

**Untersuchungen zur Funktion der  
alpha-hydroxylierten Sphingolipide im  
Nervensystem und in der Haut**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Marion Meixner  
aus  
Düsseldorf

Bonn, März 2009

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

1. Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. M. Hoch

Tag der Promotion: 25.06.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
*[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online)* elektronisch publiziert.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	LIPIDE .....	1
1.2	FETTSÄURE-2-HYDROXYLASE (FA2H) .....	3
1.3	DAS NERVENSYSTEM .....	5
1.3.1	<i>Die Zellen des Nervensystems.....</i>	<i>5</i>
1.3.2	<i>Myelinisierung.....</i>	<i>7</i>
1.3.3	<i>Zusammensetzung des Myelins.....</i>	<i>8</i>
1.3.3.1	Myelin-Lipide .....	9
1.3.3.2	Myelin-Proteine .....	10
1.3.4	<i>Mausmutanten, die Veränderungen im Myelin aufweisen .....</i>	<i>11</i>
1.3.5	<i>Die Ceramid-Galaktosyltransferase defiziente Maus .....</i>	<i>12</i>
1.4	AUFBAU DER HAUT UND DER HAARE .....	14
1.4.1	<i>Die Haut.....</i>	<i>14</i>
1.4.2	<i>Der Haarfollikel.....</i>	<i>15</i>
1.4.3	<i>Der Haarzyklus .....</i>	<i>17</i>
1.5	ZIELSETZUNG .....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.1	MATERIAL .....	19
2.1.1	<i>Bakterienstämme und Zelllinien.....</i>	<i>19</i>
2.1.2	<i>Plasmide .....</i>	<i>19</i>
2.1.3	<i>Lösungen und Puffer .....</i>	<i>19</i>
2.1.4	<i>Medien.....</i>	<i>21</i>
2.1.5	<i>Chemikalien.....</i>	<i>22</i>
2.1.6	<i>Weitere Materialien.....</i>	<i>23</i>
2.1.7	<i>Molekulargewichtsstandards .....</i>	<i>24</i>
2.1.8	<i>Synthetische Oligonukleotide .....</i>	<i>24</i>
2.1.9	<i>Antikörper.....</i>	<i>25</i>
2.1.10	<i>Enzyme .....</i>	<i>26</i>
2.1.11	<i>Geräte.....</i>	<i>27</i>

---

2.1.12	<i>Computerprogramme</i> .....	28
2.2	METHODEN .....	29
2.2.1	<i>Zellkultur</i> .....	29
2.2.1.1	Passagieren von Zellen .....	29
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	29
2.2.1.3	Stabile Transfektion .....	30
2.2.1.4	Oligodendrozyten-Primärzellkultur .....	31
2.2.2	<i>Arbeiten mit Nukleinsäuren</i> .....	31
2.2.2.1	RNA-Isolierung aus Zellen .....	31
2.2.2.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	32
2.2.2.3	Denaturierende Agarosegele.....	32
2.2.2.4	Reverse Transkription.....	33
2.2.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	33
2.2.2.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	35
2.2.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	35
2.2.2.8	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen .....	35
2.2.2.9	Dephosphorylierung der 5' Enden der DNA .....	36
2.2.2.10	Ligation .....	36
2.2.3	<i>Bakterien</i> .....	37
2.2.3.1	Transformation von Bakterien mit DNA .....	37
2.2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA .....	37
2.2.3.3	DNA-Sequenzanalyse .....	38
2.2.4	<i>Proteine</i> .....	38
2.2.4.1	Präparation von Zelllysaten .....	38
2.2.4.2	Proteinbestimmung .....	39
2.2.4.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen .....	39
2.2.4.4	Silberfärbung von SDS-Gelen .....	40
2.2.4.5	Proteintransfer auf Membranen → Western Blot nach dem Semi Dry Verfahren .....	41
2.2.4.6	Anfertigung von Gewebeschnitten .....	42
2.2.4.7	Histologische HE-Färbung.....	43
2.2.4.8	Immunfluoreszenznachweis von Proteinen .....	43
2.2.4.9	Nachweis von Proteinen mittels immunhistochemischer Färbung.....	44
2.2.4.10	Lipidfärbung mit OilRed .....	44



2.2.4.11	$\beta$ -Galaktosidase-Nachweisreaktion.....	45
2.2.4.12	Präparation von "Teased Fibers" vom murinen Ischias Nerv .....	45
2.2.5	<i>Lipide</i> .....	46
2.2.5.1	Lipidextraktion.....	46
2.2.5.2	Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie .....	47
2.2.5.3	Präparation von Myelin aus Mausgehirnen .....	47
2.2.5.4	Präparation von "detergent resistant membranes" .....	48
2.2.6	<i>Mäuse</i> .....	49
2.2.6.1	Tierexperimentelles Arbeiten.....	49
2.2.6.2	Genotypisierung der Mäuse .....	49
2.2.6.3	Verhaltenstests .....	50
2.2.6.3.1	Open Field Test.....	50
2.2.6.3.2	Rotarod Experimente .....	50
2.2.7	<i>Statistische Auswertung</i> .....	51
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
3.1	IN VITRO ZELLKULTURVERSUCHE.....	52
3.1.1	<i>Subzelluläre Lokalisation der FA2H</i> .....	52
3.1.2	<i>Charakterisierung eines Antiserums gegen FA2H</i> .....	59
3.1.3	<i>Analyse der Lipide der FA2H exprimierenden Zellen</i> .....	60
3.2	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FA2H DEFIZIENTEN MÄUSE .....	61
3.2.1	<i>Untersuchungen an jungen FA2H-KO Tieren</i> .....	61
3.2.1.1	Analyse der Sphingolipide aus Mausgehirn .....	62
3.2.1.2	Analyse der myelinspezifischen Proteine aus Mausgehirn.....	64
3.2.1.3	Analyse des Verhältnisses von S/L-MAG .....	66
3.2.1.4	Analyse des Myelins aus FA2H defizienten Tieren .....	67
3.2.1.5	Strukturanalyse der paranodalen Region .....	69
3.2.1.6	Verhaltenstest mit adulten Mäusen.....	70
3.2.1.7	Messung der Nervenleitgeschwindigkeit.....	72
3.2.2	<i>Untersuchungen an alten FA2H defizienten Tieren</i> .....	73
3.2.2.1	Analyse der Sphingolipide im ZNS und PNS.....	73
3.2.2.2	Analyse des myelinspezifischen Proteins MBP im ZNS und PNS.....	74
3.2.2.3	Elektronenmikroskopische Analyse.....	75

3.2.2.4	Analyse des Myelins .....	77
3.2.2.5	Analyse der neuronalen Degeneration .....	78
3.2.2.6	Untersuchung der paranodalen Region .....	79
3.2.2.7	Messung der Nervenleitgeschwindigkeit .....	81
3.3	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER FA2H/CGT-DOPPEL-KO TIERE .....	82
3.3.1	<i>Extraktion des Myelins aus FA2H/CGT Mäusen</i> .....	83
3.3.2	<i>Analyse der Sphingolipide im ZNS und PNS</i> .....	84
3.3.3	<i>Analyse von MBP im ZNS und PNS</i> .....	90
3.4	CHARAKTERISIERUNG DES HAUTPHÄNOTYPS DER FA2H-KO MÄUSE .....	91
3.4.1	<i>Analyse der Lokalisation der FA2H in der Haut</i> .....	91
3.4.2	<i>Analyse des Haarzyklus in FA2H defizienten Tieren</i> .....	93
3.4.3	<i>Untersuchung der verschiedenen Keratine der Haut</i> .....	102
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>105</b>
4.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKALISATION DER FETTSÄURE-2- HYDROXYLASE EXPRESSION ANHAND EINES ZELLKULTURMODELLS .....	105
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES NERVENSYSTEMS DER FA2H DEFIZIENTEN MÄUSE .....	107
4.2.1	<i>Junge FA2H-KO Tiere zeigten trotz veränderter Lipidzusammensetzung fast keine neurologischen Symptome</i> .....	107
4.2.2	<i>Alte FA2H-KO Mäuse entwickelten eine axonale Degeneration</i> .....	112
4.3	UNTERSUCHUNGEN DER FA2H/CGT-DOPPEL-KO MÄUSE .....	116
4.4	EINFLUSS DER FA2H DEFIZIENZ AUF DIE HAUT UND DEN HAARZYKLUS .....	119
4.4.1	<i>Expression der FA2H in der Haut</i> .....	119
4.4.2	<i>FA2H defiziente Tiere können in der Haut noch hydroxylierte Lipide bilden</i> .....	119
4.4.3	<i>Die FA2H Defizienz führt zu einem zyklischen Haarverlust</i> .....	121
4.4.4	<i>FA2H-KO Mäuse zeigten eine Verschiebung des Haarzyklus</i> .....	122
4.4.5	<i>Die FA2H Defizienz führt zu einer Talgdrüsenhyperplasie</i> .....	124
4.4.6	<i>Der Haarverlust kann nicht auf Defizite der IRS oder der ORS zurückgeführt werden</i> .....	126

---

4.5	AUSBLICK .....	127
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>139</b>
	PLASMIDKARTEN.....	139
	PUBLIKATIONEN .....	140
	DANKSAGUNG .....	141
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	142

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1-1	Schematische Darstellung der de novo Synthese von Ceramid .....	2
Abb. 1-2	Synthese einzelner Sphingolipide ausgehend von Ceramid .....	2
Abb. 1-3	Schematisches Modell der Fettsäure-2-Hydroxylase .....	4
Abb. 1-4	Schematische Darstellung der vier Zelltypen des zentralen Nervensystems .....	6
Abb. 1-5	Schematische Darstellung der Topologie der Myelinmembran .....	10
Abb. 1-6	Übersicht über den Aufbau der Haut .....	14
Abb. 1-7	Schematische Darstellung eines Haarfollikels .....	16
Abb. 3-1	Codierende Sequenz der FA2H aus verschiedenen Tierspezies.....	54
Abb. 3-2	Die Co-Färbung der FA2H mit ER- bzw. Golgi-Proteinen zeigt, dass die Hydroxylase im ER lokalisiert ist .....	55
Abb. 3-3	Die Co-Färbung der FA2H-K370L mit dem M6PR verdeutlicht die Lokalisation im Golgi-Apparat .....	57
Abb. 3-4	Die Co-Färbung der FA2H- $\Delta$ 5 mit dem M6PR zeigt eine Golgi- Lokalisation .....	57
Abb. 3-5	Expression der FA2H auf Proteinebene .....	58
Abb. 3-6	Das FA2H-Antiserum zeigt ebenfalls eine ER-Lokalisation der FA2H ..	59
Abb. 3-7	Western Blot Analysen des FA2H-Antiserums bestätigt seine Aktivität und seine Spezifität .....	60
Abb. 3-8	Die FA2H hydroxyliert die Sphingolipide in Säugetierzellen.....	61
Abb. 3-9	Analyse der Sphingolipide aus Gesamtgehirn und Myelin .....	63
Abb. 3-10	Die Expression myelinspezifischer Proteine war unverändert .....	65
Abb. 3-11	Normale morphologische Differenzierung der primären FA2H defizienten Oligodendrozyten .....	66
Abb. 3-12	RT-PCR Analyse der myelinspezifischen Proteine L-MAG und S-MAG .....	67
Abb. 3-13	FA2H-KO Tiere besitzen weniger biochemisch isolierbares kompaktes Myelin im Gehirn.....	68
Abb. 3-14	Nach der Extraktion mit CHAPS befinden sich die Lipide unabhängig von der $\alpha$ -Hydroxylierung in den Fraktionen der DRMs .....	69
Abb. 3-15	Paranodin-Färbung an Nerven der FA2H-KO Mäuse zeigte keine Veränderungen zu den WT-Kontrollen .....	70
Abb. 3-16	Open Field Box Verhaltenstest.....	72
Abb. 3-17	Unterschiede in der Zusammensetzung der Sphingolipide des zentralen und peripheren Nervensystems .....	74
Abb. 3-18	Vergleichbare Expression von MBP im ZNS und PNS .....	75
Abb. 3-19	Elektronenmikroskopische Analyse des zentralen Nervensystems .....	76
Abb. 3-20	Toluidin-Blau-Färbung des peripheren Nervensystems .....	77
Abb. 3-21	Extraktion der DRMs ergab auch bei den alten Tieren keine Unterschiede zwischen WT und KO .....	78
Abb. 3-22	Immunhistochemische Untersuchung des Amyloid Precursor Proteins... 79	79
Abb. 3-23	Immunfluoreszenz der paranodalen Region .....	80
Abb. 3-24	Aussehen und Viabilität der FA2H/CGT-KO Mäuse.....	83
Abb. 3-25	Lipidanalysen des ZNS und PNS von vier Wochen alten Mäusen .....	85
Abb. 3-26	Quantifizierung der Lipide aus Myelin und Ischias Nerv (IN) .....	86
Abb. 3-27	Massenspektren der aus Ischias Nerven isolierten Lipide gemessen mit der ESI-Ionenfalle .....	88

Abb. 3-28	Massenspektrometrie der Myelinlipide mittels MALDI-TOF .....	89
Abb. 3-29	Die Extraktion der DRMs mittels CHAPS konnte keine Unterschiede aufzeigen .....	90
Abb. 3-30	Keine Unterschiede in der MBP-Expression im ZNS und PNS.....	91
Abb. 3-31	Die FA2H wird in den Talgdrüsen exprimiert.....	92
Abb. 3-32	Verzögerte Haarentwicklung und zyklischer Haarverlust der FA2H Knock-out Mäuse .....	94
Abb. 3-33	Der Haarkanal der FA2H defizienten Mäuse ist weiter geöffnet und teilweise mit Sebum verstopft.....	95
Abb. 3-34	Lipidanalyse der Haut.....	96
Abb. 3-35	Morphogenese der Haut der FA2H-KO Tiere im Vergleich zum Wildtyp .....	98
Abb. 3-36	Analyse der Haut nach Depilation.....	100
Abb. 3-37	Die FA2H Defizienz bewirkt eine Hyperplasie der Talgdrüsen während der Morphogenese .....	102
Abb. 3-38	Vergleichbare Expression von epidermisspezifischen Keratinen .....	103
Abb. 3-39	Co-Färbungen der inneren Wurzelschicht und der Talgdrüsen ließen keinen Unterschied erkennen .....	104

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Genotypen-Verteilung der Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten FA2H Tieren.....	62
Tabelle 2:	Myelinmengen der vier verschiedenen Hauptgenotypen .....	83
Tabelle 3:	Erwartete Massen der Sphingolipide in den Mäusen unterschiedlichen Genotyps.....	87

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
$A_{nm}$	Absorption bei einer Wellenlänge
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BFA	Brefeldin A
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CGT	Ceramid-Galaktosyltransferase
$CHCl_3$	Chloroform
CHO	Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters
CNP	2'3'-zyklische-nukleotid 3'-Phosphodiesterase
Cyt	Cytochrom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FA2H	Fettsäure-2-Hydroxylase
FCS	fötales Kälberserum
FG	Fettsäure-2-Hydroxylase/Galaktosyltransferase
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GalCer	Galaktosylceramid
GalT	Galaktosyltransferase
GFP	grünes, fluoreszierendes Protein
GlcCer	Glukosylceramid
h	Stunde
H	Histidin
HA	Hemagglutinin
HE	Hämalaun/Eosin
HET	heterozygot
HexCer	Hexosylceramid
HRP	Meerrettichperoxidase
IN	Ischias Nerv
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knock-out

---

Konz.	Konzentration
L	Liter; Leucin
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase
Lsg.	Lösung
M	Molar; Masse
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mA	Milli-Ampère
MAG (S/L)	Myelin assoziiertes Glykoprotein (kurz/lang)
MALDI	Matrixassoziertes Laser Desorption / Ionisation
MBP	Myelin basisches Protein
MeOH	Methanol
min	Minute
MOPS	3'- (N-Morphilino)propansulfonsäure
mRNA	'Messenger RNA'
MW	Molekulargewicht; Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
n.d.	nicht detektierbar
NF	Neurofascin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
RM	Rückenmark
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodezylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SG	Silbergel
SM	Sphingomyelin
ST	Standardabweichung
Sulf	Sulfatid
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	"Time of flight" = Flugzeit
U	Unit
üN	über Nacht
UV	Ultra-Violett
W	Watt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem





# **1 Einleitung**

## **1.1 Lipide**

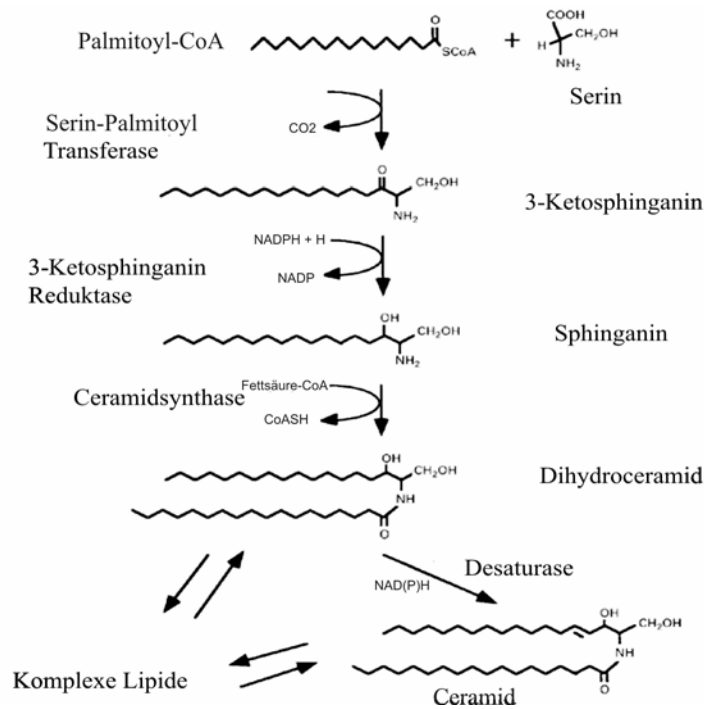
Lipide, wie z.B. Phospholipide und vor allem Glykolipide, sind wichtige Bausteine eukaryotischer Plasmamembranen.

In Säugetieren sind die Glykosphingolipide die häufigsten Glykolipide. Sie besitzen einen hydrophoben Ceramid-Kern und einen hydrophilen, extrazellulären Oligosaccharid-Anteil, der als Erkennungsstruktur für Proteine fungieren kann (Kolter & Sandhoff, 1999). Ceramid besteht aus einem langkettigen Alkohol und einem Fettsäurerest. Die Ceramid-Synthese erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER); zuerst wird die Aminosäure L-Serin mit einer Coenzym-A aktivierten Fettsäure (Palmitoyl-Coenzym-A) zu 3-Ketosphinganin kondensiert, das zu D-erythro-Sphinganin reduziert wird. Sphinganin wird daraufhin zu Dihydroceramid acyliert, das abschließend zu Ceramid dehydriert wird (Weiss & Stoffel, 1997; Shimeno et al., 1998).

Ceramid ist der Vorläufer aller Glykosphingolipide, in denen ein Zuckerrest  $\beta$ -glykosidisch an Ceramid angehängt wird, so wird entweder Galaktosylceramid (GalCer) (Schulte & Stoffel, 1993) oder Glukosylceramid (GlcCer) (Paul et al., 1996) gebildet. Durch Addition weiterer Zuckerreste entstehen komplexere Glykosphingolipide. Laktosylceramid wird gebildet, wenn ein Galaktoserest an Glukosylceramid angehängt wird. Ganglioside sind die Glykolipide mit dem höchsten Grad an Komplexität. Sie enthalten Oligosaccharide mit einem oder mehreren Sialinsäure-Resten (N-Acetyl-Neuraminsäure), wodurch Ganglioside negativ geladen sind.

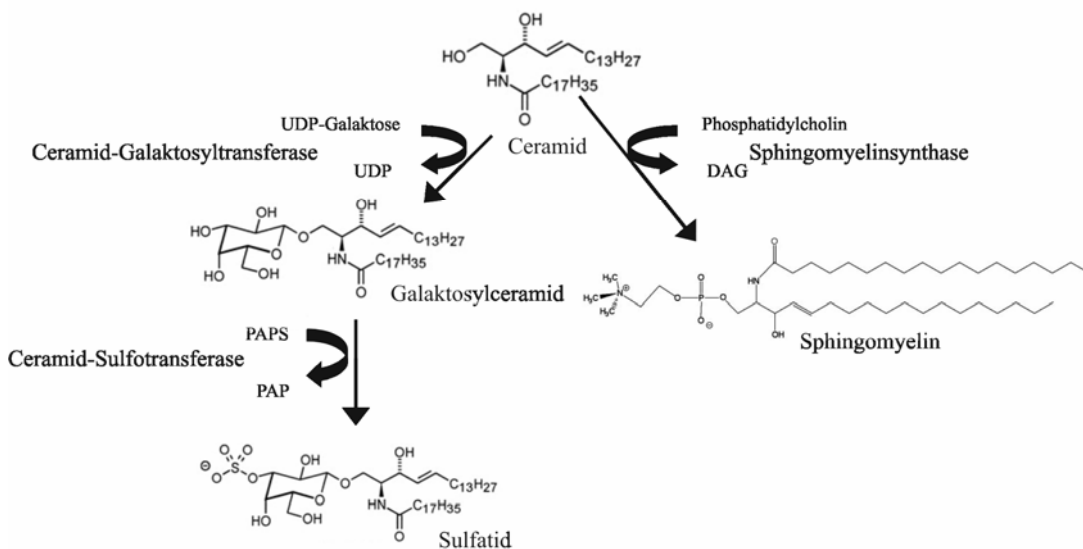
Wenn an die freie Hydroxylgruppe des Ceramids eine Phosphorylcholin-Kopfgruppe angehängt wird, entsteht Sphingomyelin. Bei diesem Vorgang, der im luminalen Bereich des Golgi-Apparates stattfindet, fällt zusätzlich Diacylglycerol an.

Der Ablauf der Ceramid-Synthese ist in Abb. 1-1 schematisch dargestellt. Wohingegen Abb. 1-2 einen schematischen Überblick über die Synthese des Galaktosylceramids und des Sphingomyelins gibt. Während die Ceramid-Synthese vollständig an der zytoplasmatischen Seite des ERs abläuft, findet die Synthese von Sphingomyelin im Golgi-Apparat statt; die Glykosphingolipide werden sowohl im ER (Galaktosylceramid) als auch im Golgi-Apparat (Glukosylceramid) gebildet.



**Abb. 1-1 Schematische Darstellung der de novo Synthese von Ceramid.**

Ausgehend von Serin und Palmitoyl-CoA wird Ceramid über 3-Ketosphinginin, Sphinginin und Dihydroceramid gebildet. Dieses Ceramid-Rückgrat ist das Grundgerüst für viele weitere komplexere Sphingolipide (Abb. modifiziert nach Stoffel & Bosio, 1997).



**Abb. 1-2 Synthese einzelner Sphingolipide ausgehend von Ceramid.**

Ceramid ist der Grundbaustein vieler komplexer Sphingolipide. Hier ist die Bildung des Sphingomyelins und Galaktosylceramids (GalCer) exemplarisch dargestellt. Durch Addition eines Sulfatrestes an GalCer entsteht das sulfatierte Derivat Sulfatid. Die Übertragung des Galaktoserestes auf Ceramid wird von der Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) katalysiert. Wird hingegen ein Glukose Molekül  $\beta$ -glykosidisch mit Ceramid verknüpft, entsteht Glukosylceramid (GlcCer). UDP = Uridindiphosphat; DAG = Diacylglycerol; PAPS = 3'Phosphoadenosin-5'Phosphosulfat.

Glykosphingolipide spielen bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Hucho, 1982) sowie beim Aufbau der Wasser-Permeabilitätsbarriere der Haut (Wertz & van den Bergh, 1998) eine wichtige Rolle. Abhängig vom Zelltyp unterscheiden sich die Sphingolipide in ihrem lipophilen Anteil sowie in der Zahl und Art der verknüpften Zuckerreste, aber auch die Fettsäurereste der Sphingolipide variieren in Länge, Grad der Sättigung und Grad der Hydroxylierung (Sandhoff & Kolter, 2003).

Im Myelin sind die oft langen Fettsäurereste des Galaktosylceramids und des Sulfatids häufig am  $\alpha$ -C-Atom hydroxyliert. Das Verhältnis von hydroxyliertem zu nicht hydroxyliertem GalCer beträgt zwei zu eins. Die erhöhte Menge an  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden im Myelin konnte in einem „in vitro“ Versuch durch eine deutlich höhere Affinität der Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) gegenüber hydroxyliertem Ceramid erklärt werden (van der Bijl et al., 1996).

Die Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es gibt die begründete Hypothese, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe die cis-Interaktionen zwischen Lipiden stärkt und dabei gleichzeitig die Mikrodomänen der Membranen stabilisiert, da zusätzliche Bindungsstellen für Ionen oder die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen (Kochy et al., 1999; Graf et al., 2002). Eine weitere Vermutung besagt, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe eine dichte Packung der Plasmamembran bewirkt (Stoffel & Bosio, 1997).

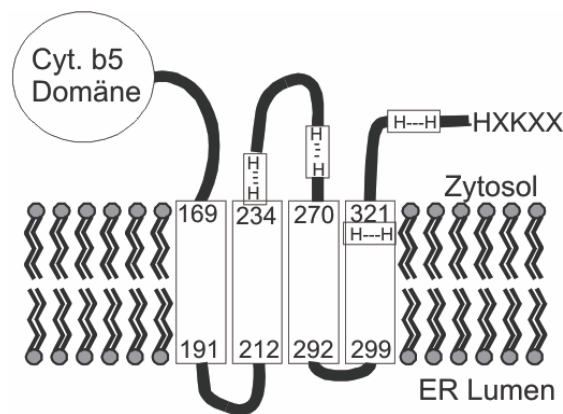
## **1.2 Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H)**

In fast allen Organismen kommen  $\alpha$ -hydroxylierte Lipide vor, ausgehend von Bakterien und Hefen, über Pflanzen und Nematoden, bis hin zu Vögeln und Säugetieren. In Säugern, zum Beispiel, dominieren die  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide vor allem im ZNS. Hier liegt das Verhältnis von hydroxyliertem zu nicht hydroxyliertem Galaktosylceramid bei einem Faktor von zwei.

Bis vor kurzem war noch kein Enzym bekannt, das in höheren Eukaryonten die  $\alpha$ -Hydroxylierung des Ceramids bewirkt. Erst Alderson et al., 2004, sowie Eckhardt et al., 2005, konnten beweisen, dass die sogenannte Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Glykosphingolipide im Nervensystem von Säugetieren katalysiert.

Das murine FA2H-Gen ist aus sieben Exons aufgebaut und umspannt ca. 50 kb auf Chromosom 8. Das codierte Protein besteht aus 372 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von ca. 42 kDa. Es besitzt eine N-terminale Cytochrom b5-Domäne und ein potentiell C-terminales ER-Rückhaltesignal (Eckhardt et al., 2005). Weiterhin befinden sich noch vier Transmembrandomänen im murinen FA2H-Protein sowie vier hoch konservierte Histidin-Motive, die charakteristisch für die Familie der membrangebundenen Lipid-Hydroxylasen sind (Ternes et al., 2002). Abb. 1-3 zeigt das Membrantopologiemodell der FA2H.

Das eigentliche Substrat der Fettsäure-2-Hydroxylase war lange unbekannt. Ergebnisse von Alderson et al., 2005, ließen den Schluss zu, dass die freien Fettsäuren direkt  $\alpha$ -hydroxyliert und erst anschließend ins Ceramid eingebaut werden.



**Abb. 1-3 Schematisches Modell der Fettsäure-2-Hydroxylase.**

Die FA2H besitzt eine N-terminale Cytochrom b5-Domäne sowie ein C-terminales putatives ER-Rückhaltesignal (HXKXX), so dass die Hydroxylase vermutlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Die Zahlen geben die erste und die letzte AS der vier Transmembrandomänen an, während „H—H“ für die vier hoch konservierten Histidinmotive steht.

Über Northern Blot Analysen konnte ermittelt werden, dass das FA2H Gen hauptsächlich im Gehirn, in der Haut, im Magen, im Hoden und in der Niere exprimiert wird. Diese Beobachtung stimmt mit dem Vorhandensein von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden in diesen Geweben überein.

Außerdem zeigten in situ Hybridisierungsversuche, dass die FA2H zum größten Teil in der weißen Substanz des Gehirns exprimiert wird und dass eine Hochregulierung des Gens während der Myelinisierung stattfindet (Eckhardt et al., 2005).

Anhand dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die FA2H in Oligodendrozyten exprimiert wird und für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide im Myelin verantwortlich ist.

Aus diesem Grunde werden nachfolgend die Myelinisierung und die Zusammensetzung des Myelins erläutert, aber auch der Aufbau der Haut, der Haarfollikel und der Haarzyklus näher beschrieben, da die FA2H auch in der Haut exprimiert wird.

## **1.3 Das Nervensystem**

### ***1.3.1 Die Zellen des Nervensystems***

Das Nervensystem besteht überwiegend aus Nervenzellen (Neuronen), die bei Nagetieren ca. 35% der Zellen im Nervensystem ausmachen (Pfrieger & Barres, 1995; Baumann & Pham Dinh, 2001), und aus den weit häufigeren Gliazellen, die als Stützzellen des Nervensystems fungieren.

Zu unterscheiden ist zwischen den Neurogliazellen des peripheren Nervensystems (PNS), den Schwannzellen sowie den Satellitenzellen, und den Neurogliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS), den Astrozyten und den Oligodendrozyten, zusammen als Makroglia bezeichnet, sowie der Mikroglia. In Abb. 1-4 A sind die vier Zelltypen des ZNS schematisch dargestellt.

Die Mikrogliazellen sind, wie der Name impliziert, die kleinsten Gliazellen und machen je nach Tier 5-20% der gesamten Neuroglia aus (Kettenmann & Ransom, 2005). Sie kommen in der grauen wie auch in der weißen Substanz vor, wobei sie jedoch in der grauen Substanz am stärksten vertreten sind.

Der häufigste Zelltyp im ZNS sind die Astrozyten, die sowohl in der grauen Substanz als protoplasmatische Astrozyten als auch in der weißen Substanz als Faserastrozyten vorkommen.

Die etwas kleineren Oligodendrozyten besitzen einen großen, runden, heterochromatinreichen Zellkern. Sie können untereinander und mit Astrozyten interagieren (siehe Abb. 1-4 A). Die Anzahl der strahlenförmig in alle Richtungen entspringenden Fortsätze ist deutlich geringer als bei Astrozyten (deshalb „Oligo“-dendrozyt). Mit diesen Fortsätzen bilden die Oligodendrozyten die

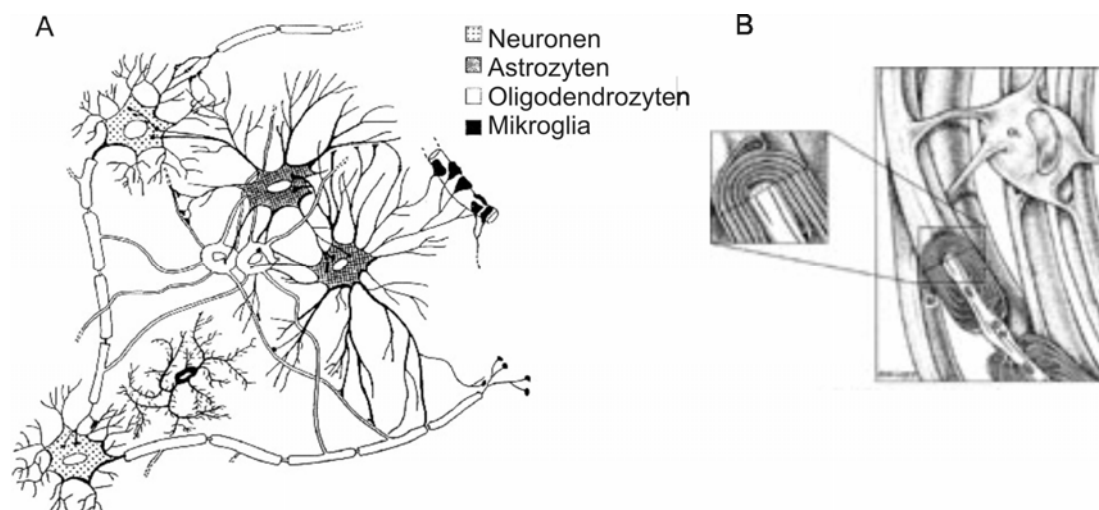
sogenannten Myelinscheiden, wobei ein Oligodendrozyt die Axone von bis zu 50 verschiedenen Neuronen in konzentrischen Lagen umhüllt (siehe 1.3.2 Myelinisierung).

Es wird zwischen vier Haupttypen von Oligodendrozyten unterschieden:

- 1.) Interfaszikuläre Oligodendrozyten in der weißen Substanz, die die Myelinscheide bilden
- 2.) Perineuronale Oligodendrozyten in der grauen Substanz, die die Perikarya großer Neuronen umschließen
- 3.) Perivaskuläre Oligodendrozyten in der grauen Substanz, die sich um Blutgefäße legen
- 4.) Oligodendrozyten in der grauen Substanz, die Myelinscheiden bilden.

Perineuronale und perivaskuläre Oligodendrozyten bilden kein Myelin, sondern treten als Satelliten-Oligodendrozyten mit den Neuronen in Kontakt (Ludwin, 1997).

Im peripheren Nervensystem übernehmen Schwannzellen die Aufgaben der Oligodendrozyten des ZNS. Sie können aber, im Gegensatz zu den Oligodendrozyten, immer nur ein Axon myelinisieren.



**Abb. 1-4 Schematische Darstellung der vier Zelltypen des zentralen Nervensystems.**

Abb. A zeigt die Interaktionen der verschiedenen Zelltypen des zentralen Nervensystems. Sie wurde der Publikation von Giaume & Venance von 1995 entnommen.

In Abb. B ist die Myelinbildung eines Oligodendrozyten veranschaulicht. Sie stammt aus der Publikation von Wood et al., 1984.

### ***1.3.2 Myelinisierung***

Oligodendrozyten und Schwannzellen bilden das Myelin um Axone des ZNS bzw. des PNS. Diese lipidreiche Plasmamembranschicht gewährleistet eine effiziente Isolierung und dadurch eine schnelle saltatorische Erregungsweiterleitung entlang des Axons.

Die Axone werden mit einer unterschiedlich dicken Myelinschicht röhrenförmig umhüllt. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Axondurchmesser und der Dicke der Myelinscheide, je größer der Axondurchmesser ist, desto dicker ist auch die Myelinscheide.

Die Myelinscheide weist in bestimmten Abständen Unterbrechungen auf, die sogenannten Ranvierschen Schnürringe. Der Ranviersche Schnürring besteht aus einem zentral gelegenen „Knoten“ (Node) und den zu beiden Seiten angrenzenden Paranodien, in denen die Myelinscheide ausläuft.

Der myelinisierte Bereich zwischen zwei Schnürringen wird als Internodium bezeichnet. Ein Oligodendrozyt kann die Myelinscheiden von mehreren benachbarten Axonen bilden; Schwannzellen hingegen umhüllen immer nur ein Axon. Die Myelinbildung ist beispielhaft in Abb. 1-4 B dargestellt.

Oligodendrozyten durchlaufen verschiedene Stadien der Differenzierung und Reifung, die durch die Expression spezifischer Oberflächenantigene und Veränderungen der Zellmorphologie klar voneinander unterschieden werden können (Pfeiffer et al., 1993). Bei der Differenzierung spielen verschiedene Wachstumsfaktoren eine Rolle (Barres et al., 1994). Nur ausdifferenzierte, reife Oligodendrozyten können Myelinscheiden um Axone bilden.

Beim eigentlichen Vorgang der Myelinisierung erkennen reife Oligodendrozyten Axone von benachbarten Neuronen über Oberflächenrezeptoren und werden daraufhin angeregt segelartige Fortsätze ihrer Plasmamembran zu bilden, die sich um die Nervenfasern wickeln (Baumann & Pham Dinh, 2001). Es kommt zur Kompaktierung des Myelins, bei der das Zytoplasma aus dem Myelin verdrängt wird. Dabei entsteht die typische Ultrastruktur des Myelins mit der „Major dense line“ und der „Intraperiodic line“ (Wood et al., 1984). Nur in der innersten und äußersten Lamellen sowie in den direkt an die Schnürringe angrenzenden Paranodien und den mikrotubulireichen Schmidt-Lantermann-Kanälen bleiben nicht kompaktierte, zytoplasmatische Bereiche enthalten, die den metabolischen Austausch

zwischen Zelle und Myelin gewährleisten (Sternberger et al., 1979; Raine, 1984). Das Zytoskelett der Oligodendrozyten spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Sortierung, dem Transport und dem Aufbau der Myelinstruktur (Pfeiffer et al., 1993; Richter-Landsberg, 2000).

Bei Nagetieren findet die Myelinisierung in den ersten Lebenswochen, ab Tag 10, statt. Oligodendrozytenvorläuferzellen wandern aus der Subventrikularzone des Neuralrohrs in die weiße Substanz, um dort zu differenzieren und Axone zu myelinisieren. Besonders in der dritten postnatalen Woche bilden Oligodendrozyten die dreifache Menge an Myelin, bezogen auf ihr eigenes Zellkörpergewicht (Wood et al., 1984).

Eine wesentliche Funktion des Myelins ist die Isolierung einzelner Axone, zur schnellen saltatorischen Erregungsweiterleitung. Hierbei spielen die kompaktierten Bereiche der Myelinscheide (Internodien) und die nicht kompaktierten Ranvierschen Schnürringe eine entscheidende Rolle. Im Bereich der Internodien besteht ein hoher Membranwiderstand, wohingegen in den Nodien der Membranwiderstand gering ist. Außerdem sind die Schnürringe reich an Natrium- und Kalium-Ionenkanälen, während die Konzentration dieser Kanäle in den Internodien eher gering ist. Dies hat zur Folge, dass ein Aktionspotential von Schnürring zu Schnürring „springt“ (Peles & Salzer, 2000). Dadurch ist die Erregungsweiterleitung bei myelinisierten Nervenfasern deutlich schneller als bei nicht myelinisierten, da hier das Aktionspotential die gesamte Länge des Axons entlang wandern muss.

Ein weiterer Vorteil der Myelinisierung ist der geringe Ionenfluss über die axonalen Membranen, wodurch das gesamte extrazelluläre Ionenmilieu stabilisiert wird.

Bei demyelinisierenden Krankheiten steigt die extrazelluläre Kaliumkonzentration aufgrund von erhöhten Ionenströmen an, was eine Depolarisation der Nerven und damit eine Zunahme der zerebralen Krampfanfälle zur Folge hat (Nave & Suter, 1997).

### ***1.3.3 Zusammensetzung des Myelins***

Myelin, das ca. 40-50% der weißen Substanz des Gehirns ausmacht, besitzt eine charakteristische molekulare Zusammensetzung. Der Anteil an Lipiden (70%) ist im Vergleich zu den Proteinen (30%) sehr hoch (Baumann & Pham Dinh, 2001). Dieser



hohe Anteil an Lipiden im Myelin ist wichtig für die elektrische Isolierung der Axone und ermöglicht eine schnelle saltatorische Erregungweiterleitung.

### ***1.3.3.1 Myelin-Lipide***

Die Hauptlipide des Myelins sind Cholesterol, Phospholipide und Glykosphingolipide (im Verhältnis 4:3:2) (Morell et al., 1994). Bei den Glykosphingolipiden überwiegen Galaktosylceramid (GalCer) und Sulfatid. Obwohl es keine myelinspezifischen Lipide gibt, ist GalCer das typische Lipid in Myelinmembranen; es macht ca. 20% des Myelintrockengewichtes aus (Morell et al., 1994). Eine Besonderheit der Glykosphingolipide des Myelins sind die an das Ceramid gebundenen sehr langen Fettsäureketten (22-26 Kohlenstoffatome), die häufig gesättigt und  $\alpha$ -hydroxyliert sind (Baumann & Pham Dinh, 2001).

Auch in Myelinmembranen liegt eine asymmetrische Verteilung der Lipide vor; Glykolipide sind an der Membranaußenseite, während die Phospholipide, vor allem Phosphatidylethanolamin, fast ausschließlich an der zytoplasmatischen Membranhälfte lokalisiert sind (Stoffel et al., 1997). Abb. 1-5 stellt die Topologie der Myelinmembran vereinfacht dar.

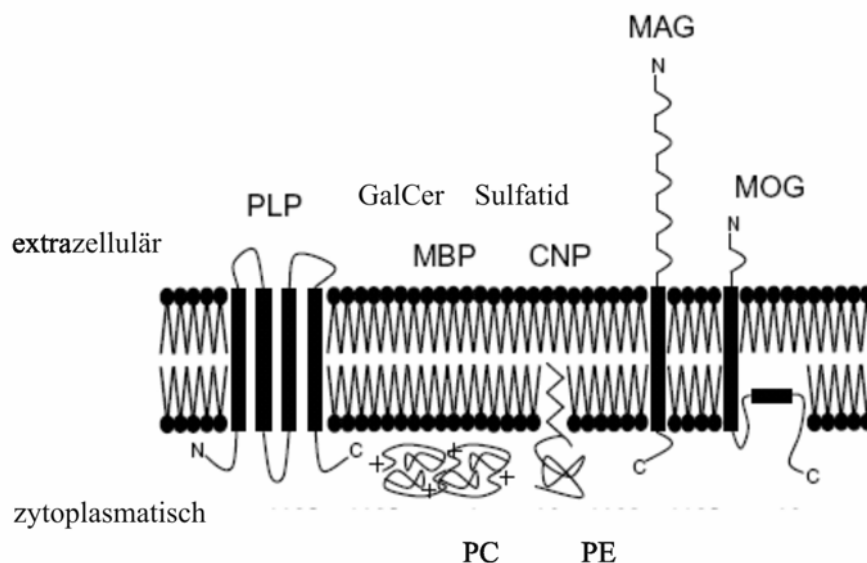
Genau wie andere Zellen sind auch Oligodendrozyten in abgrenzbare Membrandomänen unterteilt, die sich durch ihre Protein- und Lipidzusammensetzung voneinander unterscheiden (Kim & Pfeiffer, 1999; Simons et al., 2000; Kramer et al., 2001). Sogenannte „detergent resistant membranes“ (DRM) auch „Lipid Rafts“ genannt, sind kleine, bewegliche, dicht gepackte ca. 50 nm große Mikrodomänen, die vor allem aus Glykosphingolipiden und Cholesterol bestehen (Brown & London, 1998; Simons & Toomre, 2000; Simons & Vaz, 2004). Sie sind bei 4°C in vielen Detergentien unlöslich; woraus auch ihr Name resultiert. Aufgrund dieser Eigenschaft schweben die DRM im Dichtegradienten weit oben und können so vom Zytoskelett und den restlichen Proteinen leicht abgetrennt werden (Brown & London, 2000; Simons & Toomre, 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass viele Myelinproteine, wie PLP, MBP, MAG und CNPase mit den DRMs assoziiert sind (Coetzee et al., 1996a; Kim & Pfeiffer, 1999; Simons et al., 2000) und sich in einer „liquid-ordered“-Phase befinden.

### 1.3.3.2 Myelin-Proteine

Das Myelin basische Protein (MBP) und das Proteolipid Protein (PLP) sowie dessen Isoform DM-20 machen ca. 80-85% aller Myelinproteine aus (MBP ca. 35% und PLP ca. 50%) (Griffiths et al., 1998; Sporkel et al., 2002).

MBP liegt in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichen molekularen Massen vor, wobei in der Maus die Isoformen 14 und 18,5 kDa überwiegen (95%) (Staugaitis et al., 1990). MBP, das auf der zytoplasmatischen Membranseite in der „Major dense line“ zu finden ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Kompaktierung des Myelins und deren Regulierung (Capello et al., 1997; Campagnoni & Skoff, 2001).

Auch PLP, ein hydrophobes Transmembranprotein, existiert in zwei Isoformen: PLP mit einer Größe von 25 kDa und der kleineren Isoform DM-20 bei 20 kDa (Baumann & Pham Dinh, 2001). Es wird vermutet, dass PLP eine Rolle bei der Formation der „Intraperiodic line“ spielt und für die Stabilität der Myelinscheide verantwortlich ist (Boison et al., 1995; Griffiths et al., 1998).



**Abb. 1-5 Schematische Darstellung der Topologie der Myelinmembran.**

Die Abb. zeigt die asymmetrische Verteilung der Lipide und Proteine in der Myelinmembran. GalCer = Galaktosylceramid; PC = Phosphatidylcholin; PE = Phosphatidylethanolamin; CNP = 2'3'-zyklische-nukleotid 3'-Phosphodiesterase; MAG = Myelin assoziiertes Glykoprotein; MBP = Myelin basisches Protein; MOG = Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein; PLP = Proteolipid Protein; (Abb. modifiziert nach Pfeiffer et al., 1993).

Verschiedene Glykoproteine sind im Myelin angereichert, wobei das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und das Neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM-120) die bekanntesten sind

(Linington et al., 1984; Trotter et al., 1989; Salzer et al., 1987). Diese Mitglieder der Ig-Superfamilie machen nur 1,5% der Gesamtmyelinproteine aus.

Zwei Isoformen von MAG konnten identifiziert werden (Salzer et al., 1987), das lange MAG („Large MAG“, L-MAG) und das kurze MAG („Small MAG“, S-MAG), die für ein 72 bzw. 67 kDa großes Protein codieren. Die PCR-Produkte dieser beiden Spleiß-Varianten haben eine Größe von 199 bp (S-MAG) bzw. 154 bp (L-MAG). MAG gilt als potentieller Rezeptor für die Initiierung und Fortführung der Myelinisierung (Meyer-Franke & Barres, 1994; Filbin, 1996).

### ***1.3.4 Mausmutanten, die Veränderungen im Myelin aufweisen***

Verschiedene humane Erkrankungen führten zu dem Schluss, dass die Akkumulation von Lipiden Risiken birgt, ebenso bleibt auch das Fehlen von z.B. GalCer oder Sulfatid nicht ohne neurologische Folgen. Aus diesem Grund wurden Mausmodelle entwickelt, die Störungen in der Synthese bestimmter Lipide aufweisen, bzw. bei denen die Degradation verschiedener Lipide beeinträchtigt ist.

Bekannte Mausmodelle sind die Ceramid-Galaktosyltransferase Mausmutante (CGT-KO) (Coetzee et al., 1996a; Bosio et al., 1998a; Dupree et al, 1998a) und die Ceramid-Sulfotransferase defiziente Maus (CST-KO) (Honke et al., 2002; Ishibashi et al, 2002).

Die CST-KO Maus, die kein Sulfatid bilden kann, zeigt hauptsächlich Veränderungen in der paranodalen Region des Ranvierschen Schnürrings. Die Lokalisation von verschiedenen Adhäsionsmolekülen, wie Neurofascin 155 und Paranodin, sowie die Lokalisation der Natrium- und Kalium-Kanäle ist in diesem Bereich verändert. Zum Beispiel ist die Expression von Paranodin nicht mehr nur auf den paranodalen Bereich beschränkt, sondern ist auch im nodalen Bereich nachweisbar.

Die CGT-KO Maus (siehe 1.3.6) hingegen kann kein GalCer und kein Sulfatid bilden, was sich zum überwiegenden Teil in einer fortschreitenden Demyelinisierung manifestiert. Diese Tiere sterben im Alter von drei bis 12 Wochen.

Fewou et al., 2005, demonstrierten, dass die Überexpression von im Lipidstoffwechsel beteiligten Genen, Auswirkungen auf das Myelin hat. Transgene Mäuse, welche die Galaktosyltransferase hauptsächlich in Oligodendrozyten

vermehrt exprimierten, zeigten, ebenso wie CGT-KO Tiere, eine progressive Demyelinisierung mit fortschreitendem Alter.

Untersuchungen an verschiedenen Mausmutanten ließen weiterhin den Schluss zu, dass neben der Regulierung der Myelinlipide auch Störungen in der Expression der Myelinproteine für die Myelinisierung entscheidend sind.

In zwei bekannten Mausmodellen liegen Mutationen im PLP Gen vor, nämlich bei der „Jimpy-Maus“ (Klugmann et al., 1997) und bei der „Rumpshaker-Maus“ (Griffiths et al., 1990). Beide Mutationen führen zur Demyelinisierung, vor allem im Großhirn, die mit starken Bewegungsstörungen und Lähmungen einhergeht. Ebenso hat eine verstärkte Expression von PLP Auswirkungen auf die Myelinisierung und bedingt ein frühes Oligodendrozytensterben (Campagnoni et al., 2001). Mutationen des PLP-Gens sind auch für zwei humane Krankheiten bekannt, die x-chromosomale rezessive Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit (PMD) und die Spastische Paraplegie Typ 2 (SPP2) (Koeppen et al., 1987; Saugier-Verber et al., 1994), die zu vergleichbaren Symptomen führen, wie sie in den Mausmutanten beschrieben sind.

Ebenso führen Mutationen im MBP-Gen zu einer Abnahme des Myelins, wie mit Hilfe der „Shiverer-Maus“ (Roach et al., 1985) nachgewiesen werden konnte. Wie der Name der Maus schon impliziert, zittert diese Maus unkontrolliert und weist Bewegungsdefizite auf.

### ***1.3.5 Die Ceramid-Galaktosyltransferase defiziente Maus***

Die UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) katalysiert den Transfer von Galaktose auf die C<sub>1</sub>-Hydroxylgruppe des Ceramids, wobei Galaktosylceramid gebildet wird (Stoffel & Bosio, 1997).

Das murine Gen codiert für ein ca. 54 kDa großes Schlüsselenzym der Myelinisierung (Bosio et al., 1996a). Das Protein besitzt C-terminal eine Transmembrandomäne sowie ein ER-Rückhaltesignal (Sprong et al., 1998).

Postnatal verläuft die CGT-Expression bis zum fünften Tag auf einem niedrigen Niveau und steigt in der Myelinisierungsphase bis zu einem Maximum zwischen Tag 15 und Tag 25 (P15 und P25) stark an. Dies korreliert mit dem Expressionsmuster myelinspezifischer Proteine, wie MBP oder PLP (Schulte & Stoffel, 1993).

Zur Untersuchung der Rolle des Galaktosylceramids (GalCer), bei der Myelinisierung, wurde parallel in zwei Arbeitsgruppen eine CGT defiziente Mauslinie etabliert (Bosio et al., 1996b; Coetzee et al., 1996b). Die homozygoten Tiere sind nicht mehr in der Lage Galaktosylceramid zu synthetisieren.

CGT-KO Tiere zeigen ab P10-12 (Bosio et al., 1996b; Coetzee et al., 1996a) ein vermindertes Wachstum, einen Körpertremor und eine Lähmung der Extremitäten. Dadurch ist ihre Aktivität im Open Field Verhaltenstest verringert. Die homozygoten KO Tiere sind infertil und sterben am Ende der Myelinisierungsphase an Dehydrierung. Erstaunlicherweise können diese Tiere trotz des Fehlens von GalCer und Sulfatid myelinisierte Axone bilden. Das gebildete Myelin ist aber instabil und weist Veränderungen in der Kompaktierung auf (Bosio et al., 1996c).

Neben der progressiven Demyelinisierung mit fortschreitendem Alter kommt es weiterhin zur Veränderung der Paranodien und zu Beeinträchtigungen des Zellkontaktes zwischen Gliazellen und Axonen (Bosio et al., 1998a).

Lipidanalysen zeigten, dass die CGT defizienten Tiere das Fehlen von GalCer und Sulfatid vermutlich teilweise durch eine Erhöhung der Konzentration an GlcCer und sulfatiertem GlcCer kompensieren konnten. Glukosylceramid, Sphingomyelin und Ceramid lagen hauptsächlich als  $\alpha$ -hydroxylierte Derivate vor. Somit ist in den CGT-KO Mäusen zwar die absolute Menge an Sphingolipiden reduziert, aber der relative Anteil an hydroxylierten Glykolipiden ist deutlich erhöht (Coetzee et al., 1996a; Bosio et al., 1998b).

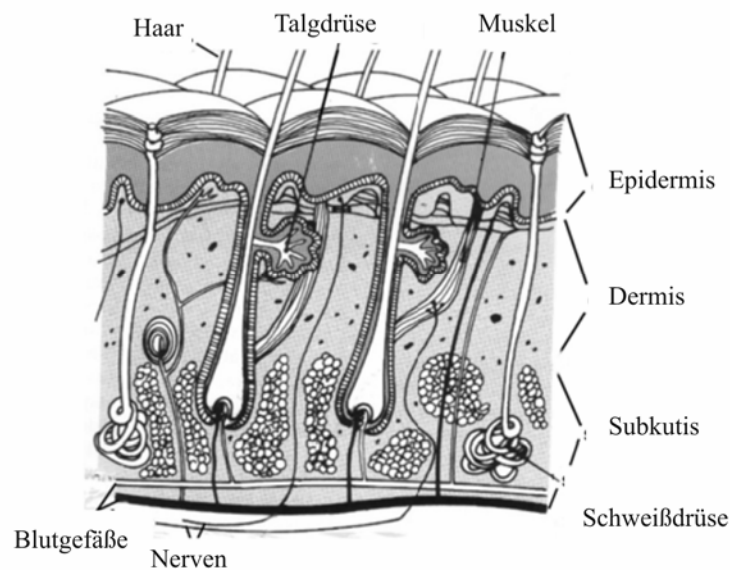
Forschungen an der von Zöller et al., 2005, generierten transgenen CGT Maus, welche die Galaktosyltransferase ausschließlich in Oligodendrozyten exprimiert, führten zu einer deutlichen Verbesserung bzw. Milderung des Phänotyps der CGT-KO Maus und demonstrierten damit, dass es zur Formierung und Aufrechterhaltung von normal kompaktiertem Myelin ausreicht, wenn GalCer in Oligodendrozyten gebildet wird.

## 1.4 Aufbau der Haut und der Haare

### *1.4.1 Die Haut*

Die Haut (Kutis), das größte und nervenreichste Organ, lässt sich in drei Schichten unterteilen; die Oberhaut (Epidermis) und die Lederhaut (Dermis oder Corium), die zusammen die Kutis bilden, sowie die Unterhaut (Subkutis), die aus Fettgewebe besteht. Zur Haut gehören auch die Hautanhangsgebilde, z.B. die Haare und die Talgdrüsen. Abb. 1-6 gibt einen Überblick über die verschiedenen Schichten der Haut mit ihren Anhangsgebilden.

Die Haut hat viele verschiedene Funktionen; sie dient der Abgrenzung von innen und außen (Hüllorgan), dem Schutz vor Umwelteinflüssen und der Aufrechterhaltung der Homöostase. Sie spielt eine Rolle im Stoffwechsel und in der Immunantwort. Zusätzlich enthält die Haut adulte, pluripotente Stammzellen.



**Abb. 1-6 Übersicht über den Aufbau der Haut.**

Dargestellt ist ein vereinfachtes Modell über den Aufbau der drei verschiedenen Schichten der Haut mit ihren Anhangsgebilden. Modifiziert nach Dawber, 1995.

Die Epidermis gehört zu den verhornten Epithelgeweben; es werden folgende Schichten von außen nach innen unterschieden: die Hornschicht (Stratum corneum), die Körnerschicht (Stratum granulosum), die Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und die Basalzellschicht (Stratum basale). Die Keratinozyten, der Hauptzelltyp der Epidermis, werden in der Basalzellschicht gebildet und wandern langsam nach außen

(Li et al., 2007), dabei verhornen und differenzieren sie immer weiter, bis sie in der Hornschicht zu toten Zellen ohne Zellkern werden, den Korneozyten (Eckert et al., 2005). Neben den Keratinozyten gibt es in der Epidermis noch immunologisch aktive Langerhans-Zellen und T-Lymphozyten, Pigmentzellen (Melanozyten) und Merkelzellen (Mechanorezeptoren).

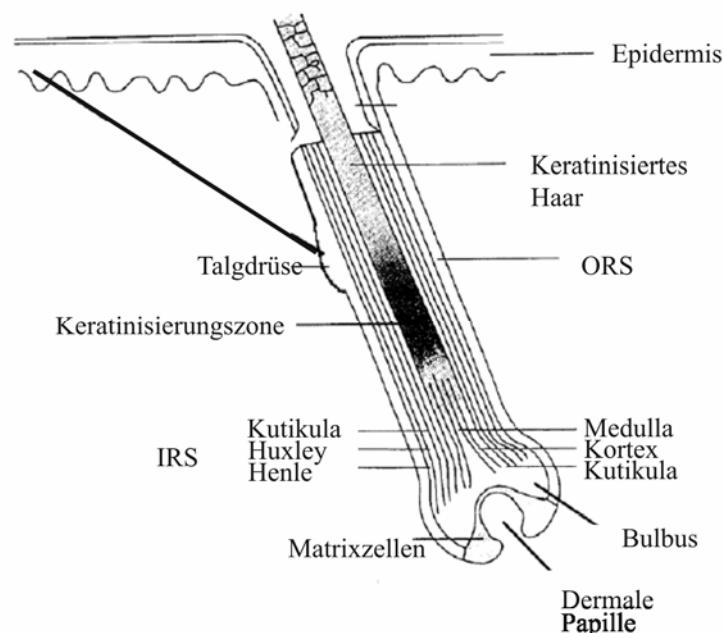
Die Dermis schließt sich direkt an die Basalmembran der Epidermis an und wird in zwei Schichten unterteilt: die Papillenschicht (Stratum papillare) und die Netzschicht (Stratum reticulare). Die Papillenschicht besteht vorwiegend aus elastischen Bindegewebefasern, aus Kollagen und Elastin zur Dehnbarkeit und Flexibilität der Haut. Sie dient der Ernährung und der Verankerung der Epidermis, indem das fein kapillarisierte Blutgefäßsystem die Grenzzone zur Epidermis mit Nährstoffen versorgt. Die Talg- und Schweißdrüsen befinden sich in der Netzschicht, genauso wie Blutgefäße, die glatte Muskelzellen sowie Temperatur- und Schmerzsensoren.

In der Subkutis sind die Haarwurzeln verankert. Sie besteht hauptsächlich aus großen Blutgefäßen, lockerem Bindegewebe und Fettgewebe zur Isolierung und als Nahrungsdepot.

### ***1.4.2 Der Haarfollikel***

Im unteren Bereich der Dermis entsteht das Haar an der Haarpapille. Hier befinden sich im Bulbus (proximale Auftreibung), der die Papille umschließt, mitotisch aktive Matrix-Keratinozyten, die nach oben wandern und dabei den Haarschaft bilden (Powell & Rogers, 1997). Der Haarschaft liegt in einer länglichen Einstülpung der Epidermis, dem sogenannten Haarfollikel. Die Morphogenese des Haarfollikels ist bei Geburt abgeschlossen, so dass das Tier eine festgelegte Anzahl an Haarfollikeln besitzt. Der Haarfollikel ist das einzige menschliche Organ, das sich fast vollständig regenerieren kann, aber eine Neubildung nach der Geburt gibt es fast nie. Die Morphogenese der Haarfollikel beginnt mit der Teilung und der Differenzierung der im Bulbus liegenden Matrix-Keratinozyten, welche den zur Hautoberfläche wandernden Haarschaft und das eigentliche Haar bilden (Jahoda & Reynolds, 1993). Beeinflusst wird die Haarfollikel-Bildung von Signalen aus dem Epithel der Epidermis, dabei werden die Matrixzellen zur Teilung angeregt (Jahoda & Reynolds, 1993).

Der Haarfollikel ist von einer inneren, dreischichtigen Wurzelscheide (IRS; inner root sheath) und einer äußeren Wurzelscheide (ORS; outer root sheath) umgeben. Letztere geht kontinuierlich in das Stratum basale der Epidermis über und umgibt nur den Teil des Haares, der in der Haut verläuft, also die Haarwurzel (Ito, 1988). Im Gegensatz dazu umschließen die drei Schichten der IRS (Henle-Schicht, Huxley-Schicht und Kutikula) sowohl die Haarwurzel als auch den Haarschaft (Sundberg et al., 1994). Die Zellen der IRS verhornen zuerst und beteiligen sich am Aufbau des fertigen Haares, das ebenfalls aus drei Schichten besteht; der Kutikula, der Rinde (Cortex) und dem Mark (Medulla). In Abb. 1-7 ist ein muriner Haarfollikel zu erkennen.



**Abb. 1-7 Schematische Darstellung eines Haarfollikels.**

Gezeigt wird ein Längsschnitt durch einen aktiven Haarfollikel. Die wichtigsten Schichten, die dermale Papille und die Talgdrüse sind vereinfacht dargestellt. IRS = „Inner root sheath“; ORS = „Outer root sheath“. Modifiziert nach Dawber, 1995.

Die Behaarung erfüllt mehrere Funktionen. Zum einen sorgen Haare bei kaltem Wetter für Isolierung, zum anderen bieten sie auch Schutz bei heißem Wetter, dementsprechend dienen sie der Thermoregulation. Weiterhin bieten Haare Schutz vor der Außenwelt und helfen manchen Tieren sich ihrer Umgebung besser farblich anzupassen (Mimikry). Außerdem nehmen sie Informationen und Stimuli von außen auf und leiten diese weiter an das Nervensystem (Botschkarev & Paus, 2003).



### ***1.4.3 Der Haarzyklus***

Das Haarwachstum ist bei Mäusen kein kontinuierlicher Vorgang, sondern verläuft in repetierenden Zyklen, die erstmals im Jahre 1926 beschrieben wurden. Der sich wiederholende Haarzyklus beginnt, wenn der Haarfollikel und das erste Haar nach der embryonalen Entwicklung vollständig geformt sind (Müller-Röver et al., 2001). In der katagenen Phase, die ca. zwei Tage dauert, stellen die Matrixzellen ihre Proliferation ein, der Haarfollikel verengt und verkürzt sich, so dass das Haar sich löst. In der telogenen Ruhephase erneuert sich die Haarpapille und der Haarfollikel regeneriert sich. In der anagenen Phase wird, durch ein Signal der dermalen Papille induziert, die Haarwurzel neu gebildet, die Matrixzellen proliferieren wieder und das Wachstum eines Haares beginnt (Lavker & Sun, 1995). Diese Wachstumsphase dauert ca. 12-17 Tage, bevor der Haarzyklus erneut in die katagene Phase eingeht (Sundberg & King, 1996). In der anagenen Phase ist eine deutliche Größenzunahme der Epidermis, der Dermis und der Subkutis zu beobachten, während die Haut im Katagen wieder dünner wird. Die Größe der Talgdrüsen schwankt ebenfalls abhängig vom Haarzyklus (Paus et al., 1994a; Stenn & Eilersten, 1996).

Viele Proteine spielen beim Haarzyklus eine Rolle. Ihre Expression ist während des Haarzyklus zeitlich und örtlich genau definiert und verändert sich in den einzelnen Wachstumsphasen. Innere und äußere Faktoren (wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine oder Medikamente) können Einfluss auf die Dauer der einzelnen Phasen und ihren zeitlichen Verlauf nehmen (Stenn & Eilersten, 1996; Paus & Cotsarelis, 1999).

Bei der Geburt ist der Körper der Maus nackt, erst ab dem dritten Lebenstag erscheinen Haare auf der Hautoberfläche und zwar zuerst am Kopf, Nacken, Rücken sowie am Schwanz. An P14 haben die Haare der Maus ihre endgültige Länge erreicht und der Haarzyklus geht in die katagene Phase über (Alonso & Fuchs, 2006). Anhand der anatomischen Lage und der Morphologie können bei der Maus acht verschiedene Haararten unterschieden werden (Sundberg & Hogan, 1994). Neben den Haaren des Rumpfes (Fell) gibt es noch spezielle Haare am Schwanz, den Füßen, den Augen (Wimpern), den Ohren, der Schnauze (Tasthaare, Vibrissen), den Zitzen und an der Genitalregion.

Die Rumpfbehaarung ist noch in vier weitere Subtypen unterteilt; die Leithaare, die Ahlenhaare, die Knickhaare und die Zick Zack-Haare (Sundberg & Hogan, 1994).

## **1.5 Zielsetzung**

Die Fettsäure-2-Hydroxylase wird in verschiedenen murinen Geweben exprimiert, in denen auch  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipiden vorhanden sind, unter anderem im Nervensystem und in der Haut. Daraus kann geschlossen werden, dass dieses Enzym für die Bildung von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden verantwortlich ist. Bis heute ist über die Funktion der  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide, die im zentralen Nervensystem überwiegen, nur wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte zunächst bestätigt werden, dass die FA2H die Bildung von  $\alpha$ -hydroxylierten Lipiden katalysiert. Desweiteren sollte die Frage der subzellulären Lokalisation des Enzyms geklärt werden. Diese ersten Untersuchungen wurden anhand von Zellkulturmodellen bearbeitet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide aufzuklären. Dazu wurden FA2H defiziente Mäuse untersucht, die in allen Geweben kein funktionsfähiges FA2H-Gen mehr besaßen. Der Schwerpunkt der Analyse dieser Knock-out Tiere lag auf dem Nervensystem. Es sollte geklärt werden, ob eine FA2H Defizienz Auswirkungen auf die Myelinbildung und auf die Aufrechterhaltung des Myelins hat. Dazu wurden die entsprechenden Untersuchungen an jungen und alten Tieren durchgeführt. Desweiteren wurde der Einfluss des Fehlens der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide auf die Haut untersucht.

In dieser Doktorarbeit sollte weiterhin die Frage beantwortet werden, ob die Hochregulierung von  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer in den CGT-KO Mäusen den Verlust an GalCer kompensieren kann. Dazu wurden FA2H/CGT Doppel-KO Mäuse generiert und die Auswirkungen der veränderten Lipidzusammensetzung auf die Myelinbildung untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### ***2.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien***

##### Bakterien

XL-1 Blue     E.coli: supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1 lac  
F<sup>'</sup>[proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10 (tet<sup>r</sup>)]; Bullock et al., 1987

##### Zelllinien

CHO            „Chinese hamster ovary cells“ gewonnen aus einer Ovarienbiopsie  
eines chinesischen Hamsters, 1957 (Puck et al., 1958)

#### ***2.1.2 Plasmide***

pcDNA3            Invitrogen  
pBluescript        Stratagene

#### ***2.1.3 Lösungen und Puffer***

Zur Herstellung sämtlicher Puffer und Lösungen wurde dH<sub>2</sub>O (Milli-Q-Wasser) verwendet (Aufbereitungsanlage von Millipore). Das Ansetzen der Lösungen erfolgte nach Sambrook et al., 1989.

Bei RNA-Analysen wurden die verwendeten Lösungen zuvor mit DEPC behandelt (0,001% DEPC in dH<sub>2</sub>O, üN rühren, 2x autoklavieren).

AK-Blockierlg.        3% (w/v) Magermilchpulver in TBST  
APS                    1 g APS in 10 ml dH<sub>2</sub>O, bei -20°C gelagert  
Blotpuffer            48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,037% SDS,  
20% Methanol (v/v) in 1000 ml dH<sub>2</sub>O

---

DC-Färbelsg.	625 mM Kupfersulfat, 9,4% Phosphorsäure (85%) in 1000 ml dH <sub>2</sub> O
L(IV)-Puffer	0,25 mM Bromphenolblau, 30% Glycerol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0
LacZ-Färbepuffer	0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,3; 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 (in Dimethylformamid)
LacZ-Fixierpuffer	0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,3; 5 mM EGTA, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2% Glutaraldehyd, bei 4°C lagern
LacZ-Waschpuffer	0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,3; 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Lysepuffer (Zellen)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,3% (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100 vor Gebrauch Zugabe von Proteaseinhibitoren: 1 mM EDTA, 100 U/ml Aprotinin, 100 µg/ml Pefablock
Lysepuffer (Schwänze)	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8; 1% SDS
10x MOPS	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 7,0
2 M Na-Acetat	272 g Natriumacetat in DEPC-H <sub>2</sub> O gelöst; für mRNA- Isolierung mit pH-Papier auf pH 4 einstellen
3 M Na-Acetat	408 g Natriumacetat in 1000 ml, pH 5,2 (mit Essigsäure einstellen), autoklavieren
OilRed-Stamm-Lsg. A	0,5 g OilRed in 100 ml 99% Isopropanol
OilRed-Stamm-Lsg. B	60 ml Stammlsg. A, 40 ml dH <sub>2</sub> O, filtrieren
OilRed-Fixier-Lsg.	für 75 ml: 25 ml 10% CaCl <sub>2</sub> , 25 ml dH <sub>2</sub> O, 25 ml 37% Formaldehyd
10x PBS	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 M NaCl in dH <sub>2</sub> O, 25 mM KCl, pH 7,4
4% PFA	4 g Paraformaldehyd auf 100 ml dH <sub>2</sub> O, erhitzen
Ponceau-Gebrauchslsg.	0,2% Ponceau S (w/v), 3% Trichloressigsäure (v/v)
4x Probenpuffer	8% SDS, 40% Glycerol (v/v), 240 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% Bromphenolblau, 4% β-Mecapthoethanol
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

10x SDS Laufpuffer	30,3 g Tris-HCl, 144 g Glycerol, 10 g SDS in 1000 ml dH <sub>2</sub> O, pH 8,6
50x TAE	2,5 M Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M Natriumacetat, pH 8,0
10x TBS	100 ml 1 M Tris-HCl, 300 ml 5 M NaCl in 1000 ml dH <sub>2</sub> O, pH 8,0
TBST	0,05% Tween-20 in 1x TBS
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 8,0
TNE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Pefablock
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Tris-HCl	0,1 M Tris-HCl in dH <sub>2</sub> O, pH 7,4; pH 8; pH 9

### ***2.1.4 Medien***

#### Zellkultur

1x DMEM-F12-Medium	Gibco BRL
High Glucose	500 ml DMEM-Medium 5-10% hitzeinaktiviertes FCS (30 min bei 56°C) 1% Pen/Strep (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) 2 mM L-Glutamin
Einfriermedium	70% DMEM 10% DMSO 20% FCS
SATO-Medium	Bottenstein und Sato, 1979; modifiziert nach Barres et al., 1993 DMEM-Pulver 3,4 g/l (Serva) NaHCO <sub>3</sub> 2 g/l Transferrin 100 mg/l Gentamycin 25 mg/l

	Insulin	10 mg/l
	Putrescin	100 nM
	Progesteron	200 nM
	3,3',5-Triiod-L-Thyronin	500 nM
	Natriumselenit	220 nM
	L-Thyroxin	500 nM
G418-Stammlsg.	125 mg/ml G418 Sulfat, in dH <sub>2</sub> O gelöst	

### Bakterien

LB-Medium	1% NaCl, 1% Bacto-Hefe Extrakt, 0,5% Trypton in 1000 ml dH <sub>2</sub> O gelöst; pH 7,5; autoklavieren	
Agarplatten	LB-Medium, 1,5% Agar; Lösung autoklavieren, abkühlen auf ca. 50°C, in Petrischalen gießen	
Ampicillin	100 µg/ml in LB-Medium (auf Agarplatten oder in üN-Kulturen)	
Kanamycin	50 µg/ml in LB-Medium (auf Agarplatten oder in üN- Kulturen)	

### **2.1.5 Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Merck (Schwalbach), Roth (Karlsruhe) und Sigma/Fluka (München) bezogen.

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	Qbiogene
ABC-Kit (Vectastain)	Linaris
Avertin (2,2,2 Tribromoethanol)	Sigma
BigDye Terminator Cycle Seq Kit	Applied Biosystems
CHAPS	Sigma
CSPD	Roche
DC Protein Assay	BioRad
DPX Einbettmedium	Fluka

ExGene 500	Fermentas
FCS	Invitrogen
HiDi Formamid	Applied Biosystems
Histogreen	Linaris
Milchpulver	Reformhaus
Optiprep	Sigma
Polyvinylalkohol	Fluka
RNA-Auftragungspuffer	Fermentas
RT-PCR-KIT (First Strand)	Fermentas
Tissue Tek OCT Einbettmedium	Sakura
Triton X-100	Serva

### ***2.1.6 Weitere Materialien***

#### **Material**

Bioimager Screens  
 Chemilumineszenz Substrat (ECL-Kit)  
 Einmalspritzen  
 Gel Blotting Papier  
 Glaswolle  
 HPTLC Platten (Silica Gel 60)  
 Kryoröhrchen  
 Nitrozellulose Membran (WB)  
 Ohrmarken  
 Qiaquick Gel Extraktion Kit  
 Qia-Plasmid Mini/Midi Kit  
 Plastikgefäße für Zellkultur  
 PVDF Membran (WB)  
 Röntgenfilme Biomax MR  
 Super Frost Plus Objektträger  
 Stickstoff  
 Zellzählkammer (Neubauer)

#### **Hersteller**

Fuji/Raytest  
 Pierce  
 Braun  
 Schleicher & Schnell  
 Hasenmüller  
 Merck  
 Nalgene Cryoware  
 Schleicher & Schnell  
 Hauptner  
 Qiagen  
 Qiagen  
 Sarstedt  
 Invitrogen  
 Kodak  
 Menzel-Glaser  
 Linde Gas  
 Brandt

### 2.1.7 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNA-Standard	GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
100 bp DNA-Standard	GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
50 bp DNA-Standard	GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas)
Protein Standard	Page Ruler Prestained Protein Ladder 671 (Fermentas)

### 2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer stammen der MWG Biotech AG.

<u>Primer-Name</u>	<u>Sequenz</u>
T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
SP6	5'-CTA GCA TTT AGG TGA CAC TAT AG-3'
M13 forward (-40)	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
M13 reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
GalT anti	5'-TTA CCA AGG AGT TCA GCA AAC C-3'
GalT sense	5'-CCT CTC AGA AGG CAG AGA CAT TG-3'
Neo Reverse	5'-TCT GCA CGA GAC TAG TGA GAC G-3'
FA2H shortarmanti	5'-GCT CTT CTT CAA GAG CCA TCC-3'
FA2H wtsense	5'-GTG CTG TAC CTC AGC TGG TC-3'
FA2H neoneu	5'-ATT CGC AGC GCA TCG CCT TCT ATC-3'
Aktin sense	5'-TGC GTG ACA TCA AAG AGA AG-3'
Aktin anti	5'-GCT CAT AGC TCT TCT CCA GG-3'
FA2H(K370L)	5'-GCT CTA GAT TAC TGC ATC AAC GGG TGG-3'
FA2HsBglII	5'-CGC AGA TCT GCC CCC GCT CCG CCC CCC-3'
FA2HsBamHI	5'-GCG GAT CCG CCC CCG CTC CGC CCC CC-3'
FA2HsHindIII	5'-GCG CAA GCT TGG TAC CCG CCA TGG CCC CCG CTC-3'
FA2HaXbaI	5'-GCT CTA GAT TAC TGC ATC TTC GGG TGG-3'



## 2.1.9 Antikörper

### Primäre Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
β-Aktin (Klon AC-74) monoklonal	Maus	Sigma	WB: 1:5000
BrdU (Klon IIB5) monoklonal	Maus	BioGene	IF: unverdünnt
Calnexin (Bestell.Nr: SPA 860) polyklonal	Kaninchen	Stressgen	IF: 1:300
HA-Antikörper (Klon 12CA5) monoklonal	Maus	Roche	WB: 10 µg/ml IF: 10 µg/ml
FA2H-Antiserum affinitätsgereinigt	Kaninchen	Pineda	WB: 1:800 IF: 1:800
β-Galaktosidase (Bestell.Nr: ab616) polyklonal	Kaninchen	Abcam	IF: 1:1000
GFP (Bestell.Nr: ab390) polyklonal	Kaninchen	Abcam	WB: 1:5000 IF: 1:1000
GM130 (FITC markiert) monoklonal	Maus	BD Bioscience	IF: 1:1000
K1 polyklonal	Kaninchen	Babco	WB: 1:50.000 IF: 1:400
K5 polyklonal	Kaninchen	Babco	WB: 1:50.000 IF: 1:500
K75 polyklonal	Meerschweinchen	Von Thomas Langbein erhalten	IF: 1:500
Mannose-6-Phosphat- Rezeptor polyklonal	Kaninchen	Von Paul Saftig erhalten	IF: 1:1000
L-MAG (M2) polyklonal	Kaninchen	Von Arthur Butt erhalten	WB: 1:2000
MBP (Bestell.Nr: AB 980) polyklonal	Kaninchen	Chemicon	WB: 1:5000 IF: 1:1000
Natrium-Kanal (Klon K58/35) monoklonal	Maus	Sigma	IF: 1:200
NCAM (Klon H28) (Bestell.Nr. MAB 310) monoklonal	Ratte	Chemicon	WB: 50 µg/ml
NF 155/186 polyklonal	Kaninchen	Von Peter Brophy erhalten	IF: 1:1000

Paranodin polyklonal	Kaninchen	Von Jean-A. Girault erhalten	IF: 1:1000
$\alpha$ -Tubulin (Klon B5-1-2) monoklonal	Maus	Sigma	WB: 1:3000

### Sekundäre Antikörper

<b><u>Antigen</u></b>	<b><u>Spezies</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>	<b><u>Verdünnung</u></b>
Alexa 488 anti-Meerschweinchen	Ziege	Molecular Probes	IF: 1:800
Alexa 488 anti-Maus	Ziege	Molecular Probes	IF: 1:800
Alexa 488 anti-Kaninchen	Ziege	Molecular Probes	IF: 1:800
Alexa 586 anti-Maus	Ziege	Molecular Probes	IF: 1:800
Alexa 586 anti-Kaninchen	Ziege	Molecular Probes	IF: 1:800
Biotin konjugiert anti-Maus	Ziege	Dianova	IF: 1:200
Biotin konjugiert anti-Kaninchen	Ziege	Dianova	IF: 1:200
HRP-konjugiert anti-Maus	Ziege	Dianova	WB: 1:1000
HRP-konjugiert anti-Kaninchen	Ziege	Dianova	WB: 1:1000
HRP-konjugiert anti-Ratte	Ziege	Dianova	WB: 1:1000

### 2.1.10 Enzyme

#### **Enzym**

Alkalische Phosphatase

T4-DNA-Ligase

Reverse Transkriptase

Restriktionsendonukleasen

RNase Inhibitor

Taq Polymerase

Phusion Polymerase

#### **Hersteller**

Fermentas

New England's BioLabs

Fermentas

Fermentas

Fermentas

Fermentas

Finnzymes

**2.1.11 Geräte**

<b><u>Gerät</u></b>	<b><u>Typ</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Absaugpumpe		UKB Elektronik
Brutschrank		Forma Scientific
DC-Auftragegerät	TLC-Sampler 4	Camag
Digital pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Elektrophoresekammer klein	Mini Protean 3	BioRad
Elektrophoresekammer groß	Proteax Xi	BioRad
ESI-Ionenfalle	HCT-Ultea PTM	Bruker
Feinwaage	A 120S	Satorius
Filmentwickler-Automat	Curix 60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100M	ZEISS
Gefrierschrank -20°C		AEG
Gefrierschrank -80°C	Ultra low	Sanyo
Geldokumentationsanlage	Gel-Doc-2000	BioRad
Gelkammer (Agarose)		Eigenbau
Geltrockner	Model 583	BioRad
Heizblock	Dry Block Heater	STAR LAB
Kryostat	CM 1510 S	Leica
Kühlschrank	Öko Santo Super	AEG
Kühlung (WB)		BioRad
Lichtmikroskop	TELAVAL 31	ZEISS
Magnetrührer		IKAMAG Red
MALDI-TOF	Voyager STR	Applied Biosystems
Mikrotom	CS 2511	Leica
Mikrowelle		Sharp
Paraffiniermaschine	Tissue Vip/Tek TEC	Sakura
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Photometer	DV 640	Beckmann
Plattenlesegerät (Fluoreszenz)	Odyssey	LY-COR
Plattenlesegerät (Mikroplatte)	GENios	TECAN
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra

Powersupply (Agarose)	Powersupply ST305	Life Technologies
Powersupply (WB)	Power Pac 200	BioRad
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific
Sequenzierer	Genetic Analyser 310	Abi Prism
Speed Vac	SC100	Servant
Sterilbank		BDK
Ultraschallbad		Branson
Vortexer	2x <sup>3</sup>	UniEquip
Waage	PC 4400	Mettler
Wasserbad	1083	GFL
Western Blot (Semi Dry)	Transblot SD Cell	BioRad
Kühlzentrifuge klein	Z233 MK	Hermle
Kühlzentrifuge groß	Rotoren: - F34-6-38 - A4-62	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Ultrazentrifuge klein	Optima TLX	Beckmann Coulter
Ultrazentrifuge groß	L7-65	Beckmann Coulter

### ***2.1.12 Computerprogramme***

Adobe Photoshop

Corel Draw 12

Chromas

Aida Software

Activity Software

## **2.2 Methoden**

### ***2.2.1 Zellkultur***

#### ***2.2.1.1 Passagieren von Zellen***

CHO-Zellen wurden in DMEM-F12 Medium, das 5% hitzeinaktiviertes FCS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptavidin enthielt, je nach Versuchsdurchführung auf 6-, 12-, 24- oder 96-Well-Platten, in 60-mm und 100-mm-Petrischalen oder T75-Kulturflaschen ausgesät und in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> anwachsen gelassen. Zweimal die Woche wurde das Medium gewechselt, nachdem die Zellen unter einem Lichtmikroskop auf mögliche Kontaminationen begutachtet worden waren. Konfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin behandelt (0,5 ml Trypsin pro 100-mm-Petrischale), damit sie sich in der folgenden 2-3 minütigen Inkubation im Brutschrank vom Zellkulturgefäß ablösten. Durch Zugabe von 5 ml DMEM-F12 Medium wurde die Reaktion gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in 15 ml Röhren überführt und 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer. Das Zellpellet wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an Zellkulturmedium auf die geforderte Zellzahl eingestellt und die Zellsuspension daraufhin in neue Kulturgefäße ausgesät. Alle Arbeiten wurden unter laminarem Luftfluss mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, Materialien und Kulturmedien durchgeführt.

#### ***2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen***

Zum Einfrieren der verschiedenen Zelllinien wurden die Zellen 5 min bei 800 g bei RT abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 1,8 ml eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen gefüllt und bei -80°C eingefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt.

Beim Auftauen wurde das Kryoröhrchen im 37°C Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Die aufgetauten Zellen wurden nach einer 5 min Zentrifugation bei 800 g bei RT in eine 100-mm-Petrischale mit vorgewärmtem

DMEM-Medium ausplattiert. Nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt, ob die Zellen angewachsen waren.

### ***2.2.1.3 Stabile Transfektion***

Der Begriff Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, wobei zwei verschiedene Formen der Transfektion unterschieden werden. Zum einen die transiente Transfektion, bei der die Plasmid-DNA zwar in den Zellkern gelangt, dort aber nicht ins Genom integriert und aus diesem Grund bald wieder abgebaut wird. Im Gegensatz dazu steht die stabile Transfektion, bei der die Fremd-DNA ins Genom eingebaut und an die nächste Zellgeneration weitergegeben wird.

Für die stabile Transfektion der CHO-Zellen mit DNA wurde das polykationische Transfektionsreagenz ExGene 500 (MBI, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Bei dieser Methode interagiert das Makromolekül Polyethylenimin (PEI), das eine hohe kationische Ladungsdichte besitzt, mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA. Der entstandene Komplex aus DNA und PEI kann von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden.

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro 6-Well-Platte in 2,5 ml DMEM-Medium ausgesät, so dass sich die Zellen am nächsten Tag in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und die Kulturgefäße zu ca. 70-80% konfluent bewachsen waren. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mit jeweils 2 µg DNA pro Well. Nach einer 10 minütigen Inkubation der DNA mit dem Transfektionsreagenz bei RT wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben. 4 h nach Zugabe wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Weitere 48 h nach der Transfektion wurden die stabil transfizierten Zellen auf 100-mm-Petrischalen umgesetzt. Die Selektion der transfizierten Zellen begann 72 h nach der Transfektion und wurde weiter durchgeführt, bis stabile Zellklone zu sehen waren.

#### ***2.2.1.4 Oligodendrozyten-Primärzellkultur***

Bei dieser Methode werden Primärzellen aus Gehirnen von neugeborenen Mäusen isoliert, um spezifische Immunfärbungen (siehe 2.2.4.8) durchführen zu können. Die gesamte Durchführung musste steril erfolgen. Zunächst wurde die Hirnhaut (Meningis) entfernt und das Gehirn mit Pasteurpipetten mit kleiner Öffnung (im Feuer lang gezogene Pasteurpipetten, zur Verkleinerung der Öffnung) homogenisiert, bis alle Zellen vereinzelt waren. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in DMEM mit 10% Pferdeserum aufgenommen und auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturgefäßen ausplattiert. Alle drei Tage wurde das alte Medium durch frisches ersetzt, bis der Astrozyten-Monolayer konfluent erschien (ca. 10-14 Tage). Nun konnten die Oligodendrozyten, die auf den Astrozyten saßen, abgeschüttelt werden. Dazu mussten zuerst die ebenfalls auf den Astrozyten sitzenden Mikrogliazellen durch einstündiges Schütteln bei 100 rpm entfernt werden. Danach konnten die Oligodendrozyten durch kräftiges Schütteln bei 250 rpm üN (ca. 16-18 h) abgeschüttelt werden.

Am nächsten Morgen wurde die Zellzahl der abgeschüttelten Oligodendrozyten mit Hilfe der Neubauerkammer bestimmt und die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in 24-Well-Platten in SATO-Medium mit 5% Pferdeserum ausplattiert. Nach ein, zwei und drei Tagen wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und ein Immunfluoreszenznachweis durchgeführt (siehe 2.2.4.8).

### ***2.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren***

#### ***2.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen***

Die Isolierung von RNA mittels Trizol basiert auf der Methode von Chomczynsky und Sacchi, 1987. Hierzu wurden die konfluent angewachsenen Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen, mit 1 ml Trizol pro 6-Well-Platte abgelöst und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren lysiert. Die Präparation der RNA erfolgte nach der Anleitung der Firma Life-Technologies. Die aufgereinigte RNA wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Neben der RNA aus Zellen wurde auch die RNA aus Mausgeweben isoliert. Hierzu wurde das Gewebe in Trizol (1 ml pro 0,5 g Gewebe) zunächst 30 sec bei 4°C mit

dem Ultra-Turax homogenisiert. Die weitere Durchführung erfolgte, wie bereits bei den Zellen, nach Herstellerangaben.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch gemessen (siehe 2.2.2.2). Weiterhin wurde auch die Qualität der RNA in einem denaturierenden Agarosegel (siehe 2.2.2.3) überprüft.

### ***2.2.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration***

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch in einer Quarzküvette an einem Photometer nach der Methode von Sambrook et al., 1989. Bei 260 nm haben sowohl RNA als auch DNA ihr Absorptionsmaximum, hingegen ist die Absorption bei 280 nm ein Maß für den Proteingehalt (Absorptionsmaximum der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) der Lösung.

$$\text{DNA} \quad \text{Extinktion } E(260\text{nm}) = 1 \cong 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA} \quad \text{Extinktion } E(260\text{nm}) = 1 \cong 40 \mu\text{g/ml}$$

Die Reinheit einer Nukleinsäure-Präparation kann über den Quotient  $A_{260}/A_{280}$  ermittelt werden. Bei Werten über 1,8 für DNA und über 1,9 für RNA gilt die jeweilige Probe als rein.

### ***2.2.2.3 Denaturierende Agarosegele***

Denaturierende Agarosegele wurden zur Kontrolle der Qualität von RNA-Proben verwendet. Für diese speziellen 1% igen Gele wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer und 73,6 ml dH<sub>2</sub>O mit 1 g Agarose vermischt und aufgekocht. Sobald die Agaroselösung handwarm war, wurden 16,7 ml 37%iges Formaldehyd dazugegeben und das Gel sofort auf einen Gelträger gegossen. Fünf µg RNA-Probe wurden mit dem gleichen Volumen an RNA-Auftragungspuffer (Fermentas) versetzt, 10 min bei 60°C hitzedenaturiert, auf Eis abkühlen gelassen und auf das polymerisierte MOPS-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 mA für ca. 1-1,5 h, bis die blaugefärbte Lauffront ungefähr die Hälfte der



Gelstrecke zurückgelegt hatte. Nicht degradierte RNA-Proben zeigten zwei distinkte rRNA-Banden (18S und 28S rRNA).

#### **2.2.2.4 Reverse Transkription**

Bei der Reversen Transkription diente mRNA als Matrize für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) durch die Reverse Transkriptase. Dazu wurde ein Oligo dT Primer verwendet, der an die 3' PolyA-Sequenz der RNA binden kann. Alle verwendeten Lösungen wurden dem RT-PCR-KIT (First Strand) der Firma Fermentas entnommen.

Für eine Reverse Transkription wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

5x	Erst-Strang-Puffer	4,0 µl
10 mM	dNTP	1,0 µl
0,5 µg/µl	Primer	1,0 µl
20 U/µl	RNase Inhibitor (RiboLock™)	1,0 µl
200 U/µl	RT (RevertAid™) H Minus	1,0 µl
1-5 µg	RNA	X µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 5 min bei 70°C und dann 5 min bei 37°C inkubiert, daraufhin folgte eine Inkubation für 1 h bei 42°C. Die Reaktion wurde durch eine 10 minütige Inaktivierung der Reverse Transkriptase bei 95°C gestoppt. Abschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

In der darauf folgenden PCR (siehe 2.2.2.5), die dazu diente, spezifische Nukleinsäureabschnitte zu amplifizieren, wurden 0,5 µl bzw. 2 µl des cDNA-Reaktionsansatzes eingesetzt.

#### **2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion wird ein bestimmtes doppelsträngiges DNA-Fragment spezifisch amplifiziert. Zur Durchführung wurde die DNA zunächst kurz auf 95°C erhitzt, damit sich die beiden Stränge voneinander trennten

(Denaturierung); es folgte eine Abkühlung, so dass die spezifischen Primer, die komplementär zu bestimmten Abschnitten der zu amplifizierenden DNA waren, über Wasserstoffbrücken an ihre Zielsequenzen binden konnten („Annealing“). Im letzten Schritt verlängerte die Polymerase die Primer in 5′ – 3′ Richtung durch Anhängen von weiteren Nukleotiden, so dass ein komplementärer Strang entstand (Elongation). Dieser zyklische Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis eine ausreichende Menge an DNA amplifiziert war. Je nach Versuch wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Sollte das PCR-Fragment in eine Klonierung eingesetzt werden, wurde die Phusion-Polymerase verwendet, die eine 3′ – 5′ Exonukleaseaktivität („proof reading“) besitzt.

Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

5x	Puffer	5,0 µl
25 mM	MgCl <sub>2</sub>	2,0 µl
2 mM	dNTPs	2,0 µl
10 µM	5′ Primer	1,0 µl
10 µM	3′ Primer	1,0 µl
2 U/µl	Phusion-Polymerase	0,25 µl
	DNA-Templat	X µl
	dH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

In eine PCR zur Klonierung wurden ca. 0,1 µg DNA eingesetzt.

Die Reaktion begann mit einem initialen Denaturierungsschritt von 95°C für 5 min, danach folgten je nach Amplifikationsprodukt zwischen 29-33 PCR-Zyklen nach folgendem Schema:

30 sec: 95°C (Denaturierung); 45 sec: 45-65°C (Annealing); 1-3 min: 72°C (Elongation), je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments. Zum Schluss erfolgte noch ein terminaler Elongationsschritt von 10 min bei 72°C, bevor die Proben auf 4°C abgekühlt wurden. Die Temperatur der Primeranlagerung ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer, die wiederum mit dem GC-Gehalt der Primer und ihrer Länge zusammenhängt. Sie wird nach folgender Faustregel berechnet:

$$T_M = 4x (G+C) + 2x (A+T)$$

Die Temperatur der Primeranlagerung sollte ca. 5-10°C unter der Schmelztemperatur liegen.

PCR-Bedingungen für die MAG-PCR sahen wie folgt aus: 30 sec 95°C, 45 sec 60°C und 60 sec 72°C über 30 Zyklen.

#### ***2.2.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen***

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lässt sich DNA aufgrund ihrer negativen Ladung leicht nach der Größe auftrennen. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst, aufgeköcht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (interkaliert in die DNA) versetzt und in horizontale Flachbettkammern gegossen (Sambrook et al., 1989). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,7 - 3%ige Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit ¼ Volumen L(IV)-Puffer versetzt und neben einem DNA-Längenstandard aufs Gel aufgetragen. Die Proben wurden bei einer Stromstärke von ca. 50 mA aufgetrennt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten an der Geldokumentationsanlage unter UV-Licht visualisiert werden.

#### ***2.2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen***

Die Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten (ausgeschnitten unter langwelligem UV-Licht bei 366 nm) aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) gemäß der Durchführungsbeschreibung des Herstellers. Die DNA-Fragmente wurden zum Schluss in 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1/10 der eluierten DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Intensität der Bande im Vergleich zum DNA Größenstandard (Fermentas) geschätzt.

#### ***2.2.2.8 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen***

Es wurden Restriktionsendonukleasen des Typ II verwendet, welche die doppelsträngige DNA an einer genau definierten, palindromischen Sequenz im

Bereich der Phosphodiesterbindungen schneiden. Die Restriktionsreaktionen enthielten neben 1-2 µg DNA auch ca. 10 Units des Restriktionsenzym und erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Inkubation wurde nach Herstellerangaben (Fermentas) in den passenden Reaktionspuffern für 2-3 h bei der entsprechenden Temperatur durchgeführt.

### ***2.2.2.9 Dephosphorylierung der 5' Enden der DNA***

Wenn ein DNA-Fragment mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wird, entstehen gleiche, kompatible Enden, die wieder miteinander religieren können. Um dies zu verhindern, müssen die 5' Enden der DNA durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Fermentas). Direkt nach der Restriktion wurde der Reaktionsansatz mit einer Unit alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch eine 15 minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 85°C wurde die alkalische Phosphatase wieder inaktiviert. Anschließend konnten die dephosphorylierten DNA-Fragmente in einer Ligationsreaktion eingesetzt werden.

### ***2.2.2.10 Ligation***

Bei der Ligation wird ein bestimmtes DNA-Fragment (Insert) mit einem Vektor verbunden, der die Vermehrung dieses Fragmentes gewährleistet. Dazu müssten sowohl das DNA-Fragment als auch der Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut werden, so dass kompatible Enden entstanden. Hierbei handelte es sich um eine Ligation mit überhängenden Enden („sticky-end“). Bei einer Ligation mit glatten Enden („blunt-end“) wurden die nach Restriktionsverdau fehlenden Nukleotide mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I eingefügt. Die Ligation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers (Fermentas) mit einem molaren Insert/Vektor-Verhältnis von 10:1, mit 10 ng linearisiertem Vektor und einer Unit T4-DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20 µl. Der Ligationsansatz wurde entweder 2 h bei RT oder 16 h bei 4°C inkubiert, bevor er in einer Transformationsreaktion (siehe 2.2.3.1) eingesetzt wurde.

Mit folgender Formel lassen sich die optimalen Verhältnisse von Insert zu Vektor berechnen:

$$X \text{ ng Insert} = \frac{(\text{bp Insert}) \cdot (10 \text{ ng Vector})}{(\text{Vektor bp})} \times \frac{10(\text{Insert})}{1(\text{Vektor})}$$

## **2.2.3 Bakterien**

### **2.2.3.1 Transformation von Bakterien mit DNA**

Die Transformation beschreibt das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien, die unabhängig vom Bakteriengenom weitergegeben werden kann. Das Plasmid besitzt meistens ein Selektionsgen, das dem transformierten Bakterium Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum vermittelt.

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente *E.coli* XL1-Blue-Bakterienzellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 7,5 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.2.2.10) bzw. 10 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Transfektionsansätze einen Hitzeschock (45 sec bei 42°C) unterzogen, 2 min auf Eis inkubiert und zuletzt nach Zugabe von 900 µl LB-Medium 45-60 min bei 37°C geschüttelt. Von jedem Ansatz wurden je 10 µl sowie 90 µl auf Ampicillin- oder Kanamycin- haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nur transformierte Zellen konnten auf diesen Selektionsagar wachsen und üN Kolonien bilden.

Die Klone, die vermutlich rekombinante Bakterien enthielten, wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt, in frische antibiotikahaltige 5 ml LB-Mini-Kulturen überimpft und üN bei 37°C und ca. 150 rpm schüttelnd inkubiert.

### **2.2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde eine Übernachtskultur (LB-Medium + Antibiotika) mit einer Bakterien-Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und üN bei 37°C und ca. 150 rpm geschüttelt.

Die Isolation erfolgte entweder aus 4 ml LB-Medium mit dem „Qiagen Plasmid Mini Kit“ (Mini) oder aus ca. 30 ml LB-Medium mit dem „Qiagen Plasmid Midi-Kit“

(Midi) jeweils nach den Angaben des Herstellers (Qiagen). Die extrahierte DNA wurde in einem entsprechenden Volumen dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Diese Methode der Plasmidisolierung basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien nach Birnboim und Doly, 1979.

### ***2.2.3.3 DNA-Sequenzanalyse***

Zur Verifizierung, ob das gewünschte Insert in den Vektor eingefügt werden konnte, wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Die enzymatische Sequenzierungsreaktion, die auf der Kettenabbruchmethode von Sanger et al., 1977, beruht, wurde mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Hier wurden neben den normalen dNTPs noch fluoreszierende Nukleotide verwendet, die zum Kettenabbruch führten. In die anfängliche PCR wurden ca. 0,3 µg Plasmid-DNA in einem 10 µl PCR-Ansatz nach der Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die Primer variierten je nach Plasmid bzw. Insert.

Durch Zugabe von 10 µl dH<sub>2</sub>O, 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 100% EtOH wurde die PCR gefällt, indem sie zuerst 15 min bei RT inkubiert und daraufhin 15 min bei 15.000 g abzentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Pellet in 250 µl 70% EtOH gewaschen (für 5 min bei 15.000 g), bei RT getrocknet und in 25 µl HiDi Formamid aufgenommen. Nach einer abschließenden Denaturierung bei 80°C für 2 min konnte die DNA sequenziert werden. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des Genetic Analysers 310 von Abi Prism.

Die so erhaltenen Sequenzdaten wurden einer Datenbank-Recherche unterzogen und mit den Datenbanken der PubMed und des NCBI verglichen.

## ***2.2.4 Proteine***

### ***2.2.4.1 Präparation von Zelllysaten***

Proteine wurden sowohl aus Zellen als auch aus verschiedenen Mausegeweben isoliert. Zur Isolierung der Proteine aus Zellen, wurden die Zellen auf 6-Well-Platten ausplattiert und bis zur Konfluenz anwachsen gelassen. Danach wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, mit 2 mM EDTA/PBS vom Zellkulturgefäß abgelöst

und 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50-100  $\mu$ l Lysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis lysiert, wobei alle 5 min das Zelllysate durchmischt wurde. Abschließend wurde das nicht gelöste Material durch eine 25 min Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C pelletiert. Die Proteine befanden sich hauptsächlich im Überstand, der bei -20°C eingefroren wurde.

Bei der Isolierung der Proteine aus Mausgeweben wurde das Gewebe in 1x TBS mit Proteaseinhibitoren (1 mM EDTA, 100 U/ml Aprotinin, 100  $\mu$ g/ml Pefablock) aufgenommen und 30 sec bei 4°C mit dem Ultra-Turax bei einer Laufrumdrehzahl von 24.000 rpm zerkleinert. Auch hier wurde das unlösliche Material durch eine abschließende 30 min Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C pelletiert. Die gewonnenen Proteine im Überstand wurden bei -20°C gelagert.

#### ***2.2.4.2 Proteinbestimmung***

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde eine modifizierte Methode nach Lowry et al., 1951 angewandt. Alle Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers (BioRad).

Die Proteinbestimmung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Als Proteinstandard wurde eine BSA-Standardreihe (0  $\mu$ g – 2,5  $\mu$ g) im entsprechenden Puffer mit oder ohne SDS verwendet, dessen Proteingehalt, genauso wie der Proteingehalt der Proben, bei 750 nm im Plattenlesegerät (Tecan) ermittelt wurde.

#### ***2.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen***

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli, 1970. In diesem Gelsystem werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei das anionische Detergens SDS die Proteine denaturiert und negative Ladungen anlagert, so dass die Ladungsdichte aller Proteine gleich ist. Ammoniumpersulfat (APS) diente als Radikalstarter der Quervernetzung des Polyacrylamids, während TEMED als Katalysator hinzugefügt wurde. Zuerst wurde das Trenngel (Gelzusammensetzung siehe unten) in eine Gelapparatur

gegossen und unmittelbar nach dem Gießen mit n-Butanol überschichtet, damit sich eine plane Oberfläche bildete. (Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins kann die Konzentration des Trenngels variieren. Je größer das zu untersuchende Protein ist, desto geringer ist die Konzentration des Trenngels.) Nach einer Polymerisation von ca. 30 min bei RT wurde das Butanol abgegossen, das Gel kurz mit Wasser gewaschen, das 5% Sammelgel oben auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach der erneuten Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer gestellt und mit den Proteinproben beladen. Vor dem Beladen wurden die Proben mit SDS-Laufpuffer gemischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden 2 µl „Prestained Protein Standard“ aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 70 V für 30 min, bis die Proteine das Sammelgel verlassen hatten, danach wurde die Elektrophorese für weitere 90 min bei 150 V fortgeführt.

Zusammensetzung der Gele (Bsp.: 10% Trenngel):

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung	1,25 ml	125 µl
Trenngelpuffer	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	250 µl
dH <sub>2</sub> O	2,4 ml	600 µl
10% SDS	50 µl	10 µl
10% APS	50 µl	10 µl
TEMED	10 µl	5 µl

#### ***2.2.4.4 Silberfärbung von SDS-Gelen***

Zur Kenntlichmachung von Proteinen auf SDS-Gelen kann eine sehr sensitive Silberfärbung durchgeführt werden. Bei dieser Methode bildet das Silber- ( $\text{Ag}^+$ ) Ion Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten der Proteine und Formaldehyd reduziert  $\text{Ag}^+$  zu Silber, so dass Proteine metallisch silbern gefärbt werden (Blooms et al., 1987).

Zunächst wurden die Proteine, wie unter 2.2.4.3 beschrieben, im SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und für mindestens 2 h oder üN im Fixierer I (30% EtOH, 10% Essigsäure) fixiert. Es folgte



eine weitere 1-2 stündige Fixierung im Fixierer II (30 % EtOH, 0,5 M Natriumacetat, 0,2 M Natriumthiosulfat, 0,5% Glutaraldehyd), bevor das Gel dreimal je 20 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen wurde. Daraufhin wurde das Gel 30 min mit der Silberfärbelösung (0,1% Silbernitrat, 0,01% Formaldehyd) und kurz in der Entwicklungslösung (2,5% Natriumcarbonat, 0,01% Formaldehyd) inkubiert. Wenn sich die Entwicklungslösung leicht gelblich färbte, wurde frische Lösung hinzugegeben. Die Entwicklungsdauer hing von der Protein-Konzentration ab. Sobald Silber-Protein-Banden zu sehen waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5% Essigsäure gestoppt. Zur längeren Lagerung wurde das gewaschene Silbergel zuletzt im Geltrocker bei 80°C getrocknet.

#### ***2.2.4.5 Proteintransfer auf Membranen → Western Blot nach dem Semi Dry Verfahren***

Bei einem Western Blot erfolgt ein Transfer von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran aus Nitrozellulose oder PVDF. Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung spezifischer Proteine aus einem Proteingemisch mittels spezifischer Antikörper. Es wurde die Semi-Dry-Blotting-Methode eingesetzt. Der Aufbau der Blotting-Apparatur sah wie folgt aus: Zuerst wurden drei Lagen des in Blotpuffer getränkten Whatman-Papiers auf die Anode der Blotkammer gelegt, gefolgt von der in Wasser angefeuchteten Nitrozellulose- oder PVDF-Membran und dem zu blottenden Gel. Zuletzt folgten weitere drei Lagen Whatman-Papier und die Kathode (der Deckel des Blotters). Entstandene Luftblasen wurden vorher noch vorsichtig entfernt. Zwischen den beiden Platten (Anode und Kathode) wurde ein homogenes, elektrisches Feld erzeugt, worin die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden. Dieser Transfer dauerte 70-100 min je nach Größe der Proteine. Mittels Ponceau-Färbung konnte das Blotresultat überprüft werden. Dafür wurde die Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran für 1 min in der Ponceau-Gebrauchslösung bei RT inkubiert.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran, wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf dieser durch eine Inkubation von 1 h mit der Blockierlösung bei RT abgesättigt. Der Primäantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung zu

der Blockierlösung hinzugefügt und 90 min unter Drehen inkubiert. Die Membran wurde dreimal je 10 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:10.000 verdünnt in Blockierlösung) für 1 h bei RT unter Rotieren inkubiert und danach erneut dreimal je 10 min mit TBST gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Detektionssystem von BioRad nach Angaben des Herstellers. Die Exposition wurde auf Röntgenfilmen durchgeführt. Dazu wurden die Röntgenfilme für unterschiedliche Zeiträume (je nach Lichtintensität 5 – 300 sec) auf die Membran aufgelegt. Die exponierten Filme wurden mit Hilfe der Entwicklermaschine entwickelt. Die getrockneten Filme konnten densitometrisch ausgewertet werden.

#### ***2.2.4.6 Anfertigung von Gewebeschnitten***

Zur histologischen Untersuchung bzw. Anfärbung spezifischer Proteine wurden verschiedene Mausgewebe sowohl mit dem Kryostat als auch mit dem Mikrotom geschnitten.

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten (Kryoschnitte), wurde das Gewebe auf Trockeneis eingefroren, in Tissue Tek OCT (Sakura) eingebettet und daraufhin bei ca. -20°C mit dem Kryostat geschnitten, wobei die Schnittdicke je nach Gewebe zwischen 8 – 12 µm variiert hat. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden bei -80°C gelagert. Teilweise wurden die Gewebe nach der Präparation 30 min in 4% PFA fixiert, üN in 20% Saccharose inkubiert, 5 sec in eiskaltem Isopentan schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert, bis die Gewebe geschnitten werden sollten. Diese Prozedur diente dem Gefrierschutz des Gewebes.

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten ist es von Vorteil, wenn die Maus zunächst mit 4% PFA perfundiert wird. Die perfundierten Gewebe wurden üN in 4% PFA fixiert, am nächsten Morgen mit PBS gewaschen und zunächst mit Hilfe der Paraffiniermaschine von Sakura dehydriert und daraufhin in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit dem Mikrotom von Leica angefertigt; die Schnittdicke lag bei 4 µm. Die ebenfalls auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden bei RT gelagert.

### **2.2.4.7 Histologische HE-Färbung**

Die Hämalaun / Eosin (HE)-Färbung, bei der die Zellkerne dunkelblau und das Zytoplasma rosa gefärbt werden, dient der histologischen Untersuchung von Geweben (Bancroft & Cook, 1994).

Bei Paraffinschnitten musste als erstes eine Endparaffinierung durchgeführt werden. Dazu wurden die Schnitte zunächst zweimal für je 10 min in Xylol inkubiert, woraufhin eine wasserzuführende Alkoholreihe folgte (2x 10 min 100% EtOH, 2x 5 min 75% EtOH, 2x 5 min 50% EtOH); zum Schluss wurden die Schnitte kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen.

Kryoschnitte konnten direkt für die Färbereihe verwendet werden.

Die Schnitte wurden zunächst ca. 2 min in die Hämalaun-Lösung getaucht, mit warmem Leitungswasser zur Farbtintensivierung gewaschen, 30 sec in der Eosin-Lösung inkubiert und erneut kurz in dH<sub>2</sub>O gesäubert. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte jeweils kurz zweimal in 70% EtOH, zweimal in 90% EtOH und zweimal je 1 min in 100% EtOH sowie zweimal je 1 min in Xylol inkubiert. Noch feuchte Schnitte wurden mit dem DPX-Einbettmedium eingebettet und bei RT gelagert.

### **2.2.4.8 Immunfluoreszenznachweis von Proteinen**

Die Immunfluoreszenz dient dem Nachweis der Lokalisation und der Expression spezifischer Proteine an fixierten Geweben oder Zellen.

Wie schon zuvor bei der histologischen Färbung mussten Paraffinschnitte auch bei den Immunfluoreszenzanalysen deparaffiniert werden, indem sie zunächst zweimal je 10 min in Xylol inkubiert und daraufhin in eine absteigende Ethanol-Reihe getaucht wurden (je 1 min 100%, 95%, 75% und 50% EtOH). Zuletzt folgte ein Waschschrift in dH<sub>2</sub>O. Weiterhin wurde bei Paraffinschnitten eine Antigendemaskierung durchgeführt. Dazu wurden die deparaffinierten Schnitte 10 min bei 98°C in 0,1 M Citratpuffer, pH 9 inkubiert und 30 min in PBS auf RT abgekühlt.

Diese Schritte mussten bei Gefrierschnitten und Zellen nicht durchgeführt werden.

Zur Fixierung wurden die Zellen (auf Deckgläschen) oder die Gewebeschnitte zunächst 10 min in 4% PFA bzw. Methanol fixiert und danach zweimal mit PBS gewaschen, worauf eine Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,3% Triton X-100

für 5 min erfolgte. Dieser Schritt entfiel beim Nachweis von Zellmembranproteinen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 30 minütige Inkubation der Schnitte bzw. der Zellen mit 0,3% Gelatine bzw. 2% BSA abgesättigt. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer entsprechenden Verdünnung in 0,2% Gelatine bzw. 2% BSA auf die Schnitte/Zellen gegeben und 90 min bei RT inkubiert. Nicht gebundener AK wurde mittels drei Waschschritten zu je 10 min mit PBS entfernt, woraufhin die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:800) für 60 min bei RT erfolgte. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI (1:500 in PBS) gefärbt. Abschließend wurden die in dH<sub>2</sub>O gewaschenen Präparate mit Polyvinylalkohol Einbettmedium (Fluka) eingebettet und bei 4°C gelagert. Zur Auswertung wurden die Schnitte bzw. die Zellen mit dem Zeiss Axiovert Fluoreszenz Mikroskop begutachtet und die Bilder mit dem Axiovision Programm von Zeiss ausgewertet.

#### ***2.2.4.9 Nachweis von Proteinen mittels immunhistochemischer Färbung***

Der Nachweis von Proteinen mittels Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper erfolgte analog zum Immunfluoreszenznachweis, bis auf die Tatsache, dass die Inkubation des Primärantikörpers  $\bar{u}N$  bei 4°C erfolgte. Im Anschluss an den dritten Waschschriff nach der Sekundärantikörper Inkubation (hier Biotin gekoppelt), wurden die Präparate eine weitere Stunde mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Visualisierung der Peroxidase erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit HistoGreen für 2-5 min, bis unter dem Lichtmikroskop eine Anfärbung zu erkennen war. Danach wurden die Schnitte 2-5 min mit PBS und kurz mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie dehydriert wurden (3x je 30 sec in 100% EtOH sowie 2x je 30 sec Xylol). Die getrockneten Präparate wurden in wasserfreiem Eindeckel-Medium (DPX) eingebettet und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

#### ***2.2.4.10 Lipidfärbung mit OilRed***

Mit der OilRed-Färbung können fettreiche Bereiche von Geweben angefärbt werden, z.B. die Talgdrüsen der Haut.

Diese Färbung wurde ausschließlich mit Gefrierschnitten durchgeführt, die zunächst für 5 min in der OilRed-Fixier-Lösung fixiert und, nach einem kurzen Waschschrift mit dH<sub>2</sub>O, für 5 min in 60%igem Isopropanol äquilibriert wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in der OilRed-Stamm-Lösung B inkubiert, bevor ein kurzer Waschschrift in 60%igem Isopropanol und daraufhin in dH<sub>2</sub>O folgte. Zur besseren Visualisierung der genauen Hautstrukturen konnten die Schnitte noch mit Hämalaun gegengefärbt und mit Kaisers Gelatine eingebettet werden.

#### ***2.2.4.11 $\beta$ -Galaktosidase-Nachweisreaktion***

Dieser Nachweis dient der Darstellung des LacZ-Reportergens. Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kann in einer Färbereaktion das Substrat X-Gal farbig umsetzen. Für diese histologische Färbung wurden ebenfalls nur Kryoschnitte verwendet, die 5-10 min im LacZ-Fixierpuffer fixiert, danach zweimal je 5 min in der LacZ-Waschlösung und anschließend üN bei 37°C im LacZ-Färbepuffer inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde die Färbung lichtmikroskopisch begutachtet, bevor die Schnitte erneut zweimal je 5 min in der Waschlösung gewaschen und gegebenenfalls mit Hämalaun, Eosin oder OilRed gegengefärbt wurden.

#### ***2.2.4.12 Präparation von „Teased Fibers“ vom murinen Ischias Nerv***

Mit dieser Methode („Teased Fibers“) können einzelne Fasern des Ischias Nervs getrennt untersucht werden. Die Durchführung erfolgte, wie es im Protokoll von Altevogt et al., 2002, beschrieben steht. Die präparierten und in 4% PFA fixierten Nerven wurden unter dem Lichtmikroskop mit zwei spitzen Pinzetten vorsichtig auseinander gezogen, bis einzelne Axone vorlagen („Teased Fibers“). Diese Nervenfasern wurden üN auf einem Objektträger trocknen gelassen und bis zur Durchführung des Immunfluoreszenznachweises (siehe 2.2.4.8) bei -20°C gelagert.

## ***2.2.5 Lipide***

### ***2.2.5.1 Lipidextraktion***

Lipide wurden sowohl aus Mausgeweben als auch aus Zellen, nach dem Protokoll von van Echten-Deckert, 2000, extrahiert.

Die Gewebe wurden zunächst in einem kleinen Volumen TBS, mit zugesetzten Protease-Inhibitoren, 30 sec unter Eiskühlung mit Hilfe des Ultra-Turax bei einer Laufrumdrehzahl von 24.000 rpm homogenisiert und anschließend pelletiert (1 h; 100.000 g; 4°C). Das Gewebepellet wurde in einem zehnfachen Überschuss an Chloroform/Methanol (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) (2:1) aufgenommen und 4 h bei 56°C unter Rühren extrahiert. Bei dieser ersten Extraktion wurden die apolaren Lipide freigesetzt. Proteine und nicht lösliche Gewebereste wurden pelletiert (5 min; 1000 rpm; 4°C) und der Überstand über mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten filtriert. Bei der zweiten Extraktion, zur Freisetzung von polaren Lipiden, wurde das Pellet in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) aufgenommen und erneut 4 h bei 56°C rührend inkubiert. Auch hier wurden die nicht löslichen Reste abzentrifugiert und der Überstand filtriert. Die vereinigten Filtrate wurden daraufhin bei 50°C unter N<sub>2</sub>-Gas eingedampft. Die Gesamtlipide wurden in 300 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung von reinen Glykolipiden konnten die Gesamtlipide in 2,5 ml Methanol aufgenommen und durch Zugabe von 62,5 µl 4 M NaOH alkalisch hydrolysiert werden. Bei dieser zweistündigen Verseifung bei 37°C wurden die Phospholipide entfernt. Nach Stoppen der Hydrolyse durch Zugabe von 10 µl Eisessig, wurden die Lipide erneut unter N<sub>2</sub>-Gas eingedampft. Die in 1 ml MeOH aufgenommenen Lipide mussten noch entsalzt werden. Dazu wurden die Lipide mit 300 mM Ammoniumacetatlösung versetzt und über eine mit LiChrop®-RP-18 Kügelchen gestopfte Säule gegeben. Die Elution der Lipide erfolgte durch Zugabe von 1 ml MeOH und 6 ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1). Im N<sub>2</sub>-Gas eingedampfte Lipide wurden in 300 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Lipidextraktion aus Zellen erfolgte analog zur oben beschriebenen Extraktion aus Geweben.

Zur Gewinnung von Myelin-Lipiden wurde eine erste Extraktion des aufgereinigten Myelins (2.2.5.3) in MeOH/CHCl<sub>3</sub>/dH<sub>2</sub>O (8:4:3) für 4 h bei 56°C durchgeführt. Für

die zweite Extraktion wurde das Pellet in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1) aufgenommen und wiederum 4 h bei  $56^\circ\text{C}$  rührend inkubiert.

Auch hier wurde das nicht lösliche Material pelletiert und der Überstand filtriert. Nach Eindampfen des Lösungsmittel-Überstands, wurden die Gesamtlipide in  $300\ \mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1:1) aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### ***2.2.5.2 Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie***

Die Dünnschichtchromatographie (DC) dient der Analyse von Lipiden. Die Lipide wurden dazu auf HPTLC-Platten der Firma Merck aufgetragen und in den entsprechenden Laufmitteln, je nach Lipid, bis ca. 1 cm unter dem Rand der Platte aufgetrennt; z.B. für Ganglioside  $0,22\% \text{CaCl}_2/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  8:60:35, für Glykolipide  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{dH}_2\text{O}$  70:30:4 bzw. 65:25:4 oder für Ceramide  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAc}$  190:9:1.

Die verwendeten Lipidvolumina wurden aus dem Gesamtgewicht der Gewebe bzw. des Myelingsgewichts berechnet. Verschiedene bekannte Mengen ( $0,2 - 2\ \mu\text{g}$ ) von einzelnen Lipidstandards, wie Sulfatid, Cholesterol, Galaktosylceramid, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin, wurden ebenfalls auf die HPTLC-Platte aufgetragen, um eine Eichreihe zu erstellen. Zur Visualisierung der Lipide wurde die Dünnschichtplatte mit der DC-Färbelösung ( $625\ \text{mM}$  Kupfersulfat, gelöst in  $9,4\%$  konzentrierter Phosphorsäure) eingesprüht und bei  $180^\circ\text{C}$  für 5 min gebacken.

Nachdem die Platte gescannt worden war, konnten die Lipidkonzentrationen jeder einzelnen Bande densitometrisch mit Hilfe der AIDA Software (Advanced Image Data Analyzer; Raytest, Straubenhardt) ausgewertet werden.

### ***2.2.5.3 Präparation von Myelin aus Mausgehirnen***

Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass Myelin, im Vergleich zu anderen zellulären Membranen, eine geringe Dichte hat und deshalb im Saccharose-Gradienten schwebt. Ausgangsmaterial für die Analyse (nach Norton & Poduslo, 1973) waren Mausgehirne, die zunächst in  $8\ \text{ml}$   $10,5\%$  Saccharose mit dem Ultra-Turax mit einer Laufrichtung von  $24.000\ \text{rpm}$  bei  $4^\circ\text{C}$  homogenisiert und durch eine

50 minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C pelletiert wurden. Das weiße Pellet wurde in 9 ml 30% Saccharose aufgenommen, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt, vorsichtig mit 1 ml 10,5% Saccharose überschichtet und für 55 min bei 40.000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge im Ausschwingrotor zentrifugiert. Dabei stieg das Myelin auf und befand sich in der Interphase zwischen 10,5% und 30% Saccharose. Dieses schwebende Myelin wurde abgenommen und zur Abtrennung der axonalen Membranen (Axolemma) zweimal für je 30 min bei 40.000 g und 4°C mit dH<sub>2</sub>O gewaschen (Osmotischer Schock). Anschließend wurde das resultierende Pellet erneut auf einen weiteren Saccharose-Gradienten (30% - 10,5%) geladen und 55 min bei 40.000 g und 4°C zentrifugiert. Das schwebende Myelin wurde wiederum zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor das abschließende Myelinpellet in 500 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und üN lyophilisiert (gefrieretrocknet) wurde, so dass am nächsten Morgen das Trockengewicht an Myelin bestimmt werden konnte. Abschließend wurde das Myelin in dH<sub>2</sub>O aufgenommen und in kleinen Aliquots bis zur weiteren Verwendung (z.B. Lipidextraktion, Proteinextraktion oder Extraktion der DRM) bei -80°C gelagert.

Alle bei der Myelin-Präparation verwendeten Lösungen enthielten Protease-Inhibitoren, wie Pefablock, Aprotinin und EDTA.

#### ***2.2.5.4 Präparation von „detergent resistant membranes“***

Als „detergent resistant membranes“ (DRM) werden Membranen bezeichnet, die unlöslich gegenüber Detergenzien sind; der deutsche Begriff lautet „Detergenzien unlösliche Membranen“ oder auch „Lipid Rafts“.

Alle Arbeitsschritte erfolgten, wie bei Simons et al., 2000, beschrieben mit kleinen Änderungen. Kurz zusammengefasst: 0,25-0,75 mg Myelin wurden in 300 µl TNE-Puffer mit 2% Detergenz gelöst und 30 min bei der entsprechenden Temperatur (4°C, RT oder 37°C) inkubiert. 250 µl dieser Lösung aus dem aufgereinigten Myelin und dem TNE-Puffer wurden in einem 2 ml Ultrazentrifugen-Röhrchen mit 500 µl 60% Optiprep (ergibt 40% Optiprep) gemischt und vorsichtig mit 1,2 ml 30% Optiprep sowie 200 µl TNE-Puffer überschichtet und 2 h bzw. üN bei 60.000 g und 4°C in der Tischultrazentrifuge im TLA-110 Ausschwingrotor zentrifugiert. Dabei sollten die DRMs aufschweben und in den oberen Fraktionen zu finden sein. Nach



Zentrifugation wurden insgesamt sechs Fraktionen á 350 µl von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 6) abgenommen und für weitere Versuche bei -20°C eingefroren.

## **2.2.6 Mäuse**

### **2.2.6.1 Tierexperimentelles Arbeiten**

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes.

Zu präparierende Tiere wurden zunächst mit Diethylether betäubt und daraufhin entweder durch zervikale Dislokation (adulte Tiere) oder durch Dekapitation (junge Tiere) getötet.

Zu perfundierende Tiere wurden als erstes durch eine intraperitoneale Injektion mit Avertin (15 µl pro g Körpergewicht) betäubt und daraufhin durch die linke, vordere Herzkammer mit PBS/1% Procain, um die Arterien zu erweitern, und später mit 4% PFA bzw. 6% Glutaraldehyd (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3) perfundiert. Perfundierte Mäuse wurden ün weiter in 4% PFA bzw. 3% Glutaraldehyd bei 4°C fixiert.

PFA-fixierte Mäuse wurden für die Anfertigung von histologischen Schnitten und zum Immunfluoreszenznachweis verwendet, wohingegen Glutaraldehyd-fixierte Mäuse elektronenmikroskopisch untersucht wurden.

### **2.2.6.2 Genotypisierung der Mäuse**

Um zu überprüfen, welchen Genotyp eine bestimmte Maus hatte, wurde ihre Schwanzspitze (ca. 0,5-1 cm) ün bei 56°C schüttelnd in 750 µl Lysepuffer mit 5 µg/ml Proteinase K lysiert. Die vollständig aufgelöste Schwanzspitze wurde am nächsten Morgen zuerst mit 250 µl 6 M NaCl versetzt, weitere 5 min bei 56°C inkubiert und 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu pelletieren. 750 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach mehrmaligem leichten Schwenken wurde die DNA abzentrifugiert (3 min; 13.000 rpm). Das DNA-Pellet wurde daraufhin mit

70% EtOH gewaschen und getrocknet, bevor es in 300 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.2.2) wurden ca. 300 ng genomische Maus-DNA in PCR-Analysen (siehe 2.2.2.5) eingesetzt.

Die PCR-Bedingungen für eine Genotypisierung einer FA2H defizienten Maus sahen wie folgt aus: 30 sec 95°C, 45 sec 59°C und 60 sec 72°C über 32 Zyklen, während für die CGT-KO PCR folgende Parameter verwendet wurden: 30 sec 95°C, 45 sec 52°C und 60 sec 72°C für 31 Zyklen.

### ***2.2.6.3 Verhaltenstests***

Verschiedene Verhaltenstests wurden durchgeführt, um mögliche Veränderungen im Verhalten der Mäuse zu diagnostizieren.

#### ***2.2.6.3.1 Open Field Test***

Mit diesem Test kann das Explorationsverhalten von Mäusen untersucht werden, d.h. wie aktiv und erkundigungsfreudig sie sind. Folgende Parameter wurden gemessen: Anzahl und Zeit der Sprünge sowie des Aufrichtens, Durchschnittsgeschwindigkeit, zurückgelegte Strecke sowie die Zeit im Zentrum und im Ruhezustand.

Dazu wurden weibliche Mäuse einzeln für je 5 min in eine Box (ENV-515-16) gesetzt, deren Boden und Plexiglaswände Lichtschranken aufwiesen, die mit einem Computer verbunden waren. Jedes Mal, wenn eine Maus eine Lichtschranke passierte, wurde es von dem angeschlossenen Computer vermerkt, der im Anschluss die verschiedenen Verhaltensparameter der Mäuse in der Box zusammenfasste [Activity Software Version 4.36 (Med. Associates Inc., St. Albans, USA)]. Die so erhaltenen Daten konnten mit Excel ausgewertet werden.

#### ***2.2.6.3.2 Rotarod Experimente***

Diese Untersuchungen wurden, wie bei Kuhn et al., 1995, beschrieben, durchgeführt, um mögliche Beeinträchtigungen der Bewegungskoordination oder der Balance der zu untersuchenden Mäuse zu ermitteln.

Zuerst wurden die Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 10 sec bei 3 rpm auf das Rotarod gesetzt, um sie an die Umgebung zu gewöhnen. Am vierten Tag erfolgte die eigentliche Messung bei 12 und 18 rpm. Hier wurde ermittelt, wie oft die Mäuse in einer Minute vom Rotarod fielen. Jedes Mal, wenn die Maus von der Walze fiel, wurde die Zeit gestoppt und die Messung erst wieder gestartet, wenn das Tier erneut auf das Rotarod gesetzt worden war.

### ***2.2.7 Statistische Auswertung***

Die Ergebnisse sind jeweils als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung bzw. Standardfehler (SEM) dargestellt. Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde der zweiseitige t-Test angewandt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant gewertet.

### **3 Ergebnisse**

Myelin, das von Oligodendrozyten und Schwannzellen synthetisiert wird und eine schnelle Erregungsweiterleitung gewährleistet, hat eine sehr spezielle Zusammensetzung. So dominieren die Sphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid, die sowohl als hydroxylierte als auch als nicht hydroxylierte Derivate vorliegen, wobei der Anteil der  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide deutlich überwiegt.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Rolle und Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide, die vermutlich durch das Enzym Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) erfolgt, zu ermitteln.

Dazu wurden zunächst in vitro Untersuchungen anhand eines Zellkulturmodells durchgeführt, um zum einen die subzelluläre Lokalisation der FA2H zu bestimmen und zum anderen zu untersuchen, ob die  $\alpha$ -Hydroxylierung einen Einfluss auf die Menge und die Struktur der weiteren endogenen Lipide hat. Diese Ergebnisse werden im ersten Teil der Arbeit (3.1) gezeigt.

Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils (3.2) beschäftigt sich mit in vivo Untersuchungen der jungen (3.2.1) und der gealterten (3.2.2) FA2H-KO Mäuse auf biochemischer Ebene.

Im dritten Teil der Arbeit (3.3) werden die biochemischen Analysen der FA2H/CGT (Galaktosyltransferase)-Doppel-KO Maus näher beschrieben.

Der vierte und letzte Abschnitt dieser Doktorarbeit (3.4) behandelt abschließend den Hautphänotyp der FA2H-KO Maus.

#### **3.1 In vitro Zellkulturversuche**

##### ***3.1.1 Subzelluläre Lokalisation der FA2H***

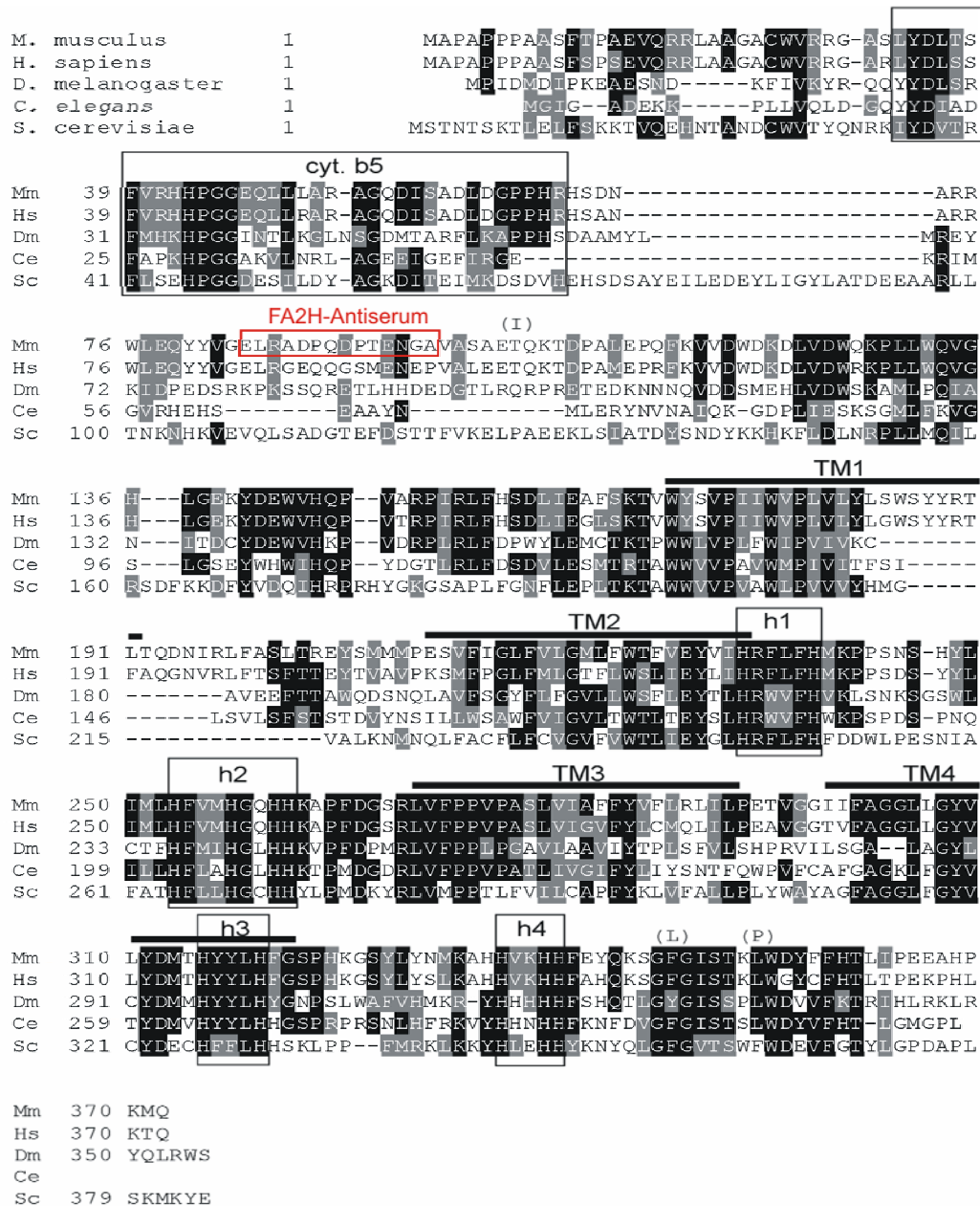
Für die nachstehenden Untersuchungen wurden immer CHO-K1 (WT) Zellen verwendet, da dieser Zelltyp weder die FA2H noch die CGT endogen exprimieren (van der Bijl et al., 1996).

Untersuchungen von Burger et al., 1996, haben gezeigt, dass die Synthese von hydroxyliertem Galaktosylceramid (GalCer) im endoplasmatischen Retikulum (ER) abläuft. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die Fettsäure-2-Hydroxylase, die wahrscheinlich die Hydroxylierung des Fettsäurerestes des GalCers katalysiert, im

ER lokalisiert ist. Wie das topologische Modell der FA2H in Abb. 1-3 der Einleitung zeigt, besitzt die FA2H die C-terminale Sequenz HXKXX. In der Literatur (Jackson et al., 1990; Zerangue et al., 2001) gilt das Motiv K(X)KXX als klassisches ER-Rückhaltesignal. Dieses klassische Signal ist in der Aminosäuresequenz der FA2H (siehe Abb. 3-1) nicht zu finden, sondern das erste Lysin ist durch Histidin substituiert, so dass sich die Frage nach der Funktionalität des HXKXX-Signals stellt.

Anhand von Immunfluoreszenz-Untersuchungen sollte getestet werden, ob dieses leicht veränderte Signal tatsächlich funktionell aktiv ist. Dazu wurden die codierende Sequenz der FA2H (siehe Abb. 3-1) und ein HA-Epitop in den pcDNA3-Vektor kloniert, so dass ein Fusionsprotein aus der FA2H und dem N-terminalen HA-Epitop entstand. Dieser für das HA-FA2H Fusionsprotein codierende Expressionsvektor wurde transient in CHO-K1 Zellen transfiziert und über das HA-Epitop in Immunfluoreszenz-Untersuchungen detektiert.

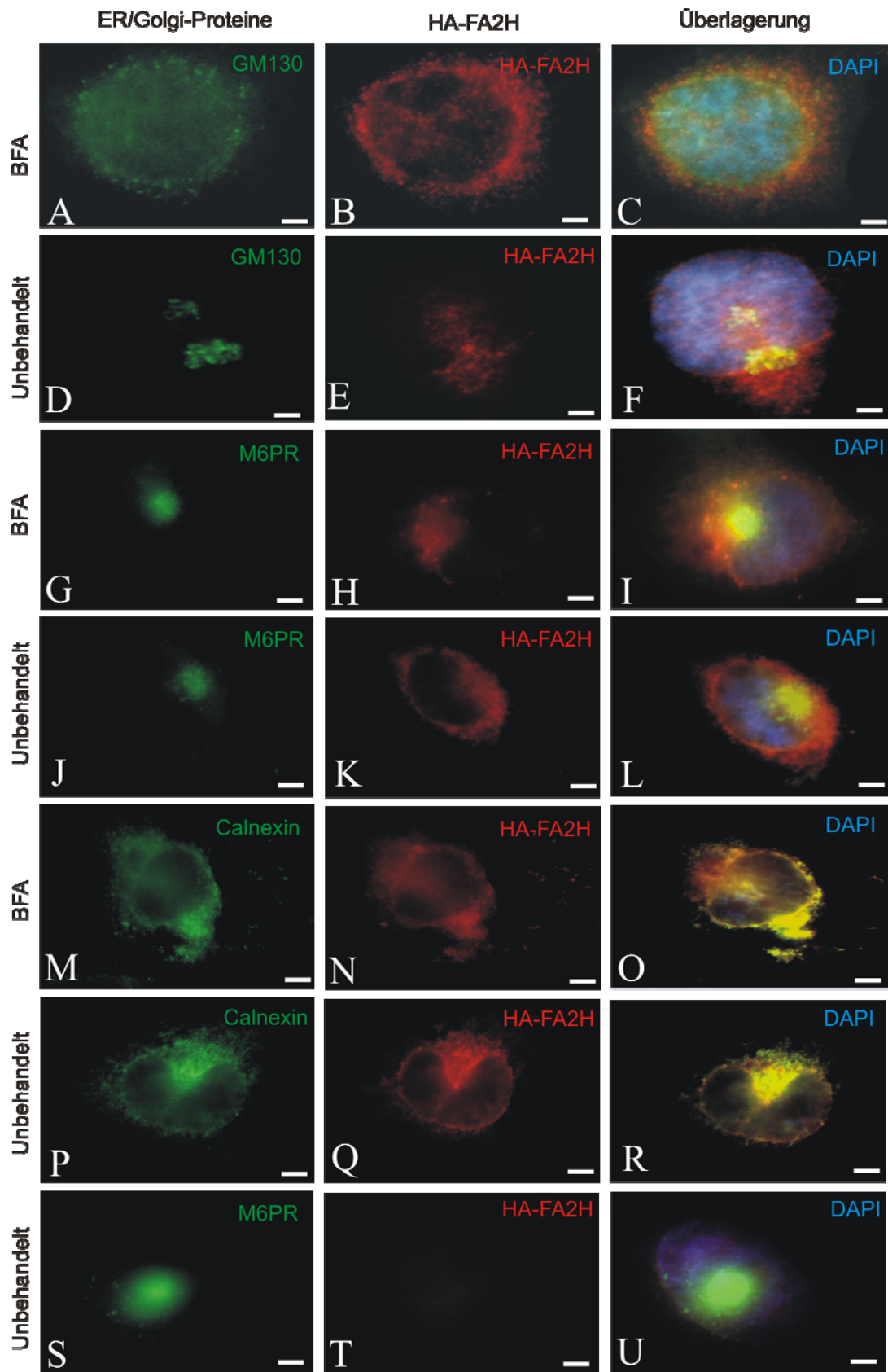
Zur Bestimmung der Lokalisation der FA2H wurden Co-Färbungen mit einem Antikörper gegen Calnexin, das im ER lokalisiert ist, und mit Antikörpern gegen die beiden Golgi-Proteine GM130 und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) durchgeführt, wobei ersteres im Cis-Golgi und letzteres hauptsächlich im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist.



**Abb. 3-1 Codierende Sequenz der FA2H aus verschiedenen Tierspezies.**

Die Aminosäuresequenz besitzt eine hohe Konservierung in den einzelnen Tierarten über die gesamte phylogenetische Entwicklung. TM = Transmembrandomäne; cyt. b5 = Cytochrom b5-Domäne; h = Histidin-Motive. In rot ist der Bereich gekennzeichnet, aus dem das Peptid generiert wurde, mit dem Kaninchen immunisiert wurden. Das resultierende Antiserum wird nachfolgend als FA2H Antiserum bezeichnet.

Teilweise wurden die transient transfizierten Zellen drei Stunden mit Brefeldin A (BFA) behandelt. Diese Substanz unterbindet den Vorwärtstransport vom ER zum Golgi-Apparat und führt dazu, dass alle Proteine, die im Cis-Golgi oder im Trans-Golgi lokalisiert sind, zurück zum ER transportiert werden.



**Abb. 3-2 Die Co-Färbung der FA2H mit ER- bzw. Golgi-Proteinen zeigt, dass die Hydroxylase im ER lokalisiert ist.**

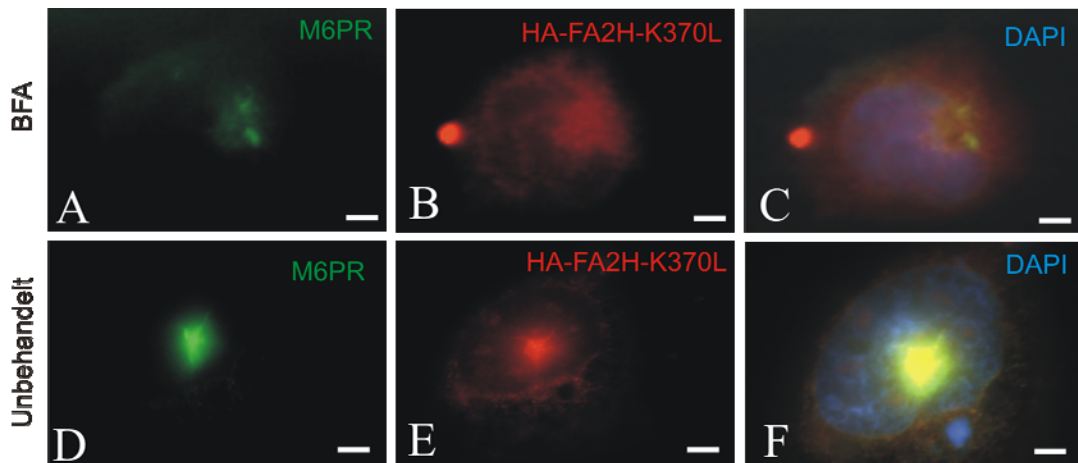
A-F zeigen eine Doppelfärbung von CHO-K1-Zellen mit GM130 (grün) und HA-FA2H (rot), während in G-L, sowie in S-U die mit M6PR (grün) und FA2H-HA (rot) gefärbten

CHO-Zellen dargestellt sind, in M-R sind die Co-Färbungen von Calnexin (grün) und HA-FA2H (rot) zu sehen. Die Überlagerung der einzelnen Bilder mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung (1:500) ist jeweils in den Abb. C, F; I, O und R erkennbar. Die zusammengehörenden oberen Paneele (A-C; G-I; M-O) zeigen die Färbung nach einer dreistündigen Inkubation der Zellen mit BFA, wohingegen die unteren Bilder (D-F; J-L; P-R; S-U) die Immunfärbung ohne BFA-Behandlung darstellen. In S-U ist eine Kontrolle der HA-FA2H-Transfektion zu erkennen; die Zelle zeigt nur eine positive Immunfärbung für M6PR, wohingegen sie negativ für das HA-FA2H Fusionsprotein ist. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Antikörper-Verdünnung: Calnexin: 1:300; GM130: 1:1000; HA (12CA5)-AK: 10  $\mu\text{g/ml}$  und M6PR-AK: 1:2000. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt vier Versuchen.

In Abb. 3-2 sind beispielhaft die verschiedenen Doppelfärbungen dargestellt. Das transient transfizierte HA-FA2H Fusionsprotein wurde mit einem rot fluoreszierenden Antikörper nachgewiesen, während die Co-Färbungen mit einem grün fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert wurden. Es ist eine klare Co-Lokalisation der FA2H-Färbung mit der Calnexin-Färbung zu erkennen (Abb. 3-2 M-R), wohingegen die GM130- bzw. die M6PR-Färbung einen anderen Bereich der Zelle färbt. Teilweise ist auch hier eine partielle Überlagerung (Gelbfärbung) zu sehen (siehe Abb. 3-2 F, I und L), aber die grüne und die rote Einzelfärbungen zeigen eine andere Morphologie, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die partielle Überlagerung nicht zwangsläufig eine Co-Lokalisation beschreibt. Ohne BFA Behandlung zeigte GM130 eine Golgi-spezifische Färbung. Nach der Brefeldin A Inkubation hingegen war dieses Cis-Golgi Protein nur noch im ER zu finden (siehe Abb. 3-2 A-F). Auf die Lokalisation des Trans-Golgi-Netzwerk Proteins M6PR hatte die BFA-Behandlung keinen Einfluss (Abb. 3-2 G-L).

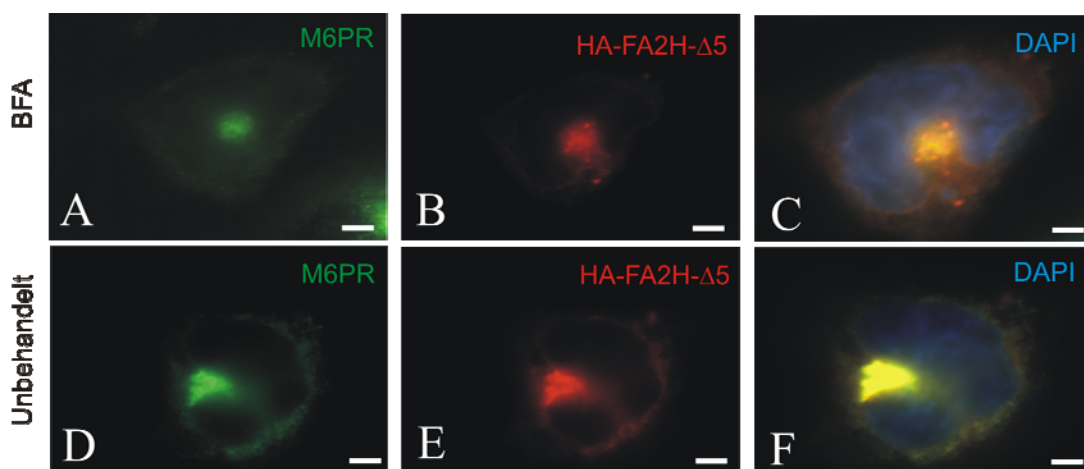
Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die FA2H tatsächlich ein ER-Rückhaltesignal besitzt und deshalb im ER lokalisiert ist. Um zu überprüfen, ob die ER Lokalisation auf das vermeintliche ER-Rückhaltesignal HXXXX zurückzuführen ist, wurden zwei verschiedene Mutanten der FA2H generiert. Bei der ersten, die im weiteren FA2H-K370L genannt wird, wurde eine Aminosäure des Rückhaltesignals ausgetauscht [Lysin (K) gegen Leucin (L)], während bei FA2H- $\Delta 5$  das gesamte, fünf Aminosäuren lange ER-Rückhaltesignal deletiert wurde. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden auch hier mit einem HA-FA2H Fusionsprotein durchgeführt. Abb. 3-3 und 3-4 zeigen je eine repräsentative Co-Färbung des mutierten und des deletierten FA2H-Konstruktes (FA2H-K370L und FA2H- $\Delta 5$ ) (rot) mit dem Trans-Golgi-Netzwerk Proteins M6PR (grün).





**Abb. 3-3 Die Co-Färbung der FA2H-K370L mit dem M6PR verdeutlicht die Lokalisation im Golgi-Apparat.**

In rot (B u. E) sind die Färbungen des HA-FA2H-K370L Fusionsproteins dargestellt, während das grüne Signal (A u. D) den im Golgi lokalisierten M6PR zeigt. Die Überlagerung des grünen und des roten Kanals (C u. F) verdeutlicht die Lokalisation der FA2H-K370L im Golgi-Apparat. Die Zellen wurden mit dem blauen Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die ersten drei Bilder (A-C) zeigen die Inkubation der Zellen mit BFA für 3 h und auf den unteren Bildern (D-F) sind die unbehandelten Zellen dargestellt. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Antikörper-Verdünnung: HA (12CA5)-AK: 10  $\mu\text{g/ml}$  und M6PR-AK: 1:2000. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen.



**Abb. 3-4 Die Co-Färbung der FA2H- $\Delta$ 5 mit dem M6PR zeigt eine Golgi-Lokalisation.**

B u. E zeigen die rote Färbung des HA-FA2H- $\Delta$ 5 Fusionsproteins, in A u. D ist das grüne Signal des Trans-Golgi-Netzwerk Proteins zu sehen und in C u. F ist erneut die Überlagerung des roten und des grünen Kanals mit zusätzlicher DAPI-Kernfärbung dargestellt. Die Zellen in den oberen drei Bildern (A-C) wurden drei Stunden mit BFA behandelt, wohingegen die Zellen in D-F unbehandelt blieben. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Antikörper-Verdünnung: HA (12CA5)-AK: 10  $\mu\text{g/ml}$  und M6PR-AK: 1:2000. Zu sehen ist ein exemplarisches Ergebnis von insgesamt drei Versuchen.

Hier ist zu erkennen, dass die FA2H-K370L ohne Brefeldin A Behandlung hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert war, aber nach einer BFA-Inkubation

wieder eine ER-Färbung zeigte, wie zuvor die WT FA2H (siehe Abb. 3-2), was für eine Lokalisation im Cis- oder Trans-Golgi spricht. Die FA2H- $\Delta 5$  zeigte unabhängig von Brefeldin A eine Golgi-Lokalisation, wie auch der M6PR. Jedoch war die Co-Lokalisation der FA2H- $\Delta 5$  mit dem M6PR nach einer Behandlung mit BFA reduziert. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die FA2H- $\Delta 5$  vermutlich partiell im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist. Abschließend verdeutlichen diese Ergebnisse die Funktionalität des ER-Rückhaltesignals.

Neben dem HA-FA2H Fusionsprotein wurde ebenfalls ein Konstrukt aus der FA2H und einem N-terminalen GFP-Protein kloniert, das hauptsächlich für Western Blot Analysen verwendet wurde. Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit diesem GFP-FA2H Fusionsprotein zeigten ebenfalls eine Lokalisation der FA2H im ER (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Western Blot Untersuchungen von transient transfizierten CHO-K1 Zellen verdeutlichten (Abb. 3-5), dass die FA2H auch auf Proteinebene exprimiert wird. Die Inkubation mit einem GFP-Antikörper führte zur Detektion eines ca. 71 kDa großen Proteins, dem Fusionsprotein aus GFP (29 kDa) und der FA2H (42 kDa).



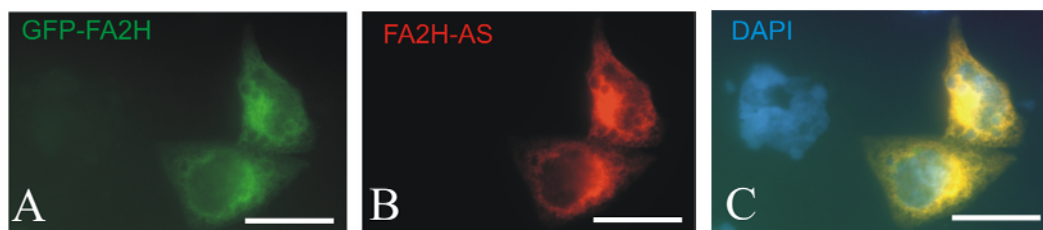
**Abb. 3-5 Expression der FA2H auf Proteinebene.**

48 h nach Transfektion wurden die Proteine aus den unterschiedlich transient transfizierten Zellen isoliert und je Spur 50  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Detektion der FA2H erfolgte mit einem GFP-AK (Verdünnung 1:5000), der das Fusionsprotein aus FA2H und GFP erkennt, welches ein apparentes Molekulargewicht von ca. 70 kDa haben sollte. In der ersten Spur wurde das Lysat der untransfizierten CHO-K1 Zellen aufgetragen, in der zweiten und dritten Spur CHO-K1 Zellen transfiziert mit dem GFP-FA2H-WT Fusionsprotein (zwei unabhängige Transfektionen), in der vierten Bahn CHO-K1 Zellen transfiziert mit dem GFP-FA2H-K370L Fusionsprotein und in der letzten Bahn CHO-K1 Zellen transfiziert mit dem GFP-FA2H- $\Delta 5$  Fusionsprotein.

Obwohl die mutierte und die deletierte Form der FA2H nicht mehr im ER lokalisiert waren, wurden sie ebenfalls auf Proteinebene exprimiert. Es war kein Unterschied in der Expression im Vergleich zur FA2H-WT zu erkennen.

### 3.1.2 Charakterisierung eines Antiserums gegen FA2H

Northern Blot Analysen konnten die Expression der FA2H mRNA in verschiedenen Mausgeweben zeigen (Eckhardt et al., 2005). Zur Überprüfung und genaueren Bestimmung der Gewebe, welche die FA2H exprimieren und zur Bestätigung der ER-Lokalisation, wurde ein Peptid-Antiserum generiert. Dazu wurden Kaninchen mit einem FA2H-Peptid, das zwischen der Cytochrom b5-Domäne und der ersten Transmembrandomäne liegt (Aminosäure 84-97; siehe Abb. 3-2 und 3-7 A) und von Exon 2 codiert wird, immunisiert. Das Antiserum wurde zum einen in Immunfärbungen an FA2H exprimierenden CHO-Zellen eingesetzt und zum anderen in Western Blot Analysen. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigten die Funktionalität des Antiserums (siehe Abb. 3-6). Mit dem FA2H-Antiserum wurde annähernd der gleiche Bereich der Zelle gefärbt, wie mit dem GFP-AK, der das Fusionsprotein aus FA2H und GFP erkennt. Somit legen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen nahe, dass die FA2H tatsächlich im ER lokalisiert ist.

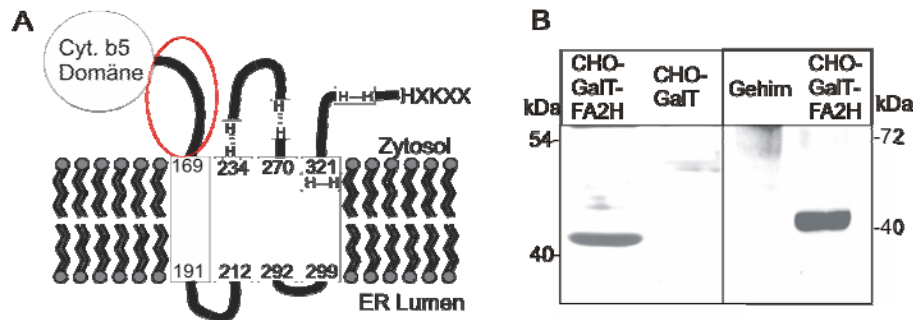


**Abb. 3-6 Das FA2H-Antiserum zeigt ebenfalls eine ER-Lokalisation der FA2H.**

In Abb. A ist das grüne Signal des FA2H-GFP-Fusionsproteins, das mit einem GFP-Antikörper detektiert wurde, dargestellt, während Abb. B die rote Färbung des FA2H-Antiserums (AS) zeigt. Die Überlagerung der beiden Immunfluoreszenzen mit DAPI-Kernfärbung (C) verdeutlicht, dass jeweils der gleiche Bereich der Zelle gefärbt und dass die FA2H im ER lokalisiert ist. Messbalken: 200  $\mu$ m. Antikörper-Verdünnung: GFP-AK: 1:1000; FA2H-Antiserum: 1:800.

Die Western Blot Analysen wurden mit FA2H überexprimierenden CHO-GalT-FA2H Zellen sowie Gehirnhomogenat-Proben als Positivkontrolle sowie CHO-GalT Zellen als Negativkontrolle des Antiserums durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten nur bei den CHO-GalT-FA2H positiven Zellen die erwartete Bande bei ca. 42 kDa, während weder bei den FA2H negativen CHO-GalT Zellen noch bei der Gewebeprobe ein Signal zu beobachten war (siehe Abb. 3-7 B). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das Antiserum nur bedingt verwendet werden kann, da es die FA2H nur erkennt, wenn dieses Protein überexprimiert wird. Kontroll-Western

Blots mit dem Präimmunserum zeigten, wie erwartet, weder bei den FA2H positiven Zellen noch bei der Gehirnprobe ein Signal (Daten nicht gezeigt).



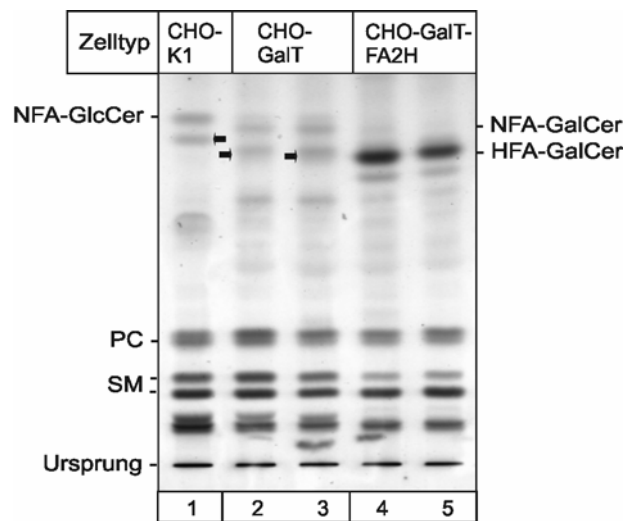
**Abb. 3-7 Western Blot Analysen des FA2H-Antiserums bestätigt seine Aktivität und seine Spezifität.**

Proteine aus stabilen CHO-GalT-FA2H bzw. CHO-GalT Zellen sowie aus Gehirn von ca. vier Wochen alten WT Mäusen wurden isoliert und 50 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Detektion der FA2H erfolgte mit dem Antiserum gegen die FA2H (Aminosäuresequenz CELRADPQDPTENGA; bp 84-97, mit roten Kreis gekennzeichnet), das 1:800 verdünnt wurde. Die FA2H-Bande wurde bei ca. 42 kDa erwartet.

### 3.1.3 Analyse der Lipide der FA2H exprimierenden Zellen

Es ist zwar bereits bekannt, dass verschiedene Säugetierzellen  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide synthetisieren, aber das verantwortliche Gen war bis 2004 noch nicht identifiziert. Um zu überprüfen, ob die FA2H das entscheidende Enzym ist, das in Säugetierzellen die Synthese von  $\alpha$ -hydroxylierten Lipiden katalysiert, wurden Lipidanalysen mit FA2H transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Dazu wurde die FA2H stabil in CHO-GalT Zellen transfiziert, die Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie (Abb. 3-8) analysiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurden gleichzeitig verschiedene Lipidstandards auf die DC aufgetragen. In der in Abb. 3-8 gezeigten Dünnschichtchromatographie ist zu erkennen, dass die CHO-K1 Zellen (Bahn eins) neben den Phospholipiden und Sphingomyelin auch Glukosylceramid (GlcCer) produzierten. Die stabil mit der Galaktosyltransferase (CGT) transfizierten CHO-GalT Zellen (zweite und dritte Spur) bildeten nicht hydroxyliertes Galaktosylceramid (GalCer). In der vierten und fünften Spur sind die CHO-GalT Zellen dargestellt, die stabil mit der FA2H cDNA transfiziert wurden. Diese Zellen zeigten eine distinkte Bande des  $\alpha$ -hydroxylierten GalCers (untere Bande). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die FA2H die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Lipide in Säugetierzellen katalysiert. Bis auf eine leichte

Reduktion der oberen Bande des Sphingomyelins waren keine Veränderungen der endogenen Lipidzusammensetzung der CHO-GalT-FA2H Zellen im Vergleich zu den CHO-GalT Zellen zu erkennen.



**Abb. 3-8 Die FA2H hydroxyliert die Sphingolipide in Säugetierzellen.**

Aus fünf 100-mm-Petrischalen wurden die Lipide isoliert und 15% der alkalisch hydrolysierten Lipide je Spur auf eine DC aufgetragen. Als Laufmittel diente Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O im Verhältnis von 70:30:4. GlcCer wandert in diesem Laufmittel etwas weiter als GalCer. NFA-GlcCer = nicht hydroxyliertes Glukosylceramid; NFA-GalCer = nicht hydroxyliertes Galaktosylceramid; HFA-GalCer =  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid; PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin. Die Pfeile weisen auf kurzketziges, nicht hydroxyliertes GalCer bzw. GlcCer hin (siehe Diskussion).

## **3.2 Biochemische Charakterisierung der FA2H defizienten Mäuse**

### ***3.2.1 Untersuchungen an jungen FA2H-KO Tieren***

Wie bei Zöllner et al., 2008, beschrieben, erfolgte die Generierung der FA2H defizienten Mäuse durch homologe Rekombination in ES-Zellen. Dazu wurden Teile des FA2H Gens, welche die Exons 3 und 4 enthielten, durch ein  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) Reporter Gen ersetzt, welches „in frame“ in Exon 3 kloniert wurde. So entstand ein Fusionsprotein aus der N-terminalen Cytochrom b5-Domäne und der  $\beta$ -Galaktosidase. Southern und Northern Blot Analysen sowie in situ Hybridisierungen haben gezeigt, dass der Knock-out funktionell war (Zöllner et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob eine FA2H Defizienz eventuell zu einem embryonal letalen Phänotyp führt, wurden Mäuse, die heterozygot für ein defektes FA2H Allel waren,

miteinander verpaart. In der F<sub>1</sub>-Generation entsprach die Anzahl der Nachkommen der einzelnen Genotypen den Erwartungen gemäß den Mendelschen Regeln (siehe Tabelle 1). FA2H defiziente Tiere waren lebensfähig und zeigten keine erhöhte Sterberate im Vergleich zu den WT Geschwistern. Sowohl weibliche als auch männliche FA2H-KO Mäuse waren fertil.

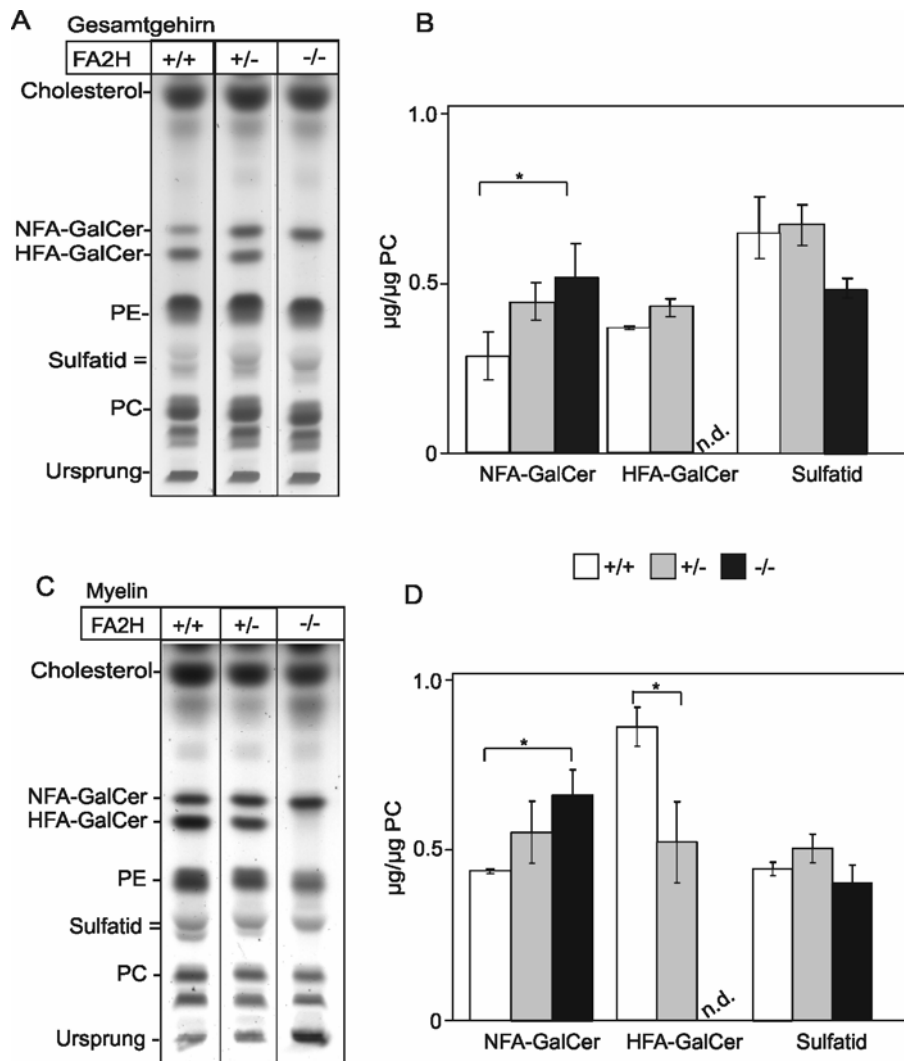
**Tabelle 1: Genotypen-Verteilung der Nachkommen aus Verpaarungen von heterozygoten FA2H Tieren**

<b>Genotyp</b>	<b>Beobachtet</b>	<b>Erwartet</b>
FA2H (+/+)	29	25,5
FA2H (+/-)	46	51
FA2H (-/-)	27	25,5

### ***3.2.1.1 Analyse der Sphingolipide aus Mausgehirn***

In den vorangegangenen Zellkulturversuchen konnte bereits bestätigt werden, dass die Fettsäure-2-Hydroxylase für die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Fettsäurereste der Sphingolipide verantwortlich ist. Als nächstes sollte untersucht werden, welchen Effekt das Enzym auf die endogene Lipidzusammensetzung des zentralen Nervensystems von Mäusen hat. Für die Untersuchungen wurden jeweils drei 10 Wochen alte Tiere aller drei Genotypen (Wildtyp (+/+) oder WT, Heterozygot (+/-) oder HET), Knock-out (-/-) oder KO) verwendet.

Die Lipide des Gesamtgehirns und des Myelins wurden nach dem Protokoll von van Echten-Deckert, 2000, extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie in einem Laufmittel aufgetrennt, in dem die Glykolipide gut von den Phospholipiden abgetrennt wurden. Kommerziell erhältliche Lipide wurden als Standards verwendet.



### Abb. 3-9 Analyse der Sphingolipide aus Gesamtgehirn und Myelin.

Gesamtlipide aus Gesamtgehirn (A) und Myelin (C) von zehn Wochen alten Mäusen wurden isoliert und mittels HPTLC-Platten im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O im Verhältnis 65:25:4 aufgetrennt. Pro Spur wurden entsprechend 5% des Gehirngewichts bzw. 0,5 mg Myelin (Trockengewicht) aufgetragen. Insgesamt wurden drei Tiere je Genotyp für eine quantitative Auswertung analysiert, die für das Gehirnhomogenat in Abb. B und für das Myelin in Abb. D zu sehen ist. Die Daten der Auswertung werden als  $\mu\text{g}$  Lipid je  $\mu\text{g}$  PC mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Durch einen Stern wird ein statistisch signifikanter Unterschied (t-Test,  $* = p < 0,05$ ) gekennzeichnet. +/+ = FA2H-WT; +/- = FA2H-HET; -/- = FA2H-KO; NFA-GalCer = nicht hydroxyliertes Galaktosylceramid; HFA-GalCer =  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid; PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; n.d. = nicht detektierbar.

Wie in Abb. 3-9 beispielhaft zu erkennen ist, bildeten die FA2H defizienten Mäuse sowohl im Gesamtgehirn als auch im Myelin, wie erwartet, keine  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide (GalCer und Sulfatid) mehr. Stattdessen konnte ein Anstieg der nicht hydroxylierten Form des GalCers in den untersuchten Geweben beobachtet werden.

Insgesamt aber war die Gesamtmenge an GalCer in den FA2H(-/-) Tieren signifikant reduziert.

Die Lipid-Quantifizierung der heterozygoten Mäuse zeigte, dass bereits diese Tiere eine verringerte Konzentration an hydroxyliertem GalCer hatten, dies aber durch einen Anstieg der nicht hydroxylierten Form ausgleichen konnten. Vermutlich war auch die Menge an nicht hydroxyliertem Sulfatid in den FA2H defizienten Mäusen erhöht, aber eine quantitative Bestimmung war nicht möglich, da die untere Bande ein „Gemisch“ ist aus  $\alpha$ -hydroxyliertem Sulfatid und kurzkettigem, nicht hydroxyliertem Sulfatid. Weder im Myelin noch im Gesamtgehirnhomogenat der FA2H defizienten oder heterozygoten Tieren konnte ein signifikanter Unterschied in der Menge an Sulfatid beobachtet werden, genauso wenig wie Veränderungen in der Zusammensetzung der Phospholipide oder des Sphingomyelins.

### ***3.2.1.2 Analyse der myelinspezifischen Proteine aus Mausgehirn***

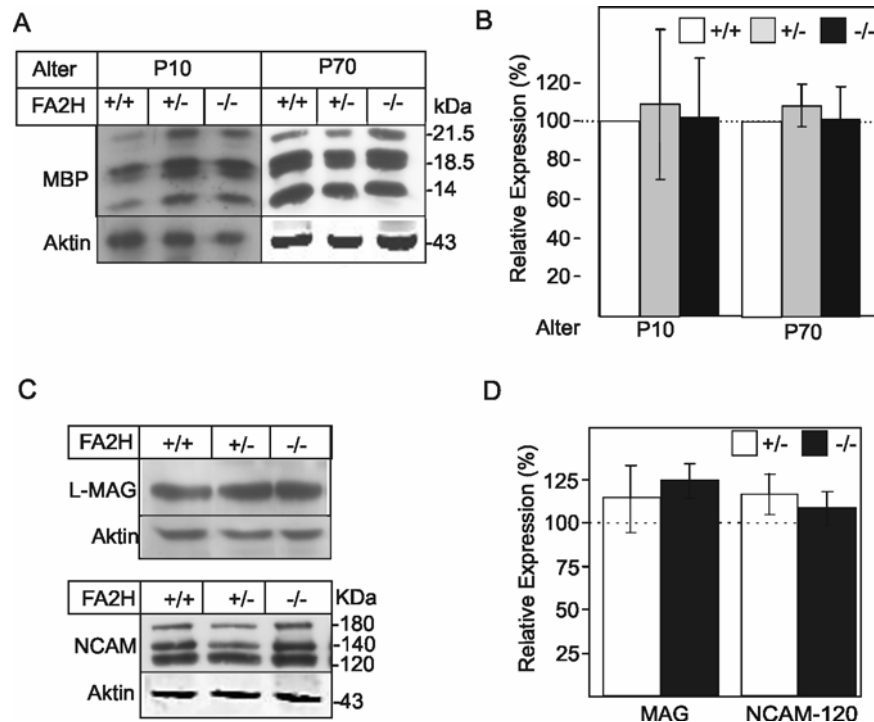
Die Lipiduntersuchungen bestätigten die Hypothese, dass die FA2H die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide katalysiert. Weiterhin konnten in situ Hybridisierungen zeigen (Zöller et al., 2008), dass die FA2H hauptsächlich in der weißen Substanz des Gehirns exprimiert wird. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welchen Einfluss die FA2H Defizienz auf myelinspezifische Proteine und auf die Myelinisierung hat.

Das Myelin basische Protein (MBP) gilt als wichtiges Myelinprotein. Eine Veränderung der Menge von MBP kann als Hinweis auf eine Störung der Myelinbildung gewertet werden. Um mögliche Veränderungen in der Menge an MBP in FA2H defizienten Mäusen festzustellen, wurden Western Blot Analysen mit dem Gesamtgehirnhomogenat von drei Tieren pro Genotyp und Altersstufe durchgeführt. Abb. 3-10 A und B verdeutlichen, dass es keinen signifikanten Unterschied der MBP Expression zwischen den drei Genotypen zu allen untersuchten Zeitpunkten gab. Auch im aufgereinigten Myelin war der MBP-Gehalt der FA2H-KO Tiere nicht signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

Als weitere myelinspezifische Proteine wurden NCAM 120 (Neurales Zelladhäsionsmolekül) und L-MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein), beide hauptsächlich in ausdifferenzierten Oligodendrozyten exprimiert, untersucht. Die



anderen Isoformen von NCAM (140 und 180) kommen im Myelin nur in geringen Mengen vor. Die quantitative Auswertung ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen Knock-out und Wildtyp (Abb. 3-10 C und D). Aktin diente als interne Kontrolle der gleichmäßigen Beladung und zur Normierung der Expressionssignale.



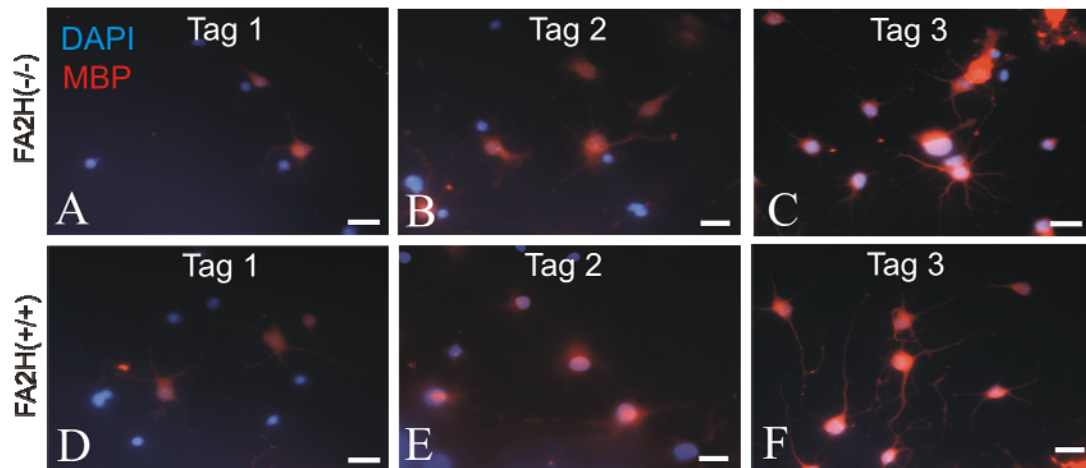
**Abb. 3-10 Die Expression myelinspezifischer Proteine war unverändert.**

In A sind MBP-Western Blots von Gehirnproben von zehn und 70 Tage alten Tieren (P10 und P70) aller drei Genotypen zu sehen, die dazugehörige Quantifizierung von mindestens drei Tieren pro Genotyp mit Standardabweichung wird in Abb. B gezeigt; die Expression der WT Tiere wurde auf 100% gesetzt. Pro Bahn wurden 50 µg Protein aufgetragen. AK-Verdünnung: MBP: 1:5000; Aktin: 1:5000.

Abb. C zeigt die Western Blot Analysen für L-MAG und NCAM von 70 Tage alten Tieren. Die quantitative Auswertung von erneut drei Tieren pro Genotyp mit Standardabweichung ist in Abb. D zu erkennen. Der L-MAG-AK wurde in diesem Versuch 1:2000 verdünnt, während der NCAM-AK mit einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt wurde. Die Expression wurde sowohl für MBP als auch für NCAM und MAG auf Aktin normiert. +/+ = FA2H-WT; +/- = FA2H-HET; -/- = FA2H-KO.

Weiterhin wurde mittels Immunfärbungen untersucht, ob die *in vitro* Differenzierung von primären Oligodendrozyten in Abwesenheit der FA2H beeinträchtigt ist. Die Oligodendrozyten wurden an drei aufeinander folgenden Tagen nach dem Aussäen fixiert und anschließend in einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Repräsentative Bilder sind in Abb. 3-11 dargestellt. Die Anzahl der MBP positiven Oligodendrozyten nahm mit fortschreitender Differenzierung bei den WT und FA2H-KO Tieren gleichermaßen zu; ein Unterschied zwischen den Genotypen war

nicht nachweisbar. Als Kontrolle dienten Oligodendrozyten, die nur mit dem Zweitantikörper angefärbt wurden; hier war keine Färbung zu beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt).

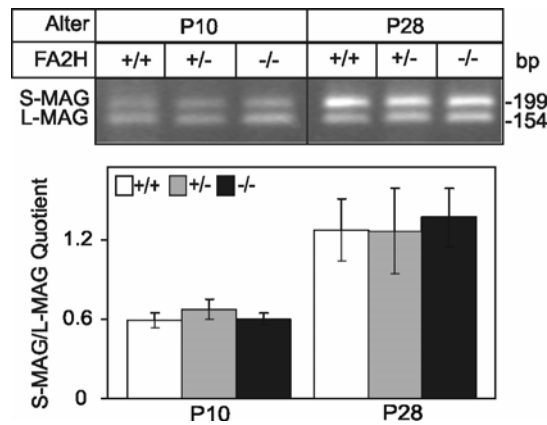


**Abb. 3-11 Normale morphologische Differenzierung der primären FA2H defizienten Oligodendrozyten.**

Dargestellt sind Immunfluoreszenzanalysen von primären Oligodendrozyten mit einem MBP-AK von FA2H-KO Tieren (A-C) und WT Mäusen (D-F). Die Zellen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen nach dem Aussäen fixiert und gefärbt. Die Abb. A und D zeigen die Zellen, die am ersten Tag fixiert wurden, während die Abb. B und E die Zellen am zweiten Tag sowie die Abb. C und F die Zellen am dritten Tag zeigen. Der Zellkern wurde jeweils mit DAPI (1:500) gefärbt. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Antikörper-Verdünnung: MBP-AK: 1:1000. Zu sehen ist ein exemplarisches Ergebnis von zwei Untersuchungen.

### 3.2.1.3 Analyse des Verhältnisses von S/L-MAG

Ein weiteres sensibles Anzeichen der Störung der Oligodendrozyten-Differenzierung ist das Verhältnis der beiden durch alternatives Spleißen entstehenden Myelinproteine S-MAG und L-MAG („small“ und „large“). Während der Oligodendrozyten-Entwicklung nimmt dieses Verhältnis zu. Zehn (P10) und 28 (P28) Tage alte FA2H-KO Tiere zeigten den erwarteten Anstieg der Menge an S-MAG und damit einen normalen S-MAG/L-MAG Quotient, der durch eine quantitative RT-PCR-Analyse gemessen wurde (siehe Abb. 3-12). Die PCR-Produkte der beiden Spleißformen von MAG haben eine Größe von 199 bp für S-MAG und von 154 bp für L-MAG.

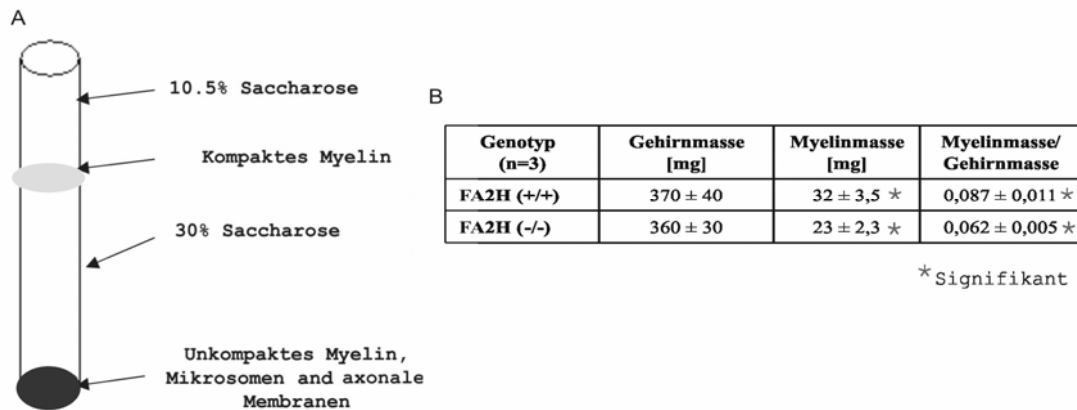


**Abb. 3-12 RT-PCR Analyse der myelinspezifischen Proteine L-MAG und S-MAG.**

Die Expressionsmengen an L-MAG bzw. S-MAG [langes (L) und kurzes (S) Myelin assoziiertes Glykoprotein] von zehn und 28 Tage alten Tieren (P10 und P28) wurden mittels RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung des Verhältnisses von S-MAG zu L-MAG mit Standardabweichung erfolgte über die Intensität der Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produkte von drei Tieren pro Genotyp, dessen Signale auf Aktin normiert wurden. Jeweils 2 µg RNA wurden in die RT-PCR eingesetzt, wovon 25% für die anschließende MAG-PCR verwendet wurden. +/+ = FA2H-WT; +/- = FA2H-HET; -/- = FA2H-KO.

### 3.2.1.4 Analyse des Myelins aus FA2H defizienten Tieren

Elektronenmikroskopische Ultrastrukturanalysen des Myelins des optischen Nervs und des Ischias Nervs von 4 Wochen und 5 Monate alten Tieren haben gezeigt, dass das Myelin der FA2H defizienten Tiere normal kompaktiert ist und auch die erwartete lineare Beziehung zwischen Axondurchmesser und Myelindicke aufweist (Zöller et al., 2008). Diese Resultate verdeutlichen, dass die FA2H-KO Tiere eine normale Myelinisierung sowie eine normale Aufrechterhaltung des Myelins besitzen. Als nächstes wurde das kompakte Myelin untersucht, das aus Mausgehirnen über eine Saccharose Gradientenzentrifugation isoliert wurde. Sowohl die Lipide (siehe 3.2.1.1) als auch die Proteine (3.2.1.2) wurden analysiert. Trotz der normalen Ultrastruktur des Myelins (siehe oben), wurde bei der Extraktion des Myelins festgestellt, dass die FA2H defizienten Mäuse ca. 25-30% weniger kompaktes Myelin, das in der Interphase (siehe Abb. 3-13) zwischen 10,5% und 30% Saccharose „schwebt“, besaßen als die WT-Kontrollen. Dieser Verlust an kompaktem Myelin konnte sowohl bei jungen (P24) als auch bei älteren Tieren (P70) beobachtet werden. Diese Resultate sprechen dafür, dass die FA2H defizienten Tiere trotz normaler Myelinisierung Veränderungen des Myelins aufweisen.

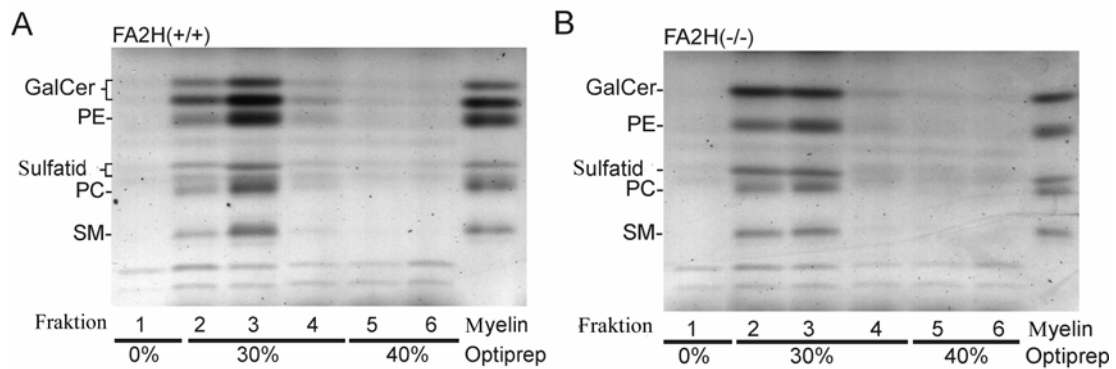


**Abb. 3-13 FA2H-KO Tiere besitzen weniger biochemisch isolierbares kompaktes Myelin im Gehirn.**

Abb. A zeigt eine schematische Darstellung des Saccharose-Gradienten zur Isolierung von Myelin. Aus der Interphase zwischen 10,5% und 30% Saccharose wurde das kompakte Myelin isoliert, dessen Trockengewicht nach Gefriertrocknung bestimmt wurde. Das Gehirngewicht ist als Nassgewicht angegeben. In Abb. B ist ein repräsentatives Ergebnis einer Myelin-Isolation von jeweils drei 70 Tage alten Tieren dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Ein Stern gibt einen statistisch signifikanten Unterschied an (t-Test,  $* = p < 0,05$ ).

Die Rolle und die Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung sind bis heute unklar, es wird jedoch vermutet, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe zur Stabilisierung der Myelinmembran beiträgt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden sogenannte „detergent resistant membranes“ (Membranmikrodomänen, die gegenüber einer Extraktion mit Detergenzien stabil sind, DRM) aus dem Myelin von zehn Wochen alten Tieren mit 20 mM CHAPS bei 4°C extrahiert, anschließend in einem Optiprep Dichtegradienten zentrifugiert und aus sechs Fraktionen des Gradienten die Lipide isoliert. Die Extraktion wurde auch bei höheren Temperaturen (RT und 37°C) wiederholt, um eine mögliche Destabilisierung der DRM ohne hydroxylierte Lipide bei physiologischen Temperaturen zu untersuchen.

Abb. 3-14 zeigt zwei repräsentative DCs der aufgereinigten Lipide nach einer Extraktion des Myelins bei 37°C und anschließender Gradientenzentrifugation. Es wird deutlich, dass die Myelinmembranen, unabhängig von der  $\alpha$ -Hydroxylierung, resistent gegenüber einer Extraktion mit CHAPS waren, so dass die Sphingolipide jeweils in den „DRM Fraktionen“ zwischen 0% und 30% Optiprep angereichert waren.



**Abb. 3-14 Nach Extraktion mit CHAPS befinden sich die Lipide unabhängig von der  $\alpha$ -Hydroxylierung in den Fraktionen der DRMs.**

Jeweils 0,5 mg aufgereinigtes Myelin von zehn Wochen alten WT (A) und KO (B) Mäusen wurde 30 min mit 20 mM CHAPS bei 37°C extrahiert und in einem diskontinuierlichen Optiprep Gradienten zentrifugiert. Jeweils sechs Fraktionen á 350  $\mu$ l wurden von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 6) vom Gradienten abgenommen. Aus 200  $\mu$ l jeder Fraktion wurden die Lipide isoliert und mittels DC (Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65:25:4) analysiert. In der letzten Bahn sind die Lipide aus Myelin zu erkennen, das nicht mit CHAPS behandelt wurde. GalCer = Galaktosylceramid; PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin.

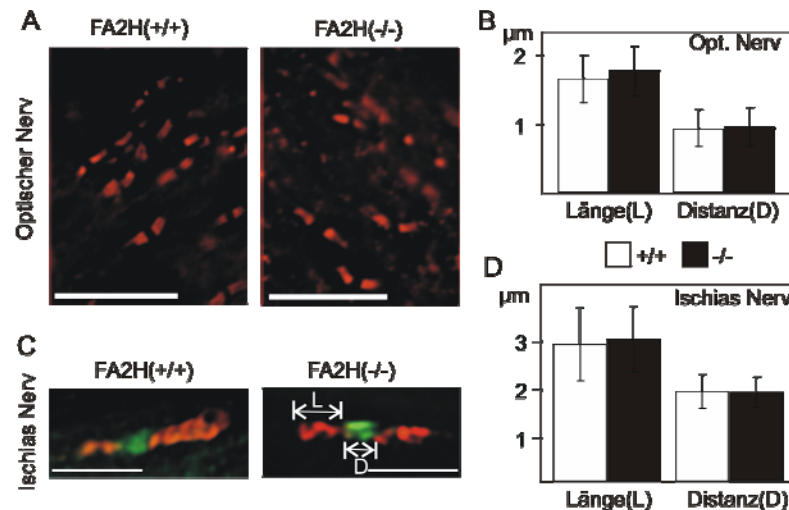
### 3.2.1.5 Strukturanalyse der paranodalen Region

Myelinisierte Axone besitzen nicht myelinisierte Bereiche, die Ranviersche Schnürringe genannt werden. Diese Bereiche sind entscheidend für die saltatorische Nervenweiterleitung entlang des Axons. Forschungen von Dupree et al., 1999 und von Ishibashi et al., 2002, haben gezeigt, dass die Lipide GalCer und Sulfatid wichtig sind für die Stabilisierung der paranodalen Region des Ranvierschen Schnürrings und damit für die Erregungsweiterleitung. In CGT-KO Mäusen, die kein GalCer und Sulfatid mehr besitzen, kann eine Misslokalisierung von Paranodin, das sich normalerweise auf beiden Seiten des Ranvierschen Schnürrings befindet, in den nodalen Bereich hinein, festgestellt werden. Auch die Verteilung der Kalium- bzw. Natriumkanäle ist bei diesen Mäusen verändert bzw. deren Anzahl reduziert (Dupree et al., 1999), was in einer verminderten Nervenleitgeschwindigkeit resultiert (Coetzee et al., 1996a).

Wie bereits erwähnt, zeigten FA2H-KO Mäuse eine veränderte Lipidzusammensetzung bezüglich der Hydroxylierung des Galaktosylceramids und des Sulfatids. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation und die Verteilung von Paranodin in Kryoschnitten vom optischen Nerv und in „Teased Fibers“ vom Ischias

Nerv in 6-7 Monate alten Mäusen untersucht. Es wurden sowohl die Länge als auch der Abstand zwischen zwei Paranodin-Hälften gemessen.

In Abb. 3-15 sind die Ergebnisse beispielhaft zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass weder beim optischen Nerv noch beim Ischias Nerv Unterschiede in der Länge und der Verteilung von Paranodin in den FA2H defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar sind. Außerdem ist auch kein Einfluss der FA2H Defizienz auf die Natriumkanäle zu sehen.



**Abb. 3-15 Paranodin-Färbung an Nerven der FA2H-KO Mäuse zeigte keine Veränderungen zu den WT-Kontrollen.**

Dargestellt sind Immunfluoreszenzanalysen und deren quantitative Auswertung. Abb. A zeigt längsgeschnittene Gefrierschnitte des optischen Nerven von ca. 6-7 Monate alten FA2H-WT und KO Mäusen, die mit einem Antikörper gegen Paranodin (1:1000) gefärbt wurden. Es wurden sowohl die Länge als auch die Distanz zwischen zwei Paranodin-Paaren gemessen und quantitativ ausgewertet. In Abb. B sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von insgesamt 20 ausgewerteten Paranodin-Paaren von drei Tieren pro Genotyp zu erkennen. In Abb. C sind die Paranodin-Färbung in rot und die Natriumkanal-Färbung (1:200) in grün an Teased Fibers des Ischias Nerven von Wildtyp und FA2H defizienten Mäusen zu sehen. Auch hier wurden für die quantitative Auswertung in Abb. D die Länge und die Distanz zwischen den Paranodin-Paaren von sieben Nervenfasern pro Genotyp gemessen, wobei erneut die Mittelwerte und die Standardabweichung dargestellt sind. Messbalken: 5 μm (A, C).

### 3.2.1.6 Verhaltenstests mit adulten Mäusen

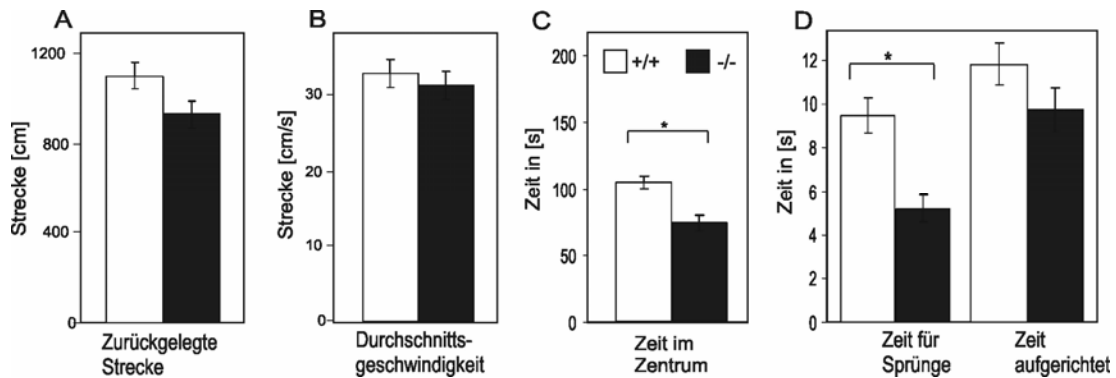
In anderen Knock-out Mausmodellen, die Veränderungen im Myelin zeigen, konnten Verhaltensdefizite beobachtet werden. Da die FA2H-KO Mäuse eine veränderte Lipidzusammensetzung aufwiesen, wurden mit diesen Mäusen ebenfalls Verhaltenstests durchgeführt, um mögliche neurologische Auswirkungen festzustellen.

Durch Rotarodversuche können Defizite der Balancefähigkeit sowie der Bewegungskoordination erfasst werden. Innerhalb eines festgelegten Zeitraums (von einer Minute) und einer definierten Geschwindigkeit wird die Häufigkeit gemessen, mit der ein Tier von der Walze fällt. Bei Mäusen, die signifikant häufiger von der Walze fallen, könnte ein Defizit der motorischen Fähigkeiten vorliegen, welcher möglicherweise auf einen neurologischen Defekt zurückgeführt werden kann. Mäuse, die direkt von der Walze runtersprangen, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Der Rotarod Test wurde mit je neun weiblichen 9 Monate alten Mäusen bei 12 und 18 rpm durchgeführt. Die FA2H Knock-out Tiere fielen genauso oft von der Walze wie die Kontrolltiere, so dass kein signifikanter Unterschied vorlag. Folgende Werte wurden gemessen: für die FA2H-KO bei 12 rpm  $4,57 \pm 2,19$  und bei 18 rpm  $2,86 \pm 1,64$  Fälle pro Minute, sowie bei den Kontroll-Mäusen  $6,2 \pm 2,4$  bzw.  $4,4 \pm 3,77$ . Der Standardfehler war bei diesen Messungen sehr hoch, da extreme Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren beobachtet werden konnten. Der Rotarod Test wurde mit 18 Monate alten Tieren wiederholt. Eine Auswertung war hier nicht möglich, da mehrere Tiere beider Genotypen sich nicht auf dem Rotarod halten konnten und sogar schon bei stehender Walze herunterfielen.

Als zweiter Verhaltenstest wurde der „Open Field Test“ durchgeführt. Hier wurde die Maus fünf Minuten in eine ihr unbekannte Box (ENV-515-16) gesetzt und ihre Aktivität und ihr Explorationsverhalten gemessen.

Beim Open Field Test, in dem 12 weibliche FA2H defiziente Mäuse und 16 weibliche Kontrolltiere im Alter von vier Monaten untersucht wurden, konnten signifikante Unterschiede im Verhalten der FA2H-KO Tiere im Vergleich zu den WT Mäusen beobachtet werden. Zwar war die zurückgelegte Strecke (Abb. 3-16 A) und die durchschnittliche Geschwindigkeit (Abb. 3-16 B) der FA2H-KO und WT Mäuse vergleichbar, jedoch waren zwischen den Genotypen deutliche Unterschiede in der Zeit, in der die Mäuse sprangen, zu verzeichnen (siehe Abb. 3-16 D). Dies kann neben dem Parameter, wie oft sich die Mäuse aufrichten, der in dieser Untersuchung keine Unterschiede zeigte, als Merkmal der „Explorationsfreude“ (van Meer & Raber, 2005) betrachtet werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen waren die FA2H-KO Mäuse ängstlicher und verbrachten deshalb signifikant weniger Zeit im Zentrum der Box als die Kontrollen (Abb. 3-16 C).



**Abb. 3-16 Open Field Box Verhaltenstest.**

Diese Abbildungen zeigen einen Teil der Ergebnisse des Open Field Box Tests der WT (weiße Balken) und der FA2H-KO (schwarze Balken) Tiere, die für 5 min in der Open Field Box beobachtet wurden. Es sind jeweils die Mittelwerte der Auswertung von 12 unabhängigen Experimenten pro Genotyp (n=12), mit dem Standardfehler (SEM), angegeben. Ein Stern signalisiert einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, \*= p < 0,05). +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO.

### 3.2.1.7 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit

Axone werden von einer Myelinschicht röhrenförmig umhüllt, um sie zu isolieren. Schädigungen dieser Schicht können in einer deutlichen Verlangsamung der Weiterleitung von Aktionspotentialen resultieren. Es wird vermutet, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung eine wichtige Rolle bei der saltatorischen Weiterleitung der Erregung spielt. Forschungen an Invertebraten, wie dem Salamander, der keine  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide besitzt, zeigen eine deutlich geringere Nervenleitgeschwindigkeit im Vergleich zu Tieren bei denen eine  $\alpha$ -Hydroxylierung nachgewiesen werden konnte (Kishimoto, 1986).

Da bei den FA2H defizienten Tieren die  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide fehlen, wurde bei diesen Mäusen untersucht, ob daraus eine verringerte saltatorische Erregungsweiterleitung im peripheren Nervensystem resultierte. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. R. Meyer (Physiologisches Institut, Universität Bonn) die Weiterleitung der Aktionspotentiale von isolierten Ischias Nerven von sechs Monate alten weiblichen FA2H-KO und WT Mäusen gemessen. Die Nervenleitgeschwindigkeit der FA2H defizienten Tiere war mit  $33,1 \pm 2,0$  m/s (n=22) nicht signifikant verringert im Vergleich zur Erregungsweiterleitung der Kontrolltiere mit  $34,4 \pm 2,9$  m/s (n=12).



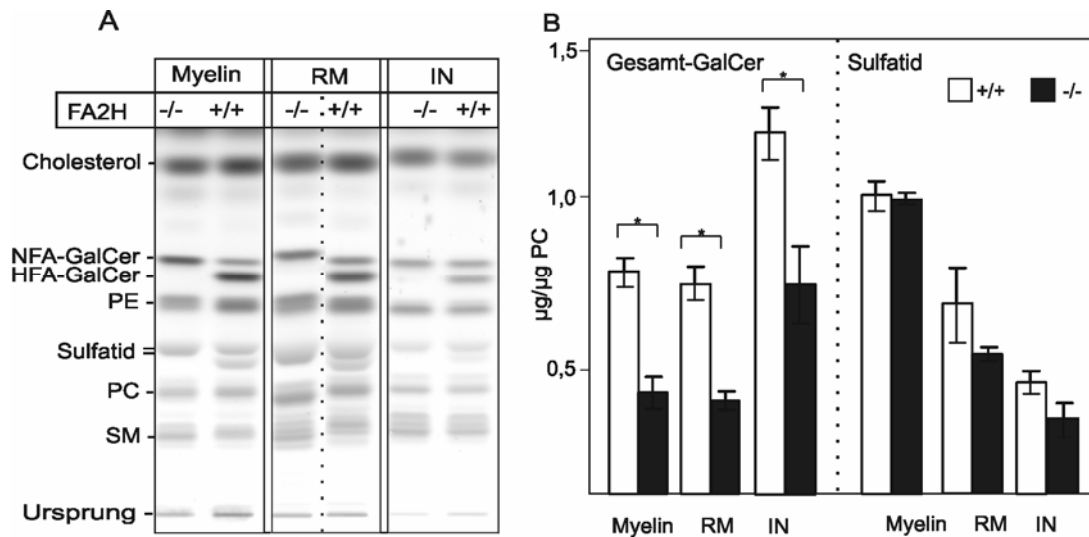
### ***3.2.2 Untersuchungen an alten FA2H defizienten Tieren***

Um mögliche Veränderungen und Beeinträchtigungen des Myelins in späteren Lebensphasen der Mäuse zu untersuchen, wurden die meisten zuvor beschriebenen Versuche mit alten FA2H defizienten Mäusen (20-24 Monate alt) wiederholt. Obwohl diese alten FA2H-KO Tiere keine erhöhte Sterblichkeitsrate im Vergleich zu den WT Mäusen zeigten, entwickelten sie häufiger eine Lähmung der hinteren Extremitäten, was möglicherweise für eine Demyelinisierung des Ischias Nerven sprechen könnte und nachfolgend z.B. mittels einer elektronenmikroskopischen Analyse (3.2.2.3) bzw. einer Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (3.2.2.7) untersucht wird.

#### ***3.2.2.1 Analyse der Sphingolipide im ZNS und PNS***

Erneut wurde zunächst der Einfluss einer FA2H Defizienz auf die Lipidzusammensetzung des Nervensystems untersucht, diesmal dienten Myelin sowie das Rückenmark als Beispiele für das zentrale Nervensystem und der Ischias Nerv als repräsentativer Teil des peripheren Nervensystems. Für die Analyse wurden jeweils zwei Wildtyp (WT) Tiere und eine heterozygote Maus (HET) als Kontrollen (nachfolgend der Vereinfachung halber als WT bezeichnet) und drei FA2H defiziente Mäuse im Alter von ca. 22 Monaten verwendet. Die isolierten Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und über eine auf der gleichen Platte aufgetragene Standardreihe quantifiziert. Wie schon zuvor bei den jungen Tieren, zeigte die Quantifizierung, dass die alten FA2H defizienten Mäuse in allen untersuchten Geweben kein  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid und  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid mehr besaßen, so dass die Gesamtmenge an GalCer in den FA2H Knock-out Tieren signifikant reduziert war (siehe Abb. 3-17). Jedoch war die Menge an nicht hydroxyliertem GalCer erhöht.

Die anderen Lipide waren weiterhin sowohl im zentralen Nervensystem als auch im peripheren Nervensystem nicht von der Ausschaltung der FA2H betroffen.

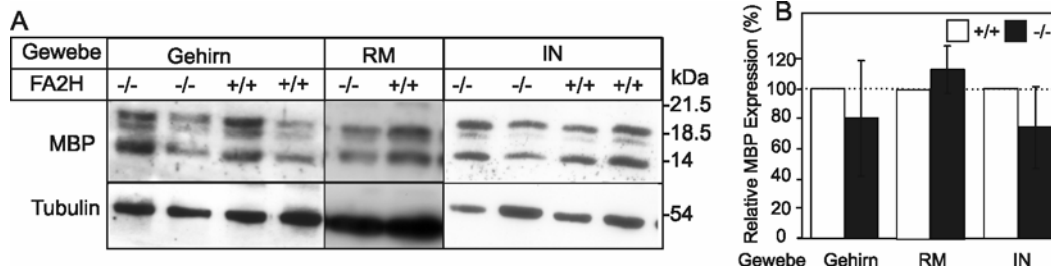


**Abb. 3-17 Unterschiede in der Zusammensetzung der Sphingolipide des zentralen und peripheren Nervensystems.**

Gesamtlipide aus Myelin, Rückenmark (RM) und Ischias Nerv (IN) von ca. 22 Monate alten Mäusen wurden isoliert und mittels HPTLC-Platten aufgetrennt. Abb. A stellt eine repräsentative Beispiel-DC (Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65:25:4) von insgesamt drei untersuchten Tieren pro Genotyp (n=3) dar, während die quantitative Auswertung in Abb. B zu sehen ist. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt; ein Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an (t-Test,  $* = p < 0,05$ ). +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO; NFA-GalCer = nicht hydroxyliertes Galaktosylceramid; HFA-GalCer =  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid; SM = Sphingomyelin; PC = Phosphatidylcholin; PE = Phosphatidylethanolamin.

### 3.2.2.2 Analyse des myelinspezifischen Proteins MBP im ZNS und PNS

Um mögliche Probleme bei der Aufrechterhaltung der Kompaktierung des Myelins bei alten FA2H-KO Tieren festzustellen, wurde der Einfluss einer FA2H Defizienz auf das Myelinprotein MBP untersucht. Dazu wurden Western Blot Analysen mit Proteinhomogenat-Proben des Gehirns, des Rückenmarks und des Ischias Nervs durchgeführt. Abb. 3-18 A zeigt exemplarische Blots der untersuchten Proben. In der dazugehörigen Quantifizierung (siehe Abb. 3-18 B) von jeweils drei Tieren pro Genotyp ist zu erkennen, dass auch bei den alten Tieren kein signifikanter Unterschied in der Menge an MBP in den FA2H-KO Tieren im Vergleich zur Kontrolle besteht. Tubulin diente der internen Kontrolle der gleichmäßigen Beladung und zur Normierung der Expressionssignale.



**Abb. 3-18 Vergleichbare Expression von MBP im ZNS und PNS.**

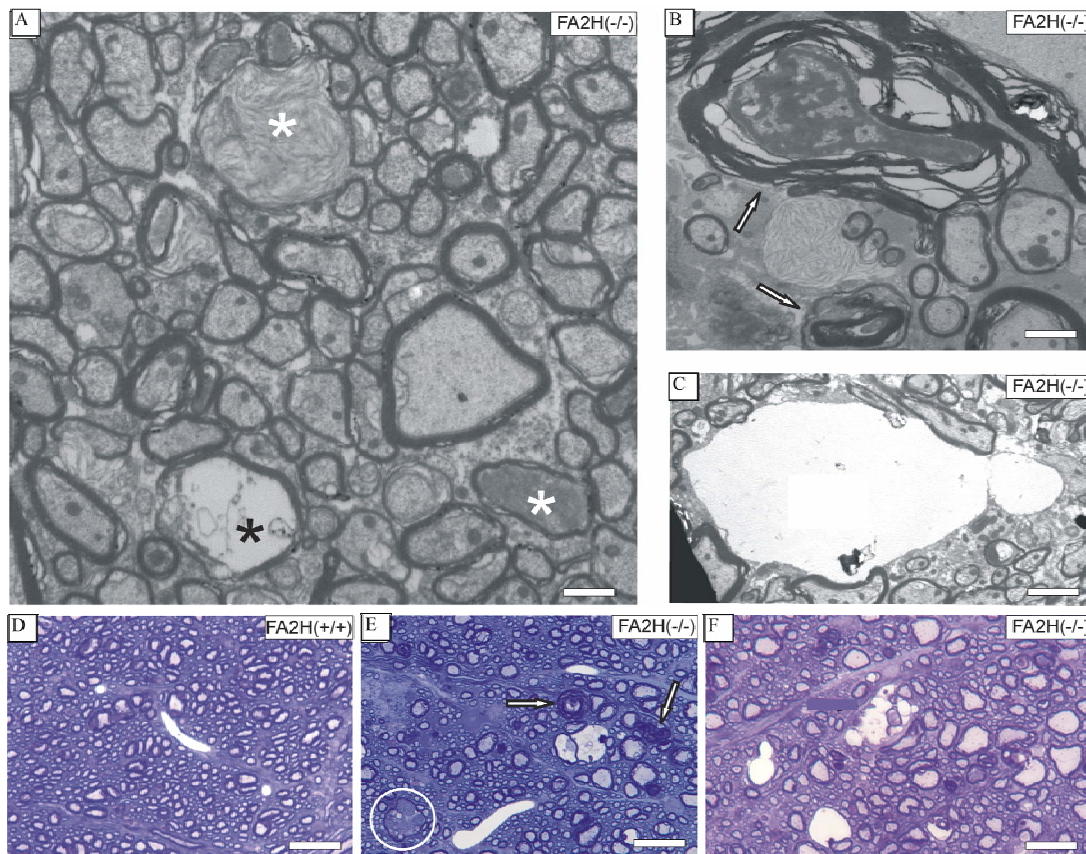
In Abb. A sind beispielhafte MBP-Western Blot Analysen des Gehirns, des Rückenmarks (RM) und des Ischias Nervis (IN) von ca. 22 Monate alten FA2H-WT und KO Tieren zu erkennen, die dazugehörige Quantifizierung von mindestens drei Tieren pro Genotyp mit Standardabweichung wird in Abb. B gezeigt. AK-Verdünnung: MBP: 1:5000; Tubulin: 1:3000. +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO.

### 3.2.2.3 Elektronenmikroskopische Analyse

Die ersten Untersuchungen der Ultrastruktur des Myelins der jungen FA2H defizienten Mäuse hatte zwar gezeigt, dass bei diesen Tieren eine normale Myelinbildung stattfand und dass die Aufrechterhaltung der Myelinstruktur zunächst gewährleistet war. In Forschungen mit anderen Mausmodellen, in denen ebenfalls myelinspezifische Gene, wie z.B. PLP (Griffiths et al., 1998) oder CNPase (Lappe-Siefke et al., 2003) ausgeschaltet waren, konnte beobachtet werden, dass diese Tiere mit zunehmenden Alter eine Demyelinisierung aufwiesen. Deshalb wurde das Myelin von 18 Monate alten Mäusen untersucht. Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. D. Hartmann (Anatomisches Institut, Universität Bonn) durchgeführt. Pro Genotyp wurden je drei Tiere untersucht.

In den meisten Bereichen des Gehirns konnte auch bei den alten FA2H-KO Tieren kein Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt werden, im oberen Bereich des Rückenmarks (verlängerter Hirnstamm/ Stammhirn) konnte jedoch eine beginnende Degenerierung der Myelinschicht und eine axonale Degeneration beobachtet werden (Pfeile in Abb. 3-19 B und E). In diesem Bereich kam es zur Akkumulation von fibrillärem Material (schwarzer Stern in Abb. 3-19 A, weißer Kreis in Abb. 3-19 E), das teilweise die zerstörten Axone ersetzte, aber weder mit einer Alzian-Blau-Färbung noch mit einer spezifischen Lipid-Färbung angefärbt werden konnte (Abb. 3-19 D-F). Desweiteren konnten vakuolen-ähnliche, mikrozystische Aussparungen (weiße Sterne in Abb. 3-19 A, ebenso wie Abb. 3-19 C) im Stammhirn der FA2H Knock-out Mäuse nachgewiesen werden. Erste histologische

Luxol-Fast-Blue-Färbungen (zum Anfärben von Myelin) an Paraffinschnitten des Rückenmarks von ca. 22 Monate alten FA2H defizienten Mäusen konnten ebenfalls eine Degeneration der Myelinschicht des Rückenmarks nachweisen (nicht gezeigte Resultate).

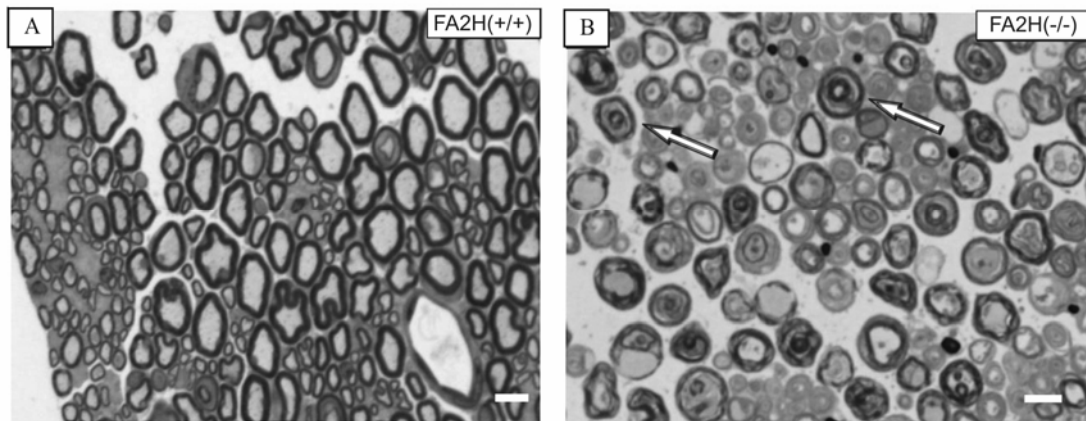


**Abb. 3-19 Elektronenmikroskopische Analyse des zentralen Nervensystems.**

Die hier abgebildeten Bilder und die histologischen Analysen wurden von Herrn Prof. Dr. D. Hartmann, Anatomisches Institut, Universität Bonn, angefertigt. Abb. A-C zeigen Querschnitte des verlängerten Hirnstamms von 18 Monate alten FA2H defizienten Mäusen. Die Abb. D-F repräsentieren eine Alzian-Blau-Färbung des Rückenmarks von 18 Monate alten FA2H-WT und KO Tieren. Die Pfeile in B und E weisen auf eine degenerierte Myelinschicht und eine axonale Degeneration hin, während der schwarze Stern in A sowie der weiße Kreis in E die Akkumulation von fibrillärem Material widerspiegeln. Die vakuolen-ähnliche, mikrozystischen Aussparungen sind in A mit einem weißen Stern gekennzeichnet bzw. in C vergrößert zu sehen. +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO; Messbalken: 0,5  $\mu\text{m}$  (A, B), 210  $\mu\text{m}$  (C), 20  $\mu\text{m}$  (A), 10  $\mu\text{m}$  (D, F).

Die ebenfalls von Herrn Prof. Dr. Hartmann durchgeführten Analysen der Ischias Nerven von 18 Monate alten Tieren mittels Toluidin-Blau-Färbung, zeigte, neben der verringerten Anfärbbarkeit der Nerven der FA2H-KO Mäuse, eine massive Degeneration der Myelinschicht (Pfeile in Abb. 3-20 B). Dieses Ergebnis stand im Einklang mit der Beobachtung, dass alte FA2H defiziente Tiere oft Lähmungen an

den hinteren Extremitäten aufwies und wurde von den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt (nicht gezeigte Daten).



**Abb. 3-20 Toluidin-Blau-Färbung des peripheren Nervensystems.**

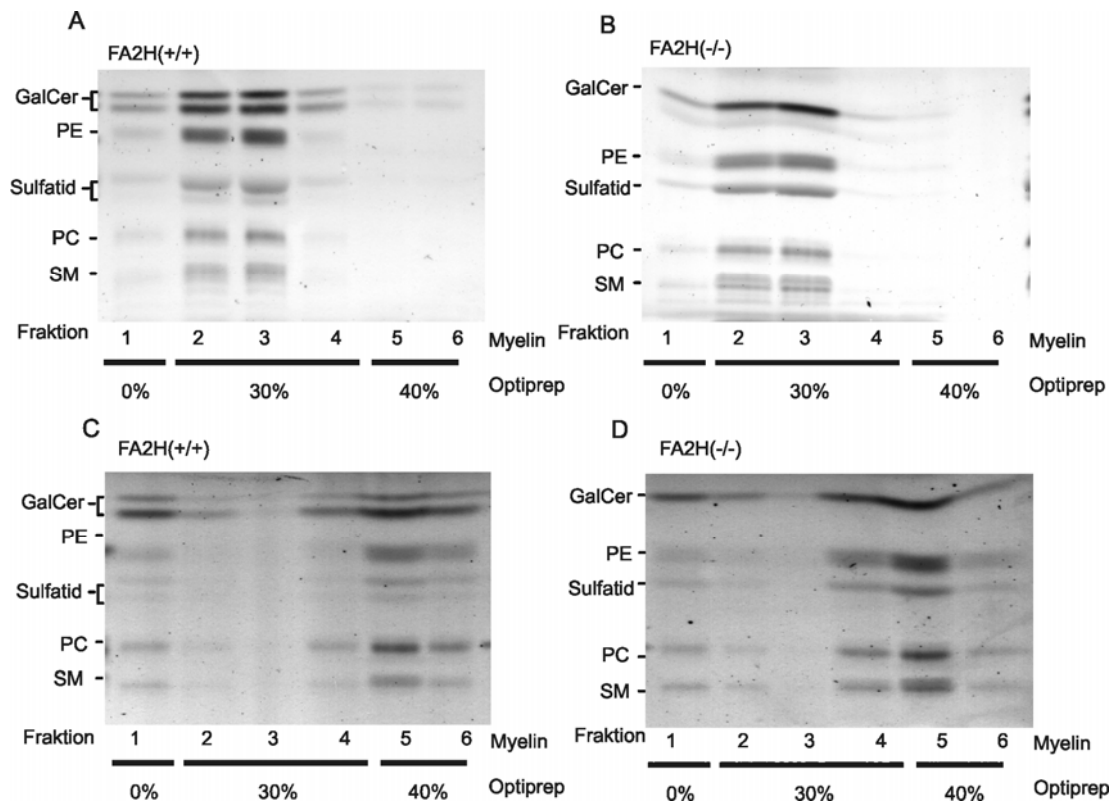
Dargestellt ist eine Toluidin-Blau-Färbung des Ischias Nervs von 18 Monate alten FA2H-WT (A) und KO (B) Mäusen. Die weißen Pfeile weisen auf degenerierte Myelinlamellen sowie auf eine axonale Degeneration hin. +/- = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO; Messbalken: 5  $\mu$ m. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. D. Hartmann erstellt.

#### **3.2.2.4 Analyse des Myelins**

Die beginnende Dekompaktierung des Myelins der alten FA2H defizienten Tiere wies darauf hin, dass diese Mäuse Probleme mit der Aufrechterhaltung der normalen Myelinstruktur hatten. Deshalb wurde das kompakte Myelin aus jeweils drei Mausgehirnen pro Genotyp über eine Saccharose Gradientenzentrifugation isoliert. Überraschenderweise besaßen die alten FA2H-KO Tiere, wie bereits zuvor die jungen Tiere, auch nur 25-30% weniger kompaktes Myelin im Vergleich zum WT, obwohl aufgrund der in der ultrastrukturellen Analyse gezeigten Dekompaktierung mit einem größeren Verlust an kompaktem Myelin hätte gerechnet werden können.

Die Untersuchungen bezüglich der Stabilisierung der Myelinmembran durch die  $\alpha$ -Hydroxylierung mittels Extraktion der Detergenzien unlöslichen Membran-Mikrodomänen (DRM) bei 37°C und anschließender Zentrifugation in einem Optiprep Dichtegradienten, konnten keine Unterschiede zwischen den FA2H defizienten Tieren und den Kontrollen nachweisen. Nach der Extraktion mit CHAPS (Abb. 3-21 A u. B) waren die meisten Lipide beider Genotypen in den Fraktionen der DRMs zu finden, während die Extraktion mit Triton X-100 (Abb.3-21 C u. D) die DRMs instabilisierte, so dass die Lipide unabhängig vom Genotyp sowohl in der

ersten Fraktion als auch in den Fraktionen vier und fünf angereichert waren. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-21 dargestellt.



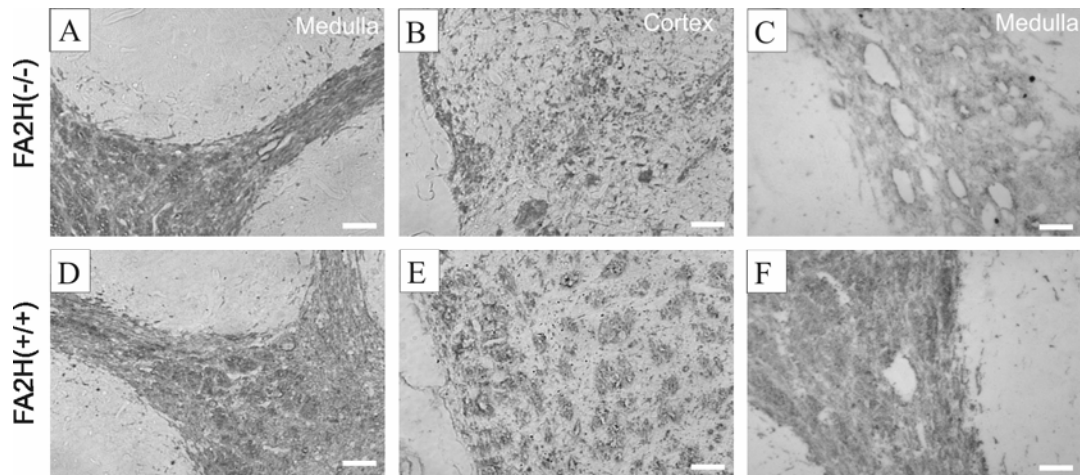
**Abb. 3-21 Extraktion der DRMs ergab auch bei den alten Tieren keine Unterschiede zwischen WT und KO.**

Jeweils 0,5 mg aufgereinigtes Myelin von 22 Monate alten FA2H-WT (A u. C) und KO (B u. D) Mäusen wurde mit 20 mM CHAPS (A u. B) bzw. 20 mM Triton X-100 (C u. D) bei 37°C extrahiert und anschließend im Optiprep-Gradienten abzentrifugiert. Aus den sechs Fraktionen des Gradienten (1 oben; 6 unten) wurden die Lipide isoliert und auf eine DC (Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65:25:4) aufgetragen. GalCer = Galaktosylceramid; PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin.

### 3.2.2.5 Analyse der neuronalen Degeneration

Untersuchungen an anderen Mausmodellen zeigen, dass eine späte Demyelinisierung oft mit einem Anschwellen der Axone, hervorgerufen durch eine Akkumulation von Organellen, verbunden ist (Griffiths et al., 1998; Edgar et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die FA2H defizienten Mäuse ebenfalls Beeinträchtigungen im axonalen Transport aufwiesen, wurden immunhistochemische Färbungen an Gehirn-Paraffinschnitten von 18 Monate alten Mäusen mit einem Antikörper gegen das Amyloid Precursor Protein (APP) durchgeführt. Abb. 3-22 zeigt, dass bei den FA2H-KO Mäusen keine Schwellung der Axone bzw. keine Akkumulation von Material

beobachtet werden konnte. Die Auswertung von vergleichbaren Regionen des Gehirns (Medulla des Kleinhirns und Cortex des Großhirns) ergab, dass die APP-Färbungen der Mäuse ohne FA2H vergleichbar waren mit der Färbung der Kontrollen. Immunfluoreszenzanalysen konnten ebenfalls keine Unterschiede in der APP-Färbung zwischen den beiden Genotypen nachweisen. Dies deutet daraufhin, dass die späte Demyelinisierung bei den alten FA2H defizienten Tieren nicht mit einer Beeinträchtigung des axonalen Transports verbunden ist.



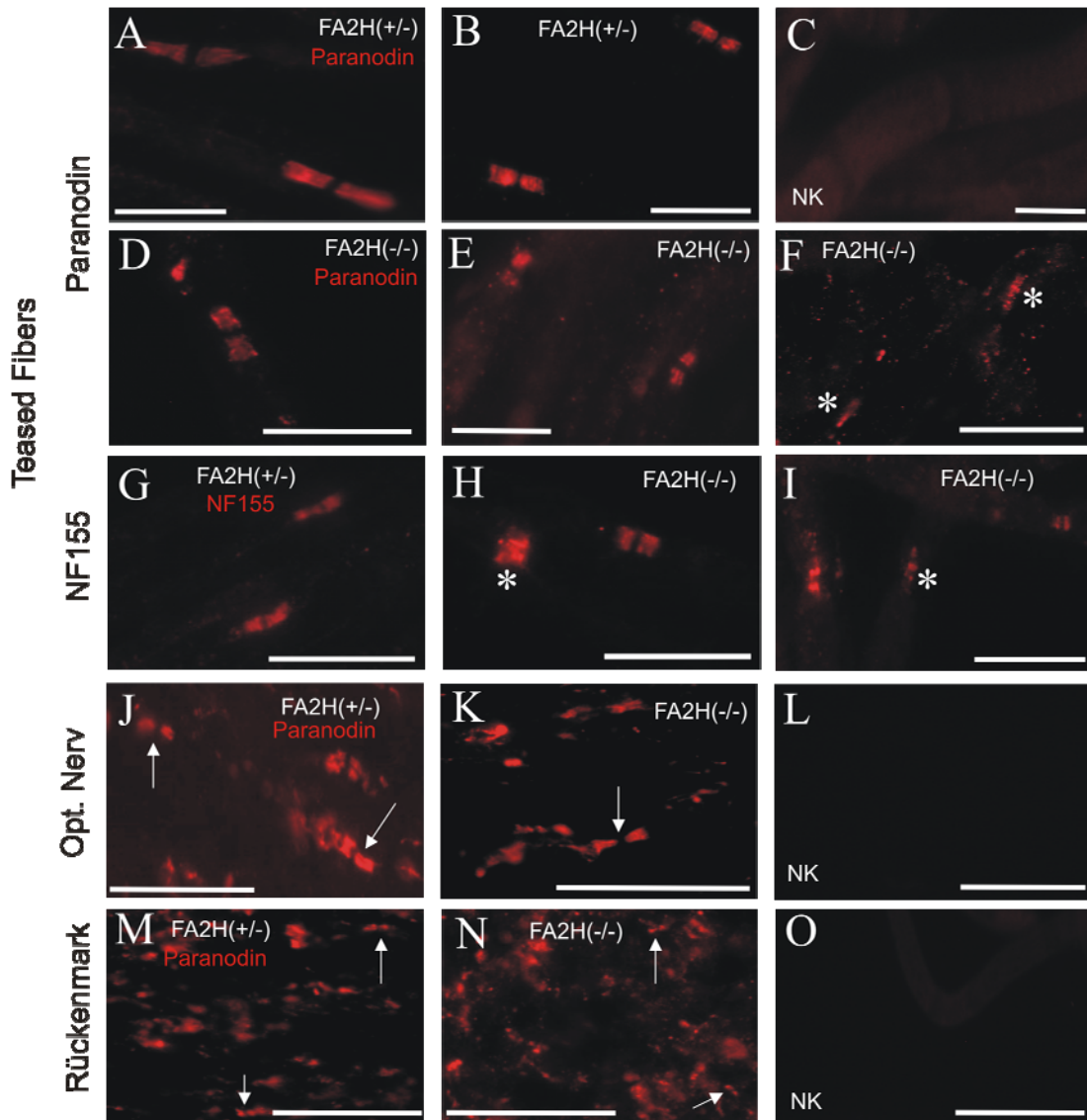
**Abb. 3-22 Immunhistochemische Untersuchung des Amyloid Precursor Proteins.**

Dargestellt ist eine repräsentative immunhistochemische Analyse an längsgeschnittenen Paraffinschnitten des Gehirns von 18 Monate alten FA2H-KO (A-C) und WT (D-F) Mäusen, die mit einem Antikörper gegen das Amyloid Precursor Protein (1:500) gefärbt wurden. Es sind vergleichbare Bereiche des Gehirns gezeigt; in Abb. A, C, D und E sind die Faserstränge der weißen Substanz (Medulla) des Kleinhirns (Cerebellum) zu sehen, während die Abb. B und F einen Teil des Cortex des Großhirns darstellen. Es fällt auf, dass die FA2H defizienten Tiere mehr vakuolen-ähnliche, mikrozystische Aussparungen besitzen. Diese Untersuchungen wurden an drei Tieren pro Genotyp durchgeführt. Messbalken: 50  $\mu\text{m}$  (A, B, D und E); 25  $\mu\text{m}$  (C und F).

### 3.2.2.6 Untersuchung der paranodalen Region

Die Untersuchung der Ultrastruktur des Myelins und des Ischias Nervs von alten Tieren ohne FA2H hatte gezeigt, dass hier eine verstärkte Demyelinisierung sowie eine Dekompaktierung des Myelins vorliegen. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob dies auch Auswirkungen auf die Stabilität der paranodalen Region der Ranvierschen Schnürringe hat. Dazu wurden Paranodin-Immunfärbungen mit je drei auseinander gezogenen Ischias Nerven (Teased Fibers) pro Genotyp durchgeführt.





### Abb. 3-23 Immunfluoreszenz der paranodalen Region.

Gezeigt werden Teased Fibers des Ischias Nervs (A-I) sowie längsgeschnittene Gefrierschnitte des optischen Nervs (J-L) und des Rückenmarks (M-O) von 22-24 Monate alten FA2H(+/-) (FA2H-HET) und FA2H(-/-) (FA2H-KO) Mäusen, die mit einem Antikörper gegen Paranodin (A-E; J-O) (1:1000) oder gegen NF155 (G-I) (1:500) gefärbt wurden.

Ischias Nerv - Paranodin: A und B zeigen die Ergebnisse von zwei FA2H-HET Tieren, während in D-E die Resultate von drei untersuchten FA2H-KO Mäusen zu erkennen sind. Die Sterne kennzeichnen Beispiele einer diffusen Paranodin-Färbung.

Ischias Nerv - NF155: in G ist die Immunfärbung eines FA2H-HET Tieres mit dem NF155-AK dargestellt; wohingegen H und I die Untersuchung von zwei FA2H-KO Tieren zeigen. Die Sterne weisen auf eine unregelmäßige Färbung hin.

Optischer Nerv: In J ist die Färbung des heterozygoten Tieres und in K die Analyse der FA2H defizienten Maus zu sehen.

Rückenmark: In M ist die Untersuchung einer FA2H-HET Maus dargestellt, Abb. N repräsentiert die Paranodin-Färbung des FA2H defizienten Tieres.

Die Abb. C, L und O zeigen die jeweilige Negativkontrolle (NK); d.h. die Färbung mit dem Zweitantikörper. Die Pfeile weisen jeweils auf ein Paranodin-Paar hin. Messbalken: 25 µm.



Diese Analyse lieferte ein eher heterogenes Resultat, wie in Abb. 3-23 A-F zu erkennen ist. Zwei der untersuchten FA2H defizienten Tiere zeigten eine normale Struktur und Verteilung der paranodalen Region, wie auch die heterozygoten Kontrollen. Ein weiteres Knock-out Tier wies bei einigen Fasern eine deutlich diffuse Paranodin-Färbung auf (weißer Stern in Abb. 3-23 F), wohingegen andere Axone normal ausgebildet waren. Die Verteilung von NF 155, ein weiteres Protein der paranodalen Region, war in den FA2H-KO Mäusen ebenfalls bei manchen Fasern verändert (weiße Sterne in Abb. 3-23 H u. I). Somit ist eine Beeinträchtigung der paranodalen Region der Mäuse ohne FA2H wahrscheinlich. Möglicherweise zeigten nicht alle alten FA2H defizienten Tiere eine Misslokalisierung von Paranodin, da die Demyelinisierung der Ischias Nerven der verschiedenen Mäuse unterschiedlich stark vorangeschritten war. Hierfür spricht die Tatsache, dass nicht alle alten Tiere gelähmte Hinterläufe aufwiesen.

Die weiterhin gemessene Länge und der Abstand zwischen zwei Paranodin-Hälften (Daten nicht gezeigt) waren bei den alten FA2H-KO Tieren nicht signifikant unterschiedlich, im Vergleich zu den heterozygoten Kontrollen.

Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Verteilung von Paranodin im optischen Nerv oder im Rückenmark konnten keine Veränderungen der alten FA2H-KO Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren aufzeigen (siehe Abb. 3-23 J-O) und sprechen dafür, dass die paranodale Region im zentralen Nervensystem der FA2H defizienten Tiere nicht beeinträchtigt ist.

### ***3.2.2.7 Messung der Nervenleitgeschwindigkeit***

Um festzustellen, ob die fortschreitende Demyelinisierung der Ischias Nerven der alten FA2H defizienten Mäuse sich auf die Erregungsweiterleitung auswirkt, wurde die Nervenleitgeschwindigkeit an isolierten Ischias Nerven von 20-24 Monate alten Mäusen gemessen. Die Messung der insgesamt zehn FA2H-KO Mäuse und der Kontrolltiere wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. R. Meyer (Physiologisches Institut, Universität Bonn) durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen konnte kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Erregungsweiterleitung zwischen FA2H defizienten Mäusen und den Kontrollen ermittelt werden.

### **3.3 Biochemische Charakterisierung der FA2H/CGT-Doppel-KO Tiere**

CGT-KO Mäuse, bei denen die Galaktosyltransferase (CGT) ausgeschaltet wurde, können kein Galaktosylceramid und kein Sulfatid mehr bilden. Vermutlich wurde der Verlust dieser Sphingolipide durch die Bildung von fast ausschließlich  $\alpha$ -hydroxyliertem Glukosylceramid kompensiert (Coetzee et al., 1996a). Dadurch können die CGT defizienten Mäuse zwar noch myelinisierte Axone bilden, aber die Myelinschicht ist insgesamt dünner und auch die paranodale Region weist Schädigungen auf (Bosio et al., 1996b; Dupree et al., 1998a). Diese Mäuse ohne Galaktosyltransferase entwickeln aufgrund ihrer progressiven Demyelinisierung verschiedene motorische Auffälligkeiten, wie eine Art Körpertremor und sterben ca. 4-6 Wochen nach der Geburt.

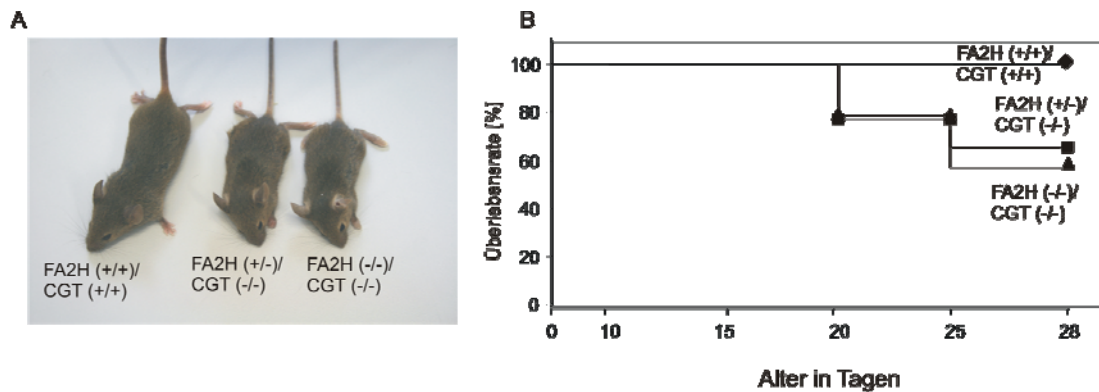
Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine zusätzliche Defizienz der FA2H auf diese CGT defizienten Tiere hat, wurden FA2H-CGT-Doppel-KO Mäuse durch Kreuzung der heterozygoten Einzel-KO miteinander generiert. Dabei konnten folgende neun Genotypen entstehen: FA2H(+/+)/CGT(+/+); FA2H(+/+)/CGT(+/-); FA2H(+/+)/CGT(-/-); FA2H(+/-)/CGT(+/+); FA2H(+/-)/CGT(+/-); FA2H(+/-)/CGT(-/-); FA2H(-/-)/CGT(+/+); FA2H(-/-)/CGT(+/-) und FA2H(-/-)/CGT(-/-).

Die meisten Untersuchungen wurden mit den folgenden vier Genotypen durchgeführt: FA2H(+/+)/CGT(+/+), FA2H(+/-)/CGT(-/-), FA2H(-/-)/CGT(+/+) und FA2H(-/-)/CGT(-/-), wobei FA2H(+/-)/CGT(-/-) Tiere anstelle der FA2H(+/+)/CGT(-/-) Mäuse analysiert wurden, da beide den gleichen Phänotyp besaßen und auch die ersten Lipidanalysen keine Unterschiede zeigten.

In der äußeren Erscheinung gab es auf den ersten Blick keine Unterschiede zwischen den CGT-KO Tieren und den FA2H(-/-)/CGT(-/-) Tieren (siehe Abb. 3-24 A). Auch die Doppel-KO Mäuse entwickelten zum Beginn der Myelinisierung (P12-14) den erwähnten Körpertremor und starben ca. 4-6 Wochen nach der Geburt. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit vier Wochen alten Tieren durchgeführt. Die ältesten Doppel-KO Tiere überlebten ca. 10 Wochen.

Abb. 3-24 B zeigt die Sterblichkeitsrate der WT, der FA2H(+/-)/CGT(-/-) und der FA2H(-/-)/CGT(-/-) Tiere bis zum Alter von vier Wochen (P28). Es ist zu erkennen, dass die Letalitätsrate der FA2H(-/-)/CGT(-/-) Tiere und der CGT-KO Mäuse im Vergleich zu den WT Tieren erhöht war. Die Viabilitätsrate der FA2H(-/-)/CGT(-/-)

und der FA2H(+/-)/CGT(-/-) Tiere war miteinander vergleichbar, ca. 60-65% der Mäuse überlebten die ersten 28 Tage.



**Abb. 3-24 Aussehen und Viabilität der FA2H/CGT-KO Mäuse.**

In Abb. A ist eine WT Maus im Vergleich zu einem FA2H(+/-)/CGT(-/-) und einem FA2H(-)/CGT(-/-) Tier zu erkennen. Abb. B zeigt eine graphische Darstellung der Überlebensrate der Doppel-KO, der CGT-KO und der WT Maus.  $\blacklozenge$  = FA2H(+)/CGT(+);  $\blacksquare$  = FA2H(+/-)/CGT(-/-);  $\blacktriangle$  = FA2H(-)/CGT(-/-); zehn Tiere pro Genotyp wurden ausgewertet (n=10).

### 3.3.1 Extraktion des Myelins aus FA2H/CGT Mäusen

Untersuchungen an den CGT-KO Mäusen haben gezeigt, dass diese Tiere weniger Myelin besitzen als ihre Wildtyp Geschwister, auch alte FA2H-KO Tiere weisen eine beginnende Demyelinisierung auf. Um herauszufinden, ob die Doppel-KO Tiere noch weniger Myelin besitzen als die jeweiligen Einzel-KO Mäuse, wurde eine Saccharose Gradientenzentrifugation durchgeführt, mit der das kompakte Myelin aus dem Gehirn von jeweils drei 4 Wochen alten Mäusen isoliert wurde. In Tabelle 2 sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei untersuchten Tieren pro Genotyp dargestellt.

**Tabelle 2: Myelinmengen der vier verschiedenen Hauptgenotypen**

Genotyp (n=3)	Gehirnmasse [mg]	Myelinmasse [mg]	Myelinmasse/Gehirnmasse
FA2H(+)/CGT(+)	210 ± 20	4,2 ± 0,3	0,020 ± 0,005
FA2H(-)/CGT(+)	200 ± 20	3,2 ± 0,4	0,016 ± 0,002
FA2H(+/-)/CGT(-)	190 ± 0	2,5 ± 0,2	0,013 ± 0,001
FA2H(-)/CGT(-)	180 ± 20	2,1 ± 0,2	0,012 ± 0,001

Es ist zu erkennen, dass die FA2H-KO Tiere wie erwartet ca. 25% weniger Myelin besaßen als die WT Tiere, während der Verlust des Myelins bei den CGT-KO ca. 40% und bei den Doppel-KO Mäusen ca. 50% betrug und somit signifikant im Vergleich zum WT war.

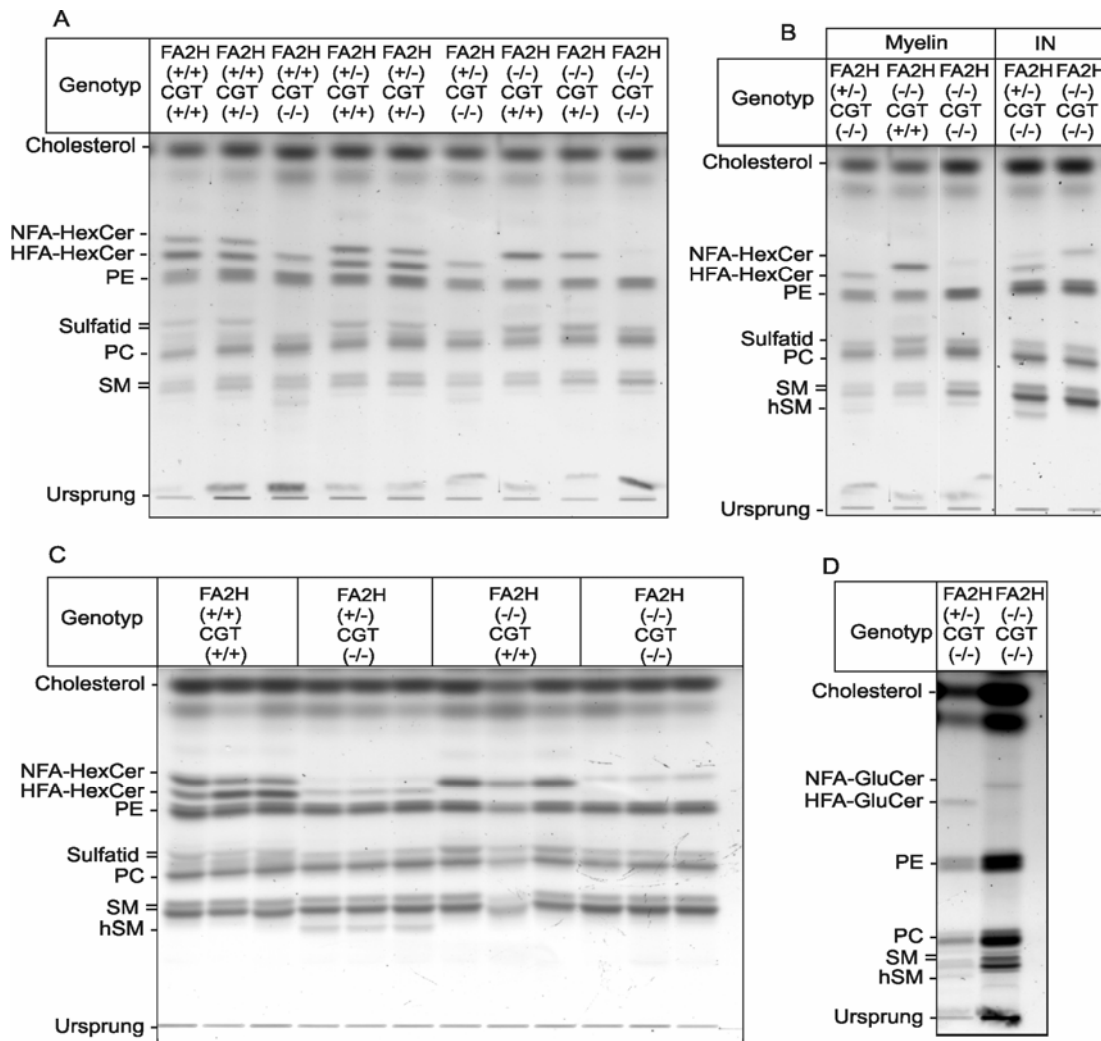
### ***3.3.2 Analyse der Sphingolipide im ZNS und PNS***

In CGT defizienten Mäusen, die kein GalCer und Sulfatid mehr bilden können, wird die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer vermutlich kompensatorisch hochreguliert. Mäuse, in denen die FA2H deletiert wurde, können keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide mehr synthetisieren. Deshalb sollten FA2H(-)/CGT(-) Tiere kein  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer mehr besitzen. Um dies zu analysieren, wurden die Lipide aus dem Myelin von vier Wochen alten Mäusen untersucht. Abb. 3-25 A zeigt eine exemplarische Dünnschichtchromatographie aller neun Genotypen. Es werden Unterschiede deutlich, z.B. fehlten bei den FA2H-KO Tieren die Banden auf Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten GalCers und des Sulfatids. Die FA2H(+)/CGT(-) Tiere synthetisierten, wie erwartet, weder GalCer noch Sulfatid, sondern nur noch  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer und hydroxyliertes Sphingomyelin, während es den Anschein hatte, dass die FA2H(-)/CGT(-) Tiere weder  $\alpha$ -hydroxyliertes noch nicht hydroxyliertes GlcCer bildeten, dafür aber mehr Sphingomyelin besaßen.

Als repräsentativer Teil des peripheren Nervensystems wurden die Lipide des Ischias Nervs von vier Wochen alten Mäusen untersucht. Erneut waren deutliche Unterschiede zwischen den vier Hauptgenotypen zu erkennen. Bei den CGT-KO Tieren zeigte sich die erwartete  $\alpha$ -hydroxylierte GlcCer Bande, während die FA2H(-)/CGT(-) Mäuse eine Bande auf Höhe des nicht hydroxylierten GlcCer besaßen (siehe Abb. 3-25 C).

Um zu überprüfen, ob die Doppel-KO Tiere nicht hydroxyliertes GlcCer auch im zentralen Nervensystem bildeten, wurde die Auftragsmenge der Sphingolipide aus dem Myelin um das sechsfache erhöht. Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, wie aus Abb. 3-25 D hervorgeht, dass die Doppel-KO Mäuse auch im ZNS nicht hydroxyliertes GlcCer besaßen. Es wurden ca. 30% der isolierten Lipide der FA2H(-)/CGT(-) Tiere und ca. 10% der Lipide der FA2H(+)/CGT(-) Mäuse aufgetragen, um die Menge an nicht hydroxyliertem GlcCer der Doppel-KO Tiere im

Vergleich zur Konzentration des  $\alpha$ -hydroxylierten GlcCers in den CGT-KO Mäusen zu bestimmen (siehe Quantifizierung Abb. 3-36). In Abb. 3-25 B ist der Unterschied in der Menge an nicht hydroxyliertem GlcCer im ZNS (Myelin) im Vergleich zum PNS (Ischias Nerv) der FA2H(-)/CGT(-) Mäuse zu erkennen.



**Abb. 3-25 Lipidanalysen des ZNS und PNS von vier Wochen alten Mäusen.**

A: Gesamtlipide aus dem Myelin aller neun Genotypen; aufgetragen sind ca. 15  $\mu$ l (5% der isolierten Lipide).

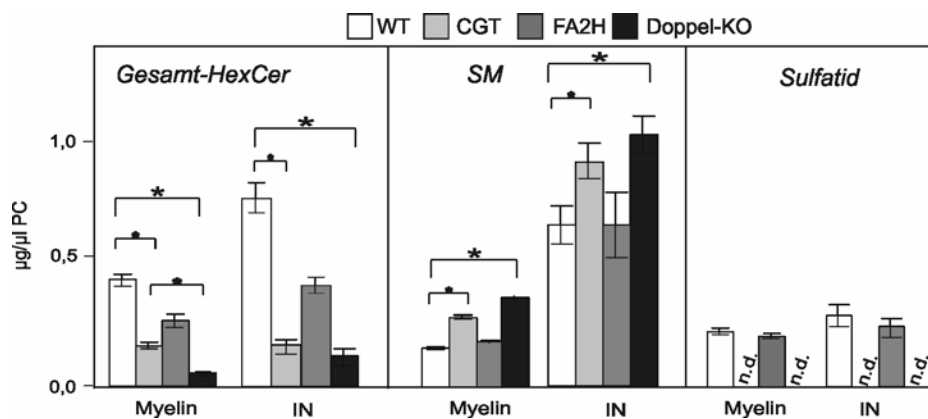
B: Gesamtlipide aus dem Myelin und dem Ischias Nerv (IN) im Vergleich. Es wurden vergleichbare Mengen/Prozentsätze aufgetragen.

C: Gesamtlipide aus dem Ischias Nerv der vier Hauptgenotypen.

D: Gesamtlipide aus dem Myelin; für die CGT-KO Tiere wurden ca. 30  $\mu$ l und für die Doppel-KO Mäuse ca. 100  $\mu$ l (10% bzw. 30% der isolierten Lipide) aufgetragen.

Laufmittel: Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65:25:4; NFA-HexCer = nicht hydroxyliertes Hexosylceramid (Galaktosyl- oder Glukosylceramid); HFA-HexCer =  $\alpha$ -hydroxyliertes Hexosylceramid; NFA-GlcCer = nicht hydroxyliertes Glukosylceramid; HFA-GlcCer =  $\alpha$ -hydroxyliertes Glukosylceramid; PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin; hSM = hydroxyliertes Sphingomyelin.

Sowohl für das ZNS als auch für das PNS wurde eine quantitative Auswertung der Lipidanalyse der vier Hauptgenotypen durchgeführt. Die Menge an nicht hydroxyliertem GlcCer betrug im Myelin ca. 15% des  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCers der CGT-KO Mäuse und im Ischias Nerv ca. 70%, dementsprechend war die Menge des Gesamt-Hexosylceramids in den Doppel-KO Mäusen signifikant reduziert (Abb. 3-26). Beide Genotypen konnten kein Sulfatid mehr bilden. Sowohl in den CGT-KO Tieren als auch in den FA2H (-)/CGT (-) Mäusen war die Menge an Sphingomyelin signifikant erhöht, was bei der CGT-KO auf die Bildung des hydroxylierten Derivats zurückgeführt werden konnte. Die Menge der anderen Lipide war nicht verändert (siehe Abb. 3-25).



**Abb. 3-26 Quantifizierung der Lipide aus Myelin und Ischias Nerv (IN).**

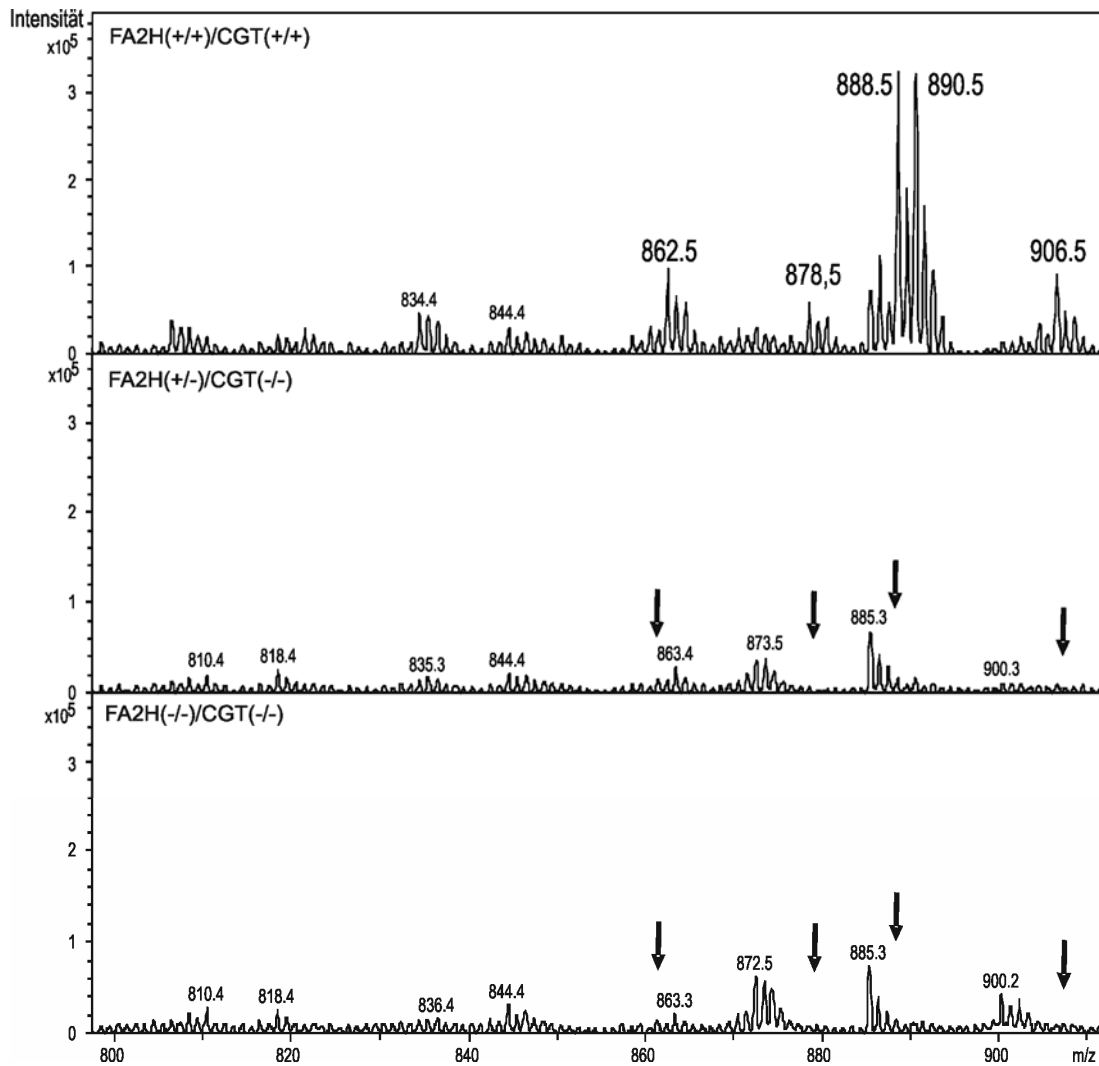
Zu sehen ist die quantitative Auswertung der Lipidanalyse der vier Hauptgenotypen WT = FA2H(+)/CGT(+); CGT = FA2H(+)/CGT(-); FA2H = FA2H(-)/CGT(+); Doppel-KO = FA2H(-)/CGT(-) von 28 Tage alten Mäusen (n=3). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung bezogen auf  $\mu\text{g PC}$ ; ein Stern gibt einen signifikanten Unterschied an (t-Test,  $*=p < 0,05$ ). Gesamt-HexCer = hydroxyliertes und nicht hydroxyliertes Hexosylceramid (GalCer oder GlcCer); SM = Sphingomyelin; PC Phosphatidylcholin; n.d. = nicht detektierbar.

Um zu bestätigen, dass CGT-KO und FA2H(-)/CGT(-) Mäuse weder GalCer noch Sulfatid, dafür aber  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer, bzw. das nicht hydroxylierte Derivat bilden, wurden massenspektrometrische Untersuchungen mittels einer ESI-Ionenfalle und einem MALDI-TOF Massenspektrometer durchgeführt. Die erwarteten Massen der Sphingolipide in den Mäusen unterschiedlichen Genotyps können aus Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3: Erwartete Massen der Sphingolipide in den Mäusen unterschiedlichen Genotyps**

				<b>FA2H (+/-)/ CGT(+/-)</b>	<b>FA2H (+/-)/ CGT(-/-)</b>	<b>FA2H (-/-)/ CGT(-/-)</b>
<b>sulfatiertes HexCer</b>	<b>nicht hydroxyl.</b>	<b>C22:0</b>	<b>M - H<sup>+</sup></b>	862,8 m/z	n.d.	n.d.
		<b>C24:1</b>	<b>M - H<sup>+</sup></b>	888,8 m/z	n.d.	n.d.
	<b>hydroxyl.</b>	<b>C22:0-OH</b>	<b>M - H<sup>+</sup></b>	878,7 m/z	n.d.	n.d.
		<b>C24:1-OH</b>	<b>M - H<sup>+</sup></b>	906,7 m/z	n.d.	n.d.
<b>HexCer</b>	<b>nicht hydroxyl.</b>	<b>C22:0</b>	<b>M + Na<sup>+</sup></b>	807,5 m/z	n.d.	807,5 m/z
		<b>C24:0</b>	<b>M + Na<sup>+</sup></b>	835,5 m/z	n.d.	835,5 m/z
	<b>hydroxyl.</b>	<b>C22:0-OH</b>	<b>M + Na<sup>+</sup></b>	823,5 m/z	823,5 m/z	n.d.
		<b>C24:0-OH</b>	<b>M + Na<sup>+</sup></b>	851,5 m/z	851,5 m/z	n.d.

In Abb. 3-27 sind exemplarisch die Massenpeaks der mittels ESI-Ionenfalle gemessenen deprotonierten Sphingolipide des Ischias Nervs dargestellt ( $M - H^+$ ). Bei den Wildtyp Tieren waren deutliche Peaks bei 862,5, 888,5 und 890,5 m/z zu erkennen, die für das Vorhandensein von nicht hydroxyliertem Sulfatid mit einer C22-Fettsäure (22:0) bzw. mit einer einfach ungesättigten C24-Fettsäure (24:1) sprechen. Auch die Peaks für  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid (bei 878,5 sowie 906,5 m/z) waren hier detektierbar. In den Doppel-KO und den CGT-KO Mäusen konnte keiner dieser Peaks nachgewiesen werden, was auf einen Verlust von Sulfatid in beiden Mausmutanten hindeutet.



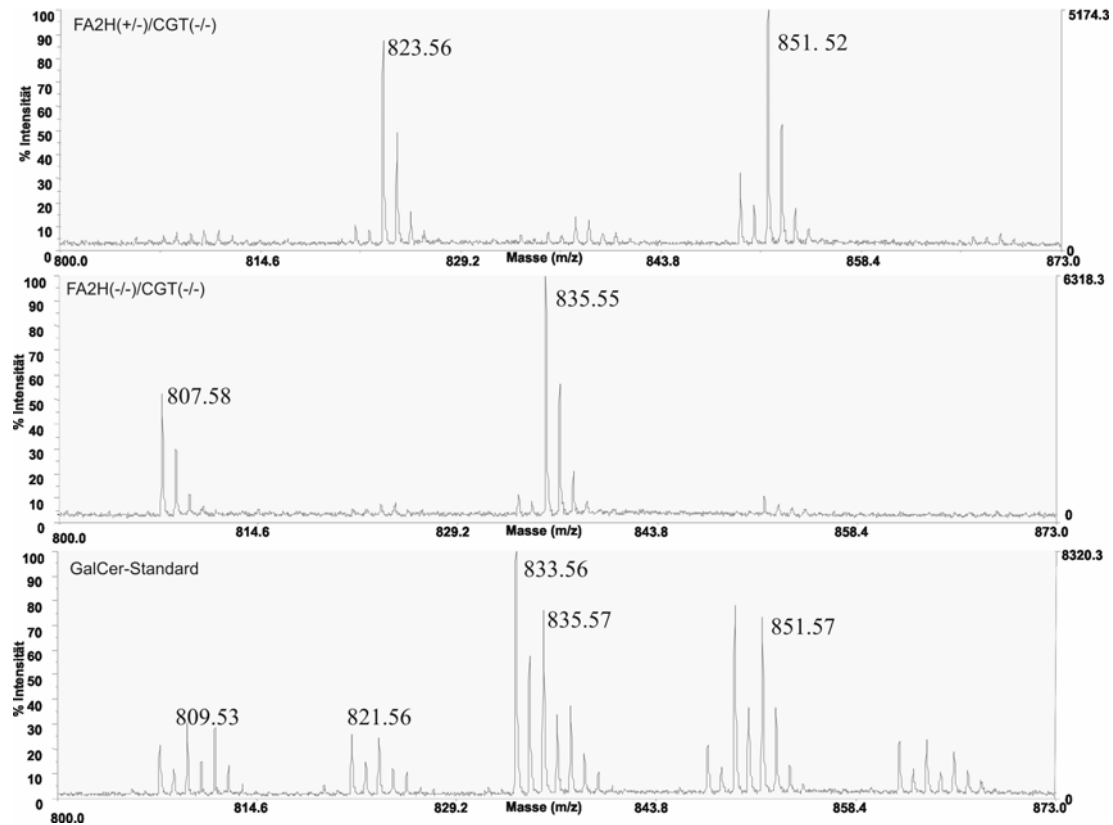
**Abb. 3-27 Massenspektren der aus Ischias Nerven isolierten Lipide gemessen mit der ESI-Ionenfalle.**

Gesamtlipide aus dem Ischias Nerv von vier Wochen alten FA2H(+)/CGT(+), FA2H(+)/CGT(-) und FA2H(-)/CGT(-) wurden mittels ESI-Ionenfalle auf ihre Masse hin untersucht. Dargestellt ist je eine repräsentative Analyse von insgesamt drei untersuchten Tieren pro Genotyp (n=3). Die Messung erfolgte im negativen Ionenmodus, um sulfatierte, Hexosylceramide zu detektieren. Die Zahlen zeigen die Massenpeaks der deprotonierten Sphingolipide ( $M - H^+$ ) an, die erwartet wurden (siehe Tabelle 3); die Pfeile hingegen kennzeichnen den Bereich, der im Vergleich zum WT fehlenden Peaks.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF Massenspektrometrie der Myelin-Lipide in Abb. 3-28 bestätigen, dass die CGT-KO Tiere  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer bildeten. Die charakteristischen Peaks bei 823,5 und 851,5 m/z waren bei diesen Tieren zu erkennen, wohingegen sie bei den FA2H(-)/CGT(-) Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Hier waren Peaks bei 807,5 und 835,5 m/z detektierbar, die für das Vorhandensein von nicht hydroxyliertem GlcCer sprechen. Die gemessenen Massen beziehen sich auf das Natrium assoziierte Lipid ( $M + Na^+$ )



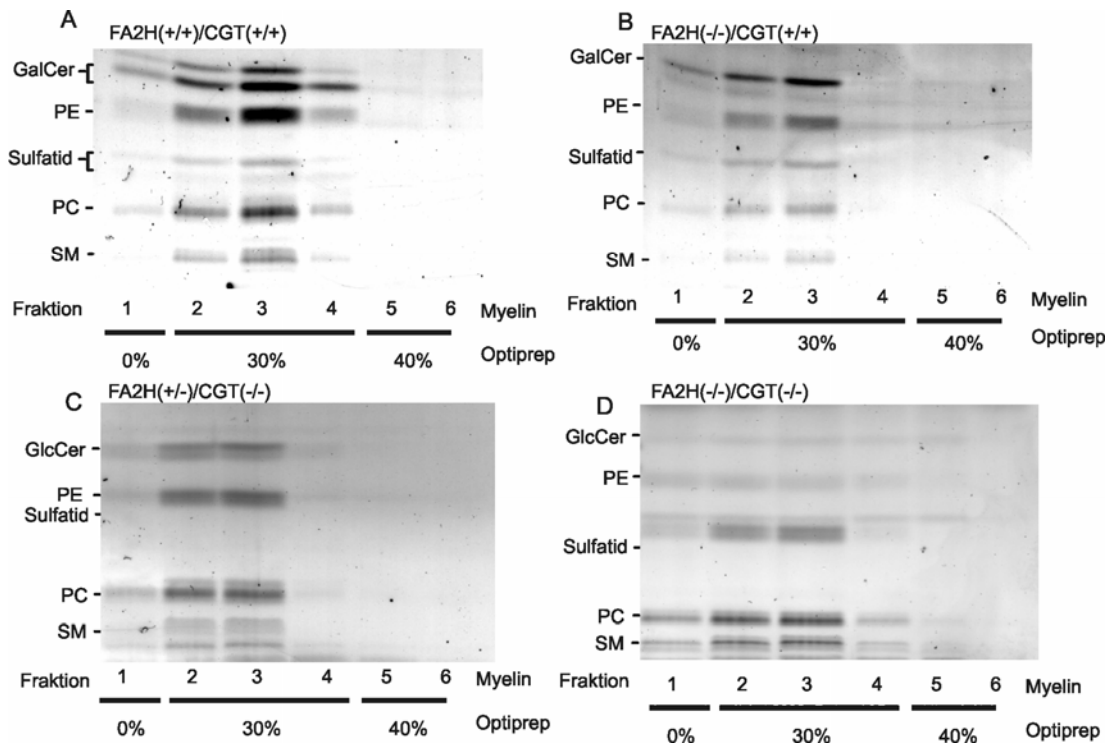
und waren jeweils um eine „Einheit“ ( $m/z$ ) erhöht (z.B. 823,5  $m/z$  anstelle von 822,5  $m/z$  für  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer, siehe Hexosylceramidstandard aufgrund eines Kalibrierungsfehlers).



**Abb. 3-28 Massenspektrometrie der Myelinlipide mittels MALDI-TOF.**

Gezeigt wird eine exemplarische MALDI-TOF Analyse der Myelinlipide von vier Wochen alten FA2H(+/-)/CGT(-/-) und FA2H(-/-)/CGT(-/-) Tieren, sowie des gleichzeitig vermessenen Hexosylceramidstandards, die im positiven Ionenmodus durchgeführt wurde, um die Massenpeaks von Galaktosylceramid bzw. Glukosylceramid, die mit Natrium assoziiert waren ( $M + Na^+$ ), nachzuweisen. Die erwarteten Massen (siehe Tabelle 3) sind neben die Peaks geschrieben.

Desweiteren wurden bei den Doppel-KO Tieren auch die Detergenzien unlösliche Membranfraktionen (DRM) untersucht, um zu überprüfen, ob die Demyelinisierung der CGT-KO Tiere kombiniert mit dem Verlust der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide möglicherweise eine weitere Destabilisierung der Myelinmembran zur Folge hat. Die DRMs wurden aus dem Myelin von vier Wochen alten Tieren mit 20 mM CHAPS bei 37°C extrahiert und anschließend in einem Optiprep Dichtegradienten abzentrifugiert. Die isolierten Lipide wurden auf eine DC-Platte aufgetragen; es waren keine Unterschiede in der Verteilung der Lipide in den verschiedenen Fraktionen zwischen den vier Genotypen zu sehen (siehe Abb. 3-29).

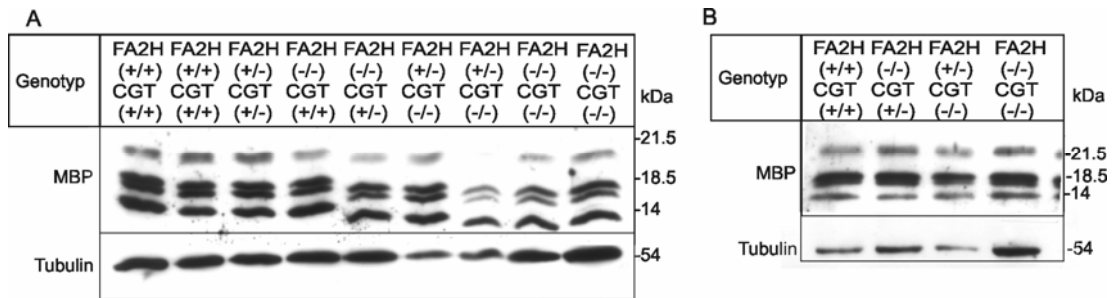


**Abb. 3-29 Die Extraktion der DRMs mittels CHAPS konnte keine Unterschiede aufzeigen.**

Je Genotyp wurden 0,25 mg aufgereinigtes Myelin von vier Wochen alten Tieren mit 20 mM CHAPS bei 37°C extrahiert und in einem Optiprep Gradienten zentrifugiert. Aus den abgenommenen sechs Fraktionen (1 oben; 6 unten) wurden die Lipide isoliert und mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65:25:4) untersucht. A zeigt die Lipide der WT Tiere, während B die Lipide der FA2H-KO Maus und C die Lipide der CGT-KO Maus darstellt. In Abb. D sind die Lipide der FA2H(-)/CGT(-) Maus zu sehen. GalCer = Galaktosylceramid; GlcCer = Glukosylceramid; PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; SM = Sphingomyelin.

### 3.3.3 Analyse von MBP im ZNS und PNS

Da die Lipidanalyse gezeigt hatte, dass die Lipidzusammensetzung des Myelins bei den Doppel-KO Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Tieren verändert war, sollte über Western Blot Analysen untersucht werden, ob auch die Proteinzusammensetzung der FA2H(-)/CGT(-) Tiere Veränderungen aufwies. Bei einer fortschreitenden Demyelinisierung sind die Mengen des Myelin basischen Proteins (MBP) stark reduziert. Deshalb wurde die MBP-Expression im Gehirnhomogenat und im Ischias Nerv-Homogenat von drei 4 Wochen alten Tieren jedes Genotyps analysiert. Die Western Blot Analysen verdeutlichen, dass es weder im ZNS noch im PNS zu gravierenden Unterschieden in der Menge an MBP zwischen den vier Genotypen kam, wie aus Abb. 3-30 ersichtlich wird.



**Abb. 3-30 Keine Unterschiede in der MBP-Expression im ZNS und PNS.**

Dargestellt sind Western Blot Analysen des Gesamtgehirnhomogenats (A) und des Ischias Nervis (B) von vier Wochen alten Mäusen. Der MBP-AK wurde in diesem Versuch 1:5000 verdünnt. Als interne Ladekontrolle diente Tubulin (1:3000).

Die leicht unterschiedlichen Mengen an MBP eines Genotyps könnten darin begründet liegen, dass dieses Protein sehr anfällig ist, gegenüber einer Degradation, so dass die Proben möglicherweise unterschiedlich stark degradiert waren.

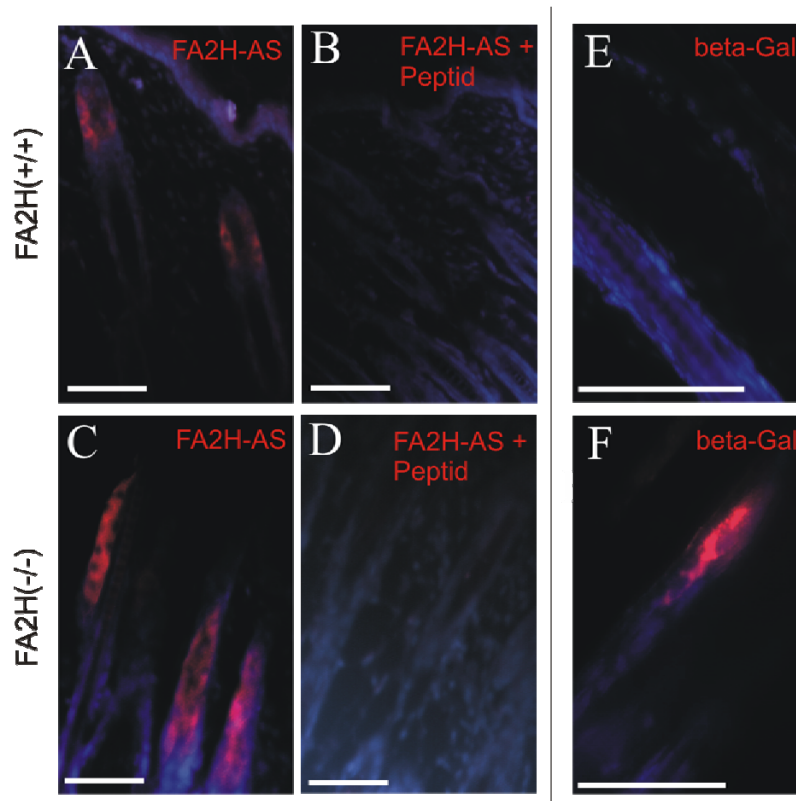
### **3.4 Charakterisierung des Hautphänotyps der FA2H-KO Mäuse**

Eckhardt et al., 2005, hatten in Northern Blot Analysen gezeigt, dass die FA2H nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Haut exprimiert wird, aber die genaue Lokalisation war nicht bekannt. Erwartet wurde eine Expression der FA2H in den Keratinozyten, da diese Hautzellen  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide bilden. Die Untersuchungen zur Lokalisation der FA2H in der Haut sowie zum Einfluss einer FA2H Defizienz auf die Haut wurden mit FA2H defizienten Mäusen durchgeführt, die bei Zöller et al., 2008 näher beschrieben sind.

#### ***3.4.1 Analyse der Lokalisation der FA2H in der Haut***

Die Bestimmung der genauen zellulären Lokalisation der FA2H in der Haut erfolgte sowohl mit einem Antikörper, der an die  $\beta$ -Galaktosidase im Fusionsprotein aus der Cytochrom b5-Domäne der FA2H und dem LacZ-Reportergen bindet, als auch mit dem FA2H-Peptidantiserum (siehe 3.1.3), das einen Bereich erkennt, der zwischen der Cytochrom b5-Domäne und der ersten Transmembrandomäne liegt und von Exon 2 codiert wird. Da das LacZ-Reportergen bei den FA2H defizienten Tieren in Exon 3 inseriert wurde, können mit dem Antiserum auch FA2H-KO Mäuse untersucht werden.

Es wurden Immunfärbungen an Gefrierschnitten der Haut von zehn Tage alten Mäusen durchgeführt. In Abb. 3-31 sind exemplarisch die Ergebnisse der zwei unterschiedlichen Färbungen an FA2H-KO Mäusen und Kontrolltieren dargestellt. Beide Antikörper färbten den gleichen Bereich der Haut an, der über eine histologische Färbung als Talgdrüse identifiziert werden konnte.



**Abb. 3-31 Die FA2H wird in den Talgdrüsen exprimiert.**

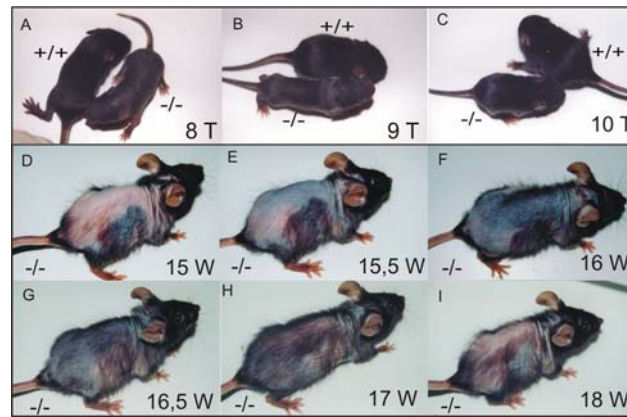
Dargestellt sind Immunfluoreszenzanalysen an Krioschnitten der Haut von zehn Tage alten FA2H-WT (A, B und E) und FA2H-KO (C, D und F) Mäusen, die entweder mit dem FA2H-Antiserum (A-D) oder mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-AK (E und F) inkubiert wurden. In beiden Fällen ist die rote Färbung in den Sebozyten lokalisiert. In A und C ist die Inkubation der Haut mit dem Antiserum zu sehen, während B und D die Kontrollfärbungen zeigen, in denen die Haut der Tiere sowohl mit dem FA2H-Antiserum als auch mit dem Peptid, aus dem das Antiserum generiert worden war, inkubiert wurde. Antikörper-Verdünnung: FA2H-Antiserum (AS): 1:800;  $\beta$ -Galaktosidase-AK (beta-Gal): 1:1000; Messbalken: 50  $\mu$ m.

Wie erwartet, war die Färbung mit dem Antiserum bei FA2H-KO und WT Tieren zu sehen, während der  $\beta$ -Galaktosidase-AK nur die Haut von FA2H defizienten Mäusen anfärbte. Schnitte, die gleichzeitig mit dem Antiserum und mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid inkubiert wurden, zeigten keine Färbung (außer im Bereich der Haare, die auf Autofluoreszenz zurückzuführen war und auch ohne AK-Inkubation auftrat). Ebenso war keine Färbung auf Schnitten zu erkennen, die mit dem Präimmenserum behandelt wurden (Daten nicht gezeigt).

Eine *in situ* Hybridisierung mit einer FA2H-Sonde zeigte eine Färbung im gleichen Bereich der Haut (unveröffentlichte Daten von Frau Inge Zöller). Somit wird die murine FA2H in der Haut ausschließlich in den Talgdrüsen exprimiert.

### ***3.4.2 Analyse des Haarzyklus in FA2H defizienten Tieren***

Bereits während der frühen Haut- und Haarentwicklung konnten Unterschiede in der Hautdicke, der Haarzyklusphase und der Proliferation der Haut der FA2H-KO Mäuse im Vergleich zu den WT Tieren beobachtet werden. Bei den WT Mäusen durchbrechen die ersten Haare nach ca. 6-7 Tagen die Haut, während bei den Tieren ohne FA2H die ersten Haare erst bei Tag 8-9 zu sehen waren. In Abb. 3-32 A-C ist die Verzögerung der Haarentwicklung zu erkennen. 25-30 Tage nach der Geburt kam es bei FA2H defizienten Tieren zu einem drastischen Haarverlust, der sich besonders im kaudalen Bereich des Rückens manifestierte. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Haut im Telogen, der Ruhephase des Haarzyklus, erkennbar an der rosa Haut der Tiere. Der Haarverlust wiederholte sich ca. alle vier Wochen, jeweils wenn der Haarzyklus der Tiere im telogenen Stadium war. Anfänglich wuchsen die Haare in der Wachstumsphase, dem Anagen, wieder gleichmäßig nach. Während dieser Phase konnten alle vier Haartypen bei den FA2H-KO Tieren nachgewiesen werden und auch die Haarlänge der Leithaare war nicht signifikant unterschiedlich (WT 9,42 mm  $\pm$  0,74 mm und KO 7,78 mm  $\pm$  1,39 mm). Jedoch verloren die Tiere mit jedem weiteren Haarverlust immer mehr Haare auf dem Rücken, so dass alte FA2H defizienten Mäuse fast gar kein Rückenfell mehr besaßen. Der zyklische Haarverlust ist in Abb. 3-32 D-I zusammengefasst.

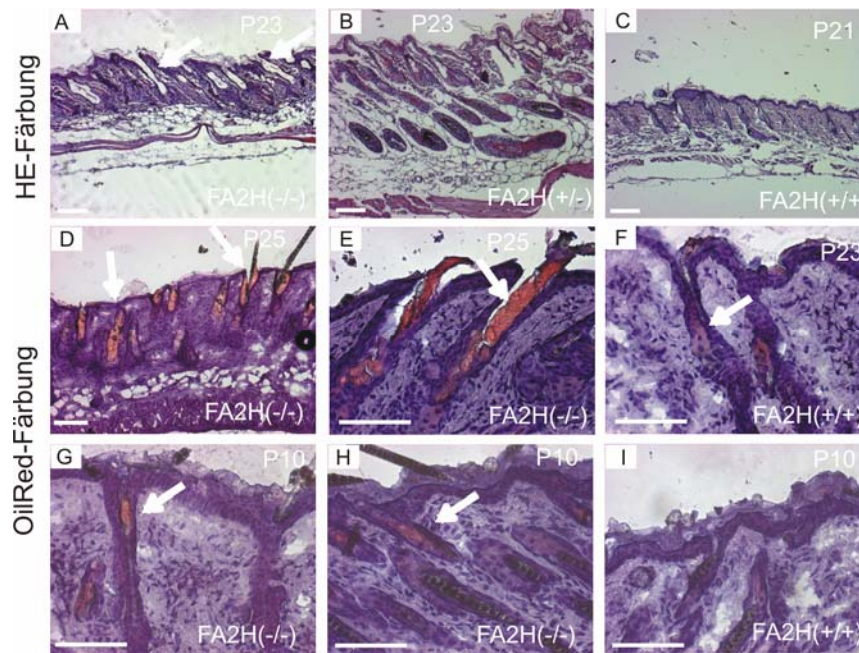


**Abb. 3-32 Verzögerte Haarentwicklung und zyklischer Haarverlust der FA2H Knock-out Mäuse.**

Abgebildet sind Aufnahmen von FA2H defizienten Mäusen verschiedener Altersstufen. In den ersten drei Bildern (A-C) ist zu erkennen, dass bei den FA2H-KO Tieren die Haare später herauswachsen; ab Tag 10 (C) besitzen sie dann ein normales Fell. Abb. D-I zeigen dieselbe Maus über einen Zeitraum von ca. vier Wochen; es ist zu sehen, dass es zu einem zyklischen Haarverlust kommt, die Haare aber zunächst wieder nachwachsen. T = Tage; W = Wochen; +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO.

Trotz des fast vollständigen Haarverlustes mit fortschreitendem Alter der FA2H defizienten Mäuse, gab es keine Anzeichen des Verlusts von Haarfollikeln. Die Anzahl der Haarfollikel von drei adulten Tieren war vergleichbar mit der Anzahl bei den Kontrolltieren.

Auch auf mikroskopischer Ebene waren die Defizite der Haarentwicklung zu erkennen, wie z.B. die Verformung des Haarfollikels und ein geöffneter Haarkanal bei ca. 20-23 Tage alten Mäusen (Abb. 3-33 A-C). Desweiteren konnte eine OilRed-Färbung, die spezifisch die Fettbestandteile der Haut färbt, zeigen, dass bei 23-25 Tage alten FA2H defizienten Mäusen die Haarkanäle mit Lipid verstopft sind, so dass möglicherweise die Haare leichter ausfallen bzw. nicht so leicht die Haut durchdringen können (siehe Abb. 3-33 D-F). Das gleiche Phänomen war bereits bei zehn Tage alten FA2H-KO Tieren zu beobachten; auch hier waren die Haarkanäle mit mehr Lipid verstopft, im Vergleich zu den WT Tieren (Abb. 3-33 G-I), was die verzögerte Haarentwicklung erklären könnte.

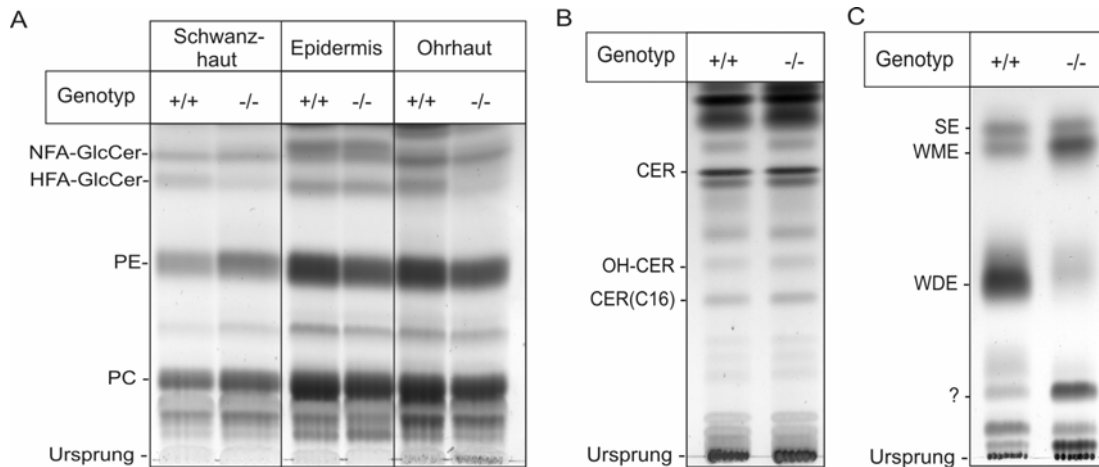


**Abb. 3-33 Der Haarkanal der FA2H defizienten Mäuse ist weiter geöffnet und teilweise mit Sebum verstopft.**

In Abb. A und B sind HE-Färbungen der Haut von 23 Tage alten FA2H-KO (A) und HET (B) Tieren dargestellt; Abb. C zeigt die Haut von einem P21 WT Tier, das ebenso, wie das P23 FA2H-KO Tier, in der telogenen Wachstumsphase war. In D-F sind Gefrierschnitte der Haut von P25 FA2H defizienten Tieren (D und E) und einer 23 Tage alten WT Maus (F) abgebildet, die mit OilRed und Hämalaun gefärbt wurden. In G-I sind OilRed und Hämalaun gefärbte Kryoschnitte von zehn Tage alten FA2H-KO (G und H) und WT (I) zu sehen. Messbalken: 50  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile kennzeichnen den offenen Haarkanal (A), bzw. das Sebum (D-H), das in den Haarkanälen zu sehen ist

Die Verstopfung der Haarkanäle der FA2H defizienten Tiere mit Sebum bzw. Lipid ließ die Vermutung zu, dass eine FA2H Defizienz zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung führt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Lipide der Gesamthaut (hier Schwanz- und Ohr-Haut) und der Epidermis von adulten FA2H-KO und WT Mäusen extrahiert und auf eine DC aufgetragen. Wie aus Abb. 3-34 A ersichtlich wird, konnten FA2H-KO Tiere, trotz des Verlustes der FA2H, immer noch  $\alpha$ -hydroxyliertes Glukosylceramid und hydroxyliertes Ceramid bilden. Jedoch war die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer in der Gesamthaut stark reduziert, während keine Veränderung in der Epidermis nachzuweisen war. Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte in der Existenz eines weiteren Enzyms begründet liegen, dass in der Haut, vermutlich in der Epidermis, für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Sphingolipide verantwortlich ist. Weiterhin war die Gesamtmenge an Wachsdiestern, ein spezifisches Sebumlipid, in den FA2H defizienten Tieren signifikant reduziert, während die Menge an Wachsmoestern

und einem weiteren unbekanntem Lipid (Fragezeichen (?)) in Abb. 3-34 C) erhöht war. Hingegen hatte die FA2H Defizienz keinen Einfluss auf die Menge an  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden (Abb. 3-34 B).



### Abb. 3-34 Lipidanalyse der Haut.

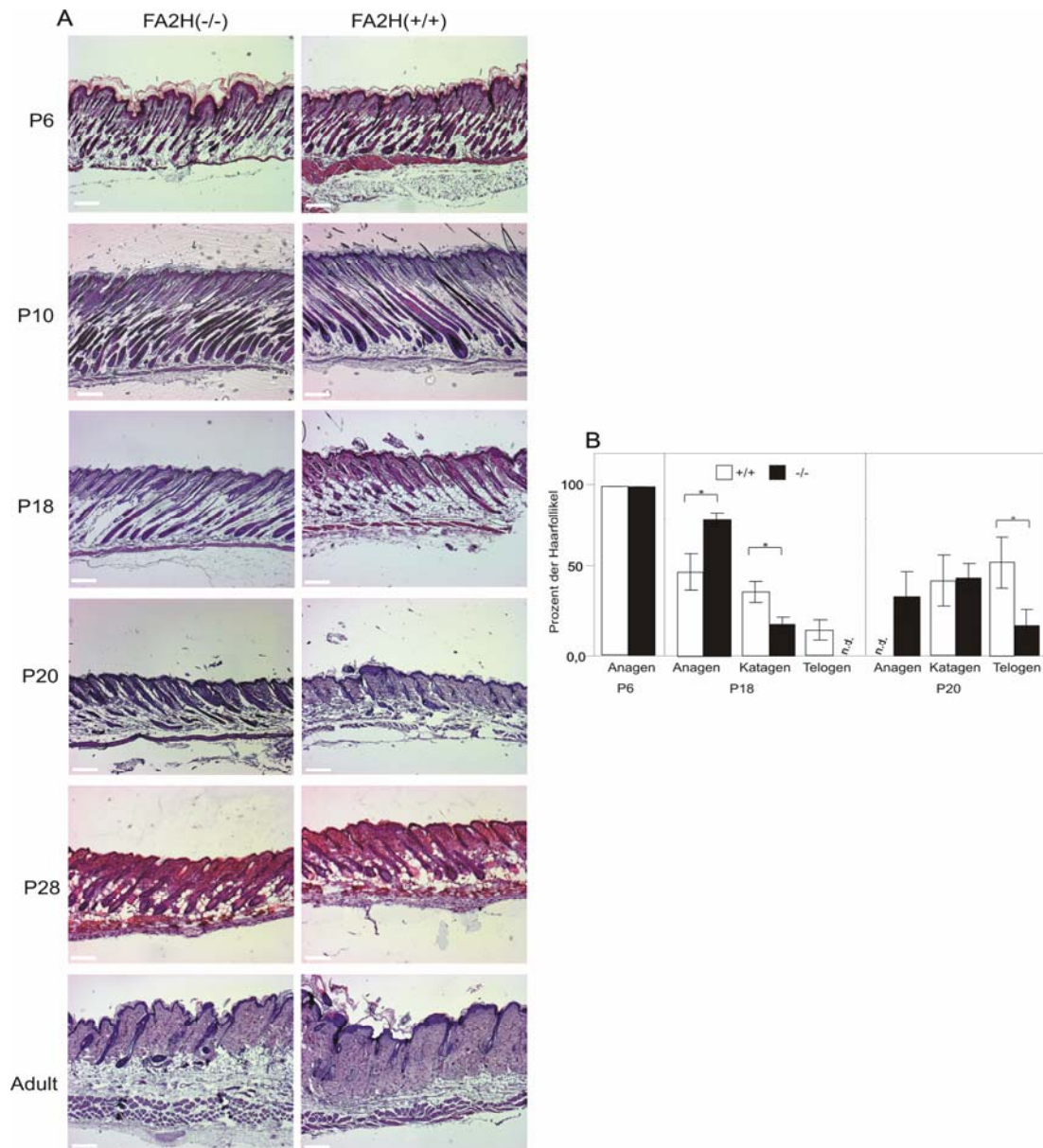
Abb. A stellt die Lipide dar, die aus der Gesamthaut (Schwanz und Ohr) und der Epidermis von adulten FA2H-KO und WT Mäusen isoliert und mittels DC untersucht wurden. Die Platte wurde zunächst in einem Laufmittel aus Toluol/Hexan 1:1 gestellt, um große Hautlipide abzutrennen, danach folgte die Auftrennung der Lipide in dem Laufmittel  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{dH}_2\text{O}$  65:25:4. Abb. B zeigt die Auftrennung der Hautceramide adulter FA2H defizienter Tiere und der Kontrollen (Laufmittel:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAc}$  190:9:1), während in Abb. C die DC der Monoester bzw. Sterolester der Haut zu sehen ist (Laufmittel: Toluol/Hexan 1:1). +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO; CER = Ceramid; OH-CER =  $\alpha$ -hydroxyliertes Ceramid; NFA-GlcCer = nicht hydroxyliertes Glukosylceramid; HFA-GlcCer =  $\alpha$ -hydroxyliertes Glukosylceramid; PE = Phosphatidylethanolamin; PC = Phosphatidylcholin; SE = Sterolester; WDE = Wachsdierester; WME = Wachsmonoester. ? = unbekanntes Lipid.

Übereinstimmend mit den drei Phasen des Haarzyklus (Anagen, Katagen und Telogen) wächst bzw. verkürzt sich sowohl der Haarfollikel als auch die gesamte Haut, besonders die Subkutis (Müller-Röver et al, 2001). In der anagenen Wachstumsphase, die ca. 12-17 Tage dauert, nimmt die Dicke der Haut proportional zum sich verlängernden Haarfollikel zu, bevor sich die Dicke der Haut in der ca. zweitägigen katagenen Regressionsphase drastisch verringert. In der telogenen Ruhephase verbleibt die Haut ca. sieben Tage bevor ein erneuter Haarzyklus mit der anagenen Phase beginnt (Sundberg & King, 1996). Die Größe der Haarfollikel, die Lage und die Form der dermalen Papille sowie die Dicke der Haut schwanken also abhängig vom Haarzyklus (Paus et al., 1994a) und können somit als Kriterium für das jeweilige Stadium dienen.



Es wurden Gefrierschnitte von männlichen Mäusen verschiedener Altersstufen angefertigt und diese HE gefärbt, um auf histologischer Ebene die jeweilige Phase des Haarzyklus und die Dicke der Haut zu bestimmen.

In Abb. 3-35 sind HE-Färbungen von FA2H-KO und WT Mäusen zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten zu sehen. Es wird deutlich, dass bei P6 und P10 (Tag 6 und Tag 10 nach der Geburt) noch kein Unterschied in der Hautdicke zu beobachten war, aber nach 18 Tagen war die Haut, die Subkutis und die Dermis, der FA2H-KO Tiere dicker als die Haut der Kontrollen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die WT Tiere schon im Übergang zwischen Katagen und Telogen, während die FA2H Knock-out Mäuse immer noch im Anagen waren. Die quantitative Auswertung der Haarfollikelphase von mindestens drei Tieren pro Genotyp bestätigte diese Annahme. Die FA2H defizienten Tiere befanden sich 18 Tage nach der Geburt noch hauptsächlich in der Anagenphase und teilweise im Katagen, erst nach 20 Tagen waren Haarfollikel zu erkennen, die charakteristisch sind für die telogene Phase. Bei den Kontrolltieren waren diese schon nach 19 Tagen deutlich zu sehen. 20 Tage nach der Geburt waren die Wildtyp Mäuse zum größten Teil in der Ruhephase, gekennzeichnet dadurch, dass die Hautdicke stark reduziert und die dermale Papille fast ausschließlich in der Dermis lokalisiert war (Paus & Cotsarelis, 1999). Die FA2H defizienten Mäuse hingegen zeigten noch Merkmale der katagenen Phase, so befand sich die dermale Papille im Übergangsbereich zwischen Subkutis und Dermis und die innere Wurzelschicht, die im Telogen nicht mehr vorhanden ist, war noch zu erkennen. Das bedeutet, dass die FA2H-KO Tiere ca. zwei Tage länger im Anagen waren und sich dadurch der gesamte Haarzyklus um diese zwei Tage nach hinten verschob. Nach 28 Tagen gingen beide Genotypen langsam wieder in die anagene Phase über und der Haarzyklus begann von vorne. Wie aus Abb. 3-35 hervorgeht, wurde kein Unterschied in der Hautdicke oder im Aussehen der Haarfollikel bei den adulten Tieren zwischen den Genotypen ersichtlich.



**Abb. 3-35 Morphogenese der Haut der FA2H-KO Tiere im Vergleich zum Wildtyp.**

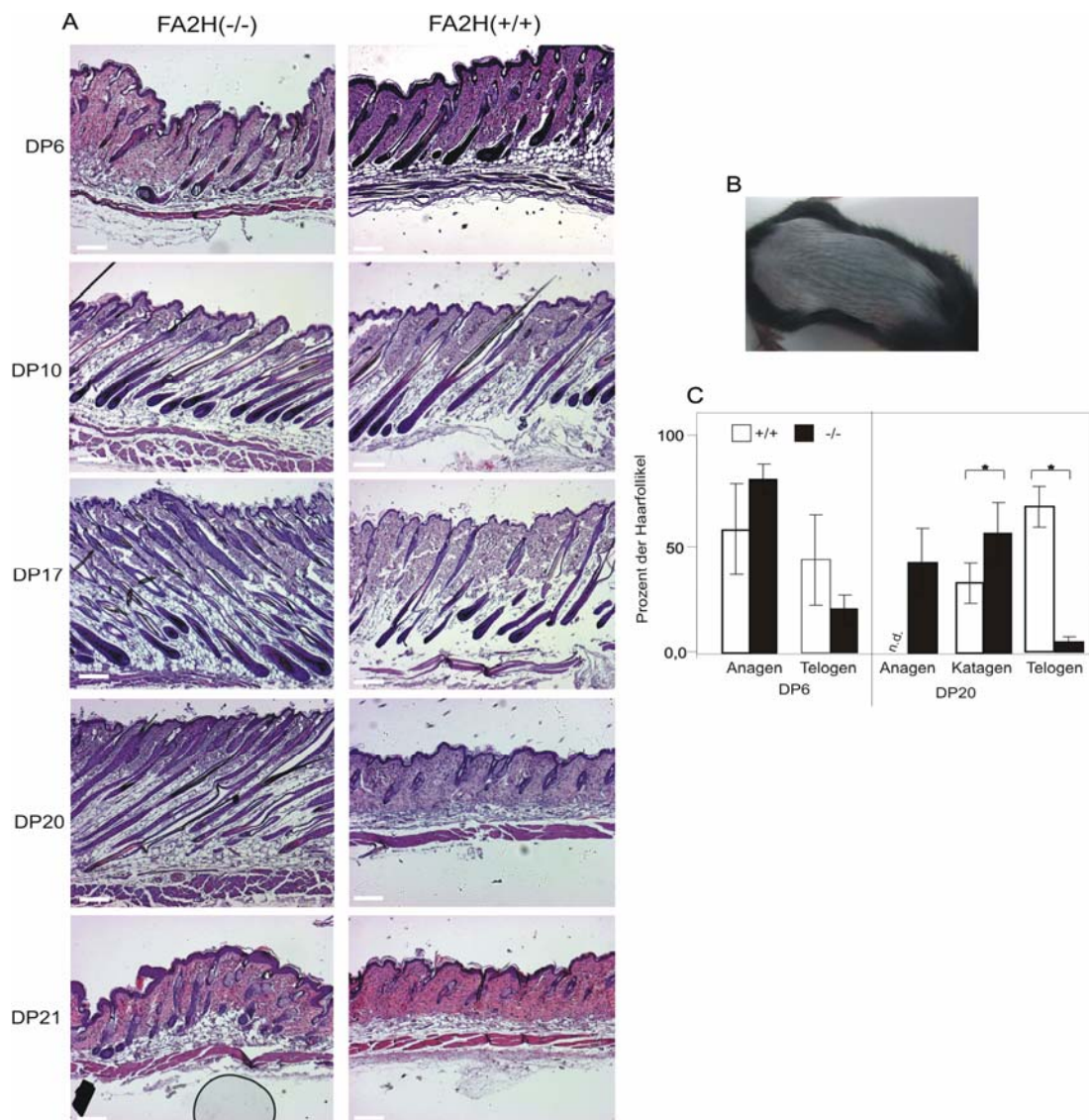
In Abb. A sind HE-Färbungen der Haut von FA2H defizienten Mäusen (links) und Wildtyp Kontrollen (rechts) verschiedener Altersstufen von Tag sechs (P6) bis Tag 28 (P28) sowie von adulten Tiere dargestellt. Die quantitative Auswertung in Abb. B zeigt die Prozentzahl der Haarfollikel, die sich bei den ausgewählten Zeitpunkten in der jeweiligen Haarzyklusphase befanden. Es sind die Mittelwerte von mindestens drei untersuchten Tieren pro Genotyp mit dem Standardfehler (SEM) angegeben; durch einen Stern wird ein statistisch signifikanter Unterschied markiert (t-Test,  $*= p < 0,05$ ). +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO; n.d. = nicht detektierbar; Messbalken = 100  $\mu\text{m}$ .

Neben der Morphogenese der Haut sollte auch ihre Regenerationsfähigkeit untersucht werden. Dazu wurden die Haare auf dem Rücken von 45 Tage alten Mäusen, deren Haarzyklus in der Ruhephase war, herausgezogen, Depilation genannt. So konnte eine neue Wachstumsphase eingeleitet werden. Es galt zu untersuchen, ob auch nach einer Depilation (DP) das Haarwachstum der FA2H

defizienten Mäuse verzögert war und der Haarzyklus um zwei Tage verlängert wurde. Tatsächlich war das Haarwachstum der FA2H-KO Tiere nach Depilation ebenfalls verzögert. Wildtyp Tiere zeigten bereits ca. sieben Tage nach dem Ausrupfen der Haare eine Regeneration des Haarwachstums, während die Haare der FA2H defizienten Tiere erst bei DP9 langsam wieder nachwuchsen. DP12 Tiere beider Genotypen wiesen keinen Unterschied mehr in der Behaarung auf.

Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Depilation wurde die Haut der jeweiligen Tiere präpariert und Paraffinschnitte angefertigt, die zur näheren histologischen Untersuchung HE gefärbt wurden (siehe Abb. 3-36 A).

Wie schon in der Morphogenese war bei DP6 und DP10 (sechs und zehn Tagen nach Depilation) kein Unterschied in der Hautdicke zwischen den Genotypen erkennbar. 17 Tage nach dem Entfernen der Rückenhaare wurde die Haut der WT Tiere langsam wieder dünner, die Haarfollikel zeigten erste Merkmale der katagenen Phase, die nach 19-20 Tagen allmählich in die Ruhephase überging. Hier waren sowohl katagene als auch telogene Haarfollikel zu erkennen. Im Vergleich dazu war die Hautdicke bei den DP17 FA2H-KO Mäusen noch nicht verkleinert und alle Haarfollikel befanden sich noch in der Wachstumsphase. Auch nach 19 Tage waren nur anagene Haarfollikel nachweisbar, erst 20 Tage nach Depilation waren sowohl anagene als auch katagene Haarfollikel erkennbar und die Regression der Hautdicke begann. Diese Ergebnisse, die exemplarisch in Abb. 3-36 dargestellt sind, verdeutlichen, dass auch der Haarzyklus bei einer Regeneration um zwei Tage nach hinten verschoben war.



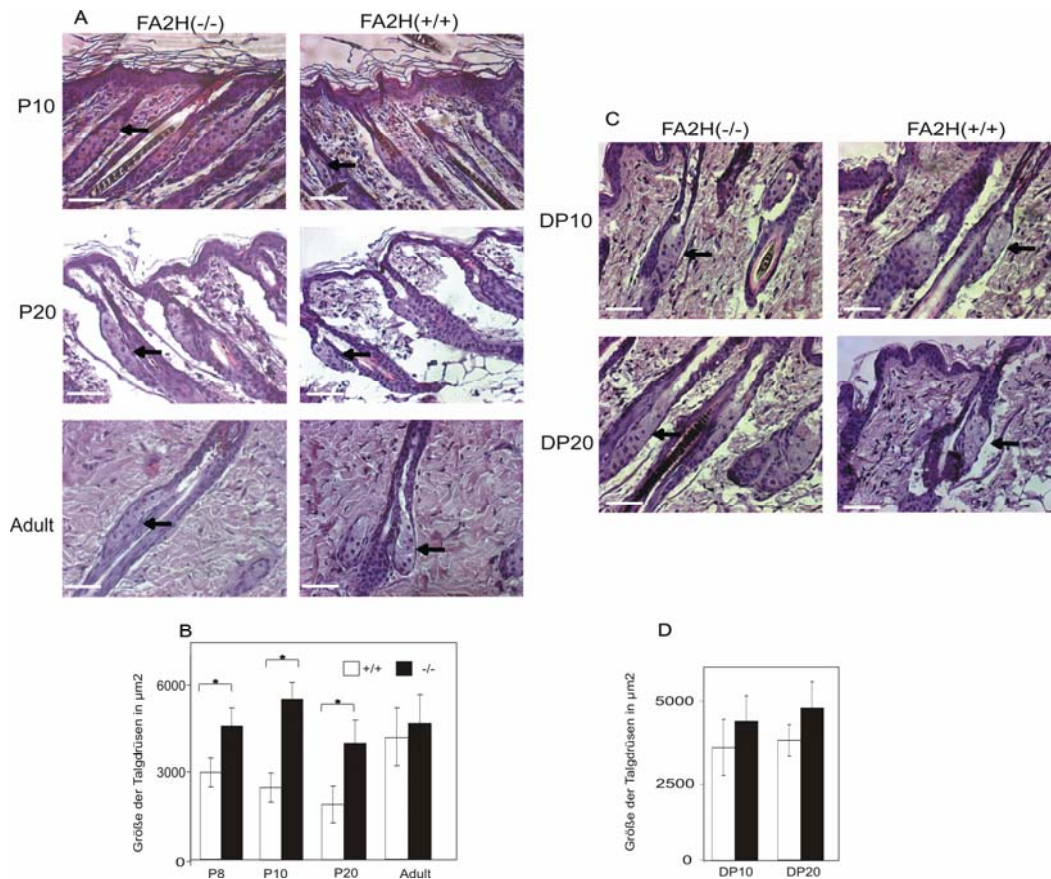
### Abb. 3-36 Analyse der Haut nach Depilation.

Abb. B zeigt ein exemplarisches Bild einer Maus, der die Rückenhaare entfernt (depiliert) wurden. In Abb. A sind HE-Färbungen der Haut von FA2H defizienten Mäusen (links) und Wildtyp Kontrollen (rechts) zu ausgewählten Zeitpunkten nach der Depilation zu erkennen. Die dazugehörige quantitative Analyse ist in Abb. C zu sehen. Sechs und 20 Tage nach Depilation wurde die Anzahl der Haarfollikel in der jeweiligen Haarzyklusphase bestimmt. Es sind Prozentwerte mit dem Standardfehler (SEM) dargestellt; ein Stern zeigt an, wenn ein statistisch signifikanter Unterschied vorliegt (t-Test,  $*, * = p < 0,05$ ). +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO; n.d. = nicht detektierbar; Messbalken = 100  $\mu$ m.

Da die FA2H in der Talgdrüse, deren Größe ebenfalls abhängig vom Haarzyklus schwankt (Paus et al., 1994a), exprimiert wird, sollte untersucht werden, wie sich eine FA2H Defizienz auf die Talgdrüse auswirkt. Die Talgdrüsengröße wurde sowohl während der Morphogenese als auch nach Depilation zu verschiedenen Zeitpunkten von mindestens drei Tieren pro Genotyp analysiert. Dazu wurde die Fläche der Talgdrüsen in HE gefärbten Schnitten ausgemessen. Abb. 3-37 A zeigt

einige repräsentative Talgdrüsen von FA2H-WT und KO Tieren verschiedener Altersstufen. Während der Wachstumsphase, in der die Zellen der Haut stark proliferieren (P8 und P10), und auch noch bei P20 war die Größe der Talgdrüsen bei den FA2H defizienten Tieren (siehe Abb. 3-37 B), im Vergleich zu den WT Mäusen, signifikant erhöht. Adulte Tiere hatten ungefähr gleichgroße Talgdrüsen. Die Talgdrüsen der FA2H defizienten Tiere nach Depilation waren nicht signifikant größer als die Talgdrüsen von gleichaltrigen Kontrollen (siehe Abb. 3-37 C und D). Es hatte den Anschein, dass der Unterschied in der Talgdrüsengröße zwischen den Genotypen während der Wachstumsphase der Haut nicht durch eine Vergrößerung der Zellen, sondern durch eine höhere Zellzahl zustande kam. Diese Vermutung wurde durch Immunfärbungen gegen Ki67, einen Proliferationsmarker, bestätigt (durchgeführt von Frau Inge Zöller). Die FA2H defizienten Tiere besaßen in den Sebozyten mehr Ki67 positive Zellen. Eine Behandlung von zehn Tage alten Tieren mit 100 mg/ml BrdU pro 10 g Körpergewicht zwei Stunden vor Tötung der Tiere und anschließender Immunfluoreszenzanalyse der Hautschnitte mit einem BrdU-spezifischen Antikörper zeigte ähnliche Resultate. FA2H-KO Tiere hatten mehr BrdU positive Zellen im Bereich der Talgdrüsen, ein Hinweis auf eine erhöhte Proliferationstätigkeit, als die Kontrolltiere (WT  $2,7 \pm 0,2$ ; KO  $5,7 \pm 0,1$ , n=4). Weiterhin fällt auf, dass die Talgdrüsengröße der FA2H defizienten Tiere während allen untersuchten Zeitpunkten, unabhängig von der Phase des Haarzyklus, annähernd gleich groß war, während sich die Talgdrüsen der Kontrollen, in Übereinstimmung mit der Literatur, abhängig von der Haarzyklusphase vergrößerten bzw. verkleinerten. So hatte die Fläche der Talgdrüse im Telogen ihr Minimum erreicht.





**Abb. 3-37 Die FA2H Defizienz bewirkt eine Hyperplasie der Talgdrüsen während der Morphogenese.**

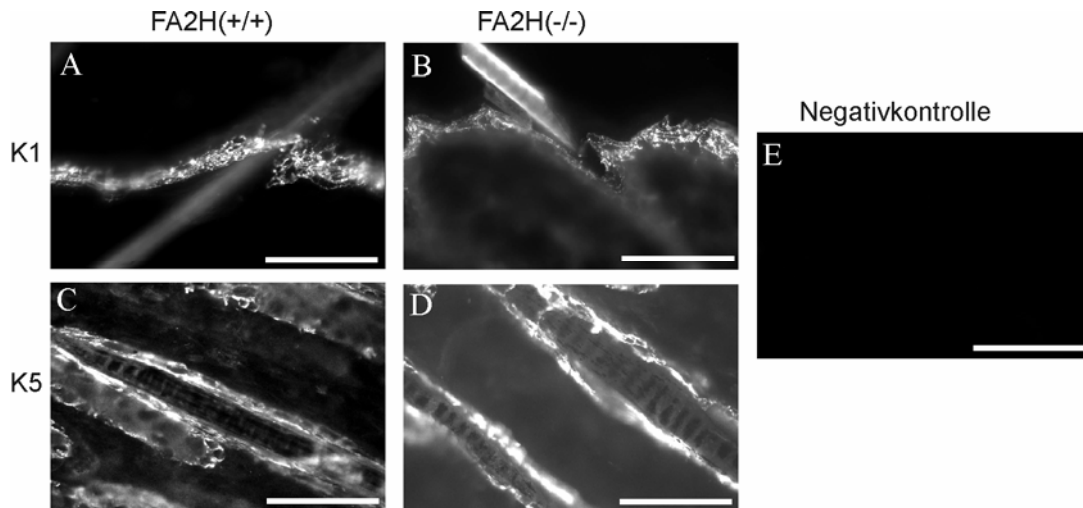
A und C: HE-Färbung von Hautschnitten von FA2H-WT und KO Tieren während der Morphogenese (A) und nach Depilation (C). Messbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Die schwarzen Pfeile weisen auf Talgdrüsen hin.

B und D: Graphische Darstellung der Talgdrüsengröße in  $\mu\text{m}^2$ , während der Morphogenese (B) und nach Depilation (D). Angegeben sind die Mittelwerte der Talgdrüsengröße mit dem Standardfehler (SEM) von mindestens drei Tieren pro Genotyp; ein Stern kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test,  $* = p < 0,05$ ); +/+ = FA2H-WT; -/- = FA2H-KO.

### 3.4.3 Untersuchung der verschiedenen Keratine der Haut

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Subkutis als auch die Dermis der FA2H-KO Tiere in der Proliferationsphase der Morphogenese, im Vergleich zu den WT Mäusen, deutlich vergrößert waren. Die histologischen HE-Färbungen ließen jedoch keinen Schluss zu, ob auch die Epidermis dicker war. Um zu überprüfen, ob nur die Sebozyten hyperproliferieren, oder auch die Keratinozyten, wurden Immunfärbungen mit zwei Antikörpern, die spezifisch die Epidermis anfärben, durchgeführt. Zum einen wurde das Keratin K1 verwendet, das in den Keratinozyten der Hornschicht (Stratum corneum) exprimiert

wird, und zum anderen das Keratin K5, das hauptsächlich in der Basalschicht zu finden ist. Abb. 3-38 zeigt eine exemplarische Färbung von Gefrierschnitten von P10 Tieren. Weder die Färbung mit dem K5-Antikörper noch die K1-Immunfärbung zeigten einen Unterschied zwischen den Genotypen.

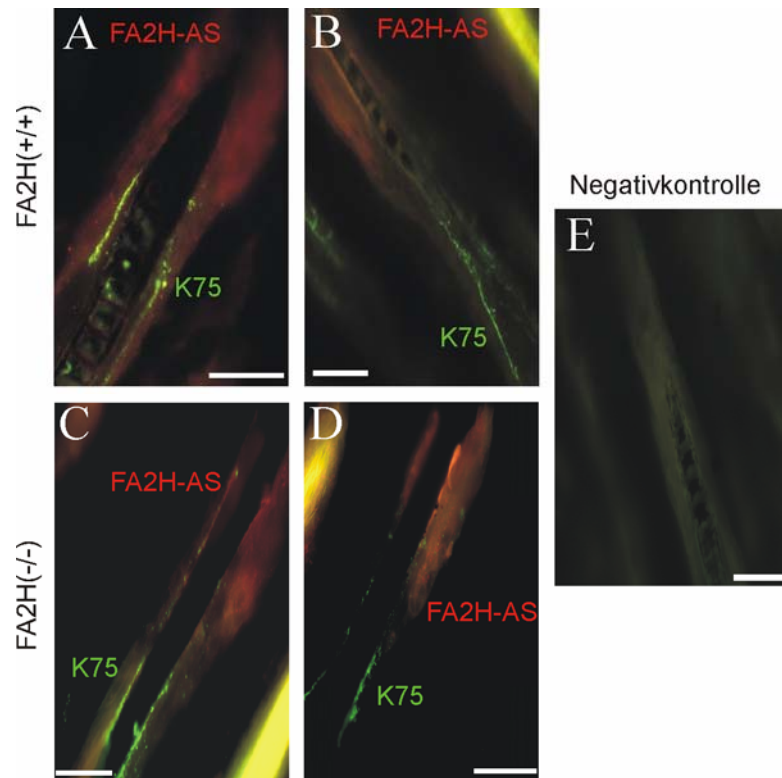


**Abb. 3-38 Vergleichbare Expression von epidermisspezifischen Keratinen.**

Abb. A und B zeigen die Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Haut von zehn Tage alten FA2H-WT (A) und Knock-out (B) Tieren, die mit dem K1-Antikörper (Verdünnung: 1:500) durchgeführt wurden. In Abb. C und D sind die Färbungen der FA2H defizienten Mäuse (D) und der WT Kontrollen (C) mit dem K5-AK (Verdünnung 1:600) zu erkennen. Abb. E stellt die Negativkontrolle dar, hier wurde der Schnitt nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Messbalken: 50  $\mu$ m.

In anderen Mausmutanten, die ebenfalls zyklisch ihre Haare verlieren, konnte der Verlust der Haare teilweise durch Veränderungen in der inneren Wurzelschicht (IRS) erklärt werden. Diese innere Wurzelschicht wächst, wie das Haar selbst, aus dem Bulbus (proximale Auftreibung, der die Dermale Papille umschließt) zur Oberfläche, endet aber knapp unterhalb der Talgdrüsen. Sie besteht aus drei einzelnen Schichten (von außen nach innen: Henle-Schicht, Huxley-Schicht und Kutikula), die den Haarschaft und die Haarwurzel umschließen und in den oberen Abschnitten verhornen. Horenstein & Simons, 2007 konnten zeigen, dass die innere Wurzelschicht bei Haarfollikeln des Menschen, die unter der Krankheit Alopecia (Haarverlust) leiden, nicht mehr richtig ausgebildet werden kann. Deshalb wurde das Keratin K75, das spezifisch in der „Begleitschicht“ (Companion layer) der inneren Wurzelschicht exprimiert wird, analysiert. Dazu wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gefrierschnitten von zehn Tage alten FA2H defizienten Mäusen und Kontrolltieren durchgeführt. Die Immunfärbung mit dem K75-Antikörper war

sowohl bei den FA2H defizienten Mäusen als auch bei den WT Tieren bis hin zur Talgdrüse ausgebildet (siehe Abb. 3-39). Diese Ergebnisse ließen demnach nicht den Schluss zu, dass ein Unterschied in der Ausbildung der inneren Wurzelschicht bei FA2H defizienten Mäusen vorlag. Somit konnte der Haarverlust der FA2H-KO Tiere nicht mit einer Veränderung der IRS begründet werden.



**Abb. 3-39 Co-Färbungen der inneren Wurzelschicht und der Talgdrüsen ließen keinen Unterschied erkennen.**

In Abb. A und B sind Co-Färbungen der Haut von zehn Tage alten WT Tieren mit dem FA2H-Antiserum in rot und dem K75-AK in grün dargestellt. Die Abb. C und D zeigen die Immunfluoreszenzanalysen der Haut von zehn Tage alten FA2H defizienten Mäusen; die rote Färbung ist auf das FA2H-Antiserum (AS) und das grüne Signal auf den K75-AK zurückzuführen. Abb. E ist die Negativkontrolle, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Haare haben eine hohe Eigenfluoreszenz und sind als stark gelb fluoreszierende Bereiche zu sehen, diese Färbung ist unspezifisch. Antikörperverdünnungen: FA2H-Antiserum: 1:800; K75: 1:1000; Messbalken: 25  $\mu\text{m}$ .



## **4 Diskussion**

### **4.1 Untersuchungen zur Lokalisation der Fettsäure-2-Hydroxylase Expression anhand eines Zellkulturmodells**

Zu Beginn der Untersuchung der Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) galt es zu ermitteln, wo dieses Enzym in der Zelle lokalisiert ist, welchen Einfluss es auf die endogene Lipidzusammensetzung hat und ob es tatsächlich für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide verantwortlich ist.

Bis Ende des Jahres 2004 konnten in höheren Eukaryonten keine Enzyme nachgewiesen werden, welche die  $\alpha$ -Hydroxylierung des Ceramids katalysieren, sondern nur in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die murine FA2H besitzt, wie das homologe Enzym der Hefe (Scs7p) (Dunn et al., 1998), eine N-terminale Cytochrom b5-Domäne, vier hochkonservierte Histidin-Motive sowie vier putative Transmembrandomänen (Eckhardt et al., 2005). Aufgrund des potentiellen C-terminalen ER-Rückhaltesignals (HXKXX) wurde eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum vermutet. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein ähnliches Signal, mit zwei Lysin-Resten, eine ER-Lokalisation von Proteinen gewährleistet (Jackson et al., 1993; Zerangue et al., 2001). Die Effizienz der verschiedenen ER-Rückhaltesignale ein Protein im ER zurückzuhalten ist unterschiedlich und hängt von der AS-Sequenz ab (Zerangue et al., 2001); K(X)KXX ist das effektivste Motiv, das eine ER-Lokalisation bedingt. Trotzdem kann auch bei einem Austausch der beiden Lysin-Reste (K) des Rückhaltesignals gegen Histidine eine ER-Lokalisation gewährleistet werden, wie Hardt & Bause, 2002, anhand der Oligosaccharidtransferase nachweisen konnten.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der murinen FA2H, wurde die cDNA des Enzyms in ein HA-Expressionsplasmid kloniert, so dass von dem resultierenden Plasmid ein Fusionsprotein aus der FA2H und einem N-terminalen HA-Epitop codiert wurde.

Co-Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen ein ER-spezifisches Protein bestätigten die Vermutung, dass die murine FA2H tatsächlich im ER lokalisiert ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Befunden von Burger et al., 1996, dass  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid (GalCer) im ER gebildet wird. Dementsprechend könnte die FA2H die Hydroxylierung der freien Fettsäuren im ER katalysieren, die daraufhin in das neu gebildete

$\alpha$ -hydroxylierte GalCer eingebaut werden. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Alderson et al., 2005, die zeigen, dass die freien Fettsäuren das Substrat der FA2H sind.

Die beiden FA2H-Mutanten des ER-Rückhaltesignals (FA2H-K370L und FA2H- $\Delta$ 5) wurden generiert, um zu zeigen, dass die ER-Lokalisation der FA2H auf dieses Signal zurückzuführen ist. Die Immunfluoreszenzanalysen der FA2H-K370L und FA2H- $\Delta$ 5 bestätigten die oben genannte Hypothese zum ER-Rückhaltesignal. Beide FA2H-Mutanten befanden sich im Golgi-Apparat. Eine ähnliche Umlokalisierung zum Golgi-Apparat konnte bereits für andere ER-residente Proteine mit einem mutierten ER-Rückhaltesignal nachgewiesen werden (Lonka et al., 2000, für das CLN8-Protein; Paulsson et al., 2006, für das MHC I-Komplex Protein Tapasin sowie Kabuss et al., 2005, für den UDP-Galaktosetransporter). Die Versuche mit Brefeldin A (BFA) wurden durchgeführt, um die Lokalisation der FA2H-Mutanten im Golgi-Apparat zu ermitteln. BFA zerstört den Golgi-Apparat (Klausner et al., 1992), so dass alle Golgi-Apparat spezifischen Proteine wieder ins ER zurücktransportiert werden. Dies gilt nicht für Proteine, die im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert sind (Nebenführ et al., 2002). Über Immunfluoreszenzanalysen nach BFA-Behandlung konnte ermittelt werden, dass die FA2H-K370L im Cis- oder Trans-Golgi lokalisiert ist, während sich die FA2H- $\Delta$ 5 im TGN befindet.

Es wurde ein spezifisches Peptid-Antiserum gegen die FA2H generiert, um zum einen die Lokalisation der FA2H im ER zu bestätigen und zum anderen Mausegewebe auf die Expression der FA2H hin zu analysieren. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigten die Lokalisation der FA2H im ER. Western Blot Analysen mit dem FA2H-Antiserum hingegen verdeutlichen, dass die Funktionalität des Antiserums eingeschränkt ist; nur bei einer Überexpression der FA2H erkennt das Antiserum das Protein. Möglicherweise konnte die FA2H in der Gehirngewebeprobe nicht detektiert werden, da nur wenige Zellen aller Gehirnzellen Oligodendrozyten sind, welche die FA2H exprimieren.

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die murine FA2H für die Hydroxylierung der Fettsäuren der Sphingolipide verantwortlich ist. Es wurde mit stabilen CHO-GalT-FA2H Zellen gearbeitet (Stahl et al., 1994), da die Galaktosyltransferase (CGT) bekannterweise eine höhere Affinität gegenüber  $\alpha$ -hydroxyliertem Ceramid besitzt (van der Bijl et al., 1996). Die Lipidanalysen zeigten, dass nur die FA2H-Zellklone  $\alpha$ -hydroxyliertes GalCer bilden konnten. Bei den CHO-GalT Zellen war zwar auch

eine schwache Bande auf Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten GalCers zu erkennen, aber massenspektrometrische Untersuchungen mittels MALDI-TOF bewiesen, dass CHO-GalT Zellen kein  $\alpha$ -hydroxyliertes GalCer bildeten (Eckhardt et al., 2005). Deshalb könnte vermutet werden, dass diese untere Bande wahrscheinlich kurzkettiges nicht hydroxyliertes GalCer (C16) ist. Die weitere endogene Lipidzusammensetzung der CHO-GalT-FA2H Zellen war nur minimal verändert

## **4.2 Charakterisierung des Nervensystems der FA2H defizienten Mäuse**

### ***4.2.1 Junge FA2H-KO Tiere zeigten trotz veränderter Lipidzusammensetzung fast keine neurologischen Symptome***

Die jungen FA2H defizienten Tiere zeigten auf den ersten Blick keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Lipidanalyse des zentralen Nervensystems hingegen verdeutlichte, dass die FA2H-KO Mäuse, wie erwartet, keine  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide mehr bilden konnten; weder  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid noch  $\alpha$ -hydroxyliertes Sulfatid waren noch nachweisbar. Dieses Ergebnis konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Zöller et al., 2008). Gleichzeitig stieg die Menge an nicht hydroxyliertem GalCer an, obwohl die Gesamtmenge an GalCer im Vergleich zu den WT Mäusen weiterhin signifikant reduziert war. Diese Ergebnisse beweisen, dass tatsächlich die FA2H das verantwortliche Enzym für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide im ZNS ist.

Bereits heterozygote FA2H Tiere zeigten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung, nämlich die Verringerung der Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GalCer bei gleichzeitiger Zunahme der Menge der nicht hydroxylierten Form, so dass die Gesamtmenge an GalCer gegenüber den WT Mäusen nicht verändert war. Eine ähnliche Reduktion des  $\alpha$ -hydroxylierten GalCers und eine Zunahme des nicht hydroxylierten GalCers war auch bei transgenen PLP-CGT Mäusen beobachtet worden (Fewou et al., 2005). Interessanterweise konnten diese transgenen Tiere kaum stabil kompaktiertes Myelin bilden und entwickelten eine fortschreitende Demyelinisierung. Aufgrund der nahezu unveränderten Konzentration des Gesamt-GalCers, wurde dieser myelinspezifischer Phänotyp der transgenen PLP-CGT Mäuse

mit dem veränderten Verhältnis von nicht hydroxyliertem GalCer zu  $\alpha$ -hydroxyliertem GalCer begründet. Überraschenderweise zeigten aber weder die jungen heterozygoten noch die homozygoten FA2H-KO Mäuse Beeinträchtigungen bei der Myelinbildung und der Aufrechterhaltung des Myelins auf elektronenmikroskopischer Ebene (Zöller et al., 2008). Sowohl im Gehirn als auch im Ischias Nerv entwickelten FA2H Knock-out Tiere kompaktiertes Myelin mit normal dicken Myelinscheiden (Zöller et al., 2008). Dementsprechend kann die progressive Demyelinisierung der transgenen PLP-CGT Mäuse (Fewou et al., 2005) nicht auf die verringerte Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GalCer zurückgeführt werden. Eine mögliche Ursache für den Phänotyp der transgenen PLP-CGT Maus könnte die Synthese des Monogalaktosyldiglycerids oder der erhöhte Umsatz von GalCer sein. Lipidanalysen zeigten, dass die FA2H defizienten Tiere Veränderungen in der Zusammensetzung der Myelinlipide aufwiesen. Eine weitere Frage war, ob die FA2H Defizienz ebenfalls Auswirkungen auf myelinspezifische Proteine, wie das Myelin basische Protein (MBP), das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM-120) oder das Myelin assoziierte Glykoprotein (MAG) hat. Western Blot Analysen von Gehirn- bzw. Myelinproben konnten jedoch keine veränderte Expression der untersuchten Myelinproteine detektieren. Dieser Befund spricht für eine normale Ausbildung des Myelins.

Defizite in der Differenzierung bzw. bei der Reifung von Oligodendrozyten, hervorgerufen durch das Fehlen von GalCer oder Sulfatid (Bansal et al., 1999), können über das Verhältnis der zwei Isoformen von MAG zueinander ermittelt werden. Es handelt sich hierbei um zwei Spleiß-Varianten, das kurze MAG (S-MAG) und das lange MAG (L-MAG), deren Verhältnis während der Reifung der Oligodendrozyten ansteigt (Fujita et al., 1998). Dieser Anstieg ist dadurch begründet, dass die Menge an S-MAG mit zunehmendem Alter der Mäuse größer wird, während sich die Konzentration an L-MAG stetig verringert. In CGT-KO Mäusen hingegen bleibt die Menge an L-MAG immer auf dem gleichen Niveau und der Anstieg der S-MAG Konzentration ist nicht mehr zu detektieren (Coetzee et al., 1998; Marcus et al., 2000). Das über RT-PCR ermittelte S-MAG/L-MAG Verhältnis von zehn und 28 Tage alten FA2H-KO und WT Mäusen zeigte bei beiden Genotypen den erwarteten Anstieg. Dies bedeutet, dass die Oligodendrozytenreifung in den FA2H defizienten Tieren nicht beeinträchtigt war.

Immunfluoreszenzanalysen von primären Oligodendrozyten konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Differenzierung der Oligodendrozyten zwischen den einzelnen Genotypen detektieren. Sowohl bei WT als auch FA2H-KO Tieren nahm die Anzahl der MBP positiven Oligodendrozyten während der Differenzierung zu. Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\alpha$ -hydroxyliertes GalCer nur bedingt essentiell für die Differenzierung von Oligodendrozyten ist, denn auch bei einer signifikanten Reduktion der Menge des Gesamt-GalCers können Oligodendrozyten noch normal differenzieren.

Obwohl mittels elektronenmikroskopischer Analyse bereits gezeigt werden konnte (Zöller et al., 2008), dass das Myelin der Tiere ohne FA2H normal kompaktiert war, galt es zu ermitteln, welchen Einfluss die FA2H Defizienz auf die sogenannten „detergent resistant membranes“ (DRM; Membranmikrodomänen, die gegenüber einer Inkubation mit Detergenzien stabil sind) hat (Pike, 2004). Möglicherweise spielen die DRMs eine wichtige Rolle bei der Myelinbildung und dessen Aufrechterhaltung (Kim & Pfeiffer, 1999). Zunächst wurde das kompakte Myelin aus Mausgehirnen von Tieren verschiedener Altersstufen isoliert. Bei den FA2H-KO Mäusen konnte unabhängig vom Alter ca. 25-30% weniger kompaktes Myelin, das in Interphase zwischen 10,5% und 30% Saccharose schwebt, isoliert werden. Aufgrund des Fehlens der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide ist der Gesamt-Lipidgehalt in den FA2H defizienten Tieren um ca. 15% vermindert im Vergleich zu den WT Mäusen. Der weitere Verlust an Myelin von 10-15% muss eine andere Ursache haben. Vielleicht ist die Dichte des Myelins der FA2H defizienten Tiere durch das Fehlen der Hydroxylgruppen verändert, so dass es in der Dichtezentrifugation nicht in der gleichen Phase zu finden ist, wie das kompakte Myelin der WT Kontrollen (Idkowiak-Baldys et al., 2004). Es wird vermutet, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung eine erhöhte Stabilität der Myelinmembranen bewirkt (Graf et al., 2002), indem zusätzliche Bindungsstellen für Wasserstoffbrückenbindungen bzw. für die Komplexbildung von Ionen geschaffen werden. Hydroxylierte Lipide können stärkere Bindungen eingehen als nicht hydroxylierte (Koshy et al., 1999). Die Vermutung, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe zur Stabilisierung des Myelins beiträgt, konnte durch die Untersuchungen der DRMs der FA2H defizienten Tieren nicht bestätigt werden. Die Verteilung der Myelinlipide zeigte keinen Einfluss auf eine Behandlung mit CHAPS. Die nach Dichtezentrifugation isolierten Lipide der FA2H-KO Mäuse waren ebenso, wie die Lipide der WT Kontrollen, in den DRM

Fraktionen zu finden. Möglicherweise spielt das verwendete Detergenz eine entscheidende Rolle in der Lokalisation der Lipide in oder außerhalb der DRM Fraktionen. So sind PLP und MAG nach einer Inkubation mit Triton X-100 in der DRM Fraktionen zu finden, während sie nach einer CHAPS Behandlung sowohl in den DRMs als auch außerhalb der DRM Fraktionen detektierbar sind (Simons et al., 2000; Taylor et al., 2002).

Der Ranviersche Schnürring, ein unmyelinisierter Bereich des Axons, ist entscheidend für die schnelle saltatorische Erregungsweiterleitung. Im angrenzenden paranodalen Bereich ist neben den Kaliumkanälen ein neuronales Glykoprotein, Paranodin oder Caspr (Contactin assoziiertes Protein) genannt (Peles et al., 1997), auf beiden Seiten des Ranvierschen Schnürrings lokalisiert (Menegoz et al., 1997), während die Natriumkanäle im nodalen Bereich angereichert sind.

Forschungen von Dupree et al., 1999, an CGT-KO Mäusen zeigen, dass Galaktosylceramid und Sulfatid essentiell sind für die Struktur des paranodalen Bereiches und damit für den Informationsfluss zwischen Neuronen und Gliazellen am Ranvierschen Schnürring. Bei einer Destabilisierung dieser Zellkontakte, hervorgerufen durch den Verlust an GalCer oder Sulfatid, kann daraus eine Misslokalisierung von Paranodin in den internodalen Bereich resultieren, genauso wie eine Umverteilung der Kaliumkanäle (Dupree et al., 1999), wie es bei den CGT-KO Tieren der Fall ist. Bereits in CST-KO Mäusen, die kein Sulfatid besitzen, treten schwerwiegende Veränderungen des paranodalen Bereichs auf. Sowohl im ZNS als auch im PNS ist die Anzahl der Natrium- und Kaliumkanäle herabgesetzt. Ebenso kommt es zu einer diffusen Verteilung von Paranodin in den nodalen Bereich (Ishibashi et al., 2002). Mäuse, die defizient für Paranodin sind, können keine normale paranodale Region mehr ausbilden; Folgen sind fehlende Kontakte zwischen Axonen und Gliazellen am Ranvierschen Schnürring (Rios et al., 2003), obwohl sie noch normal kompaktes Myelin besitzen. Da die FA2H defizienten Mäuse ebenfalls Veränderungen in der Zusammensetzung von GalCer und Sulfatid mit normal kompaktierten Myelin aufwiesen, wurde der paranodale Bereich auch bei diesen Tieren näher untersucht. Der optische Nerv diente als Beispiel für das zentrale Nervensystem und die auseinander gezogenen Fasern des Ischias Nervs („Teased Fibers“ nach Altevogt et al., 2002) als repräsentativer Teil des peripheren Nervensystems. In den Tieren ohne FA2H konnten jedoch keine Unterschiede in der Verteilung und der Länge der Paranodin-Paare beobachtet werden, ebenso wenig wie

Veränderungen der Natriumkanäle nachweisbar waren. Diese Resultate führten zu dem Schluss, dass die Aufrechterhaltung der paranodalen Region unabhängig von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden ist.

Um festzustellen, ob das normal kompaktierte Myelin funktionelle Beeinträchtigungen bei den Tieren ohne FA2H aufwies, wurden zum einen Verhaltenstests durchgeführt und zum anderen die Nervenleitgeschwindigkeit gemessen.

Der Rotarod-Test gibt Aufschluss über Defizite der Bewegungskoordination von Vorder- und Hinterläufen (Kuhn et al., 1995). Eine Beeinträchtigung der Informationsweiterleitung entlang des Axons kann in einer Verminderung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse resultieren. Ein motorischer Defekt liegt vor, wenn die FA2H-KO Tiere signifikant häufiger von der Walze fallen als gleichaltrige Kontrollmäuse. Beim Rotarod-Test konnten jedoch unabhängig vom Alter keine Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet werden. Der Open Field Test untersucht das explorative Verhalten und die Aktivität der Mäuse, wie agil sie sind und wie häufig sie sich aufrichten bzw. springen. Hier waren Unterschiede zwischen den WT und FA2H-KO Tieren zu beobachten. Die FA2H defizienten Tiere verbrachten weniger Zeit springend bzw. aufgerichtet. Desweiteren hielten sich diese Mäuse hauptsächlich am Rand der Box auf, woraus geschlossen werden konnte, dass diese Tiere ängstlicher und weniger „explorativ“ waren als ihre WT Altersgenossen. Diese Resultate könnten damit erklärt werden, dass die neuronale Erregungs- und Informationsweiterleitung gestört ist, woraus eine reduzierte Aktivität resultiert.

Die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit konnte diese Vermutung nicht bestätigen. Die FA2H-KO Tiere zeigten eine mit den Kontrollen vergleichbare Erregungsweiterleitung. Diese Ergebnisse sowie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Zöller et al., 2008) widerlegen die Theorie von Kishimoto, 1986, die besagt, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide direkt mit der Bildung von kompaktem Myelin sowie der Myelindicke und somit mit der Nervenleitgeschwindigkeit gekoppelt ist. In CGT-KO Tieren, deren Axone nicht mehr komplett myelinisiert sind und deren paranodale Region Störungen aufwies, war eine verringerte Nervenleitgeschwindigkeit zu beobachten (Coetzee et al., 1996a; Bosio et al., 1996b; Dupree et al., 1998b). Die Untersuchungen an den FA2H-KO Mäusen zeigten jedoch deutlich, dass  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide keinen direkten Einfluss auf die Kompaktierung der Myelinscheiden und auf die

Erregungsweiterleitung haben. Möglicherweise ist nicht die  $\alpha$ -Hydroxylierung entscheidend für die Stabilität des Myelins und damit der Nervenleitgeschwindigkeit, wie bisher vermutet wurde (Graf et al., 2002), sondern die Gesamtmenge an Glykosphingolipiden oder Gangliosiden, die bei den FA2H defizienten Mäusen kaum verändert war.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der biochemischen Analyse des Nervensystems der jungen FA2H-KO Mäuse daraufhin, dass zwar die Lipidzusammensetzung des Myelins verändert ist, diese Veränderungen jedoch keine Auswirkungen auf die Funktion des Myelins besitzen.

#### ***4.2.2 Alte FA2H-KO Mäuse entwickelten eine axonale Degeneration***

Wie schon bei den jungen Mäusen, die keine Fettsäure-2-Hydroxylase mehr besitzen, fehlten  $\alpha$ -hydroxyliertes Galaktosylceramid und Sulfatid sowie die  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide im zentralen und peripheren Nervensystem der ca. 22 Monate alten FA2H-KO Tiere. Trotz des Anstiegs des nicht hydroxylierten GalCers war die Gesamtmenge dieses Lipids signifikant reduziert, während keine Veränderung in der Gesamtmenge des Sulfatids feststellbar war. Die Expression des Myelin basischen Proteins (MBP) war auch in den alten FA2H defizienten Tieren nicht verändert im Vergleich zu den Kontrollen. Ebenso konnten ,unabhängig vom Detergenz, keine Unterschiede in der Lokalisation der Lipide innerhalb oder außerhalb der Fraktionen der „detergent resistant membranes“ (DRMs), nachgewiesen werden, obwohl die 22 Monate alten Tiere erneut ca. 25-30% weniger kompaktes Myelin besaßen. Wie bereits bei den jungen FA2H defizienten Tieren, konnte dieser Verlust an kompaktem Myelin nicht geklärt werden. Es kann nur spekuliert werden, dass es zu strukturellen Veränderungen des Myelins bzw. zu Kompaktierungsdefiziten kommt. Elektronenmikroskopische Analysen des verlängerten Hirnstamms ergaben, dass bei 18 Monate alten FA2H-KO Mäusen eine erste Degeneration der Axone gekoppelt mit dem Beginn einer Dekompaktierung der Myelinscheiden feststellbar war. An den dekompartiiten Stellen des Myelin kam es zu einer Ansammlung von fibrillärem Material, welches die Myelinschichten ersetzte. Desweiteren waren bei den FA2H-KO Mäusen oft vakuolen-ähnliche Aussparungen im Bereich der degenerierten Axone zu erkennen. Eine ähnliche Vakuolenbildung konnte bei den CGT-KO Tieren sowie den CNP1-KO Mäusen beobachtet werden (Dupree et al.,



1999 bzw. Lappe-Siefke et al., 2003). Eine späte axonale Degeneration wurde auch bei anderen Mausmutanten beschrieben, in denen verschiedene myelinspezifische Gene ausgeschaltet wurden. Erst im fortschreitenden Alter der Mäuse tritt eine Myelindekompaktierung auf, z.B. bei den PLP-KO (Griffith et al., 1998; Edgar et al., 2004) oder bei den CNP1-KO Tieren (Lappe-Siefke et al., 2003). Werner et al., 2007, vermuteten, dass diese späte Manifestierung der Dekompaktierung des Myelins in den PLP-KO Mäusen, auf Störungen in den Transportwegen verschiedener Proteine zurückzuführen ist. Die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) abhängige Deacetylase Sirtuin 2 (Sirt2), die hauptsächlich in Oligodendrozyten exprimiert wird und dort mit PLP in den DRMs assoziiert ist, konnte in den PLP-KO Mäusen auf Protein-Ebene nicht mehr nachgewiesen werden. Die Mengen verschiedener retrograder Transportproteine, wie Dynein und Dynactin waren in den PLP-KO Mäusen ebenfalls verändert (Edgar et al., 2004), ein möglicher Grund, warum Sirt2 nicht mehr zum Myelin transportiert werden konnte. Diese sekundären molekularen Veränderungen der PLP-KO Maus, die bereits 15 Tage nach der Geburt zu beobachten waren, führten jedoch erst Wochen bzw. Monate später zur Dekompaktierung des Myelins und zur axonalen Degeneration. Eine mögliche Ursache der axonalen Degeneration könnte in der Instabilität der Mikrotubuli begründet liegen (Werner et al., 2007), denn sowohl Sirt2 als auch CNP spielen eine wichtige Rolle bei der Mikrotubuli-Regulierung bzw. deren Aufbau. Veränderungen der Mikrotubuli der Oligodendrozyten könnten in Störungen des vesikulären Transports bestimmter Myelinproteine resultieren, dadurch würde deren Einbau in die Plasmamembran von Oligodendrozyten verändert sein, so dass die Informationsweiterleitung zum Axon und somit die Versorgung der Nervenfasern mit Nährstoffen bzw. Sauerstoff gestört wäre. Es käme zu einer Degeneration der Axone (Nave & Trapp, 2008). Möglicherweise spielen aber nicht nur verschiedene Myelinproteine, sondern auch  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide eine entscheidende Rolle bei der Kommunikation zwischen Axon und Gliazellen und somit beim Transport verschiedener Myelinproteine.

Die axonale Degeneration war aber nicht nur im ZNS zu beobachten, sondern wurde in den Ischias Nerven von 18-24 Monate alten FA2H defizienten Tieren besonders deutlich. Neben dem Verlust an Axonen war eine massive Demyelinisierung der Nerven zu erkennen, gekoppelt mit einer stark verminderten Anfärbbarkeit der Nerven mit Toluidin-Blau. Desweiteren entwickelten etwa. die Hälfte aller über

20 Monate alter FA2H-KO Tiere eine Lähmung der hinteren Extremitäten, die soweit führte, dass diese Mäuse zum Schluss nicht mehr stehen konnten. Bei den transgenen PLP-CGT Tieren (Fewou et al., 2005) war eine ähnliche Lähmung der Hinterläufe zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide entscheidend sind für die späte Aufrechterhaltung des Myelins, vor allem im PNS.

Die Ergebnisse der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit von isolierten Ischias Nerven von 20-24 Monate alten FA2H defizienten Mäusen standen nicht im Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen der Demyelinisierung im PNS. Die saltatorische Erregungsweiterleitung der FA2H Knock-out Tieren war vergleichbar mit der gleichaltrigen Kontrollgruppe. Aufgrund von Schwankungen der Messwerte der einzelnen Tiere untereinander, die möglicherweise auf Unterschiede bei der Präparation der Nerven zurückgeführt werden können, war die Standardabweichung recht hoch, so dass kein signifikanter Unterschied detektierbar war. Vermutlich besaßen die FA2H defizienten Tiere trotz der zu beobachteten Demyelinisierung der Ischias Nerven, immer noch einige Axone, die nicht demyelinisiert waren und das Aktionspotential weiterleiten konnten. Bei dieser Untersuchung der Nervenleitgeschwindigkeit wurden nur die am schnellsten leitenden Fasern in der Messung berücksichtigt, deshalb konnte keine signifikant reduzierte Erregungsweiterleitung der FA2H-KO Tiere detektiert werden. Wie bereits bei den jungen Tieren erwähnt, widerlegen diese Resultate die Hypothese von Kishimoto, 1986, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung einen Einfluss auf die Kompaktierung des Myelins und auf die Erregungsweiterleitung hat.

Das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Untersuchung der paranodalen Region der Ischias Nerven von 22-24 Monate alten FA2H defizienten Mäusen war heterogen. Die „Teased Fibers“ von zwei untersuchten FA2H Knock-out Tieren zeigten eine mit heterozygoten Kontrollen vergleichbare Lokalisation von Paranodin, wohingegen die Verteilung von Paranodin bei einem weiteren FA2H-KO Tier bei einigen Fasern eher diffus war. Die Färbung reichte teilweise bis in den nodalen Bereich hinein, wie es bereits bei den CGT- und CST-KO Mäusen, aber auch bei der sogenannten „Shiverer-Maus“, die Mutationen im MBP-Gen aufweist (Rasband et al., 1999a), der Fall ist. Weiterhin war im ZNS letzterer Mäuse die Anzahl der Natriumkanäle drastisch reduziert und ihre Lokalisation ebenfalls verändert (Rasband et al., 1999a); im optischen Nerv kam eine Misslokalisierung der Kaliumkanäle hinzu (Rasband et

al., 1999b). Obwohl die FA2H-KO Mäuse eine beginnende Demyelinisierung im zentralen Nervensystem zeigten, konnten keine Veränderungen in der Paranodin-Färbung im Rückenmark und im optischen Nerv von alten FA2H-KO Mäusen beobachtet werden. Wiederholte Untersuchungen mit weiteren Tieren bestätigten die Beobachtung, dass FA2H defiziente Mäuse bei einigen Fasern eine diffuse Verteilung von Paranodin aufwiesen, jedoch konnte diese Misslokalisierung nicht mit dem Auftreten einer Lähmung der hinteren Extremitäten gekoppelt werden.

Immunfärbungen der auseinander gezogenen Fasern des Ischias Nervis mit einem Antikörper gegen ein weiteres paranodales Adhäsionsmolekül, NF155, die bei den FA2H-KO Tieren teilweise ebenfalls eine diffuse Lokalisation aufwies, deuteten darauf hin, dass eine FA2H Defizienz Auswirkungen auf den paranodalen Bereich des Ranvierschen Schnürrings hat. Kir 4.1 Kaliumkanal-KO Mäuse entwickelten, ebenso wie die FA2H defizienten Tiere, eine Lähmung der Hinterläufe; obwohl die Lähmung bei dieser Mausmutante erheblich früher auftrat (Neusch et al., 2001), was noch einmal die Bedeutung der Kaliumkanäle für die Struktur der paranodalen Region und für die Erregungsweiterleitung im PNS unterstreicht.

Die späte axonale Degeneration wird in den oben bereits erwähnten PLP und CNP Mausmutanten, aber auch in der ATPase-KO Maus (Ferreirinha et al., 2004), häufig von einer Beeinträchtigung des axonalen Transports begleitet, was zum Anschwellen der Axone und damit zur Akkumulation von nicht phosphoryliertem Neurofilament (Nave & Trapp, 2008) und von Membranorganellen, wie den „dense bodies“ und den Mitochondrien, distal zum Ranvierschen Schnürring führt (Lappe-Siefke et al., 2003; Edgar et al., 2004; Rasband et al., 2005). Immunhistochemische Färbungen gegen das „Amyloid Precursor Protein“, mit dem eine Verkürzung der Axone sowie deren Anschwellen nachgewiesen werden kann, konnten keine veränderten Axone der FA2H-KO Mäuse, im Vergleich zum WT, aufzeigen. Ebenfalls zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, durchgeführt von Herrn Prof. Dr. Hartmann, Anatomisches Institut, Universität Bonn, keine Akkumulation von Organellen an den Schnürringen. Somit konnte die axonale Degeneration der alten Tiere ohne FA2H nicht mit Störungen im axonalen Transport begründet werden.

Abschließend zeigten die Analysen des Nervensystems der FA2H defizienten Mäuse, dass der Verlust der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide keinen Einfluss auf den Beginn der Myelinisierung und auf die Reifung der Oligodendrozyten hat. Hingegen ist die  $\alpha$ -Hydroxylierung für die Aufrechterhaltung der Funktionalität des Myelins in alten

Tieren bedingt notwendig. Möglicherweise führt die Defizienz an  $\alpha$ -hydroxyliertem GalCer und Sulfatid zu Störungen im Informationsfluss zwischen Neuronen und Gliazellen. Das Endresultat ist eine späte Dekompaktierung des Myelins mit Ablagerungen von fibrillärem Material und eine axonale Degeneration.

Ende 2008 wurden erstmal Mutationen im humanen FA2H-Gen beschrieben, die bei den neun betroffenen Patienten schon in der Kindheit zu Lähmungen der unteren Extremitäten, zu spastischen Anfällen, zu kognitiven Fehlfunktionen und zu Degenerationen der weißen Substanz im Gehirn führten (Edvardson et al., 2008). Diese ersten Symptome konnten zu Beginn der Myelinisierung festgestellt werden, während bei älteren Patienten (17-18 Jahre), in Übereinstimmung mit den FA2H-KO Mäusen, eine beginnende axonale Degeneration zu beobachten war. Bei sieben der neun Patienten wurde eine zusätzliche Base in Exon 5 in eine Spleißstelle inseriert, was zu einem verkürzten und damit inaktiven FA2H-Protein ohne Exon 5 und 6 führte (Edvardson et al., 2008). Zwei der neun Patienten hatten eine Punktmutation im FA2H Gen, welche zu einem Aminosäure-Austausch eines konservierten Aspartatrestes gegen einen Tyrosinrest (D35Y) in der Cytochrom b5-Domäne führte, die eine kritische Rolle für die Hydroxylase-Aktivität des Enzyms besitzt. Bei Messungen der *in vitro* Enzymaktivität konnte keine Aktivität der FA2H nachgewiesen werden, so dass die D35Y Punktmutation zu einer inaktiven FA2H führt (Edvardson et al., 2008). Im Widerspruch dazu, bewiesen eine metabolische Markierung von Zellen, die mit der FA2H transfiziert waren (Frau Helena Maier und Herr Matthias Eckhardt, persönliche Mitteilung), dass die Punktmutante D35Y nicht inaktiv, sondern nur in ihrer Aktivität reduziert ist. Die daraus resultierende Restaktivität der FA2H im Gehirn, könnte erklären, dass die beiden Patienten mit der Punktmutation, im Gegensatz zu den anderen sieben Patienten, keine zerebralen Auffälligkeiten zeigten.

### **4.3 Untersuchungen der FA2H/CGT-Doppel-KO Mäuse**

CGT-KO Tiere besitzen kein Galaktosylceramid und Sulfatid. Trotzdem bilden sie noch Myelin. Es wurde angenommen, dass der Anstieg der Menge an hauptsächlich  $\alpha$ -hydroxyliertem Glukosylceramid und  $\alpha$ -hydroxyliertem Sphingomyelin (Bosio et al., 1998a) den Verlust der anderen Lipide zum Teil kompensierte und so die Bildung von Myelin ermöglichte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden CGT-KO

Mäuse mit einer zusätzlichen Defizienz der FA2H generiert. Diese Tiere synthetisierten nur noch nicht hydroxyliertes GlcCer und Sphingomyelin.

Erstaunlicherweise zeigten die FA2H(-)/CGT(-) Mäuse keinen anderen Phänotyp als die CGT-KO Tiere. Die Lebensspanne beider Mausmutanten war vergleichbar; die Tiere starben nach ca. 4-6 Wochen, nachdem sie zuvor auch den charakteristischen Körpertremor entwickelt hatten (Bosio et al., 1996b; Coetzee et al., 1996a). Die ältesten FA2H(-)/CGT(-) Mäuse überlebten ca. 10 Wochen, Die Menge an isolierbarem kompakten Myelin war bei den FA2H-KO Tieren um 25% verringert, während die Mäuse ohne CGT eine signifikante Reduktion des kompakten Myelins um 40% und die Doppel-KO Tiere einen signifikanten Verlust von 50% (additiver Verlust FA2H und CGT) im Vergleich zu den Kontrollmäusen aufzeigten.

Lipidanalysen zeigten, dass die FA2H(-)/CGT(-) Tiere im ZNS nur eine sehr geringe Menge an nicht hydroxyliertem GlcCer bildeten, wohingegen im PNS die Menge an GlcCer der Doppel-KO Mäuse gegenüber den CGT-KO Tieren nicht signifikant erniedrigt war. Diese Unterschiede in der Menge an nicht hydroxyliertem GlcCer und  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer im ZNS lassen vermuten, dass möglicherweise nur nicht hydroxyliertes GlcCer als Substrat der Laktosylsynthase fungieren kann und in komplexere Glykolipide umgewandelt wird, während  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer nicht als Substrat dient und deshalb in größerer Menge im ZNS zu finden ist. Außerdem hat es den Anschein, dass der Transport von Sphingolipiden in Oligodendrozyten und in Schwannzellen unterschiedlich geregelt ist.

Sowohl FA2H(-)/CGT(-) Tiere als auch CGT-KO Mäuse besaßen signifikant mehr Sphingomyelin als die Kontrollen; bei letzteren zurückzuführen auf die Synthese des hydroxylierten Derivats (Bosio et al., 1998a; Coetzee et al., 1998). Obwohl die Doppel-KO Tiere im Myelin ca. 70% weniger Glukosylceramid im Vergleich zu den CGT-KO Mäusen bildeten, waren keine phänotypischen Unterschiede zwischen den Mäusen nachweisbar. Nur elektronenmikroskopische Aufnahmen des Myelins der FA2H(-)/CGT(-) Tiere würden Aufschluss darüber geben, welche genauen Auswirkungen dieser Verlust an Glukosylceramid auf die Myelinisierung und damit auf die Kompaktierung des Myelins gegenüber den CGT-Einzel-KO Tieren hat.

Lipiduntersuchungen des Ischias Nervs von CGT defizienten Mäusen hatten vermuten lassen, dass diese Tiere möglicherweise hydroxyliertes, sulfatiertes GlcCer

bilden (Bosio et al., 1998a), aber im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte der Befund nicht bestätigt werden. Die massenspektrometrische Auswertung der Ischias Nerven mittels ESI-Ionenfalle konnte weder bei den CGT-KO Mäusen noch bei den FA2H(-)/CGT(-) Tieren Massenpeaks für hydroxyliertes bzw. nicht hydroxyliertes sulfatiertes GlcCer nachweisen.

Analysen der DRMs erbrachten keine Unterschiede in der Verteilung der Lipide bezüglich der Lokalisation in den DRM Fraktionen. Bei allen vier untersuchten Genotypen befanden sich die meisten Lipide in den Fraktionen zwei und drei. Dies deutet daraufhin, dass die FA2H(-)/CGT(-) Tiere trotz des Verlustes von GalCer und Sulfatid sowie der  $\alpha$ -Hydroxylierung, keine Beeinträchtigungen in der Stabilität des Myelins aufweisen.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen zur MBP-Expression der jungen CGT defizienten Mäuse (Coetzee et al., 1998; Dupree et al., 1998a) war bei den Proteinanalysen des ZNS und des PNS, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, keine Reduktion der MBP-Expression in den CGT-KO und den FA2H(-)/CGT(-) Tieren zu beobachten.

Zusammenfassend zeigten diese ersten Untersuchungen des zentralen und peripheren Nervensystems der FA2H(-)/CGT(-) Mäuse, dass eine gekoppelte Defizienz der FA2H und der CGT keine weiterführenden Beeinträchtigungen der Myelinbildung bedingt, als eine Defizienz der CGT alleine, da kompensatorisch nicht hydroxyliertes GlcCer und Sphingomyelin gebildet werden. Diese Ergebnisse widerlegen die Theorie, dass der Verlust an GalCer durch  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer kompensiert wird. Auch bei einer Reduktion der Menge an Glukosylceramid um ca. 70% können die FA2H(-)/CGT(-) Mäuse noch Myelin ausbilden. Diese Resultate deuten daraufhin, dass eine definierte Lipidzusammensetzung des Myelins nicht entscheidend ist für die Myelinisierung, solange kompensatorisch andere Lipide gebildet werden.

## **4.4 Einfluss der FA2H Defizienz auf die Haut und den Haarzyklus**

### ***4.4.1 Expression der FA2H in der Haut***

Northern Blot Analysen hatten gezeigt, dass die Fettsäure-2-Hydroxylase nicht nur im Gehirn sondern auch in der Haut exprimiert wird (Eckhardt et al., 2005). In situ Hybridisierungen an Hautschnitten, durchgeführt von Frau Inge Zöller, bestätigten diese Befunde. Uchida et al., 2007, zeigten, dass die FA2H in einer Kultur aus humanen Epidermiszellen und Keratinozyten exprimiert wird.

Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit dem FA2H-Peptid-Antiserum (siehe Ergebnisteil 3.1.2) ließen eine spezifische Expression der FA2H in den Talgdrüsen vermuten. Die Immunfluoreszenzanalyse mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper, der das Fusionsprotein aus der Cytochrom b5-Domäne und dem LacZ-Reportergen erkennt, bestätigte die Lokalisation der FA2H in den Sebozyten. Andere Bereiche der Haut waren weder mit dem Antiserum noch mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper anfärbbar. Dies spricht für eine ausschließliche Expression der FA2H in den Talgdrüsen und widerspricht den Befunden von Uchida et al., 2007, die eine Expression der FA2H in einer humanen Keratinozyten-Kultur nachweisen konnten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Keratinozyten sich zu Sebozyten differenzieren konnten, so dass  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide und eine FA2H Expression nachweisbar waren. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass in der humanen Haut die FA2H nicht in den Talgdrüsen, sondern in den Keratinozyten exprimiert wird, den Zellen der Haut, die  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide synthetisieren.

### ***4.4.2 FA2H defiziente Tiere können in der Haut noch hydroxylierte Lipide bilden***

Hydroxylierten Sphingolipiden wird eine wichtige Rolle bei der Barrierefunktion der Haut nachgesagt (Wertz & van den Bergh, 1998). Die Hydroxylgruppen der Fettsäurereste der Sphingolipide der Keratinozyten sollen die Haut vor einem zu hohen Wasserverlust schützen. Forschungen an einer Mausmutante, die eine Defizienz des Transkriptionsfaktors Arnt aufweist und keine 4-hydroxylierten Sphingolipide mehr bilden kann (Tagaki et al., 2003), verdeutlichen die Wichtigkeit der Hydroxylierung, denn bei diesen Tieren kommt es zu einem sehr hohen

transepidermalen Wasserverlust und damit zum frühen Tod der Tiere. Mäuse, die eine Mutation im Gen der „Elongase 4 für sehr lange Fettsäuren“ aufweisen, sterben bereits fünf bis sechs Stunden nach der Geburt, ebenfalls aufgrund eines sehr hohen Wasserverlustes (Li et al., 2007). Die Beeinträchtigung der Wasserbarriere der Haut wird bei diesen Tieren von einem Verlust der  $\omega$ -hydroxylierten Ceramide mit sehr langen Fettsäuren (C30-36) begleitet.

Der Zusammenbruch der Wasserbarriere konnte bei den FA2H-KO Tieren zwar nicht beobachtet werden, jedoch war bei diesen Mäusen eine Abschuppung der Haut zwischen P6 und P8 gut zu erkennen. Lipidanalysen zeigten, dass in der Haut trotz der FA2H Defizienz, noch  $\alpha$ -hydroxyliertes Glukosylceramid und Ceramid gebildet werden. Dies könnte erklären, warum bei den FA2H-KO Tieren kein transepidermaler Wasserverlust über die Haut nachgewiesen werden konnte, denn Glukosylceramid und Ceramid sind die wichtigsten Komponenten der Wasserbarriere (Jennemann et al., 2007). In der Haut der Ohren, die reich an Talgdrüsen ist, war die Konzentration des hydroxylierten GlcCers (besonders des GlcCers mit einer C20 Fettsäure) und der hydroxylierten Ceramide (Herr Roger Sandhoff, persönliche Mitteilung) im Vergleich zur Epidermis deutlich verringert. Hydroxyliertes Ceramid mit einer C20 Fettsäure wird hauptsächlich von der Ceramidsynthase Lass 4 synthetisiert, die in den Talgdrüsen der Haut lokalisiert ist (Herr Matthias Eckhardt, persönliche Mitteilung). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass das in den Ohren reduzierte hydroxylierte GlcCer von der FA2H gebildet wird, und dass für die Synthese weiterer  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide in der Haut ein zweites Enzym verantwortlich sein muss. Die Gesamtmenge an Typ II Wachsdiestern, mit Fettsäuren veresterte 1,2 Dirole des Sebums, war in den FA2H defizienten Tieren deutlich reduziert, bei einem gleichzeitigen Anstieg der Menge an Wachsmoestern. Mäuse ohne FA2H wiesen eine deutliche Verringerung der Menge an langkettigen Diolen auf (Herr Matthias Eckhardt, persönliche Mitteilung). Daraus kann gefolgert werden, dass die FA2H hauptsächlich die Synthese der langkettigen Dirole katalysiert, während ein zweites Enzym existieren muss, dass für die Bildung der kurzkettigen Dirole verantwortlich ist.



#### ***4.4.3 Die FA2H Defizienz führt zu einem zyklischen Haarverlust***

Bereits während der Morphogenese (P10) produzierten die Talgdrüsen der FA2H-KO Tiere mehr Sebum. Diese vermehrte Talgbildung blieb über den gesamten Haarzyklus hinweg erhalten, so dass sich die Haarkanäle mit Lipid zusetzten. Dies korrelierte zum einen mit einer verzögerten ersten sichtbaren Behaarung (P8-9 anstelle von P6-7) und zum anderen mit einem zyklischen Haarverlust, der sich ca. alle vier Wochen wiederholte. Wenn die FA2H defizienten Tiere die Ruhephase im Haarzyklus erreichten verloren sie ihr Rückenfell, das zunächst wieder nachwuchs. Mit jedem weiteren Haarzyklus konnten immer weniger Haare nachwachsen, so dass das Fell mit fortschreitendem Alter der Mäuse immer dünner wurde, bis ca. ein Jahr alte Tiere fast kein Rückenfell mehr besaßen. Ein ähnlicher Verlust des gesamten Rückenfalls ist für die durch spontane Mutation entstandene Mauslinie „Defolliculated“ (Porter et al., 2002) beschrieben, in der die Talgdrüsen weniger Sebum produzierten.

In der ersten telogenen Phase der Morphogenese waren die Haarkanäle der Tiere ohne FA2H nicht nur mit mehr Lipid verstopft, sondern auch die Haarkanalöffnungen waren deutlich vergrößert, im Vergleich zu WT Mäusen, die sich in der gleichen Wachstumsphase befanden. Sowohl die vermehrte Talgbildung als auch der offene Haarkanal könnten dazu führen, dass die Haare bei den FA2H defizienten Tieren nicht so fest verankert waren und deshalb leichter ausfielen. Bei der Cathepsin-L-KO Maus, die zum „Furless“ Phänotyp führt, wurde die Haarkanalerweiterung und das Defizit der Verankerung des telogenen Haars im Haarkanal für den periodischen Haarverlust verantwortlich gemacht (Roth et al., 2000). Überraschenderweise war die Anzahl der Haarfollikel in älteren FA2H-KO Mäusen trotz des zyklischen Haarverlustes vergleichbar zu gleichaltrigen Kontrollmäusen. Diese Resultate verdeutlichen, dass die FA2H Knock-out Mäuse zwar Anzeichen einer beginnenden Haarfollikeldystrophie (offener Haarkanal) aufwiesen, diese aber nicht durch den Verlust der Haarfollikel oder durch eine Melanineinlagerung bestätigt werden konnte. Übereinstimmend hiermit waren morphologisch keine Veränderungen im Aussehen der Haarfollikel nachweisbar. Nur mit Hilfe von elektronenmikroskopische Aufnahmen könnte geklärt werden, ob die Haarfollikel der FA2H defiziente Mäusen Beeinträchtigungen in der Verankerung in der inneren (IRS) oder in der äußeren Wurzelschicht (ORS) aufweisen.

#### ***4.4.4 FA2H-KO Mäuse zeigten eine Verschiebung des Haarzyklus***

Neben dem oben beschriebenen zyklischen Haarverlustes der FA2H defizienten Tiere während der Ruhephase, zeigten diese Mäuse weiterhin eine Verschiebung des Haarzyklus um etwa zwei Tage. Viele verschiedene innere und äußere Faktoren haben einen Einfluss auf den empfindlichen Prozess des Haarzyklus, der von der dermalen Papille aus gesteuert wird (Jahoda & Reynolds, 1993). So ist es nicht verwunderlich, dass eine Veränderung von verschiedenen Faktoren gravierende Folgen auf den Haarzyklus hat, wie es z.B. bei *Blimp1* (Horsley et al., 2006); *c-Myc* (Bull et al., 2005); *Ectodysplasin* (Cui et al., 2003; Fessing et al., 2006) und *Sonic Hedgehog* (Allen et al., 2003) beobachtet werden konnte.

Die Verschiebung des Haarzyklus bei den FA2H defizienten Mäusen wurde von einer Zunahme der Hautdicke während der anagenen Wachstumsphase begleitet. Von Tag 10 an, wenn sich die Haut in der Proliferationsphase befindet, war die Hautdicke der FA2H Knock-out Tiere im Vergleich zum Wildtyp vergrößert, bis zu dem Zeitpunkt, an dem der Haarzyklus beider Genotypen in die telogene Phase überging (P19-20 bei WT und P21-22 bei KO). Dies galt sowohl für die Dermis als auch für die Subkutis. Immunfärbungen mit Antikörpern gegen die epidermisspezifischen Keratine K1 und K5 konnten keinen Unterschied in der Dicke der Epidermis zwischen FA2H-KO und WT aufzeigen. Im Telogen gab es keine Größenunterschiede in der Hautdicke.

Ungefähr 17 Tage nach der Geburt endet in der Regel die anagene Phase bei WT Mäusen (Sundberg & King, 1996) und der Haarzyklus geht in die katagene Regressionsphase über, die ca. zwei bis drei Tage dauert und mit der telogenen Ruhephase bei P20 endet. Dieser Haarzyklus konnte bei den WT Tieren beobachtet werden. Die FA2H-KO Mäuse hingegen, zeigten erst ab P18-19 erste katagene Haarfollikel. Das telogene Stadium erreichten die Tiere 21-22 Tage nach der Geburt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nur die anagene und nicht die katagene Phase verlängert war, in Übereinstimmung mit der Zunahme der Hautdicke im Anagen. Es wurden jedoch keine Hinweise auf eine Verlängerung der Leithaare gefunden.

Der Übergang von der anagenen in die katagene Phase wird zum Teil durch den Fibroblastenwachstumsfaktor 5 (FGF5) induziert, dessen Deletion in einer verlängerten Wachstumsphase mit deutlich verlängerten Haaren resultiert, wie es bei der Angora-Maus (Hébert et al., 1994) zu beobachten ist. Die Defizienz eines weiteren Wachstumsfaktors, dem TGF- $\beta$ 1 (transformierender Wachstumsfaktor) hat

ebenfalls Auswirkungen auf den Übergang des Haarzyklus vom Anagen zum Katagen, so dass auch hier die anagene Wachstumsphase verlängert ist (Foitzik et al., 2000). Obwohl die Haarlänge der Leithaare der FA2H defizienten Mäuse nicht verändert war, würde die Analyse bezüglich verschiedener Wachstumsfaktoren Aufschluss darüber geben, ob eine Veränderung von Wachstumsfaktoren das verlängerte Anagen bedingt. Die Mausmutante „Hairless“ verliert im Katagen ihr gesamtes Rückenfell (Panteleyev et al., 1999). Der Haarausfall wird mit einer Störung der Verbindung zwischen der dermalen Papille und dem nach oben wandernden Haarfollikel begründet, die in einem Verlust der dermalen Papille resultiert. Dieser Mechanismus kann bei den FA2H defizienten Tieren nicht der Grund des Haarausfalls im Telogen sein, da keine erkennbare Veränderung der dermalen Papille nachweisbar war. Die Msx2-KO Maus (Ma et al., 2003) verliert ebenfalls zyklisch in der katagenen Phase ihr Fell, genauso wie die Desmoglein-3-KO Maus (Koch et al., 1998). Bei beiden Mausmutanten wird die unzureichende Verankerung der Haare im Haarkanal für den Haarausfall verantwortlich gemacht. Defizite bei der Verankerung des telogenen Haares im Haarschaft konnte ebenfalls bei der Cathepsin-L-KO Maus beobachtet werden (Roth et al., 2000), woraus ein periodischer Haarverlust im Katagen/Telogen resultiert. In dieser der FA2H-KO Maus sehr ähnlichen Mausmutante ist die Haarentwicklung auch um zwei Tage verzögert und es kommt zur Hyperproliferation der Keratinozyten der Dermis und der Epidermis. Jedoch ist hier die katagene Phase verlängert.

Bei den meisten der beschriebenen Mausmutanten ist die Verschiebung des Haarzyklus mit einer Degeneration der Haarfollikel und einer Hyperproliferation der Epidermis gekoppelt, was in den FA2H-KO Tieren zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden konnte.

In der Literatur sind verschiedene Beispiele beschrieben (Paus et al., 1994b; Lindner et al., 1997; Foitzik et al., 2000; Ito et al., 2004), wie das Auszupfen des Rückenfalls (Depilation) dazu führt, dass ein neuer Haarzyklus induziert wird. Forschungen an verschiedenen Knock-out Mäusen zeigen, dass bei der Regeneration der Haarfollikel Störungen im Haarzyklus auftreten können. Bei der ARKO-KO Maus, die keinen Androgen-Rezeptor besitzt, startet das Haarwachstum nach Depilation früher als bei WT Tieren und die katagene Phase ist verlängert (Naito et al., 2008). Hingegen ist die Induktion des Anagens bei RXR-KO Mäusen (Retinoid X Rezeptor) um einige Tage verzögert (Li et al., 2001). Die Depilation der FA2H defizienten Mäuse

bedingte, dass der Haarzyklus, wie bereits während der Morphogenese, um zwei Tage nach hinten verschoben und das Dickenwachstum der Haut vergrößert war, so dass die Hautdicke erneut signifikant größer als bei WT Tieren war, die sich ebenfalls in der Regenerationsphase befanden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Haarfollikel führte zu der Annahme, dass auch nach Depilation die anagene Phase um zwei Tage verlängert war.

#### ***4.4.5 Die FA2H Defizienz führt zu einer Talgdrüsenhyperplasie***

Der zyklische Haarverlust der FA2H-KO Mäuse wurde von einer deutlichen Vergrößerung der Talgdrüsen begleitet, die nicht auf eine Größenzunahme der Talgdrüsenzellen, sondern auf eine größere Anzahl der Sebozyten zurückgeführt werden konnte. Sechs Tage nach der Geburt waren die Talgdrüsen der FA2H defizienten Tiere bereits signifikant vergrößert, im Vergleich zum WT. Möglicherweise ein Grund dafür, dass der Zeitpunkt der ersten Behaarung um zwei Tage nach hinten verschoben war. Möglicherweise hinderte die veränderte Zusammensetzung der Lipide im Sebum die Haare daran aus der Haut zu wachsen. Die Talgdrüse wurde daraufhin angeregt mehr Sebum zu produzieren, damit das Haar die Haut durchdringen kann. Dabei proliferierten die Sebozyten und die Talgdrüse wurde größer. Die Hyperplasie der Talgdrüsen konnte während der gesamten anagenen und katagenen Phase von P8 über P10 bis P20 beobachtet werden. Talgdrüsen von adulten Tieren wiesen keine Größenunterschiede mehr auf, da die Haare bereits aus der Haut gewachsen und keine proliferations-induzierenden Signale mehr vorhanden waren.

Der Zusammenhang zwischen einem Haarverlust und Veränderungen in der Talgdrüse sind nicht neu und schon für die verschiedensten Mausmutanten beschrieben.

Die Gasdermin-3-KO Maus („Defolliculated“), die ihre Haare im Katagen verliert, besitzt eine verkleinerte Talgdrüse (Lunny et al., 2005). Die nachwachsenden Haarfollikel weisen eine progressive Haarfollikeldystrophie auf, ebenso wie bei der Asebia-Maus, bei der die Stearoyl-CoA-Desaturase (Scd1) mutiert ist (Lu et al., 2004). Diese Mausmutante weist einen der FA2H defizienten Maus ähnlichen Phänotyp auf. Die anagene Wachstumsphase ist verlängert, dadurch kommt es zu einer Größenzunahme der Dermis, aber auch der Epidermis; der zyklische,

progressive Haarverlust vollzieht sich jeweils im Katagen oder Telogen, bis ältere Tiere fast haarlos sind. Die Menge der Wachsdierster und der Sterolester ist ebenfalls signifikant verringert, wodurch der transepidermale Wasserverlust der Haut vergrößert ist, der aber von den Asebia Mäusen durch vermehrtes Trinken kompensiert werden kann (Sundberg et al., 2000). Der entscheidende Unterschied der Asebia-Maus zu der FA2H-KO Maus ist die Hypoplasie der Talgdrüsen, die vermutlich zur Haarfollikeldystrophie führt. Trotzdem zeigt der Phänotyp dieser Mausmutante deutlich, dass eine Veränderung der Sebumlipide, wie die Wachsdierster, zu Störungen im Wasserhaushalt und im Haarzyklus führen kann.

In der Mausmutante „Rough Coat“, die eine reduzierte Menge an LOXL (Lysyl Oxidase like Protein) aufweist, konnte eine Hyperplasie der Talgdrüsen nachgewiesen werden, woraus ein periodischer und progressiver Haarverlust im Katagen oder Telogen resultiert (Hayashi et al., 2004). Die Talgdrüsenvergrößerung war durch eine vermehrte Anzahl an Sebozyten bedingt, während der Haarausfall auf eine Atrophie der Haarfollikel zurückgeführt werden konnte (Hayashi et al., 2004). Allerdings gab es keine Anzeichen einer Größenzunahme der Dermis, sondern nur der Epidermis. Diese Mausmutante entwickelte durch Entzündungen entstandene Geschwüre im Nacken, die ebenfalls bei der FA2H-KO Maus auftraten. Neuere Forschungen zeigen, dass der Phänotyp der „Rough Coat“ Maus auf einer Mutation im *Mpz13* Gen (Myelin Protein Zero like 3), welches für ein Zelladhäsionsmolekül codiert, beruht (Cao et al., 2007). Die daraus resultierende Adhäsionsstörung der Keratinozyten könnte möglicherweise der Grund für die Talgdrüsenhypertrophie und dem Haarverlust sein, wie es bei transgenen *c-Myc* Mäusen der Fall ist (Bull et al., 2005; Lo Celso et al., 2008).

Alle oben beschriebenen Mausmutanten der Haut zeigen zwar Gemeinsamkeiten mit dem Hautphänotyp der FA2H defizienten Maus, aber es gibt auch Unterschiede. Festgehalten werden kann, dass sehr wahrscheinlich die Veränderungen in der Talgdrüse dazu führen, dass bei der FA2H-KO Maus Probleme im Haarzyklus entstehen.

#### ***4.4.6 Der Haarverlust kann nicht auf Defizite der IRS oder der ORS zurückgeführt werden***

Bei vielen der beschriebenen Mausmutanten wurden die Veränderungen im Haarzyklus oder in der Talgdrüsengröße von einer Hyperproliferation der Epidermis begleitet [Angora (Sundberg et al., 1997); Asebia (Lu et al., 2004) und andere]. Aber weder das Keratin K1, das in der äußersten Schicht der Epidermis zu finden ist, noch das Keratin K5, das in der basalen Schicht der Epidermis und in der ORS lokalisiert ist, zeigten in den FA2H-KO Tieren eine erhöhte Expression. Zusammengenommen mit den HE-Färbungen, die auch keine deutliche Veränderung der Epidermis aufzeigten, sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die FA2H Defizienz keine Auswirkungen auf die Epidermis hat.

Horenstein und Simons, 2006, haben gezeigt, dass der Haarausfall, aufgrund einer Haarfollikeldystrophie, oft von einer Störung in der Ausbildung der inneren Wurzelschicht (IRS) begleitet wird. Obwohl bei den FA2H defizienten Tieren keine offensichtliche Haarfollikeldystrophie nachweisbar war, wurde untersucht, ob die IRS beeinträchtigt war und somit zum Haarverlust beitrug. Das Typ II Keratin K75 (Winter et al., 1998) wird in der „Companion Schicht“, die Begleitschicht zwischen der IRS und ORS, exprimiert. Während des Anagens ist die K75 Expression zuerst in der Nähe des Bulbus und später in der Balg-Region zu finden (Gu & Coulombe, 2007), genauso wie es bei spezifischen Keratinen der IRS der Fall ist (Langbein et al., 2006). Bei beiden Genotypen war die K75-Färbung bis knapp unterhalb der Talgdrüse zu erkennen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Haarausfall der FA2H defizienten Tiere nicht in einer Störung der Ausbildung der IRS begründet liegt, sondern eine andere Ursache haben muss.

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte der Grund für den progressiven Haarverlust der FA2H defizienten Tiere nicht geklärt werden. Es lässt sich nur spekulieren, welche molekularen Veränderungen diesen Haarverlust bedingen. Vermutlich ist die veränderte Talgdrüse der Auslöser dafür, dass der Haarzyklus um zwei Tage verschoben ist und die Haare zyklisch ausfallen. Es bleibt noch zu untersuchen, ob nur die veränderte Sebumzusammensetzung alleine dazu führt, dass die Haare später aus der Haut wachsen und früher ausfallen, oder ob auch die Verankerung des telogenen Haares im Haarfollikel Defizite aufweist. Weiterhin muss geklärt werden, ob ältere FA2H-KO Tiere möglicherweise doch eine Dystrophie sowie eine Atrophie der Haarfollikel zeigen.

## **4.5 Ausblick**

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Dissertation ergeben sich verschiedene Ansatzpunkte für zukünftige Projekte der genaueren Charakterisierung der FA2H-KO Maus.

Die These, dass die zusätzlichen Hydroxylgruppen der Sphingolipide die Stabilität der Myelinmembran positiv beeinflussen, konnten anhand der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Analysen mit weiteren Detergenzien oder eines kontinuierlichen Gradienten wären notwendig, um auch kleinste Stabilitätsveränderungen, hervorgerufen durch die Defizienz der Hydroxylgruppen, aufzuzeigen.

Die molekularen Ursachen der späten Demyelinisierung des PNS und die damit zusammenhängende Lähmung der hinteren Extremitäten der FA2H defizienten Mäuse sind nicht bekannt. Zum einen würden weiterführende Immunfärbungen der Natrium- und Kaliumkanäle Aufschluss darüber geben, in wieweit die paranodale Region des Ischias Nervs Beeinträchtigungen aufweist, und zum anderen würden Untersuchungen von schwanzellspezifischen Proteinen, wie z.B. P0, helfen, die Entstehung der späten Demyelinisierung zu ermitteln.

Die späte axonale Degeneration der FA2H defizienten Mäuse wird von einer Akkumulation von fibrillärem Material unbekanntem Ursprungs begleitet. Dies deutet daraufhin, dass möglicherweise die Endozytose von Myelinmembranbestandteilen beeinträchtigt wird, wie es auch bei anderen Speicherkrankheiten mit einer Akkumulation von Lipiden der Fall ist (Trajkovic et al., 2008). Analysen der Beschaffenheit des fibrillären Materials sowie Untersuchungen zur Exosomenbildung in FA2H defizienten Zellen würden einen ersten Hinweis liefern, ob die FA2H Defizienz zu Störungen in der Endozytose führt. In anderen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass bei einer späten axonalen Degeneration häufig der Transport bestimmter Proteine gestört ist (Werner et al., 2007). Über Proteomanalysen mittels 2D Gelelektrophorese könnten mögliche Transportdefizite der FA2H-KO aufgezeigt werden.

In neuen Forschungen (Herrero et al., 2008) war zu beobachten, dass humane Krebszellen, in denen die FA2H-Expression herunterreguliert wurde, resistent waren gegenüber einer Behandlung mit einem neuen Anti-Tumor Medikament, welches das Zellwachstum stoppt und Nekrosen induziert. Entgegengesetzt zeigten Zellen, welche die FA2H überexprimierten, eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem

Medikament. Dies deutet darauf hin, dass die FA2H auch eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Tumoren haben könnte. Eine genaue makroskopische Untersuchung aller Gewebe der FA2H defizienten Tiere würde die Rolle des Enzyms bei der Entstehung von Tumoren verdeutlichen.

Die Charakterisierung der FA2H(-)/CGT(-) Mäuse steht noch am Anfang. Die Myelinisierung und Oligodendrozyten-Differenzierung müssten anhand von in situ Hybridisierungen bzw. Realtime-PCR Analysen untersucht werden. Desweiteren könnten Myelinisierungsdefizite mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden. Außerdem würde ein in vitro Ansatz helfen zu ermitteln, ob sowohl hydroxyliertes als auch nicht hydroxyliertes Glukosylceramid als Substrat für die Laktosylsynthase dienen und in komplexere Sphingolipide umgewandelt werden können. Mit diesem Versuch könnte geklärt werden, warum die FA2H(-)/CGT(-) Tiere ca. 70% weniger Glukosylceramid im ZNS besitzen im Vergleich zu den CGT-KO Mäusen. Schließlich könnte noch untersucht werden, ob es zu Unterschieden im Transport von Sphingolipiden zwischen Oligodendrozyten und Schwannzellen kommt.

Die Hyperplasie der Talgdrüse scheint der entscheidende Faktor des veränderten Haarzyklus und des progressiven Haarverlustes der FA2H defizienten Mäuse zu sein. Um die Ursache der Vergrößerung der Talgdrüsen zu ermitteln, könnten weitere Lipidanalysen zur genauen Zusammensetzung des Sebums sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Ultrastruktur der Talgdrüse durchgeführt werden. Um sicher sein zu können, dass die FA2H defizienten Tiere eine Haarfollikeldystrophie sowie eine Atrophie aufweisen, könnten weitere elektronenmikroskopische Aufnahmen der Haarfollikel angefertigt werden.

In der Haut scheint neben der FA2H ein weiteres Enzym für die Bildung von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden zu existieren. Mit Hilfe einer Expressionsklonierung könnte diese zweite hautspezifische Hydroxylase identifiziert werden. Mikroarray Experimente mit der Haut von zehn Tage alten WT und FA2H Knock-out Tieren könnten Aufschluss darüber geben, welche Gene und damit welche Signalwege durch die FA2H Defizienz gestört sind.

Letztendlich würde die Generierung einer konditionellen FA2H-KO Mauslinie helfen, den Hautphänotyp näher zu charakterisieren.



## **5 Zusammenfassung**

Das Myelin von Säugetieren enthält große Mengen  $\alpha$ -hydroxylierter Glykosphingolipide, deren Funktion unklar ist. Bislang konnte nur ein murines Enzym identifiziert werden, das vermutlich für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide verantwortlich ist und das als Fettsäure-2-Hydroxylase bezeichnet wird.

Die Funktion der  $\alpha$ -Hydroxylierung wurde anhand von Zellkulturversuchen sowie über die Analyse einer FA2H defizienten Mauslinie (FA2H-KO) untersucht.

In Zellkulturversuchen konnte bestätigt werden, dass die FA2H für die Synthese von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden notwendig ist. Desweiteren wurde die subzelluläre Lokalisation geklärt; die FA2H ist in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert.

Lipidanalysen des Nervengewebes der FA2H-KO Maus zeigten, dass tatsächlich alle  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide sowohl im ZNS als auch im PNS fehlten. Damit konnte in vitro und in vivo der Beweis erbracht werden, dass die FA2H für die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäurereste der Sphingolipide verantwortlich ist.

Erstaunlicherweise schien die FA2H Defizienz keinen weiteren Einfluss auf das Nervensystem von jungen Mäusen zu haben. Sowohl die Myelinisierung als auch die Kompaktierung des Myelins zeigten keine Unterschiede zwischen FA2H-KO Mäusen und Kontrolltieren. Weiterhin war auch die gemessene Nervenleitgeschwindigkeit sowie die Differenzierung der Oligodendrozyten der FA2H defizienten Tiere vergleichbar mit den Kontrollen. Jedoch war in alten FA2H-KO Mäusen eine axonale Degeneration des ZNS und eine progressive Demyelinisierung des PNS zu beobachten. Daraus kann gefolgert werden, dass die FA2H somit eine entscheidende Rolle bei der Kommunikation zwischen Gliazellen und Axonen spielt und wichtig für die Aufrechterhaltung der Myelinkompaktierung ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine definierte Lipidzusammensetzung des Myelins nicht entscheidend für die Myelinisierung ist, so lange andere Lipide (z.B Sphingomyelin) kompensatorisch gebildet werden.

In der Haut werden  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide vor allem von den Keratinozyten gebildet, welche keine FA2H Aktivität besitzen. Die FA2H wird in Talgdrüsen exprimiert. In den FA2H-KO Tieren scheint die Biosynthese der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide in der Epidermis nicht beeinflusst zu sein, wohingegen die Synthese der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide und der Wachsdierester in der Talgdrüse reduziert war. Es muss demnach in der Epidermis, ein zweites Enzym exprimiert werden, das die weitere  $\alpha$ -Hydroxylierung katalysiert. In der Haut führte die FA2H Defizienz zu einer Hyperplasie der Talgdrüsen und einer damit einhergehenden Verzögerung der Haarentwicklung sowie einem periodischen und progressiven Haarverlust.

## **6 Literaturverzeichnis**

- 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.
- Alderson, N.L., Walla, M.D. and Hama, H. (2005) A novel method for the measurement of in vitro fatty acid 2-hydroxylase activity by gas chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res*, **46**, 1569-1575.
- Allen, M., Grachtchouk, M., Sheng, H., Grachtchouk, V., Wang, A., Wei, L., Liu, J., Ramirez, A., Metzger, D., Chambon, P., Jorcano, J. and Dlugosz, A.A. (2003) Hedgehog signaling regulates sebaceous gland development. *Am J Pathol*, **163**, 2173-2178.
- Alonso, L. and Fuchs, E. (2006) The hair cycle. *J Cell Sci*, **119**, 391-393.
- Altevogt, B.M., Kleopa, K.A., Postma, F.R., Scherer, S.S. and Paul, D.L. (2002) Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*, **22**, 6458-6470.
- Bancroft, J.D. and Cook, H.C. (1994) Principles of tissue demonstration and routine morphological staining. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*, 17-34.
- Bansal, R., Winkler, S. and Bheddah, S. (1999) Negative regulation of oligodendrocyte differentiation by galactosphingolipids. *J Neurosci*, **19**, 7913-7924.
- Barres, B.A., Raff, M.C., Gaese, F., Bartke, I., Dechant, G. and Barde, Y.A. (1994) A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature*, **367**, 371-375.
- Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M. and Raff, M.C. (1993) Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development*, **118**, 283-295.
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, **81**, 871-927.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blooms, H., Beier, H. and Gross, H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis*, 93-99.
- Boison, D., Bussow, H., D'Urso, D., Muller, H.W. and Stoffel, W. (1995) Adhesive properties of proteolipid protein are responsible for the compaction of CNS myelin sheaths. *J Neurosci*, **15**, 5502-5513.
- Bosio, A., Binczek, E., Haupt, W.F. and Stoffel, W. (1998a) 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., Le Beau, M.M., Fernald, A.A. and Stoffel, W. (1996a) The human gene CGT encoding the UDP-galactose ceramide galactosyl transferase (cerebroside synthase): cloning, characterization, and assignment to human chromosome 4, band q26. *Genomics*, **34**, 69-75.
- Bosio, A., Binczek, E. and Stoffel, W. (1996b) 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.
- Bosio, A., Binczek, E. and Stoffel, W. (1996c) Molecular cloning and characterization of the mouse CGT gene encoding UDP-galactose ceramide-galactosyltransferase (cerebroside synthetase). *Genomics*, **35**, 223-226.
- Bosio, A., Bussow, H., Adam, J. and Stoffel, W. (1998b) Galactosphingolipids and axon-glia interaction in myelin of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, **292**, 199-210.
- 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.
- Bottenstein, J.E. and Sato, G.H. (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 514-517.

- Brown, D.A. and London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 111-136.
- Brown, D.A. and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, **275**, 17221-17224.
- 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.
- Bullock, J.C., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) XL-1 Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. *Bio/Techniques*.
- Burger, K.N., van der Bijl, P. and van Meer, G. (1996) Topology of sphingolipid galactosyltransferases in ER and Golgi: transbilayer movement of monohexosyl sphingolipids is required for higher glycosphingolipid biosynthesis. *J Cell Biol*, **133**, 15-28.
- 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 Mpz13, a novel [corrected] gene encoding a predicted [corrected] adhesion protein, in the rough coat (rc) mice with severe skin and hair abnormalities. *J Invest Dermatol*, **127**, 1375-1386.
- Capello, E., Voskuhl, R.R., McFarland, H.F. and Raine, C.S. (1997) Multiple sclerosis: re-expression of a developmental gene in chronic lesions correlates with remyelination. *Ann Neurol*, **41**, 797-805.
- 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. (1996a) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell*, **86**, 209-219.
- Coetzee, T., Li, X., Fujita, N., Marcus, J., Suzuki, K., Francke, U. and Popko, B. (1996b) Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the mouse UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase gene. *Genomics*, **35**, 215-222.
- Cui, C.Y., Durmowicz, M., Ottolenghi, C., Hashimoto, T., Griggs, B., Srivastava, A.K. and Schlessinger, D. (2003) Inducible mEDA-A1 transgene mediates sebaceous gland hyperplasia and differential formation of two types of mouse hair follicles. *Hum Mol Genet*, **12**, 2931-2940.
- Dawber, R. (1995) Haarwachstumsdiagnostik und das Haarwachstum stimulierende Substanzen. *Dermatologie, Heutiger Stand*, 243-248.
- Dunn, T.M., Haak, D., Monaghan, E. and Beeler, T.J. (1998) Synthesis of monohydroxylated inositolphosphorylceramide (IPC-C) in *Saccharomyces cerevisiae* requires Scs7p, a protein with both a cytochrome b5-like domain and a hydroxylase/desaturase domain. *Yeast*, **14**, 311-321.
- Dupree, J.L., Coetzee, T., Blight, A., Suzuki, K. and Popko, B. (1998a) 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. (1998b) Myelin abnormalities in mice deficient in galactocerebroside and sulfatide. *J Neurocytol*, **27**, 649-659.
- Dupree, J.L., Girault, J.A. and Popko, B. (1999) Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins. *J Cell Biol*, **147**, 1145-1152.
- 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., Yaghootfam, 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.
- Edgar, J.M., McLaughlin, M., Yool, D., Zhang, S.C., Fowler, J.H., Montague, P., Barrie, J.A., McCulloch, M.C., Duncan, I.D., Garbern, J., Nave, K.A. and Griffiths, I.R. (2004) Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol*, **166**, 121-131.
- Edvardson, S., Hama, H., Shaag, A., Gomori, J.M., Berger, I., Soffer, D., Korman, S.H., Taustein, I., Saada, A. and Elpeleg, O. (2008) Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet*, **83**, 643-648.
- Ferreirinha, F., Quattrini, A., Pirozzi, M., Valsecchi, V., Dina, G., Broccoli, V., Auricchio, A., Piemonte, F., Tozzi, G., Gaeta, L., Casari, G., Ballabio, A. and Rugarli, E.I. (2004) Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest*, **113**, 231-242.
- Fessing, M.Y., Sharova, T.Y., Sharov, A.A., Atoyan, R. and Botchkarev, V.A. (2006) Involvement of the Edar signaling in the control of hair follicle involution (catagen). *Am J Pathol*, **169**, 2075-2084.
- 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.
- Filbin, M.T. (1996) The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci*, **8**, 84-92.
- Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roeber, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., Dotto, G.P. and Paus, R. (2000) Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *Faseb J*, **14**, 752-760.
- Fujita, N., Kemper, A., Dupree, J., Nakayasu, H., Bartsch, U., Schachner, M., Maeda, N., Suzuki, K. and Popko, B. (1998) The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. *J Neurosci*, **18**, 1970-1978.
- Giaume, C. and Venance, L. (1995) Gap junctions in brain glial cells and development. *Perspect Dev Neurobiol*, **2**, 335-345.
- 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.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N. and Nave, K.A. (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*, **280**, 1610-1613.
- Griffiths, I.R., Scott, I., McCulloch, M.C., Barrie, J.A., McPhilemy, K. and Cattanach, B.M. (1990) Rumpshaker mouse: a new X-linked mutation affecting myelination: evidence for a defect in PLP expression. *J Neurocytol*, **19**, 273-283.
- Gu, L.H. and Coulombe, P.A. (2007) Keratin expression provides novel insight into the morphogenesis and function of the companion layer in hair follicles. *J Invest Dermatol*, **127**, 1061-1073.
- Hardt, B. and Bause, E. (2002) Lysine can be replaced by histidine but not by arginine as the ER retrieval motif for type I membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 751-757.
- 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.
- Herrero, A.B., Astudillo, A.M., Balboa, M.A., Cuevas, C., Balsinde, J. and Moreno, S. (2008) Levels of SCS7/FA2H-mediated fatty acid 2-hydroxylation determine the sensitivity of cells to antitumor PM02734. *Cancer Res*, **68**, 9779-9787.
- 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.
- Horenstein, M. and Simon, J. (2006) Investigation of the Hair Follicle Inner Root Sheath in Scarring and Nonscarring Alopecia. *Journal of Cutaneous Pathology*, **34**, 762 - 768.
- Horsley, V., O'Carroll, D., Tooze, R., Ohinata, Y., Saitou, M., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A. and Fuchs, E. (2006) Blimp1 defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland. *Cell*, **126**, 597-609.
- Hucho, F. (1982) Einführung in die Neurochemie. *Lehrbuch*.
- Idkowiak-Baldys, J., Grilley, M.M. and Takemoto, J.Y. (2004) Sphingolipid C4 hydroxylation influences properties of yeast detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes. *FEBS Lett*, **569**, 272-276.
- Ishibashi, T., Dupree, J.L., Ikenaka, K., Hirahara, Y., Honke, K., Peles, E., Popko, B., Suzuki, K., Nishino, H. and Baba, H. (2002) A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. *J Neurosci*, **22**, 6507-6514.
- Ito, M. (1988) Electron microscopic study on cell differentiation in anagen hair follicles in mice. *J Invest Dermatol*, **90**, 65-72.
- Ito, M., Kizawa, K., Hamada, K. and Cotsarelis, G. (2004) Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differentiation*, **72**, 548-557.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **9**, 3153-3162.
- Jahoda, C.A. and Reynolds, A.J. (1993) Dermal-epidermal interactions--follicle-derived cell populations in the study of hair-growth mechanisms. *J Invest Dermatol*, **101**, 33S-38S.
- 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.
- Kabuss, R., Ashikov, A., Oelmann, S., Gerardy-Schahn, R. and Bakker, H. (2005) Endoplasmic reticulum retention of the large splice variant of the UDP-galactose transporter is caused by a dilysine motif. *Glycobiology*, **15**, 905-911.
- Kettenmann, H. and Ransom, B. (2005) The concept of neuroglia: a historical perspective. *Neuroglia*, 1-16.
- Kim, T. and Pfeiffer, S.E. (1999) Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J Neurocytol*, **28**, 281-293.
- Kishimoto, Y. (1986) Phylogenetic development of myelin glycosphingolipids. *Chem Phys Lipids*, **42**, 117-128.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol*, **116**, 1071-1080.

- Klugmann, M., Schwab, M.H., Puhlhofer, A., Schneider, A., Zimmermann, F., Griffiths, I.R. and Nave, K.A. (1997) Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*, **18**, 59-70.
- 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.
- Koeppen, A.H., Ronca, N.A., Greenfield, E.A. and Hans, M.B. (1987) Defective biosynthesis of proteolipid protein in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Ann Neurol*, **21**, 159-170.
- Kolter, T. and Sandhoff, K. (1999) Sphingolipids - Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angewandte Chemie International Edition*, **38**, pp.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.
- Kramer, E.M., Scharadt, A. and Nave, K.A. (2001) Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech*, **52**, 656-671.
- 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.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langbein, L., Rogers, M.A., Praetzel-Wunder, S., Helmke, B., Schirmacher, P. and Schweizer, J. (2006) K25 (K25irs1), K26 (K25irs2), K27 (K25irs3), and K28 (K25irs4) represent the type I inner root sheath keratins of the human hair follicle. *J Invest Dermatol*, **126**, 2377-2386.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R. and Nave, K.A. (2003) Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet*, **33**, 366-374.
- Lavker, R.M. and Sun, T.T. (1995) Hair follicle stem cells: present concepts. *J Invest Dermatol*, **104**, 38S-39S.
- Li, M., Chiba, H., Warot, X., Messaddeq, N., Gerard, C., Chambon, P. and Metzger, D. (2001) RXR-alpha ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development*, **128**, 675-688.
- 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.
- 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.
- Linnington, C., Webb, M. and Woodhams, P.L. (1984) A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol*, **6**, 387-396.
- Lo Celso, C., Berta, M.A., Braun, K.M., Frye, M., Lyle, S., Zouboulis, C.C. and Watt, F.M. (2008) Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells*, **26**, 1241-1252.
- Lonka, L., Kyttala, A., Ranta, S., Jalanko, A. and Lehesjoki, A.E. (2000) The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet*, **9**, 1691-1697.
- 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, Y., Bu, L., Zhou, S., Jin, M., Sundberg, J.P., Jiang, H., Qian, M., Shi, Y., Zhao, G., Kong, X. and Hu, L. (2004) Scd1ab-Xyk: a new asebia allele characterized by a

- CCC trinucleotide insertion in exon 5 of the stearyl-CoA desaturase 1 gene in mouse. *Mol Genet Genomics*, **272**, 129-137.
- Ludwin, S.K. (1997) The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 111-124.
- 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., Maxson, R., Maas, R.L. and Chuong, C.M. (2003) 'Cyclic alopecia' in *Msx2* mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation. *Development*, **130**, 379-389.
- Maldonado, E.N., Alderson, N.L., Monje, P.V., Wood, P.M. and Hama, H. (2008) FA2H is responsible for the formation of 2-hydroxy galactolipids in peripheral nervous system myelin. *J Lipid Res*, **49**, 153-161.
- Marcus, J., Dupree, J.L. and Popko, B. (2000) Effects of galactolipid elimination on oligodendrocyte development and myelination. *Glia*, **30**, 319-328.
- Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, C., Ezan, P., Arnos, F. and Girault, J.A. (1997) Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron*, **19**, 319-331.
- Meyer-Franke, A. and Barres, B. (1994) Axon myelination. Myelination without myelin-associated glycoprotein. *Curr Biol*, **4**, 847-850.
- Morell, P., Quarles, R.H. and Norton, W.T. (1994) Myelin formation, structure, and biochemistry. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 117-143.
- 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.
- Naito, A., Sato, T., Matsumoto, T., Takeyama, K., Yoshino, T., Kato, S. and Ohdera, M. (2008) Dihydrotestosterone inhibits murine hair growth via the androgen receptor. *Br J Dermatol*, **159**, 300-305.
- Nave, K.A. and Suter, U. (1997) Störungen der Myelinbildung. In *Pathophysiologie des Nervensystems*, 101-128.
- Nave, K.A. and Trapp, B.D. (2008) Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci*, **31**, 535-561.
- Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C. and Robinson, D.G. (2002) Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol*, **130**, 1102-1108.
- Neufang, G., Furstenberger, G., Heidt, M., Marks, F. and Muller-Decker, K. (2001) Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7629-7634.
- Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R.E., Lester, H.A. and Kofuji, P. (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci*, **21**, 5429-5438.
- Norton, W.T. and Poduslo, S.E. (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem*, **21**, 749-757.
- 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.
- Paul, P., Kamisaka, Y., Marks, D.L. and Pagano, R.E. (1996) Purification and characterization of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase from rat liver Golgi membranes. *J Biol Chem*, **271**, 2287-2293.
- Paulsson, K.M., Jevon, M., Wang, J.W., Li, S. and Wang, P. (2006) The double lysine motif of tapasin is a retrieval signal for retention of unstable MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *J Immunol*, **176**, 7482-7488.
- Paus, R. and Cotsarelis, G. (1999) The biology of hair follicles. *N Engl J Med*, **341**, 491-497.

- Paus, R., Handjiski, B., Czarnetzki, B.M. and Eichmüller, S. (1994a) A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen): effects of dexamethasone and cyclosporin A. *J Invest Dermatol*, **103**, 143-147.
- Paus, R., Hofmann, U., Eichmüller, S. and Czarnetzki, B.M. (1994b) Distribution and changing density of gamma-delta T cells in murine skin during the induced hair cycle. *Br J Dermatol*, **130**, 281-289.
- Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.D. and Schlessinger, J. (1997) Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *Embo J*, **16**, 978-988.
- Peles, E. and Salzer, J.L. (2000) Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol*, **10**, 558-565.
- Pfeiffer, S.E., Warrington, A.E. and Bansal, R. (1993) The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol*, **3**, 191-197.
- Pfrieger, F.W. and Barres, B.A. (1995) What the fly's glia tell the fly's brain. *Cell*, **83**, 671-674.
- Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, **378**, 281-292.
- 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 (dfl): a dominant mouse mutation leading to poor sebaceous gland differentiation and total elimination of pelage follicles. *J Invest Dermatol*, **119**, 32-37.
- Powell, B.C. and Rogers, G.E. (1997) The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair. *Exs*, **78**, 59-148.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*, **108**, 945-956.
- Raine, C. (1984) The neuropathology of myelin diseases. 259-310.
- Rasband, M.N., Peles, E., Trimmer, J.S., Levinson, S.R., Lux, S.E. and Shrager, P. (1999a) Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. *J Neurosci*, **19**, 7516-7528.
- 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.
- Rasband, M.N., Trimmer, J.S., Peles, E., Levinson, S.R. and Shrager, P. (1999b) K<sup>+</sup> channel distribution and clustering in developing and hypomyelinated axons of the optic nerve. *J Neurocytol*, **28**, 319-331.
- Richter-Landsberg, C. (2000) The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *J Neurosci Res*, **59**, 11-18.
- Rios, J.C., Rubin, M., St Martin, M., Downey, R.T., Einheber, S., Rosenbluth, J., Levinson, S.R., Bhat, M. and Salzer, J.L. (2003) Paranodal interactions regulate expression of sodium channel subtypes and provide a diffusion barrier for the node of Ranvier. *J Neurosci*, **23**, 7001-7011.
- 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., Von Figura, K., Paus, R. and Peters, C. (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *Faseb J*, **14**, 2075-2086.
- Salzer, J.L., Holmes, W.P. and Colman, D.R. (1987) The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol*, **104**, 957-965.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

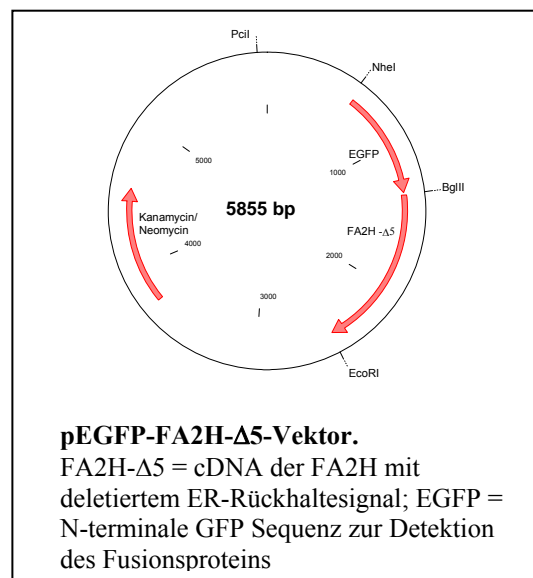
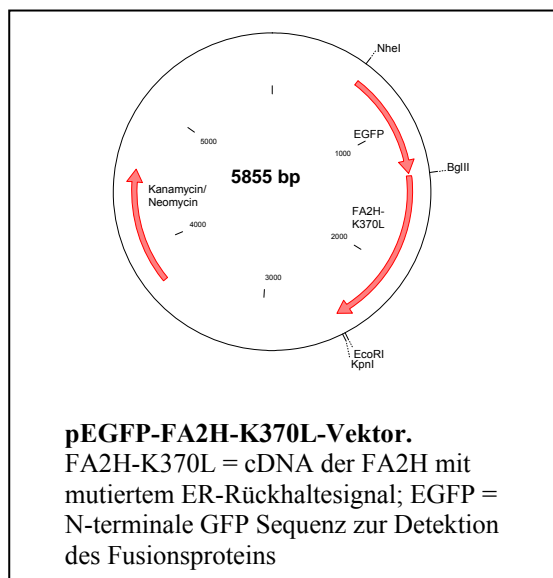
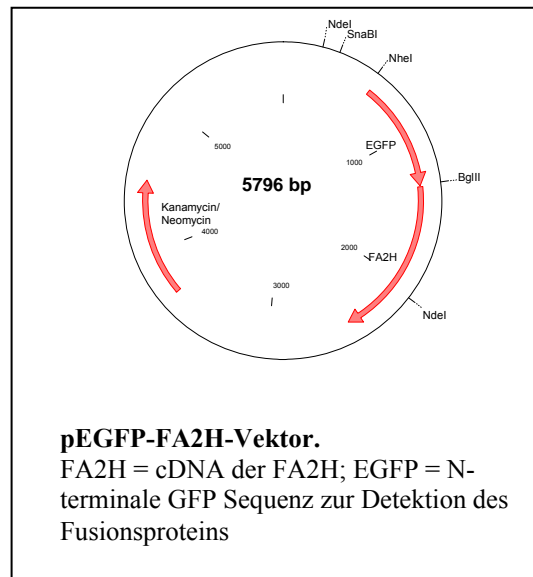
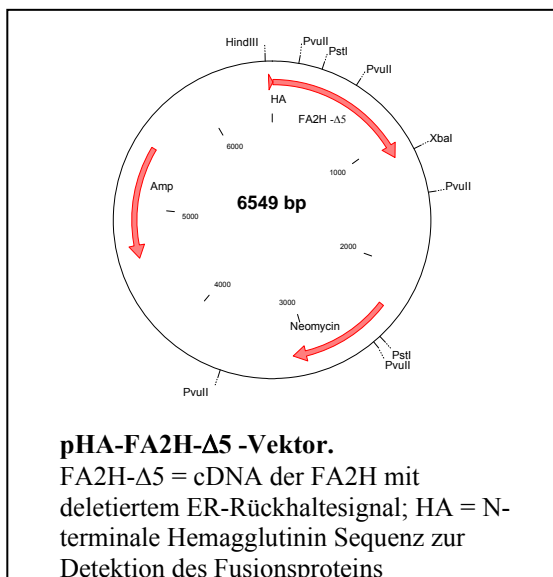
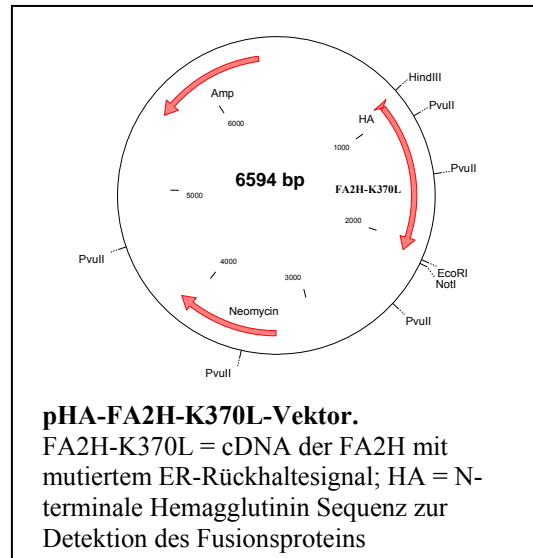
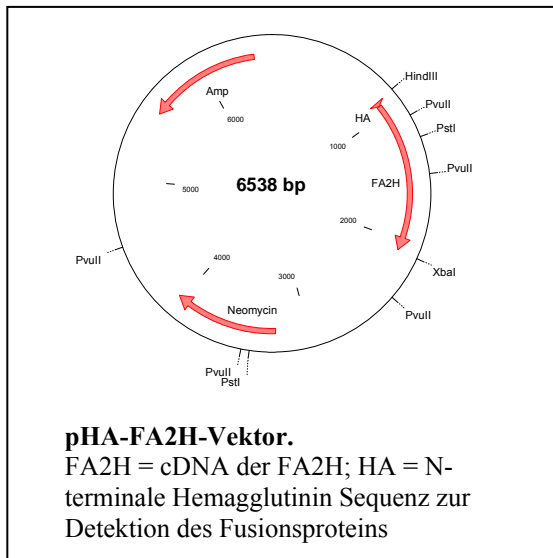


- Sandhoff, K. and Kolter, T. (2003) Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**, 847-861.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. and Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, **265**, 687-695.
- Saugier-Verber, P., Munnich, A., Bonneau, D., Rozet, J.M., Le Merrer, M., Gil, R. and Boespflug-Tanguy, O. (1994) X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet*, **6**, 257-262.
- Schulte, S. and Stoffel, W. (1993) Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10265-10269.
- Shimeno, H., Soeda, S., Sakamoto, M., Kouchi, T., Kowakame, T. and Kihara, T. (1998) Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction. *Lipids*, **33**, 601-605.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simons, K. and Vaz, W.L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295.
- Simons, M., Kramer, E.M., Thiele, C., Stoffel, W. and Trotter, J. (2000) Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol*, **151**, 143-154.
- Sourla, A., Richard, V., Labrie, F. and Labrie, C. (2000) Exclusive androgenic effect of dehydroepiandrosterone in sebaceous glands of rat skin. *J Endocrinol*, **166**, 455-462.
- 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.
- Sprong, H., Kruijthof, B., Leijendekker, R., Slot, J.W., van Meer, G. and van der Sluijs, P. (1998) UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **273**, 25880-25888.
- Stahl, N., Jurevics, H., Morell, P., Suzuki, K. and Popko, B. (1994) Isolation, characterization, and expression of cDNA clones that encode rat UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase. *J Neurosci Res*, **38**, 234-242.
- Staugaitis, S.M., Smith, P.R. and Colman, D.R. (1990) Expression of myelin basic protein isoforms in nonglial cells. *J Cell Biol*, **110**, 1719-1727.
- Stenn, K.S. and Eilertsen, K. (1996) Molecular basis of hair growth control. *J Invest Dermatol*, **107**, 669-670.
- Sternberger, N.H., Quarles, R.H., Itoyama, Y. and Webster, H.D. (1979) Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1510-1514.
- Stoffel, W., Boison, D. and Bussow, H. (1997) Functional analysis in vivo of the double mutant mouse deficient in both proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP) in the central nervous system. *Cell Tissue Res*, **289**, 195-206.
- Stoffel, W. and Bosio, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 654-661.
- Sundberg, J. and Hogan, M. (1994) Hair types and subtypes in the laboratory mouse. *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools*, 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. and King, L.E., Jr. (1996) Mouse models for the study of human hair loss. *Dermatol Clin*, **14**, 619-632.
- 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.
- Takagi, S., Tojo, H., Tomita, S., Sano, S., Itami, S., Hara, M., Inoue, S., Horie, K., Kondoh, G., Hosokawa, K., Gonzalez, F.J. and Takeda, J. (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.
- 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.
- Trotter, J., Bitter-Suermann, D. and Schachner, M. (1989) Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *J Neurosci Res*, **22**, 369-383.
- 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*, **282**, 13211-13219.
- van der Bijl, P., Strous, G.J., Lopes-Cardozo, M., Thomas-Oates, J. and van Meer, G. (1996) Synthesis of non-hydroxy-galactosylceramides and galactosyldiglycerides by hydroxy-ceramide galactosyltransferase. *Biochem J*, **317 (Pt 2)**, 589-597.
- van Echten-Deckert, G. (2000) Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. *Methods Enzymol*, **312**, pp. 64-79.
- Van Meer, P. and Raber, J. (2005) Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochem J*, **389**, 593-610.
- Weiss, B. and Stoffel, W. (1997) Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem*, **249**, 239-247.
- Werner, H.B., Kuhlmann, K., Shen, S., Uecker, M., Schardt, A., Dimova, K., Orfaniotou, F., Dhaunchak, A., Brinkmann, B.G., Mobius, W., Guarente, L., Casaccia-Bonnel, P., Jahn, O. and Nave, K.A. (2007) Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci*, **27**, 7717-7730.
- 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.
- Winter, H., Langbein, L., Praetzel, S., Jacobs, M., Rogers, M.A., Leigh, I.M., Tidman, N. and Schweizer, J. (1998) A novel human type II cytokeratin, K6hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle. *J Invest Dermatol*, **111**, 955-962.
- Wood, D.D., Vella, G.J. and Moscarello, M.A. (1984) Interaction between human myelin basic protein and lipophilin. *Neurochem Res*, **9**, 1523-1531.
- Zerangue, N., Malan, M.J., Fried, S.R., Dazin, P.F., Jan, Y.N., Jan, L.Y. and Schwappach, B. (2001) Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2431-2436.
- 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., Hartmann, D., Bussow, H., Meyer, R., Gieselmann, V. and Eckhardt, M. (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *J Neurosci*, **28**, 9741-9754.

## 7 Anhang

### Plasmidkarten



## **Publikationen**

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht bzw. präsentiert:

Meixner, M., Maier, H., Zöller, I., Hartmann, D., Sandhoff, R., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (Manuskript in Bearbeitung) Loss of 2-hydroxylated sphingolipids leads to alopecia and hair cycle arrest.

Zöller, I., Meixner, M., Hartmann, D., Büssow, B., Meyer, R., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. **The Journal of Neuroscience**, 28 (39), 9741-9754

## **Posterpräsentationen**

Meixner, M., Zöller, I., Hartmann, D., Büssow, B., Meyer, R., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2008) The absence of 2-hydroxylated sphingolipids causes axonal degeneration. 49<sup>th</sup> Conference of Lipids; ICBL-Meeting, Maastricht, Niederlande; Posterpreis

Meixner, M., Maier, H., Wang-Eckhardt, L., Gieselmann, V., and Eckhardt, M. (2008) Fatty acid 2-hydroxylase is expressed in sebaceous glands and is required for normal hair cycling. SFB-Meeting, Bonn, Deutschland

## **Danksagung**

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann bedanken, der mir die Möglichkeit gab in seinem Institut zu promovieren und mein Projekt stets unterstützt hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Hoch für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias Eckhardt, der mir das interessante Thema meiner Doktorarbeit gestellt hat. Er hat mir stets bei allen Fragen geduldig zugehört und mir viele neue Anregungen zur Bearbeitung meines Promotionsthemas gegeben, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Hartmann bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei Herrn Prof. Dr. R. Meyer für die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit sowie bei Herrn Prof. Dr. T. Magin für die Bereitstellung seiner histologischen Geräte.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für die angenehme Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Herausforderungen des Laboralltages. Außerdem danke ich herzlichst der „Familie Eckhardt“ (Ivonne, Lena, Lihua, Rebekka und Silvia, sowie Annika und Frank) für ihre tatkräftige Unterstützung und die guten Gespräche innerhalb und außerhalb des Labors. Weiterer Dank geht an Herrn Norbert Rösel, ohne dessen Ratschläge bei technischen Problemen mir vieles erschwert worden wäre.

Den Tierpflegern danke ich für die fortwährende Hilfsbereitschaft und für die Versorgung der Mäuse.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Freunden und meiner Familie. Vor allem danke ich meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums sowie während der Promotion.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Marion Meixner, 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, März 2009

Marion Meixner