Ansatz = 25 µl		PCR-Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
2,0 µl	DNA	95 °C	5 min	1
2,5 µl	10 x Puffer	95°C	30 s	
2,5 µl	dNTP-Mix	59°C	30 s	32
2,5 µl	DMSO	72°C	1 min	
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>	72°C	10 min	1
0,1 µl	FH short arm anti	4°C	∞	1
0,1 µl	FH wt sense 1			
0,1 µl	FH neo neu			
2,0 µl	Taq-Polymerase			
11,7 µl	H <sub>2</sub> O			

### 3.4.1.3 Genotypisierung von PLP-CGT/GalT-KO-Mäusen

Für diese Genotypisierung werden zwei PCR-Ansätze verwendet. Mit einer PCR wird auf das Vorhandensein der GalT wt und ko Allele getestet. Das GalT ko Allel ist erkennbar an einem Amplikon der Größe 820 bp, das GalT wt Allel liegt vor, wenn ein 684 bp großes Amplikon auf dem Gel zu erkennen ist.

PCR-Ansatz = 25 µl		PCR-Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
2,0 µl	DNA	95 °C	5 min	1
2,5 µl	10 x Puffer	95°C	30 s	
2,5 µl	dNTP-Mix	50°C	30 s	34
2,5 µl	DMSO	72°C	1 min	
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>	72°C	10 min	1
0,1 µl	GalT sense	4°C	∞	1
0,1 µl	GalT anti			
0,1 µl	Neo reverse			
2,0 µl	Taq-Polymerase			
11,7 µl	H <sub>2</sub> O			

Auf Vorhandensein des CGT Transgens wird mit einer zweiten PCR getestet. Diese ergibt nur dann ein 684 bp Amplikon, wenn das Transgen im Genom der Maus integriert ist. Ist dies nicht der Fall, ergibt sich keine Bande.

PCR-Ansatz = 25 µl		PCR-Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
2,0 µl	DNA	95 °C	5 min	1
2,5 µl	10 x Puffer	95°C	30 s	
2,5 µl	dNTP-Mix	56°C	30 s	34
2,5 µl	DMSO	72°C	1 min	
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>	72°C	10 min	1
0,1 µl	Rat CGT 2	4°C	∞	1
0,1 µl	CGT 883			
2,0 µl	Taq-Polymerase			
11,8 µl	H <sub>2</sub> O			

### 3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die native Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen oder präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren im Gleichspannungsfeld. Die DNA- bzw. RNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zum positiven Pol, wobei die

Wanderungsgeschwindigkeit sowohl durch die Molekülgröße, als auch durch die Konformation (einzelsträngig, doppelsträngig, zirkulär geschlossen, zirkulär mit Einzelstrangbruch) beeinflusst wird. Die eingesetzte Agarosekonzentration richtet sich nach der Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren und liegt zwischen 0,8% und 2,0%. Die entsprechende Menge Agarose wird in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und wieder abgekühlt. Wenn die Lösung eine Temperatur von 56°C erreicht hat, wird Ethidiumbromid in die Gellösung gegeben (Endkonzentration an Ethidiumbromid = 0,7 µg/ml). Dadurch kann DNA und RNA später bei Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht werden. Die zu analysierenden Proben werden vor dem Beladen des Gels mit der entsprechenden Menge 4-fach DNA/RNA-Ladepuffer versetzt. Die Bestimmung der DNA-Längenfragmente erfolgt durch den parallelen Auftrag eines Längenstandards. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt.

### 3.4.3 Southern-Blot-Hybridisierung

Nach Aufreinigung der genomischen DNA gemäß den unter 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Methoden, werden 10 µg DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym über Nacht gespalten und elektrophoretisch in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird das Gel mit einem Fluoreszenzlineal als Größenmaßstab unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Zur Depurinierung der DNA wird das Gel 10 min in 0,2 N HCl unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Es folgt eine Inkubation für 30 min in 0,4 N NaOH. Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham, Deutschland) erfolgt für etwa 20 h mit 0,4 N NaOH. Nach Abbau des Blots wird die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, für 1 h bei RT getrocknet und für 2 h bei 80°C gebacken.

Zur radioaktiven Markierung der Sonden-DNA wird der Reagenziensatz Megaprime-DNA labeling Kit der Firma Amersham verwendet. Das Verfahren beruht darauf, dass hexamere Startermoleküle zufälliger Sequenz mit der als Sonde einzusetzenden DNA hybridisieren und vom Klenow-Fragment der DNA-Polymerase in Anwesenheit von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP verlängert werden. Die Sonde wird durch Restriktionsspaltung aus der entsprechenden Plasmid-DNA ausgeschnitten, über ein Agarosegel gereinigt (siehe 3.2.1.2) und die Konzentration des Eluats bestimmt (siehe 3.1.6.2). 25 ng DNA werden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 28 µl aufgefüllt und mit 5 µl hexameren Startermolekülen versetzt. Der Ansatz wird für 5 min gekocht und für 10 min bei RT abgekühlt. Danach werden 10 µl Markierungspuffer zugegeben. Dieser enthält nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP. Es folgt die Zugabe von 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (10 µCi) und 2 µl Klenow-Polymerase (1 U/µl). Der Ansatz wird für 15 min bei 37°C inkubiert. 2 µl der Sonde werden zu diesem Zeitpunkt abgenommen und später vermessen. Zur Abtrennung freier, radioaktiver Nukleotide und kurzer Oligonukleotide wird

eine ProbeQuant™ G-50 Micro Columns Säule der Firma Amersham verwendet. Die Säule wird zunächst durch Zentrifugation (1 min, 3000 Upm) von überschüssiger Flüssigkeit befreit und anschließend wird der Ansatz mit der radioaktiv markierten Sonden-DNA auf die Säule gegeben und diese erneut zentrifugiert (2 min, 3000 Upm). Erneut erfolgt die Abnahme von 2 µl der Sonde. Beide abgenommenen Proben werden im Szintillationszähler vermessen und dabei wird zum Einen die Einbaurate der Radioaktivität in die Sonde und zum Anderen die absolut einzusetzende Menge an markierter Sonde bestimmt.

Die Membran wird für 1 h bei 42°C zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wird für 5 min aufgeköcht und rasch auf Eis abgekühlt. Die Membran wird nach der Prähybridisierung mit frischer Hybridisierungslösung versetzt und dieser wird die radioaktiv markierte und denaturierte Sonde zugefügt. Die Durchführung der Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C. Danach wird die Membran zweimal für jeweils 10 min bei RT mit 2 x SSC, welches 0,1% SDS enthält, gewaschen. Es folgt ein zweimaliges Waschen bei 65°C mit 0,2 x SSC/0,1% SDS. Anschließend wird die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette auf einen gelöschten Fuji Bioimager Screen aufgelegt. Die Expositionszeit beträgt zwischen 2 h und einer Woche.

## **3.5 Biochemische Nachweise**

### **3.5.1 Northern-Blot-Hybridisierung**

Nach Aufreinigung der RNA wie unter 3.1.4 beschrieben werden jeweils 20 µg RNA mit einem Probenpuffer der Firma Fermentas versetzt, der Formamid und Ethidiumbromid enthält und für 10 min bei 65°C erhitzt. Darauf wird die RNA rasch auf Eis abgekühlt. Anschließend wird die RNA in einem Agarosegel, welches 2,2 M Formaldehyd enthält, aufgetrennt. Danach wird das Gel mit einem Fluoreszenzlineal als Größenmaßstab unter dem UV-Transilluminator dokumentiert, wobei vor allem die Lage der 28 S- und der 18 S-Bande genau zu beachten ist. Das Gel wird dann in 20 x SSC äquillibriert und für etwa 20 h auf Hybond-N<sup>+</sup>-Membran mit 20 x SSC geblottet. Nach Abbau des Blots wird die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, für 1 h bei RT getrocknet und zur Fixierung der RNA für 2 h bei 80°C gebacken.

Die radioaktive Markierung der Sonde und die Hybridisierung erfolgen wie unter 3.4.3 für die Southern-Blot Hybridisierung beschrieben.

## 3.5.2 *In-situ*-Hybridisierung

### 3.5.2.1 *Herstellung der RNA-Gensonden*

Zur Herstellung einer Sonde wird das zur Hybridisierung einzusetzende Fragment in einen geeigneten Transkriptionsvektor, der T3-, T7- oder SP6-Promotoren enthält, umkloniert. Zur Markierung werden 1-2 µg Plasmid linearisiert, anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ethanol unter RNase-freien Bedingungen gefällt. Die Markierung erfolgt mit Hilfe eines DIG-Labeling Kits der Firma Roche. Die in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O gelöste DNA wird mit 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-Labeling-Mix und 2 µl der entsprechenden RNA-Polymerase versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Entfernung der DNA durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I (10 U/µl) und einer weiteren Inkubation bei 37°C für 15 min. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA gestoppt und die synthetisierte RNA mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wird die RNA getrocknet und das Pellet schließlich in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Markierungseffizienz wird bestimmt, indem Verdünnungsreihen der markierten Probe und einer markierten Kontroll-RNA auf einer Nylonmembran fixiert und anschließend mit dem anti-DIG-F<sub>ab</sub>-AP-Konjugat wie unten (3.5.2.2) beschrieben entwickelt werden.

### 3.5.2.2 *In-situ*-Hybridisierung

Ausgangsmaterial für diese Analyse sind Gefrierschnitte verschiedener Gewebe, die wie unter 3.5.3.4 beschrieben hergestellt werden. Die Schnitte werden für 5 min in 4% PFA fixiert, 4 min in Proteinase K (10 µg/ml) inkubiert und für 4 min mit 0,25% Triton X-100 permeabilisiert. Es folgen Inkubationen für 8 min in 0,2 M HCl und für 10 min in 0,1 M TEA-Lösung. Daraufhin wird für weitere 10 min bei 50°C in 2 x SSC inkubiert. Für die Hybridisierung werden die markierten RNA-Sonden entsprechend ihrem Markierungssignal in Hybridisierungspuffer unter Zugabe von 4 µl DTT verdünnt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 70°C in einer feuchten Kammer. Danach werden die Schnitte zweimal für 5 min mit 2 x SSC und dann einmal für 20 min mit 0,1 x SSC/50% Formamid inkubiert. Es folgt eine Inkubation für 45 min in 0,1 x SSC. Anschließend werden die Schnitte in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) äquillibriert, bevor für 30 min die unspezifischen Bindungsstellen mit Blocklösung (2% Blockreagenz von Boehringer-Mannheim in Maleinsäurepuffer) geblockt werden. Der Anti-Digoxigenin-Antikörper wird 1:5000 in der Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Nach der Inkubation werden die Schnitte 5 x je 1 h mit Maleinsäurepuffer gewaschen und anschließend mit AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) äquillibriert. Die

NBT/BCIP-Lösung wird in dem AP-Puffer entsprechend den Herstellerangaben verdünnt und für 2 h bis 3 Tage auf die Schnitte gegeben.

### **3.5.3 Nachweise von Proteinen**

#### **3.5.3.1 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen, die in der Immunoblot-Analyse benötigt werden, wird mit Hilfe des BioRad DC Assay Systems, das auf dem Lowry-System basiert (Lowry et al., 1951), durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve werden verschiedene Konzentrationen einer BSA-Lösung als Standard verwendet. 5 µl des Standards oder der Proben werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Alle Werte werden als Dreifachwerte bestimmt. Nebenbei erfolgt die Herstellung der Lösung A'. Dafür werden zu jedem ml Lösung A 20 µl Lösung S zugegeben. Von dieser Lösung A' werden 25 µl in jede belegte Vertiefung gegeben und mit 200 µl Lösung B vermischt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wird das Gemisch in einem Mikrotiterplattenleser bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 750$  nm vermessen.

#### **3.5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Protein-Analyse von Gewebelysaten werden die Gewebe in Homogenisierungspuffer mit Hilfe des Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend werden die Gewebelysate mit 1% SDS versetzt und die Proteinkonzentration wird wie unter 3.5.3.1 beschrieben bestimmt.

Die Trennung der Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse, unabhängig von ihrer Eigenladung, erfolgt durch diskontinuierliche SDS-PAGE. Dazu werden denaturierende, SDS-haltige Gele nach Laemmli (Laemmli et al., 1970) angefertigt, die ein niederprozentiges Sammelgel und ein höherprozentiges Trenngel enthalten. Die hier verwendeten Trenngele enthalten 10% oder 12,5% Polyacrylamid.

Die Proteinproben werden mit 4-fach-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Dieses Gemisch wird in die Taschen des Sammelgels gegeben und die Elektrophorese gestartet. Solange sich die Proben noch im Sammelgel befinden, wird eine niedrigere Stromstärke angelegt, die erhöht wird, sobald die Proben das Trenngel erreichen. Nachdem die Lauffront fast den unteren Rand des Gels erreicht hat, wird der Strom abgeschaltet und das Gel aus der Kammer genommen. Anschließend wird es wie unter 3.5.3.3 beschrieben weiterbehandelt. Als Größenstandards werden die Proteinmarker 661 Pager Ruler und 671 Prestained Page Ruler der Firma Fermentas verwendet.

### **3.5.3.3 Western-Blot nach dem Semi Dry Verfahren**

Unter dem Begriff Western-Blot versteht man den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, welche meist aus Nitrozellulose besteht. Der Westernblot ermöglicht eine Identifizierung bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch mittels spezifischer Antikörper.

Pro zu blottendem Gel werden 6 Stück Whatman-Papiere entsprechender Größe in Blotpuffer getränkt und ein Stück Nitrozellulose-Membran in H<sub>2</sub>O von Industrierückständen befreit. Zum Aufbau des Blots werden 3 Stück des in Blotpuffer getränkten Whatman-Papiers auf die Anode gelegt, gefolgt von der angefeuchteten Nitrozellulose-Membran, dem zu blottenden Gel und den verbleibenden 3 Stück Whatman-Papier. Beim Aufbau des Blots wird darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befinden. Die Apparatur wird mit dem Deckel (der Kathode) verschlossen und das Gel mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratcentimeter Gelfläche für 2 h geblottet.

Nach dem Blot erfolgt eine Überprüfung des Blotresultats mittels PonceauS-Färbung. Dafür wird die Nitrozellulose-Membran für einige Minuten in der PonceauS-Gebrauchslösung inkubiert. Nach Waschen mit H<sub>2</sub>O kann man die Proteinbanden erkennen und sehen, ob alle Bereiche der Membran gleichmäßig belegt sind oder ob gegebenenfalls durch Luftblasen nicht geblottete Bereiche entstanden sind. Die Färbung wird durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt.

Anschließend werden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit der Blocklösung (3% Magermilchpulver in 1xPBS) für 30-60 min bei RT unter Schütteln geblockt. Nach der Blockierung wird die Membran 3 x für je 5 min mit TBS/Tween gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt. Die Primärantikörper werden in Blocklösung verdünnt und die Inkubation dauert 2 h. Danach wird die Membran wieder 3 x für je 5 min in TBS/Tween gewaschen und anschließend für 1 h mit dem ebenfalls in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgt ein weiteres dreimaliges Waschen wie oben beschrieben.

Die Detektion des Signals erfolgt über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). Dazu werden auf 10 ml ECL-Lösung 3,1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben und die Membran für 1 min darin inkubiert. Anschließend kann ein Film durch Auflegen auf die Membran belichtet und mittels Entwicklungsmaschine entwickelt werden. Alternativ erfolgt die Detektion mit einem Li-Cor Laserscanner über durch Laser angeregte Fluoreszenz, wofür abweichend nicht peroxidase-markierte zweite Antikörper, sondern fluoreszenz-markierte zweite Antikörper verwendet werden müssen.

### **3.5.3.4 Immunfluoreszenznachweis von Proteinen in Gefrierschnitten**

Die für die Immunfluoreszenz-Analyse, aber auch für histologische Nachweise und Färbungen (siehe 3.6), präparierten Gewebe werden vor dem Schneiden in TissueTek® eingebettet. Anschließend werden mit Hilfe des Kryostaten von Leica Gefrierschnitte hergestellt. So ist es möglich, die Gewebeschnitte bei einer Umgebungstemperatur von -21°C und einer dem Gewebe angepassten Objekttemperatur von -18°C bis -25°C anzufertigen. Das Trimmen des Gewebes erfolgt bei 30 µm. Die Schnittdicke der verwendeten Gefrierschnitte beträgt 10-12 µm. Die Schnitte werden auf Superfrost®Plus Objektträger von Merck aufgezogen und für 1 h luftgetrocknet. Nicht sofort verarbeitete Gewebeschnitte werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Immunfluoreszenz-Analyse ermöglicht einen Nachweis eines Proteins mit Hilfe von Antikörpern an fixierten Geweben. Dadurch ist nicht nur eine Aussage über die Expression des Proteins in dem Gewebe, sondern auch über seine Lokalisation in diesem möglich. Für die Analyse werden die Gefrierschnitte zunächst für 5 min in 4% PFA fixiert. Danach wird 3 x für je 10 min mit PBS gewaschen, worauf gegebenenfalls eine Permeabilisierung mit Triton X-100 für 30 min erfolgt. Anschließend werden die Schnitte für 30 min in 1% BSA in PBS inkubiert und damit die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers wird über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Primär- und Sekundärantikörper werden entsprechend in der BSA-Lösung verdünnt. Es schließen sich wiederum 3 Waschschriffe mit PBS und daraufhin die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1h bei RT an. Überschüssige Sekundärantikörper werden durch erneutes dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Zur unspezifischen Zellkernmarkierung werden die Präparate 5 min in einer 1:500 Verdünnung in PBS der Hoechst-Lösung inkubiert und anschließend noch einmal in PBS und dann in H<sub>2</sub>O gewaschen, um Salze zu entfernen. Schließlich werden die Präparate in Polyvinylalkohol Eindeckelmedium mit DABCO der Firma Fluka eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

## **3.5.4 Lipidanalyse**

### **3.5.4.1 Extraktion von Lipiden aus Geweben**

Zur Extraktion der Lipide aus den Geweben werden diese zunächst mit Hilfe des Ultra Turrax in einem kleinen Volumen H<sub>2</sub>O homogenisiert und anschließend in dem zehnfachen des Gewebevolumentums an Lösungsmitteln extrahiert. Die erste Extraktion erfolgt in Chloroform/Methanol (2:1; v/v) für 4 h unter Rühren bei 56°C mit dem „Reacti Therm Heating and Stiring Module“. Die Gewebeanteile werden durch Zentrifugieren (5 min, 1000 Upm) pelletiert und der klare Überstand durch mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten filtriert. Das Pellet wird mit einem zweiten Lösungsmittel (Chloroform/Methanol (1:1; v/v)) erneut für 4 h

bei 56°C unter Rühren extrahiert. Erneut wird das Gewebematerial durch Zentrifugieren und Filtrieren abgetrennt und die zusammengeführten Filtereluate werden bei 50°C unter Einblasen von N<sub>2</sub>-Gas eingedampft.

Die Lipide werden in 3,0 ml Methanol gelöst und hiervon werden 0,5 ml zur Analyse der Gesamtlipide abgenommen. Die verbleibenden 2,5 ml werden mit 62,5 µl 4 N NaOH zur Verseifung der Triglyceride und Phospholipide versetzt. Diese Lösung wird für 2 h bei 37°C unter Rühren inkubiert. Die Hydrolyse wird anschließend durch Zugabe von 10 µl Eisessig gestoppt und die Lösung erneut mit Hilfe von N<sub>2</sub>-Gas eingedampft. Für die Entsalzung werden die Lipide in 1 ml Methanol aufgenommen und auf eine folgendermaßen präparierte Säule gegeben (Schwarz, et al., 1997; van Echten-Deckert 2000): Eine Pasteurpipette wird mit etwas Glaswolle gestopft. In Methanol gelagerte LiChroprep® RP-18-Kügelchen werden resuspendiert und auf die Glaswolle pipettiert. Die Säule wird anschließend zweimal mit 1 ml Chloroform/Methanol/Kaliumchlorid (3:48:47; v/v/v) gewaschen. Die Lipidlösung wird mit 1 ml 300 mM Ammoniumacetatlösung versetzt und anschließend auf die Säule gegeben. Das Pyrex-Röhrchen wird zweimal mit je 0,5 ml Methanol/200 mM Ammoniumacetatlösung (1:1; v/v) gewaschen und die Waschlösung ebenfalls auf die Säule gegeben. Anschließend wird die Säule 6 x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann wird damit begonnen, das Eluat aufzufangen. Zur Elution der Lipide wird zunächst 1 ml Methanol, dann 6 x je 1 ml Chloroform/Methanol (1:1; v/v) auf die Säule gegeben. Das Eluat wird unter Einblasen von N<sub>2</sub>-Gas eingedampft. Die eingedampften Lipide werden anschließend in der Menge des eingesetzten Gewebes entsprechendem Volumen Chloroform/Methanol (1:1; v/v) gelöst und in ein Glasfläschen mit Teflondeckel überführt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

Werden die Lipide aus der Epidermis von Mäusen extrahiert, ändert sich die Methode wie folgt: Die Homogenisierung erfolgt in der Kälte in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser. Die erste Extraktion wird mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:2:0,5; v/v/v) bei 50°C durchgeführt. Auch die zweite Extraktion in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) erfolgt bei 50°C. Es schließt sich eine dritte Extraktion bei 50°C in Chloroform/Methanol (2:1; v/v) an. Die zusammengeführten Überstände der Extraktionen enthalten die nicht kovalent gebundenen Lipide und diese werden unter N<sub>2</sub>-Gas eingedampft, wie oben beschrieben in Lösungsmittel aufgenommen und in Glasfläschen überführt.

Im verbleibenden Pellet befinden sich die kovalent gebundenen Lipide. Um diese zu extrahieren wird das Pellet 3 x mit je 2 ml Methanol für 5 min bei RT extrahiert. Es folgen zwei Extraktionen bei 60°C für jeweils 2 h mit 2 ml 95%igem Methanol. Die Überstände der Extraktionen werden zusammengefasst und hierzu wird 1 ml 1 M KOH in 95%igem Methanol gegeben und 2 h bei 60°C inkubiert. Anschließend werden 2 ml H<sub>2</sub>O und 2 ml Chloroform zugegeben. Die Lipide gehen in die lipophile Chloroformphase über und diese wird isoliert. Zur wässrigen Phase werden erneut 2 ml Chloroform gegeben und auch diesmal wird die

lipophile Phase abgetrennt. Die vereinigten lipophilen Phasen werden unter N<sub>2</sub>-Gas eingedampft und die Lipide wie schon zuvor beschrieben in Lösungsmittel wieder aufgenommen und in Glasfläschchen überführt.

#### **3.5.4.2 Auftrennen von Lipiden auf Dünnschichtchromatographie-Platten**

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie werden die extrahierten Lipide analysiert. Die Lipide werden mit dem „TLC-Sampler“ von Camag auf eine HPTLC Kieselgel 60 Platte aufgetragen. Die verwendeten Volumina ergeben sich aus dem Feuchtgewicht der Ausgangsgewebe. Die beladene Platte wird in eine Chromatographiekammer mit entsprechendem Laufmittel gestellt und bis etwa 2 cm unter dem Rand entwickelt. Das Laufmittel wird kurz bei Raumtemperatur abgedampft und dann die Platte mit DC-Färbelösung eingesprüht. Die Platte wird mit Hilfe eines Föns getrocknet, für 10 min bei 180°C inkubiert und abschließend eingelesen.

Quantifizierungen der Lipidbanden erfolgen densitometrisch mit Hilfe der AIDA Software (Advanced Image Data Analyzer; Raytest, Straubenhardt, Deutschland). Mit Lipidstandards bekannter Konzentrationen werden Eichgeraden für die einzelnen Lipide erstellt.

#### **3.5.4.3 DE MALDI-TOF (Delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight analysis)**

Die Lipide werden wie unter 3.5.4.2 beschrieben auf DC-Platten aufgetrennt und die Regionen, die die entsprechenden Lipide enthalten, werden ausgeschnitten und die Lipide mit Chloroform/Methanol (2:1; v/v) reextrahiert. Nach Eindampfen unter N<sub>2</sub>-Gas werden die Lipide wieder in Chloroform/Methanol (1:1; v/v) gelöst. Ein µl der Lösung wird mit 1 µl 2,5-Dihydrobenzoesäure-Lösung (10 mg/ml in 70% Acetonitril) gemischt. Ein µl dieser Mischung wird auf eine Platte geladen. Die Massenspektren werden mit einem Voyager-DE STR Massenspektrometer (PE Biosystems) in positivem oder negativem Ionenmodus aufgenommen. Die Messungen wurden von Herrn Werner Tomberg durchgeführt.

## **3.6 Histochemische Färbungen und Nachweise**

Die Gewebeschnitte werden wie unter 3.5.3.4 beschrieben angefertigt. Zur Untersuchung von histologischen Unterschieden werden die Schnitte mit Eosin/Hämatoxylin-Lösung gefärbt, welches eine Darstellung der Zellkerne in dunkelblau bis violett und des Zytoplasmas in rosa ermöglicht (Bancroft und Cook, 1994).

### 3.6.1 Färbungen der Sebozyten an Gefrierschnitten

Um die Lokalisierung und die Größe und Morphologie der Sebozyten sichtbar zu machen, werden Gefrierschnitte der Haut unterschiedlichen Färbemethoden unterworfen.

#### 3.6.1.1 OilRedO®-Färbung

Die Schnitte werden zunächst in Baker`s Solution für 5 min fixiert. Anschließend wird kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 5 min in 60%igem Isopropanol äquillibriert. Es folgt eine Inkubation für 10 min in der OilRedO®-Stammlösung B, die durch kurzes Waschen in 60%igem Isopropanol beendet wird. Danach wird kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Kaiser`s Gelatine eingedeckelt.

#### 3.6.1.2 Nile Red-Färbung

Die Gefrierschnitte werden für 5 min in 4% PFA fixiert und anschließend zweimal für je 10 min mit PBS gewaschen. Danach wird die Nile Red-Arbeitslösung direkt auf die Objektträger getropft und diese mittels Deckglas eingedeckelt. Nach etwa 2 h Trocknen bei RT wird der Rand des Deckglases mit Kaisergelatine abgedichtet, um ein Verschieben des Deckglases und ein Austrocknen der Objektträger zu verhindern. Die Lagerung bis zur mikroskopischen Analyse erfolgt im Dunkeln bei 4°C.

### 3.6.2 AP-Färbung

Mit dieser Methode können Strukturen der dermalen Papille an Gefrierschnitten der Haut sichtbar gemacht werden. Dafür werden die Schnitte zunächst für 5 min in 4% PFA fixiert und danach kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgt eine Inkubation für 30 min in AP-Inkubationslösung, die durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt wird. Die Objektträger werden in Kaiser`s Gelatine eingedeckelt und bei RT bis zur mikroskopischen Analyse gelagert.

## 3.7 Expressionsanalyse des LacZ-Reportergens

Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* wird durch das Gen *lacZ* kodiert. Das tetramere Enzym kann für eine sogenannte  $\beta$ -Galaktosidase Nachweisreaktion eingesetzt werden, bei der an fixierten Gewebeschnitten ein zuvor farbloses Substrat X-Gal zu einem blauen unlöslichen Indigofarbstoff umgesetzt wird.

Es werden Gefrierschnitte der unterschiedlichen Gewebe, wie unter 3.5.3.4 beschrieben, angefertigt. Die Gefrierschnitte werden für 5 min im LacZ-Fixierungspuffer inkubiert, zweimal

mit LacZ-Waschpuffer gewaschen und über Nacht bei 37°C in der LacZ-Färbelösung inkubiert. Anschließend wird wieder 2 Mal im Waschpuffer gewaschen und dann gegebenenfalls mit Hämatoxylin gegengefärbt und schließlich in Kaisergelatine eingedeckelt. Zusätzlich werden ganze Embryonen verschiedener Stadien nach dem gleichen Protokoll gefärbt. Hier erfolgt jedoch die Fixierung alternativ für 30 min in 4% PFA-Lösung.

## **3.8 Tierexperimentelles Arbeiten**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und sind durch das Regierungspräsidium Köln (Genehmigungsnummer: AZ50.203.2-BN24,23/05) genehmigt worden. Alle Tiere, denen Organe entnommen werden, werden zunächst mit Diethylether betäubt. Adulte Tiere werden darauf durch zervikale Dislokation, alle unter zwei Wochen alten Tiere durch Decapitation, getötet. Alle Mauslinien werden in Tierställen mit einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

### **3.8.1 Nervenleitgeschwindigkeitsmessung**

Die Ischiasnerven von Mäusen wurden isoliert und in Ringer Lösung gesammelt. Die Nervenleitgeschwindigkeit wurde für jeden Nerv einzeln gemessen.

### **3.8.2 Verhaltenstests an Mäusen**

#### **3.8.2.1 Rotarod Experimente**

Die Tests wurden durchgeführt wie bei Kuhn et al., 1995 beschrieben. Sie ermöglichen die Analyse der flexiblen Bewegungskoordination der Vorder- und Hinterbeine sowie der Fähigkeit, Balance zu halten (Dunham und Miya, 1957). Hierfür werden die Mäuse an 3 aufeinander folgenden Tagen für je 10 Sekunden auf das langsam drehende Rotarod bei 3 Upm gesetzt. Am vierten Tag werden die Mäuse für 1 min auf das Rotarod bei 12 Upm gesetzt und es wird gemessen, wie oft sie in dieser Zeit herunterfallen. Bei jedem Fallen wird die Zeit gestoppt, damit die Verweildauer der Mäuse auf dem Rotarod immer 1 min beträgt.

#### **3.8.2.2 „Open field“-Test**

Für diese Analyse werden die Mäuse einzeln für jeweils 5 min in eine offene Box Typ ENV-515-16 (44 cm x 44 cm) mit Plexiglas-Wänden gesetzt, deren Boden mit einem Computer verbunden ist, auf dem das Programm „Activity software“ in der Version 4.36 läuft (Med Associates Inc., St Albans) (van Meer und Raber, 2005). Über den Computer werden verschiedene Verhaltensparameter der Tiere aufgenommen und später über Excel ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Inaktivierung des FA2H-Gens der Maus

#### 4.1.1 Klonierung des Austauschvektors pLZ1-LacZ

Das FA2H-Gen der Maus sollte mittels homologer Rekombination in ES-Zellen inaktiviert werden. Für die homologe Rekombination galt es, einen entsprechenden Austausch- oder *Targeting*-Vektor zu klonieren.

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pLRlacZpA/MCINeopA. Er enthält eine Transkriptionseinheit der Neomycinphosphotransferase (*neo*), die Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin vermittelt und deshalb als selektierbarer Marker verwendet werden kann und das Reporter-gen LacZ, welches die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase ermöglicht. Der Vektor ist ein *Replacement*-Vektor, der den Austausch eines definierten Abschnitts des Gens mit dem Bereich LacZ/*neo* des Vektors vermittelt. Ein effizienter *Targeting*-Vektor sollte möglichst lange homologe Bereiche zu dem betreffenden Gen enthalten, die aber in der Länge einen kritischen Wert nicht überschreiten sollten (Hasty et al., 1991). Es hat sich außerdem gezeigt, dass ein asymmetrischer Vektor mit einem sogenannten langen und einem kurzen Arm, d.h. unterschiedlich lange Sequenzabschnitte des Gens beiderseits des LacZ/*neo*-Bereichs sind enthalten, die Häufigkeit der homologen Rekombination steigert.

Alle hier aufgeführten Zwischenschrittvektoren wurden vor ihrer Weiterverwendung durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen charakterisiert und ausgewählte Abschnitte wurden sequenziert.

##### 4.1.1.1 Klonierung der 5'-homologen Region

Die für den Austauschvektor als 5'-homologe Region verwendeten Sequenzen wurden mittels PCR und den Startermolekülen (Primern) FH1 und FH2 aus genomischer HM1-Zellen-DNA amplifiziert. Das 4,3 kb große Amplikon wurde blunt end in die Schnittstelle des Restriktionsenzym *Sma*I des Ausgangsvektors pLRlacZpA/MCINeopA kloniert. Das Fragment enthält Bereiche des Introns 2 und die ersten 30 bp des Exons 3. Die verwendete 5'-homologe Region ist länger als die verwendete 3'-homologe Region. Dieser Bereich wurde folglich als „long-arm“ bezeichnet. Es entstand der Zwischenschrittvektor pLacZneo-long-arm (siehe Abb. 4-1 A).

#### **4.1.1.2 Klonierung der 3'-homologen Region sowie des PCR-Testvektors**

Eine PCR mit den Primern FH3 und FH4 auf genomischer DNA von HM1-Zellen lieferte ein 2,4 kb großes Amplikon. In dieser Sequenz war die gewünschte 3'-homologe Region als 1,8 kb großes PvuII-Fragment enthalten. Dieses PvuII-Fragment umspannt einen Teil des Introns 4 des FA2H-Gens. Das gesamte 2,4 kb große Amplikon wurde zunächst blunt end in die Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRV des Klonierungsvektors pBluescript (pBS) kloniert. Die 3'-homologe Region wurde als „short-arm“ bezeichnet und es entstand der Zwischenschrittvektor pBS-short-arm (siehe Abb. 4-1 B).

Das komplette 2,4 kb große, nicht verdaute Amplikon der PCR wurde außerdem blunt end in die aufgefüllte Schnittstelle des Restriktionsenzym SpeI des Ausgangsvektors pLRlacZpA/MCINeo<sup>r</sup>A kloniert. Mit diesem Schritt entstand der PCR-Testvektor, der im Gegensatz zum Austauschvektor 100 bp zusätzliche Sequenzinformationen stromabwärts enthält, jedoch keine Sequenzen stromaufwärts des LacZ/neo-Bereichs. Diese zusätzliche Sequenzinformation wurde zur Generierung eines Antisense-Primers genutzt. Damit wurde mittels des PCR-Testvektors die PCR zur Identifizierung einer homologen Rekombination simuliert und etabliert.

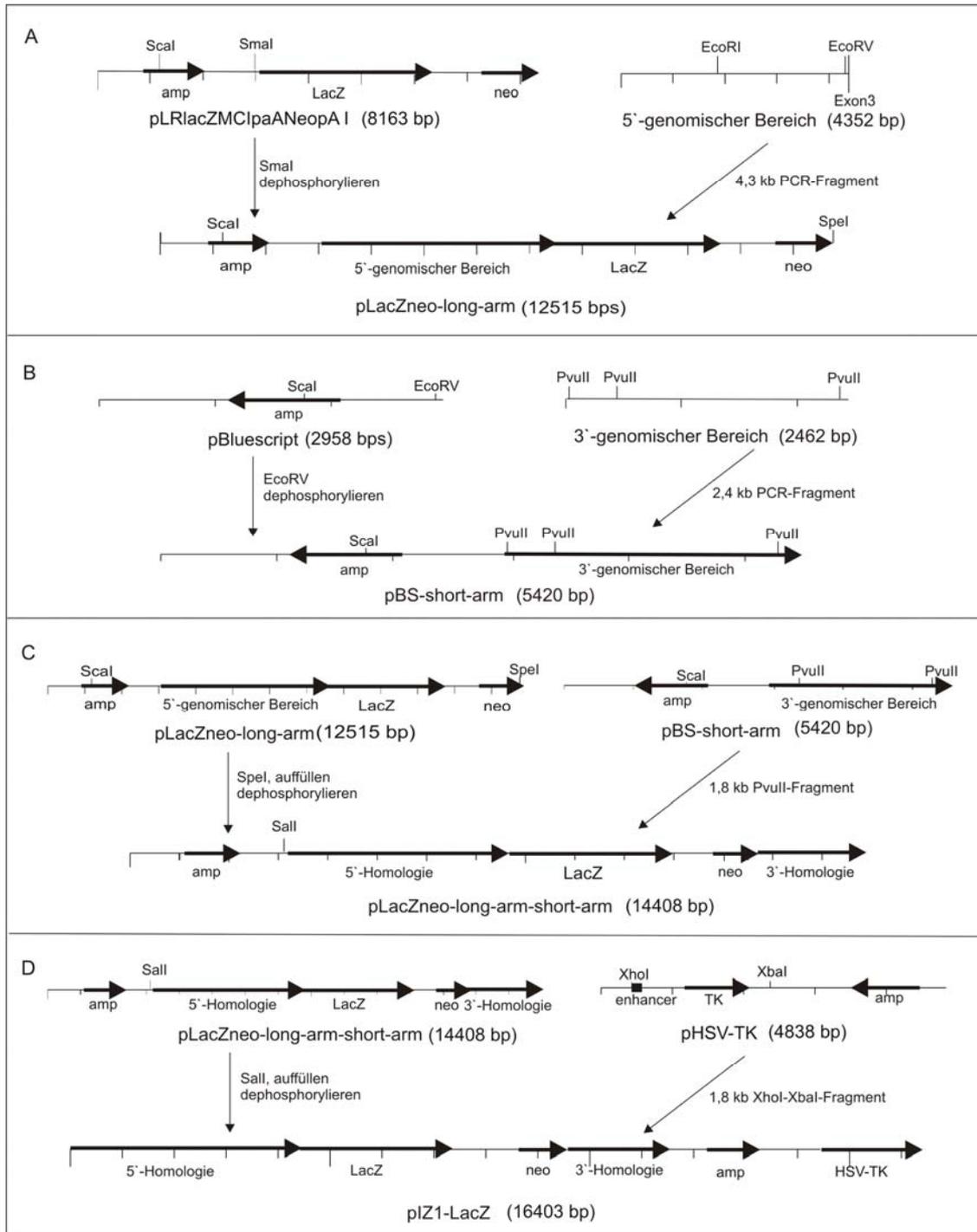
#### **4.1.1.3 Klonierung eines Zwischenschrittvektors mit beiden homologen Regionen**

Im nächsten Schritt wurden die beiden homologen Bereiche in einen Vektor kloniert, der dann die 5'-homologe Region, das LacZ-Expressionsgen, die Neomycin-Resistenz-Kassette und die 3'-homologe Region enthält. Hierfür wurde der Vektor pLacZneo-long-arm mit dem Restriktionsenzym SpeI gespalten und die entstehenden überhängenden Enden wurden mit Klenow Fragment aufgefüllt. Der 3'-homologe Bereich wurde mit dem Restriktionsenzym PvuII aus dem Vektor pBS-short-arm geschnitten und blunt end in den geöffneten Vektor mit der 5'-homologen Region einkloniert. Dadurch entstand der Vektor pLacZneo-long-arm-short-arm (siehe Abb. 4-1 C).

#### **4.1.1.4 Klonierung des Endvektors pIZ1-LacZ**

Um nach der Transfektion der ES-Zellen neben der positiven Selektion mit Neomycin auch eine negative Selektion mit Ganciclovir durchführen zu können, wurde in einem letzten Klonierungsschritt die Thymidin-Kinase-Kassette (unter der Kontrolle des HSV-Promotors; HSV-TK) eingeführt. Diese Kassette wird bei der homologen Rekombination in ES-Zellen entfernt, da sie sich an einem Ende des Vektors und damit nach homologer Rekombination außerhalb des Genlokus befindet. Sollte der Austauschvektor jedoch nicht homolog, sondern zufällig inseriert werden, wird die Thymidin-Kinase exprimiert und setzt aus Ganciclovir ein toxisches Produkt frei, welches den entsprechenden Klon absterben lässt.

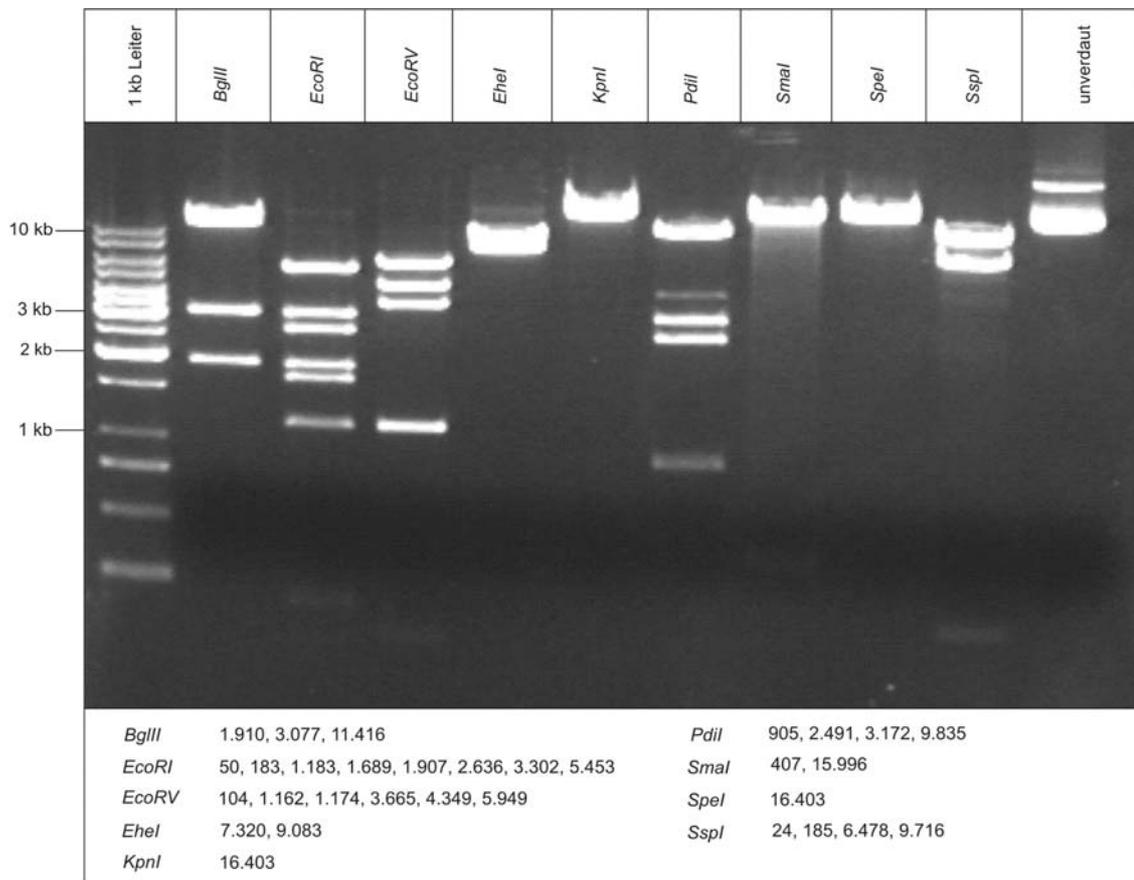
Ein Restriktionsverdau des Vektors pHSV-TK mit den Enzymen XhoI und XbaI ergab ein 1,8 kb großes Fragment, dessen überhängende Enden mit Klenow Fragment aufgefüllt wurden. Dieses Fragment wurde blunt end in die aufgefüllte Sall-Schnittstelle des Zwischenschrittvektors pLacZneo-long-arm-short-arm kloniert. Dadurch entstand der Austauschvektor pIz1-LacZ, in dem durch den letzten Klonierungsschritt eine neue SpeI Schnittstelle eingefügt wurde, die zur Linearisierung des Vektors genutzt werden konnte (Abb. 4-1 D)



**Abb. 4-1: Klonierungsstrategie für die Herstellung des Austauschvektors pIz1-LacZ**

Es sind alle Klonierungsstufen (A-D) des Austauschvektors bis zum fertigen Konstrukt pIz1-LacZ dargestellt. Alle für die Klonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

Nach seiner Fertigstellung wurde die Struktur des Austauschvektors pIZ1-LacZ mittels Restriktionsanalyse überprüft (siehe Abb. 4-2) und ausgewählte Abschnitte des Vektors wurden sequenziert. Dabei wurden in diesen Bereichen keine Mutationen gefunden.



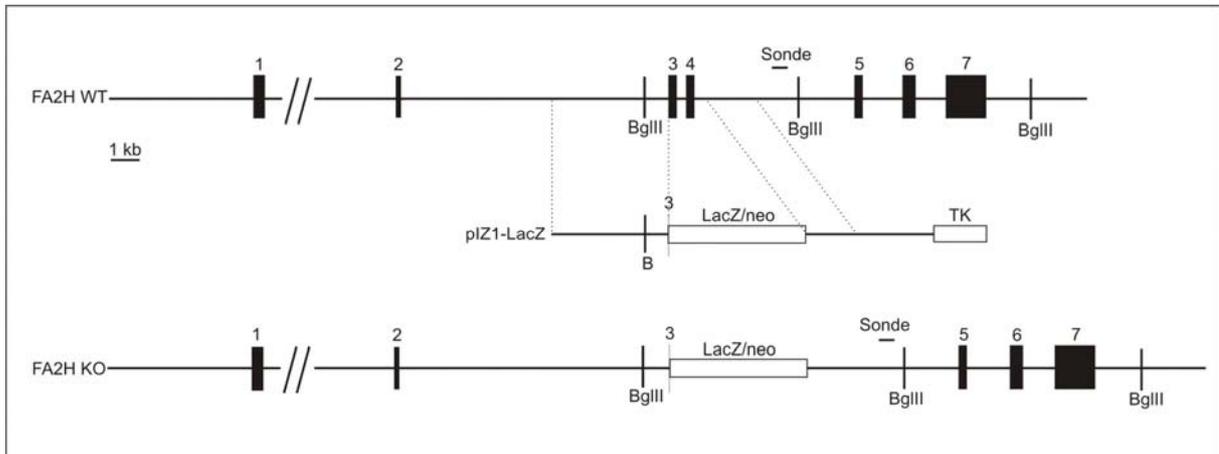
**Abb. 4-2: Restriktionsanalyse des Austauschvektors pIZ1-LacZ mit verschiedenen Restriktionsenzymen**  
Jeweils 0,5 µg Plasmid-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut und die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. DNA wurde durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die erwarteten Fragmentgrößen der Spaltprodukte sind angegeben. Die im Gel gezeigten Spaltprodukte entsprachen sämtlich den vorhergesagten.

#### 4.1.2 Herstellung und Überprüfung homolog rekombinierter ES-Zellen

Vor der Transfektion in HM1-ES-Zellen wurde der Austauschvektor mit Hilfe des Restriktionsenzym *SpeI* linearisiert. Die Beschaffenheit des Austauschvektors pIZ1-LacZ sollte das FA2H-Gen nach homologer Rekombination so mutieren, dass es nach dem Exon 2 unterbrochen ist. Der 3' nachfolgende Bereich ist bis zum Intron 4 entfernt und durch das LacZ-Reportergen und die *neo*-Kassette ersetzt („Knock-in“), so dass das Exon 3 und Exon 4 hierdurch ersetzt werden. Die Einfügung des LacZ-Reportergens stromabwärts des 5'-homologen Bereichs führt damit zum potentiellen Genprodukt eines Fusionsproteins aus der

durch Exon 1 und 2 kodierten cytosolischen Cytochrom-b5-Domäne des FA2H-Proteins und der  $\beta$ -Galaktosidase anstelle des kompletten FA2H-Proteins (Cyt-b5- $\beta$ -gal).

Nach der Transfektion von ES-Zellen mit dem Austauschvektor pIZ1-LacZ entstanden im Falle einer homologen Rekombination ES-Zellklone, die sowohl gegen G418 als auch gegen Ganciclovir resistent waren. In diesen ES-Zellklonen war ein Allel genomisch in dem FA2H-Lokus wie in Abb. 4-3 dargestellt mutiert.

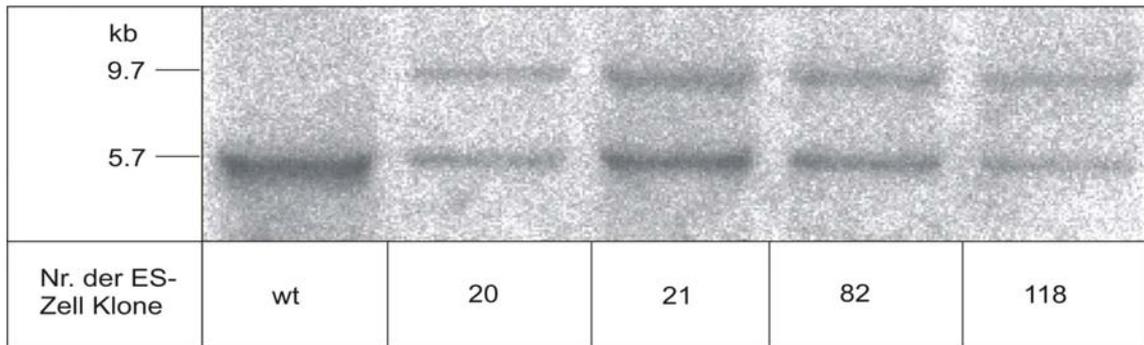


**Abb. 4-3: Homologes Rekombinationsschema in den WT-Lokus des FA2H-Gens von ES-Zellen**

Abgebildet sind der FA2H-WT-Lokus, der Austauschvektor pIZ1-LacZ und der FA2H-Lokus nach der homologen Rekombination. Die Exons sind als schwarze Boxen dargestellt, die LacZ/neo-Kassette und das Thymidin-Kinase-Gen als weiße Boxen. Eingezeichnet sind zudem die 3'-Sonde, die zur Durchführung der Southern-Blot Hybridisierung verwendet wurde und die hierfür benötigten Schnittstellen für das Restriktionsenzym BglIII.

Zur Charakterisierung homolog rekombinierter ES-Zellklone wurde aus Klonen, die die Selektion mit G418 und Ganciclovir überlebt hatten, DNA isoliert und per PCR zum Nachweis der homologen Rekombination analysiert (Abbildung nicht gezeigt). Die PCR-positiven Klone wurden einer Southern-Blot-Hybridisierung mit einer 3'-externen Sonde nach BglIII-Spaltung unterzogen, wobei das heterozygot vorliegende Wildtyp-Allel ein 5,7 kb Fragment und das homolog rekombinierte Allel FA2H-Knock-Out ein 9,7 kb Fragment ergeben sollte (siehe Abb. 4-4). Durch Verwendung einer externen Sonde, die homolog zu einem Bereich des FA2H-Gens ist, der sich außerhalb der Zielsequenz des Austauschvektors befindet, wurde verhindert, dass auch Abschnitte des Genoms getestet wurden, in die der Vektor unspezifisch (nicht homolog) integriert wurde.

Insgesamt wurden 150 ES-Zellklone isoliert, von denen 4 aufgrund der Ergebnisse der PCR-Analyse homolog rekombiniert waren, was für alle 4 Klone mittels der Southern-Blot-Hybridisierung bestätigt werden konnte (siehe Abb. 4-4).



**Abb. 4-4: Überprüfung der homologen Rekombination mittels Southern-Blot-Hybridisierung**

Southern-Blot-Hybridisierung. Bei 4 der 150 analysierten ES-Zellklone konnte in der PCR-Analyse das homolog rekombinierte Allel nachgewiesen werden. Die genomische DNA dieser Klone wurde mit BglII-Verdaut und einer Southern-Blot-Hybridisierung mit einer externen 3'-Sonde unterzogen. Alle 4 Klone zeigten die für die heterozygote Situation erwarteten zwei Fragmente des homolog rekombinierten Allels (9,7 kb) und des Wildtyp-Allels (5,7 kb).

Die Anzahl vorhandener Chromosomen wurde in zweien dieser ES-Zellklone, die in der Southern-Blot-Hybridisierung als homolog rekombiniert nachgewiesen werden konnten, untersucht und für beide konnte ein Anteil der Zellen mit vollständigem Chromosomensatz ( $n = 40$ ) von etwa 70% gezeigt werden. Dies entspricht den erwarteten Werten für die Karyotypanalyse.

### 4.1.3 Generierung FA2H-defizienter Mäuse

Nachdem verschiedene ES-Zellklone positiv auf homologe Rekombination des Austauschvektors pZ1-LacZ in den FA2H-WT-Lokus getestet werden konnten, wurden aus dem ES-Zellklon Nr. 20 mittels Injektion in C57BL/6-Blastozysten chimäre Mäuse erzeugt. Die Generierung der chimären Mäuse wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmer und dem HET (Haus für experimentelle Therapie der Universität Bonn) durchgeführt. Es konnten 4 männliche hochchimäre Nachkommen erzeugt werden. Ein Beispiel für ein chimäres Tier ist in Abb. 4-5 gezeigt. Die männlichen Chimären wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Drei der 4 Chimären zeigten Keimbahntransmission, was am agoutifarbenen Fell der Nachkommen zu erkennen war. Aufgrund der Injektion von HM1-ES-Zellen in C57BL/6 Blastozysten und der anschließenden Verpaarung mit C57BL/6 Mäusen entstanden Nachkommen mit einem gemischten Stammhintergrund. Diese Nachkommen bildeten die Grundlage für alle weiteren Verpaarungen. Die hier gezeigten Analysen wurden daher mit Tieren mit gemischtem Hintergrund durchgeführt. Parallel wurde eine Rückkreuzung auf C57BL/6-Hintergrund begonnen, um einen reinen Stammhintergrund zu erreichen. Damit sollten dann Effekte durch einen gemischten Stammhintergrund ausgeschlossen sein.

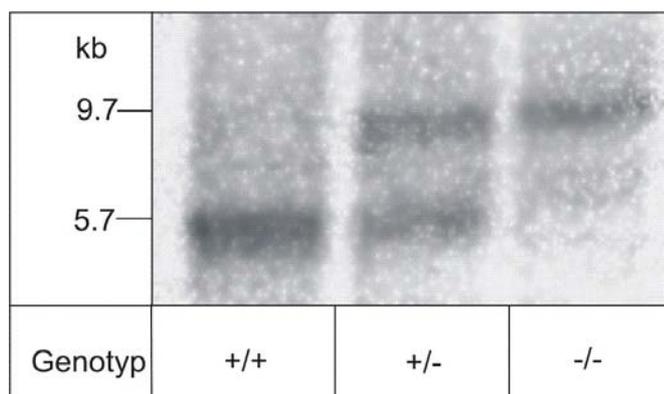


**Abb. 4-5: Beispiel einer chimären Maus**

Gezeigt ist eine chimäre Maus mit einem Chimärismusgrad von etwa 70%, die aus HM1-ES-Zellen und C57BL/6 Blastozysten entstand. Die Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen brachte agouti-farbene Nachkommen hervor.

Der Genotyp der Nachkommen aus den Verpaarungen der chimären Mäuse wurde mit Hilfe einer 3-Primer PCR ermittelt. Bei dieser entstand eine FA2H-Knock-Out-spezifische Bande auf der Grundlage eines Sense-Primers, welcher homolog zu einem Sequenzabschnitt der *neo*-Kassette ist und eines Antisense-Primers mit Homologie zu einer FA2H-Gensequenz im 3'-Bereich des FA2H-Lokus. Dieser Antisense-Primers wurde auch zur Amplifikation der Wildtyp-Bande in Kombination mit einem Sense-Primer homolog zur FA2H-Wildtyp-Sequenz verwendet. Für das Wildtyp-Allel entsteht ein Amplikon der Größe 1045 bp. Das FA2H-Knock-Out-Allel ist vorhanden, wenn mit dieser PCR ein 685 bp Amplikon entsteht (Daten nicht gezeigt).

Eine Überprüfung der mittels der PCR-Analyse genotypisierten Mäuse durch eine Southern-Blot-Hybridisierung mit der externen Sonde, wiederum nach BglII-Verdau der genomischen DNA, konnte die Ergebnisse der PCR-Analyse bestätigen (siehe Abb 4-6).



**Abb. 4-6: Southern-Blot-Hybridisierung genomischer BglII-Verdauter DNA aus Mausschwänzen mit externer 3'-Sonde**

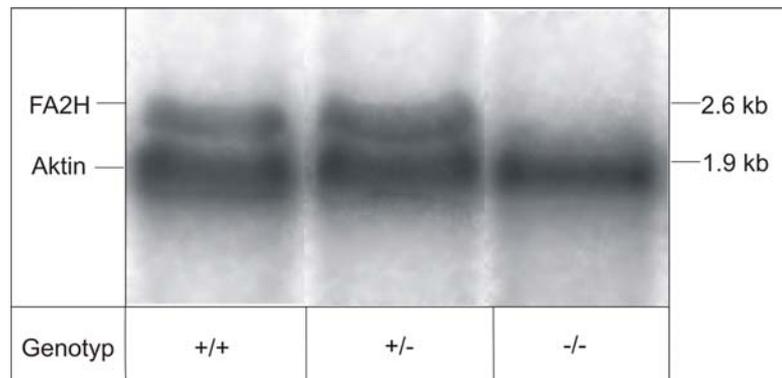
Genomische DNA wurde aus den Mausschwänzen verschiedener Nachkommen der chimären Mäuse gewonnen. Die BglII-Verdauter DNA wurde einer Southern-Blot-Hybridisierung mit der externen 3'-Sonde wie für die Analyse der ES-Zellklone unterworfen. Alle möglichen Genotypen waren vorhanden. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+/del[LacZ]</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Die 3 möglichen Genotypen traten bei 165 ausgezählten Tieren entsprechend den Mendelschen Regeln verteilt auf: 37 Wildtyp-Mäuse, 83 heterozygote Mäuse und 45 FA2H-Knock-Out-Mäuse.

## 4.2 Expressionsanalysen an Mäusen mit mutierten FA2H-Allelen

### 4.2.1 Nachweis der fehlenden Expression der mRNA für FA2H

Die Abwesenheit der Expression des FA2H-Gens in den Mäusen wurde zunächst auf der RNA-Ebene mittels Northern-Blot-Hybridisierung kontrolliert (siehe Abb. 4-7). Die dafür eingesetzte Sonde war komplementär zu den Exons 3 und 4 der FA2H-mRNA, die im hergestellten „Knock-in“ durch die LacZ/neo-Kassette ersetzt sein sollten. Damit sollte bei FA2H-Knock-Out Mäusen kein Signal im Northern-Blot zu erkennen sein. Die Wildtyp-Mäuse und die Mäuse, die nur ein mutiertes FA2H-Allel tragen, sollten hingegen eine Bande bei 2,6 kb aufweisen.



**Abb. 4-7: Nachweis der Abwesenheit des FA2H-Gens in FA2H-Knock-Out-Mäusen mittels Northern-Blot-Hybridisierung**

Die Sonde war komplementär zur mRNA-Sequenz der Exons 3 und 4. Die gleichzeitige Hybridisierung mit einer  $\beta$ -Aktin-Sonde diente als interne Kontrolle der Gleichmäßigkeit der Beladung. Je Genotyp wurden 3 Tiere analysiert. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+/del[LacZ]</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Zur Analyse wurde die RNA aus den Gehirnen von 4 Wochen alten Mäusen isoliert. Je Genotyp wurden 3 verschiedene Tiere untersucht. Die Northern-Blot-Hybridisierung erfolgte zeitgleich mit der FA2H-Sonde und einer Sonde, die komplementär zu  $\beta$ -Aktin war, um eine Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung einbeziehen zu können.

In Abb. 4-7 ist zu erkennen, dass sowohl in der Wildtyp-Mäusen als auch bei heterozygoten Mäusen die FA2H-Sonde an die komplementären Sequenzen in der RNA hybridisieren konnte, während diese Sequenzen in der RNA von Mäusen mit 2 mutierten FA2H-Allelen

nicht vorhanden waren. Eine Abschwächung des Signals in heterozygoten Mäusen wäre zu erwarten gewesen, konnte jedoch in dieser Analyse nicht beobachtet werden.

Das Fehlen der FA2H-mRNA-Expression wurde zudem *in situ* an Gefrierschnitten des Gehirns adulter Mäuse mit Hilfe einer *In-situ*-Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde der gleichen Sequenz, wie sie für die Northern-Blot-Hybridisierung verwendet wurde, nachgewiesen (siehe 4.2.2.1 und Abb. 4-8).

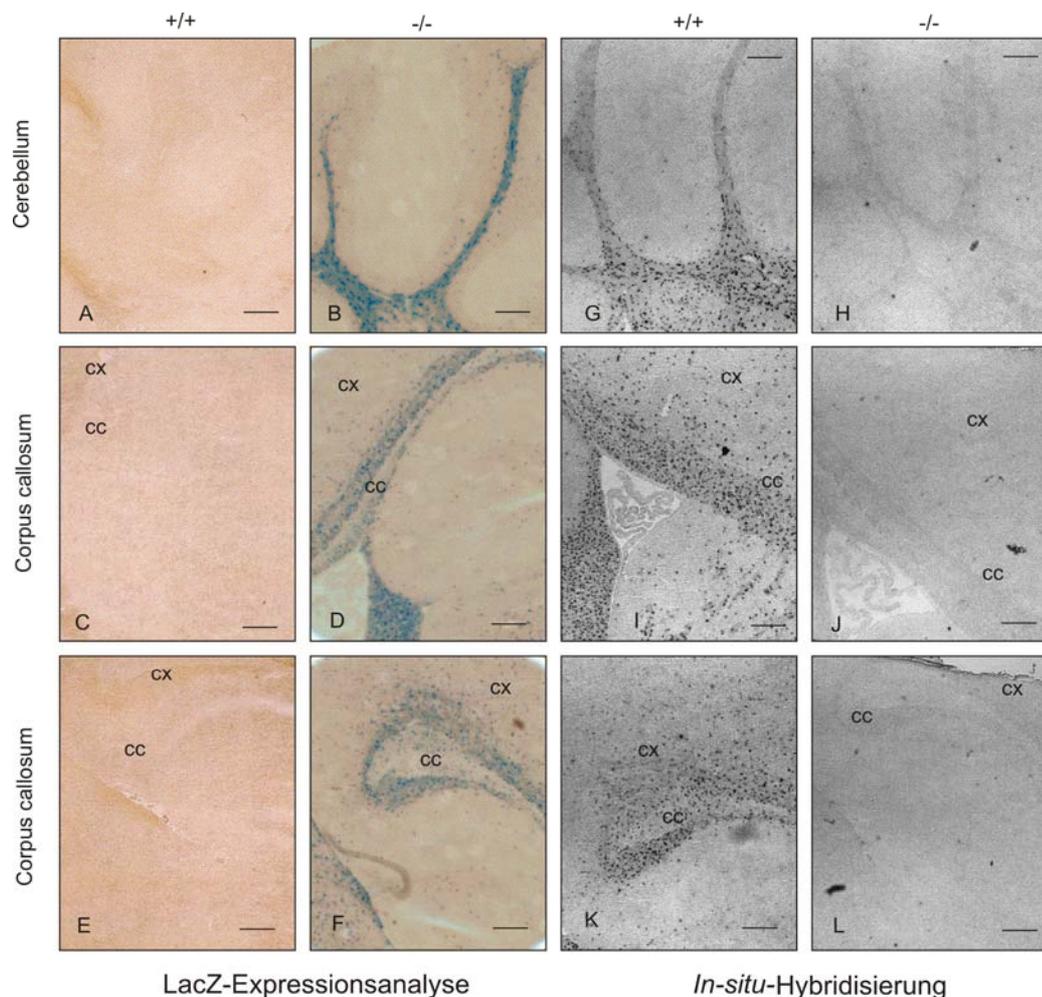
## **4.2.2 Expressions-Analysen der FA2H durch Detektion des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal**

Durch die Verwendung eines Austauschvektors, der ein Reportergen enthielt, konnte die Expression dieses Reportergens dazu genutzt werden, Daten über die Expression des FA2H-Gens in verschiedenen Geweben der Maus zu erhalten. Zellen die normalerweise FA2H exprimieren, sollten in Mäusen, die mindestens ein mutiertes FA2H-Allel tragen, nun anstelle des FA2H-Proteins das Fusionsprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal, bestehend aus der cytosolischen Cytochrom-b5-Domäne der FA2H und dem LacZ-Reporterprotein, exprimieren.

### **4.2.2.1 Expression des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal im Gehirn im Vergleich zur Expression der FA2H-mRNA im Gehirn**

Aus vorhergehenden Analysen war bereits bekannt, dass FA2H im Gehirn von Mäusen exprimiert wird. Um die Übereinstimmung der Expression des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal mit der eigentlichen Expression des nativen FA2H-Proteins zu überprüfen, wurden 2 Verfahren der Expressionsanalyse verglichen: Zum einen die  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion und zum anderen die bereits etablierte *In-situ*-Hybridisierung. Die  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion ergibt ein Signal in Zellen, in denen normalerweise das FA2H-Protein exprimiert wird, in den mutierten Mäusen nun jedoch das Fusionsprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal. Bei der *In-situ*-Hybridisierung ist ein Signal in Zellen zu erwarten, die die FA2H-mRNA exprimieren, und zwar die mRNA, die noch die Exons 3 und 4 enthält, da die DIG-markierte Sonde gegen diese Exons gerichtet ist. Diese Situation ist in Wildtyp-Mäusen gegeben, jedoch nicht in der FA2H-Knock-Out-Maus.

Für die Analysen wurden Gefrierschnitte des Gehirns von 4 Wochen alten Mäusen unterschiedlicher Genotypen den verschiedenen Verfahren ausgesetzt und das Signalmuster der entsprechenden Hirnregionen verglichen (siehe Abb. 4-8).



**Abb. 4-8: Vergleichende Expressionsanalyse im Gehirn 4 Wochen alter Mäuse**

Gezeigt sind im Vergleich die Expressionsanalysen auf das Fusionsprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal (A-F) und auf die Wildtyp-mRNA der FA2H (G-L). Die Analysen wurden jeweils an 12  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten des Gehirns 4 Wochen alter Mäuse durchgeführt. Abgebildet sind Bereiche des Kleinhirns und des Corpus Callosum, von denen bekannt war, dass in ihnen FA2H exprimiert wird. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>, cc= Corpus Callosum, cx= Cortex. Balken entsprechen 200  $\mu$ m.

Die funktionelle Expression des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins stimmt mit dem bereits bekannten Expressionsmuster der FA2H-mRNA überein. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass in den jeweiligen Kontrollschnitten von Gehirnen von Wildtyp-Mäusen keine LacZ-Färbereaktion erkennbar ist. Die *In-situ*-Hybridisierung mit einer DIG-markierten RNA-Sonde, die gegen die Exons 3 und 4 gerichtet ist, zeigt im Wildtyp-Gehirn das erwartete Expressionsmuster für FA2H, während in den Knock-out-Geweben kein Signal erkennbar war. Die sense-Kontrolle für die *In-situ*-Hybridisierung zeigte kein erkennbares Signal.

Diese vergleichende Analyse unterstützte die Vermutung, dass ein Nachweis der Cyt-b5- $\beta$ -gal Aufschluss über die Expression des FA2H-Proteins geben kann.

#### 4.2.2.2 Entwicklungsabhängige Expression des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal in verschiedenen Geweben

In früheren Northern-Blot-Analysen wurde FA2H-Expression in unterschiedlichen Geweben gefunden. Auf dieser Grundlage wurden verschiedene Gewebe von Wildtyp-Mäusen und von Mäusen mit einem oder zwei mutierten FA2H-Allelen einiger Altersstufen einer LacZ-Färbereaktion unterzogen. Mit dieser Analyse sollte nähere Einsicht in die Verteilung der FA2H-Expression auf die unterschiedlichen Zelltypen in den Organen und in die zeitliche Entwicklung der Expression gewonnen werden.

12  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte von 1 bis 4 Wochen alten Mäusen wurden von folgenden Organen angefertigt: Gehirn, Niere, Magen, Haut und Milz. Auf die Färbungen in der Haut wird in einem späteren Abschnitt noch eingegangen werden. Die Milz wurde als ein Organ zu der Analyse herangezogen, in dem laut Northern-Blot-Analyse keine FA2H-Expression zu erwarten war. Die Gefrierschnitte wurden einer LacZ-Färbereaktion unterzogen und damit auf das Vorkommen des Reporterfusionsproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal untersucht (siehe Abb. 4-9).

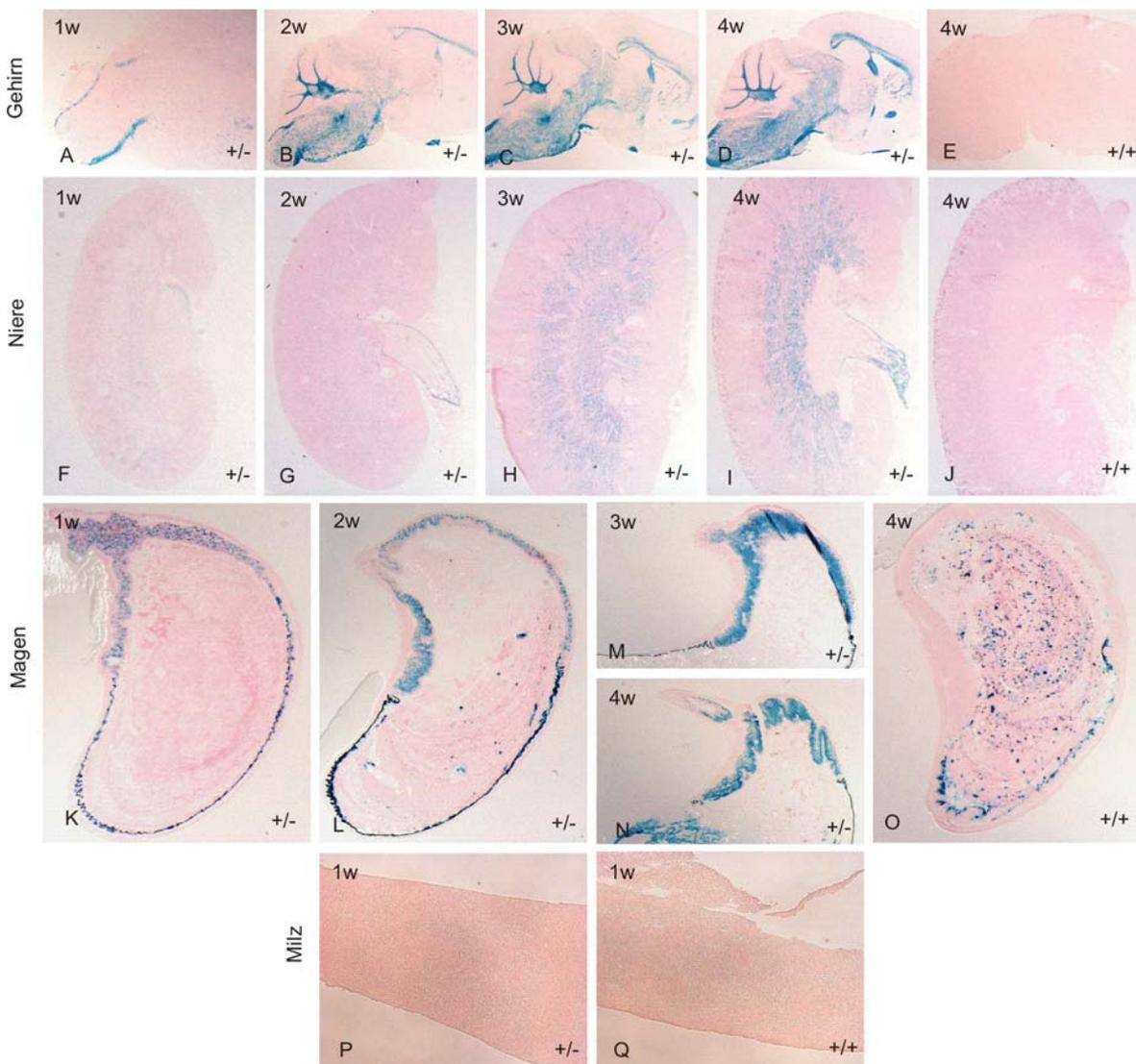


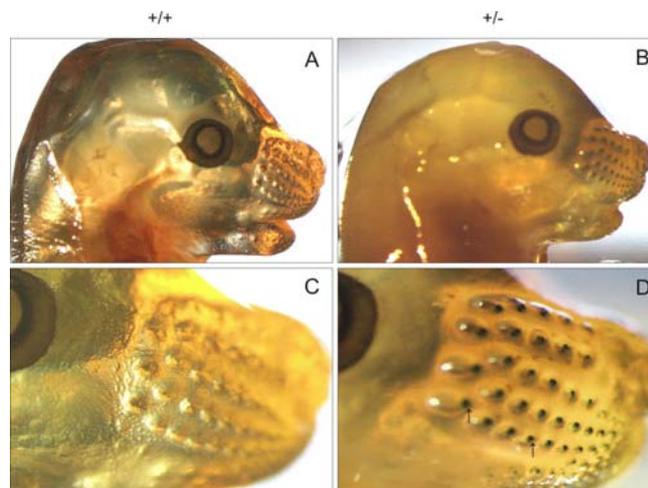
Abb. 4-9: Expression des Reporterfusionsproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal an Gefrierschnitten verschiedener Organe

Verschiedene Altersstufen unterschiedlicher Organe wurden der LacZ-Färbereaktion unterzogen und mit Eosin gegengefärbt. A-E: Gefrierschnitte des Gehirns; F-J: Gefrierschnitte der Niere; K-O: Gefrierschnitte des Magens; P-Q: Gefrierschnitte der Milz.  $+/+$  = FA2H<sup>+/+</sup>  $+/-$  = FA2H<sup>+/-del[LacZ]</sup>, w = Woche.

In allen Organen, die eine FA2H-Expression im Northern-Blot gezeigt hatten, finden sich Signale des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins in Gewebeschnitten von Mäusen mit einem mutierten FA2H-Allel. Die Wildtyp-Kontrollen und die Gewebeschnitte der Milz sind nicht gefärbt. Im Gehirn sind vor allem Bereiche der weißen Substanz gefärbt. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalyse auf der Grundlage von *In-situ* Experimenten überein (Eckhardt et al., 2005). Die Niere zeigt Färbungen in der Markregion. Beim Magen kann man zweierlei Färbungen erkennen: Zum Einen sind die Wand des Drüsenmagens und die äußeren Schichten der Wand des Vormagens spezifisch in mutierten Geweben, die ein Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterprotein anstelle des FA2H-Proteins exprimieren, blau gefärbt. Zum Anderen ist in allen analysierten Magengefrierschnitten eine unspezifische LacZ-Färbung in inneren Bereichen der Wand des Vormagens und von Teilen des Mageninhalts zu beobachten.

Für alle gezeigten Gewebe, die eine Expression des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins aufwiesen, gilt, dass die Stärke des Signals im Laufe der Entwicklung zunimmt. Dies ist besonders gut beim Gehirn und bei der Niere zu erkennen.

Zusätzlich zu den Gefrierschnitten verschiedener Gewebe wurden außerdem ganze Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien einer LacZ-Färbereaktion unterworfen. Dabei wurden die Embryonen der Stadien 12,5 dpc, 14,5 dpc und 16,5 dpc analysiert. Zur Analyse kamen Wildtyp-Embryonen und Embryonen, die ein mutiertes FA2H-Allel trugen (siehe Abb. 4-10). Die Genotypisierung dieser Embryonen wurde auf der genomischen DNA, die aus der Embryonalhülle gewonnen wurde, durchgeführt.



**Abb. 4-10:  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion an ganzen Embryonen des Entwicklungsstadiums dpc 16,5**

Gezeigt ist ein Bildausschnitt der Embryonen nach LacZ-Färbereaktion, Entwässerung und Bleichung. A und C = FA2H-Wildtyp; B und D = FA2H heterozygote Embryonen. C und D zeigen jeweils eine Vergrößerung eines Bildausschnittes aus A bzw. B.  $+/+$  = FA2H<sup>+/+</sup>  $+/-$  = FA2H<sup>+/-del[LacZ]</sup>.

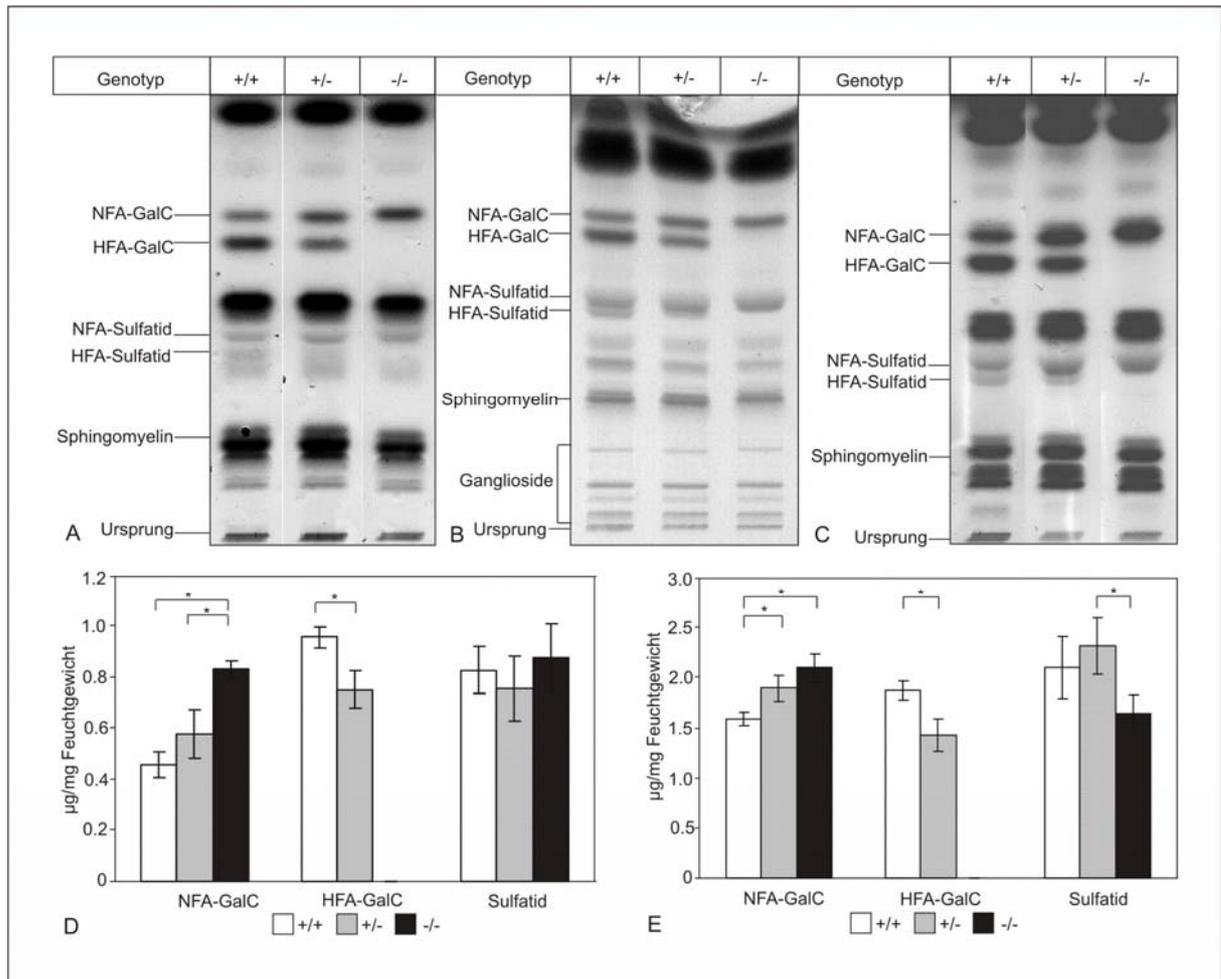
Mit der durchgeführten Methode konnte erst ab einem Entwicklungsstadium von dpc 16,5 eine blaue Färbung in FA2H<sup>+del[LacZ]</sup> Embryonen beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Ursprungspunkte der Tasthaare ein deutliches Signal, während in den FA2H<sup>+/+</sup> Embryonen auch hier keine Färbung zu erkennen war. Frühere Entwicklungsstadien, die ebenfalls untersucht wurden, zeigten keine Expression des Cyt-b5-β-gal Reporterproteins.

### **4.3 Biochemische Analysen an FA2H-Knock-Out-Mäusen**

Nachdem der Nachweis erfolgt war, dass die mRNA der FA2H nicht länger in FA2H-Knock-Out-Mäusen gebildet wird, wurden zur Überprüfung der Effekte des Knock-Outs des FA2H-Gens auf biochemischer Ebene die Lipide und Proteine des Nervensystems entsprechenden Analysen unterzogen.

#### **4.3.1 Analyse der Sphingolipidzusammensetzung im Nervensystem**

Frühere Versuche mit verschiedenen Zelllinien legten die Vermutung nahe, dass die FA2H für die α-Hydroxylierung von Sphingolipiden verantwortlich ist. Um zu überprüfen, welchen Effekt das Ausschalten des Enzyms auf die Zusammensetzung der Sphingolipide im Nervensystem hat, wurden die Lipide des Gesamtgehirns und die Lipide des Ischiasnervs analysiert. Das Gehirn wurde als repräsentativer Teil des zentralen Nervensystems herangezogen, der Ischiasnerv diente als repräsentativer Teil des peripheren Nervensystems. Für die Analyse wurden je Genotyp 3 verschiedene Tiere der Altersstufe 4 Wochen verwendet, um eine quantitative Auswertung der vorhandenen Lipidmengen möglich zu machen. Nach Isolierung der Lipide wurden diese zunächst mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe Abb. 4-11). Als Vergleiche für das unterschiedliche Laufverhalten der einzelnen Lipidspezies dienten kommerziell erwerbliche Lipidstandards. Um verschiedene Lipidarten auftrennen zu können, wurde zum Teil mit unterschiedlichen Laufmitteln gearbeitet, so dass sowohl die Glykosphingolipide als auch die Ganglioside untersucht werden konnten.



**Abb. 4-11: Analyse der Sphingolipide des Nervensystems 4 Wochen alter Mäuse**

Analysiert wurden die Gesamtlipide des Gehirns (A), die verseiften Lipide des Gehirns (B) und die Gesamtlipide, die aus dem Ischiasnerv isoliert wurden (C). Die Dünnschichten wurden auf HPTLC Kieselgel 60 Platten aufgetragen und stellen je Genotyp ein repräsentatives Beispiel der Lipidzusammensetzung dar. Insgesamt wurden je Genotyp  $n = 3$  Tiere analysiert. Als Laufmittel für A und C wurde das Laufmittel DC Laufmittel Sphingolipide verwendet; das Laufmittel für B entspricht dem DC Laufmittel Ganglioside. Abb. D stellt die quantitative Auswertung der verseiften Sphingolipide des Gehirns dar. In Abb. E ist die quantitative Auswertung der Gesamtlipide des Ischiasnervs zu sehen. Die Fehlerbalken stellen die sich ergebende Standardabweichung dar. Ein Stern signalisiert einen statistisch signifikanten Unterschied (T-Test,  $p < 0,05$ ). +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+del[LacZ]</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>, NFA-GalC = nicht- $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid, HFA-GalC =  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid, NFA-Sulfatid = nicht  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid, HFA-Sulfatid =  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid.

Die Analyse der Lipide per Dünnschichtchromatographie ließ Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zwischen Wildtyp und FA2H-Knock-Out-Mäusen erkennen. Die Mäuse, die keinerlei intaktes FA2H-Gen mehr besitzen, wiesen keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide mehr auf: In den Dünnschichten waren  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid und  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid in Geweben aus FA2H-Knock-Out-Mäusen nicht mehr zu sehen. Die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatographien von jeweils 3 verschiedenen Tieren je Genotyp zeigte einen Anstieg in der Menge des nicht-hydroxylierten

Galaktosylceramid in FA2H-Knock-Out-Mäusen. Dies galt sowohl für das zentrale als auch das periphere Nervensystem. Die Menge an nicht-hydroxyliertem Sulfatid scheint in FA2H-Knock-Out-Mäusen ebenfalls anzusteigen. Eine quantitative Auswertung der einzelnen Sulfatid-Banden war jedoch aufgrund der nicht genügenden Auflösung nicht möglich. Die Quantifizierung der gesamten Sulfatidmenge ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Mengen und die Zusammensetzung der Ganglioside scheint unverändert.

Bereits bei heterozygoten Mäusen waren erste Veränderungen in der Menge der vorhandenen Sphingolipide zu sehen. In allen hier analysierten Geweben kam es zu einer signifikanten Reduktion der Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid. Die Menge an nicht-hydroxyliertem Galaktosylceramid stieg wie im Knock-Out an, dieser Anstieg war in der Analyse jedoch nur für den Ischiasnerv statistisch signifikant. Die Gesamtmenge für Sulfatid war im heterozygoten Zustand ebenfalls weitgehend unverändert. Die Dünnschichten ließen jedoch auch hier einen Anstieg für die nicht-hydroxylierte Form und eine Reduktion für die  $\alpha$ -hydroxylierte Form erkennen.

Um auszuschließen, dass noch kleinste Mengen an  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden in FA2H-Knock-Out-Mäusen gebildet werden, die sich der Sensitivität der Dünnschichtchromatographie-Analyse entziehen, wurde eine DE MALDI-TOF-Analyse durchgeführt. Diese verfügt über eine deutlich höhere Empfindlichkeit als die Dünnschichtchromatographie und sollte auch geringste Spuren verschiedener Lipidspezies nachweisen können. Für diese Analyse wurden die verseiften Lipide des Gehirns von 4 Wochen alten Wildtyp und FA2H-Knock-Out-Mäusen herangezogen. Es wurden wiederum jeweils 3 verschiedene Tiere untersucht. Es ergaben sich Spektren, die in Abb. 4-12 beispielhaft dargestellt sind.

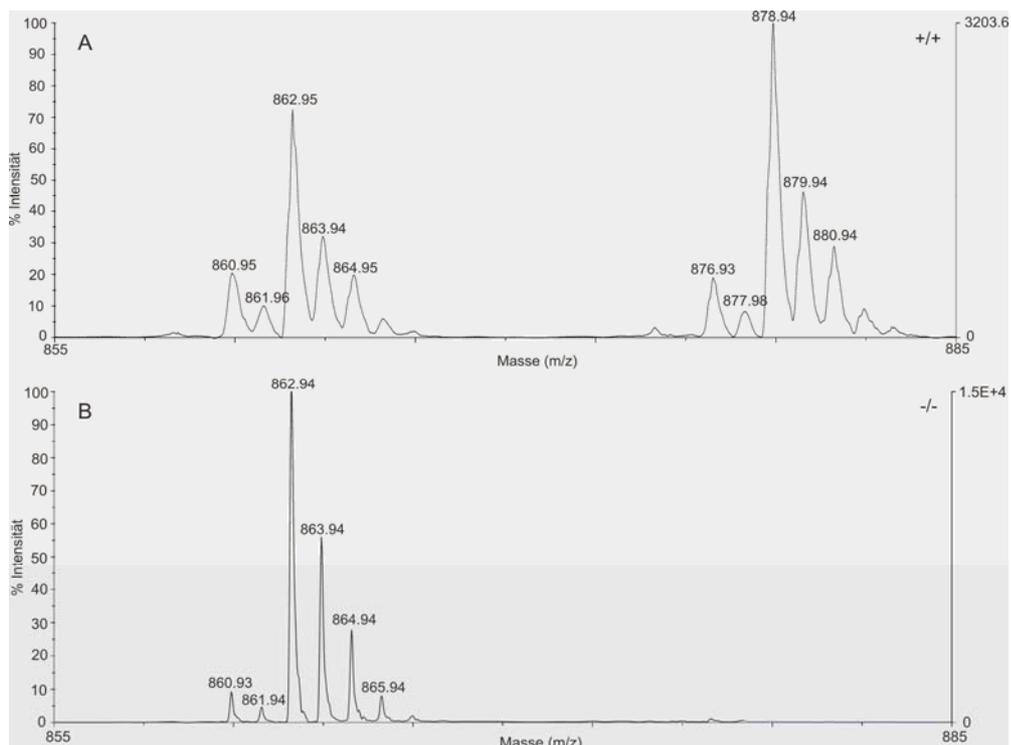


Abb. 4-12: DE-MALDI-TOF Massen-Spektrum der verseiften Lipide aus dem Gehirn

Die verseiften Lipide, die aus den Gehirnen 4 Wochen alter Mäuse isoliert wurden, wurden einer DE MALDI-TOF-Analyse im negativen Ionenmodus unterworfen, um Sulfatide zu detektieren. Dargestellt sind die Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ). Abb. A zeigt das Spektrum einer Wildtyp-Probe, Abb. B das Spektrum einer FA2H-Knock-Out-Probe. Der Peak bei 862.94 entspricht einem Sulfatid-Derivat mit einer C-24-Fettsäure, welches keine  $\alpha$ -Hydroxylierung trägt. Der Peak bei 878.94 korrespondiert zum entsprechenden  $\alpha$ -hydroxylierten Derivat.  $+/+$  = FA2H<sup>+/+</sup>,  $-/-$  = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

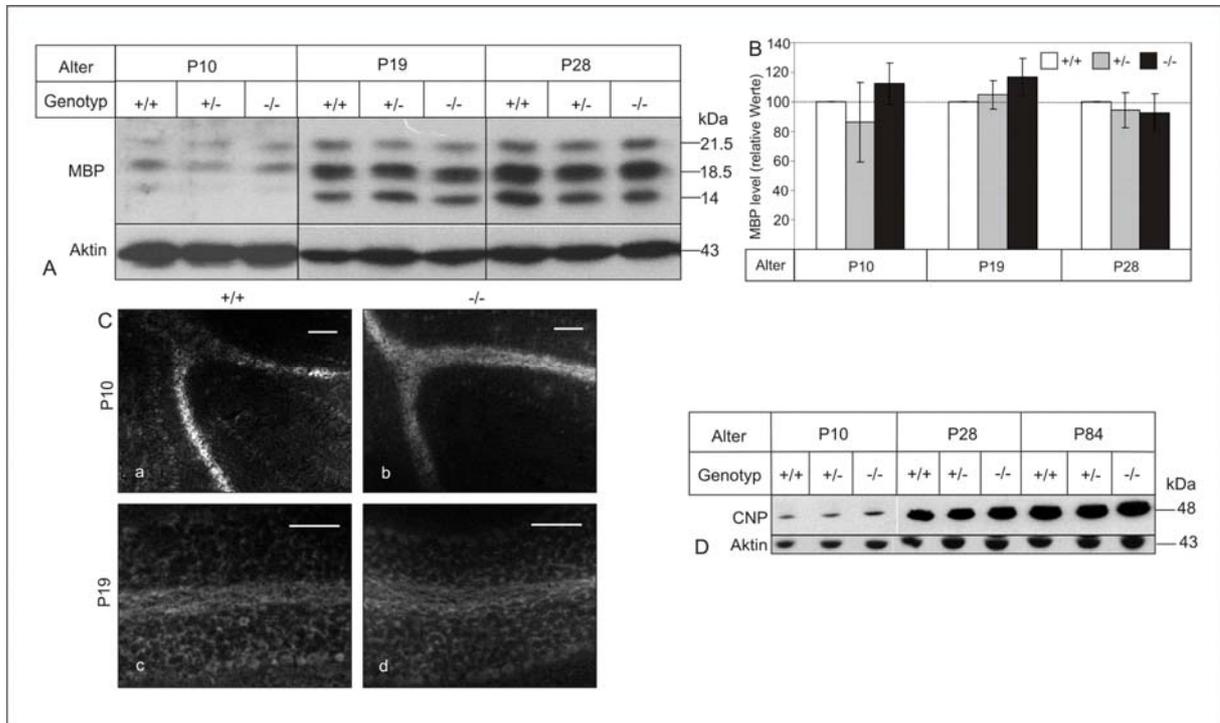
Das Spektrum der Lipide, die aus Wildtyp-Gewebe isoliert wurden, zeigt typische Massenpeaks für Sphingolipide und bei einer Masse + 16 Dalton die korrespondierenden Massenpeaks der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide. Im Spektrum der FA2H-Knock-Out-Gewebe sind die Massenpeaks für die nicht-hydroxylierten Sphingolipide ebenfalls zu erkennen. Im Bereich des Spektrums, der + 16 Dalton von diesen Peaks entfernt ist, sind keine Massenpeaks, die durch  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide hervorgerufen würden, zu detektieren. Als Beispiel seien die Peaks bei 862.94 ( $m/z$ ) und 878.94 ( $m/z$ ) herangezogen. Der erste entspricht einem nicht-hydroxylierten Sulfatid-Derivat mit einer C-24-Fettsäure. Dieser ist in beiden Spektren zu sehen, während der Peak bei 878.94 ( $m/z$ ) lediglich im Spektrum der Wildtyp-Proben auftritt. Dieser Peak korrespondiert zum  $\alpha$ -hydroxylierten Sulfatid-Derivat mit einer C-24-Fettsäure.

### 4.3.2 Analyse Myelin-assoziiierter Proteine im Gehirn

Mit der Lipidanalyse konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen des Enzyms FA2H zu einer Veränderung des Sphingolipidmusters im Nervensystem führt. Da die Sphingolipide einen großen Anteil der Masse des Myelins ausmachen, kann man an dieser Stelle feststellen, dass die Zusammensetzung des Myelins von FA2H-Knock-Out-Mäusen anders ist als diejenige von Wildtyp-Mäusen. Es galt nun herauszufinden, ob neben den direkten Produkten des Enzyms auch weitere Komponenten an den Orten der Expression der FA2H verändert sind. Die Untersuchung war darauf ausgelegt zu analysieren, ob eine derart veränderte Myelinzusammensetzung Einfluss auf weitere Faktoren hat. Da FA2H im Gehirn vor allem in Strukturen der weißen Substanz exprimiert wird, wurden myelinrelevante Marker genauer untersucht, um festzustellen, ob sich hier Veränderungen ergeben, die auf eine Veränderung der Myelinisierung oder der Aufrechterhaltung des Myelins schliessen lassen könnten.

Als Marker für ausdifferenzierte Oligodendrozyten wurden die Expressionslevel des MBP (Myelin basisches Protein) herangezogen. Zum Einen erfolgte eine Western-Blot-Analyse des Homogenats aus dem gesamten Gehirn von Mäusen verschiedener Entwicklungsstufen. Zum Anderen wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse an Gefrierschnitten von Mäusen durchgeführt. Je verwendetem Genotyp und verwendeter Altersstufe wurden 3 verschiedene Tiere untersucht (siehe Abb. 4-13, A-C).

Zusätzlich wurde mit CNPase ein weiteres Protein analysiert, dessen Expression weitgehend auf das Myelin beschränkt ist. Bei dieser Analyse wurden die Proteinlevel je eines Tieres je Genotyp und Alter bestimmt (siehe Abb. 4-13, D). Die Western-Blot-Analysen wurden gleichzeitig mit  $\beta$ -Aktin zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung durchgeführt.



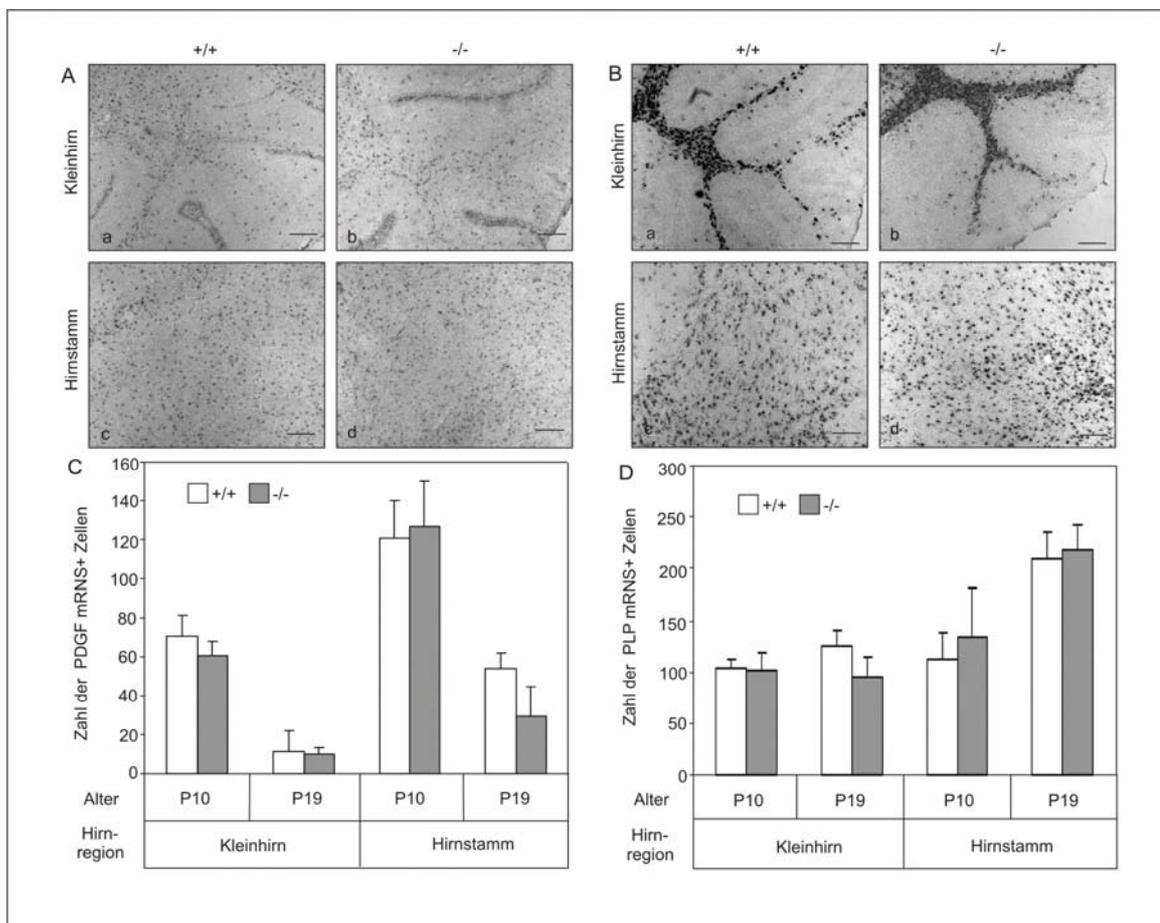
**Abb. 4-13: Expressionsanalyse Myelin-assoziiertes Proteins des Gesamtgehirns**

Dargestellt sind Western-Blot-Analysen (A und D) und eine Immunfluoreszenz-Analyse (C). Abb. A und B zeigen die Western-Blot-Analyse für MBP im Gesamtgehirn (A) und deren quantitative Auswertung (B) für  $n = 3$  verschiedene Tiere mit Fehlerbalken, die die sich ergebende Standardabweichung darstellen. Für diesen Versuch wurde der MBP-Antikörper 1:5000 verdünnt. Abb. C stellt ein repräsentatives Beispiel der Immunfluoreszenzanalyse für MBP am Gehirn dar, wobei der MBP-Antikörper in diesem Fall 1:1000 verdünnt wurde. In Abb. D ist das Ergebnis der Western-Blot-Analyse des Gesamtgehirns für CNP zu sehen (Antikörperverdünnung = 1:200). Beladung in A und D entspricht jeweils 50  $\mu$ g Protein. P = Tag postnatal, MBP = Myelin basisches Protein, CNP = 2',3'-zyklisches Nukleotid 3'-Phosphohydrolase, +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+/-</sup>, -/- = FA2H<sup>-/-</sup>, Balken in C = 200  $\mu$ m.

Die quantitative Auswertung der MBP-Proteinlevel im Gesamtgehirn zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen für die analysierten Altersstufen. Die Verteilung und Stärke des Immunfluoreszenzsignals für MBP an Wildtyp und FA2H-Knock-Out-Gefrierschnitten des Gehirns war vergleichbar. CNP als weiterer analysierter Marker für ausdifferenzierte Oligodendrozyten des nicht-kompaktierten Myelins zeigte ebenfalls keine Unterschiede in den Proteinlevels im Gesamtgehirn.

Neben der Analyse der Proteinlevel verschiedener Myelin-assoziiertes Marker wurde zudem die Expression weiterer Myelin-assoziiertes Proteine auf der Ebene der mRNA untersucht. Hierfür wurden Marker ausgewählt, die den Differenzierungsstatus der Oligodendrozyten

charakterisieren. Der PDGF- $\alpha$ -Rezeptor (platelet-derived growth factor, Plättchenwachstumsfaktor) gilt als Marker für Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, also einer Vorstufe für den Zelltyp der Oligodendrozyten, PLP (Proteolipid Protein) hingegen als Marker für differenzierte Oligodendrozyten. Für die folgende Analyse wurden Gefrierschnitte des Gehirns von 10 Tage und 19 Tage alten Mäusen einer *In-situ*-Hybridisierung mit der jeweiligen RNA-Gsonde für den entsprechenden Marker unterzogen. Anschließend wurden Bereiche der weißen Substanz wie das Kleinhirn und der Hirnstamm auf positive Zellen ausgezählt. Als positive Zellen galten dabei solche, die einen für die *In-situ*-Hybridisierung typischen Farbniederschlag unter dem Mikroskop erkennen ließen (siehe Abb. 4-14). Je Alter, Genotyp und RNA-Sonde wurden dafür jeweils Gefrierschnitte von 3 unterschiedlichen Tieren untersucht.



**Abb. 4-14: Analyse der Oligodendrozytendifferenzierung mittels *In-situ*-Hybridisierung für PLP und PDGF**

In A und B sind die Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung des Gehirns von 10 Tage alten Wildtyp und FA2H-Knock-Out-Mäusen mit PDGF- $\alpha$ -Rezeptor (A) und PLP (B) RNA-Gsonden beispielhaft dargestellt. C und D zeigen die Resultate der Auszählung PDGF- $\alpha$ -Rezeptor-mRNA positiver Zellen (C) bzw. PLP-mRNA positiver Zellen (D). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die sich bei der Auswertung von  $n = 3$  verschiedenen Tieren je Genotyp ergab. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede auszumachen. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>, Balken in A und B = 200  $\mu$ m.

Die Auszählung der PDGF- $\alpha$ -Rezeptor- bzw. PLP-mRNA positiven Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen FA2H<sup>+/+</sup> und FA2H-Knock-Out-Mäusen. Weder bei der Altersstufe P10, die als Beispiel für den Beginn der Myelinisierung gewählt wurde, noch bei der Altersstufe P19, die einen Status der aktiven Myelinisierung darstellen soll, konnten Unterschiede der Expression von PDGF- $\alpha$ -Rezeptor oder PLP festgestellt werden. Sowohl für Wildtyp- als auch für FA2H-Knock-Out-Gewebe konnte ein Abfallen der PDGF- $\alpha$ -Rezeptor-mRNA positiven Zellen mit zunehmendem Alter für beide analysierten Hirnregionen beobachtet werden. Die Zahl der PLP-mRNA positiven Zellen stieg hingegen mit der Zeit an. Dies gilt vor allem für den Hirnstamm, aber auch in gewissem Maße für das Kleinhirn. Auch dieser Effekt wurde gleichermaßen bei Wildtyp- und FA2H-Knock-Out-Geweben festgestellt.

## **4.4 Strukturelle und funktionelle Analyse des Myelins**

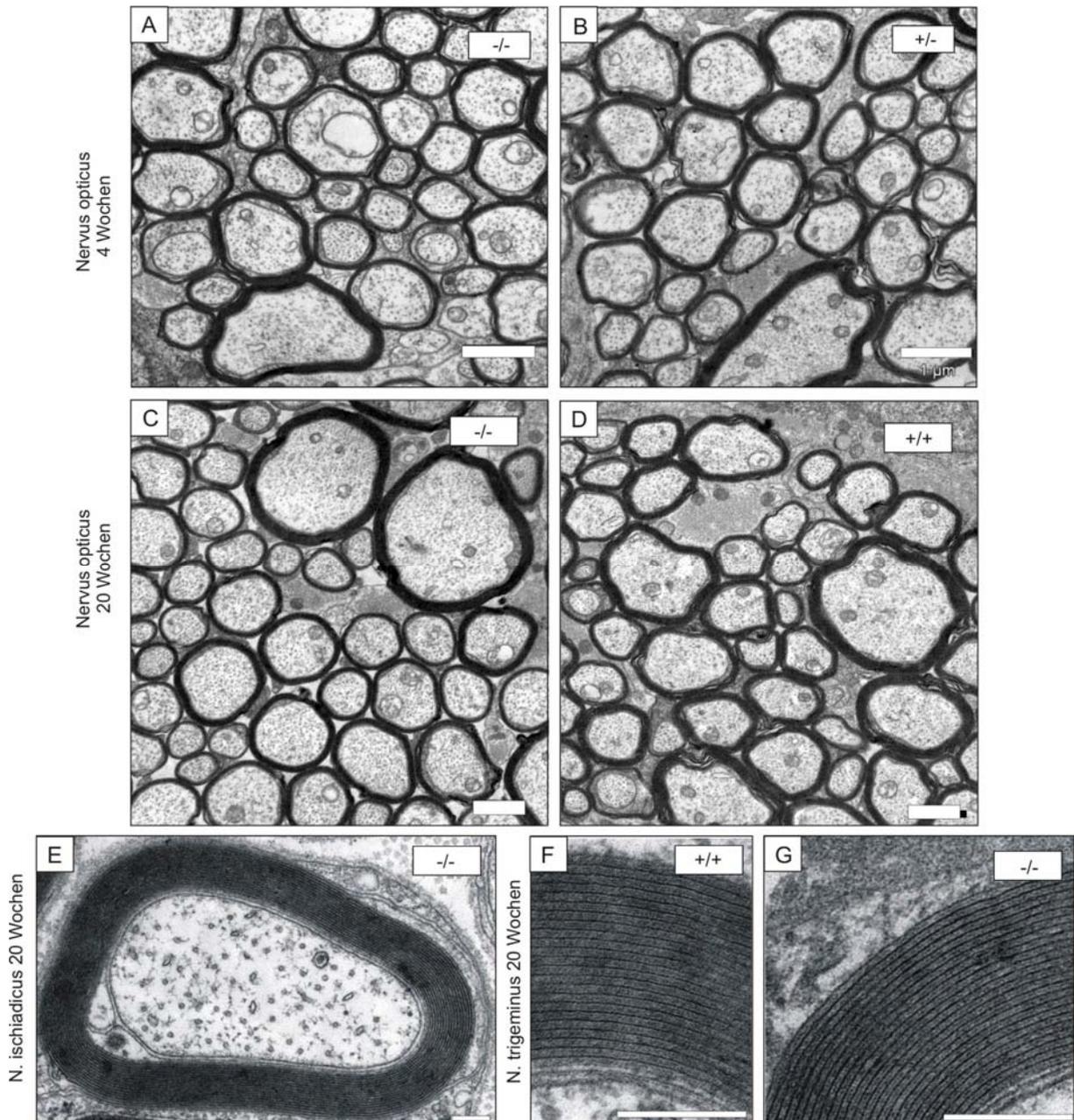
Da die Lipidanalyse eine deutliche Veränderung der Myelinzusammensetzung offenbarte, war nun der Frage nachzugehen, wie dieses veränderte Myelin in seiner Struktur und seiner Funktion beschaffen ist. Dafür wurden zum Einen elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Teile des Nervensystems angefertigt, um die Ultrastruktur analysieren zu können. Zum Anderen wurden unterschiedliche Verhaltenstests an den Mäusen durchgeführt, die Aufschluss über eventuelle Fehlfunktionen des Myelins geben sollten.

### **4.4.1 Elektronenmikroskopische Analyse des Nervensystems von FA2H-Knock-Out-Mäusen**

Die Untersuchung der Ultrastruktur sollte Aufschluss über die Kompaktierung der Myelinschichten geben. Zudem ist eine Analyse der Myelindicke in Bezug zum Axondurchmesser angezeigt. Es wurde gezeigt, dass bei Spezies, die keine  $\alpha$ -Hydroxylierung durchführen, keine lineare Beziehung zwischen dem Axondurchmesser und der Myelindicke besteht (Kishimoto, 1986). Wenn nun in den FA2H-Knock-Out-Mäusen die  $\alpha$ -Hydroxylierung ausbleibt, könnte auch hier dieser Zusammenhang verloren gehen.

Um die Myelinisierung untersuchen zu können, wurden 4 Wochen alte Mäuse analysiert. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Myelinisierung weitestgehend abgeschlossen sein. Wenn diese jedoch nicht akkurat abläuft, sollte es möglich sein, fehlerhafte Strukturen zu diesem Zeitpunkt zu erkennen, bevor sie eventuell wieder „repariert“ werden. Zur Analyse darauf, ob das Myelin normal erhalten bleibt, wurden 20 Wochen alte Mäuse herangezogen. Die Myelinisierung ist zu diesem Zeitpunkt komplett abgeschlossen und es gilt, die myelinisierten Strukturen aufrechtzuerhalten, um ihre Funktion auch über einen langen Zeitraum stabil

halten zu können. Die Aufrechterhaltung könnte aufgrund der veränderten Zusammensetzung mit Schwierigkeiten behaftet sein. Die Analyse der 4 Wochen alten Mäuse wurde mit 2 FA2H-Knock-Out-Tieren und einem heterozygoten Tier durchgeführt. Querschnitte des optischen Nervs sind in Abb. 4-15 A und B gezeigt. Zur Analyse der 20 Wochen alten Mäuse wurde jeweils 1 Tier je möglichem Genotyp verwendet. Abb. 4-15 C-G zeigen Querschnitte des optischen Nervs (C und D), des Ischiasnervs (E) und des Trigemiusnervs (F und G). Als Kontrollen dienten hier Wildtyp-Gewebe.



**Abb. 4-15: Elektronenmikroskopische Analyse des optischen Nervs und des Ischiasnervs**

A und B zeigen Querschnitte durch den optischen Nerv von 4 Wochen alten Mäusen. In C und D sind Querschnitte durch den optischen Nerv von 20 Wochen alten Tieren abgebildet. Der Ischiasnerv von Knock-out-Tieren ist in E dargestellt. F und G zeigen jeweils eine große Vergrößerung eines Querschnitts durch den Trigemiusnerv. Die Bilder wurden angefertigt von Prof. Büssow, Anatomisches Institut, Universität Bonn. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+/~~LacZ~~</sup>, -/- = FA2H<sup>~~LacZ~~/~~LacZ~~</sup>; Balken in A-D = 1  $\mu$ m; E = 10  $\mu$ m; F und F = 200 nm.

Die Querschnitte und die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden von Prof. Büssow vom Anatomischen Institut der Universität Bonn durchgeführt. Die analysierte Ultrastruktur des Myelins von FA2H-Knock-Out-Mäusen wies keine Unterschiede zu Kontrolltieren auf. Die Kompaktierung der Myelinscheiden erscheint normal. Das reguläre Muster von IPL („Intraperiod Line) und MDL („Major Dense Line“) ist sowohl in Kontroll- wie auch in Knock-out-Geweben zu erkennen. Die Myelindicke nimmt auch bei FA2H defizienten Geweben mit zunehmendem Axondurchmesser zu. Dies ist sowohl bei jungen Tieren im Alter von 4 Wochen als auch bei adulten Tieren im Alter von 20 Wochen zu beobachten. Die ultrastrukturelle Analyse von Ischiasnerv und Trigeminierv als Teilen des peripheren Nervensystems erbrachte ebenfalls keine Veränderungen in FA2H-Knock-out-Geweben, wenn diese mit den Kontrollgeweben verglichen wurden.

Die Analyse der Region der Paranodien im zentralen Nervensystem von 20 Wochen alten Mäusen ließ vergleichbare Strukturen bei Kontrolltieren und FA2H-Knock-Out-Mäusen erkennen, Bilder liegen von dieser Analyse jedoch noch nicht vor.

#### **4.4.2 Verhaltenstests mit adulten FA2H-Knock-Out Mäusen**

Um zu untersuchen, ob die Defizienz der FA2H einen Effekt auf neurologische oder verhaltenstypische Parameter hat, wurden verschiedene Verhaltenstests durchgeführt. Defekte in der Myelinisierung oder dem Myelinerhalt können sich auf die neurologischen Fähigkeiten der Mäuse auswirken. Veränderungen in den gemessenen Parametern könnten einen ersten Hinweis auf Störungen im Myelin geben.

Die Co-Koordination der Vorder- und Hinterläufe sowie die Fähigkeit, die Balance zu halten, wurden in einem Rotarod Test untersucht. Halten sich die Mäuse bei einer bestimmten Geschwindigkeit für einen entsprechenden Zeitraum auf dem rotierenden Stab, werden ihnen die oben genannten Fähigkeiten zugesprochen. Fallen sie im Untersuchungszeitraum häufiger von dem rotierenden Stab als die Kontrollgruppe, kann dies ein Hinweis auf neurologische Ausfälle sein. Mit dem sogenannten „Open field“-Test werden verschiedene Aktivitätsparameter analysiert. Das soll Aufschluss darüber geben, ob die generelle motorische Aktivität und das „Entdecker“-Verhalten wie bei Kontrolltieren ausgeprägt ist. Zur Analyse kamen 4 Monate alte Tiere. Für den Rotarod Test wurden 11 Wildtyp-Mäuse und 13 FA2H-Knock-Mäuse untersucht (siehe Abb. 4-16 A und B). Für den „Open field“-Test wurden 8 Wildtyp- und 13 Knock-Out-Mäuse herangezogen (siehe Abb. 4-16 C bis E).



Sprünge, der Zeit im aufgerichteten Zustand und bei der Zeit für die Sprünge zwischen Wildtyp- und FA2H-Knock-Out-Mäusen festgestellt werden.

#### **4.4.3 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit**

Die Myelinschicht umgibt das Axon und schützt es vor äußeren Schädigungen. Zudem ist sie aber auch für die schnelle Saltatorische Weiterleitung von Reizen entlang des Axons notwendig. Schädigungen in der Myelinschicht haben häufig eine Verschlechterung dieser schnellen Weiterleitung des Nervenimpulse zur Folge. Des Weiteren ist bekannt, dass Tiere, in denen keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide vorkommen, eine geringe Nervenleitgeschwindigkeit zeigen (Kishimoto, 1986). Um nun festzustellen, ob das Myelin der FA2H defizienten Mäuse eventuell in der Funktion der Saltatorischen Erregungsleitung eingeschränkt ist, wurde die Nervenleitgeschwindigkeit entlang des Ischiasnervs von Wildtyp- und FA2H-Knock-Out-Mäusen gemessen. Die Messung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Rainer Meyer vom Physiologischen Institut der Universität Bonn durchgeführt. Die Mäuse waren etwa 5 Monate alt. Gemessen wurden 12 einzelne Nerven von Wildtyp-Mäusen und 22 einzelne Nerven von Knock-Out-Mäusen. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Nervenleitgeschwindigkeit bei FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Nervenleitgeschwindigkeit betrug bei den Kontrolltieren  $34,4 \pm 2,9$  m/s und bei den FA2H-Knock-Out-Mäusen  $33,1 \pm 2,0$  m/s.

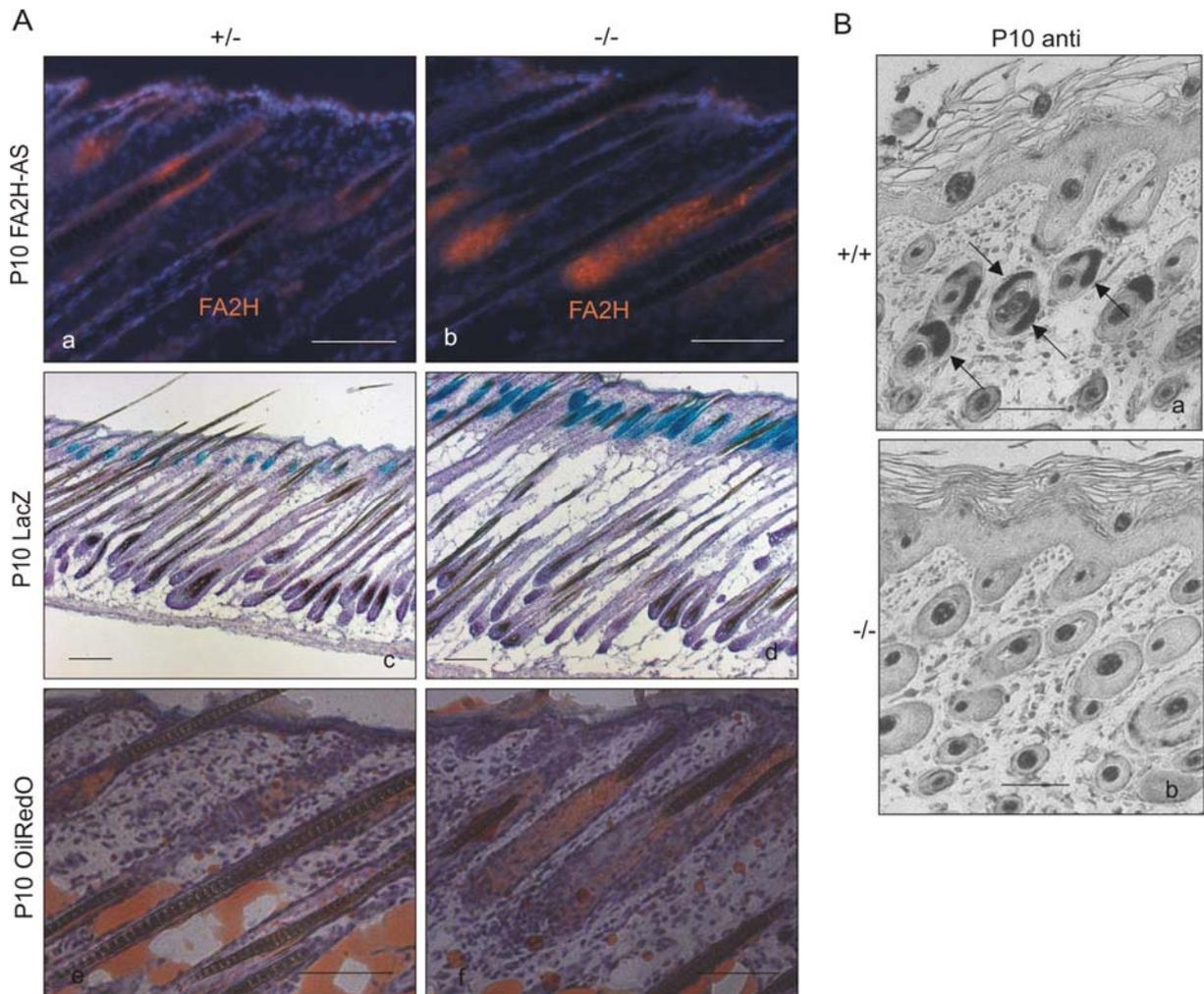
#### **4.5 Analyse des Haut- und Haarphänotyps FA2H defizienter Mäuse**

Aus vorherigen Arbeiten über die FA2H war bereits bekannt, dass das Enzym ebenfalls in der Haut exprimiert wird (Eckhardt et al., 2005). Die Northern-Blot-Ergebnisse früherer Versuche konnten jedoch noch keine Aussage über die genaue Lokalisation der Expression der FA2H in der Haut machen. Dies sollte nun anhand der Mäuse mit einem mutierten FA2H-Allel durch die in diesen erfolgende Expression des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins anstelle des FA2H-Proteins möglich sein. Des Weiteren sollte eine Analyse des Einflusses der FA2H-Defizienz in dem Organ Haut erfolgen.

### 4.5.1 Aufklärung der zellulären Lokalisation der FA2H-Expression in der Haut

Mit Hilfe der Expression des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins sollte untersucht werden, welche Zellen in der Haut FA2H exprimieren. Zusätzlich stellt die *In-situ*-Hybridisierung die Möglichkeit dar, die Expression der FA2H-mRNA im Gewebe zu lokalisieren und darüber hinaus zu beweisen, dass auch in der Haut das Ausschalten des FA2H-Gens in den FA2H defizienten Mäusen komplett ist. Im vorliegenden Fall ergab sich zudem die Option, Teile des FA2H-Proteins auch in den defizienten Geweben mittels eines Antiserums nachzuweisen, da dieses Antiserum gegen Bereiche der cytosolischen Cytochrom-b5-Domäne gerichtet war, welche in der FA2H-Knock-Out-Maus weiterhin exprimiert wurde und dort zur Bildung des Cyt-b5- $\beta$ -gal Fusionsproteins führte. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser 3 Nachweismethoden sollte eine verlässliche Aussage über die Lokalisation der FA2H-Expression in der Haut zulassen.

Für die immunhistochemische Färbung mit dem FA2H-Antiserum wurden Gefrierschnitte der Haut verwendet, ebenso wie für die  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion. Es wurden jeweils Schnitte des gleichen Präparates verwendet, um die gezeigten Regionen vergleichen zu können. Als Kontrollgewebe wurden hierbei Hautschnitte von heterozygoten Mäusen verwendet, da diese das Cyt-b5- $\beta$ -gal Fusionsproteins exprimieren und somit auch eine Aussage über die Lokalisation der Expression des Reporterproteins in Geweben, die nicht defizient für das Enzym FA2H sind, zulassen. Für die *In-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin markierten FA2H-cDNA Sonde kamen Paraffinschnitte der Haut zur Anwendung. Wie oben unter 4.2.2.1 konnte diese Kombination der Methoden dazu genutzt werden, anhand der etablierten *In-situ*-Hybridisierung die Färbung für das Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterprotein nun ebenfalls in der Haut auf ihre Richtigkeit zu prüfen. In Abb. 4-17 sind beispielhaft die Ergebnisse der unterschiedlichen Färbungen an 10 Tage alten Mäusen dargestellt. Als Kontrollen für die immunhistochemischen und histologischen Färbungen wurden jeweils Gewebe von heterozygoten Mäusen verwendet, um sie direkt mit der  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion vergleichen zu können.



**Abb. 4-17: Lokalisation der FA2H-Expression in der Haut**

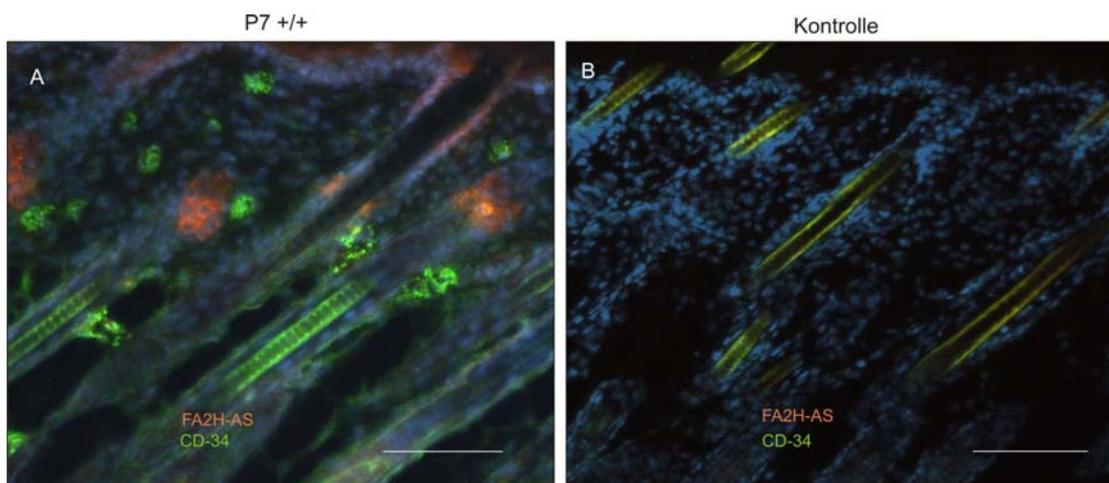
A zeigt einen Vergleich der Färbung FA2H exprimierender Zellen der Haut nach immunhistochemischer Färbung mit einem FA2H-Antiserum (Verdünnung = 1:100) mit der LacZ-Färbemethode und mit der OilRedO-Färbung der Sebozyten. Balken in a und b, e und f = 100  $\mu$ m; Balken in c und d = 200  $\mu$ m; AS = Antiserum; FA2H-Antiserum in rot; DAPI-Färbung in blau.

In B ist das Ergebnis einer *In-situ*-Hybridisierung mit einer FA2H-anti-Sonde an Paraffinschnitten der Haut von Wildtyp und FA2H defizienten Mäusen zu sehen. Balken = 100  $\mu$ m. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+/-del[LacZ]</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Abb. 4-17 A zeigt eine gute Übereinstimmung der mit dem FA2H-Antiserum und mit der  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion gefärbten Regionen. Die Färbung für das FA2H-Antiserum in a und b ist in Rot zu sehen. Die Schnitte wurden mit dem blauen Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt. Die der  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion unterworfenen Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Färbungen sind sehr strikt auf den Bereich der Talgdrüsen beschränkt. Auch nach einer 1 Woche dauernden  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion konnte kein Signal in anderen Bereichen der Haut oder der Subkutis festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die OilRedO-Färbung färbt spezifisch neutrale Lipide wie Triglyceride und Cholesterolester an. Diese kommen in der Haut in den Lipidtröpfchen innerhalb der Sebozyten vor. Mit dieser Methode zeigte sich ein sehr

ähnliches Färbemuster wie das Expressionsmuster des Enzyms FA2H. Sie ist in Abb. 4-17 A, e und f gezeigt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Ort der Expression der FA2H in der Haut um die Sebozyten der Talgdrüse handelt. Die streng begrenzte Lokalisierung konnte auch mit Hilfe der Signale in der *In-situ*-Hybridisierung bestätigt werden (Abb.4-17 B). Darüber hinaus zeigte dieser Versuch, dass in den FA2H defizienten Mäusen in der Tat auch in der Haut keine mRNA mehr gebildet wird, die die Exons 3 und 4 der FA2H enthält.

Die Lokalisierung und die Form der gefärbten Bereiche ließ annehmen, dass der Ort der Expression der FA2H die Talgdrüse ist. Um auszuschließen, dass zudem die sehr nah an der Talgdrüse gelegene sogenannte Balgregion ebenfalls eine FA2H-Expression aufweist, wurden Gefrierschnitte der Haut mit dem FA2H-Antiserum und einem Marker für die Balgregion (CD34) co-gefärbt (siehe Abb. 4-18). Die Balgregion bildet ein Reservoir epidermaler Stammzellen, die als Nachkommen transient amplifizierende Zellen bilden. Eine Expression der FA2H in den Zellen der Balgregion würde für eventuelle Signalwege, die beeinflusst werden könnten, weit reichende Konsequenzen haben, da in dieser Region fortwährend pluripotente Stammzellen gebildet werden.



**Abb. 4-18: Co-Färbung FA2H-Antiserum und CD34 in der Haut**

A: Wildtyp-Haut wurde mit dem FA2H-Antiserum und Anti-CD34-Antikörper co-gefärbt, um eine mögliche Co-Lokalisation aufzudecken. Das Signal für das Enzym FA2H ist in Rot zu sehen, CD34 positive Bereiche sind grün gefärbt. Das FA2H-Antiserum wurde 1:100 in 1% BSA-Lösung verdünnt, der CD34-Antikörper 1:500.

B: Schnitte der gleichen Haut wie in A wurden nur mit den Zweitantikörpern gefärbt, um unspezifische Färbereaktionen aufzudecken. Die Sekundärantikörper wurden jeweils 1:400 verdünnt. Balken = 100  $\mu$ m, . +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>.

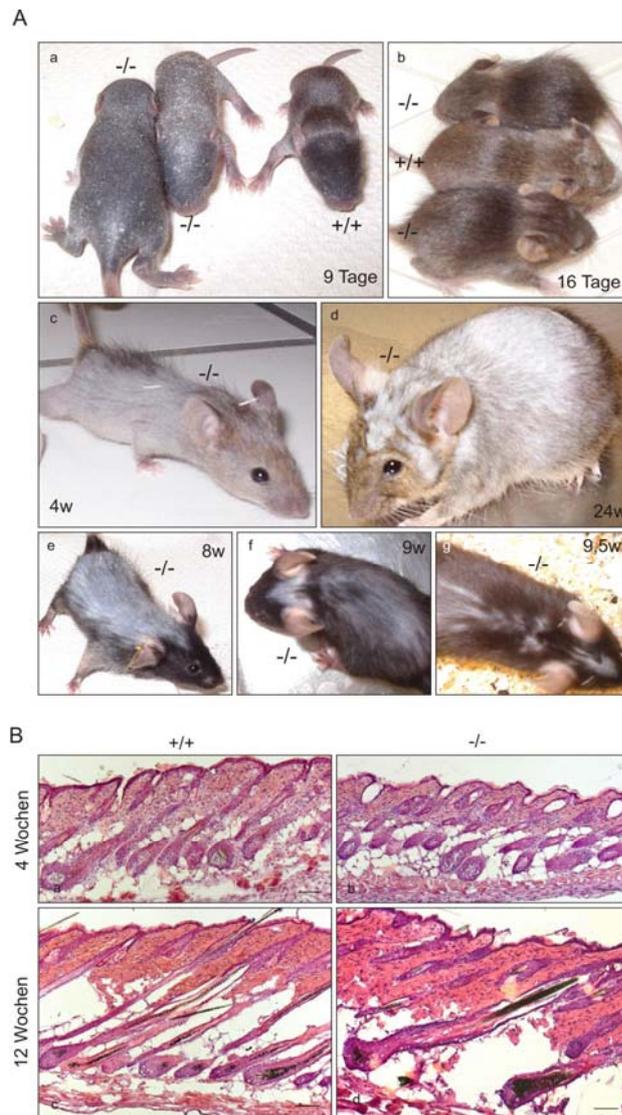
Abb. 4-18 zeigt das Ergebnis der Co-Färbung von Wildtyp-Haut der Altersstufe P7. Das FA2H-Antiserum gibt ein rotes Signal, CD34 positive Zellen sind grün gefärbt. In den durchgeführten Färbungen von denen Abb. 4-18 ein repräsentatives Beispiel darstellt, konnte zu keiner Zeit und in keinem Bereich Co-Lokalisation von FA2H und CD-34 festgestellt werden.

## **4.5.2 Veränderungen des Aufbaus der Haut und der Haarfollikel in FA2H-Knock-Out-Mäusen**

Bereits bei den ersten histologischen Untersuchungen der Haut zur Aufklärung der Lokalisation der FA2H-Expression fielen Unterschiede im Aufbau der Haut und auch in der Struktur der Haarfollikel zwischen Wildtyp- bzw. heterozygoten und FA2H defizienten Mäusen auf. Im folgenden wurde versucht, diese Unterschiede aufzulisten.

### **4.5.2.1 Anzeichen für Haarfollikeldystrophie in FA2H-Knock-Out-Mäusen**

Während der Morphogenese konnten einige Unterschiede bezüglich der Hautdicke, der Talgdrüsengröße und der Proliferation in FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen ausgemacht werden. Unterschiede waren zum Teil nicht nur auf der histologischen Ebene zu erkennen, sondern auch mit bloßem Auge bei Betrachtung der Maus zu sehen. Die Entwicklung der ersten Haare setzt bei Wildtyp-Mäusen etwa um den 9. Tag nach der Geburt ein. Dieser Prozess war bei den FA2H-Knock-Out-Mäusen um etwa 2 Tage verzögert. Tiere aus einem Wurf zeigten zum Teil bereits ein komplettes Fell, während die Geschwistertiere, die defizient für das Enzym FA2H waren, noch die nackte Haut mit vielen Hautschuppen erkennen ließen (siehe Abb. 4-19 A, a). War das Fell einmal entwickelt, zeigte es keine Unterschiede in der Zusammensetzung im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Alle 4 möglichen Haartypen traten auf und die Längen der Haare waren vergleichbar lang. Im weiteren Verlauf kam es zu einem nahezu kompletten Haarverlust bei FA2H defizienten Mäusen etwa alle 4 Wochen (siehe Abb. 4-19 A, c). Der Zeitpunkt des Haarverlustes entspricht dem Ende jeweils eines Haarzyklusses. Die durchscheinende Haut ist zu diesem Zeitpunkt pink gefärbt, was für ein telogenes oder frühes anagenes Stadium spricht. In den ersten Zyklen wuchsen die Haare zumeist gleichmäßig nach (siehe Abb. 4-19 A, e bis g). Mit jedem neuen Haarverlust kam es dann jedoch zu immer mehr dauerhaft verlorenen Haaren, so dass bei älteren Tieren permanent fast kein Fell mehr zu erkennen war (siehe Abb. 4-19 A, d). Diese makroskopisch zu beobachtenden Effekte fanden auch mikroskopisch ihren Niederschlag. In HE-gefärbten Gefrierschnitten der Haut von 4 Wochen bzw. 12 Wochen alten Mäusen, also Beispielen von jenen Altersstufen, bei denen ein Verlust des Fells beobachtet wurde, konnten Anzeichen für eine Haarfollikeldystrophie ausgemacht werden (siehe Abb. 4-19 B). Abb. 4-19 gibt einen Überblick über die beobachteten Effekte der FA2H-Defizienz auf die Entwicklung des Fells, den zyklischen Haarverlust und die histologischen Untersuchungen an Gefrierschnitten der Haut von Mäusen der entsprechenden Altersstufen.



**Abb. 4-19: Verzögerte Haarentwicklung, zyklischer Haarverlust und Anzeichen für Haarfollikeldystrophie in FA2H defizienten Mäusen**

A: Aufnahmen von FA2H-Knock-Out-Mäusen verschiedener Altersstufen, die die verzögerte Haarentwicklung und den zyklischen Haarverlust alle 4 Wochen darstellen. a stellt ein Beispiel für die um 2 Tage verzögerte Haarentwicklung bei jungen Tieren eines Wurfes dar. Auch in b sind Tiere eines Wurfes dargestellt, wobei zu diesem Zeitpunkt jedoch alle Tiere ein komplettes Fell aufweisen. In e-g ist die gleiche Maus im Abstand von etwa 3 Tagen abgelichtet worden, um das Nachwachsen des Fells zu dokumentieren. w = Wochen.

B: HE-Färbungen von Gefrierschnitten der Haut von 4 bzw. 12 Wochen alten Tieren, die die typischen Anzeichen für Haarfollikeldystrophie veranschaulichen sollen. Balken = 100  $\mu$ m, +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Abb. 4-19 B zeigt einige Anzeichen für eine Haarfollikeldystrophie in der Haut von FA2H defizienten Mäusen. Bestimmte Klassifizierungskriterien wurden in der Literatur als Merkmale für eine Haarfollikeldystrophie benannt (Hendrix et al., 2005). Zu diesen gehören z. B. der weit geöffnete Haarkanal wie er im HE-gefärbten Schnitt der Haut einer 4 Wochen alten FA2H-Knock-Out-Maus zu erkennen ist (B, b). Den weit geöffneten Haarkanal konnte man bei FA2H defizienten Mäusen alle 4 Wochen beobachten, d. h. wenn es zum Verlust des Fells kam, wie z. B. auch bei 12 Wochen alten Tieren (B,d). Des Weiteren sind eine

Verformung des Haarfollikels und des Haarschaftes als morphologische Abnormalitäten dafür zu werten, dass eine Haarfollikeldystrophie vorliegt. Ein Beispiel für eine solche Abnormalität ist in der Haut einer 12 Wochen alten FA2H defizienten Maus zu sehen (B, d). Der Untergang der Haarfollikel würde den vermehrten permanenten Haarverlust mit zunehmendem Alter bei FA2H-Knock-Out-Mäusen erklären.

#### **4.5.2.2 *Veränderte Dicke der Haut in FA2H-Knock-Out-Mäusen***

In der Wildtyp-Maus ändert sich mit der sich verändernden Länge des Haarfollikels während des Haarzyklus auch die Dicke der Subkutis und in geringerem Maße die Dicke der Dermis (Übersicht: Müller-Röver et al., 2001). Wird der Haarfollikel länger, so wird die Haut dicker, wird er kürzer, so wird die Haut dünner. Während der Haarfollikelmorphogenese kommt es zu einem starken Längenwachstum des Haarfollikels und damit zu einer sich deutlich verdickenden Haut in diesem Zeitraum. Dieses Phänomen hält etwa bis zum 16. Tag nach der Geburt an. Danach kommt es zur massiven Regression und Verkürzung des Haarfollikels. Damit wird die Haut in der ersten sogenannten catagenen Phase des ersten Haarzyklus dann deutlich dünner. Die catagene Phase dauert etwa 2 Tage und wird von der telogenen Phase abgelöst. Dies ist eine Ruhephase bevor der neue Haarzyklus mit einem erneuten Längenwachstum in der anagenen Phase beginnt. Somit kommt es also zu einer sich ständig veränderten Dicke der Haut im Laufe des Haarzyklusses. Die Hautdicke gibt damit bereits erste Aufschlüsse über das Stadium des Haarzyklus, in dem sich die Haut momentan befindet (Müller-Röver et al., 2001).

Um zu vergleichen, ob der Haarzyklus bei Kontrolltieren und FA2H-Knock-Out-Mäusen gleichermaßen synchron abläuft, wurden jeweils für Kontrolle und Knock-Out Gefrierschnitte der Haut von unterschiedlichen Altersstufen angefertigt und verschiedenen Färbemethoden unterworfen.

Zunächst wurden histologische Übersichten mit Hilfe der HE-Färbung durchgeführt, um einen Überblick über die Dicke der Haut und den Aufbau der Haut unterschiedlicher Altersstufen zu erlangen.

Abb. 4-20 A zeigt eine Zusammenstellung einiger Färbungen, die exemplarisch für die verschiedenen Altersstufen ausgewählt wurden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Färbungen von Wildtyp- und FA2H-Knock-Out-Haut. Die Haut der Mäuse mit einem mutierten FA2H-Allel zeigte keinerlei Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Die Dicke der Haut wurde von allen gefärbten Altersstufen in der in c und d beispielhaft eingezeichneten Art und Weise vermessen. Dabei wurden bei den Altersstufen P10 und P19 je Genotyp 3 verschiedene Tiere untersucht. Bei den übrigen Altersstufen kamen jeweils 2 Tiere zur Analyse. Insgesamt wurden je Tier 10 Werte an verschiedenen Stellen der Schnitte



Abb. 4-20 zeigt, dass die Dicke der Haut bei FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen deutlich erhöht ist. In Abb 4-20 A, a und b ist die Altersstufe P10 dargestellt, in der sich die Haut noch in der sogenannten Morphogenese befindet, in welcher ein starkes Längenwachstum des Haarfollikels zu beobachten ist (vergleichbar der späteren anagenen Phase). Der Aufbau der Haut sieht bei FA2H-Knock-Out-Mäusen wie in der Kontrolle aus. Verändert ist hingegen die Dicke, welche um gut 20% erhöht ist. Zu diesem Zeitpunkt weist die Haut generell die während der Morphogenese maximale Hautdicke auf. Diese maximale Hautdicke scheint nun bei Fehlen des Enzyms FA2H vergrößert zu sein.

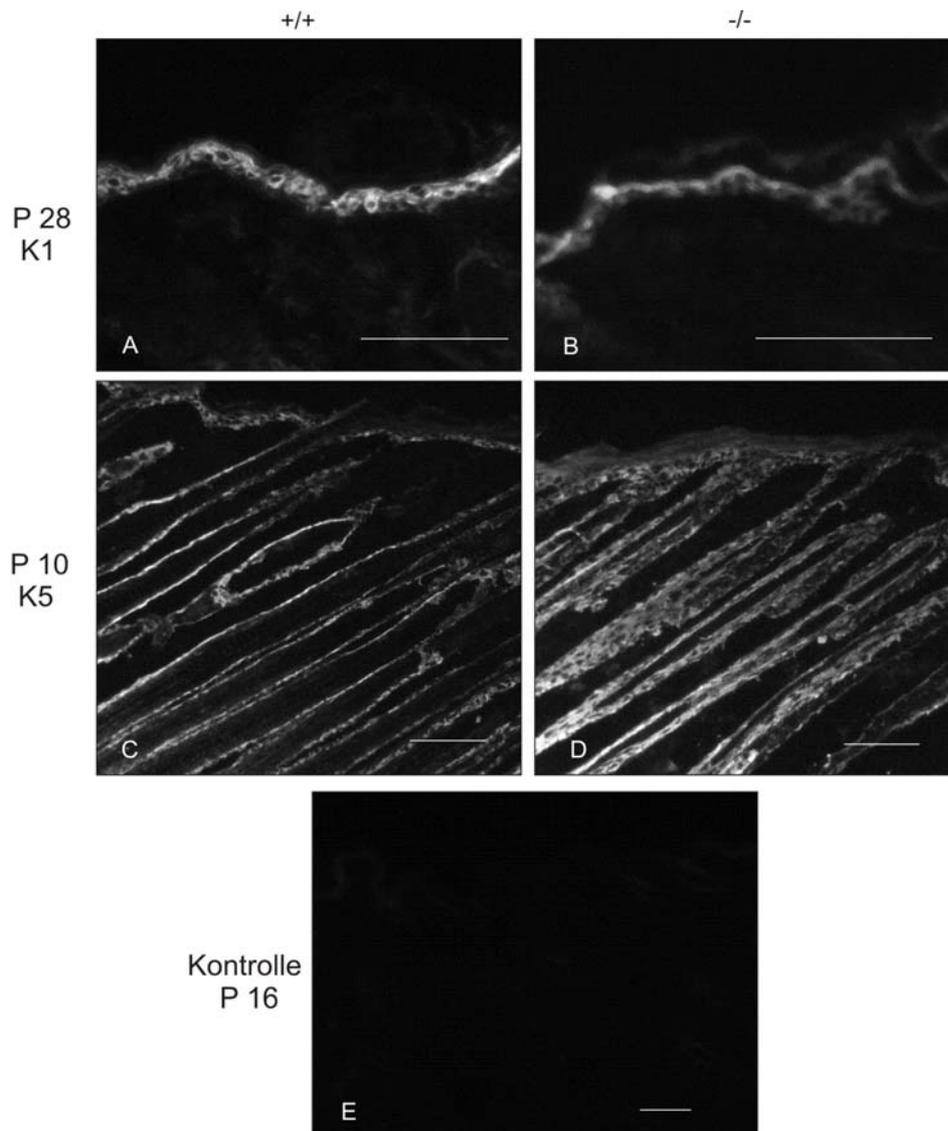
Betrachtet man als nächstes die Altersstufe P19 (c und d), so erkennt man, dass sich die Haut der Kontrolltiere bereits wieder in der telogenen Phase befindet: Die Haut ist wieder sehr dünn, die Dermale Papille kommt vollständig in der Dermis zu liegen und der Haarschaft ist vor allem als Clubhaar sichtbar (Paus et al., 1999). Die Vermessung brachte eine Verminderung der Hautdicke im Vergleich zum gemessenen Maximalwert auf etwa 25%. Währenddessen erscheint das Aussehen der FA2H-Knock-Out-Haut sehr verschieden von der Kontrolle. Die Haarfollikel weisen zahlreiche Anzeichen dafür auf, dass sich die Haut noch in der catagenen Phase befindet. Die Dermale Papille ist noch deutlich in der Subkutis lokalisiert, die Haut ist noch relativ dick und der Haarschaft ist weiterhin in seiner typischen gemusterten Struktur zu erkennen (Paus et al., 1999). Im Vergleich zur gemessenen Maximaldicke bei P10 ist auch hier die Dicke der Haut vermindert, allerdings bis zu diesem Zeitpunkt nur auf etwa 55% des gemessenen Maximalwertes und im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrolle ist die Dicke der Haut über 100% erhöht.

Hautgewebe von Tieren der Altersstufe P23 (e und f) stellt idealerweise ein typisches Beispiel für das telogene Stadium dar, wie es auch in der Wildtyp-Kontrolle zu erkennen ist. Die Dicke der Haut ist maximal reduziert. Sie weist zu diesem Zeitpunkt kaum mehr die Schicht der Subkutis auf. Die Haarfollikel sind maximal verkürzt. Die Haut der FA2H defizienten Maus hingegen zeigt weiterhin strukturelle Anzeichen dafür, dass sie sich in der catagenen Phase befindet. Die Subkutis ist nach wie vor ausgebildet. Die Dermale Papille befindet sich noch immer nicht vollständig in der Dermis. Die Haut verliert jedoch weiterhin an Dicke und ist noch etwa ein Drittel so stark ausgeprägt wie in der Maximalausdehnung. Im direkten Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen ist zu verzeichnen, dass die Dicke weiterhin um mehr als 100% erhöht ist. Die catagene Phase scheint auch zu diesem Zeitpunkt noch nicht gänzlich abgeschlossen zu sein, da die Dicke der Haut im weiteren Verlauf bei FA2H defizienten Mäusen noch weiter abnimmt. Bei P28 ist die minimale gemessene Hautdicke für FA2H-Knock-Out-Mäuse erreicht (siehe Abb. 4-20 B). Zu vermuten ist, dass sich die tatsächliche minimale Hautdicke in FA2H defizienten Mäusen zwischen diesen Altersstufen findet, da die Altersstufe P28 sowohl bei Kontroll- wie auch bei FA2H-Knock-Out-Geweben Anzeichen dafür zeigt, dass sich die Haut in der anagenen

Phase befindet. Gleich zu Beginn dieser Phase kommt es jedoch wieder zu einem Längenwachstum der Haarfollikel und damit zu einer Zunahme der Dicke der Haut.

Allgemein ist zu vermerken, dass die Hautdicke von Mäusen, denen das Enzym FA2H fehlt, während der Morphogenese und der ersten catagenen Phase zu jedem Zeitpunkt deutlich vergrößert ist.

Das verstärkte Längenwachstum der Haut in der Wachstumsphase führte zu der Frage, ob nicht nur die Dermis und die Subkutis eine vergrößerte Dicke aufwiesen, sondern ob es auch im Bereich der Epidermis zu einem verstärkten Wachstum kam. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Gefrierschnitte der Haut mit den Epidermismarkern K1 bzw. K5 gefärbt (siehe Abb. 4-21).



**Abb. 4-21: Keratinfärbungen an der Haut FA2H defizienter Mäuse**

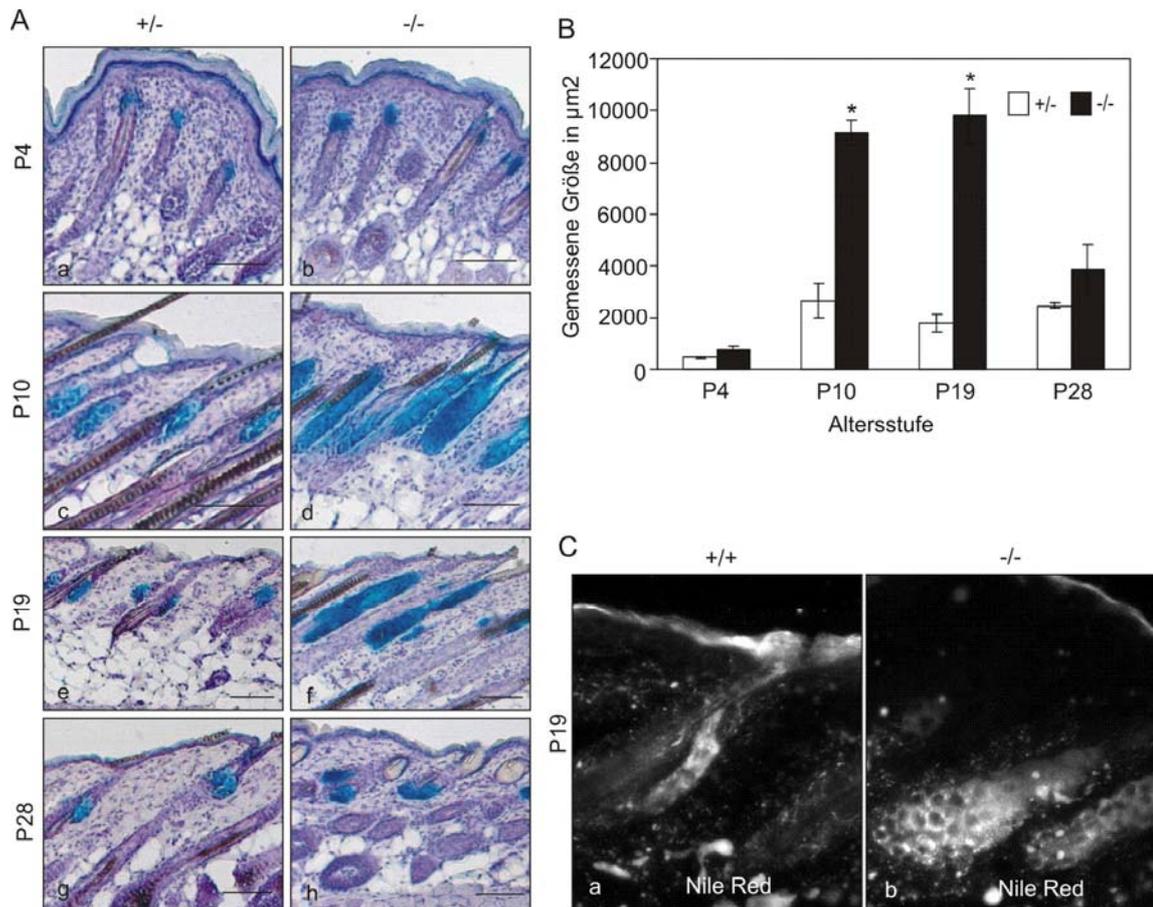
In A und B sind die Färbungen mit dem K1-Antikörper zu sehen (Verdünnung = 1:500). C und D stellen die Ergebnisse der Färbungen mit dem K5-Antikörper dar (Verdünnung = 1:600). In E wurde nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Balken = 100  $\mu$ m, +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Mit dem Antikörper K1 können die Keratinozyten der suprabasalen Epidermisschicht sichtbar gemacht werden. Der Antikörper K5 färbt die Keratinozyten der Basalschicht und der äußeren Wurzelschicht. Die Färbung mit dem K1-Antikörper ließ keine Unterschiede zwischen der Haut von Wildtyp-Mäusen und FA2H defizienten Mäusen erkennen (siehe Abb. 4-21 A und B). Der Antikörper K5 hingegen färbte in den FA2H Mäusen vor allem im Bereich der äußeren Wurzelschicht deutlich mehr Zellen als es in der Kontrolle der Fall war (siehe Abb. 4-21 C und D). Dies könnte ein erster Hinweis auf eine Hypertrophie der äußeren Wurzelscheide in FA2H-Knock-Out-Mäusen sein.

#### **4.5.2.3 Unterschiede in den Talgdrüsen der Haut zwischen Wildtyp und FA2H defizienten Mäusen**

Wie bereits in 4.5.1 beschrieben konnte die Talgdrüse als der Ort der Expression der FA2H in der Haut ausgemacht werden. Im Folgenden wurden die Auswirkungen auf die Talgdrüse in der Haut untersucht, wenn der Haut das Enzym FA2H fehlt. Die Sebozyten wurden mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion, die eine Expression des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins anzeigt, sichtbar gemacht. Verschiedene Altersstufen während der Haarmorphogenese und der ersten Haarzyklusstadien wurden untersucht. Gewebe von heterozygoten Mäusen dienten hier als Kontrollen, da sie ebenfalls anfärbbar sind und keinerlei Unterschiede zur Wildtyp-Kontrolle aufweisen. In Abb. 4-22 A sind verschiedene Altersstufen als repräsentative Beispiele dargestellt. Die Fläche, die von den Sebozyten in den verschiedenen Geweben eingenommen wird, wurde gemessen. Dabei kamen bei P4 und P28 jeweils 2 und bei P10 und P19 jeweils 3 Tiere zur Analyse. Es wurden je Tier 8-10 unterschiedliche Talgdrüsen vermessen. In Abb. 4-22 B ist das Ergebnis der quantitativen Auswertung gezeigt. Es sind die Mittelwerte der Messungen dargestellt. Die Färbung auf das Reporterprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal als Marker für die Sebozyten wurde mit Hilfe der Nile-Red-Färbung verifiziert. Diese ist in Abb. 4-22 C gezeigt. Mit Hilfe der Nile-Red-Färbung können intrazelluläre Lipidtröpfchen dargestellt werden, die zumeist aus Triglyceriden und Cholesterolestern bestehen (Greenspan et al., 1985; Fowler und Greenspan, 1985). Diese Lipidtröpfchen kommen in der Haut in der Talgdrüse vor. Die gefärbten Lipide sind damit mit denen bei der Oil-Red-O-Färbung zu vergleichen, sichtbar gemacht werden sie in diesem Fall jedoch durch ein Fluoreszenz-Signal. In Übereinstimmung mit der LacZ-Färbung zeigte die Färbung mit Nile Red eine Zunahme der Fläche, die durch die Talgdrüse eingenommen wird. Mit dieser zusätzlichen Färbemethode konnte gezeigt werden, dass die LacZ-Färbung in FA2H-Knock-Out-Mäusen und heterozygoten Mäusen den gesamten Bereich der Talgdrüse erfasst und somit zur Bestimmung der Fläche der Talgdrüse geeignet ist. Die Nile-Red-Färbung wurde zudem an Wildtyp-Haut durchgeführt und zeigte dabei eine

vergleichbare Färbung, wie sie die LacZ-Färbung bei heterozygoten Mäusen ergibt. Damit konnte gezeigt werden, dass die heterozygoten Mäuse als Kontrollen geeignet sind.



**Abb. 4-22: Vergleich der Flächen, die durch die Sebozyten eingenommen werden**

A: Gefrierschnitte der Haut verschiedener Altersstufen wurden einer  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion unterworfen und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Damit konnten die Sebozyten sichtbar gemacht werden, Balken = 100  $\mu$ m.

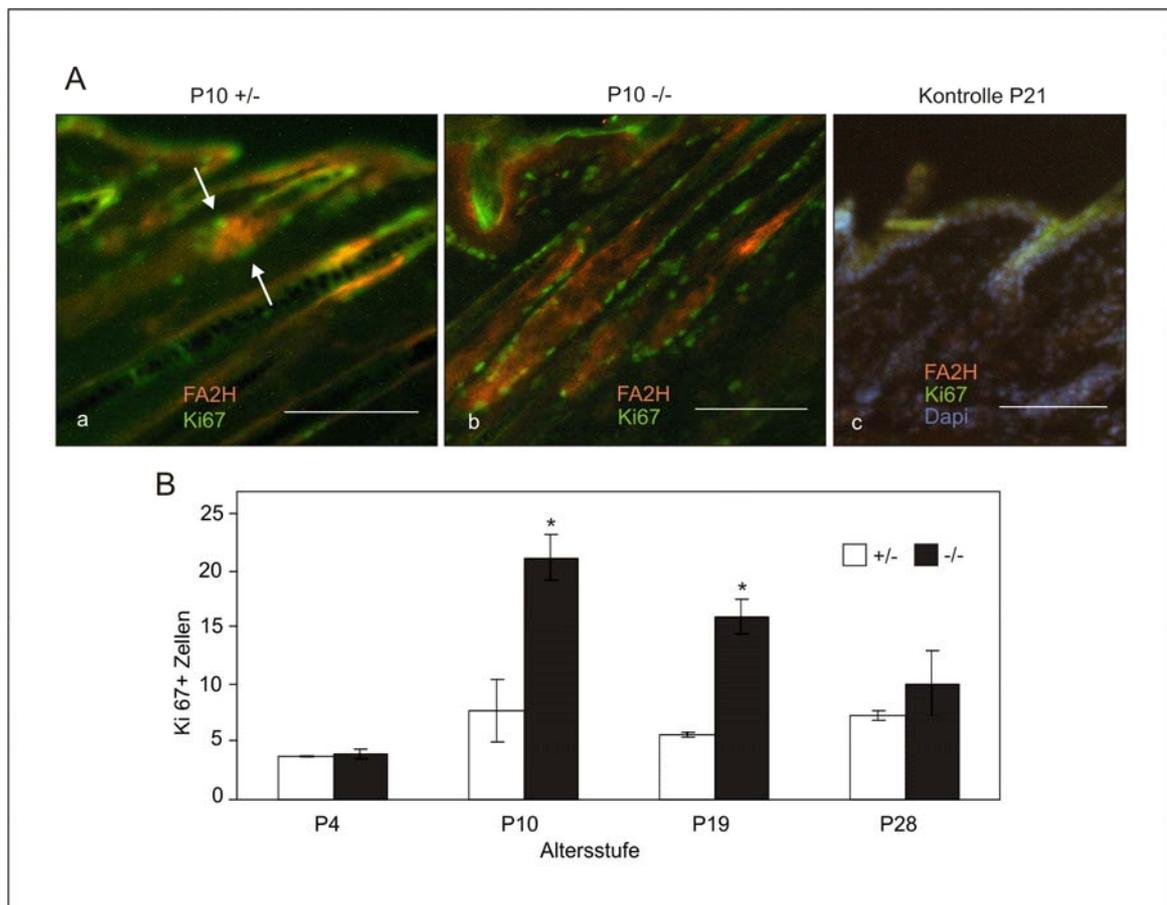
B: Ergebnis der Vermessung, der durch die Sebozyten eingenommenen Fläche. Für P4 und P28 wurden  $n = 2$  Tiere analysiert, für P10 und P19  $n = 3$  Tiere. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, die Sterne statistisch signifikante Unterschiede für die Altersstufen, in den jeweils 3 verschiedene Tiere analysiert wurden (T-Test,  $p < 0,05$ ). +/- = FA2H<sup>+del[LacZ]</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

C: Nile-Red-Färbung der Talgdrüsen an Gefrierschnitten von 19 Tage alten Mäusen als Vergleich der Talgdrüsengröße mit einer alternativen Färbemethode. +/+ = FA2H<sup>+/+</sup>; -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Abb. 4-22 A zeigt das Ergebnis der  $\beta$ -Galaktosidase Färbereaktion, mit der die Sebozyten sichtbar gemacht werden konnten. Zur Kenntlichmachung weiterer Hautstrukturen wurde anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Färbungen wurden verwendet, um die durch die Sebozyten eingenommene Fläche in den unterschiedlichen Geweben der verschiedenen Alterstufen und Genotypen zu vergleichen. Das Ergebnis der Vermessung ist in Abb. 4-22 B dargestellt. Die Sebozyten nehmen in den FA2H defizienten Mäusen zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine größere Fläche ein als es in den Kontrollen der Fall ist. Bereits rasch nach der Bildung der ersten Sebozyten, die etwa am Tag 3,5 nach der Geburt auftritt (Paus et al. 1999), ist die gebildete Talgdrüse in den Knock-Out-Mäusen ein wenig

größer als in der Kontrolle. Dies ist bei der Auswertung der Gefrierschnitte der Haut von 4 Tage alten Mäusen sichtbar geworden (siehe Abb. 4-22 A, a und b und 4-22, B). Im weiteren Verlauf der Haarfollikel-Morphogenese vergrößert sich die Talgdrüse sowohl in den Kontroll- als auch in den Knock-out-Geweben. Während sie am 10. Tag nach der Geburt in den Kontrollen etwa 5 mal so groß ist wie an Tag 4, hat sich die Talgdrüse in der Haut der FA2H defizienten Maus im gleichen Zeitraum um mehr als das 10-fache vergrößert. Im Vergleich zur heterozygoten Haut ist die Talgdrüse der Haut ohne FA2H Enzym nun um über 300% vergrößert (siehe Abb. 4-22 A, c und d und 4-22, B). Wenn die Haut etwa am 16. Tag nach der Geburt in die catagene Phase eintritt, kommt es zu einer massiven Reduktion der Haarfollikellänge und der Hautdicke. Dies betrifft auch die Bereiche der Dermis, in der die Talgdrüse lokalisiert ist. Entsprechend reduziert sich die Größe der Talgdrüse im Verlauf der catagenen Phase, um in der telogenen Phase ein Minimum zu erreichen. Dies ist in der Haut der Kontrolltiere zu beobachten, die am 19. Tag nach der Geburt viele Anzeichen dafür aufweist, dass sie sich in der telogenen Phase befindet, wie es nach der Literatur zu erwarten war. Dies ist z.B. daran zu erkennen, dass sich die Dermale Papille komplett in der Dermis befindet und der Haarschaft zumeist nur als Clubhaar erkennbar ist. Die Fläche, die von den Sebozyten eingenommen wird, verkleinert sich zu diesem Zeitpunkt auf etwa 65% des maximal gemessenen Wertes bei P10. Anders sieht es bei den Geweben der FA2H-Knock-Out-Mäuse aus. Diese haben wie schon erwähnt die telogene Phase noch nicht erreicht. Vielmehr scheinen sie sich noch in der catagenen Phase zu befinden (siehe 4.5.2.2). Auf das unterschiedliche Verhalten im Haarzyklus wird in einem späteren Punkt noch eingegangen werden. Die catagene Phase bedeutet nun eine Reduktion der Größe der Talgdrüse. Dies ist zu diesem Zeitpunkt in den Knock-out-Geweben jedoch noch nicht zu verzeichnen. Der Wert der Fläche, die durch die Sebozyten eingenommen wird, bleibt bei einem ähnlich hohen Level wie am 10. Tag nach der Geburt. Da die Kontrolle eine verminderte Größe aufweist, kommt es jetzt zu einer maximalen Diskrepanz in der Größe der Talgdrüsen, wenn man Kontroll- und Knock-out-Gewebe vergleicht: Die Talgdrüse ist in den Knock-out-Geweben mehr als 5 mal größer als in der Haut der Kontrolltiere (siehe Abb. 4-22 A, e und f und 4-22, B und C). An P28 gehen sowohl die Kontroll- als auch die Knock-out-Gewebe wieder in die anagene Phase über. Es kommt zu einem erneuten Längenwachstum und damit auch zu einer erneuten Vergrößerung der Talgdrüse. Dies ist bei der Kontrollhaut sehr gut zu beobachten. Die Größe der Talgdrüse der Knock-out-Haut ist im Vergleich zu vorher untersuchten Zeitpunkten deutlich auf etwa 30% ihres maximal gemessenen Wertes vermindert. Es ist zu vermuten, dass diese Reduktion schrittweise in der Zeit zwischen P19 und P28 aufgetreten ist und das Minimum hier nicht gemessen wurde. Bei P28 kommt es wohl auch in den Knock-out-Geweben schon wieder zu einer Zunahme der Größe der Talgdrüse (siehe Abb. 4-22 A, g und h und 4-22, B).

Um zu analysieren, ob die gemessene Vergrößerung der Talgdrüsen durch eine gesteigerte Anzahl an Sebozyten oder durch vergrößerte Sebozyten hervorgerufen wurde, wurden Gefrierschnitte der Haut der gleichen Altersstufen, die oben auf die Talgdrüsengröße untersucht wurden, einer Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 unterzogen. Die Bereiche der FA2H-Expression, die als die Sebozyten identifiziert wurden, wurden durch Co-Färbung mit dem FA2H-Antiserum im Schnitt sichtbar gemacht. Abb. 4-23 A zeigt das Ergebnis der Co-Färbung mit dem Ki67 Antikörper in grün und dem FA2H-Antiserum in rot beispielhaft an Gefrierschnitten der Haut von 10 Tage alten Mäusen. Die Ki-67 positiven Zellen im Bereich von jeweils 6 Talgdrüsen wurden ausgezählt. In Abb. 4-23 B ist das Resultat der Auszählung zu sehen.



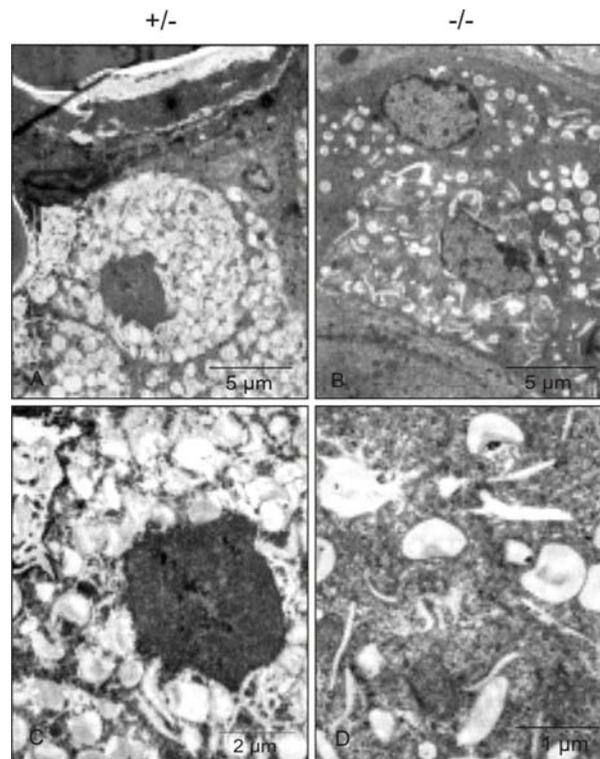
**Abb. 4-23: Ki67 positive Zellen in den Talgdrüsen**

A zeigt eine Co-Färbung an Gefrierschnitten der Haut 10 Tage alter Mäuse mit einem Antikörper gegen Ki67 (Verdünnung = 1:50) in grün und einem Antiserum gegen die Cytochrom-b5-Domäne der FA2H in rot (Verdünnung = 1:100). Abgebildet ist die Hautregion der Dermis, in der sich die Talgdrüsen befinden. a zeigt die Situation in der Haut von Mäusen mit einem defekten FA2H Allel, b stellt die Knock-out-Situation dar und in c ist eine Kontrollfärbung an der Haut von 21 Tage alten Wildtyp-Mäusen zu sehen, bei der lediglich die Zweitantikörper verwendet wurden. In B ist das Ergebnis der Auszählung Ki67 positiver Zellen im Bereich der Sebozyten zu sehen. Es wurden die gleichen Altersstufen wie für Abb. 4-22 untersucht. Für P4 und P28 wurden n = 2 Tiere analysiert, für P10 und P19 n = 3 Tiere. Die Standardabweichung ist durch die Fehlerbalken dargestellt, die Sterne zeigen die statistisch signifikanten Unterschiede an (T-Test,  $p < 0,05$ ). +/- = FA2H<sup>+/~~LacZ~~</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>, Balken = 100  $\mu$ m.

Die Auszählung der Ki67 positiven Zellen im Bereich der Talgdrüse ergab für die Kontrolle einen ähnlichen Verlauf wie sie die Entwicklung der Größe der Talgdrüse während des Haarzyklus zeigt (siehe Abb. 4-23 B im Vergleich mit Abb. 4-22 B). Wenn die Talgdrüse ihre maximale Ausdehnung erreicht hat, sind ebenfalls am meisten Ki67 positive Zellen zu erkennen. Dies war bei der vorliegenden Untersuchung an Tag 10 der Fall. Die Anzahl der proliferierenden Zellen nimmt bei Erreichen der telogenen Phase am 19. Tag nach der Geburt ab und steigt zu Beginn der ersten anagenen Phase an Tag 28 nach der Geburt wieder an. Die Zahl der proliferierenden Zellen im Bereich der Talgdrüse zeigt zu jedem untersuchten Zeitpunkt in den Knock-out-Geweben einen höheren Wert als in den Kontroll-Geweben. Zum ersten untersuchten Zeitpunkt am 4. Tag nach der Geburt ist dieser Unterschied noch sehr gering. Sowohl bei den FA2H defizienten Mäusen als auch bei den heterozygoten Mäusen sind am 10. Tag nach der Geburt die meisten proliferierenden Zellen zu finden. In den Knock-out-Geweben ist die Menge der Ki67 positiven Zellen jedoch bereits etwa um das 3-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ihre Anzahl nimmt zum Tag 19 nach der Geburt hin ab. Dennoch ist die Anzahl der proliferierenden Zellen im Bereich der Talgdrüse in den FA2H defizienten Geweben noch um 2,5-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Größe der Talgdrüse ist am Tag 28 bei den FA2H-Knock-Out-Mäusen im Vergleich zum Tag 19 stark reduziert. Das Gleiche gilt für die Anzahl Ki67 positiver Zellen im Bereich der Talgdrüse.

Die Auszählung der proliferierenden Zellen im Bereich der Talgdrüsen ergab deutlich erhöhte Werte für die FA2H defiziente Haut im Vergleich zur Haut der Kontrolltiere. Diese gesteigerte Proliferation im Bereich der Talgdrüsen ist wahrscheinlich die Ursache für die deutlich vergrößerte Fläche der Talgdrüsen in FA2H-Knock-Out-Mäusen.

Zur detaillierteren Analyse wurde die Ultrastruktur der Talgdrüsen mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Die Untersuchungen wurden von Prof. Dr. H. Büssow vom Institut für Anatomie der Universität Bonn durchgeführt. Abb. 4-24 gibt eine Übersicht über die dabei gemachten Beobachtungen in der Rückenhaut 4 Wochen alter Mäuse. Der Querschnitt wurde dabei derart durch den Bereich der Dermis gelegt, in dem sich die Talgdrüse befindet, dass die Talgdrüse und im Idealfall auch der Haarkanal zu erkennen sind.



**Abb. 4-24: Elektronenmikroskopische Analyse der Talgdrüse FA2H defizienter Mäuse**

Gezeigt sind verschiedene Vergrößerungen von Querschnitten durch die Talgdrüse der Rückenhaut 4 Wochen alter heterozygoter Mäuse (A und C) und von FA2H-Knock-Out-Mäusen (B und D). Zu sehen ist ein Stadium bereits differenzierter Sebozyten, die nahe des Haarkanals gelegen sind. Die Untersuchungen und die Bilder wurden von Herrn Prof. Dr. H. Büssov angefertigt. +/- = FA2H<sup>+/del[LacZ]</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

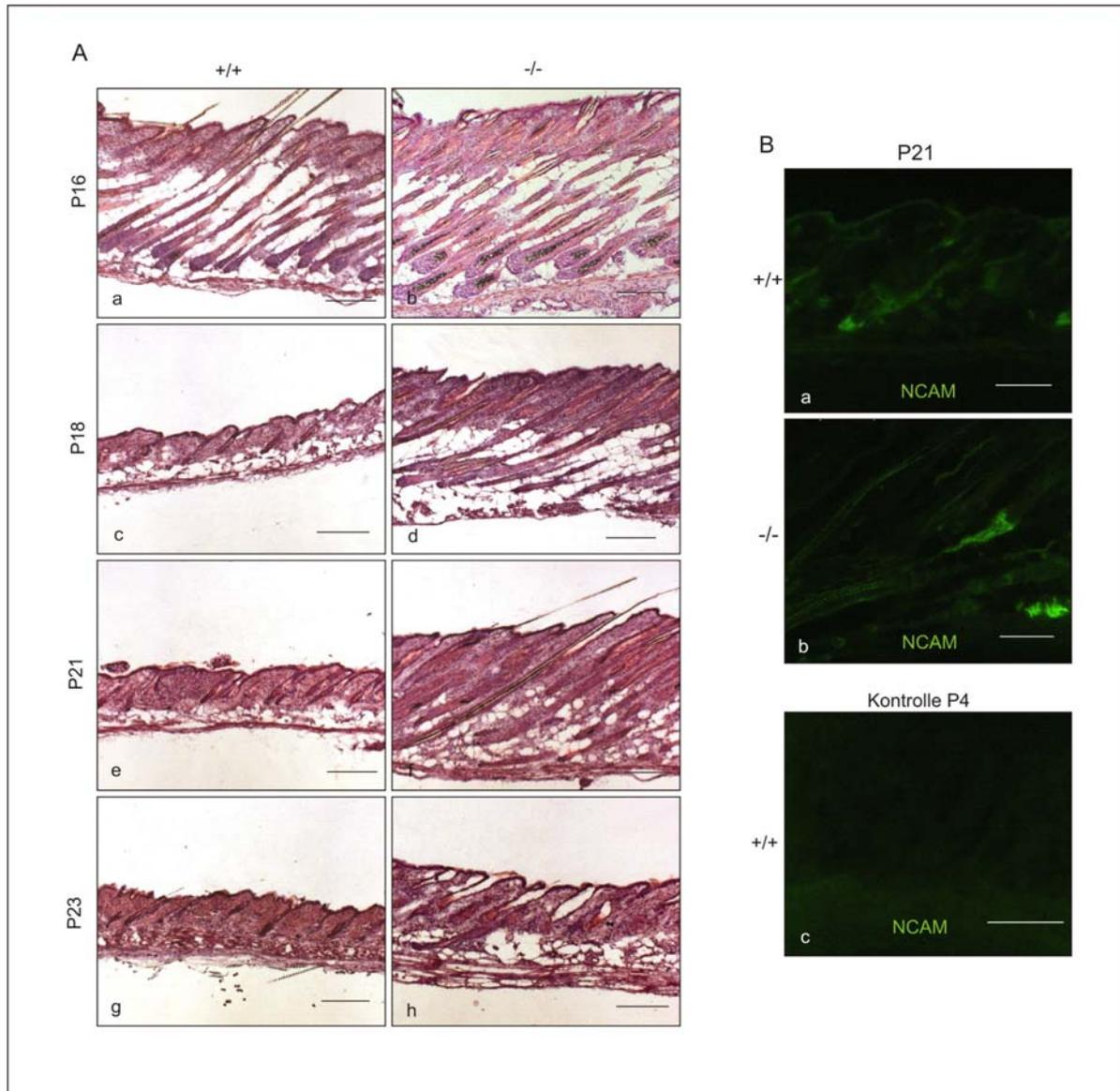
Bewegt man sich innerhalb der Talgdrüse in Richtung Haarkanal, so findet man weiter differenzierte Sebozyten im Vergleich zu Bereichen an den äußeren Rändern der Talgdrüse. Abb. 4-24 zeigt Aufnahmen vom Querschnitt durch die Talgdrüse nahe des Haarkanals von 4 Wochen alten Mäusen. Die Sebozyten sind bereits stark differenziert. Man erkennt viele „Lipidtröpfchen“, die zur Speicherung der Lipide, die in den Haarkanal abgegeben werden sollen, dienen (Martin und Parton, 2006). Die Form und Anzahl dieser Lipidtröpfchen scheint in den FA2H defizienten Mäusen verändert zu sein. Die Menge ist deutlich herabgesetzt, wenn man mit der Kontrolle, das ist in diesem Fall die Talgdrüse einer heterozygoten Maus, vergleicht. Die verbliebenen Lipidtröpfchen scheinen ihre runde Form zu verlieren und treten in mannigfaltigen Formen auf. Es ist allerdings unklar, ob es sich dabei um ein Artefakt der Fixierung handelt. Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Analyse von 5 Monate alten Mäusen gemacht werden. Bei dieser Untersuchung wurden auch Wildtyp-Mäuse in die Analyse einbezogen. Sie zeigten keinerlei Unterschiede zu den heterozygoten Tieren. Die Unterschiede zu den FA2H defizienten Geweben entsprachen den hier beschriebenen bei 4 Wochen alten Tieren.

#### **4.5.2.4 Unterschiede im Haarzyklus in FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle**

Wie bereits bei der vorherigen Beschreibung der veränderten Hautdicke und der vergrößerten Talgdrüsen in FA2H defizienten Mäusen angemerkt, kam es in der Haut der Mäuse, die kein FA2H-Protein exprimieren, zu einer Verschiebung im Haarzyklus. Die Haut durchläuft den Haarzyklus nach einem strengen Zeitplan. Dieser Zeitplan ist vor allem während der Haarmorphogenese und der ersten spontan initiierten catagenen und telogenen Phase für alle Mäuse noch sehr synchron (Paus et al., 1999). Im späteren Verlauf kommt es durchaus zu einer Desynchronisation der einzelnen Haarfollikel, was bedeutet, dass die Haarzyklusstadien gleichaltriger älterer Tiere nur erschwert verglichen werden können. Um dieses auch bei älteren Tieren bewerkstelligen zu können, müsste man eine Synchronisierung durch Depilieren künstlich hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus der Analyse der Haarzyklusstadien auf die Zeit der Haarmorphogenese und der ersten catagenen und telogenen Phase bis zum Erreichen der ersten Wachstumsphase gelegt. Das bedeutet, dass vor allem die Haut von Tieren bis zur Altersstufe von 4 Wochen untersucht wurde. Zum Vergleich gleichaltriger Mäuse wurden jeweils Geschwisterpaare aus einem Wurf verwendet, um künstliche Entwicklungsverschiebungen zu vermeiden.

Zur Bestimmung, in welchem Haarzyklusstadium sich die einzelnen Haarfollikel befanden, wurden verschiedene Merkmale verwendet, wie sie in Müller-Röver et al., 2001 vorgeschlagen werden. Um deutlich zu machen, wie für die folgende Analyse vorgegangen wurde, seien hier die wichtigsten Merkmale und die dafür verwendeten Färbungen kurz aufgeführt: Es wurde die Länge des Haarfollikels und die Dicke der Haut vermessen. Hierfür kann man HE-gefärbte Gefrierschnitte verwenden (siehe Abb. 4-25 A). Zudem erfolgte für die Bestimmung der Länge des Haarfollikels eine Anfärbung der Dermalen Papille mittels einer Färbung der Alkalischen Phosphatase (Handjiski et al., 1994). Die Dermale Papille stellt den Bereich des Haarfollikels dar, der zu jedem Zeitpunkt des Haarzyklus maximal proximal gelegen ist. Die Lage der Dermalen Papille in den verschiedenen Schichten der Haut ist ein weiteres Kriterium zur Ermittlung des Haarzyklusstadiums. Sie liegt z. B. während der telogenen Phase vollständig in der Dermis, wandert im Verlauf der Wachstumsphase in Richtung Panniculus Carnosus, wo sie bis zu Beginn der catagenen Phase verweilt. Mit der Verkürzung des Haarfollikels bewegt sich die Dermale Papille wieder in Richtung der Dermis. Auch die Form der Dermalen Papille gibt Auskunft darüber, in welchem Stadium sich der jeweilige Haarfollikel befindet. Eine weitere Methode, die zur Bestimmung der Haarzyklusstadien verwendet wird, ist die immunhistochemische Anfärbung der Gefrierschnitte der Haut mit einem Antikörper gegen das Neuronale Zell Adhäsionsmolekül (NCAM; Müller-Röver et al., 1998). NCAM-positive Zellen sind in der Dermalen Papille und in Fibroblasten, die um den proximalen Teil des Haarfollikels gelegen

sind, zu erkennen. Darüber hinaus kann man eine sehr typische Spur an NCAM-positiven Zellen unterhalb der Dermalen Papille während später catagener Phasen beobachten (siehe Abb. 4-25 B). Zusammen mit der Struktur der Haarfollikel wurden diese Merkmale untersucht, um die Haarfollikel verschiedener Altersstufen von Wildtyp und FA2H defizienten Mäusen einem bestimmten Haarzyklusstadium zuzuordnen. Abb. 4-25 zeigt beispielhafte Färbungen, die zu dieser Untersuchung verwendet wurden, zur Verdeutlichung.



**Abb. 4-25: Verschiebungen im Haarzyklus in FA2H defizienten Mäusen**

A: HE-gefärbte Gefrierschnitte der Haut der angezeigten Altersstufen von Wildtyp und FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup> Mäusen. Diese Färbungen wurden auf die Hautdicke, die Lage der Dermalen Papille, die Ausdehnung des Haarfollikelbulbs und das Aussehen des Haarschaftes hin untersucht. Balken = 200 µm.

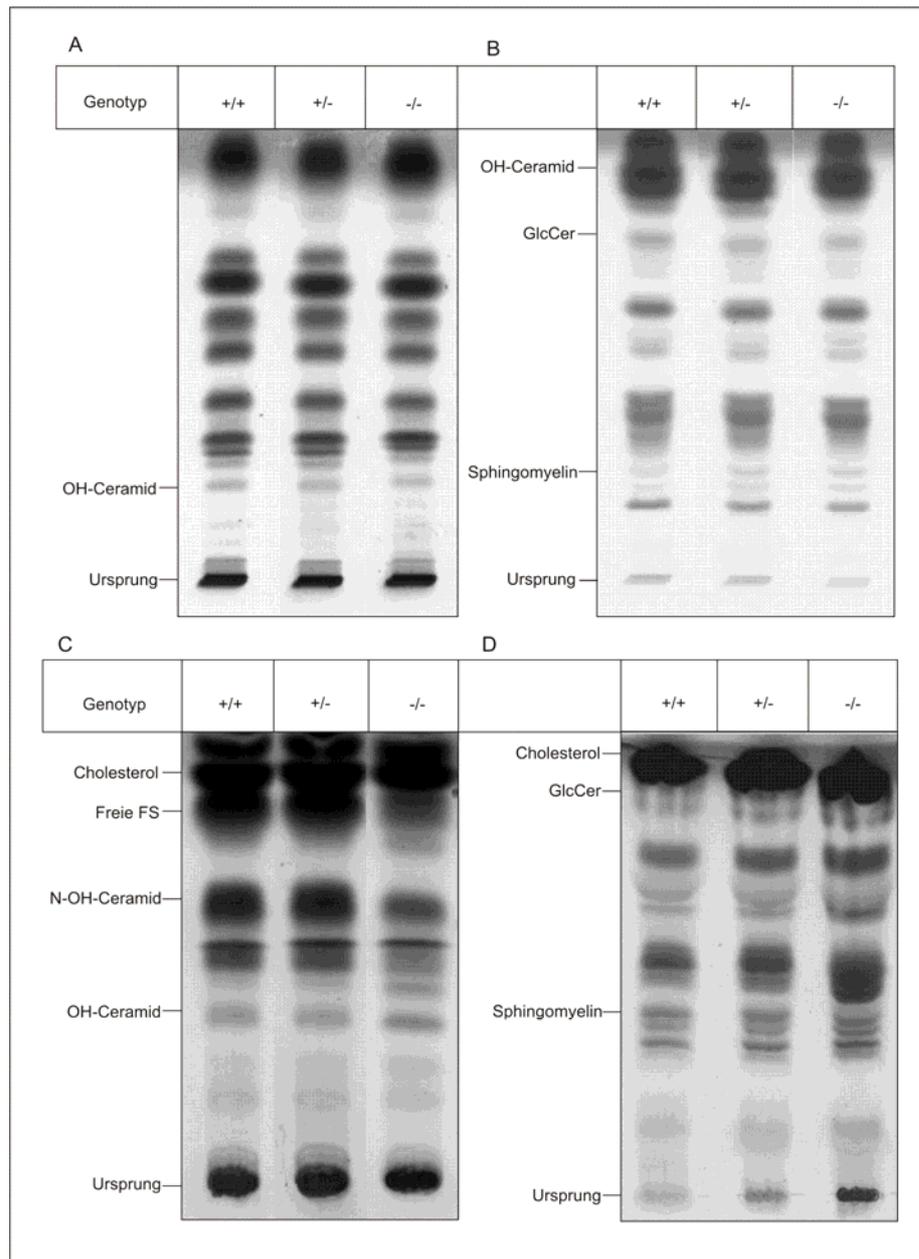
B: Beispielhafte Darstellung einer NCAM-Färbung an Gefrierschnitten der Haut von 21 Tage alten Wildtyp und FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup> Mäusen. Die Färbungen wurden auf die typische NCAM-positive Spur unterhalb der Dermalen Papille hin untersucht und bei positivem Ergebnis die Schnitte der catagenen Phase zugeordnet. Zur Färbung wurde der unverdünnte Zellkulturüberstand verwendet (a und b) oder es wurde nur mit dem Zweitantikörper gefärbt, um unspezifische Färbereignisse zu entdecken (c; Altersstufe der hier verwendeten Haut = P4). Balken = 100 µm, FA2H<sup>+/+</sup>, -/- = FA2H<sup>del[LacZ]/del[LacZ]</sup>.

Betrachtet man den Zeitraum des Übergangs von der catagenen zur telogenen Phase, so ist erkennbar, dass es bei FA2H defizienten Mäusen deutlich länger dauert, bis die Haut nach dem starken Längenwachstum der Haarmorphogenese wieder eine Dicke erreicht hat, die der telogenen Phase entsprechen würde. Die Analyse nach den verschiedenen vorgeschlagenen und oben aufgeführten Merkmalen ergab nun, dass auch die Haut der FA2H-Knock-Out-Mäuse etwa am Tag 16 nach der Geburt in die catagene Phase eintritt. Die catagene Phase wird in 8 Unterphasen eingeteilt. Zu diesem Zeitpunkt (P16) konnte eine Verzögerung um etwa eine catagene Phase ermittelt werden. Die Wildtyp-Haut befand sich zumeist in der catagenen Phase II, was vor allem an der Abnahme des Durchmessers des Haarfollikelbulbs zu erkennen war. Die Knock-out-Haut hingegen zeigte zumeist Anzeichen für das erste catagene Stadium. Am 18. Tag nach der Geburt lagen fast alle Haarfollikel der Wildtyp-Haut bereits im letzten catagenen Stadium vor, wenige schon im telogenen Stadium. Die Dermale Papille war bis zur Grenze der Subkutis und Dermis zurückgewandert. Die Haarfollikel der FA2H defizienten Mäuse zeigten zum gleichen Zeitpunkt Merkmale, die typisch sind für die catagenen Stadien II bis IV: Der Durchmesser des Haarfollikelbulbs hat weiter abgenommen, die Form der Dermalen Papille ist typisch für die entsprechenden Stadien. Wildtyp-Tiere, die einen Tag älter sind, zeigen sehr ähnliche Stadien wie am Tag 18 nach der Geburt. Die Regression der Haarfollikel nimmt währenddessen in den Knock-out-Tieren weiter zu. Die zu beobachtenden Stadien sind die catagenen Stadien V bis VII, einige wenige befinden sich bereits im catagenen Stadium VIII. Am 21. Tag nach der Geburt sind nahezu alle Haarfollikel der Wildtyp-Haut im Ruhestadium angekommen. Die Haut der FA2H defizienten Mäuse zeigt demgegenüber weiterhin Haarfollikel der catagenen Stadien VI bis VIII. Dies ist in Abb. 4-25 B illustriert, in der man NCAM-gefärbte Gefrierschnitte der Haut sieht. Die Dermale Papille ist gefärbt und befindet sich in der Wildtyp-Haut bereits vollständig in der Dermis. Die Haut ist schon wieder sehr dünn. In der Haut der FA2H defizienten Mäuse sieht man zum gleichen Zeitpunkt hingegen noch NCAM-positive Fibroblasten, die die typische Spur unterhalb der nach „oben“ wandernden Dermalen Papille bilden. Dies ist ein Merkmal für das catagene Stadium VII. Am 23. Tag nach der Geburt sieht die Haut sehr ähnlich aus wie 2 Tage zuvor. Die Wildtyp-Haut verweilt im Ruhezustand, die Knock-out-Haut befindet sich noch immer im späten catagenen Stadium.

Abschließend ist zu diesen Untersuchungen zu sagen, dass bis zum bestehenden Zeitpunkt in der Haut von FA2H-Knock-Out-Mäusen kaum Haarfollikel des telogenen Stadiums zu beobachten waren. Konnten diese gefunden werden, so schien die Dauer der telogenen Phase deutlich verkürzt, da nach einer verlängerten catagenen Phase etwa zum gleichen Zeitpunkt wie bei der Wildtyp-Haut die Wachstumsphase erneut initiiert wurde. Dies war zum Beispiel bei der untersuchten Altersstufe P28 der Fall.

### 4.5.3 Analyse der Lipidzusammensetzung der Haut FA2H defizienter Mäuse

Bei dieser Analyse sollte der Versuch unternommen werden, dem makroskopisch und mikroskopisch zu beobachtenden Haut- und Haarphänotyp, der durch das Fehlen des FA2H Enzyms in den Talgdrüsen entstand, eine Veränderung auf biochemischer Ebene zuzuordnen. Dazu wurden die Lipide der Haut verschiedener Altersstufen extrahiert und auf ihre Zusammensetzung hin dünnschichtchromatographisch analysiert.



**Abb. 4-26: Analyse der Epidermislipide neugeborener und adulter FA2H defizienter Mäuse**

A und B zeigen die Lipide aus der Epidermis von Mäusen des Alters P0. Es wurden jeweils Lipide, die aus 500 µg Epidermistrockengewicht extrahiert wurden, aufgetragen. In A wurden die Ceramide aufgetrennt und dafür das DC-Laufmittel Ceramide verwendet. In B erfolgte eine Auftrennung für Glukosylceramid und Sphingomyelin mit Hilfe des DC-Laufmittels Sphingolipide.

C und D stellen das Ergebnis der Auftrennung der Epidermislipide von 75 Tage alten Mäusen dar. Hier wurden Lipide entsprechend 1 mg Epidermistrockengewicht aufgetragen. In C erfolgte eine Analyse mittels einem Laufmittel für die Auftrennung der Ceramide, in D für Glukosylceramid und Sphingomyelin. FA2H<sup>+/+</sup>, +/- = FA2H<sup>+del[LacZ]</sup> -/- = FA2H<sup>del[LacZ]del[LacZ]</sup>.

Für die Untersuchung der Zusammensetzung der Lipide der Epidermis wurden je Altersstufe und angezeigtem Genotyp 3 verschiedene Tiere herangezogen. Abb. 4-26 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Experimente.

Für die beiden analysierten Altersstufen konnten in den FA2H-Knock-Out-Mäusen Lipide ausgemacht werden, die auf der gleichen Höhe wie der Standard für  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide laufen. Diese sollten nach vorherigen Hypothesen und Arbeiten (Uchida et al., 2007) jedoch von der FA2H gebildet werden und somit in den Knock-out-Geweben nicht mehr vorliegen und in der Haut Neugeborener Mäuse noch nicht vorkommen, da die Expression der FA2H erst mit der Bildung der Sebozyten startet. Zur Erklärung warum trotzdem Lipide auf der Höhe der  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide laufen, scheinen mehrere Ansätze denkbar: Es könnte ein weiteres Enzym geben, das für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Ceramide verantwortlich ist und das in FA2H-Knock-Out-Mäusen folglich nicht defekt ist. Es könnte auch sein, dass die Lipide, die auf der Höhe der  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide laufen, andere als die deklarierten Lipide sind. Das ist nach dem Vergleich der Laufstrecken nicht ohne weiteres auszuschließen. Die Hydroxylierung könnte nicht am  $\alpha$ -C-Atom liegen, sondern an einer anderen Stelle. Darüber wurde für die humanen Ceramide berichtet. Hier wurde beobachtet, dass ein Ceramid, welches am C-6 des Sphingosins hydroxyliert ist, genauso migriert wie  $\alpha$ -hydroxyliertes Ceramid. Des Weiteren könnten Mikroben auf der Hautoberfläche für die  $\alpha$ -Hydroxylierung verantwortlich sein.

Die Analyse der Lipide aus der Epidermis von neugeborenen Mäusen erbrachte damit insgesamt keine Unterschiede in der Zusammensetzung. Abb. 4-26 A zeigt die Analyse der Ceramide der Haut, Abb. 4-26 B die Analyse für Glukosylceramid und Sphingomyelin. Weder für heterozygote Mäuse noch für FA2H defiziente Tiere konnte zu diesem Zeitpunkt eine Veränderung der Lipidkomponenten in der Haut beobachtet werden.

Abb. 4-26 C und D zeigen die Lipide aus der Epidermis von adulten Tieren. Bedingt durch die Präparation kommt es bei dieser Extraktion wohl auch immer zur Anreicherung der Lipide aus weiteren Hautschichten als der Epidermis und der Lipide, die sich auf der Hautoberfläche befinden. Zudem wurden die Haare als Ausgangsmaterial mitextrahiert. Damit kommt es zur Anreicherung von Oberflächenlipiden in den Proben. Bei adulten Tieren konnten in der Zusammensetzung der Lipide der Haut einige Unterschiede ausgemacht werden.

Trennt man die Lipide spezifisch für die Ceramide der Haut auf, so lassen sich auch die freien Fettsäuren als zwei einzelne, wenn auch unterschiedlich starke, Banden erkennen

(siehe Abb. 4-26 C). Diese migrieren bei den Knock-out-Proben ähnlich wie bei den Kontrollen, jedoch sind insgesamt deutlich weniger freie Fettsäuren der gleichen Zusammensetzung als bei den Kontrollen enthalten.

Auf der Höhe des Standards für die nicht-hydroxylierten Ceramide scheinen bei den Kontrollen mengenmäßig deutlich mehr Lipide zu wandern als dies bei den Proben aus FA2H defizienten Mäusen der Fall ist. Die FA2H-Knock-Out-Mäuse zeigen auf dieser Höhe eine Doppelbande. Ob auch in der Kontrolle eine Doppelbande vorliegt, ist aus der Dünnschicht nicht ohne Weiteres zu erkennen, so dass für diese Lipide nur festzuhalten bleibt, dass die Menge bei FA2H defizienten Mäusen erniedrigt zu sein scheint.

In den Kontrollen kann auf der Höhe des Standards für  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide eine Doppelbande erkannt werden. Diese Doppelbande ist anscheinend im Knock-Out nicht mehr vorhanden oder zumindest ist eine der Banden stark abgeschwächt. Die Stärke der oberen Bande scheint bereits bei den Proben aus der Epidermis von Mäusen mit einem mutierten FA2H-Allel abzunehmen.

Lipide auf der Höhe des Glukosylceramidstandards zeigten in den Wildtyp-Proben 2 Banden, bei den Knock-out-Proben nur noch eine Bande. Dies war in der vorliegenden Analyse der Lipide aus der Epidermis der Rückenhaut jedoch nicht ohne Weiteres erkennbar, da scheinbar zuviel unerwünschte Oberflächenlipide ebenfalls extrahiert wurden. Bei der Extraktion der Lipide der Epidermis aus Ohrmaterial konnte das Fehlen einer Bande, die einer Glukosylceramid Form zuzurechnen ist, nachgewiesen werden (von Matthias Eckhardt durchgeführt, daher hier keine Abbildung gezeigt). Lipide, die auf der gleichen Höhe wie der Standard für Sphingomyelin wandern, zeigten bei adulten Knock-out-Tieren eine Verstärkung der untersten von 4 Banden (siehe Abb. 4-26 D). Diese Verstärkung trat schon zu einem gewissen Anteil bei heterozygoten Tieren auf und war bei FA2H defizienten Tieren noch stärker ausgeprägt.

## **4.6 Generierung und Analyse einer transgenen Mauslinie mit oligodendrozyten-spezifischer Expression der CGT**

### **4.6.1 Generierung einer transgenen Maus mit oligodendrozyten-spezifischer Expression der CGT**

Mäusen mit einer ubiquitären Defizienz für das Enzym Galaktosyltransferase (CGT) fehlen die Sphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid (Bosio et al, 1996; Coetzee et al. 1996). Dennoch führen die Oligodendrozyten in dieser Mausmutante eine Myelinisierung durch. Das gebildete Myelin ist instabil und es kommt zu einer progressiven Demyelinisierung mit fortschreitendem Alter. Dies äußert sich zum Beispiel in schwerwiegenden motorischen

Koordinationsdefekten (Bosio et al, 1996; Coetzee et al. 1996). In einigen Arbeiten der letzten Zeit wurde gezeigt, dass die CGT in Wildtyp-Mäusen nicht nur in Oligodendrozyten, sondern auch in Neuronen und Astrozyten exprimiert wird (Schaeren-Wiemers et al., 1995; Pernber et al., 2002; Molander-Melin et al., 2004).

Um herauszufinden, ob das Fehlen des Enzyms CGT in den Neuronen und Astrozyten des zentralen Nervensystems anteilig zur Entwicklung des Phänotyps beiträgt oder ob ausschließlich die fehlende Expression in den Oligodendrozyten für die schwerwiegende Schädigung verantwortlich ist, wurden transgene Mäuse generiert, die das Enzym CGT ausschließlich in den Oligodendrozyten, jedoch nicht in den Neuronen und Astrozyten exprimieren. Hierzu wurden transgene Mäuse, die das Enzym CGT unter dem Promotor PLP spezifisch in Oligodendrozyten überexprimieren (Fewou et al., 2005), mit CGT defizienten Mäusen (freundlicherweise von Brian Popko zur Verfügung gestellt) verpaart. Die transgenen Mäuse mit der Überexpression der CGT in Oligodendrozyten wurden als PLP-CGT transgene Mäuse bezeichnet. Frühere Analysen zeigten, dass eine starke Überexpression der CGT zu instabilem Myelin und zu einer Demyelinisierung führte. Währenddessen zeigte eine Überexpression der CGT auf einem niedrigen Level keinen Einfluss auf die Stabilität des Myelins. Tiere dieser gering überexprimierenden Linie wurden für die Verpaarungen mit  $cgT^{+/-}$ -Mäusen verwendet. Das Konstrukt zur Herstellung der PLP-CGT transgenen Mäuse ist in Abb. 4-27 A dargestellt. Aus dieser Verpaarung resultierten Nachkommen, die die CGT exklusiv in Oligodendrozyten exprimieren sollten (siehe Abb. 4-27 B). Diese Nachkommen aus der oben beschriebenen Verpaarung wurden CGT/ $cgT^{-/-}$ -Mäuse genannt.

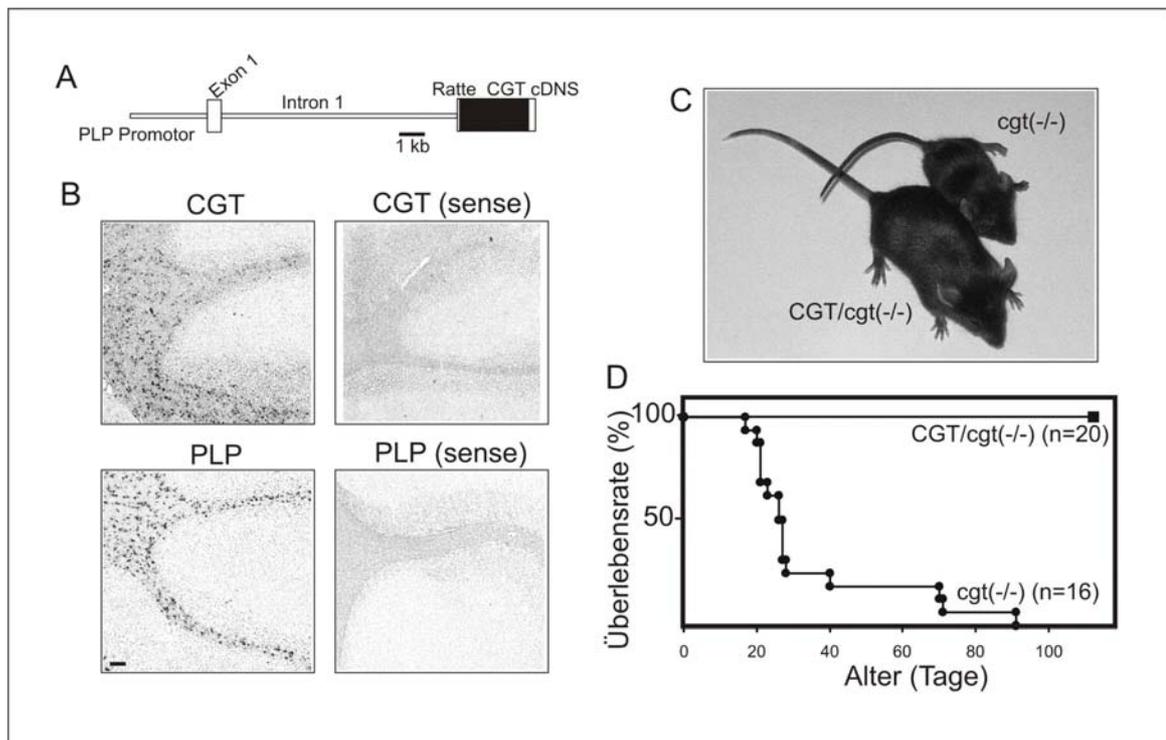


Abb. 4-27: PLP-CGT/ $cgT^{-/-}$  transgene Mäuse

A zeigt das Konstrukt zur Generierung der PLP-CGT transgenen Mäuse mit dem PLP-Promotor und der cDNA der CGT aus Ratte. In Abbildung B ist das Ergebnis einer *In-situ*-Hybridisierung mit CGT- bzw. PLP-cRNA Sonden, die mit Digoxigenin markiert wurden, zu sehen. C zeigt das Bild einer CGT/cgt(-/-) transgenen Maus im Vergleich mit einer CGT defizienten Maus. D gibt einen Überblick über die Überlebensrate der CGT/cgt(-/-) transgenen Maus im Vergleich mit der CGT defizienten Maus.

Bei der *In-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten CGT-cRNA-Sonde konnte die transgene Expression des Enzyms CGT in den CGT/cgt(-/-)-Mäusen ausschließlich in der weißen Substanz ausgemacht werden. In Abb. 4-27 B ist beispielhaft ein Ausschnitt des Kleinhirns dargestellt. Die parallel durchgeführte *In-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten PLP-cRNA-Sonde zeigte ein fast identisches Färbemuster. PLP wurde als Marker für Oligodendrozyten verwendet. Die übereinstimmenden Färbungen lassen vermuten, dass die CGT in den CGT/cgt(-/-)-Mäusen exklusiv in den Oligodendrozyten exprimiert wurde. Die Hybridisierung mit den jeweiligen Sense-Sonden brachte kein Signal.

Die äußere Erscheinung der CGT/cgt<sup>-/-</sup> transgenen Maus entsprach derjenigen einer Wildtyp-Maus. Dies war besonders deutlich im Vergleich mit einer CGT defizienten Maus aus dem gleichen Wurf zu erkennen (siehe Abb. 4-27 C). Die CGT defizienten Mäuse lassen rasch nach der Geburt einen Entwicklungsrückstand erkennen. Dies war bei den CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen keineswegs der Fall. Sie entwickelten sich ähnlich wie die Kontrolltiere des gleichen Wurfs und zeigten keinerlei äußerlich sichtbare Retardierung der Entwicklung.

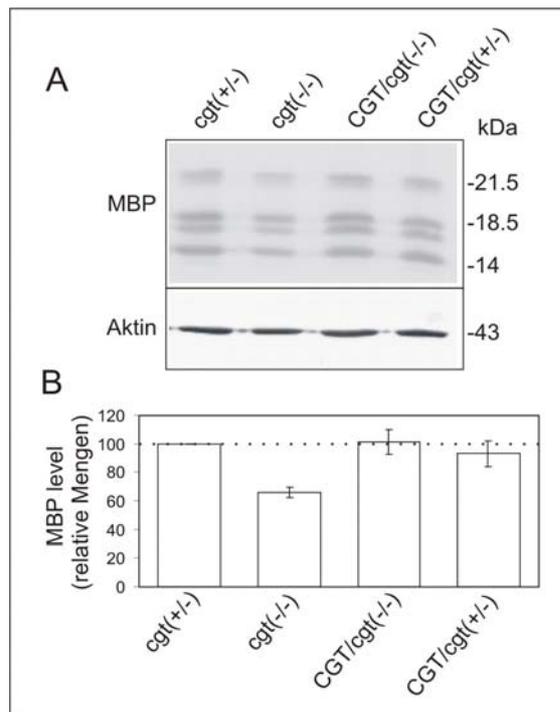
Die Überlebensrate der CGT defizienten Mäuse ist deutlich reduziert. Die meisten Tiere überleben nur bis zu einem Alter von etwa 3 Wochen. Im Vergleich dazu zeigten die Mäuse mit einer transgenen Expression der CGT nur in den Oligodendrozyten über den gesamten Beobachtungszeitraum von etwa einem Jahr eine normale Überlebensrate, die der des Wildtyps entspricht (siehe Abb. 4-27 D).

#### 4.6.2 Biochemische Analyse der CGT/cgt(-/-) transgenen Maus

Nachdem in den generierten CGT/cgt(-/-)-Mäusen die Expression der CGT im zentralen Nervensystem ausschließlich in den Oligodendrozyten gefunden wurde, wurden diese Mäuse diversen biochemischen Analysen unterzogen. Bei den folgenden Untersuchungen dienten als Kontrollen zum Einen die CGT defizienten Mäuse (cgt(-/-)) und die heterozygoten CGT-Knock-Out-Mäuse (cgt(+/-)) und zum Anderen die CGT/cgt(+/-)-Mäuse. Die letzteren zeigen eine Überexpression der CGT unter der Kontrolle des PLP-Promotors in Mäusen, die ubiquitär heterozygot für das CGT-Gen sind. Da heterozygote CGT-Knock-Out-Mäuse keinen Phänotyp aufweisen, wurden die cgt(+/-)-Tiere als Kontrollen verwendet. Die CGT/cgt(+/-)-Mäuse wurden verwendet, um Effekte durch das PLP-CGT-Transgen zu kontrollieren.

#### 4.6.2.1 Analyse der MBP-Level im Gehirn von *CGT/cgt(-/-)* transgenen Mäusen

Das basische Myelin Protein (MBP) wurde als Marker für das Myelin verwendet. Kommt es zu einer starken Demyelinisierung, so sind reduzierte Mengen für MBP im Gehirn zu erwarten. Für die Analyse der MBP-Level des Gehirns wurden 30 Tage alte Mäuse der unterschiedlichen Genotypen herangezogen. Der resultierende Western-Blot mit je 40 µg Proteinladung je Bahn und die quantitative Auswertung von 3 unabhängigen Versuchen sind in Abb. 4-28 dargestellt.



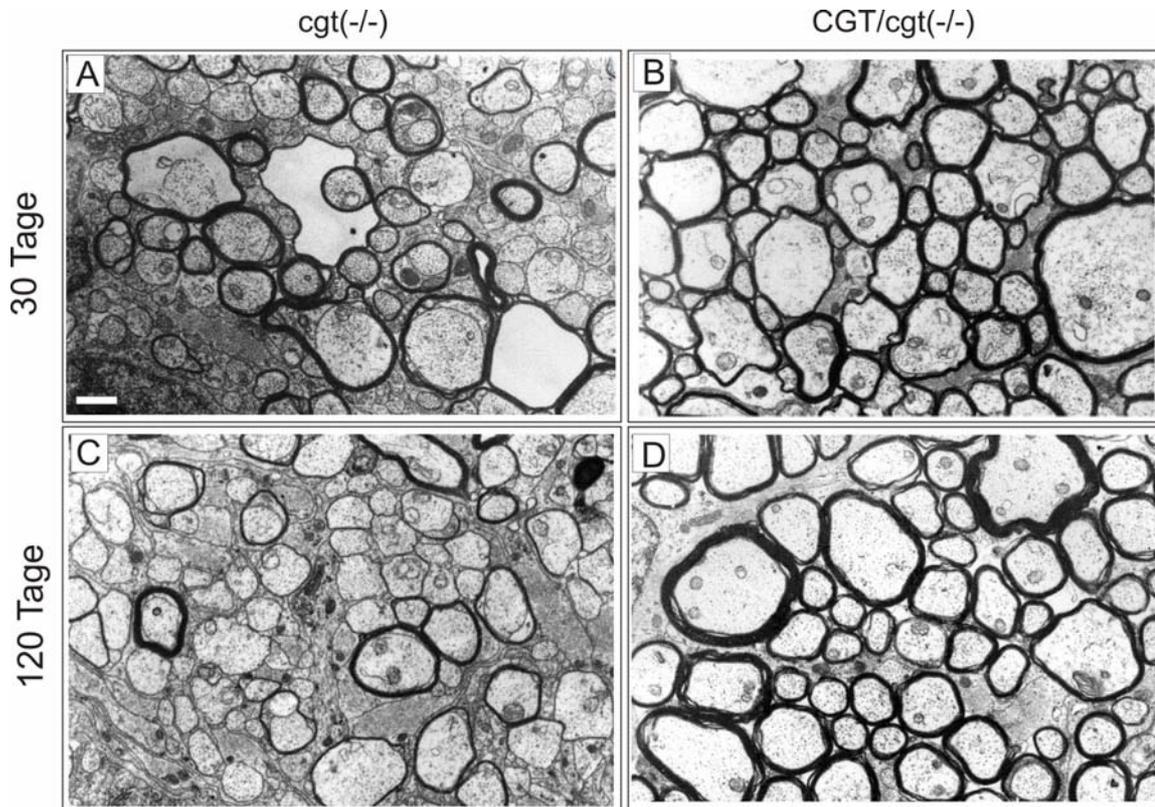
**Abb. 4-28: MBP-Expression in CGT-Knock-Out- und CGT/*cgt(-/-)*-Mäusen**

A: Western-Blot für MBP des Gehirns von 30 Tage alten Mäusen der verschiedenen Genotypen. Der MBP-Antikörper wurde 1:5000 verdünnt eingesetzt.

B: Die quantitative Auswertung von 3 unabhängigen Western-Blots, bei der das MBP-Signal für alle Isoformen zusammengefasst und auf das  $\beta$ -Aktin-Signal desselben Blots normalisiert wurde, ist gezeigt. Das MBP-Level der *cgt(+/-)*-Mäuse wurde als 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die errechneten Standardabweichungen an.

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine Reduktion der MBP-Level bei den CGT defizienten Mäusen. Dies war für alle Isoformen des MBP gleichermaßen zu beobachten. Durch Normalisierung der MBP-Signale auf  $\beta$ -Aktin und durch die Durchführung dreier unabhängiger Versuche, war eine quantitative Auswertung der MBP-Level möglich. Die entsprechenden normalisierten MBP-Level der heterozygoten CGT-Knock-Out-Mäuse (*cgt(+/-)*) wurden als 100% gesetzt. Im Vergleich hierzu war eine Reduktion der MBP-Level bei CGT-Knock-Out-Mäusen um etwa 30% zu erkennen. Währenddessen zeigten die Tiere, die die CGT im zentralen Nervensystem ausschließlich in den Oligodendrozyten exprimieren, keine Veränderung der Menge an MBP im Gehirn (PLP-*CGT/cgt(-/-)*). Die Kontrollen für die Überexpression des CGT-Transgens, *CGT/cgt(+/-)* Mäuse, zeigten eine leichte Reduktion.

Diese Ergebnisse ließen erste Vermutungen zu, dass es nicht zu einer Demyelinisierung in CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen kam. Um genauere Informationen über die Ultrastruktur des Myelins zu erhalten, wurde der optische Nerv von CGT defizienten und CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen im Alter von 30 Tagen und 120 Tagen elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Untersuchungen wurden von Herrn Prof. Dr. H. Büssow vom Anatomischen Institut der Universität Bonn durchgeführt (siehe Abb 4-29).



**Abb. 4-29: Elektronenmikroskopische Analyse des optischen Nerven von CGT-Knock-Out-Mäusen und CGT/cgt(-/-)-Mäusen**

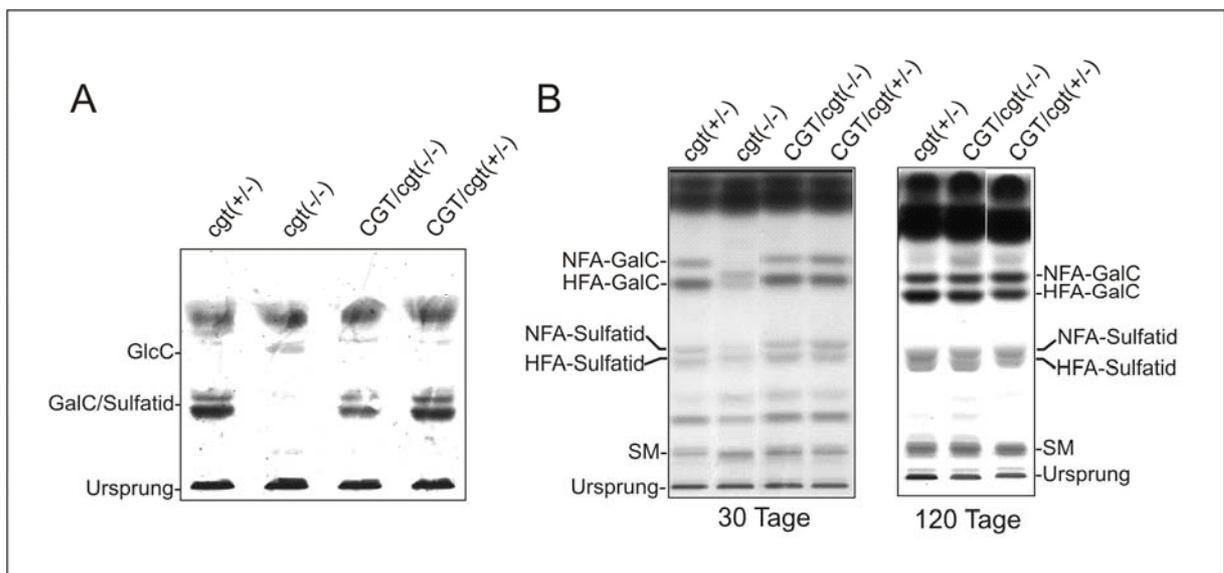
Gezeigt ist das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Analyse des optischen Nerven im Querschnitt von CGT-Knock-Out-Mäusen (A und C) und CGT/cgt(-/-)-Mäusen. Die Bilder wurden von Herrn Prof. Dr. H. Büssow vom Anatomischen Institut der Universität Bonn angefertigt.

Die Analyse des Querschnitts des optischen Nerven zeigte für CGT defiziente Mäuse wie erwartet schwerwiegende Defekte in der Myelinisierung bei 30 Tage alten Mäusen und auch Anzeichen für eine starke Demyelinisierung bei 120 Tage alten Tieren. Die starke Vakuolarisierung im Myelin und die nicht ausreichend vorhandene Kompaktierung sind Anzeichen für Defekte in der Myelinisierung (Abb. 4-29 A). Diese traten bei den 30 Tage alten CGT/cgt(-/-)-Mäusen nicht auf (Abb. 4-29 B). Die Demyelinisierung in älteren Tieren ist an zahlreichen unmyelinisierten oder hypomyelinisierten Axonen in den Knock-Out-Mäusen zu erkennen (siehe Abb. 4-29 C im Vergleich mit 4-29 D). Die Axone in den CGT/cgt(-/-)-Mäusen wiesen normale Myelinscheiden auf, deren Dicke dem Durchmesser des Axons angemessen war und die kompaktiert waren (siehe Abb. 4-29 D). Die gefunden

Veränderungen bei den CGT-Knock-Out-Mäusen entsprechen den in der Literatur beschriebenen pathologischen Veränderungen im Myelin von CGT-Knock-Out-Mäusen (Coetzee et al., 1998). Insgesamt wiesen die CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen keinerlei Anzeichen für Störungen im Myelin auf (siehe Abb. 4-29 B und D), sondern glichen vielmehr Wildtyp-Mäusen.

#### 4.6.2.2 Analyse der Lipide des Gehirns von CGT/cgt(-/-)- Mäusen

In CGT defizienten Mäusen kommt es zu einer deutlichen Veränderung der Lipidzusammensetzung des Myelins. Galaktosylceramid und Sulfatid können nicht mehr gebildet werden. Kompensatorisch kommt es zu einer Heraufregulierung des Glukosylceramids. Sollte die Expression der CGT in den Oligodendrozyten zu einer Wiederherstellung eines Wildtyp-ähnlichen Zustandes des Myelins führen, so sollte die Zusammensetzung der Sphingolipide im Gehirn wieder denen des Wildtyps entsprechen. Um dies zu analysieren wurden die Lipide des Gehirns von 30 Tage und 120 Tage alten Mäusen der unterschiedlichen Genotypen untersucht (siehe Abb. 4-30). Bei der Analyse der 120 Tage alten Tiere wurden die CGT defizienten Mäuse nicht mehr berücksichtigt, da sie aufgrund der geringen Lebenserwartung dieses Alter zumeist nicht mehr erreichten.

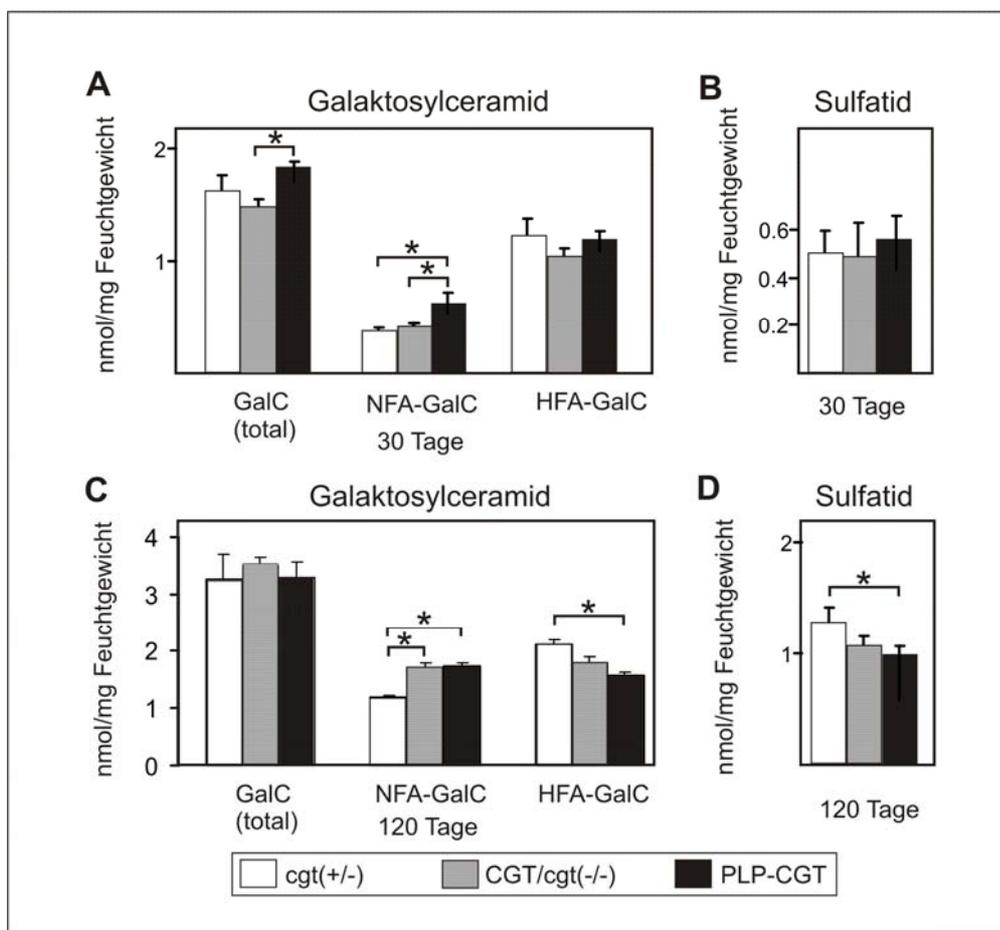


**Abb. 4-30: Lipidanalyse des Gehirns von CGT/cgt(-/-) transgenen Mäusen**

Es wurden jeweils die Lipide, die aus 1 mg Gehirn-Gewebefeuchtgewicht isoliert wurden, aufgetragen. Die entsprechenden Standards wurden auf der gleichen Dünnschicht aufgetragen. In beiden Fällen wurden HPTLC Kieselgelplatten verwendet. A: Analyse des Glukosylceramids von 30 Tage alten Mäusen der angegebenen Genotypen. Laufmittel = DC-Laufmittel Glukosylceramid. B: Analyse von Galaktosylceramid und Sulfatid von 30 Tage und 120 Tage alten Mäusen der angegebenen Genotypen. Laufmittel = DC-Laufmittel Sphingolipide: GlcC = Glukosylceramid; NFA-GalC = nicht-hydroxyliertes Galaktosylceramid; HFA-GalC =  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid; NFA-Sulfatid = nicht-hydroxyliertes Sulfatid; HFA-Sulfatid =  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid; SM = Sphingomyelin.

Die Analyse des Glukosylceramids (siehe Abb. 4-30 A) brachte wie in der Literatur beschrieben erhöhte Mengen in den CGT defizienten Mäusen (Bosio et al, 1996; Coetzee et al. 1996). CGT/cgt(-/-) transgene Mäuse zeigten keine erhöhten Level von Glukosylceramid bei einem Alter von 30 Tagen, sondern ein den Kontrollen vergleichbar niedriges Niveau.

In Abb. 4-30 B ist das Ergebnis der Analyse weiterer Glykosphingolipide zu sehen, wobei das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung des Galaktosylceramids und des Sulfatids lag. CGT defiziente Mäuse zeigen weder Galaktosylceramid noch Sulfatid in der Dünnschichtchromatographie. Statt dessen sind kompensatorisch gebildete weitere Lipidspezies wie Glukosylceramid zu erkennen. Bei einem Alter von 30 Tagen zeigten alle 3 weiteren untersuchten Genotypen das dem Wildtyp entsprechende Verhältnis von nicht-hydroxyliertem Galaktosylceramid zu  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid von etwa 1:3. Die Analyse der verschiedenen Galaktosylceramid-Spezies und der verschiedenen Sulfatid-Spezies wurde jeweils an verschiedenen Tieren je Genotyp durchgeführt. Dadurch war eine quantitative Auswertung der unterschiedlichen Mengen möglich (siehe Abb. 4-31).



**Abb. 4-31: Quantitative Auswertung der Lipide in CGT/cgt(-/-)-Mäusen**

Es sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Lipidanalyse von 30 Tage (A und B) und 120 Tage (C und D) alten Mäusen dargestellt. Je Altersstufe und Genotyp wurden 3 Tiere analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar, ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an (T-Test,  $p < 0,05$ ). NFA-GalC = nicht-hydroxyliertes Galaktosylceramid; HFA-GalC =  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid.

Abb. 4-31 zeigt das Ergebnis der quantitativen Auswertung der Lipidanalyse, die an den Genotypen *cgt(+/-)*, *CGT/cgt(-/-)* und *PLP-CGT* an jeweils 3 verschiedenen Tieren durchgeführt wurde. Bei 30 Tage alten Mäusen war kein statistisch signifikanter Unterschied in der analysierten Lipidmenge zwischen der Kontrolle *cgt(+/-)* und den *CGT/cgt(-/-)*-Mäusen, die die *CGT* ausschließlich in den Oligodendrozyten exprimieren, zu erkennen (siehe Abb.4-31 A und B). Die *PLP-CGT*-Mäuse, die sowohl endogenes *CGT* als auch transgenes *CGT* exprimieren, zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg in der Menge des nicht-hydroxylierten Galaktosylceramids.

Bei einem Alter von 120 Tagen betrug das Verhältnis von nicht-hydroxyliertem Galaktosylceramid zu  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid im *cgt(+/-)*-Genotyp, der die Kontrolle repräsentiert, noch etwa 1:2. In den beiden übrigen Genotypen, die das Enzym *CGT* unter der Kontrolle des *PLP*-Promotors überexprimierten, war dieses Verhältnis auf etwa 1:1 reduziert. Hierfür verantwortlich waren sowohl ein Anstieg des nicht-hydroxylierten Galaktosylceramids als auch eine Reduktion des  $\alpha$ -hydroxylierten Galaktosylceramids (siehe Abb. 4-31 C). Der Anstieg des nicht-hydroxylierten Galaktosylceramids geht konform einher mit einem Anstieg der gemessenen Enzymaktivität für die Galaktosylceramidtransferase im Gehirnhomogenat (Daten nicht gezeigt).

Die Mengen an Sulfatid sind bei 30 Tage alten Mäusen für die 3 Sulfatid-bildenden Genotypen vergleichbar (siehe Abb. 4-31 B). Beim Alter von 120 Tagen kommt es zu einer signifikanten Reduktion des Sulfatidgehalts bei *CGT* überexprimierenden Mäusen, die zusätzlich noch endogenes *CGT*-Enzym besitzen, wenn man sie mit der Kontrolle vergleicht, die ausschließlich endogenes *CGT* exprimiert (siehe Abb. 4-31 D).

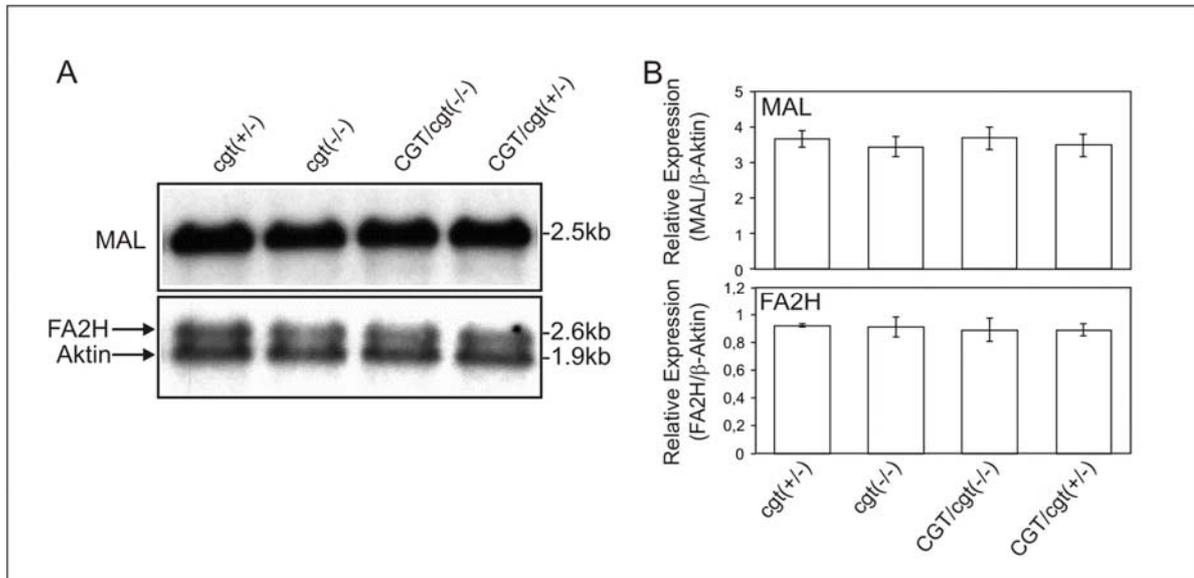
#### **4.6.2.3 Expressionsanalyse für *FA2H* und *MAL* in *CGT/cgt(-/-)*-Mäusen**

Die zuvor beschriebene Hochregulierung der Menge an Glukosylceramid war vor allem durch einen massiven Anstieg der Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Glukosylceramid bedingt. Des Weiteren kommt es in *CGT* defizienten Mäusen zu einem Auftreten von  $\alpha$ -hydroxyliertem Sphingomyelin, welches im Myelin von Wildtyp-Mäusen nicht vorkommt (Coetzee et al., 1996). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese Veränderungen in den  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden in den *CGT* defizienten Mäusen und die Veränderungen in den *PLP-CGT* transgenen Mäusen (siehe 4.6.2.2) durch eine veränderte Expression der *FA2H* hervorgerufen wurden.

Außerdem wurde bei der Analyse der Arylsulfatase A defizienten Mäuse, die deutlich erhöhte Sulfatid-Level u. a. im Gehirn aufweisen, festgestellt, dass *MAL* Sulfatid binden kann (Yaghoofam et al., 2005). Da bei den *CGT* defizienten Mäusen kein Sulfatid zu finden war und bei den *PLP-CGT* transgenen Mäusen reduzierte Sulfatid-Mengen zu verzeichnen

waren, könnte eine Veränderung der Expression des Enzyms MAL in diesen Mäusen auftreten.

Die Expressionsanalyse der beiden genannten Enzyme wurde mit der RNA des Gehirns von 30 Tage alten Mäusen aller Genotypen durchgeführt. Abb. 4-32 A zeigt das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse. In Abb. 4-32 B ist die quantitative Auswertung der auf  $\beta$ -Aktin normierten Signale von 3 unabhängigen Versuchen zu sehen.



**Abb. 4-32: Northern-Blot-Analyse der FA2H- und MAL-Expression im Gehirn**

A: Ergebnis der Northern-Blot-Analyse des Gesamtgehirns von 30 Tage alten Mäusen der genannten Genotypen. Je Bahn wurden 20  $\mu$ g RNA geladen. Die Hybridisierung erfolgte entweder mit einer MAL-, FA2H- oder  $\beta$ -Aktin-cDNA-Sonde. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus 3 unabhängigen Analysen. B: Quantitative Auswertung der Signale des Northern-Blots, die auf das jeweilige  $\beta$ -Aktin-Signal standardisiert wurden, dabei zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichungen an, die sich bei der Analyse errechneten.

Die Hybridisierung mit der FA2H-cDNA-Sonde erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den CGT defizienten Mäusen. Auch die CGT/cgt(-/-) transgenen Mäuse und die PLP-CGT transgenen Mäuse zeigten den Kontrollen vergleichbare Expressionslevel für die  $\alpha$ -Hydroxylase.

Die Auswertung der MAL-Expressionslevel zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Die Expression schien in allen 4 untersuchten Genotypen in etwa gleichermaßen aufzutreten.

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Herstellung eines *targeting*-Konstrukts zur Generierung einer konventionellen FA2H-Total-Knock-Out-Mausmutante und die phänotypische Analyse der FA2H-Knock-Out-Mauslinie. Des Weiteren wurden die Einflüsse einer exklusiven Expression der CGT in Oligodendrozyten auf die Myelinisierung und den Myelinerhalt untersucht.

### 5.1 Der Knock-Out des FA2H-Gens

Das Gen der FA2H zeigt hochkonservierte Bereiche und wird im Säuger in einigen Geweben exprimiert. Die Aktivität des Enzyms führt zur Bildung  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide (Eckhardt et al., 2005; Alderson et al., 2006), die in Organen wie dem Gehirn und der Niere und dem Intestinaltrakt vorkommen. Im Myelin sind die  $\alpha$ -hydroxylierten Cerebroside die am häufigsten vertretenen Lipide. Trotzdem ist die spezielle Funktion dieser  $\alpha$ -hydroxylierten Spezies in den Geweben noch weitgehend unverstanden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Funktion  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide zu gewinnen.

Es konnte in dieser Arbeit in einem Tiermodell zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Ausschalten des Enzyms FA2H tatsächlich zum Verschwinden der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide in den Geweben führt. Dies hatte je nach Gewebe unterschiedliche Auswirkungen und führte zum Teil zu pathologischen Veränderungen.

#### 5.1.1 Der FA2H-Knock-Out und seine Auswirkungen auf das Nervensystem

Die ursprüngliche Fragestellung bei der Generierung einer FA2H defizienten Maus hatte ein Hauptgewicht auf der Frage nach dem Einfluss des Fehlens  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide im Nervensystem der Maus und dort speziell im Myelin. Auf die gemachten Beobachtungen Betreff des Nervensystems soll hier im ersten Teil im Kontext mit der Expressionsanalyse des Proteins eingegangen werden.

##### ***5.1.1.1 Generierung einer FA2H defizienten Maus mittels eines Knock-In ergibt die Möglichkeit der Expressionsanalyse anhand des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal***

Der erste gewählte Ansatz zur Generierung einer FA2H-Knock-Out-Maus sollte zum totalen Knock-Out des Enzyms führen. Dafür wurde in den klonierten Austauschvektor pIZ1-LacZ

ein LacZ-Reporterprotein anstelle der Exons 3 und 4 des FA2H-Lokus eingefügt. Die stabile Transfektion von ES-Zellen mit diesem Vektor erbrachte 4 homolog rekombinierte ES-Zellklone aus 150 analysierten Zellklonen. Dies konnte sowohl mittels PCR als auch Southern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Damit lag eine homologe Rekombinationsrate von 2,7 % vor. Die Blastozysten-Injektion eines der 4 homolog rekombinierten ES-Zellklone brachte 3 keimbahngängige Chimäre hervor, die die Basis für alle weiteren Verpaarungen darstellten. Northern-Blot- und *In-situ*-Hybridisierung erbrachten in Geweben der FA2H-Knock-Out-Mäuse den Beweis, dass im Gehirn der FA2H defizienten Mäuse die mRNA des Enzyms nicht mehr gebildet wird. Durch die Verwendung des Knock-In-Konstruktes wurde in allen heterozygoten und homozygoten Nachkommen das Reporterprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal anstelle der FA2H in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Die Expression der FA2H in verschiedenen Geweben ist bereits aus früheren Arbeiten bekannt (Eckhardt et al., 2005 für die Maus und Alderson et al., 2004 für menschliche Gewebe). Die Verwendung eines Reporterproteins, das als Fusionsprotein aus der von den Exons 1 und 2 kodierten Cytochrom-b5-Domäne und der  $\beta$ -Galaktosidase funktionell exprimiert wird, ermöglichte in dieser Arbeit erste Erkenntnisse über die Expression des Proteins in den einzelnen Zelltypen der FA2H exprimierenden Geweben. Mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung konnten bereits zuvor Zellen der weißen Substanz im Gehirn als für das mFA2H-Transkript positiv ausgemacht werden (Eckhardt et al., 2005). Nun lag zudem die Möglichkeit vor, das LacZ-Reporterprotein in den Zellen nachzuweisen und somit die FA2H-Expression zu simulieren. Dies war zuvor nicht möglich, da ein Antikörper gegen das Enzym FA2H nicht verfügbar war. Die Signale der *In-situ*-Hybridisierung und des Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterproteins lagen in den gleichen Hirnregionen vor. Dies unterstrich die Glaubhaftigkeit der durch das Reporterprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal simulierten FA2H-Expression. Mit dessen Hilfe konnten in weiteren Organen erste Hinweise auf die Regionen der einzelnen Gewebe gewonnen werden, die FA2H exprimieren. In der Niere sind dies Zellen der Markregion. Beim Magen sind die Wand des Drüsenmagens und äußerste Schichten des Vormagens spezifisch für das Cyt-b5- $\beta$ -gal Reporterprotein gefärbt. In allen analysierten Geweben konnte eine entwicklungsabhängige Zunahme der FA2H-Expression beobachtet werden. In der Niere und dem Gehirn konnte diese Entwicklung von einem vergleichsweise niedrigen Level in der ersten Lebenswoche stufenweise zu einem hohen Level in der vierten Lebenswoche gezeigt werden. Im Magen und der Haut lagen bereits in der ersten Lebenswoche vergleichsweise hohe Expressionslevel vor, die aber auch hier noch weiter zunahmen. Die Expression der FA2H trat damit erwartungsgemäß in Zellen der Gewebe auf, die  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide aufweisen (Karlsson et al., 1969 und 1973). Die Analyse der Zelltypen, die FA2H exprimieren, kann mit diesem Ansatz noch fortgeführt werden. Die Zelltypen können

spezifiziert werden, indem für die unterschiedlichen Zelltypen spezifische Marker zur Co-Färbung herangezogen werden.

#### **5.1.1.2 In der Zusammensetzung verändertes Myelin zeigt weitestgehend normale Funktionen**

Die Lipidanalyse des Gehirns und der Ischiasnerven erbrachte den Beweis, dass in den FA2H defizienten Geweben nicht länger  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide vorhanden sind. Es fehlten nachweislich die Lipidarten  $\alpha$ -hydroxylierte Galaktosylceramid und  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid. Die Menge an nicht- $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid stieg an. Die Gesamtmenge war beim Galaktosylceramid verringert, was darauf hindeutet, dass andere Lipide kompensatorisch gebildet werden und nicht lediglich  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid durch nicht- $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid ersetzt wird. Die Gesamtmenge an Sulfatid zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

Bereits bei Tieren, die nur noch ein FA2H-Wildtyp-Allel besaßen, waren deutliche Veränderungen in den Mengenverhältnissen der Galaktosylceramid- und Sulfatid-Spezies zu erkennen. Die nicht-hydroxylierten Formen nahmen in der Menge zu, die  $\alpha$ -hydroxylierten Formen verringerten sich mengenmäßig. Im Myelin von Wildtyp-Mäusen übersteigt die Menge des  $\alpha$ -hydroxylierten Galaktosylceramids jene des nicht-hydroxylierten Galaktosylceramid (Kishimoto und Radin, 1966; Sastry, 1985). In den FA2H heterozygoten Mäusen ist die Menge dieser beiden Lipidarten im Nervensystem derart verändert, dass beide etwa gleich stark auftreten. Damit ähneln diese Mäuse bezüglich der Lipidzusammensetzung der Glykosphingolipide sehr stark den von Fewou et al., 2005 veröffentlichten transgenen PLP-CGT Mäusen. Jene Mäuse zeigten nach Überexpression der CGT in Oligodendrozyten eine Umkehr des Verhältnisses von nicht-hydroxyliertem zu  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid. Dies wurde hervorgerufen durch einen Anstieg des Levels von nicht-hydroxyliertem Galaktosylceramid, aber auch durch eine Reduktion der Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid. Die Gesamtmenge an Galaktosylceramid war in diesen Mäusen dadurch nahezu unverändert. Auch die Proteinzusammensetzung des Myelins zeigte nur wenige Unterschiede zum Wildtyp, wie z. B. eine Hochregulierung der MAL-Expression. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die deutlichen pathologischen Veränderungen im Myelin des ZNS der Mäuse nach der Phase der Myelinisierung dem veränderten Verhältnis an nicht-hydroxyliertem zu  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid zuzuschreiben seien. Die Veränderungen zeigten sich in Form von instabilem und nicht-kompaktem Myelin, in dem eine progressive Demyelinisierung stattfand. Im optischen Nerv waren zusätzlich degenerierende Axone zu finden. Phänotypisch wurden diese Veränderungen begleitet von einer zunehmenden Lähmung der Hinterbeine. Da die Lipidzusammensetzung im Hinblick auf die Galaktosylceramid-Spezies in den FA2H

heterozygoten Mäusen ähnlich war, waren nach der bei Fewou et al., 2005 genannten Hypothese auch in diesen Mäusen starke Defekte des Myelins zu erwarten. Die phänotypischen und elektronenmikroskopischen Analysen zeigten jedoch keinerlei Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Damit scheint dieser Ansatz zur Erklärung des bei PLP-CGT auftretenden Phänotyps ungeeignet und die bei Fewou et al., 2005 genannten Möglichkeiten, dass der Phänotyp durch den Anstieg des Monogalaktosyl-diglycerids oder durch einen gesteigerten Umsatz des Galaktosylceramids hervorgerufen wurde, bekommen neue Bedeutung.

Im Gehirn von Säugetieren sind über 50% der Cerebroside an der Alpha-Position der Fettsäure hydroxyliert (Kishimoto und Radin, 1966; Sastry, 1985). Mit der Defizienz der FA2H in den Knock-Out-Mäusen kam es somit zum Verlust einiger Lipidarten im Myelin, die dort mengenmäßig stark vertreten waren. Die Zusammensetzung der Lipide des Myelins, die selbst etwa zu 30% Galaktosylceramid und Sulfatid sind (Taylor et al., 2002), war damit drastisch verändert. Die weiteren Analysen verfolgten nun das Ziel, die Auswirkungen dieser Veränderungen auf das Nervensystem im Allgemeinen und das Myelin im Besonderen zu untersuchen. Da die Expression der FA2H im Gehirn ähnlich wie Myelin-assoziierte Proteine wie z.B. MBP oder PLP während der aktiven Periode der Myelinisierung das Maximum erreicht (Svennerholm und Stallberg-Stenhagen, 1968; Nonaka und Kishimoto, 1979; Eckhardt et al., 2005), lag eine Analyse des Myelins während der Myelinisierung nahe. MBP als Myelin-assoziiertes Protein sollte es ermöglichen, erste Anzeichen einer Hypomyelinisierung zu erkennen. Die Western-Blot-Analysen, die mit Gehirnproben von Tieren der jüngeren Altersstufen durchgeführt wurden, zeigten keinerlei Veränderungen in den MBP-Mengen des Gehirns FA2H defizienter Mäuse. Das Gleiche galt für adulte Tiere, die zur Untersuchung des Myelinerhalts verwendet wurden und für andere Myelinmarker wie etwa CNP.

1989 konnten Bansal und Pfeiffer zeigen, dass Galaktosylceramid und Sulfatid eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Oligodendrozyten spielen (Bansal und Pfeiffer, 1989). Die jeweiligen für diese Lipide defizienten Mäuse zeigten verstärkte Differenzierung der Oligodendrozyten *in vivo* und *in vitro* (Bansal et al., 1999; Hirahara et al., 2004). Diese Lipidkomponenten scheinen demnach eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Oligodendrozytendifferenzierung und damit bei der Formierung des Myelins zu besitzen. *In-situ*-Hybridisierungsanalysen mit dem PDGF- $\alpha$ -Rezeptor als Marker für undifferenzierte Pro-Oligodendrozyten und PLP als Marker für reife Oligodendrozyten (Pfeiffer et al., 1993) sollten Aufschluss darüber geben, ob die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Galaktosylceramid und Sulfatid einen Einfluss auf die Differenzierung der Myelin bildenden Zellen hat. Es zeigte sich, dass sowohl die Anzahl positiver Zellen für die mRNA vom PDGF- $\alpha$ -Rezeptor als auch für die mRNA von PLP in den untersuchten Hirnregionen wie dem Kleinhirn, dem Hirnstamm und

dem Corpus Callosum in FA2H defizienten Mäusen vergleichbar war mit der in Wildtyp-Mäusen. Über diesen Versuchsaufbau konnte kein Unterschied in der Differenzierung der Oligodendrozyten festgestellt werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Gesamtmenge an Sulfatid, welches als negativer Modulator der Oligodendrozyten Differenzierung bekannt ist (Hirahara et al., 2004), nicht verändert ist. Insbesondere scheint die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Galaktosphingolipide im Gehirn keinen Einfluss auf die Differenzierung der Oligodendrozyten zu besitzen.

Graf et al., 2002 postulierten eine Erhöhung der Stabilität der Myelinschichten durch die  $\alpha$ -Hydroxylierung, da durch diese zusätzliche Bindungsstellen für Ionen und Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung stünden, die auch für laterale Interaktionen genutzt werden könnten. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde der optische Nerv von 4 Wochen und 5 Monate alten Mäusen mit einer FA2H-Defizienz im Querschnitt analysiert. Durch das Fehlen der  $\alpha$ -hydroxylierten Glykosphingolipide sollte es nach obiger Hypothese in den Myelinscheiden dann zu einer verringerten Stabilität kommen, die z. B. durch das vermehrte Vorkommen von unkompaktiertem Myelin gekennzeichnet wäre. Dies war sowohl für die 4 Wochen alten als auch für die adulten Tiere nicht zu erkennen. Das Myelin sah wohl kompaktiert aus. Das reguläre Muster von IPL („Intraperiod Line) und MDL („Major Dense Line“) war sowohl in Kontroll- wie auch in Knock-out-Geweben zu erkennen. Es kamen auch die heterozygoten Tiere zur Analyse, die sich trotz nachweislich veränderter Lipidzusammensetzung in der Feinstruktur des Myelins nicht erkennbar von den Wildtyp-Mäusen unterschieden.

Es wurde berichtet, dass die Formierung von funktionellen Myelinscheiden auch in der Abwesenheit von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden durchgeführt werden kann. Dies ist z. B. in Molchen und Salamandern der Fall (Kishimoto, 1986). In diesen Spezies gibt es jedoch keine Korrelation zwischen dem Axondurchmesser und der Myelindicke, wie sie in Säugetieren gegeben ist. Das dem Salamander sehr nahe verwandte Chamäleon besitzt wie die Säugetiere  $\alpha$ -hydroxylierte Cerebroside. In dieser Spezies liegt wie in den Säugetieren ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen dem Axondurchmesser und der Myelindicke vor. Damit könnte die Korrelation zwischen Axondurchmesser und Myelindicke nicht vom evolutionären Entwicklungsstand, sondern vom Vorhandensein  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide abhängen. Die Betrachtung der Dicke der Myelinscheiden in Abhängigkeit vom Axondurchmesser ergab jedoch auch in den optischen Nerven der Mäuse, die keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide besaßen, den Zusammenhang der zunehmenden Myelindicke mit zunehmendem Axondurchmesser. Die zuvor gemachte Hypothese zu dieser Thematik muss mit Einbeziehung dieser Ergebnisse also verworfen werden.

Die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung am Nerven wird in Zusammenhang mit dem Axondurchmesser, der Myelindicke und dem Abstand zwischen den Paranodien gebracht

(Kishimoto, 1986). Der lineare Zusammenhang zwischen Axondurchmesser und Myelindicke wurde für die schnelle Reizweiterleitung entlang des Nerven mit verantwortlich gemacht. Dies wurde dadurch untermauert, dass die Nervenleitgeschwindigkeit in Spezies, die diesen linearen Zusammenhang nicht aufweisen, deutlich reduziert ist. Wie oben beschrieben, wurden diese Spezies zunächst als jene identifiziert, die keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide aufwiesen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Nervenleitgeschwindigkeit in CGT defizienten Mäusen deutlich herabgesetzt ist (Coetzee et al., 1996; Bosio et al., 1996). In dieser Mausmutante konnte die dichte Kompaktierung der Myelinmembranen nicht aufrechterhalten werden, da die polaren Gruppen von Galaktosylceramid und Sulfatid auf der Oberfläche fehlten und somit weniger Wasserstoffbrückenbindungen eingegangen werden konnten. Zudem fehlten die negativen Ladungen des Sulfatids auf der Oberfläche, die für Interaktionen mit den Proteinen MBP und PLP des kompakten Myelins verantwortlich gemacht werden (Bosio et al., 1996). Es kam zur Vakuolarisierung in den Myelinscheiden (Dupree et al., 1998). Die fehlende Kompaktierung setzte die Isolierungsfähigkeit des Myelins herab. Es wurde nachgewiesen, dass im Bereich der zentralnervösen Nodien und Paranodien Abnormalitäten bestanden (Dupree et al., 1998). Die Länge der Nodien war heraufgesetzt und die Orientierung der Paranodien war umgekehrt. Diese Veränderungen wurden für die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit verantwortlich gemacht. Die Mäuse wiesen insgesamt deutlich reduzierte Level an  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden auf. Die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit am Ischiasnerven von FA2H defizienten Mäusen sollte Aufschluss darüber geben, ob das Fehlen von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden in den Myelinscheiden zu einer Verschlechterung der Reizweiterleitung am Nerven führt. Wie schon in früheren Arbeiten berichtet, traten bei der Messung deutliche inter- aber auch intra-individuelle Schwankungen der Messwerte auf, die auf Unterschiede bei der Präparierung zurückgeführt werden könnten. So ist es möglich, dass bei einem Nerven die schnell leitenden  $\alpha$ -Motoneuronen mitpräpariert werden, beim nächsten diese jedoch bei der Präparation zerstört werden. Insgesamt betrachtet konnte kein Unterschied zwischen der Geschwindigkeit der Nervenleitung am Wildtypnerven und am FA2H defizienten Nerven festgestellt werden. Dieses Ergebnis widerlegte die Theorie, dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide entscheidenden Einfluss auf die Kompaktierung des Myelins und die Formierung der Paranodien und damit auf die Geschwindigkeit der Reizweiterleitung entlang des Nerven haben.

Die Analyse der Feinstruktur wurde bei adulten Tieren zudem am Ischiasnerv als Teil des peripheren Nervensystems durchgeführt. Auch hier waren keine Veränderungen auszumachen, obwohl zuvor vermutet wurde, dass eine Erhöhung der Stabilität der Myelinschichten durch die  $\alpha$ -Hydroxylierung erfolgt (Shah et al., 1995; Graf et al., 2002). Das Myelin scheint auch im peripheren Nervensystem trotz fehlender  $\alpha$ -hydroxylierter

Sphingolipide stabil und kompaktiert zu sein. Diese Beobachtung steht wiederum im Einklang mit der Beobachtung, dass in niedrigeren Wirbeltieren, die keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide aufweisen, normal kompaktiertes Myelin aufzufinden ist (Ki et al., 1985; Kishimoto et al., 1986). Der Ischiasnerv, der dieses strukturell normal erscheinende Myelin aufwies, wurde wie erwähnt für die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit verwendet. Eventuell ist nicht die Zusammensetzung hinsichtlich nicht-hydroxylierter und  $\alpha$ -hydroxylierter Cerebroside für das Phänomen der schnellen Reizweiterleitung entscheidend, sondern der prozentuale Anteil der Galaktosphingolipide im Myelin. Dieser war bei den FA2H defizienten Mäusen nur sehr wenig verändert. Wohingegen sowohl bei den CGT defizienten Mäusen als auch bei den PLP-CGT überexprimierenden Mäusen eine Verringerung in mindestens einer Klasse der Galaktosphingolipide auftrat. Bei den CGT defizienten Mäusen waren sowohl das Galaktosylceramid als auch Sulfatid reduziert. Bei der PLP-CGT Maus konnte eine Reduzierung der Sulfatid Level beobachtet werden. Galaktosylceramid wird nun aber die Funktion der Ordnung des Myelins und damit der Strukturgebung zugeschrieben (Curatolo, 1986; Bosio et al., 1998), welche entscheidend für die Herabsetzung der Ionenpermeabilität und damit für die schnelle saltatorische Reizweiterleitung zu sein scheint. Die Analyse der Feinstruktur der Myelinscheiden brachte jedoch keinerlei erkennbare Veränderungen bei FA2H defizienten Mäusen, so dass vielleicht die  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide bei dem Aufbau und der Funktion der Myelinscheiden nicht die wichtige Rolle spielen, die vermutet wurde, sondern die Level an Galaktosphingolipiden insgesamt entscheidend sind.

Diese Hypothese würde von den Beobachtungen bei der Durchführung des Rotarod Testes gestützt, die bei jungen adulten FA2H-Knock-Out-Mäusen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp ergaben. In diesen Tests werden die Co-Koordination der Vorder- und Hinterläufe sowie die Fähigkeit, die Balance zu halten, untersucht (Kuhn et al., 1995; van Meer und Raber, 2005). Neurologische Ausfallerscheinungen, die durch Störungen im Myelin ausgelöst werden könnten, sollten hier durch verminderte Fähigkeiten der Mäuse in diesem Test sichtbar werden. Es wurden jedoch keine solchen Beobachtungen gemacht. Ein weiterer durchgeführter Verhaltenstest, der Open field Test, sollte Aufschluss über die generelle motorische Aktivität geben. Bei diesem Test, der ebenfalls mit jungen adulten Tieren durchgeführt wurde, waren erste Anzeichen von Unterschieden zwischen Wildtyp und FA2H defizienten Mäusen zu erkennen. Bewegungen, die mit dem Aufrichten auf die Hinterbeine korreliert sind, schienen deutlich weniger ausgeführt zu werden.

Insgesamt brachte die Analyse des Nervensystems von FA2H-Knock-Out-Mäusen keine deutlichen Unterschiede in der Funktionalität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Zusammensetzung des Myelins war jedoch nachweislich verändert. Somit ist davon auszugehen, dass das Fehlen der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide durch die Bildung anderer Lipide kompensiert wird, um eine normale Funktionalität des Myelins aufrechtzuerhalten.

### 5.1.2 Auswirkungen der FA2H-Defizienz auf Haut und Haare

Da aus früheren Northern-Blot-Analysen bekannt war, dass FA2H ebenfalls in der Haut exprimiert wird, stellten genauere Untersuchungen der Auswirkungen einer Defizienz für dieses Enzym in dem Organ Haut einen weiteren Schwerpunkt der durchgeführten Analysen dar. In der *In-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass auch in der Haut keinerlei FA2H-Expression in den FA2H defizienten Mäusen mehr vorkam. Mit dem Vorkommen des Enzyms FA2H geht zugleich das Vorkommen  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide in der Haut einher. Erste Analysen der Lipide der Haut im Rahmen dieser Arbeit ergaben einen Verlust von  $\alpha$ -hydroxyliertem Glukosylceramid, wenn das Enzym FA2H defekt ist. Sandhoff und Kolter (2003) vermuteten eine Beteiligung der zusätzlichen Hydroxylgruppen am Aufbau der Barrierefunktion der Haut gegen den transepidermalen Wasserverlust. Essentiell für den Aufbau der Barrierefunktion ist die Extrusion der sogenannten „Lamellar Bodies“ von der oberen Zellschicht des Stratum granulosum in die extrazellulären Räume des Stratum corneum (Jennemann und Sandhoff et al., 2007). Die Zusammensetzung der Bestandteile der „Lamellar Bodies“ scheint entscheidend für das Bestehen der Barrierefunktion der Haut und damit für das Überleben der Wirbeltiere an Land zu sein. Unterstützt wurde diese Vermutung durch Untersuchungen an Mäusen, die defizient für den Transkriptionsfaktor Arnt sind (Tagaki et al., 2003). Eine deutliche Reduzierung der 4- und  $\alpha$ -hydroxy-Sphingolipide geht bei diesen Mäusen mit einem funktionellen Zusammenbruch der Wasserbarriere der Haut einher. Sollten nun die  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide tatsächlich maßgebend für den Aufbau der Barrierefunktion der Haut verantwortlich sein und wäre wie vermutet wiederum die FA2H maßgeblich für die Produktion der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide in der Haut verantwortlich, so könnte eine Defizienz für das Enzym FA2H einen Zusammenbruch dieser Barriere zur Folge haben. Transgene Mäuse, die eine gestörte Barrierefunktion der Haut aufweisen, zeigen rasch nach der Geburt eine gesteigerte Abschuppung des Stratum corneum und deutlichen transepidermalen Wasserverlust, der innerhalb weniger Tage zum Tod führt (Jennemann und Sandhoff et al., 2007). Die hier untersuchten Mäuse, die nachweislich defizient für das Enzym FA2H waren, zeigten nach der Geburt fast keine der oben beschriebenen Anzeichen für eine gestörte Barrierefunktion der Haut. Es kam bei etwa 4 bis 6 Tage alten Tieren zu einer verstärkten Bildung von Schuppen auf der Haut. Ein gesteigerter transepidermaler Wasserverlust war bei diesen Tieren jedoch zu keiner Zeit zu beobachten. Somit kann die Hypothese, dass die von der FA2H gebildeten  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide essentiell für den Aufbau der Barrierefunktion der Haut sind, nicht bestätigt werden. Sollten Hydroxylgruppen für diesen Vorgang eine wichtige Rolle spielen, so kann es sich entweder um 4-hydroxy Sphingolipide handeln oder es besteht die Möglichkeit, dass ein weiteres Enzym in der Haut für die Bildung von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden verantwortlich ist.

### **5.1.2.1 Mittels des Reporterproteins Cyt-b5- $\beta$ -gal ist eine Lokalisierung der FA2H-Expression in der Haut möglich**

Aus früheren Expressionsanalysen war bereits bekannt, dass die FA2H in der Haut exprimiert wird (Eckhardt et al., 2005). Uchida et al konnten zeigen, dass das Enzym in einer Kultur humaner Keratinozyten und in humaner Epidermis exprimiert wird (Uchida et al., 2007). Die genauen Zelltypen, die in humaner Epidermis FA2H exprimieren, sind jedoch nicht bekannt. Mit Hilfe der Färbung für das Reporterfusionsprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal konnte eine explizite Lokalisierung der FA2H-Expression in der Haut durchgeführt werden. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen scheint sich die Expression der FA2H in der Haut auf die Talgdrüsen zu beschränken. Weitere Färbungen mit Färbemitteln für die Talgdrüsen bzw. parallele Färbungen mit dem FA2H-Antiserum konnten die Lokalisation der Expression in den Sebozyten bestätigen. Nahe gelegene Bereiche wie die Balgregion konnten als Ort der Expression durch Co-Färbungen mit entsprechenden Markern ausgeschlossen werden. Auch in der Haut zeigten die Färbungen für das Reporterprotein und die Expressionsanalysen mittels *In-situ*-Hybridisierung vergleichbare Muster der Signale, was die LacZ-Färbung bestätigen konnte. Die Signale der *In-situ*-Hybridisierung waren in den FA2H defizienten Hautgeweben nicht mehr zu erkennen. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in den FA2H-Knock-Out-Mäusen die Exons 3 und 4 des Enzyms in der Haut ebenfalls nicht mehr exprimiert werden und zum ersten Mal konnten die Sebozyten als Ort der Expression für das Enzym FA2H in der Haut ausgemacht werden.

Die Expression der FA2H in der Haut ist zudem etwa ab dem Zeitpunkt zu erkennen, ab dem die ersten Sebozyten gebildet werden. Diese sind laut Literatur in der Haut zum ersten Mal im sogenannten Stadium 5 der Haarmorphogenese zu beobachten, das am Tag 3,5 nach der Geburt auftritt (Paus et al., 1999). Die Färbung für das Reporterprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal trat ebenfalls zu dieser Zeit auf und war demgegenüber in der Haut von Mäusen der Altersstufe P0 noch nicht zu erkennen. Auch die Färbung ganzer Embryonen zeigte noch keine Signale für das Reporterprotein in der Haut außer im Bereich der Tasthaare. Jene durchstoßen bereits bei der Geburt die Haut und deren Follikel sind die ersten Haarfollikel, die während der fetalen Entwicklung gebildet werden (Roth et al., 2000; Sundberg and Hogan, 1994). Diese entwicklungsrelevanten Beobachtungen hinsichtlich der Expression der FA2H in der Haut und der Entwicklung der Haarfollikel und speziell der Sebozyten liefern einen weiteren Beweis dafür, dass das Enzym FA2H in der Haut spezifisch in der Talgdrüse exprimiert wird. Die Beobachtung, dass das Enzym FA2H in der Rückenhaut neugeborener Wildtyp-Mäuse noch nicht exprimiert wird, die Epidermislipide dieser Altersstufe jedoch Lipide zeigen, die auf der Höhe des Standards für hydroxylierte Ceramide laufen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei diesen Lipide um andere Lipide oder anders hydroxylierte Lipide, also nicht  $\alpha$ -hydroxylierte, handelt. Eine zusätzliche Möglichkeit der Erklärung für das Auftreten

dieser Lipide in Geweben, die nachweislich (noch) keine FA2H exprimieren, wäre eine weitere  $\alpha$ -Hydroxylase, die von der FA2H verschieden ist.

#### **5.1.2.2 Die FA2H-Defizienz führt zu einer Zunahme der Hautdicke und zu einer Talgdrüsenhypertrophie**

Die Auswertung der Vermessung von Gefrierschnitten der Haut erbrachte deutliche Unterschiede in der Hautdicke beim Vergleich von Wildtyp- und FA2H-Knock-Out-Mäusen. Während der Haarmorphogenese zeigte die Haut der FA2H defizienten Mäuse zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine deutliche und statistisch signifikante Vergrößerung in der Dicke. Sowohl die maximale Dicke der Haut, die in der Phase des Längenwachstums erreicht wird, als auch die Dicke der Haut in der catagenen und telogenen Phase waren erhöht. Dabei waren sowohl die Bereiche der Dermis als auch der Subkutis der Knock-out-Gewebe dicker und die Veränderung beschränkte sich damit nicht auf einen Teil der Haut, sondern war in der gesamten Ausdehnung auszumachen.

Diese Vergrößerung der Längenausdehnung der Haut wurde von einer Hypertrophie der Talgdrüsen zu jedem untersuchten Zeitpunkt begleitet. Die Vergrößerung der Talgdrüsen ging mit einer vermehrten Färbung für den Proliferationsmarker Ki67 im Bereich der Sebozyten einher. Bei dieser Färbung werden alle Zellen angefärbt, die in den Zellzyklus eingetreten sind (Gerdes et al., 1997). Fraglich ist nun, ob die beobachtete Hypertrophie der Talgdrüse unmittelbar eine Vergrößerung der Dicke der Haut und hier speziell der Dermis, in der die Talgdrüse lokalisiert ist, nach sich zieht. Eine Hypertrophie der Talgdrüsen konnte z. B. bereits bei der Analyse der spontan auftretenden Mausmutante „Rough Coat“ beobachtet werden (Dickie, 1966; Cao et al., 2007). Bei dieser Mutante konnte jedoch keine Veränderung in der Hautdicke ausgemacht werden. Ähnliches gilt für die K10-Knock-Out-Maus. Bei dieser kommt es ebenfalls zu einer Hypertrophie der Talgdrüse, die hier auch verbunden ist mit einer vermehrten Talgproduktion, über eine vergrößerte Dicke der Dermis und der Subkutis wurde jedoch nicht berichtet (Reichelt et al., 2004). Vielmehr kommt es in diesem Fall neben der Hypertrophie der Talgdrüse zu einer Verdickung der Epidermis (Reichelt und Magin, 2002; Reichelt et al., 2004). Die spontane Mausmutante „Rough fur“ zeigt bezüglich der Talgdrüse ein sehr ähnliches Bild wie die K10-Knock-Out-Maus: Die Talgdrüse ist vergrößert und die Talgproduktion ist vermehrt, so dass ein fettiges Fell zu erkennen ist (Sweet et al., 1990; Park et al., 2001). In dieser Mutante scheint keine der Hautschichten in ihrer Ausdehnung verändert zu sein. Eine Vergrößerung der Talgdrüse war unter anderem ebenfalls als Teil des Phänotyps in transgenen Mäusen, die c-Myc in der suprabasalen Schicht der Epidermis und des Haarfollikels überexprimieren, zu beobachten (Bull et al., 2005). Auch in diesen war keine direkte Zunahme der Hautdicke und hier speziell der Dermisdicke zu erkennen. Damit kann der mögliche unmittelbare Zusammenhang

zwischen einer Hypertrophie der Talgdrüse und der Dicke der Dermis, welcher aus den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen geschlossen werden könnte, von der Hand gewiesen werden.

Die Analyse der Ultrastruktur der vergrößerten Talgdrüsen erbrachte auch auf der ultrastrukturellen Untersuchungsebene Unterschiede. Die Lipidtröpfchen waren bei FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle verändert. Eine Veränderung würde zu den bei der „Rough fur“ Maus gemachten Beobachtungen passen. Bei dieser Maus kommt es im Zusammenhang mit der Talgdrüsenhypertrophie ebenfalls zu einer Veränderung auf der Ebene der Lipidtröpfchen (Park et al., 2001). Die Veränderung ist hier dergestalt, dass die Dichte der Lipidtröpfchen in der Talgdrüse zunimmt und die Form von der physiologischen abgerundeten Form abweicht. Die Lipidtröpfchen in den Geweben der FA2H defizienten Mäuse zeigten ebenfalls irreguläre nicht abgerundete Formen. Die Dichte der Lipidtröpfchen war in diesem Fall jedoch reduziert. Eine direkte Verbindung von einer Hypertrophie der Talgdrüse zu dem vermehrten Auftreten von Lipidtröpfchen kann also nicht gezogen werden. Unterstützt wird diese These von der Beobachtung, dass das Fell der FA2H-Knock-Out-Mäuse nicht fettig aussieht, es also anscheinend nicht zu einer gesteigerten Sebumproduktion kommt, welche in den „Rough fur“ Maus zu beobachten ist. Die „Rough Coat“ Mausmutante ist ein weiteres Beispiel dafür, dass eine Vergrößerung der Talgdrüsen nicht unmittelbar mit einer gesteigerten Sebumproduktion einher gehen muss (Hayashi et al., 2004; Cao et al., 2007).

### **5.1.2.3 FA2H-Knock-Out-Mäuse weisen Anzeichen von Haarfollikeldystrophie auf und zeigen einen desynchronisierten Haarzyklus**

Neben der zu beobachtenden Verzögerung der Entwicklung der ersten Haare zeigten die FA2H defizienten Mäuse einen progressiven zyklischen Haarverlust. Der Zeitpunkt des Haarverlustes war unter anderem anhand der pinken Hautfarbe als das telogene Stadium des Haarzyklus auszumachen (Müller-Röver et al., 2001). Das nachwachsende Fell wurde mit jedem weiteren Haarzyklus und damit bei jedem weiteren Haarverlust augenscheinlich dünner, so dass ältere Tiere mitunter nahezu ohne Fell waren. Dieses Phänomen konnte durch histologische Untersuchungen auf eine mit dem Alter vermehrt auftretende Haarfollikeldystrophie zurückgeführt werden.

Eine mögliche Ursache für den zyklischen Haarverlust könnte die erkennbare Verschiebung im Haarzyklus sein. Der Haarzyklus ist ein spezialisierter Entwicklungsprozess, der von der kontinuierlichen Interaktion zwischen den mesenchymalen Geweben, der Dermalen Papille und den epithelialen Zellen der Balgregion und des Haarfollikels abhängt (Shaughnessy und Christiano, 2004). Es sind bereits einige Beispiele bekannt, in denen durch spontane oder gezielte Veränderung einzelner Gene Einfluss auf den sensibel abgestimmten Haarzyklus

genommen wurde (Roth et al., 2000; Hayashi et al., 2004; Cao et al., 2007; Park et al., 2000; Bull et al. 2005; Kulesa et al., 2000; und viele weitere). Zumeist handelt es sich dabei um Gene, die eine mehr oder weniger aufgeklärte Funktion bei der Aufrechterhaltung des Haarfollikels und des Haarzyklus haben (Sundberg, 1994). Direkte Zusammenhänge zwischen Veränderungen im Bereich der Talgdrüse und einem gestörten Haarzyklus konnten erst in wenigen Fällen aufgedeckt werden (Sundberg et al., 2000). Somit sollte es möglich sein, mit dem Modell der FA2H defizienten Maus weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen einer veränderten Funktionalität in den Sebozyten auf die Haut und auf den Haarzyklus zu gewinnen.

Die vergrößerte maximale Dicke der Haut in FA2H-Knock-Out-Mäusen tritt zum Zeitpunkt der ersten Wachstumsphase auf, die der späteren anagenen Phase ähnelt (Botchkarev und Paus, 2003). Nun könnte es sein, dass für ein verstärktes Dickenwachstum der Haut mehr Zeit benötigt wird, die Wachstumsphase in FA2H defizienten Mäusen also länger ist. Diese Vermutung liegt nahe, da der gesamte Haarfollikel in der FA2H-Knock-Out-Maus verlängert ist und für dessen Wachstum damit eventuell mehr Zeit benötigt würde. Eine veränderte Dauer der Wachstumsphase könnte ein Initiator für Verschiebungen im Haarzyklus sein. Mit einer Verlängerung der Wachstumsphase geht eine Verlängerung der Haare einher, da die Haarlänge proportional zur Dauer der Wachstumsphase ist (Shaughnessy und Christiano, 2004). Eine Vermessung der Haarlänge der verschiedenen Haartypen brachte jedoch keine erkennbaren Unterschiede beim Vergleich von Haaren von Wildtyp-Mäusen und von FA2H-Knock-Out-Mäusen. Histologische Untersuchungen erbrachten zudem die Erkenntnis, dass der Beginn der catagenen Phase in Wildtyp und Knock-Out etwa zum gleichen Zeitpunkt auftritt. Damit kann nicht bestätigt werden, dass in der Haut von FA2H defizienten Mäusen während der Haarmorphogenese eine verlängerte Wachstumsphase vorliegt.

Die Mauslinie, in der das Gen für das Enzym Stearoyl CoA-Desaturase-1 (Scd-1) defekt ist, zeigt ebenfalls abnormal lange anagene Haarfollikel (Zheng et al., 1999; Sundberg et al., 2000). Auch bei dieser Mausmutante, die Asebia Maus genannt wird, kommt es zu einem progressiven Haarverlust. Da bei der Asebia Maus eine offensichtliche Hypoplasie der Talgdrüse, in der normalerweise das Enzym Scd-1 exprimiert wird, auftritt, wird hier ein mehr oder weniger direkter Zusammenhang zwischen der Funktion der Talgdrüse und dem korrekten Zyklus des Haarfollikels vermutet. Auch die Dicke der Haut ist in der Asebia Maus im Vergleich zur Kontrolle zu fast allen untersuchten Zeitpunkten erhöht. Daran anlehnend kann also festgestellt werden, dass einige phänotypische Veränderungen der Haut in den beiden Mausmutanten Asebia und FA2H-Knock-Out sehr ähnlich sind und somit eventuell jeweils ihren Ursprung in einer veränderten Funktionalität der Talgdrüse besitzen. Die Hyperplasie der Talgdrüse in der FA2H defizienten Maus und die Hypoplasie der Talgdrüse in der Asebia Maus scheinen zunächst die beiden Extreme eines Veränderungshorizonts der

Größe der Talgdrüse darzustellen. Schaut man jedoch jeweils auf die Ultrastruktur der Sebozyten, so ist der gemeinsame Nenner in beiden Mutanten zu erkennen: Anders als z.B. bei der „Rough fur“ Mausmutante, die begleitend zur Talgdrüsenhypertrophie eine erhöhte Dichte der Lipidtröpfchen in den Sebozyten und damit verbunden eine erhöhte Sebumproduktion zeigt (Sweet et al., 1990), sind bei der FA2H-Knock-Out-Maus trotz vergrößerter Fläche, die die Sebozyten einnehmen, in den analysierten Talgdrüsen deutlich weniger Lipidtröpfchen in den Sebozyten zu erkennen. Eine verminderte Anzahl an Lipidtröpfchen sieht man auch bei der Asebia Maus. Damit scheint auch diese Veränderung im Bereich der Haut in beiden Mausmutanten gleichermaßen aufzutreten.

Neben diesen Gemeinsamkeiten bezüglich des Phänotyps gibt es aber auch einige Unterschiede, die dazu führen, dass man die neue Mausmutante FA2H-Knock-Out nicht mit der bekannten Asebia Mausmutante gleichsetzen kann. Die Hypertrophie der Talgdrüse mündet im Fall der FA2H-Knock-Out zwar ebenfalls in einer Reduzierung der Anzahl der Lipidtröpfchen, es sind jedoch weitere Effekte, die durch die veränderte Morphologie der Talgdrüse hervorgerufen werden, denkbar. Der Haarverlust ist in beiden Fällen progressiv, im Falle der FA2H defizienten Maus jedoch vor einem zyklischen Hintergrund. Diese Beobachtung ähnelt wiederum der „Rough Coat“ Mausmutante, die wie erwähnt zudem ebenfalls Talgdrüsenhypertrophie ohne vermehrte Sebumproduktion aufweist (Hayashi et al., 2004; Cao et al., 2007). Das Protein, das bei dieser Mausmutante als defekt nachgewiesen wurde, ist Mpzl3 (Myelin protein zero-like 3), welches in der Haut in Keratinozyten und Sebozyten exprimiert wird. Dieser Zusammenhang kann ein weiterer Hinweis darauf sein, dass auch Bestandteile der Talgdrüse deutlichen Einfluss auf den korrekten Verlauf des Haarzyklus nehmen können, obwohl sie in einem Teil des Haarfollikels gebildet werden, der als permanenter Anteil des Haarfollikels bezeichnet wird.

Die zu beobachtende Verschiebung im Haarzyklus der FA2H-Knock-Out-Maus scheint vor allem im Bereich der catagenen Phase zu liegen. Das Auftreten der ersten catagenen Phase in der Maus variiert deutlich in den unterschiedlichen Hautregionen und ist im unteren Bereich der Rückenhaut etwa für Tag 16 bis Tag 17 nach der Geburt zu erwarten. Diese Phase dauert etwa 3 Tage (Alonso und Fuchs, 2006). Die catagene Phase stellt die Überleitung von der Wachstumsphase zur Ruhephase dar (Müller-Rover et al., 2001). In dieser Phase kommt es zur Regression des unteren Teils des Haarfollikels, bei der eine massive Apoptose der epithelialen Zellen des Haarbulbs und der äußersten epithelialen Schicht des Haarfollikels stattfindet (Lindner et al., 1997). Im Zuge dieser Entwicklung wird das sogenannte Clubhaar gebildet, welches nach oben wandert, bis es den permanenten Teil des Haarfollikels erreicht (Alonso und Fuchs, 2006). Ebenfalls in dieser Phase zu sehen ist die Bildung eines epithelialen Stranges, der die noch tiefer gelegene Dermale Papille mit dem oberen Teil des Haarfollikels verbindet. Diese Verbindung ist in der Mausmutante

„Hairless“ gestört, wodurch in der ersten catagenen Phase die Dermale Papille in den tiefer gelegenen Hautschichten verloren geht und es zum Verlust des kompletten Fells zum Zeitpunkt der ersten catagenen Phase kommt (Panteleyev et al., 1999), welches nicht wieder nachwächst. Die histologische Analyse der Hautgewebe FA2H defizienter Mäuse der Altersstufen P16 bis P28 zeigte deutlich den epithelialen Strang oberhalb der Dermalen Papille, der dem der Kontrolle vergleichbar war. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt wies die Dermale Papille eine Verbindung zum höher gelegenen Teil des Haarfollikels auf. Ein Mechanismus, der über eine gestörte Verbindung der Dermalen Papille zum Haarfollikel zum Haarausfall führt und der dem in der „Hairless“ Maumutante auftretenden vergleichbar wäre, scheint aufgrund dieser Beobachtungen nicht vorzuliegen. Vielmehr scheint bereits der Zeitpunkt des Haarverlustes in diesen beiden Mutanten unterschiedlich: Die „Hairless“ Maus verliert ihr Fell mit Eintritt in die catagene Phase, die Haut der FA2H-Knock-Out-Maus befindet sich zum Zeitpunkt des Haarausfalls in der telogenen Phase. Gemeinsam scheint diesen beiden Mutanten jedoch zu sein, dass die Veränderungen in der Haut im Bereich der catagenen Phase auftreten: Die „Hairless“ Maus bildet in dieser Phase nicht funktionsfähige epitheliale Strangzellen, die FA2H-Knock-Out-Maus zeigt eine deutlich zu lange catagene Phase.

Die catagene Phase wird in 8 Unterphasen eingeteilt (Müller-Röver et al., 2001). Beim Vergleich der Haut der FA2H defizienten Maus mit Haut von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen, konnte ein leicht verzögerter Eintritt in die catagene Phase beobachtet werden. Dies kann eventuell durch etwas differierende Hautregionen, die analysiert wurden, erklärt werden, da je nach betrachteter Hautregion der Beginn der catagenen Phase zwischen Tag 14 und Tag 18 nach der Geburt liegen kann (Alonso und Fuchs, 2006). Der Eintritt in die catagene Phase wird z.B. durch TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor  $\beta$ 1) begünstigt (Foitzik et al., 2000), welcher als Inhibitor für die Keratinozytenproliferation und als Induktor für die Apoptose der Keratinozyten postuliert wird. FGF5 (Fibroblast growth factor) wird ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induktion der catagenen Phase zugeschrieben. Ist das Gen für FGF-5 defekt, kommt es zum sogenannten Angora Phänotyp mit deutlich verlängerten Haaren, die auf eine verlängerte anagene Phase und einen verzögerten Eintritt in die catagene Phase zurückzuführen sind (Hébert et al., 1994; Pennycuik und Raphael, 1984). Die verlängerte anagene Phase wurde für die FA2H-Mutante bereits ausgeschlossen. Zudem scheint der Eintritt in die catagene Phase dem Wildtyp vergleichbar zu sein, so dass Defekte, die die hier genannten Faktoren betreffen, als unwahrscheinlich angesehen werden müssen.

Daraufhin durchläuft die Wildtyp-Haut die verschiedenen catagenen Phasen I bis VIII in einem sehr kurzen Zeitabschnitt von insgesamt etwa 3 Tagen und erreicht die telogene Phase nach dieser Zeit. Die Haut, die defekt für das Enzym FA2H ist, durchläuft ebenfalls alle catagenen Phasen, verweilt in allen jedoch deutlich länger als der Wildtyp. Für einige

Tage sind lange Haarfollikel zu erkennen, die aufgrund der schmalen Gestalt der Dermalen Papille als solche im catagenen Stadium zu klassifizieren sind. Eine rasche Verkürzung dieser Haarfollikel scheint jedoch zu scheitern. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Mausmutante „Defolliculated“ (Dfl) gemacht (Porter et al., 2002). In dieser spontan aufgetretenen Mutante kommt es zur abnormalen Differenzierung der Talgdrüse, begleitet von deutlich verringerter Sebumproduktion. Das defekte Gen dieser Mausmutante wurde als Gasdermin 3 identifiziert (Lunny et al., 2005). Aufgrund von progressiver Haarfollikel-dystrophie kommt es zum permanenten Haarverlust bei älteren Tieren. Ein zyklischer Hintergrund des Haarverlustes scheint bei dieser Mutante nicht vorzuliegen.

Eine verlängerte catagene Phase kann unter anderem auch bei der Msx2-Knock-Out-Maus beobachtet werden (Ma et al., 2003; Satokata und Ma et al., 2000). Hier schließt sich an eine verkürzte anagene Phase, die zu einer Verkürzung der Haarlänge führt, eine deutlich verlängerte catagene und auch eine verlängerte telogene Phase an. Im Verlauf der catagenen Phase kommt es zum Verlust des Fells, welches im nächsten Haarzyklus wieder nachwächst. Es liegt also wie bei der FA2H-Knock-Out-Maus ein zyklischer Haarverlust vor. Das Fell geht bei der Msx2-Mutante jedoch bereits an Tag 14 nach der Geburt verloren, im Gegensatz zum FA2H-Knock-Out, bei dem das Fell erst um den 28. Tag nach der Geburt ausfällt. Eine Annäherung dieser zeitlichen Diskrepanz könnte man erreichen, wenn man den Eintritt in die catagene Phase betrachtet. Zum Zeitpunkt des Fellverlustes befindet sich die Msx2-Mutante auf Grund der verkürzten anagenen Phase bereits seit 4 Tagen in der catagenen Phase, also bereits deutlich in Richtung telogene Phase, womit der zyklusspezifische Zeitpunkt bei diesen beiden Mutanten durchaus Ähnlichkeiten aufweist. Der Verlust der Haare wird bei der Msx2-Mutante darauf zurückgeführt, dass es zu einem verminderten Zusammenhalt zwischen der inneren Wurzelschicht und dem Clubhaar kommt (Ma et al., 2003). Damit liegt das Clubhaar quasi „lose“ im Haarkanal und kann leicht ausfallen.

Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Desmoglein-3-Knock-Out-Maus gemacht werden: Das Clubhaar ist hier in der telogenen Phase nicht ausreichend verankert und geht mit Beginn der telogenen Phase eines jeden Haarzyklus verloren (Koch et al., 1997, 1998), so z.B. ab Tag 20 nach der Geburt. Hier wird die nicht ausreichende Verbindung zwischen Clubhaar und äußerer Wurzelschicht für den Verlust der Haare verantwortlich gemacht. Desmogleine sind wichtig für den Zellzusammenhalt zwischen Keratinozyten. In der entsprechenden Erkrankung beim Menschen, Pemphigus vulgaris, werden Autoantikörper gegen Desmoglein-3-exprimierende Keratinozyten gebildet. Deren Bindung an die Zellen führt dazu, dass die Verbindung zwischen den Keratinozyten aufgelöst wird. Infolge des fehlenden Zellzusammenhalts kommt es zur Abrundung der Keratinozyten und zur Bildung von sogenannten Blistern, was man als Akantholyse bezeichnet (Amagai et al., 1992, 1994,

1995). Die Phasen des Haarzyklus sind bei der Desmoglein-3-Knock-Out-Maus im Gegensatz zur FA2H-Knock-Out-Maus nicht verändert. Da die catagene Phase bei letzterer verlängert ist, scheint der zyklusspezifische Zeitpunkt des Haarverlustes bei diesen beiden Mutanten sehr ähnlich zu sein. In den Keratinozyten des Haarfollikels konnte nun jedoch keine Expression der FA2H festgestellt werden, so dass ein direkter Vergleich der Ursache für den Haarausfall mit Beginn der telogenen Phase zwischen der Desmoglein-3-Knock-Out-Maus und der FA2H defizienten Maus nicht als Lösung anzusehen ist. Es bietet sich aber von diesen Beobachtungen ausgehend die Möglichkeit, die morphologischen Veränderungen in der Haut der FA2H-Knock-Out-Mausmutante als potentielle Ursache für den Haarausfall zu klassifizieren.

Festgehalten werden kann an dieser Stelle, dass aus den vorliegenden Daten der Literatur kein direkter Zusammenhang zwischen der verlängerten catagenen Phase, die in der Haut der FA2H defizienten Maus vorliegt und dem Verlust der Haare zu Beginn der telogenen Phase gezogen werden kann. Daher sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die morphologischen Veränderungen der Haarfollikel und die fortschreitende Haarfollikeldystrophie - eventuell im Zusammenhang mit der Verschiebung im Haarzyklus - verantwortlich für den progressiven Haarausfall sind.

Die Aufklärung der defekten Struktur des Haarfollikels erfolgte bei der Analyse der Desmoglein-3-Knock-Out-Maus mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen, welche eine Separation der Keratinozytenschichten der äußeren Wurzelschicht als Ursache für die mangelnde Zurückhaltung des Haares in der telogenen Phase ausmachen konnten (Koch et al., 1998). Um nun ähnlich exakte Aussagen über die ursächlichen morphologischen Veränderungen in der FA2H-Knock-Out-Maus machen zu können, müssten ebenfalls elektronenmikroskopische Untersuchungen des Haarfollikels durchgeführt werden. Diese Analysen stehen derzeit noch aus. Daher bleibt zu diesem Zeitpunkt nur die Möglichkeit, die in der Kausalkette wahrscheinlich weiter hinten stehenden Beobachtungen aufzuführen, die unmittelbar zum Verlust des Haares führen. Es sind dies die erkennbaren Anzeichen für eine Haarfollikeldystrophie in der Haut von FA2H defizienten Mäusen, die eventuell durch vorhergehende Veränderungen in der Ultrastruktur der Haarfollikel hervorgerufen wurde. Bestimmte in der Literatur genannte Klassifizierungskriterien für eine Haarfollikeldystrophie (Hendrix et al., 2005) konnten in der Haut der FA2H-Knock-Out-Maus gefunden werden: Zum Beispiel war zum Zeitpunkt des zyklischen Haarausfalls ein weit geöffneter Haarkanal zu erkennen. Eine Verformung des Haarfollikels stellte ein weiteres Merkmal für die Haarfollikeldystrophie dar. In älteren Tieren konnten anstelle des wohlgeformten Haarschaftes häufig lediglich Haarschaftfragmente oder sogenannte Melaninklumpen im proximalen Teil des Haarfollikels beobachtet werden. Die Färbung mit einem Antikörper gegen K5, welches unter anderem in den Keratinozyten der äußeren Wurzelschicht

exprimiert wird, zeigte in der FA2H-Knock-Out-Maus vermehrte K5-positive Zellschichten der äußeren Wurzelschicht, was als Hypertrophie dieser Schicht gedeutet werden kann und ebenfalls zur Haarfollikeldystrophie beitragen könnte. Eine solche Hypertrophie war beispielsweise auch bei der Angora Maus beobachtet und als Zeichen der Haarfollikeldystrophie gewertet worden (Sundberg et al., 1997).

Auf der Grundlage der Analyse der Asebia Maus kann daraus nun die Hypothese aufgestellt werden, dass die Funktionalität der Talgdrüse, die mit Blick auf die reduzierte Zahl der Lipidtröpfchen auch in der FA2H-Knock-Out-Maus gestört zu sein scheint, wichtig für die Interaktion zwischen Haarschaft und den umliegenden Schichten ist (Sundberg et al., 2000). Eine noch näher zu beschreibende Störung in diesen Interaktionen scheint zur mangelhaften Verankerung des Haarschaftes in der telogenen Phase zu führen und somit den Verlust des Haares zu bedingen.

Welche veränderten Signalwege zu der beobachteten Verlängerung der catagenen Phase geführt haben und ob diese Prolongation unmittelbaren Einfluss auf den Verlust des Haares besitzt, kann vom derzeitigen Untersuchungsstandpunkt nicht bestimmt werden. Neben der oder durch die Verlängerung der catagenen Phase scheint es zu einer deutlichen Verkürzung der telogenen Phase zu kommen, da die Wachstumsphase in Kontroll- wie Knock-out-Geweben etwa zeitgleich wieder initiiert wird. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass durch die scheinbar verkürzte telogene Phase das physiologisch vorgesehene Ruhestadium des Haarfollikels, das eventuell zur Regeneration genutzt werden könnte, nicht ausreichend vorhanden ist. Dadurch könnten Störungen im Haarfollikel begründet werden.

Betrachtet man das Phänomen des permanenten Haarausfalls, kann man weitere Hypothesen für deren Ursache aufstellen. Der durch den Haarverlust nackte Haarfollikel könnte eine entzündliche Reaktion in der Haut hervorrufen, die zur Zerstörung des Haarfollikels beitragen könnte (Murillas et al., 1995; Sundberg et al., 2000). Eine erhöhte Anzahl an Mastzellen konnte in der FA2H defizienten Haut jedoch nicht ausgemacht werden. Als alleinige Erklärung für die massive Haarfollikeldystrophie scheint dieses Phänomen ungeeignet, wie auch schon von Porter et al., 2002 hypothesiert. Vielmehr scheint es Hinweise zu geben, dass die funktional defekte Talgdrüse selbst der Auslöser für die in verschiedenen Mutanten auftretende Zerstörung der Haarfollikel ist (Stenn und Sundberg, 1999).

Da es sich sowohl um einen zyklischen als auch einen progressiven Haarverlust handelt, könnten zweierlei Mechanismen verantwortlich sein: Zum Einen eine mangelhafte Verankerung des Clubhaares in der telogenen Phase, die dazu führt, dass das komplette Fell zu diesem Zeitpunkt verloren wird, deren Auslöser aber durchaus bereits in der verlängerten catagenen Phase begründet sein könnte. Zum Anderen liegt ein

fortschreitender Untergang der Haarfollikel vor, der mit der Zeit zum permanenten Verlust der Haare führt. Ob diese Mechanismen einander bedingen oder unabhängig voneinander auftreten, bleibt in weiteren Studien zu klären.

## 5.2 Oligodendrozyten-spezifische Expression der CGT

Mit der Generierung der transgenen Mauslinie PLP-CGT/cgt(-/-) konnte im Gehirn eine exklusive Expression der CGT in Oligodendrozyten erzeugt werden. Damit war es möglich, diese Mauslinie zu verwenden, um die Auswirkungen einer ausschließlichen Expression der CGT in Oligodendrozyten und damit einer fehlenden Expression in Neuronen und Astrozyten zu untersuchen.

### 5.2.1 Das PLP-CGT Transgen hebt den Phänotyp der CGT defizienten Mäuse auf

Die Nachkommen, die aus der Verpaarung von Mäusen mit einem intakten CGT-Allel mit den PLP-CGT transgenen Mäusen resultierten, trugen das CGT-Transgen auf dem CGT-Knock-out-Hintergrund. In diesen Mäusen konnte mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung gezeigt werden, dass das Transgen unter der Kontrolle des PLP-Promotors im Gehirn ausschließlich in der weißen Substanz exprimiert wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Analyse, die mit dem gleichen PLP-Promotor-Konstrukt gearbeitet hatte (Mallon et al., 2002) wie es bei der Generierung der PLP-CGT transgenen Mauslinien verwendet wurde (Fewou et al., 2005).

Zu dieser Mauslinie wurden Daten bezüglich des Verhaltens, der Fähigkeiten auf dem Rotarod, der Ultrastruktur des Myelins, der CGT-Aktivität und der Lipidzusammensetzung erhoben. Sämtliche Ergebnisse zeigten deutlich, dass in der generierten transgenen Mauslinie der Phänotyp der CGT-Knock-Out-Maus aufgehoben werden konnte. Die Mäuse waren nicht länger unterscheidbar von Wildtyp-Mäusen. Damit scheint für den Phänotyp der CGT defizienten Mäuse ausschließlich das Fehlen der CGT-Aktivität in den Oligodendrozyten verantwortlich zu sein. Zu beachten bleibt hier jedoch noch die beschriebene Möglichkeit, dass der PLP-Promotor auch in einigen Neuronen, wie den Purkinje Zellen, aktiv ist (Bongarzone et al., 1999). In der *In-situ*-Hybridisierung konnte aber weder für die PLP-mRNA noch für das CGT-Transgen unter der Kontrolle des PLP-Promotors ein Signal in Neuronen erkannt werden, so dass zumindest in den vorliegenden Untersuchungen keine Expression in Neuronen feststellbar war.

Im Gegensatz zu Dupree et al. (1998) konnte in der vorliegenden Arbeit bereits auf einer Altersstufe von 30 Tagen eine Reduktion der MBP-Protein-Level in den CGT-Knock-Out-

Mäusen beobachtet werden. Dieses Ergebnis passt zu der in der Elektronenmikroskopie beobachteten Demyelinisierung der CGT defizienten Mäuse. Für die Analyse der MBP-Protein-Level wurde hier ein Infrarot Detektionssystem verwendet, das eine lineare Dose-Response Kurve über einen großen Intensitätsbereich gibt und somit genauere Analysen der Proteinmengen erlaubt. Zudem wurden in der vorliegenden Untersuchung Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund verwendet (C57BL/6 X CBA), was einen Einfluss auf die Schwere des Phänotyps in dysmyelinisierenden Mäusen haben kann (Al-Saktawi et al., 2003).

Mehrere der beobachteten Veränderungen im Phänotyp der CGT defizienten Mäuse konnten ebenfalls in CST (=Cerebrosid-Sulfotransferase) defizienten Mäusen entdeckt werden. Als Beispiele sind hier die strukturellen Veränderungen in der Region der Paranodien (Honke et al., 2002) und die erhöhte Differenzierung der Oligodendrozyten zu nennen (Hirahara et al., 2004). Somit scheint es wahrscheinlich, dass das Fehlen des Sulfatids und nicht das Fehlen des Galaktosylceramids für einige Symptome der CGT-Knock-Out-Maus verantwortlich ist. Daneben bleibt aber zu bemerken, dass die Symptome bei der CST-Knock-Out-Maus insgesamt milder ausfielen und die Mäuse ein Alter von etwa einem Jahr erreichen konnten, während die meisten CGT-Knock-Out-Mäuse den ersten Monat nicht überlebten. Galaktosylceramid scheint also noch zusätzliche Funktionen zu besitzen. Das Lipidmuster der CGT defizienten Mäuse war jedoch nicht nur durch das Fehlen von Galaktosylceramid und Sulfatid verändert. Es zeigten sich zudem weitere Veränderungen wie etwa die Erhöhung der Level an  $\alpha$ -hydroxyliertem Glukosylceramid,  $\alpha$ -hydroxyliertem Sphingomyelin und  $\alpha$ -hydroxyliertem Ceramid. Des Weiteren fehlten im Vergleich zur Situation im Wildtyp Psychosin und Monogalaktosyldiglycerid (Bosio et al., 1996; Coetzee et al., 1996; Bosio et al., 1998; Ezo et al., 2000). Bis jetzt ist jedoch noch nicht bekannt, in welcher Weise diese Veränderungen im Einzelnen zum Phänotyp der CGT defizienten Maus beitragen. Darüber hinaus war die absolute Menge an Sphingolipiden im Myelin der CGT-Knock-Out-Mäuse deutlich reduziert, während die absolute Menge an  $\alpha$ -hydroxylierten Cerebrosiden und Sphingomyelin deutlich erhöht war (Bosio et al., 1998b). Auch hier ist der Grund für diese Änderungen noch weitgehend unerforscht. In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass der Anstieg der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide in der CGT defizienten Maus nicht auf einer erhöhten Expression der FA2H im Gehirn beruht. Eine erhöhte Enzymaktivität kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Bestimmung der zugehörigen Werte erfordert einen quantitativen Enzymassay, der zur Zeit im vorhandenem Labor noch nicht verfügbar ist.

In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass MAL-mRNA Level in Arylsulfatase A defizienten Mäusen verringert sind (Saravanan et al., 2004; Yaghootfam et al., 2005). In diesen Mäusen, die ein Modellorganismus für die Metachromatische Leukodystrophie sind,

ist die Degradation des Sulfatids gestört und somit kommt es zur Akkumulation von Sulfatid z.B. im Gehirn (Hess et al., 1996). Es konnte zudem gezeigt werden, dass MAL Sulfatid binden kann (Yaghootfam et al., 2005). Die reduzierten Mengen an Sulfatid in PLP-CGT transgenen Mäusen bzw. das gänzliche Fehlen von Sulfatid in CGT-Knock-Out-Mäusen hätten im Umkehrschluss zu einem Anstieg der MAL-Expression führen können. Die Analyse der MAL-Expressionslevel erbrachte jedoch keine Unterschiede in der Höhe der Expression zwischen den untersuchten Genotypen, so dass diese Hypothese nicht bestätigt werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der transgenen Mauslinie, die das Enzym CGT im Gehirn exklusiv in den Oligodendrozyten exprimiert, einige neue Einblicke in die engmaschige Regelung des Sphingolipidstoffwechsels des Myelins gewonnen werden konnten. Für die Bildung von dauerhaft funktionalem Myelin ist eine Expression der CGT und damit also eine Bildung der Sphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid in Neuronen und Astrozyten nach den Ergebnissen dieser Analyse nicht notwendig. Es ist ausreichend, wenn diese Lipide ausschließlich in den Oligodendrozyten gebildet werden. Damit ist der Aufbau eines normalen Myelins möglich, welches alle Funktionen des Myelins in Wildtyp-Mäusen erfüllt.

### 5.3 Ausblick

Die möglichen Auswirkungen der FA2H-Defizienz auf das Myelin der Mausmutanten könnte durch intensive Analyse von isoliertem Myelin überprüft werden, wobei auch potentielle Veränderungen im Bereich der „Raftstruktur“ einer Untersuchung unterzogen werden könnten.

Eventuelle Unterschiede in der Differenzierung von Oligodendrozyten, denen  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide fehlen, könnten mit Hilfe der Technik der Primärkultur aufgedeckt werden. Dabei wäre eine Aufdeckung von morphologischen Veränderungen denkbar, die *in vivo* eventuell nicht erkennbar sind. Durch diese Methode könnten außerdem denkbare kompensatorische Mechanismen, die *in vivo* auftreten, *in vitro* aber eventuell nicht vorhanden sind, ausgeschlossen und somit Effekte der FA2H-Defizienz sichtbar gemacht werden.

Die Analyse von älteren FA2H-Knock-Out-Mäusen könnte Aufschluss darüber geben, ob sich ein Einfluss der FA2H-Defizienz auf die Erhaltung des Myelins über einen längeren Zeitraum einstellt.

Um besser zu verstehen, welche Lipide entscheidenden Einfluss auf das Miniorgan Haarfollikel und dessen Zyklus haben, sollten die Veränderungen, die in der Dünnschicht erkennbar waren, konkreten Lipiden zugeordnet werden. Hierfür könnte die Technik der

---

kombinierten ESI-MS oder der kombinierten GC-MS verwendet werden, um so die Identifizierung der entsprechenden Lipide zu ermöglichen.

Nach Identifizierung des veränderten Lipidmusters in der Haut könnte angestrebt werden herauszufinden, welche Signalwege hierdurch verändert werden und diese Veränderungen das letztendlich zur Desynchronisierung des Haarzyklus führen.

Des Weiteren steht noch die Analyse der Auswirkungen der FA2H-Defizienz auf weitere Organe, die in der Wildtyp-Maus dieses Enzym exprimieren, aus. Besonderes Augenmerk könnte dabei auf den Gastrointestinaltrakt und die Nieren gelegt werden, für die hier bereits mit Hilfe des Reporterfusionproteins eine zellspezifische und entwicklungsabhängige Expression nachgewiesen werden konnte.

Es könnte die Generierung einer konditionalen FA2H-Knock-Out-Mausmutante angestrebt werden. Diese würde die Möglichkeiten, zellspezifische und zeitspezifische Defizienz zu erzeugen, eröffnen. Damit sollten Untersuchungen von „normal“ entwickelten Organen, denen erst in der Phase der Erhaltung das Enzym FA2H entzogen wird, zugänglich sein. Ein konkreter Anwendungsfall ist dabei die Haut, die 2 Effekte aufweist, die durch die FA2H-Defizienz hervorgerufen wurden: Zum Einen eine Retardierung in der Haarmorphogenese und zum Anderen Verschiebungen im Haarzyklus mit begleitender oder isoliert auftretender Haarfollikeldystrophie. Diese Effekte wären mit Hilfe einer konditionalen und induzierbaren Knock-Out-Mausmutante trennbar und zudem unabhängig von eventuellen systemischen Effekten der FA2H-Defizienz darstellbar.

## 6 Zusammenfassung

Zur Überprüfung der Funktion der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide wurde in der vorliegenden Arbeit eine Mausmutante generiert, die defizient für das Enzym FA2H ist, welches für die  $\alpha$ -Hydroxylierung verantwortlich gemacht werden konnte. Durch homologe Rekombination konnten FA2H-Knock-Out-Mäuse generiert werden, die anstelle der funktionalen FA2H das Reporterfusionsprotein Cyt-b5- $\beta$ -gal exprimierten. Mit Hilfe des Reporterfusionsproteins konnte die Lokalisierung von FA2H exprimierenden Zellen in der Maus und damit erstmals *in vivo* durchgeführt werden. Die Expression konnte im ZNS vor allem in Zellen der weißen Substanz ausgemacht werden. Die Niere zeigte Expression in der Markregion, im Magen waren die Wand des Drüsenmagens und Teile der Wand des Vormagens der Maus positiv für die FA2H-Expression. In der Haut ist die Talgdrüse als der Ort der FA2H-Expression identifiziert worden.

Die Analyse der Lipide des ZNS und PNS erbrachte den Beweis, dass in der erzeugten Mausmutante ein funktionaler Knock-Out des Enzyms FA2H vorlag, da keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide mehr nachweisbar waren. Damit konnte im Umkehrschluss zum ersten Mal die FA2H *in vivo* für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Sphingolipide verantwortlich gemacht werden. Auswirkungen auf das Myelin in seiner weiteren, nicht die Lipide betreffenden Zusammensetzung und in seiner Funktionalität konnten bislang nicht nachgewiesen werden. Die Ultrastruktur erwies sich als dem Wildtyp vergleichbar, bei der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit und der Proteinanalyse des Gehirns waren keine Unterschiede feststellbar.

In der Haut scheint die Defizienz der FA2H einen deutlichen Einfluss zu haben. Die Entwicklung der Haare war bei FA2H-Knock-Out-Mäusen um 2 Tage verzögert, danach bildete sich zunächst normales Fell. Dieses Fell wurde alle 4 Wochen in einem zyklischen Verlauf vollständig verloren. Das Fell wuchs daraufhin körperbedeckend nach, mit jedem neuen Haarverlust gingen jedoch immer mehr Haare permanent verloren, so dass ältere Tiere nahezu nackt erscheinen. Die histologische Untersuchung der Haut zeigte, dass die maximale Hautdicke bei FA2H-Defizienz während der Haarmorphogenese vergrößert ist. Zudem kam es zu Verschiebungen im Haarzyklus und zu Anzeichen für eine vorliegende Haarfollikeldystrophie.

Mit Hilfe einer transgenen Mauslinie, die das Enzym CGT ausschließlich in Oligodendrozyten exprimiert, konnte gezeigt werden, dass diese Expression ausreichend ist, um normales Myelin zu produzieren und zu erhalten. Damit scheint die Möglichkeit ausgeschlossen, dass die beobachtete Expression der CGT in anderen Zelltypen des ZNS, wie z.B. in Astrozyten oder Neuronen, entscheidend zu der Funktionalität des Myelins beiträgt.

## 7 Literaturverzeichnis

Al-Saktawi, K., McLaughlin, M., Klugmann, M., Schneider, A., Barrie, J. A., McCulloch, M. C., Montague, P., Kirkham, D., Nave, K. A., and Griffiths, I. R. (2003). Genetic background determines phenotypic severity of the Plp rumpshaker mutation. *J Neurosci Res* *72*, 12-24.

Alderson, N. L., Maldonado, E. N., Kern, M. J., Bhat, N. R., and Hama, H. (2006). FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain. *J Lipid Res* *47*, 2772-2780.

Alderson, N. L., Rembiesa, B. M., Walla, M. D., Bielawska, A., Bielawski, J., and Hama, H. (2004). The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J Biol Chem* *279*, 48562-48568.

Alonso, L., and Fuchs, E. (2006). The hair cycle. *J Cell Sci* *119*, 391-393.

Amagai, M., Hashimoto, T., Green, K. J., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1995). Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* *104*, 895-901.

Amagai, M., Hashimoto, T., Shimizu, N., and Nishikawa, T. (1994). Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* *94*, 59-67.

Amagai, M., Karpati, S., Prussick, R., Klaus-Kovtun, V., and Stanley, J. R. (1992). Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* *90*, 919-926.

Arroyo, E. J., and Scherer, S. S. (2000). On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* *113*, 1-18.

Bansal, R., and Pfeiffer, S. E. (1989). Reversible inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation by a monoclonal antibody against surface galactolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 6181-6185.

Bansal, R., Winkler, S., and Bheddah, S. (1999). Negative regulation of oligodendrocyte differentiation by galactosphingolipids. *J Neurosci* *19*, 7913-7924.

Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* *81*, 871-927.

Bechmann, I., and Nitsch, R. (1997). Identification of phagocytic glial cells after lesion-induced anterograde degeneration using double-fluorescence labeling: combination of axonal tracing and lectin or immunostaining. *Histochem Cell Biol* *107*, 391-397.

Benninhoff, A. (1994). Anatomie, München, Wien, Baltimore, Drenckhahn, D. Zencker, W.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-1523.

- Bjartmar, C., Hildebrand, C., and Loinder, K. (1994). Morphological heterogeneity of rat oligodendrocytes: electron microscopic studies on serial sections. *Glia* 11, 235-244.
- Bongarzone, E. R., Campagnoni, C. W., Kampf, K., Jacobs, E. C., Handley, V. W., Schonmann, V., and Campagnoni, A. T. (1999). Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci* 19, 8349-8357.
- Bosio, A., Binczek, E., Haupt, W. F., and Stoffel, W. (1998). Composition and biophysical properties of myelin lipid define the neurological defects in galactocerebroside- and sulfatide-deficient mice. *J Neurochem* 70, 308-315.
- Bosio, A., Binczek, E., and Stoffel, W. (1996). Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13280-13285.
- Botchkarev, V. A., and Paus, R. (2003). Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 298, 164-180.
- Botchkarev, V. A., Welker, P., Albers, K. M., Botchkareva, N. V., Metz, M., Lewin, G. R., Bulfone-Paus, S., Peters, E. M., Lindner, G., and Paus, R. (1998). A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 153, 785-799.
- Brenner, M., Johnson, A. B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J. E., and Messing, A. (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27, 117-120.
- Bull, J. J., Pelengaris, S., Hendrix, S., Chronnell, C. M., Khan, M., and Philpott, M. P. (2005). Ectopic expression of c-Myc in the skin affects the hair growth cycle and causes an enlargement of the sebaceous gland. *Br J Dermatol* 152, 1125-1133.
- Campagnoni, A. T., and Macklin, W. B. (1988). Cellular and molecular aspects of myelin protein gene expression. *Mol Neurobiol* 2, 41-89.
- Campagnoni, A. T., and Skoff, R. P. (2001). The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol* 11, 74-91.
- Cao, T., Racz, P., Szauter, K. M., Groma, G., Nakamatsu, G. Y., Fogelgren, B., Pankotai, E., He, Q. P., and Csiszar, K. (2007). Mutation in Mpzl3, a Gene Encoding a Predicted the Adhesion Protein, in the Rough Coat (rc) Mice with Severe Skin and Hair Abnormalities. *J Invest Dermatol*.
- Chen, S. J., and DeVries, G. H. (1989). Mitogenic effect of axolemma-enriched fraction on cultured oligodendrocytes. *J Neurochem* 52, 325-327.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Coetzee, T., Dupree, J. L., and Popko, B. (1998). Demyelination and altered expression of myelin-associated glycoprotein isoforms in the central nervous system of galactolipid-deficient mice. *J Neurosci Res* 54, 613-622.

- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K., and Popko, B. (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 86, 209-219.
- Coetzee, T., Suzuki, K., and Popko, B. (1998). New perspectives on the function of myelin galactolipids. *Trends Neurosci* 21, 126-130.
- Colello, R. J., and Schwab, M. E. (1994). A role for oligodendrocytes in the stabilization of optic axon numbers. *J Neurosci* 14, 6446-6452.
- Curatolo, W., and Neuringer, L. J. (1986). The effects of cerebroside on model membrane shape. *J Biol Chem* 261, 17177-17182.
- Deber, C. M., and Reynolds, S. J. (1991). Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin Biochem* 24, 113-134.
- DeVries, G. H., Minier, L. N., and Lewis, B. L. (1983). Further studies on the mitogenic response of cultured Schwann cells to rat CNS axolemma-enriched fractions. *Brain Res* 285, 87-93.
- Dickie (1966). Rough coat. *Mouse News Lett.*
- Doering, T., Brade, H., and Sandhoff, K. (2002). Sphingolipid metabolism during epidermal barrier development in mice. *J Lipid Res* 43, 1727-1733.
- Doering, T., Proia, R. L., and Sandhoff, K. (1999). Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* 447, 167-170.
- Downing, D. T. (1992). Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 33, 301-313.
- Dunham, N. W., and Miya, T. S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 46, 208-209.
- Dupree, J. L., Coetzee, T., Blight, A., Suzuki, K., and Popko, B. (1998). Myelin galactolipids are essential for proper node of Ranvier formation in the CNS. *J Neurosci* 18, 1642-1649.
- Dupree, J. L., Coetzee, T., Suzuki, K., and Popko, B. (1998). Myelin abnormalities in mice deficient in galactocerebroside and sulfatide. *J Neurocytol* 27, 649-659.
- Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., and Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124, 481-492.
- Eckhardt, M., Yaghoofam, A., Fewou, S. N., Zoller, I., and Gieselmann, V. (2005). A mammalian fatty acid hydroxylase responsible for the formation of alpha-hydroxylated galactosylceramide in myelin. *Biochem J* 388, 245-254.
- Ezoe, T., Vanier, M. T., Oya, Y., Popko, B., Tohyama, J., Matsuda, J., Suzuki, K., and Suzuki, K. (2000). Biochemistry and neuropathology of mice doubly deficient in synthesis and degradation of galactosylceramide. *J Neurosci Res* 59, 170-178.

- Fewou, S. N., Bussow, H., Schaeren-Wiemers, N., Vanier, M. T., Macklin, W. B., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2005). Reversal of non-hydroxy:alpha-hydroxy galactosylceramide ratio and unstable myelin in transgenic mice overexpressing UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase. *J Neurochem* 94, 469-481.
- Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roeber, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., *et al.* (2000). Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *Faseb J* 14, 752-760.
- Fowler, S. D., and Greenspan, P. (1985). Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem* 33, 833-836.
- Frank, M., Schaeren-Wiemers, N., Schneider, R., and Schwab, M. E. (1999). Developmental expression pattern of the myelin proteolipid MAL indicates different functions of MAL for immature Schwann cells and in a late step of CNS myelinogenesis. *J Neurochem* 73, 587-597.
- Gieselmann, V., Matzner, U., Hess, B., Lullmann-Rauch, R., Coenen, R., Hartmann, D., D'Hooge, R., DeDeyn, P., and Nagels, G. (1998). Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *J Inher Metab Dis* 21, 564-574.
- Graf, K., Baltes, H., Ahrens, H., Helm, C. A., and Husted, C. A. (2002). Structure of hydroxylated galactocerebrosides from myelin at the air-water interface. *Biophys J* 82, 896-907.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., and Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100, 965-973.
- Griffiths, I. R., Schneider, A., Anderson, J., and Nave, K. A. (1995). Transgenic and natural mouse models of proteolipid protein (PLP)-related dysmyelination and demyelination. *Brain Pathol* 5, 275-281.
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T., and Dunn, T. (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* 272, 29704-29710.
- Hakomori, S. (1986). Glycosphingolipids. *Sci Am* 254, 44-53.
- Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204, 63-113.
- Handjiski, B. K., Eichmuller, S., Hofmann, U., Czarnetzki, B. M., and Paus, R. (1994). Alkaline phosphatase activity and localization during the murine hair cycle. *Br J Dermatol* 131, 303-310.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11, 5586-5591.
- Hayashi, K., Cao, T., Passmore, H., Jourdan-Le Saux, C., Fogelgren, B., Khan, S., Hornstra, I., Kim, Y., Hayashi, M., and Csiszar, K. (2004). Progressive hair loss and myocardial degeneration in rough coat mice: reduced lysyl oxidase-like (LOXL) in the skin and heart. *J Invest Dermatol* 123, 864-871.

- Hebert, J. M., Rosenquist, T., Gotz, J., and Martin, G. R. (1994). FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78, 1017-1025.
- Hendrix, S., Handjiski, B., Peters, E. M., and Paus, R. (2005). A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice. *J Invest Dermatol* 125, 42-51.
- Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lullmann-Rauch, R., Goebel, H. H., Evers, M., von Figura, K., D'Hooge, R., Nagels, G., *et al.* (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14821-14826.
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., and Bjartmar, C. (1993). Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40, 319-384.
- Hirahara, Y., Bansal, R., Honke, K., Ikenaka, K., and Wada, Y. (2004). Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. *Glia* 45, 269-277.
- Holleran, W. M., Takagi, Y., and Uchida, Y. (2006). Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* 580, 5456-5466.
- Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., and Taniguchi, N. (2002). Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4227-4232.
- Hsiao, V. C., Tian, R., Long, H., Der Perng, M., Brenner, M., Quinlan, R. A., and Goldman, J. E. (2005). Alexander-disease mutation of GFAP causes filament disorganization and decreased solubility of GFAP. *J Cell Sci* 118, 2057-2065.
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1485, 63-99.
- Inoue, K., Osaka, H., Sugiyama, N., Kawanishi, C., Onishi, H., Nezu, A., Kimura, K., Yamada, Y., and Kosaka, K. (1996). A duplicated PLP gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease detected by comparative multiplex PCR. *Am J Hum Genet* 59, 32-39.
- Jennemann, R., Sandhoff, R., Langbein, L., Kaden, S., Rothermel, U., Gallala, H., Sandhoff, K., Wiegandt, H., and Grone, H. J. (2007). Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J Biol Chem* 282, 3083-3094.
- Kaplan, M. R., Meyer-Franke, A., Lambert, S., Bennett, V., Duncan, I. D., Levinson, S. R., and Barres, B. A. (1997). Induction of sodium channel clustering by oligodendrocytes. *Nature* 386, 724-728.
- Karlsson, K., Nilsson, K., Samuelsson, B. E., and Steen, G. O. (1969). The presence of hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine rennet stomach. *Biochim Biophys Acta* 176, 660-663.

- Karlsson, K. A., Samuelsson, B. E., and Steen, G. O. (1973). The sphingolipid composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. *Biochim Biophys Acta* 316, 317-335.
- Kettenmann, H., Ransom, B. R. (1995). *Neuroglia*, Oxford University Press.
- Kishimoto, Y. (1986). Phylogenetic development of myelin glycosphingolipids. *Chem Phys Lipids* 42, 117-128.
- Kishimoto, Y., and Radin, N. S. (1966). Determination of brain gangliosides by determination of ganglioside stearic acid. *J Lipid Res* 7, 141-145.
- Koch, P. J., Mahoney, M. G., Cotsarelis, G., Rothenberger, K., Lavker, R. M., and Stanley, J. R. (1998). Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *J Cell Sci* 111 (Pt 17), 2529-2537.
- Koch, P. J., Mahoney, M. G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G. F., Whitaker-Menezes, D., and Stanley, J. R. (1997). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 137, 1091-1102.
- Kolter, T., and Sandhoff, K. (2006). Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2057-2079.
- Kolter, T. a. S., K (1999). Sphingolipids: their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases. *Angew Chem Int Ed* 38, 1532-1568.
- Koshy, K. M., Wang, J., and Boggs, J. M. (1999). Divalent cation-mediated interaction between cerebroside sulfate and cerebroside: an investigation of the effect of structural variations of lipids by electrospray ionization mass spectrometry. *Biophys J* 77, 306-318.
- Kozlov, G., Lee, J., Gravel, M., Ekiel, I., Braun, P. E., and Gehring, K. (2002). Assignment of the <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonances of the catalytic domain of the rat 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J Biomol NMR* 22, 99-100.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 312-318.
- Kuhn, P. L., Petroulakis, E., Zazanis, G. A., and McKinnon, R. D. (1995). Motor function analysis of myelin mutant mice using a rotarod. *Int J Dev Neurosci* 13, 715-722.
- Kulesa, H., Turk, G., and Hogan, B. L. (2000). Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *Embo J* 19, 6664-6674.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, P., Hoffmann, V., Ding, B. C., Proia, R. L., and Deng, C. X. (2007). Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int J Biol Sci* 3, 120-128.
- Liedtke, W., Edelman, W., Bieri, P. L., Chiu, F. C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R., and Raine, C. S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607-615.
- Lindner, G., Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Ling, G., van der Veen, C., and Paus, R. (1997). Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol* 151, 1601-1617.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, Z. H., Books, J. T., Kaufman, R. M., and Ley, T. J. (2003). Long targeting arms do not increase the efficiency of homologous recombination in the beta-globin locus of murine embryonic stem cells. *Blood* 102, 1531-1533.
- Lui, K., Commens, C., Choong, R. & Jaworski, R (1988). Collodion babies with Gaucher`s disease. *Arch Dis Childhood* 63, 854-856.
- Lunny, D. P., Weed, E., Nolan, P. M., Marquardt, A., Augustin, M., and Porter, R. M. (2005). Mutations in gasdermin 3 cause aberrant differentiation of the hair follicle and sebaceous gland. *J Invest Dermatol* 124, 615-621.
- Ma, L., Liu, J., Wu, T., Plikus, M., Jiang, T. X., Bi, Q., Liu, Y. H., Muller-Rover, S., Peters, H., Sundberg, J. P., *et al.* (2003). 'Cyclic alopecia' in *Msx2* mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation. *Development* 130, 379-389.
- Mack, J. A., Anand, S., and Maytin, E. V. (2005). Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75, 314-329.
- Madison, K. C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231-241.
- Madison, K. C., Wertz, P. W., Strauss, J. S., and Downing, D. T. (1986). Lipid composition of cultured murine keratinocytes. *J Invest Dermatol* 87, 253-259.
- Magin, T. M., McWhir, J., and Melton, D. W. (1992). A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 20, 3795-3796.
- Mallon, B. S., Shick, H. E., Kidd, G. J., and Macklin, W. B. (2002). Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22, 876-885.

- Martin, S., and Parton, R. G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 373-378.
- Miller, R. H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* 67, 451-467.
- Molander-Melin, M., Pernber, Z., Franken, S., Gieselmann, V., Mansson, J. E., and Fredman, P. (2004). Accumulation of sulfatide in neuronal and glial cells of arylsulfatase A deficient mice. *J Neurocytol* 33, 417-427.
- Morell, P., and Norton, W. T. (1980). Myelin. *Sci Am* 242, 88-90, 92, 96 passim.
- Morrissey, T. K., Levi, A. D., Nuijens, A., Sliwkowski, M. X., and Bunge, R. P. (1995). Axon-induced mitogenesis of human Schwann cells involves heregulin and p185erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1431-1435.
- Muller-Rover, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I. A., Stenn, K. S., and Paus, R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 117, 3-15.
- Muller-Rover, S., Peters, E. J., Botchkarev, V. A., Panteleyev, A., and Paus, R. (1998). Distinct patterns of NCAM expression are associated with defined stages of murine hair follicle morphogenesis and regression. *J Histochem Cytochem* 46, 1401-1410.
- Murillas, R., Larcher, F., Conti, C. J., Santos, M., Ullrich, A., and Jorcano, J. L. (1995). Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *Embo J* 14, 5216-5223.
- Nagy A, G. M., Vintersten K, und Behringer R. (2003). *Manipulating the Mouse Embryo; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nave, K. A., and Salzer, J. L. (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* 16, 492-500.
- Nonaka, G., and Kishimoto, Y. (1979). Levels of cerebroside, sulfatides, and galactosyl diglycerides in different regions of rat brain. Change during maturation and distribution in subcellular fractions of gray and white matter of sheep brain. *Biochim Biophys Acta* 572, 432-441.
- O'Shaughnessy, R. F., and Christiano, A. M. (2004). Inherited disorders of the skin in human and mouse: from development to differentiation. *Int J Dev Biol* 48, 171-179.
- Pannese, E. (1994). Thieme Verlag, Neurocytology.
- Panteleyev, A. A., Botchkareva, N. V., Sundberg, J. P., Christiano, A. M., and Paus, R. (1999). The role of the hairless (hr) gene in the regulation of hair follicle catagen transformation. *Am J Pathol* 155, 159-171.
- Panteleyev, A. A., Jahoda, C. A., and Christiano, A. M. (2001). Hair follicle predetermination. *J Cell Sci* 114, 3419-3431.

- Pappas, A., Anthonavage, M., and Gordon, J. S. (2002). Metabolic fate and selective utilization of major fatty acids in human sebaceous gland. *J Invest Dermatol* 118, 164-171.
- Park, Y. G., Hayasaka, S., Takagishi, Y., Inouye, M., Okumoto, M., and Oda, S. (2001). Histological characteristics of the pelage skin of rough fur mice (C3H/HeJ-ruf/ruf). *Exp Anim* 50, 179-182.
- Paus, R., and Cotsarelis, G. (1999). The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 341, 491-497.
- Paus, R., Muller-Rover, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmuller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., and Handjiski, B. (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 113, 523-532.
- Paus, R., Schilli, M. B., Handjiski, B., Menrad, A., Henz, B. M., and Plonka, P. (1996). Topical calcitriol enhances normal hair regrowth but does not prevent chemotherapy-induced alopecia in mice. *Cancer Res* 56, 4438-4443.
- Pennycuik, P. R., and Raphael, K. A. (1984). The angora locus (go) in the mouse: hair morphology, duration of growth cycle and site of action. *Genet Res* 44, 283-291.
- Pernber, Z., Molander-Melin, M., Berthold, C. H., Hansson, E., and Fredman, P. (2002). Expression of the myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain. *J Neurosci Res* 69, 86-93.
- Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E., and Bansal, R. (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191-197.
- Porter, R. M., Jahoda, C. A., Lunny, D. P., Henderson, G., Ross, J., McLean, W. H., Whittock, N. V., Wilson, N. J., Reichelt, J., Magin, T. M., and Lane, E. B. (2002). Defolliculated (df1): a dominant mouse mutation leading to poor sebaceous gland differentiation and total elimination of pelage follicles. *J Invest Dermatol* 119, 32-37.
- Raivich, G., and Banati, R. (2004). Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev* 46, 261-281.
- Rao, M. S., and Mayer-Proschel, M. (1997). Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev Biol* 188, 48-63.
- Rasband, M. N., Tayler, J., Kaga, Y., Yang, Y., Lappe-Siefke, C., Nave, K. A., and Bansal, R. (2005). CNP is required for maintenance of axon-glia interactions at nodes of Ranvier in the CNS. *Glia* 50, 86-90.
- Reichelt, J., Breiden, B., Sandhoff, K., and Magin, T. M. (2004). Loss of keratin 10 is accompanied by increased sebocyte proliferation and differentiation. *Eur J Cell Biol* 83, 747-759.
- Reichelt, J., Furstenberger, G., and Magin, T. M. (2004). Loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, increased keratinocyte turnover, and decreased tumor formation in mice. *J Invest Dermatol* 123, 973-981.

- Reichelt, J., and Magin, T. M. (2002). Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci* 115, 2639-2650.
- Roach, A., Takahashi, N., Pravtcheva, D., Ruddle, F., and Hood, L. (1985). Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice. *Cell* 42, 149-155.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V. A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., *et al.* (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *Faseb J* 14, 2075-2086.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandhoff, K., and Kolter, T. (2003). Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 847-861.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Saravanan, K., Schaeren-Wiemers, N., Klein, D., Sandhoff, R., Schwarz, A., Yaghootfam, A., Gieselmann, V., and Franken, S. (2004). Specific downregulation and mistargeting of the lipid raft-associated protein MAL in a glycolipid storage disorder. *Neurobiol Dis* 16, 396-406.
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24, 69-176.
- Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., *et al.* (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24, 391-395.
- Schaeren-Wiemers, N., van der Bijl, P., and Schwab, M. E. (1995). The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and Schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *J Neurochem* 65, 2267-2278.
- Scherer, S. S., Braun, P. E., Grinspan, J., Collarini, E., Wang, D. Y., and Kamholz, J. (1994). Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron* 12, 1363-1375.
- Schneider, A. M., Griffiths, I. R., Readhead, C., and Nave, K. A. (1995). Dominant-negative action of the jimpy mutation in mice complemented with an autosomal transgene for myelin proteolipid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4447-4451.
- Schwarz, A., Terstappen, G. C., and Futerman, A. H. (1997). Isolation of gangliosides by cloud-point extraction with a nonionic detergent. *Anal Biochem* 254, 221-225.

- Schwenk, F., Zevnik, B., Bruning, J., Rohl, M., Willuweit, A., Rode, A., Hennek, T., Kauselmann, G., Jaenisch, R., and Kuhn, R. (2003). Hybrid embryonic stem cell-derived tetraploid mice show apparently normal morphological, physiological, and neurological characteristics. *Mol Cell Biol* 23, 3982-3989.
- Shah, J., Atienza, J. M., Rawlings, A. V., and Shipley, G. G. (1995). Physical properties of ceramides: effect of fatty acid hydroxylation. *J Lipid Res* 36, 1945-1955.
- Sheikh, K. A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T. O., Proia, R. L., Griffin, J. W., and Schnaar, R. L. (1999). Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7532-7537.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Simpson, M. A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D. A., Neville, D. C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., *et al.* (2004). Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet* 36, 1225-1229.
- Singh, I., and Kishimoto, Y. (1979). Alpha hydroxylation of lignoceric acid in brain. Subcellular localization of alpha hydroxylation and the requirement for heat-stable and heat-labile factors and sphingosine. *J Biol Chem* 254, 7698-7704.
- Sporkel, O., Uschkureit, T., Bussow, H., and Stoffel, W. (2002). Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: myelination and development. *Glia* 37, 19-30.
- Stenn, K. S., and Paus, R. (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81, 449-494.
- Stenn, K. S., Sundberg, J. P., and Sperling, L. C. (1999). Hair follicle biology, the sebaceous gland, and scarring alopecias. *Arch Dermatol* 135, 973-974.
- Stewart, H. J., Eccleston, P. A., Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1991). Mitogenic response and phenotype of short- and long-term cultured Schwann cells. Relationship to intracellular cAMP levels. *Ann N Y Acad Sci* 633, 537-539.
- Stoffel, W., and Bosio, A. (1997). Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol* 7, 654-661.
- Streit, W. J. (2001). Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 22, 619-624.
- Sugimoto, Y., and Tsuruo, T. (1997). In vivo drug-selectable markers in gene therapy. *Leukemia* 11 Suppl 3, 552-556.
- Sundberg, J. P., and Hogan, M. E. (1994). Hair types and subtypes in the laboratory mouse. *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities*, 57-68.
- Sundberg, J. P., Boggess, D., Sundberg, B. A., Eilertsen, K., Parimoo, S., Filippi, M., and Stenn, K. (2000). Asebia-2J (*Scd1(ab2J)*): a new allele and a model for scarring alopecia. *Am J Pathol* 156, 2067-2075.

- Sundberg, J. P., Rourk, M. H., Boggess, D., Hogan, M. E., Sundberg, B. A., and Bertolino, A. P. (1997). Angora mouse mutation: altered hair cycle, follicular dystrophy, phenotypic maintenance of skin grafts, and changes in keratin expression. *Vet Pathol* *34*, 171-179.
- Svennerholm, L., and Stallberg-Stenhagen, S. (1968). Changes in the fatty acid composition of cerebroside and sulfatide of human nervous tissue with age. *J Lipid Res* *9*, 215-225.
- Sweet HO, O. S., Taylor BA, Rowe L, Davisson MT, Cook S et al. (1990). Rough fur (ruf). *Mouse Genome* *86*, 236-237.
- Takagi, S., Tojo, H., Tomita, S., Sano, S., Itami, S., Hara, M., Inoue, S., Horie, K., Kondoh, G., Hosokawa, K., *et al.* (2003). Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. *J Clin Invest* *112*, 1372-1382.
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., *et al.* (1996). Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10662-10667.
- Tamai, I., and Tsuji, A. (2000). Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* *89*, 1371-1388.
- Taylor, C. M., Coetzee, T., and Pfeiffer, S. E. (2002). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem* *81*, 993-1004.
- Ternes, P., Franke, S., Zahringer, U., Sperling, P., and Heinz, E. (2002). Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* *277*, 25512-25518.
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* *51*, 503-512.
- Uchida, Y., Hama, H., Alderson, N. L., Douangpanya, S., Wang, Y., Crumrine, D. A., Elias, P. M., and Holleran, W. M. (2007). Fatty acid 2-hydroxylase, encoded by FA2H, accounts for differentiation-associated increase in 2-OH ceramides during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*.
- Uchida, Y., Hara, M., Nishio, H., Sidransky, E., Inoue, S., Otsuka, F., Suzuki, A., Elias, P. M., Holleran, W. M., and Hamanaka, S. (2000). Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* *41*, 2071-2082.
- Umemori, H., Kadowaki, Y., Hirose, K., Yoshida, Y., Hironaka, K., Okano, H., and Yamamoto, T. (1999). Stimulation of myelin basic protein gene transcription by Fyn tyrosine kinase for myelination. *J Neurosci* *19*, 1393-1397.
- van Echten-Deckert, G. (2000). Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. *Methods Enzymol* *312*, 64-79.

- van Meer, G., and Lisman, Q. (2002). Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* 277, 25855-25858.
- Van Meer, P., and Raber, J. (2005). Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochem J* 389, 593-610.
- Vannucci, S. J., Maher, F., and Simpson, I. A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2-21.
- von Figura, K., Gieselmann, V., Jaeken, J. (2001). Metachromatic Leukodystrophy. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Eds.: Scriver, Beaudet, Valle, Sly Mc Graw Hill, New York, 8<sup>th</sup> edition, chapter 148, 3695-3724.
- Waxman, S. G., and Sims, T. J. (1984). Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res* 292, 179-185.
- Wertz, P. W., and van den Bergh, B. (1998). The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids* 91, 85-96.
- Westerberg, R., Tvrdik, P., Unden, A. B., Mansson, J. E., Norlen, L., Jakobsson, A., Holleran, W. H., Elias, P. M., Asadi, A., Flodby, P., *et al.* (2004). Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J Biol Chem* 279, 5621-5629.
- Wolswijk, G., and Noble, M. (1989). Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development* 105, 387-400.
- Yaghootfam, A., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2005). Delay of myelin formation in arylsulphatase A-deficient mice. *Eur J Neurosci* 21, 711-720.
- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R. L. (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9142-9147.
- Yin, X., Crawford, T. O., Griffin, J. W., Tu, P., Lee, V. M., Li, C., Roder, J., and Trapp, B. D. (1998). Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18, 1953-1962.
- Zheng, Y., Eilertsen, K. J., Ge, L., Zhang, L., Sundberg, J. P., Prouty, S. M., Stenn, K. S., and Parimoo, S. (1999). *Scd1* is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet* 23, 268-270.
- Zoller, I., Bussow, H., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2005). Oligodendrocyte-specific ceramide galactosyltransferase (CGT) expression phenotypically rescues CGT-deficient mice and demonstrates that CGT activity does not limit brain galactosylceramide level. *Glia* 52, 190-198.

**Publikationen:**

Eckhardt, M., Yaghoofam, A., Fewou, S. N., Zoller, I., and Gieselmann, V. (2005). A mammalian fatty acid hydroxylase responsible for the formation of alpha-hydroxylated galactosylceramide in myelin. *Biochem J* 388, 245-254.

Zoller, I., Bussow, H., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2005). Oligodendrocyte-specific ceramide galactosyltransferase (CGT) expression phenotypically rescues CGT-deficient mice and demonstrates that CGT activity does not limit brain galactosylceramide level. *Glia* 52, 190-198.

Zoller, I.; Meixner, M., Bussow, H., Meyer, R., Gieselmann, V., Eckhardt, M. Structural and functional normal myelin in the absence of 2-hydroxylated sphingolipids. Eingereicht

**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, Inge Zöller, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, Mai 2007

Inge Zöller

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Inge Zöller, geb. Grothaus  
Geburtsdatum: 14.10.1976  
Geburtsort: Papenburg  
Familienstand: verheiratet

### **Schulbildung**

1983-1987 Grundsschule Lehe  
1987-1994 Mariengymnasium Papenburg  
1994-1996 Staatliches Gymnasium Papenburg  
Abschluss: Abitur in 06/1996

### **Hochschulausbildung**

10/1996-10/2000 Studium der Pharmazie an der Phillips-Universität in Marburg  
Abschluss: 2.Staatsexamen in 10/2000  
11/2001 3.Staatsexamen und Approbation als Apothekerin  
2003-2007 Promotionsvorhaben zum Thema „Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion alpha-hydroxylierter Sphingolipide anhand von Mausmodellen“ am Institut für Physiologische Chemie an der Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn unter der Leitung von Herrn Professor Volkmar Gieselmann

### **Berufstätigkeit**

11/2000-10/2001 Praktisches Jahr in der Privilegierten Adler Apotheke in Hamburg  
11/2001-03/2003 Angestellte Apothekerin in der Privilegierten Adler Apotheke in Hamburg

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann für die Betreuung meiner Promotionsarbeit, die stetige Unterstützung des Projektes und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein weiterer besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Matthias Eckhardt dafür, dass er mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat. Er hat mich in die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt und mir von Anfang bis Ende alle noch so kleinen Fragen geduldig beantwortet. Ein großer Dank dafür!

Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr, Institut für Pharmazeutische Pharmakologie der Universität Bonn, möchte ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Koreferats danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Büssow, Institut für Anatomie der Universität Bonn, bedanke ich mich für Übernahme der Elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die freundlichen Diskussionen.

Ich danke all den lieben Leuten aus dem Labor und hier ganz speziell Herrn Norbert Rösel, der jeden einzelnen Tag mit seiner unermüdlichen Hilfsbereitschaft zu einem besseren Tag gemacht hat, und Frau Ivonne Becker, deren Gespräche über alltägliche Dinge mehr zum Ausgleich beigetragen haben, als sie ahnen mag. Beide Dinge sind auch und ganz besonders für Frau Karola Ragut zutreffend, weshalb ich hier nur sagen kann: Danke Karola!

Bei den Tierpflegern des einen und des anderen Maushauses möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Atmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein ausdrücklicher Dank geht natürlich an Anne und Annette für die vielen guten und wichtigen Gespräche und dafür, dass fast immer mindestens eine von euch beiden da war. Mit Euch hat das Laborleben einen besonders herzlichen Charakter bekommen, was nicht unbedingt zu erwarten war.

Ich möchte ausdrücklich auch der Fussballtippgemeinschaft danken, die beinahe täglich zu reichhaltigen und inhaltsschweren Diskussionen geführt hat.

Mein besonderer Dank gilt wie immer meinem Mann Michael, der jede Station mit mir durchlebt und durchstanden hat und mich immer wieder weiter getragen hat, so dass ich am Ende hier angelangt bin.