

Untersuchungen zur Funktion der  
Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) in der  
Haut- und Haarfollikel-Homöostase der Maus

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Helena Maier

aus

Alma-Ata (Kasachstan)

Bonn, 2012



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

1. Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. C. E. Müller

Tag der Promotion: 22. Juni 2012

Erscheinungsjahr: 2012



*Der Ursprung der Wissenschaft liegt im Wissen,  
dass wir nichts wissen.*

-Fernando Pessoa-



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2 Einleitung</b> .....	2
2.1 Die Haut .....	2
2.2 Der Haarfollikel .....	4
2.3 Der Haarzyklus .....	6
2.4 Die Talgdrüse .....	8
2.5 Lipide der Haut .....	12
2.5.1 Epidermale Lipide und die Barrierefunktion der Haut .....	12
2.5.2 Sebumlipide .....	18
2.5.2.1 Zusammensetzung des Sebums .....	18
2.5.2.2 Funktion des Sebums .....	22
2.6 Dysfunktionen in Haut und/oder Haaren .....	23
2.6.1 Homöostase und Barrierefunktion der Haut .....	23
2.6.2 Homöostase des Haarfollikels .....	25
2.7 Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) .....	26
<b>3 Material</b> .....	29
3.1 Chemikalien, Materialien und Reagenzien .....	29
3.2 Geräte .....	30
3.3 Antikörper .....	31
3.3.1 Primärantikörper .....	31
3.3.2 Sekundärantikörper .....	31
3.4 Bakterienstämme und Zelllinien .....	31
3.4.1 Bakterien .....	31
3.4.2 Zelllinien .....	32

3.5	Lösungen, Medien und Puffer .....	32
3.5.1	Allgemeine Lösungen und Puffer .....	32
3.5.2	Lösungen und Laufmittel für DC-Analysen .....	33
3.5.3	Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Analysen .....	33
3.5.4	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur .....	35
3.5.5	Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	35
3.5.6	Lösungen und Puffer für Färbungen an Zellen und Gewebeschnitten .....	36
3.6	Oligonukleotide .....	37
3.7	Plasmide.....	38
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>39</b>
4.1	Arbeiten mit Bakterien .....	39
4.1.1	Transformation.....	39
4.2	Arbeiten mit Nucleinsäuren .....	39
4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA .....	39
4.2.2	Präparation von RNA aus Zellen und Geweben .....	40
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren .....	41
4.2.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung .....	41
4.2.4.2	Konzentrationsabschätzung im Agarosegel .....	42
4.2.5	Herstellung rekombinanter Plasmide .....	42
4.2.5.1	Plasmidspaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.....	42
4.2.5.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	42
4.2.5.3	Ligation von DNA-Fragmenten .....	43
4.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	43
4.3	Arbeiten mit Zellen .....	44
4.3.1	Passagieren von Zellen .....	44
4.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	44
4.3.3	Transfektion .....	45
4.3.4	Primärkultur von murinen Keratinozyten.....	46



4.4	Färbungen an Zellen und Gewebeschnitten.....	46
4.4.1	Antigendemaskierung (Antigen retrieval).....	46
4.4.2	Immunfluoreszenz-Analyse.....	47
4.4.3	In situ-Hybridisierung .....	48
4.4.4	BrdU-Markierungs-Reaktion.....	49
4.4.5	H&E-Färbung .....	49
4.4.6	PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reagenz).....	50
4.4.7	LacZ-Färbung.....	50
4.4.8	OilRedO-Färbung an Gefrierschnitten und Zellen .....	51
4.5	Lipidanalytik.....	51
4.5.1	Lipidextraktion .....	51
4.5.1.1	Lipidextraktion aus Geweben .....	51
4.5.1.2	Lipidextraktion aus Zellen .....	53
4.5.1.3	Extraktion von Oberflächenlipiden (Sebumlipiden), Festphasenextraktion und alkalische Hydrolyse zur Freisetzung von Alkan-1,2-Diolen aus Wachsdiestern .....	54
4.5.2	Schmelzpunktmessung von Oberflächenlipiden.....	55
4.5.3	Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie .....	56
4.6	Proteinanalytik.....	57
4.6.1	Zelllysate.....	57
4.6.2	Proteinbestimmung.....	57
4.6.3	Elektrophoretische Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE.....	57
4.6.4	Proteintransfer mittels Western Blot.....	58
4.7	Verwendung von Mausgeweben / Arbeiten mit Tieren .....	59
4.7.1	Genotypisierung .....	59
4.7.2	Gewebeschnitte .....	59
4.7.2.1	Gefrierschnitte (Cryoschnitte).....	59
4.7.2.2	Paraffinschnitte.....	60
4.7.3	Depilation der Rückenhaare .....	60

<b>5 Ergebnisse</b> .....	61
5.1 Die Rolle der Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) in der Haut- und Haarfollikel-Homöostase der Maus .....	61
5.1.1 Verzögertes Fellwachstum und zyklisch auftretende Alopezie in FA2H-KO-Mäusen .....	61
5.1.2 Histologische Untersuchungen der Haarfollikel.....	65
5.1.3 Expression der FA2H in verschiedenen Mausgeweben.....	68
5.1.4 FA2H-Expression in der murinen Haut .....	72
5.1.5 Hyperproliferation der Sebozyten und vergrößerte Talgdrüsen in FA2H-KO-Mäusen .....	75
5.1.6 Überexpression und Gen-Knock-Down von FA2H haben keinen direkten Effekt auf die Epigen-Expression .....	86
5.1.7 Analyse der Haut- und Epidermislipide .....	89
5.1.8 Primärkultur von murinen Keratinozyten.....	95
5.1.8.1 Biochemische Untersuchungen.....	96
5.1.8.2 Lipidanalyse von primären Keratinozyten .....	100
5.1.9 Analyse der Sebumlipide .....	102
5.1.10 WDE-Synthese in vitro .....	108
5.1.11 Analyse der Präputialdrüsen .....	119
5.1.12 Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase (PHYH).....	123
5.2 Humane FA2H .....	126
5.2.1 Untersuchungen zur $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität von humanen FA2H-Mutanten.....	127
5.2.2 HaCaT, SZ95 und primäre humane Keratinozyten .....	132
5.2.3 Humane Haut .....	138
<b>6 Diskussion</b> .....	141
6.1 Hydroxylierte Lipide und die Barrierefunktion der Haut.....	141
6.2 FA2H-Expression in der murinen und humanen Haut .....	142
6.3 Haut- und Epidermislipide .....	145

---

6.4	Sebumlipide .....	148
6.5	Verzögerte Fellentwicklung und zyklisch auftretende Alopezie in FA2H-KO-Tieren .....	153
6.6	FA2H-Defizienz verursacht eine Talgdrüsen-Hyperplasie.....	156
6.7	Präputialdrüsen.....	160
6.8	Mutationen im humanen <i>Fa2h</i> -Gen.....	161
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>166</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>177</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>180</b>
9.1	Plasmidkarten .....	180
9.2	Publikationen .....	182
9.3	Lebenslauf .....	183
9.4	Danksagung .....	184
9.5	Eidesstattliche Erklärung .....	185



# 1 Zusammenfassung

Die Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) ist das einzige bisher bekannte Enzym, das die  $\alpha$ -Hydroxylierung von unverzweigten Fettsäuren katalysiert. Letztere sind Bestandteile von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden, die in der Haut in großen Mengen vorkommen. Sie spielen dort vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Hautbarriere. Die Funktion der FA2H in der Haut- und Haarfollikel-Homöostase wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von FA2H-KO-Mäusen untersucht. Die Mäuse wiesen während der Morphogenese ein um zwei Tage verzögertes Fellwachstum auf und verloren in der ersten telogenen Phase ihr gesamtes Rückenfell. Der Haarverlust wurde in jeder weiteren telogenen Phase beobachtet und manifestierte sich in einer zyklischen Alopezie. Histologische Untersuchungen der Haut ließen weit offene, zum Teil mit lipidhaltigen Substanzen verstopfte Haarkanäle sowie Verformungen des Haarfollikels erkennen, was auf eine Haarfollikeldystrophie hindeutete. Die Analyse der epidermalen Lipide konnte überraschenderweise zeigen, dass die FA2H-KO-Mäuse trotz der FA2H-Defizienz noch immer über normale Mengen an  $\alpha$ -hydroxylierten Lipiden verfügten. Untersuchungen zur Lokalisation der FA2H haben nachgewiesen, dass das Enzym in der murinen Haut ausschließlich in den Talgdrüsen exprimiert wird. Folglich muss in Keratinozyten ein zweites, bisher unbekanntes Enzym existieren, welches dort die  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Reaktion katalysiert. In Sebozyten führte die FA2H-Defizienz zu einer veränderten Zusammensetzung des Sebums, wobei vor allem die Menge an Typ II-Wachsdiestern signifikant reduziert war. Daraus resultierte eine deutliche Schmelzpunkterhöhung und vermutlich eine höhere Viskosität des Sebums. Ein normaler Sebumfluss durch den Haarkanal an die Hautoberfläche war damit nicht mehr möglich. Das Sebum verstopfte die Haarkanäle und behinderte somit das Herauswachsen der Haare. Die FA2H-Defizienz bedingte weiterhin eine Sebozyten-Hyperproliferation mit deutlich vergrößerten Talgdrüsen. Dies ging mit einer signifikanten Hochregulation des epidermalen Wachstumsfaktor- bzw. des ErbB-Rezeptor-Liganden Epigen einher.

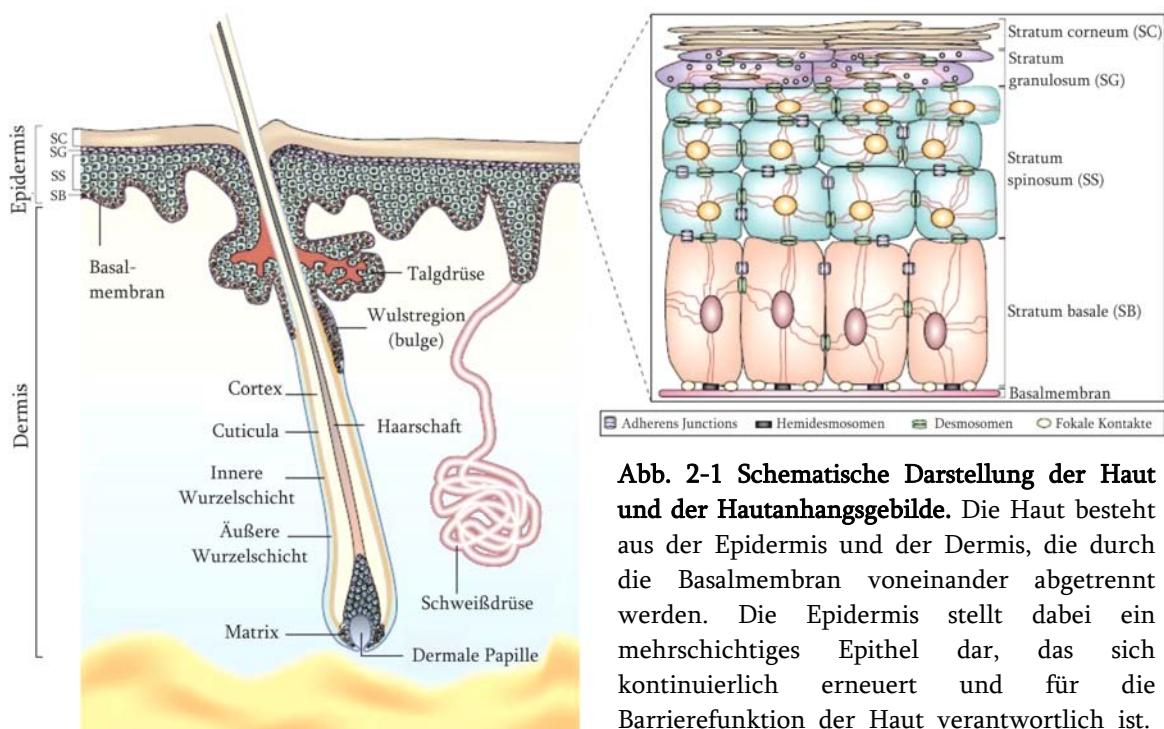
Vor kurzem im Menschen nachgewiesene Mutationen im *Fa2h*-Gen sind mit drei neurodegenerativen Funktionsstörungen assoziiert: Leukodystrophie, komplizierte Form der spastischen Paraplegie sowie Neurodegeneration mit Eisenablagerungen im Gehirn. Der durch die verschiedenen Mutationen hervorgerufene vollständige oder partielle Aktivitätsverlust der FA2H stellt vermutlich die Ursache der Erkrankungen dar.

Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Ergebnisse zur Rolle der FA2H in verschiedenen Organen der Maus und des Menschen und bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen, die zum Verständnis der Funktion von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden beitragen können.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Haut

Die Haut bedeckt die gesamte Körperoberfläche und ist das größte Organ in Säugetieren. Sie lässt sich in einzelne, morphologisch unterschiedliche Schichten einteilen: die Cutis, die weiterhin in die Epidermis (Oberhaut) und die Dermis (Lederhaut) aufgeteilt ist, und die darunter liegende Subcutis, die hauptsächlich aus lockerem Binde- und Fettgewebe besteht und über größere Blutgefäße und Nerven verfügt. In der Haut sind auch die Hautanhangsgebilde lokalisiert. Dazu zählen die Haare mit den assoziierten Talgdrüsen, die Schweißdrüsen, der Haarbalgmuskel (*Musculus arrector pili*) und die Nägel. Zu den allgemeinen Funktionen und Aufgaben der Haut gehören die Barrierefunktion, der kontrollierte Stoffaustausch, Regulation und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur und sensorische Eigenschaften. Abbildung 2-1 gibt einen Überblick über den Aufbau der Haut und einigen zugehörigen Hautanhangsgebilden.



**Abb. 2-1 Schematische Darstellung der Haut und der Hautanhangsgebilde.** Die Haut besteht aus der Epidermis und der Dermis, die durch die Basalmembran voneinander abgetrennt werden. Die Epidermis stellt dabei ein mehrschichtiges Epithel dar, das sich kontinuierlich erneuert und für die Barrierefunktion der Haut verantwortlich ist.

Des Weiteren ist ein Haarfollikel gezeigt und dessen verschiedene funktionelle Einheiten, wie die Wulstregion (*bulge*), die innere und äußere Wurzelschicht, die Talgdrüse, die Matrix und die dermale Papille (modifiziert nach Fuchs, 2002).

Die Oberhaut (Epidermis) liegt der Basalmembran direkt auf und wird durch diese von der Lederhaut (Dermis) abgetrennt. Sie besteht hauptsächlich aus Keratinozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien, die die Einteilung der Epidermis in mehrere Schichten erlauben. Von innen nach außen werden diese Schichten als *Stratum basale* (Basalschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), *Stratum granulosum* (Körnerschicht) und zuletzt *Stratum corneum* (Hornschicht) bezeichnet. Die Epidermis ist ein dynamisches Gewebe, das sich kontinuierlich selbst erneuert, wobei der Verlust von Hornschichtzellen an der Hautoberfläche durch ständig proliferierende Zellen in der unteren Basalschicht ausbalanciert wird (Bouwstra, 2006). Verlässt die Zelle einmal die Basalschicht, beginnt sie auszudifferenzieren und durchlebt während der Wanderung durch die anderen Schichten nach oben zahlreiche Veränderungen bezüglich ihrer Struktur und zellulären Zusammensetzung. Zum Schluss entstehen aus den anfangs lebenden Keratinozyten flache und abgestorbene Zellen, die Korneozyten genannt werden und am Ende von der Haut abgestoßen werden. Die Epidermis erneuert sich selbst alle 10-12 Tage in der Maus und alle 28 Tage im Menschen (O'Shaughnessy, 2004). Die Barrierefunktion der Haut liegt im Aufbau der Epidermis und insbesondere der Hornschicht begründet. Dadurch wird ein Schutz vor unerwünschten exogenen Umwelteinflüssen gewährleistet und gleichzeitig ein Verlust von körpereigenen Stoffen und Flüssigkeiten verhindert (Fuchs, 2002). Die Barrierefunktion der Haut und die dafür notwendigen biochemischen Prozesse und Komponenten werden im Folgenden noch ausführlich besprochen.

Neben Keratinozyten sind in der Epidermis noch weitere Zelltypen in geringen Mengen vorhanden: pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhans-Zellen und sensorisch aktive Merkel-Zellen.

Die Dermis besteht aus gut durchblutetem Bindegewebe und schließt sich in zapfenförmigen Ausläufern von unten an die Basalmembran an. Sie dient der Verankerung und der Ernährung der gefäßfreien Epidermis. Hier sind zahlreiche Blut- und Lymphgefäße vertreten, aber auch Nerven und Rezeptoren, die Empfindungs- und Temperaturreize verarbeiten. Weiterhin finden sich hier die

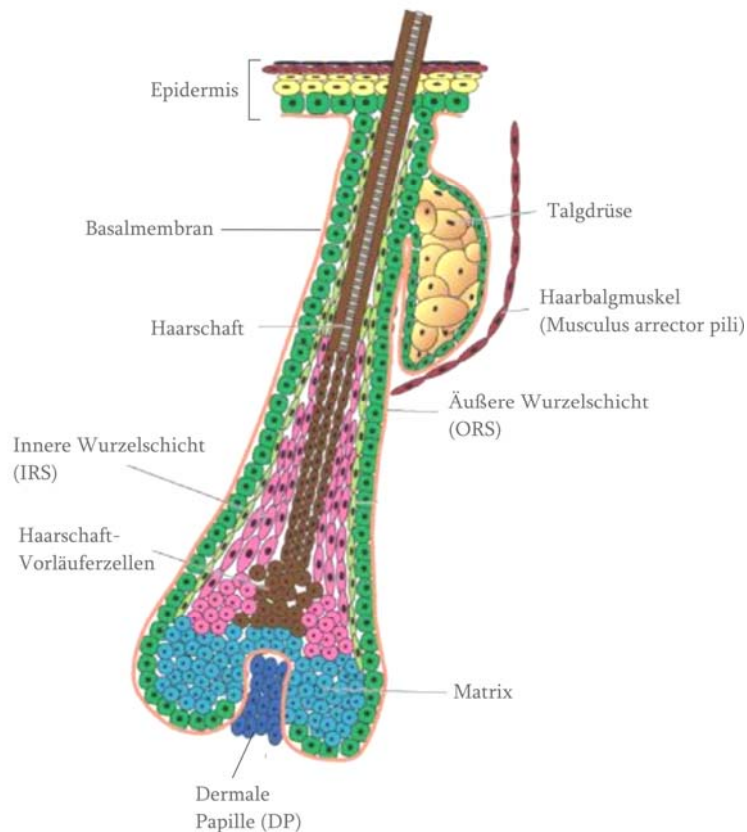
Schweißdrüsen sowie die Haarwurzeln mit den Talg- und Duftdrüsen. Die Hautfaserzellen (Fibroblasten) durchziehen die Lederhaut mit einem Geflecht aus stützenden Kollagen- und dehnbaren Elastinfasern. Des Weiteren befindet sich in der Dermis eine Vielzahl von Abwehrzellen, wie Mastzellen und Makrophagen.

## 2.2 Der Haarfollikel

Die Entwicklung des Haarfollikels beginnt im Embryonalstadium. Der Embryo ist anfangs von einer einzelnen Schicht aus ektodermalen Zellen umgeben, die direkt der Basalmembran aufliegen. Diese epidermalen Basalzellen beginnen zu differenzieren und bilden die über der Basalmembran liegende mehrschichtige Epidermis aus, die für die Barrierefunktion der Haut ausschlaggebend ist. Unterhalb der Basalmembran befinden sich im Mesenchym dermale Vorläufer-Zellen, die bestimmte Signale aussenden und die epidermalen Basalzellen instruieren, einen in die Tiefe gerichteten Haarfollikel zu formen. Die dermalen Zellen erhalten wiederum Signale, die dermale Papille auszubilden, welche als einzige Einheit des Haarfollikels dermalen Ursprungs ist. Während der weiteren Entwicklung nimmt die Größe des Haarfollikels und der Differenzierungsgrad der Zellen zu und die stark proliferierenden Matrixzellen am Basisgrund differenzieren in alle Zellgattungen des gesamten Haarfollikels und seines Haares aus (Blanpain, 2006). Der Haarfollikel ist komplett von der Basalmembran umgeben, an die sich gleich die äußere Wurzelschicht (*outer root sheath*, ORS) anschließt. Die innere Wurzelschicht (*inner root sheath*, IRS) bildet von außen nach innen gesehen die letzte Schicht und ist gleichzeitig die äußerste Schicht des Haarkanals. In einem komplett reifen Haarfollikel gehen aus den Matrixzellen insgesamt sieben konzentrische Ringe aus differenzierten Zellen hervor. Das nach unten hin gerichtete Wachstum des Haarfollikels ist bei Mäusen acht Tage nach der Geburt komplett und nach weiteren sieben Tagen sind die konzentrischen Schichten vollständig ausgebildet (Blanpain, 2006). Zu einem Haarfollikel gehört ebenfalls die Talgdrüse, deren Vorläuferzellen zwar bereits während der Embryogenese gebildet werden, aber deren vollständige Entwicklung sich erst nach der Geburt



vollzieht (Fuchs, 2007). Die Wulst-Region (*bulge*) befindet sich direkt unterhalb der Talgdrüse und stellt ein Reservoir an geringfügig aktiven, multipotenten Stammzellen dar, die während der anagenen Wachstumsphase des Haarzyklus ihre Nische verlassen und entlang der äußeren Wurzelschicht in die Tiefe wandern, um einen neuen Haarfollikel zu formen. Sie sind im Falle von Hautverletzungen ebenfalls dazu befähigt, zur Oberfläche zu wandern, um dort die epidermalen Stammzellen bei der Wundheilung und Zellerneuerung zu unterstützen (Blanpain, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass isolierte Stammzellen aus der Wulst-Region, die nach einiger Zeit in Kultur auf die Rückenhaut von immuntoleranten Mäusen transplantiert wurden, sowohl in einen Haarfollikel, in Talgdrüsen als auch in die Epidermis ausdifferenzieren können (Blanpain, 2004). Einige wichtige und entscheidende Signaltransduktionswege, die die Morphogenese des Haarfollikels einleiten und die weitere Entwicklung regulieren seien hier nur kurz erwähnt: *sonic hedgehog (Shh)*, Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg, BMP (*bone morphogenetic protein*), FGF (*fibroblast growth factor*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und der Notch-Signalweg (Fuchs, 2007). Abbildung 2-2 gibt einen Überblick über den Aufbau eines Haarfollikels.



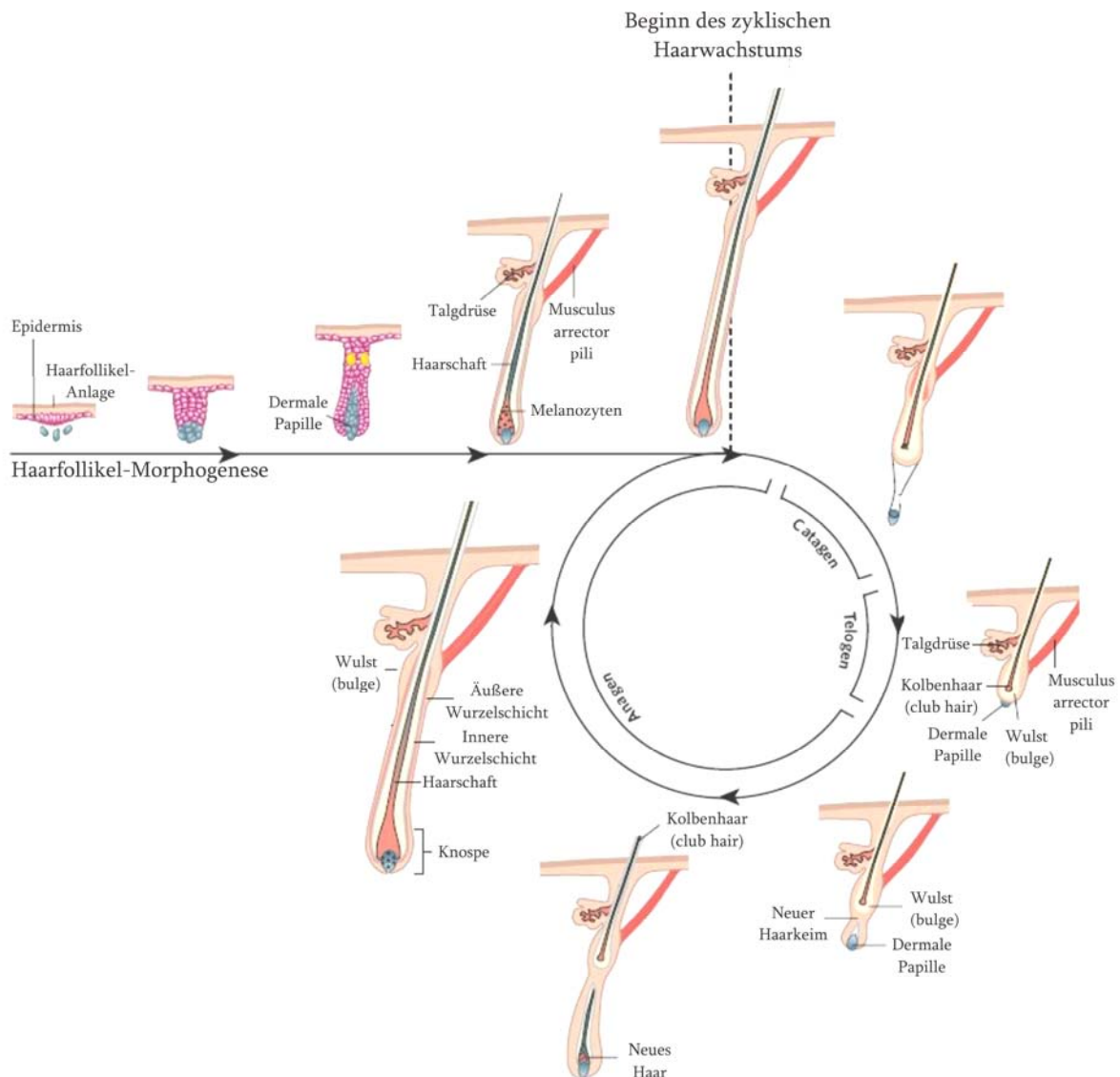
**Abb. 2-2 Schematische Darstellung eines Haarfollikels.** Gezeigt ist der Querschnitt eines komplett entwickelten Haarfollikels mit all seinen funktionellen Einheiten. Er ist vollständig von der Basalmembran umgeben, an die sich die äußere Wurzelschicht (*outer root sheath, ORS*) anschließt. Am Basisgrund des reifen Follikels befinden sich die stark proliferierenden Matrixzellen, die konzentrische Ringe aus differenzierten Zellen ausbilden, aus denen der Haarschaft und dessen Kanal, die innere Wurzelschicht (*inner root sheath, IRS*), resultiert. Zum Haarfollikel gehört ebenfalls die Talgdrüse, die das Sebum synthetisiert. Gemeinsam bilden sie mit der interfollikulären Epidermis die epidermale Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) aus (modifiziert nach Blanpain, 2006).

## 2.3 Der Haarzyklus

Der Haarfollikel ist ein Miniorgan des Körpers, das nach seiner Morphogenese fortwährend zyklische Phasen von Degeneration, anschließender Ruhepause und darauf folgender Regeneration durchmacht (Fuchs, 2007). Ungefähr zwei Wochen nach der Geburt der Maus stellen die anfangs stark proliferierenden Matrixzellen am Basisgrund des vollständig entwickelten Haarfollikels ihre Teilung ein und die Ausdifferenzierung der Zellen wird verlangsamt. Mit diesem Prozess geht die destruktive Phase des Haarzyklus einher, die auch als katagene Phase bezeichnet wird. Sie dauert in Mäusen

ungefähr 3-4 Tage. Währenddessen werden ungefähr zwei Drittel des unteren Haarfollikels bis zum Bereich der Wulst-Region durch Apoptose zerstört (Blanpain, 2006). Die dermale Papille, die als einziger Bestandteil des Haarfollikels dermalen Ursprungs ist, bleibt dabei erhalten und wird nach oben bis zum Bereich des permanenten, vom Zyklus nicht beeinträchtigten Teil des Haarfollikels gedrängt. Der katagenen Phase folgt ein Ruhezustand, der als telogene Phase bezeichnet wird und anfangs ungefähr 1-2 Tage andauert. In späteren Zyklen kann die telogene Phase jedoch bis zu zwei Wochen anhalten (Müller-Röver, 2001). Der neue Haarzyklus beginnt wieder mit der anagenen Phase (Wachstumsphase), in der die multipotenten Stammzellen der Wulst-Region aktiviert werden. Sie wandern an der äußeren Wurzelschicht entlang in die Tiefe zur Matrix, um dort einen neuen Haarfollikel auszubilden. Ein vollständiger Haarzyklus mit den erwähnten drei Phasen dauert in der Maus ungefähr 20 Tage. Beim Menschen kann sich dieser bis auf sechs Jahre ausdehnen (O'Shaughnessy, 2004). Mit den Veränderungen in der Länge der Haarfollikel geht eine unterschiedliche Dicke der Haut einher, die während der Wachstumsphase einen Maximalwert annimmt.

Die Haarfollikelmorphogenese und die folgenden Haarzyklen folgen im Regelfall einem präzisen Zeitablauf, können jedoch aufgrund von verschiedener Faktoren, wie genetischem Hintergrund, Geschlecht, Jahreszeit und Ernährungssituation, von diesem abweichen. Des Weiteren sind einige Fehlfunktionen in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Haare aufgrund von Störungen in den verschiedenen Regulationsmechanismen beschrieben (Müller-Röver, 2001). Abbildung 2-3 gibt einen kurzen Überblick über die Haarfollikel-Morphogenese und die darauf folgenden Haarzyklen.



**Abb. 2-3 Morphogenese des Haarfollikels und der Haarzyklus.** Dargestellt ist die Haarfollikelmorphogenese, die mit der ersten, postnatalen anagenen Wachstumsphase gleichzusetzen ist. Danach folgt die destruktive Phase (katagen), bei der ungefähr zwei Drittel des Haarfollikels durch Apoptose zerstört werden. Die dermale Papille wird dabei nach oben bis hin zur Wulstregion gedrängt. Nach einer Ruhephase (telogen) werden die Stammzellen in der Wachstumsphase (anagen) durch bestimmte Signale aktiviert, um einen neuen in die Tiefe wachsenden Haarfollikel zu formen (modifiziert nach Fuchs, 2007).

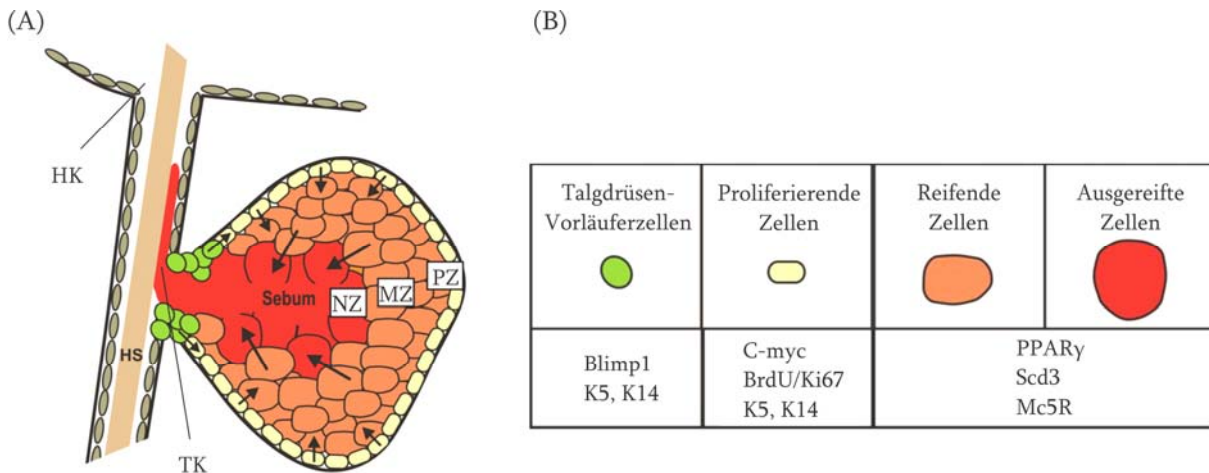
## 2.4 Die Talgdrüse

Talgdrüsen gehören zu den epithelialen Hautanhangsgebilden und kommen in der Haut von allen Säugetieren außer Walen und Tümmlern vor (Zouboulis, 2010). Im Menschen beginnt deren Entwicklung in der 13-16ten Gestationswoche. Bei Mäusen werden sie ungefähr am Tag 3-4 nach der Geburt sichtbar (Paus, 1999). Die Talgdrüsen entstehen aus

den basalen Keratinozyten des Haarfollikels, mit dem sie über einen Kanal verbunden sind. Sie werden von der Basalmembran komplett umschlossen und damit vom Mesenchym abgegrenzt (Fuchs, 2007). Die Talgdrüsen liegen oberhalb der Wulst-Region und des *Musculus arrector pili* und gleich unterhalb des Austrittsbereiches des Haarschaftes an die Oberfläche. Die Zellen der Talgdrüsen, die Sebozyten, produzieren während ihrer Differenzierung ein öliges, wachsähnliches Material, welches Talg oder Sebum genannt wird. Die reifen, lipidhaltigen und dadurch schaumig aussehenden Sebozyten geben ihren Inhalt, einhergehend mit ihrem Zerfall mittels holokriner Sekretion, in den Talgdrüsenkanal ab. Das Sebum wird anschließend mit dem Haar durch den Haarkanal nach oben an die Hautoberfläche transportiert. Es dient hauptsächlich dazu die Haut und die Haare zu befeuchten und geschmeidig zu halten, aber auch weitere Funktionen werden dem Sebum zugesprochen, die im Folgenden noch ausführlicher erwähnt werden.

Die Homöostase der Talgdrüsen wird durch ein Reservoir an Vorläuferzellen gewährleistet, die kontinuierlich proliferieren und die ausdifferenzierenden und später toten Zellen fortwährend erneuern. Die Erneuerungsrate der Sebozyten liegt bei 21-25 Tagen. Diese zelluläre Subpopulation befindet sich direkt in der Nähe des Talgdrüseneingangs. Charakteristisch für diese Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*), der auch als PRDM1 bekannt ist. Die Blimp1-positiven Zellen stellen eine dauerhaft ansässige Population an unipotenten Vorläuferzellen dar, aus denen sich die Sebozytenlinie in der adulten Haut entwickelt (Horsley, 2006). Blimp1 ist ein Repressor von *c-myc*, der eine entscheidende Rolle bei der Talgdrüsenentwicklung und deren Aufrechterhaltung spielt und die Größe und Anzahl der Sebozyten in der Talgdrüse reguliert. Bei Verlust von Blimp1 und dadurch verstärktem *c-myc*-Signal proliferieren die Vorläuferzellen und die Ausdifferenzierung der Sebozyten wird initiiert. Weitere Transkriptionsfaktoren bzw. Signalwege, die die Talgdrüsenentwicklung beeinflussen und steuern sind Sox9, BMP (*bone morphogenetic protein*), Wnt/ $\beta$ -catenin und der *hedgehog*-Signalweg (Schneider, 2010). Abbildung 2-4 gibt einen Überblick über die verschiedenen

Differenzierungsstadien der Sebozyten in murinen Talgdrüsen und zeigt jeweils deren Proteinexpressionsmuster, das im Folgenden bestimmte regulierende Signalwege auslöst.



**Abb. 2-4 (A)** Schematische Darstellung einer murinen Talgdrüse mit Sebozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien. Die Pfeile zeigen den Entwicklungsweg der Sebozyten, die mit ihrer Reifung immer mehr Sebum produzieren und akkumulieren. Dieses wird schließlich mittels holokriner Sekretion über den Talgdrüsenkanal (TK) in den Haarkanal (HK) abgegeben und mit dem wachsenden Haarschaft (HS) an die Hautoberfläche transportiert. Die grünen Zellen stellen Blimp1-positive Sebozyten-Vorläuferzellen dar. Die Zellen der peripheren Zone (PZ) sind kleine, flache, mitotisch aktive Zellen, die mit der Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden sind. In der Reifungszone (MZ) befinden sich vergrößerte Sebozyten, deren Lipidakkumulation in *lipid droplets* sichtbar wird und deren Zellvolumen zunimmt. Die Zellen in der Nekrosezone (NZ) sind aufgrund der Überladung mit Lipiden deformiert und Zellorganellen sind nicht mehr erkennbar. Die Zellen stehen kurz vor dem Zerfall und der Sebumfreisetzung. **(B)** Dargestellt sind die verschiedenen Zellstadien der Differenzierung und Reifung der Sebozyten, sowie die Marker, durch welche die verschiedenen Reifestadien charakterisiert werden. Abkürzungen: BrdU, Bromodesoxyuridin; Mc5R, Melanocortin 5-Rezeptor; Scd3, Stearoyl-CoA-Desaturase; PPAR $\gamma$ , Peroxisom-Proliferator-aktivierender Rezeptor  $\gamma$  (modifiziert nach Schneider, 2010)

Das Maß der Talgdrüsenaktivität geht mit der Sebumproduktion einher. Welche biochemischen Prozesse dabei eine entscheidende Rolle spielen, ist Grundlage der aktuellen Forschung. Untersuchungen der Talgdrüse in Zellkulturmodellen an den humanen, immortalisierten Zelllinien SZ95 (Zouboulis, 1999) und SEB-1 (Thiboutot, 2003) oder an ganzen Talgdrüsen-Organokulturen (Guy, 1996) sind dabei von großem Vorteil und haben einige regulatorische Mechanismen aufgezeigt. Es sind verschiedene Substanzen und Rezeptoren bekannt, die die Aktivität der Talgdrüsen *in vivo* und *in vitro* beeinflussen und kontrollieren. Die wesentlichen Funktionen der Sebozyten wie Proliferation, Differenzierung, Lipidsynthese und Lipidakkumulation

unterliegen komplexen endokrinen Regulationsmechanismen. Die wichtigsten Hormonrezeptoren sind dabei die Androgen- und Östrogenrezeptoren, die Wachstumshormonrezeptoren, die Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Rezeptoren (PPAR), Rezeptoren für Neuropeptide, die Leber-X-Rezeptoren (LXR), Retinoide und Vitamin D (Zouboulis, 2010).

Sind die hormonellen Regulationsmechanismen oder bestimmte Signaltransduktionswege gestört, kann es zu verschiedenen Talgdrüsen-assoziierten Erkrankungen kommen. Die am häufigsten vorkommende und bekannteste Störung stellt die Akne vulgaris dar, die hauptsächlich in der Pubertät unter verstärktem Androgeneinfluss und dadurch vermehrter Sebumproduktion in Erscheinung tritt. Daneben sind weitere Hauterkrankungen wie seborrhoische Dermatitis, auch bekannt als *oily skin*, und Psoriasis zu nennen (Zouboulis, 2010). In extrem seltenen Fällen können Talgdrüsen-Tumore entstehen, die sich in benigne (*Sebaceoma*) und maligne (*Sebaceous carcinoma*) Tumore einteilen lassen (Smith, 2008).

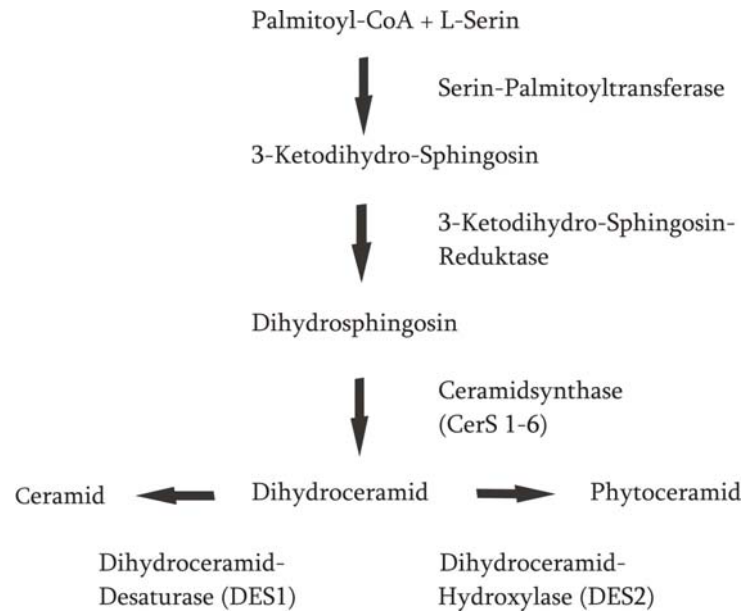
Die Talgdrüsen in der Haut sind mit einem Haarfollikel assoziiert und bilden zusammen mit diesem und der interfollikulären Epidermis die epidermale Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) aus (Blanpain, 2009). Jedoch existieren noch weitere Talgdrüsen, die nicht an einen Haarfollikel gebunden sind und deshalb als freie Talgdrüsen bezeichnet werden. Die Nomenklatur dieser Talgdrüsen geht mit ihrer Lokalisation im Körper einher. Erwähnenswert sind dabei die Meibom-Drüsen, die an den Augenlidern lokalisiert sind und das Meibum produzieren, welches eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung der Lipidschicht des Tränenfilms spielt. Des Weiteren verfügen männliche Nagetiere über Präputialdrüsen, die für die Produktion und Abgabe von Pheromonen wichtig sind. Diese sind zum einen beim Paarungsverhalten von Bedeutung und zum anderen werden sie zur Territorialabgrenzung genutzt. Weitere freie Talgdrüsen findet man an den Lippen, an der Wangenschleimhaut, an den Milchdrüsen und am Anus (Smith, 2008). Trotz unterschiedlicher Namen und Lokalisation erfüllen alle Talgdrüsen die gleiche Aufgabe, nämlich die Sekretion von Sebum nach holokriner Ruptur von reifen Sebozyten.

## 2.5 Lipide der Haut

### 2.5.1 *Epidermale Lipide und die Barrierefunktion der Haut*

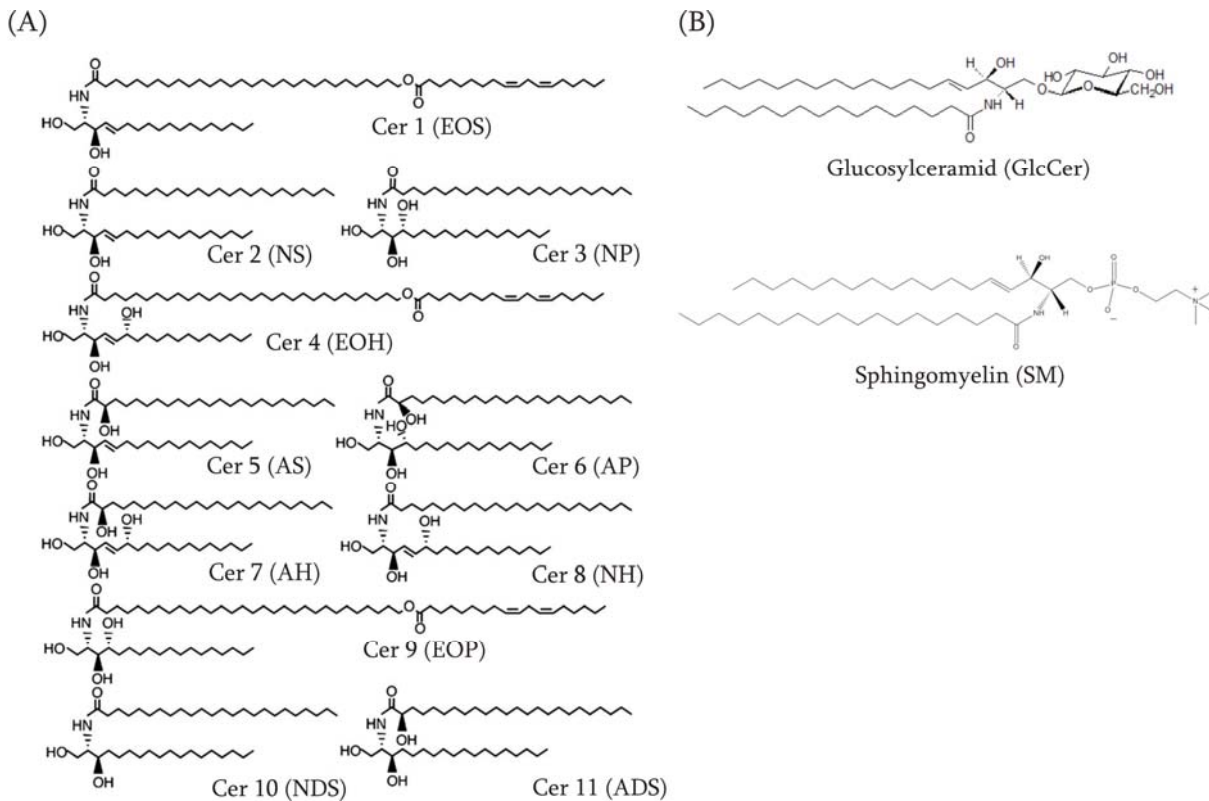
Die Epidermis ist als oberste Schicht der Haut für die Ausbildung und die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion verantwortlich, sowohl gegen Desikkation nach außen hin als auch gegen das Eindringen von Xenobiotika oder pathogenen Mikroorganismen in die Haut. Vor allem die äußerste Schicht der Epidermis, das *Stratum corneum*, das aus flachen, abgestorbenen Korneozyten besteht, spielt dabei eine entscheidende Rolle. In den extrazellulären Domänen dieser Schicht findet man eine beträchtliche Menge an Lipiden, vor allem Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren in einem ungefähr äquimolaren Verhältnis, die für die epidermale Barriere-Homöostase von Bedeutung sind (Madison, 2003). Die Ceramide stellen dabei die größte Lipidklasse dar und haben einen Gewichtsanteil von mehr als 50 % an der Gesamtlipidmenge. Sie werden entweder während der Keratinozyten-Differenzierung in den suprabasalen Schichten *de novo* synthetisiert, oder können in Lysosomen durch Recycling (*salvage pathway*) nach De-Acylierung von Sphingolipiden wieder gewonnen werden (Hannun, 2008). Bei der *de novo*-Synthese stellt die Kondensation von Palmitoyl-CoA und Serin den ersten Syntheseschritt dar. Das dabei entstehende 3-Ketodihydro-Sphingosin wird zu Dihydrosphingosin reduziert. Anschließend folgt eine N-Acylierung mit Hilfe von Ceramidsynthasen (CerS). Im Menschen und in der Maus sind sechs Ceramidsynthasen (CerS 1-6; früher auch als Lass 1-6 bezeichnet für *longevity assurance*) bekannt, die jeweils eine Spezifität für bestimmte Fettsäurelängen aufweisen. Zum Beispiel präferiert die CerS1 vor allem C18-Fettsäuren und produziert daher C18-Ceramide, die CerS 5 und 6 dagegen produzieren fast ausschließlich C16-Ceramide und CerS 2 und 3 bevorzugen längere Fettsäuren mit 22-26 C-Atomen (Mizutani, 2009). Abbildung 2-5 gibt einen Überblick über die *de novo*-Synthese von Ceramiden und die zugehörigen katalysierenden Enzyme.





**Abb. 2-5 De novo Ceramid-Biosyntheseweg in Säugetieren.** Dargestellt sind die für die Synthese benötigten Edukte und die beteiligten Enzyme, die Dihydroceramid oder andere Ceramidformen synthetisieren (modifiziert nach Mizutani, 2009).

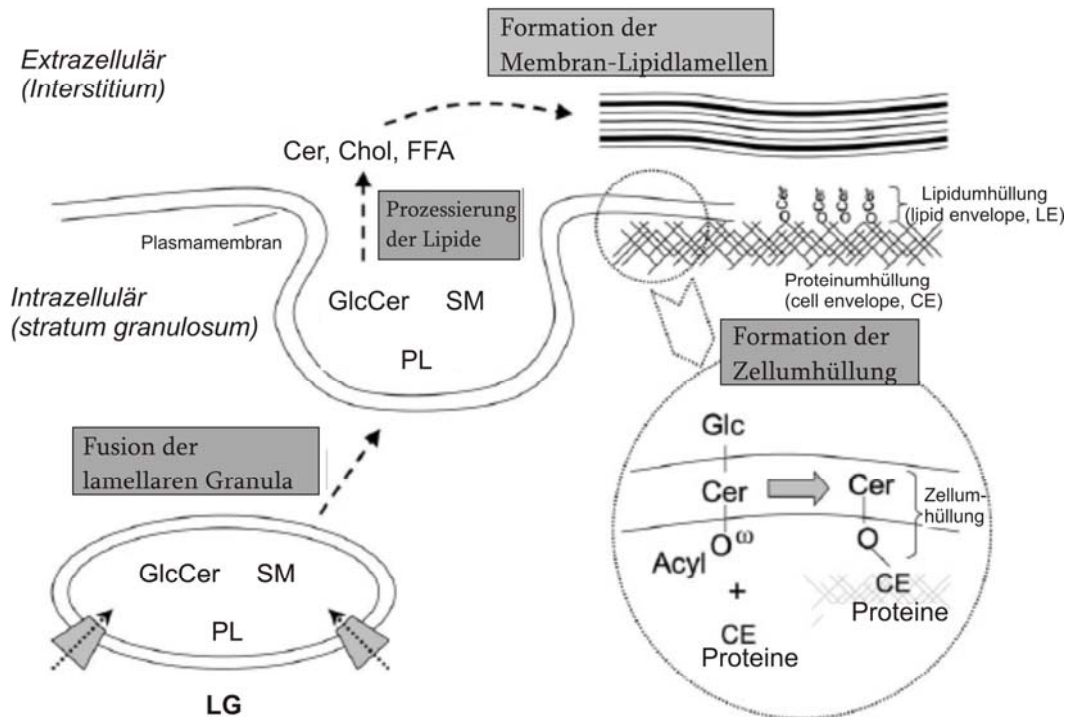
Neben Dihydrosphingosin stellt auch Sphingosin ein Sphingoidgrundgerüst dar, das nach Einwirkung einer Desaturase (DES1) entsteht. Des Weiteren gibt es noch das Phytosphingosin, das am C4 eine Hydroxylgruppe aufweist und das 6-Hydroxy-Sphingosin, das ebenfalls zusätzlich hydroxyliert ist. Diese vier verschiedenen Sphingoid-Grundgerüste und die daran gebundenen Fettsäuren, die ebenfalls Variationen aufweisen bezüglich ihres Sättigungsgrades, ihrer Länge und ihrem Hydroxylierungsstatus, führen damit zu einer Vielzahl an möglichen Ceramiden, deren Vorkommen in der Haut zum Teil einzigartig ist. Abbildung 2-6 zeigt die verschiedenen Ceramidstrukturen, die in humanem *Stratum corneum* vorkommen und die Strukturen der Sphingolipide Glucosylceramid (GlcCer) und Sphingomyelin (SM).



**Abb. 2-6 Die elf verschiedenen Ceramide im *Stratum corneum* des Menschen und die Sphingolipide Glucosylceramid und Sphingomyelin.** (A) N, A und EO machen eine Aussage über die amidgebundene Fettsäure: N, nicht-hydroxylierte Fettsäure; A,  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure; EO,  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure, die an der Hydroxylgruppe verestert ist. S, DS, P und H zeigen das Sphingoid-Grundgerüst: S, Sphingosin; DS, Dihydrosphingosin; P, Phytosphingosin; H, 6-Hydroxy-Sphingosin. NS-Ceramidformen kommen ubiquitär im Körper vor. Die  $\omega$ -O-Acylceramide (EOS, EOH und EOP) sind in ihrer Struktur einzigartig und kommen nur in der Epidermis der Haut vor (modifiziert nach Mizutani, 2009). (B) Dargestellt sind die Strukturformeln der Sphingolipide Glucosylceramid (GlcCer) und Sphingomyelin (SM).

Die in den suprabasalen Epidermisschichten neu synthetisierten Ceramide werden nach der Synthese unter der katalytischen Einwirkung der Enzyme Glucosyltransferase und Sphingomyelinsynthase sofort in Glucosylceramide (GlcCer) bzw. Sphingomyeline (SM) umgewandelt. Diese Derivatisierung stellt einen Mechanismus dar, mittels dessen die Epidermis große Mengen an Ceramiden produzieren und speichern kann, ohne dass es zu Schädigungen durch die Anhäufung dieser bioaktiven Lipide kommen könnte. Dies ist von Bedeutung, da einige Ceramid-Spezies oder deren Metabolite in Zellen Signalwirkungen bezüglich Proliferation, Differenzierung und/oder Apoptose zeigen und daher für die Zellen nachteilige Effekte hervorrufen könnten (Holleran, 2006). Die gebildeten Glucosylceramide und Sphingomyeline werden nach der Synthese zusammen mit geringeren Mengen an Phospholipiden und Cholesterol in epidermale, lamellare

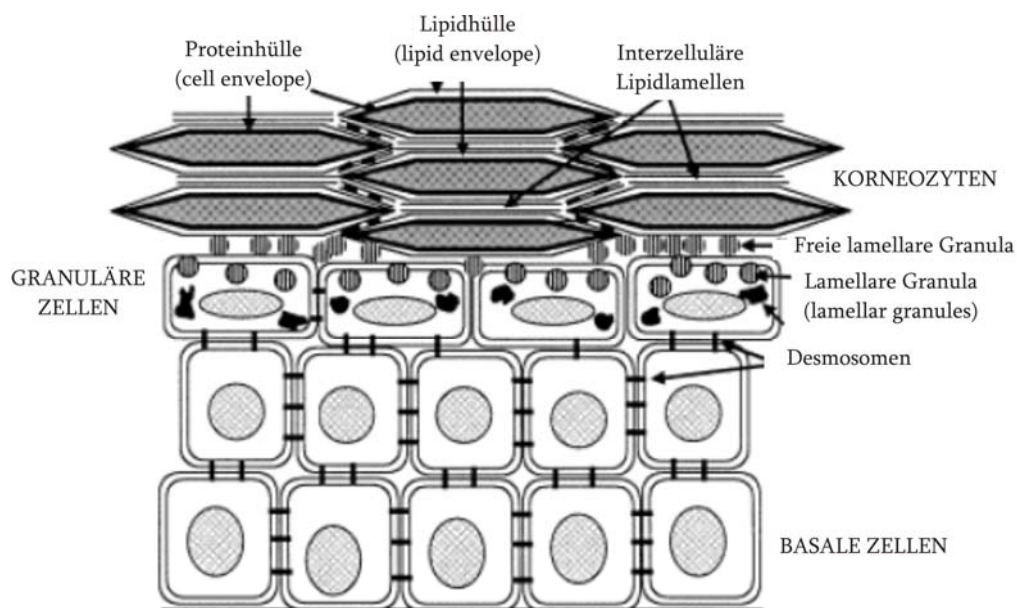
Granula (*lamellar granules*) gepackt. Darunter versteht man kleine und einzigartige Organellen, die hauptsächlich im *Stratum granulosum* vorkommen und nur unter einem Elektronenmikroskop sichtbar sind. Die Lipide sind darin schichtartig aufgebaut, daher spricht man von Lipidlamellen (*lipid lamellae*). Im letzten epidermalen Differenzierungsschritt und bei der Umwandlung der granulären Keratinozyten in Korneozyten fusionieren die lamellaren Granula mit der Plasmamembran der granulären Zellen und geben ihren Inhalt in den Interzellulärraum ab. Neben den Lipiden werden auch saure Hydrolasen, wie  $\beta$ -Glucocerebrosidase und Sphingomyelinase sekretiert, die GlcCer und SM spalten und die freien Ceramidformen wieder freisetzen (Madison, 2003). Alle Ceramide des *Stratum corneum* können aus Glucosylceramiden hervorgehen, aber nur zwei Ceramidformen, nämlich die aus dem Sphingosin-Grundgerüst mit einer nicht-hydroxylierten (NS) oder  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure (AS), entstehen zum größten Teil aus Sphingomyelin-Vorstufen (Mizutani, 2009). Abbildung 2-7 gibt einen Überblick über die Bildung der lamellaren Granula im *Stratum granulosum* und deren Freisetzung in den Interzellulärraum des *Stratum corneum*.



**Abb. 2-7 Schematische Darstellung der Bildung von lamellaren Granula und deren Sekretion.** Die lamellaren Granula (LG) werden im *Stratum granulosum* geformt und enthalten vor allem die Vorläuferlipide Glucosylceramid (GlcCer), Sphingomyelin (SM) und eine geringere Menge an Phospholipiden (PL). Die Lipide werden nach Verschmelzung mit der Plasmamembran in den Interzellulärraum des *Stratum corneum* abgegeben und dort von ebenfalls sekretierten Enzymen hydrolysiert. Es entstehen die für die Barrierefunktion der Haut wichtigsten Bestandteile: Ceramide (Cer), Cholesterin (Chol) und freie Fettsäuren (FFA). Die gesamte Zellumhüllung, die für die Impermeabilität der Haut verantwortlich ist, besteht aus  $\omega$ -OH-Ceramiden (*lipid envelope*), die kovalent an stark quervernetzte Proteine (*protein envelope*) gebunden sind (modifiziert nach Holleran, 2006).

Die Korneozyten des *Stratum corneum* sind abgestorbene, mit Keratinfilamenten und Wasser gefüllte Zellen, die von einem dichten Netzwerk an Proteinen wie Involucrin und Loricrin umschlossen sind. An diese Proteinumhülle, auch *cell envelope* (Zellumhüllung) genannt, ist eine Lipidumhülle (*lipid envelope*) kovalent gebunden, die eine Nahtstelle zwischen den hydrophilen Korneozyten und dem proteinreichen *cell envelope* sowie den aus den lamellaren Granula stammenden hydrophoben Ceramiden im Interzellulärraum darstellt. Vor allem die Ceramide mit langkettigen,  $\omega$ -hydroxylierten Fettsäuren, die an der Hydroxylgruppe zusätzlich mit Linolensäure verestert sein können, sind einzigartige Komponenten der Haut und spielen eine entscheidende Rolle bei der Barrierefunktion. Die kovalente Verknüpfung der Lipide an die Proteine erfolgt über die  $\omega$ -Hydroxylgruppe der Fettsäurereste (Bouwstra, 2006). Neben der bereits erwähnten  $\omega$ -Hydroxylierung

enthalten epidermale Ceramide auch beträchtliche Mengen an  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren. Das Enzym Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) wird in einer humanen Keratinozyten-Kultur exprimiert und katalysiert dort die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Fettsäuren (Uchida, 2007). Durch diese zusätzliche Hydroxylgruppe konnte in Modellsystemen eine vermehrte Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen gezeigt werden, die zu einer additiven Stabilisierung der lamellaren Lipidstrukturen führt und dementsprechend ebenfalls für die Bildung der epidermalen Barrierefunktion von Bedeutung ist (Uchida, 2007). Zusammengefasst sind sowohl die epidermalen Proteine als auch die Lipide der Keratinozyten für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut und für die Impermeabilität gegenüber Wasser verantwortlich, die ein Leben von Wirbeltieren auf dem Land überhaupt erst ermöglicht (Jennemann, 2007). Abbildung 2-8 gibt einen Überblick über die Keratinozytendifferenzierung und die Ausbildung der Barrierefunktion.



**Abb. 2-8 Schematische Darstellung der Keratinozytendifferenzierung in der Epidermis und der Transformation von Lipidstrukturen.** Die Korneozyten des *Stratum corneum* sind von einer Proteinhülle (*cell envelope*) umgeben, an die eine Lipidhülle (*lipid envelope*) kovalent gebunden ist. Im Interzellularraum befinden sich lamellare Lipidregionen, die hauptsächlich aus Ceramiden bestehen, welche aus lamellaren Granula des *Stratum granulosum* freigesetzt worden sind. Dieses dicht gepackte Netzwerk an Proteinen, Lipiden und Desmosomen ist für die Barrierefunktion der Haut verantwortlich (modifiziert nach Madison, 2003).

## 2.5.2 *Sebumlipide*

### 2.5.2.1 Zusammensetzung des Sebums

Unter Sebum versteht man das von den Talgdrüsen der Haut sekretierte Produkt. Es wird von den Sebozyten während ihrer Differenzierung synthetisiert und gelangt nach holokriner Ruptur der Zellen mit dem Haar durch den Haarkanal an die Hautoberfläche. Man kann die Sebumlipide, die den größten Teil der Hautoberflächenlipide darstellen, mit organischen Lösungsmitteln von der Haut und den Haaren extrahieren oder die Talgdrüsen im Ganzen isolieren und das Sebum daraus gewinnen. Letzteres ist aber eine aufwendige Prozedur, die bisher nur bei Talgdrüsen des Menschen und des Hamsters gelungen ist, weil diese z. B. im Vergleich zu den Talgdrüsen der Maus größer sind und sich damit leichter aus der Haut isolieren lassen (Smith, 2008).

Das Sebum besteht aus einem Gemisch von apolaren Lipiden, dessen Lipidkomponenten z.T. einzigartig sind und sonst nirgendwo anders im Körper vorkommen. Die Zusammensetzung des Sebums ist außergewöhnlich spezies-spezifisch, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht. Des Weiteren weisen die verschiedenen Talgdrüsen des Körpers auch innerhalb einer Tierart eine unterschiedliche Zusammensetzung der apolaren Lipide auf, wenn man beispielsweise das Sebum der Haut mit dem Meibum des Tränenfilms oder den Lipiden der Präputialdrüsen vergleicht (Nikkari, 1974).

Die wichtigsten Komponenten des Sebums sind Squalen (nicht in Mäusen), Sterole und Sterolester (SE), Wachsmonoester (WME), Wachsdierester (WDE) von Typ I und II (nicht im Menschen), Triglyceride (TG) und freie Fettsäuren (FFA). Tabelle 2-1 gibt einen Überblick über die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Sebums von Mensch und anderen Säugetieren und zeigt ebenfalls die Unterschiede zwischen dem Sebum und den Präputialdrüsenlipiden der Maus auf.

Lipid	Sebum				Präputialdrüsen
	Mensch	Ratte	Schaf	Maus	Maus
Squalen	12	0,5	Spuren	-	-
Sterole	1,4	6	12	13	3
Sterolester	2,1	27	} 25	10	5
Wachsmonoester	25	17		5	48
Typ I-Wachsdierster	-	10	9	} 65	-
Typ II-Wachsdierster	-	11	7		-
Triglyceride	41	8	6	6	17
Freie Fettsäuren	16	1	-	-	Spuren
Andere Komponenten	2	-	-	-	13
Nicht identifizierbar	-	19	31	-	

**Tab. 2-1:** Prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Komponenten des Sebums im Menschen und anderen Säugetieren sowie der Vergleich von Sebum- und Präputialdrüsen-Lipiden der Maus (modifiziert nach Nikkari, 1974).

Besonders auffällig ist die große Menge an Squalen in humanem Sebum, das man im Sebum der anderen Säugetiere kaum oder gar nicht findet. Squalen stellt ein lineares Zwischenprodukt bei der Cholesterinbiosynthese dar und wird in anderen Geweben sehr schnell zu Lanosterol und anschließend zu Cholesterol umgewandelt. Es existieren verschiedene Hypothesen für die Ursache der spezifisch hohen Mengen an Squalen in humanen Talgdrüsen. Erstens könnte eine Überexpression oder eine Überaktivität der Squalensynthese in den Sebozyten dafür verantwortlich sein (Smith, 2008). Zweitens wäre es möglich, dass eine geringere Menge an Enzymen vorhanden ist, die für die Squalenumwandlung verantwortlich sind. Die dritte und wahrscheinlich am meisten ausschlaggebende Hypothese bezieht sich auf die anaeroben Umgebungsverhältnisse in der Talgdrüse. Der Umbau von Squalen zu Squalen-2,3-epoxid, der den ersten Schritt im Umwandlungsprozess von Squalen darstellt, benötigt Sauerstoff und wäre damit im anaeroben Milieu der Talgdrüse der limitierende Faktor. Die große Menge an Squalen wäre dementsprechend auf die einzigartige Umgebung in den Talgdrüsen zurückzuführen (Smith, 2008).

Triglyceride und freie Fettsäuren machen zusammen mehr als die Hälfte des humanen Sebums aus. In Säugetieren mit Fell addieren sich diese beiden Komponenten dagegen auf weniger als 10 %. Die freien Fettsäuren stammen dabei nicht aus den Talgdrüsen selbst, sondern werden aus Triglyceriden mit Hilfe von Lipasen an der Hautoberfläche freigesetzt (Kellum, 1967). Es ist nicht bekannt, ob auch andere Ester des Sebums auf ähnliche Weise hydrolysiert werden (Downing, 1970). In Präputialdrüsen findet man ebenfalls Triglyceride, jedoch keine freien Fettsäuren. Diese Tatsache zeigt deutlich, dass die spaltenden Lipasen an der Hautoberfläche bakterieller Abstammung sein müssen und dementsprechend im sterilen Körperinneren nicht vorhanden sind (Nikkari, 1974).

Wachsmonoester (WME) kommen im Menschen und auch in allen anderen Säugetieren vor. Sie bestehen aus einem aliphatischen, langkettigen ( $C_{10}$ - $C_{32}$ ), gesättigten oder einfach ungesättigten Monoalkohol, der mit einer Fettsäure verestert ist. Die Monoalkohole können dabei in ihrer Form weiter variieren und werden in vier Kategorien eingeteilt: (1) gerade Kette und gerade Anzahl an C-Atomen, (2) gerade Kette mit ungerader Anzahl an C-Atomen, (3) verzweigte Kette mit iso-Monomethylgruppe und (4) verzweigte Kette mit anteiso-Methylgruppe (Nicolaidis, 1967). Die veresterten Fettsäuren weisen die gleichen Variationsmöglichkeiten wie die Fettalkohole auf und können zusätzlich mehrfach ungesättigt sein, sowie mit zwei verzweigten Methylgruppen vorliegen (Nicolaidis, 1972). Das Vorkommen verzweigter Ketten und einer ungeraden Anzahl an C-Atomen in den Sebumbestandteilen ist bemerkenswert einzigartig und wird nirgendwo anders im Körper beobachtet (Smith, 2008).

Wachsdierester (WDE) stellen eine Sebumkomponente dar, die in Säugetieren mit Fell vorkommt und vor allem in Mäusen einen sehr großen Anteil ausmacht. Diese Ester können auf zwei verschiedene Weisen gebildet werden. Typ I-WDE entstehen aus einer  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure, deren Carboxylgruppe mit einem Fettalkohol verestert ist und die Hydroxylgruppe mit einer weiteren Fettsäure kondensiert. Typ II-WDE entstehen dagegen durch die Kondensation von einem Alkan-1,2-Diol mit zwei Fettsäuren. Die Variationen und Eigenschaften von Fettalkoholen und Fettsäuren, die für die obigen Wachsmonoester beschrieben worden sind, gelten ebenfalls für die WDE, jedoch



existieren dort große Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten. Die WDE sind zum Teil ebenfalls sehr Spezies-spezifisch aufgebaut (Nikkari, 1969). Im humanen Sebum findet man weder Wachsdierester noch kann man deren Hydrolyseprodukte wie  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren oder 1,2-Diole nach Verseifung nachweisen. In murinem Sebum findet man im Vergleich zu anderen Nagetieren allerdings nur Typ II-WDE, dementsprechend kann man nach Esterspaltung 1,2-Diole messen. Die Präputialdrüsen dieser Tiere weisen dagegen überhaupt keine WDE auf und den größten Anteil haben hier die Wachsmoester (Nikkari, 1974).

Das durchschnittliche Molekulargewicht von Wachsmoestern und Wachsdierestern der Maus ( $C_{58}$ - $C_{60}$ ) und der Ratte ( $C_{56}$ - $C_{58}$ ) ähnelt dem der Triglyceride in humanem Sebum ( $C_{54}$ - $C_{55}$ ). Die sehr ähnliche Molekülgröße (846-869) und verwandte chemische Struktur legen die Vermutung von ähnlichen oder gleichen physikalischen Eigenschaften dieser Lipide nahe. Aus teleologischer Sicht muss es einen Nutzen oder einen Vorteil von Triglyceriden für die größtenteils haarlose Haut des Menschen geben und einen anderen für die Wachsdierester im Sebum von Säugetieren mit einem Fell. Die Triglyceride werden an der humanen Hautoberfläche mit Hilfe von Lipasen bakteriellen Ursprungs zum Teil zu freien Fettsäuren gespalten, die dort antibakteriell und antimykotisch wirken sollen (Nikkari, 1974). Die Monoglyceride dagegen sollen emulgierende Eigenschaften haben (Nicolaidis, 1970). Die Wachsdierester in Nagetieren werden jedoch an der Hautoberfläche nicht hydrolysiert und sind im Vergleich zu Triglyceriden etwas weniger polar. Diese Tatsache mag für einen besseren Schutz der Tiere vor Witterungsnässe verantwortlich sein. Die genaue Funktion der einzelnen Sebumbestandteile ist allerdings nicht ganz klar und muss in weiteren Forschungsarbeiten untersucht werden. Einige Hypothesen über die allgemeinen Funktionen des Sebums werden im Folgenden noch intensiver besprochen.

### 2.5.2.2 Funktion des Sebums

Der Mechanismus der Sebumproduktion in den Talgdrüsen ist sehr gut analysiert worden und auch die einzelnen Bestandteile konnten in den letzten Jahrzehnten charakterisiert werden. Jedoch gibt es bis heute nur Hypothesen über die mutmaßliche Funktion des Sebums. Der offensichtlichste Zweck ist der Überzug der Haut und der Haare mit einem hydrophoben Film, der beide vor Austrocknung und Nässe schützt (Nikkari, 1974). Des Weiteren werden folgende Funktionen diskutiert:

(1) Die Sebumsekretion an die Hautoberfläche ist der wichtigste physiologische Weg zur Versorgung der Haut mit Vitamin E. Vitamin E ist ein bekanntes Antioxidans, wobei dessen Formen  $\alpha$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocopherol signifikante Bestandteile des humanen Sebums sind. Die freigesetzte Menge an Vitamin E hängt von der Talgdrüsendichte ab und ist dementsprechend im Gesicht zwanzig Mal höher als am Unterarm, der viel weniger Talgdrüsen besitzt (Thiele, 1999). Zusätzlich korreliert die Menge an freigesetztem Vitamin E mit der Squalenmenge im humanen Sebum und stellt damit eine physiologische, antioxidative Strategie dar, um die Oxidationsprodukte von Squalen, wie Squalen-Peroxide, effektiv zu eliminieren. Diese Peroxide und weitere reaktive Sauerstoffspezies können zu einem Zusammenbruch der Barrierefunktion führen und spielen auch beim Alterungsprozess eine entscheidende Rolle. Damit ist die Anlieferung von Vitamin E mittels Sebumsekretion in der Haut eine wichtige Funktion zur Verhinderung bzw. Verlangsamung des Hautalters und zur Aufrechterhaltung der gesunden Barrierefunktion.

(2) Eine weitere Funktion wird durch das Vorkommen von spezifischen Fettsäuren in humanem Sebum vermutet. Die Sapiensäure (C16:1  $\Delta$ 6) und die Octadecadiensäure (C18:2  $\Delta$ 5, 8) sind die wesentlichen Fettsäuren des humanen Sebums (Zouboulis, 2010). Sapiensäure zeigt antibakterielle Aktivität gegen grampositive Bakterien wie *S. aureus* und *S. pyogenes*. Der Wirkmechanismus beruht auf der Inhibition des bakteriellen Enzyms FabI, das bei der Fettsäuresynthese eine wichtige Rolle spielt und den letzten und limitierenden Schritt bei der Kettenelongation in Bakterien katalysiert (Smith, 2008).

Diese antibakteriellen Eigenschaften der ungesättigten Fettsäuren stellen damit eine weitere Funktion des Sebums dar.

(3) Eine dritte diskutierte Funktion des Sebums ist die Feuchterhaltung der Haut. Vor allem das bei der Triglyceridspaltung durch Lipasen entstehende Glycerol ist dafür verantwortlich (Fluhr, 2003).

Die Tatsache, dass Fehlfunktionen in den Talgdrüsen von Mäusen oft mit Auffälligkeiten oder Störungen in der Haut und in den Haaren einhergehen (Smith, 2008), legt die Vermutung nahe, dass das Sebum allgemein ein wichtiger Bestandteil der gesamten Haarfollikel-Einheit ist. Damit wäre das Sebum ebenfalls für die normale Funktionalität der gesamten epidermalen Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) mitverantwortlich.

## 2.6 Dysfunktionen in Haut und/oder Haaren

In der Literatur sind in der Vergangenheit viele spontane Mutationen in Mäusen beschrieben worden, die einen abnormalen Phänotyp bezüglich Haut- und Haarentwicklung, Haarwachstumszyklus und Haarstruktur nach sich zogen. Zusätzlich zu den spontan auftretenden Fehlfunktionen können mit bio- und gentechnologischen Methoden bestimmte Gene gezielt ausgeschaltet oder überexprimiert werden, um die genauen Funktionen des gewünschten Gens und dessen Proteins zu analysieren. Im Folgenden sollen einigen Beispiele für Erkrankungen der Maus und/oder des Menschen erwähnt werden, die die Bedeutung von bestimmten Funktionseinheiten im Rahmen der Haut- und Haarfollikel-Homöostase aufzeigen.

### *2.6.1 Homöostase und Barrierefunktion der Haut*

Die epidermalen Proteine und Lipide des *Stratum corneum*, die zusammen eine zwischen den Korneozyten dicht quervernetzte Zelllipidumhüllung ausbilden (*cell lipid envelope*), sind für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut und für die Impermeabilität gegenüber Wasser verantwortlich (Jennemann, 2007). Bereits geringe Fehlfunktionen der

Lipidsynthese- oder prozessierung können massive Folgen nach sich ziehen und sogar letale Auswirkungen haben. Es wurde gezeigt, dass sehr langkettige Fettsäuren (*very long chain fatty acids, VLCFA*) mit  $\geq 28$  C-Atomen, die entweder als freie Fettsäuren oder als Bestandteile von Sphingolipiden vorkommen, eine entscheidende Rolle bei der Barrierefunktion der Haut spielen. Die Fettsäure-Elongase 4 (ELOVL4) hat die  $\omega$ -OH-Fettsäure mit 26 C-Atomen als Substrat und katalysiert die weitere Elongation zu sehr langkettigen Fettsäuren. ELOVL4-*Knock-Out*-Mäuse weisen in ihrer Epidermis dementsprechend keine  $\omega$ -OH-Fettsäuren mit  $\geq 28$  C-Atomen auf und zeigen eine Akkumulation von C26-Fettsäuren. Sie zeichnen sich zusätzlich durch eine verzögerte Differenzierung der Keratinozyten und eine abnormale Struktur des *Stratum corneum* aus. Die Tiere sterben wenige Stunden nach der Geburt aufgrund eines Permeabilitätsdefektes in der Haut (Li, 2007). Nach der Synthese von Ceramiden in den suprabasalen Schichten wird an diese Lipide Glucose mit Hilfe der Glucosylceramidsynthase geknüpft, um Glucosylceramide (GlcCer) zu formen. Diese werden im *Stratum granulosum* in die lamellaren Granula gepackt. Nach der Freisetzung dieser Organellen in den Interzellulärraum des *Stratum corneum* spaltet die  $\beta$ -Glucocerebrosidase die Glucose wieder ab und die Ceramide (Cer) bilden die Lipidumhüllung (*lipid envelope*) aus, die für die Barrierefunktion der Haut verantwortlich ist. Um zu überprüfen, wie wichtig diese Lipidprozessierung ist, wurden Mäuse mit einer epidermisspezifischen GlcCer-Synthase-Defizienz generiert. Die Tiere weisen ein verdicktes, unstrukturiertes *Stratum corneum* auf, die lamellaren Granula haben eine irreguläre Form und die Mengen an freiem  $\omega$ -OH-Ceramid und  $\omega$ -OH-Sphingomyelin sind vierfach erhöht, vermutlich aufgrund der fehlenden GlcCer-Synthese. Vier Tage nach der Geburt zeigen die Mäuse eine ausgeprägte Abschuppung der Haut und einen extremen transepidermalen Wasserverlust auf, der schließlich zum Tod der Tiere führt (Jennemann, 2007). Ebenso wichtig wie die GlcCer-Synthese ist auch die Spaltung dieses Moleküls nach der Freisetzung aus den lamellaren Granula. Der eher seltene, totale Ausfall des Enzyms  $\beta$ -Glucocerebrosidase in Patienten mit Morbus Gaucher kann in sehr schwerwiegenden Fällen zu einer drastischen Akkumulation von GlcCer führen und die

Barrierefunktion der Haut kann vermutlich aufgrund des erheblichen Cer-Mangels nicht ausgebildet werden. Die Patienten versterben kurz nach der Geburt aufgrund eines transepidermalen Wasserverlustes (Lui, 1988). Eine weitere Störung bezüglich des Ceramidgehaltes in der epidermalen Haut stellt die atopische Dermatitis des Menschen dar. Die Trockenheit der Haut bei diesen Patienten wurde anfangs oft auf verminderte Talgdrüsenaktivität zurückgeführt, doch diese Vermutung konnte revidiert werden. Heutzutage weiß man, dass eine veränderte Aktivität von an der Lipidsynthese beteiligten Enzymen für die Veränderungen in den Anteilen verschiedener epidermaler Lipide verantwortlich ist (Zouboulis, 2010). Ähnlich verhält es sich bei der Erkrankung Psoriasis, die durch einen verminderten Cer-Gehalt in der Epidermis gekennzeichnet ist (Holleran, 2006). Abschließend kann man festhalten, dass nicht nur die einzelnen Lipidsyntheseschritte und die Prozessierung der Lipide eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Barrierefunktion der Haut spielen, sondern ebenfalls die genaue Zusammensetzung der Lipide und deren Wechselwirkungen.

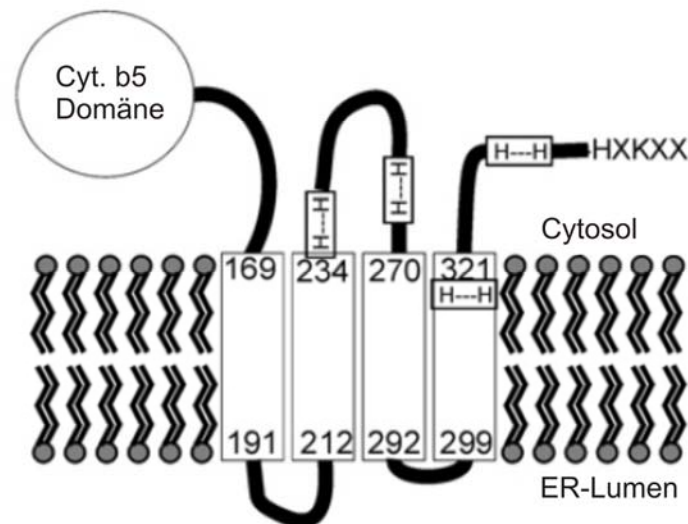
### *2.6.2 Homöostase des Haarfollikels*

In der Literatur wurden in der Vergangenheit viele verschiedene Störungen bezüglich der Entwicklung des Haarfollikels und des Haarzyklus oder einer veränderten Struktur des Haarschaftes bei Labormäusen beschrieben. Dabei handelte es sich oft um spontane Mutationen in Mäusen, wie zum Beispiel *furless*-Maus (Green, 1954), *nackt*-Maus (Benavides, 2002), *angora*-Maus (Hebert, 1994) und *asebia*-Maus (Sundberg, 2000). Die Mutationen hatten alle eine Dysfunktion in einem bestimmten Bereich des Haarfollikels zur Folge, die den Haar- und/oder Haut-Phänotyp begründete. Neben den spontan auftretenden Mutationen wurden teilweise gezielt Gene mutiert, um Aufschluss über bestimmte und teilweise in ihrer Funktion noch unbekannte Gene zu erhalten. Die verschiedenen aus diesen Arbeiten resultierenden Phänotypen können dabei in sechs Gruppen eingeteilt werden. (1) Eine abnormal geringe Anzahl an Haarfollikeln, (2) Störungen in der Haarfollikelmorphogenese, (3) Beeinträchtigung des Haarzyklus,

(4) abnormale Struktur des Haarfollikels, (5) Störungen bezüglich der Talgdrüse und (6) Haarwachstumsstörungen als Konsequenz von immunologischen Fehlfunktionen (Nakamura, 2001). Zusammenfassend kann man festhalten, dass die komplexe Biologie des Haarfollikels und der ganzen epidermalen Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) eine umfangreiche Grundlage für mögliche Störungen und Mutationen darstellt, die vielfältige Auswirkungen bezüglich der Haarentwicklung und des Haarwachstums nach sich ziehen kann.

## 2.7 Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H)

Ceramide und Sphingolipide sind Bausteine der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen, die zum Teil als hydroxylierte Formen vorliegen können. Die Hydroxylierung kann dabei am C4-Atom des Sphingosin-Grundgerüsts oder am C2-Atom der amidgebundenen Fettsäure beobachtet werden. Die letztgenannten hydroxylierten Lipidstrukturen kommen dabei in fast allen Organismen vor, z.B. in Hefen, Pflanzen, Würmern und Säugetieren (Alderson, 2004). Das einzige bisher bekannte Enzym, das die  $\alpha$ -Hydroxylierung von unverzweigten Fettsäuren katalysiert, ist die Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H). Das Enzym FA2H gehört zur Familie der membrangebundenen Lipiddesaturasen bzw. Lipidhydroxylasen, hat eine Masse von 43 kDa und besteht aus 372 Aminosäuren. Das Protein weist eine N-terminale Cytochrom-b5-Domäne auf, die beim Hydroxylierungsschritt vermutlich als Elektronendonator fungiert, und verfügt über vier Transmembrandomänen sowie vier konservierte Histidinmotive (Eckhardt, 2005). Die FA2H ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und weist am C-Terminus ein ER-Rückhaltesignal auf. Abbildung 2-9 zeigt das Topologie-Modell der FA2H in der Membran.



**Abb. 2-9 Topologie-Modell der FA2H in der Membran.** Gezeigt sind die N-terminale Cytochrom-b5-Domäne, die vier Transmembrandomänen und die vier konservierten Histidinmotive. Am C-Terminus befindet sich das potentielle ER-Rückhaltesignal HXKXX (modifiziert nach Eckhardt, 2005).

Im Myelin sind die Sphingolipide Galaktosylceramid und Sulfatid häufig am  $\alpha$ -C-Atom hydroxyliert. Es ist deshalb anzunehmen, dass die  $\alpha$ -Hydroxylierung bei der Bildung und der Funktionalität des Myelins von besonderer Bedeutung ist. In der Epidermis spielen die  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und Sphingolipide neben den  $\omega$ -hydroxylierten Lipiden eine essentielle Rolle bei der Ausbildung der Permeabilitätsbarriere der Haut (Hama, 2010). Aus vorherigen Arbeiten ging hervor, dass die FA2H in den Keratinozyten der Haut des Menschen exprimiert wird und dort für die Ausbildung der epidermalen Membranlamellen sowie für die Barrierefunktion der Haut von Bedeutung ist (Uchida, 2007). Northern Blot-Analysen von murinen Geweben konnten die Existenz der FA2H in der Haut der Maus ebenfalls bestätigen (Eckhardt, 2005).

Um den Einfluss dieses Enzyms im zentralen und peripheren Nervensystem sowie bei der Ausbildung der Barrierefunktion der Haut zu untersuchen, wurden FA2H-KO-Mäuse generiert (Zöller, 2008). Die Generierung erfolgte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen. Dazu wurden Exon 3 und 4 des *Fa2h*-Gens durch ein  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen (LacZ) ersetzt, welches *in frame* in Exon 3 eingefügt wurde. Dadurch wird in den FA2H-KO-Tieren ein Fusionsprotein exprimiert, das aus der N-terminalen Cytochrom-b5-Domäne und der  $\beta$ -Galaktosidase besteht.

RT-PCR-Ergebnisse sowie Southern- und Northern Blot-Analysen haben gezeigt, dass der *Knock-Out* funktionell ist (Zöller, 2008).

FA2H-KO-Mäuse zeigen im zentralen und peripheren Nervensystem eine vollständige Abwesenheit von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden. Die reguläre Myelinbildung ist jedoch überraschenderweise nicht gestört. Lediglich ältere Mäuse (> 18 Monate) weisen eine Degeneration in Axonen und im Myelin auf (Zöller, 2008). Mutationen im humanen *Fa2h*-Gen haben dagegen Symptome wie Leukodystrophie, spastische Paraparese und Dystonie zur Folge (Edvardson, 2008). Eine weitere FA2H-Mutation im Menschen führt zu neurodegenerativen Fehlfunktionen, die man in die Gruppe der erblich bedingten, spastischen Paraplegien einordnet (Dick und Eckhardt, 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der FA2H und die damit einhergehenden Störungen im Sphingolipid-Metabolismus die Pathogenese einer Neurodegeneration mit Akkumulation von Eisen (*neurodegeneration with brain iron accumulation, NBIA*) im Gehirn bedingt (Kruer, 2010). Damit ist das FA2H-Enzym bzw. dessen Fehlfunktion für einen ganz neuen Subtyp der NBIA verantwortlich.

Der Einfluss der FA2H auf die Haut- und Haarentwicklung wurde ebenfalls anhand von FA2H-KO-Mäusen untersucht und ist Bestandteil dieser Arbeit. Die physiologische Rolle und Funktion der FA2H und der  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide in anderen Geweben, wie z.B. im Magen, Darm oder Hoden ist bisher größtenteils unbekannt und bedarf in Zukunft weiterer Analysen.



## 3 Material

### 3.1 Chemikalien, Materialien und Reagenzien

Alle Chemikalien, Materialien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

- |   |                          |
|---|--------------------------|
| • Amersham Hybond™-N+ Membran                         | GE Healthcare            |
| • BrdU-labeling-Reagenz                               | BioGenex                 |
| • Bioimager Screens                                   | Fuji/Raytest             |
| • Chemilumineszenz Substrat (ECL-Kit)                 | Pierce                   |
| • Einmalspritzen                                      | Braun                    |
| • Filterpapier (Blotting-Papier) BF 2                 | Sartorius AG             |
| • Glaswolle   | Hasenmüller Labortechnik |
| • Kryoröhrchen  | Nalgene Cryoware         |
| • Milchpulver   | Reformhaus               |
| • Nitrocellulose Membran                              | Schleicher & Schnell     |
| • QIAquick Gel Extraktion                             | Qiagen                   |
| • QIAquick PCR Purification                           | Qiagen                   |
| • QIA-Plasmid Mini Kit                                | Qiagen                   |
| • QIA-Plasmid Midi Kit                                | Qiagen                   |
| • Phusion® Taq-Polymerase                             | Finnzymes                |
| • Restriktionsendonukleasen                           | New England Biolabs      |
| • Röntgenfilme Biomax MR                              | Kodak                    |
| • SPE-Säulchen, Cromabond 3 ml                        | Macherey-Nagel           |
| • Super Frost Plus Objektträger                       | Menzel-Glaser            |
| • <i>Super Sensitive™ Link-Label detection system</i> | BioGenex                 |
| • Stickstoff  | Linde Gas                |
| • Tissue Tek OCT                                      | Sakura                   |
| • Zymoclean Gel DNA Recovery Kit                      | Zymo Research            |

## 3.2 Geräte

• Agarosegelkammern		Selbstanfertigung
• Brutschrank	Thermo Electron	Forma Scientific
• DC-Auftragsprayer	TLC sampler 4	Camag
• Digital pH-Meter	761 Calimatic	Knick
• Dispergiergerät	Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel
• Elektrophoresekammern	Mini-Protean 3	BioRad
• Elektrotansfer-Kammer	Trans-Blot SD <i>semi-dry</i>	BioRad
• ESI-Ionenfalle	HCT-Ultea PTM	Bruker
• Feinwaage	CP124S-0CE	Sartorius
• Filmentwickler-Maschine	Curix 60	Agfa
• Flachbettscanner	PowerLook III	Umax
• Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100M	ZEISS
• Gefrierschrank -20°C	Öko Arctis	AEG
• Gefriertruhe -80°C	Ultra low	Sanyo Scientific
• Geldokumentationsanlage	Gel-Doc-2000	BioRad
• Heizblock	Block Heater	Stuart Scientific
• Inkubator für DC	UT 6120	Heraeus
• Kryostat	CM 1510 S	Leica
• Lichtmikroskop	Telaval 31	Zeiss
• MALDI-TOF	Voyager STR	Applied Biosystems
• Mikroplattenleser	GENios	Tecan
• Mikrotom	CS 2511	Leica
• Mikrowelle	Histoprocessor	Milestone
• Minizentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR
• Paraffiniermaschine	Tissue Vip/Tek TEC	Sakura
• PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra
• Schmelzpunktmessgerät	Buchi Model 535	Büchi Labortechnik
• Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
	DV 640	Beckmann
• Sterilbank	Clean-Air	Bio-Flow
• Szintillationszähler	LS 6500	Beckman Coulter
• Vakuumpumpe	MZ2C	Vacuubrand
• Vakuumentrifuge	SpeedVac SC100	Savant
• Waage	PC 4400	Mettler
• Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus	Millipore
• Wasserbad	1083	GFL
• Ultrazentrifuge	Optima TLX	Beckmann Coulter
• Zellzählkammer	Neubauer	Brand GmbH
• Zentrifugen	5415 D, 5417 R, 5810 R	Eppendorf
	Allegra 6KR	Beckmann
	Labofuge 400e	Heraeus

### 3.3 Antikörper

#### 3.3.1 *Primärantikörper*

- Anti-BrdU aus Maus, BioGenex, Fremont, CA, USA [IF: *ready to use*]
- Anti-CD34 aus Ratte, Hycult Biotech, Beutelsbach, Deutschland [IF: 1:25]
- Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragment, Roche, Mannheim [1:5000 – 1:10.000]
- Anti-huFA2H aus Maus, abcam, Cambridge, UK [IF: 1:100 – 1:250, WB: 1:1000]
- Anti-mFA2H-Antiserum aus Kaninchen, affinitätsgereinigt, Pineda, Berlin [1:800]
- Anti-Flag aus Maus, abcam, Cambridge, UK [IF: 1:500, WB: 1:5000]
- Anti-GFP aus Kaninchen, abcam, Cambridge, UK [WB: 1:5000]
- Anti-K5 aus Kaninchen, Geschenk von Thomas Magin, Bonn [IF: 1:200]
- Anti-K14 aus Kaninchen, Geschenk von Thomas Magin, Bonn [WB: 1:30.000]
- Anti-Ki67 aus Ratte, DAKO, Hamburg, Deutschland [1:25 – 1:50]
- Anti-MC5 aus Huhn, Geschenk von Diane M. Thiboutot, PennState, USA [1:25]
- Anti-PDI aus Kaninchen, abcam, Cambridge, UK [2 µg/ml]

#### 3.3.2 *Sekundärantikörper*

- Anti-Huhn-Cy2, Geschenk von Thomas Magin, IBMB, Bonn [1:400]
- Anti-Kaninchen IgG-Cy3 aus Ziege, Dianova [1:500]
- Anti-Kaninchen IgG-Cy2, Geschenk von Thomas Magin, IBMB, Bonn [1:800]
- Anti-Kaninchen IgG (H+L)-Peroxidase aus Ziege, Dianova [1:5000]
- Anti-Maus-Alexa 488 aus Ziege, Molecular Probes [1:400]
- Anti-Maus-Alexa 546 aus Ziege, Molecular Probes [1:400]
- Anti-Maus-Peroxidase aus Ziege, Dianova [1:5000]
- Anti-Ratte IgG (H+L)-Alexa 488 aus Ziege, Molecular Probes [1:200]

### 3.4 Bakterienstämme und Zelllinien

#### 3.4.1 *Bakterien*

E. coli XL-1 Blue    supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1,  
lac[F<sup>+</sup>proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>2</sup>lacZΔM15 Tn10 (tetr<sup>r</sup>)] (Bullock, 1987)

### 3.4.2 Zelllinien

- CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*; Theodore T. Puck, 1957)
- HaCaT (*Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes* – eine spontan immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie; Petra Boukamp, 1988)
- HEK-293 (*Human Embryonic Kidney-Zellen*; Harvey M. Shein, 1962)
- SZ95 (Immortalisierte, humane Sebozyten-Zelllinie; Christos Zouboulis, 1999)

## 3.5 Lösungen, Medien und Puffer

Alle verwendeten Lösungen, Medien und Puffer wurden mit Wasser angesetzt, welches vorher durch das Millipore System gereinigt worden ist.

### 3.5.1 *Allgemeine Lösungen und Puffer*

10x MOPS	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 7,0
10x PBS	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 M NaCl 25 mM KCl, pH 7,4
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
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 ad 1 L mit dH <sub>2</sub> O, pH 8,0
DEPC-H <sub>2</sub> O	dH <sub>2</sub> O wird mit 0,1 % DEPC gemischt, über Nacht bei RT gerührt und anschließend 2x autoklaviert

EtBr-Lösung	5 mg/ml Ethidiumbromid
Lysepuffer (Mausschwänze)	20 mM Tris-HCl, pH 8 150 mM NaCl 2 mM EDTA, pH 8 1 % SDS (Proteinase K (100 µg/ml) frisch hinzufügen)
Tris-HCl	0,1 M Tris-HCl in dH <sub>2</sub> O, pH 7; pH 8; pH 9

### *3.5.2 Lösungen und Laufmittel für DC-Analysen*

DC-Färbelösung	625 mM Kupfersulfat 9,4 % Phosphorsäure konz.	
DC-Laufmittel Sphingolipide	Chloroform/Methanol/dH <sub>2</sub> O	70/30/5 65/25/4
DC-Laufmittel Ceramide	Chloroform/Methanol/Essigsäure	190/90/1 (2x laufen lassen)
DC-Laufmittel Sebumlipide	Hexan/Toluol	1/1 15/65
DC-Laufmittel 1,2-Diole	Chloroform/Methanol	80/20
DC-Laufmittel Fettsäuren, 1,2-Diole und Fettalkohole	Chloroform/Methanol	60/6 60/4

### *3.5.3 Lösungen und Puffer für proteinbiochemische Analysen*

4x Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	8 % SDS 40 % Glycerol 240 mM Tris-HCl 4 % Bromphenolblau 4 % β-Mercaptoethanol
------------------------------------	--

---

10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % SDS, pH 8,6
Acrylamid	40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
Antikörper- Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS/TBS Rühren und durch einen Faltenfilter filtrieren
Blotpuffer	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % (v/v) Methanol
ECL-Lösung	2,5 mM Luminol (Fluka) in DMSO 0,4 mM p-Coumarsäure (Fluka) in DMSO 100 mM Tris-HCl pH 8,5 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
L-(IV)-Puffer	0,25mM Bromphenolblau 30 % Glycerol 10 mM Tris-HCl, pH 7,0
Lysepuffer (Zellen)	1 % Triton X-100 oder NP-40 20 mM Tris-HCl, pH 8 50 mM NaCl 5 mM EDTA 1 mM PMSF 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin
Ponceau-Lsg.	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
TBS-T	1x TBS mit 0,05 % Tween-20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS

### 3.5.4 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium	1 % NaCl 0,5-1 % Hefe-Extrakt 1 % Trypton auf pH 7,2 einstellen, Lösung autoklavieren
LB-Agarplatten	1,5 % Agar in LB-Medium mischen und Lösung autoklavieren Auf ca. 50°C abgekühlte Lösung in Petrischalen gießen
Ampicillin	100 µg/ ml
Kanamycin	50 µg/ml

### 3.5.5 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Zellkultur- und Verbrauchsartikel wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen, Zellkulturmedien und -lösungen von Invitrogen (Karlsruhe), Biochrom AG (Berlin) und CELLnTEC (Bern).

CHO-Zellen	DMEM-F12 (5 % FCS [hitzeinaktiviert], 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
HaCaT-Zellen	DMEM (10 % FCS [hitzeinaktiviert], 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
HEK-Zellen	DMEM (5 % FCS [hitzeinaktiviert], 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
Primäre Maus-Keratinocyten	CnT-07 zur Isolation, CnT-02 zur Differenzierung mit 1x CnT-ABM (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B)
Primäre Humane Keratinocyten	K-SFM Medium (50 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml BPE, 10 ng/ml EGF)
SZ95 Zellen	Sebomed basal Medium (10 % FCS [hitzeinaktiviert], 5 ng/ml rh EGF, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

Einfriermedium	
➤ HaCaT	10 ml HaCaT-Komplettmedium, 6 ml FCS, 4 ml DMSO
➤ SZ95	45 % Sebomed-Komplettmedium, 20 % FCS, 7 % DMSO
G418-Stock	125 mg/ml G418-Sulfat in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert

### 3.5.6 Lösungen und Puffer für Färbungen an Zellen und Gewebeschnitten

4 % PFA	4 g Paraformaldehyd in 70 ml dH <sub>2</sub> O Erhitzen auf 60°C, rühren, evtl. Zugabe von 1-2 Tropfen 1 N NaOH Nach Abkühlen Zugabe von 10 ml 10x PBS und auf 100 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen, Aliquots bei -20°C lagern
Antikörper-Blockierlösung	1 % <i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA) in 1x PBS oder 1x TBS
Maleinsäurepuffer (MAB-Puffer)	100 mM Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl
Blocklösung <i>in situ</i>	2 % Blocking Reagenz in MAB-Puffer
Hybridisierungs- lösung <i>in situ</i>	50 % Formamid 2 % Denhardt's Lösung (50x) 10 % Dextransulfat 0,25 % ssDNA (10 mg/ml) 10 % Hybridisierungssalz (3 M NaCl, 0,1 M PIPES, 0,1 M EDTA)
Waschpuffer <i>in situ</i>	Maleinsäurepuffer, pH 7,5 0,3 % Tween 20
AP-Puffer <i>in situ</i>	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Eosin-Lsg.	0,1 % Eosin in dH <sub>2</sub> O
Hämatoxylin-Lsg.	Mayer's Hämalaunlösung, unverdünnt



LacZ- Färbepuffer	0,1 M 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 Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
LacZ- Fixierungspuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 5 mM EGTA 2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 % Glutaraldehyd Aufbewahrung bei 4°C
LacZ- Waschpuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 2 mM MgCl <sub>2</sub>
X-Gal-Stock-Lsg.	50 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
Formol-Calcium- Lösung (Baker)	1 Vol 10 % CaCl <sub>2</sub> , 1 Vol 37 % Formaldehyd, 1 Vol dH <sub>2</sub> O
OilRedO- Stamm-Lsg. A	0,5 g OilRedO in 100 ml 99 %-igem Isopropanol lösen
OilRedO- Stamm-Lsg. B	60 ml Stammlösung A 40 ml dH <sub>2</sub> O Stammlösung B nach Mischen 24 h stehen lassen und kurz vor Gebrauch mittels Faltenfilter filtrieren

### 3.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer stammen von MWG Biotech AG

Aktin-for	5'-TCCATCATGAAGTGTGACGT-3'
Aktin-rev	5'-GAGCAATGATCTTGATCTTCAT-3'
Epigen-hu-for	5'-CATCAACGGTGCTTGTGCATTCC-3'
Epigen-hu-Var1-rev	5'-TCAAGTGCTCACACCTTTCTCCAGT-3'
mEpithelial mitogen (Epgn)-for	5'-ATTCCACCATGAGCTGAAGC-3'

mEpithelial mitogen (Epgn)-rev		5'-ATCCACAGCATACGAAGTTAG-3'
mFA2H shortarmanti		5'-GCTCTTCTTCAAGAGCCATCC-3'
mFA2H wtsense		5'-GTGCTGTACCTCAGCTGGTC-3'
mFA2H neoneu		5'-ATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'
mFA2H (exons 5/6)-for		5'-AGCCATTACCTCATCATGTTG-3'
mFA2H (exons 5/6)-rev		5'-TAGAAGAAGGCAATCACTAGG-3'
huFA2H-for1		5'-GTCATGCACGGCCAGCACCA-3'
huFA2H-rev1		5'-TCACCAGGGAGGCTGGCACA-3'
EGFP-siRNA	sense	5'-GCAGCACGACUUCUUCAAG-3'
	antisense	5'-CUUGAAGAAGUCGUGCUGC-3'
huFA2H-2-siRNA	sense	5'-GACAGAUCCUGCUAUGGAA-3'
	antisense	5'-UUCCAUAGCAGGAUCUGUC-3'
Ubiquitin C-for		5'-AGGCAAGACCATCACCTTGGACG-3'
Ubiquitin C-rev		5'-CCATCACACCCAAGAACAAGCACA-3'

### 3.7 Plasmide

- pBlueScript (pBSK)
- pCMV-SPORT6
- pEGFP-C1, 2, 3
- pFlag

## 4 Methoden

### 4.1 Arbeiten mit Bakterien

#### *4.1.1 Transformation*

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von fremder, freier DNA in prokaryotische Zellen. Durch bestimmte Selektionsgene innerhalb des transformierten Plasmids, wie z.B. Antibiotikaresistenzen, können erfolgreich transformierte Bakterien selektioniert werden.

Hier wurden 100 µl chemisch kompetente XL-1 blue E. coli Bakterien zur Transformation verwendet. Diese wurden zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit 10 ng Plasmid oder einem Drittel eines Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Der Transformationsansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert, 45 sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und dann weitere 2 min auf Eis stehen gelassen. Daraufhin wurde der Ansatz mit 900 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Von dieser Bakterienkultur wurden 100 µl auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank wachsen lassen.

### 4.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### *4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus einer über Nacht angesetzten Bakterienkultur wurden die *Qiagen* Kits nach Angaben des Herstellers verwendet. Abhängig von der Menge wurden Mini- und Midi-Präparationen durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf einer modifizierten alkalischen Zellyse (Birnboim and Doly

1979), bei der das unterschiedliche Denaturierungsverhalten der Nukleinsäuren genutzt wird, um Plasmid-DNA von chromosomaler DNA der Bakterien zu trennen.

#### *4.2.2 Präparation von RNA aus Zellen und Geweben*

Alle Arbeiten mit RNA fanden unter RNase-freien Bedingungen mit dafür speziell vorgesehenen Lösungen, Chemikalien und Laborgeräten statt.

Bei der Präparation von RNA aus Zellen oder Geweben wurde stets das Trizol-Reagenz verwendet, welches eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat darstellt und auf der Methode von Chomczynski und Sacchi, 1987 beruht.

Konfluente Zellen in einer 6-*well*-Platte wurden 1x mit PBS gewaschen und danach sofort mit 800 µl Trizol versetzt und abgeschabt. Die Zellsuspension wurde durch wiederholtes Aufziehen und Abziehen mit einer 21G-Kanüle homogenisiert. Nachdem unlösliche Bestandteile mit einem Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt werden konnten, wurde der Überstand abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1/10 des Start-Volumens an BCP (1-Bromo-3-Chloro-Propan) versetzt. Es wurde mindestens 1 min gevortext, eine kurze Zeit bei Raumtemperatur stehen gelassen und wieder abzentrifugiert. Aus dem wässrigen und klaren Überstand konnte mit Hilfe von Isopropanol die RNA gefällt werden. Nach einem Waschschrift mit 75% Ethanol wurde das RNA-Pellet kurz getrocknet und dann in RNA-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der RNA konnte mit dem NanoDrop-Photometer vermessen werden und die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Zur Homogenisierung von Geweben wurde entweder der Ultra-Turrax verwendet, wobei das Gewebe direkt mit Trizol auf Eis homogenisiert wurde oder das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff im Mörser mit einem Pistill zu einem Gewebepulverhaufen verrieben, der dann in 1,6 ml Trizol aufgenommen wurde.

### 4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur analytischen und präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren verwendet. DNA und RNA weisen aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung auf und wandern deshalb in einem elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode.

Jeweils abhängig von der Größe der aufzutrennenden Moleküle wurden 0,8-2 %-ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer gegossen. Darin waren zusätzlich 0,2-0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthalten, welches als Interkalans fungierte und im Anschluss erlaubte die Nukleinsäuren unter UV-Licht bei 260 nm sichtbar zu machen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Die Bestimmung der DNA-Längenfragmente erfolgt durch den parallelen Auftrag eines DNA-Längenstandards. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TAE-Puffer.

### 4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 4.2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren aber auch deren Reinheit kann photometrisch mit Hilfe von UV-Absorption bestimmt werden. DNA und RNA weisen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Bei 280 nm misst man die Absorption von aromatischen Aminosäureresten, also von Verunreinigungen durch Proteine. Der  $A_{260}/A_{280}$ -Quotient macht dementsprechend eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure-Präparation. Dieser sollte für DNA-Präparationen über 1,8 und für RNA-Präparationen über 1,9 liegen. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde meistens mit dem NanoDrop-Photometer bestimmt.

#### 4.2.4.2 Konzentrationsabschätzung im Agarosegel

Die Konzentrationsabschätzung mit Hilfe eines Agarosegels wurde vor allem dann durchgeführt, wenn sehr geringe Mengen an Nukleinsäure erwartet wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über einen Vergleich der Bandenintensität zwischen der eingesetzten Probe mit unbekannter Konzentration und einer Probe bekannter Nukleinsäurekonzentration. Für letzteres wurden 400 ng  $\lambda$ -DNA-Molekulargewichts-Marker aufgetragen und die zur Konzentration proportionale Leuchtintensität einer Bande in einem Ethidiumbromid-Agarosegel mit derjenigen des Referenzstandards verglichen. In einem Agarosegel konnte man ebenfalls sehr gut erkennen, ob die eingesetzte Probe rein war und dementsprechend eine einzige, klare Bande aufwies.

### *4.2.5 Herstellung rekombinanter Plasmide*

#### 4.2.5.1 Plasmidspaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in der Plasmid-DNA und spalten an diesen Stellen die Phosphodiesterbindungen der DNA-Stränge. Dadurch können DNA-Fragmente gezielt aus der Plasmid-DNA isoliert und für weitere Experimente verwendet werden.

#### 4.2.5.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach einem Verdau mit Restriktionsendonukleasen werden die verschiedenen DNA-Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die für die Klonierung benötigten DNA-Fragmente werden aus dem Agarosegel mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und im Anschluss mit Hilfe eines DNA-Extraktion-Kits von Qiagen oder Zymo-Research nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### 4.2.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter dem Begriff Ligation versteht man die Verknüpfung eines Vektormoleküls mit einem gewünschten DNA-Insert mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Diese verknüpft dabei die kompatiblen Enden der beiden DNA-Fragmente. Die Ligation kann sowohl mit *sticky ends* als auch mit *blunt ends* durchgeführt werden und wird anschließend für eine Transformation in Bakterien verwendet. Die genaue Versuchsdurchführung verlief nach Herstellerangaben der Firma Fermentas.

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

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung eines definierten DNA-Fragments. In den Reaktionsansatz kommen üblicherweise sieben Komponenten: DNA, Puffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Mix, spezifische Primer, Taq-Polymerase und dH<sub>2</sub>O. In einigen speziellen Fällen sind weitere Zusätze notwendig, wie z.B. DMSO oder der Einsatz von anderen Polymerasen.

Die PCR läuft in einem ThermoCycler nach einem bestimmten Verfahren ab. Zunächst wird der Ansatz auf 95°C erhitzt, dabei wird die DNA zu Einzelsträngen getrennt (*Denaturierung*). Eine darauf folgende Abkühlung ermöglicht eine spezifische Bindung der Primer an die komplementären Bereiche der zu vervielfältigenden DNA. Diesen Vorgang nennt man *Annealing*. Bei der *Elongation* wird die einzelsträngige DNA in Anwesenheit von dNTPs durch eine spezielle thermostabile DNA-Polymerase zu einem Doppelstrang aufgefüllt. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte ergibt sich eine exponentielle Anreicherung der zwischen den Primern gelegenen DNA, die nach der PCR mittels Agarosegelelektrophorese analysiert werden kann.

Programm für eine FA2H-Genotypisierungs-PCR:	94°C	5 min	
	95°C	30 sec	} 32 x
	59°C	45 sec	
	72°C	90 sec	
	72°C	10 min	
	4°C	∞	

### 4.3 Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden unter Werkbänken mit *Laminar-Air-Flow*-Technik durchgeführt. Es wurde mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, Materialien und Kulturmedien gearbeitet. Die Kultivierung aller Zellen in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre.

#### *4.3.1 Passagieren von Zellen*

Im Regelfall wurde das Medium der Zellen 2-3x pro Woche gewechselt. Die Zellen wurden geteilt, wenn sie einen subkonfluenten Zustand (90-95 % Konfluenz) erreicht hatten. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen bei Raumtemperatur oder im Brutschrank mit Trypsin inkubiert, bis sie sich vom Kulturschalenboden ablösten. Die Trypsinlösung wurde mit FCS-haltigem Medium verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Die Wahl der Schalen bzw. Flaschen und die ausgesäte Zellanzahl waren jeweils vom folgenden Experiment abhängig.

#### *4.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Zum Einfrieren wurden die Zellen 5-10 min bei 1000 x g pelletiert, in geeignetem eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und in 1,8 ml-Einfrierröhrchen (Nalgene) überführt. Zum Durchfrieren wurden die Zellen über Nacht bei -80°C in Styroporständern gelagert und am nächsten Tag in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.



Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und die Einfrierröhrchen in den Händen erwärmt, bis nur noch ein minimaler Teil des Mediums gefroren war. Daraufhin wurde das Einfriermedium mit neuem, kaltem Medium im Überschuss verdünnt und die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem und warmem Medium wieder aufgenommen und in geeignete Zellkulturgefäße ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt.

### *4.3.3 Transfektion*

Unter dem Begriff der Transfektion versteht man die Einschleusung von fremden DNA-Molekülen in eukaryotische Zellen. Bei der transienten Transfektion gelangt die DNA zwar in die Wirtszelle, wird jedoch aber auch recht schnell wieder abgebaut und wird nicht an weitere Generationen weitergegeben. Im Gegensatz dazu steht die stabile Transfektion, bei der die DNA stabil ins Genom integriert wird und deshalb an die Tochterzellen weiter gegeben wird.

Es wurden hauptsächlich folgende Transfektionsverfahren genutzt:

- Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode für die transiente Transfektion von HEK-Zellen (Graham & van der Ebb, 1973)
- Turbofect-Transfektionsreagenz (Fermentas) für die transiente Transfektion von CHO-Zellen
- Lipofectamin 2000-Transfektionsreagenz (Invitrogen) für die transiente und stabile Transfektion von HaCaT-Zellen, sowie transiente Transfektion von SZ95-Zellen, humanen und murinen primären Keratinozyten

Die Transfektionsbedingungen wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Zellen wurden ca. 4-5 h nach der Transfektion mit frischem Medium gefüttert und nach 24-48 h geerntet und für Experimente verwendet.

#### 4.3.4 Primärkultur von murinen Keratinozyten

Für die Gewinnung von primären murinen Keratinozyten wurde die Epidermis der Rückenhaut von neonatalen Mäusen verwendet. Die genaue Durchführung ist dem Protokoll der Firma CellNTec zu entnehmen: *Isolation and passaging protocol, mouse epidermal keratinocytes*. Für die Trennung von Dermis und Epidermis wurden die Rückenhautstücke über Nacht bei 4°C mit Dispase II (5 mg/ml) in CnT-07 Medium inkubiert. Nach der Abtrennung der Epidermis wurden die Keratinozyten mit Hilfe von TrypLE isoliert. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$  sowohl in Schalen und Flaschen als auch auf Deckgläschen in 24-*well* Platten ausgesät. Das CnT-07 Medium wurde am Tag nach der Isolation und alle 2-3 Tage während der Kultivierung gewechselt, bis die Zellen subkonfluent (ca. 90-95 %) waren und zur Analyse herangezogen werden konnten.

Mit dem CnT-07 Medium, das nur sehr wenig Calcium enthält (0,07mM), wiesen die isolierten, primären Zellen die Eigenschaften von basalen, undifferenzierten Keratinozyten auf. Wurde das Medium bei subkonfluentem Zustand durch das CnT-02 (0,07mM) Medium ausgetauscht und am nächsten Tag Calcium hinzugefügt (Anstieg auf 1,2mM), konnten die Zellen durch die erhöhte Konzentration des Calciums zum Ausdifferenzieren gebracht werden. Die Zellen wurden nach der Calcium-Erhöhung eine Woche lang kultiviert und dann analysiert.

## 4.4 Färbungen an Zellen und Gewebeschnitten

### 4.4.1 *Antigendemaskierung (Antigen retrieval)*

Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte weisen oft eine geringe bis gar nicht mehr vorhandene Immunreaktivität auf. Bestimmte nachzuweisende Epitope können daher von Antikörpern oft nicht mehr erkannt werden. Deshalb wurde in einigen Fällen nach der Entparaffinierung von Paraffinschnitten eine Antigendemaskierung

(*Antigen retrieval*) durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte in Citratpuffer in einer geeigneten Mikrowelle (Milestone Microwave Vacuum Histoprocessor RHS-1, Programm: GPR 100 C) erhitzt und ca. 30 min bei Raumtemperatur wieder abgekühlt. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in 1x PBS oder 1x TBS konnten die Schnitte für eine Immunfärbung oder Immunhistochemie verwendet werden.

Citratpuffer: Stammlösung A = 0,1 M Citronensäure-Monohydrat, Stammlösung B = 0,1 M Natrium-Citrat. Beide Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Die Gebrauchslösung (18 ml von A + 82 ml von B + 900 ml dH<sub>2</sub>O, pH6) wurde stets frisch hergestellt.

#### 4.4.2 Immunfluoreszenz-Analyse

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden Gewebeschnitte oder auf Deckgläschen ausgesäte Zellen verwendet.

Die Zellen wurden zuerst 10 min lang mit 4 % PFA fixiert und anschließend gut mit PBS gewaschen. Durch die Inkubation in einer 0,3 % Triton-X-100-Lösung in TBS für 10 min wurden die Zellen permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS fand die Blockierung in einer feuchten Kammer mit einer 1 %-igen BSA-Blocklösung in TBS für 30-60 min statt. Primärantikörper wurden in der Block-Lösung verdünnt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde der Sekundärantikörper aufgegeben und im Dunkeln für 1 h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften erfolgte für 5 min lang die DAPI-Kernfärbung. Die Deckgläschen wurden noch 2x mit TBS und 1x mit Wasser gewaschen und abschließend mit einem Polyvinyl-Alkohol-Einbettmedium eingedeckelt.

Gewebeschnitte wurden auf die gleiche Weise gefärbt. Diese mussten jedoch vorher evtl. entparaffiniert werden und vor der eigentlichen Färbung erfolgte meist eine Antigen-Demaskierung (4.4.1).

### 4.4.3 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung ermöglicht die Detektion von Nukleinsäuren in Zellen und Gewebeschnitten. Dabei ist RNase-freies Arbeiten erforderlich.

Paraffinschnitte wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert. Dabei wurden die Objektträger in drei aufeinanderfolgenden Xylolbädern für je 10 min inkubiert. Eine Rehydrierung der Schnitte erfolgte über eine absteigend konzentrierte Propanol-Reihe für jeweils 5 min (100 %, 100 %, 100 %, 96 %, 90 %, 75 %, 50 %). Nach weiteren 5 min in PBS wurden die Gewebeschnitte für 90 min in 4 % PFA fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS gewaschen, für 4 min in PBS mit Proteinase K (10 µg/ml) inkubiert, erneut gewaschen und in PBS mit 0,25 % Triton X-100 für 4 min permeabilisiert. Nach weiteren drei Waschschritten in PBS folgten die Inkubationen in 0,2 M HCl für 8 min, in 0,1 M TEA für 10 min sowie eine 10-minütige Inkubation in 2x SSC bei 50°C. Daraufhin wurden die Schnitte mit der jeweiligen Sonde versetzt, die vorher entsprechend ihrer Markierungssignalstärke in Hybridisierungspuffer mit 0,08 M DTT verdünnt worden war. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag erfolgte ein Waschschriff bei 60°C in 2x SSC für 30 min, gefolgt von einer Inkubation in 50 % Formamid / 0,1x SSC für 20 min und einer abschließenden Inkubation bei 70°C für 45 min in 0,1x SSC. Die Detektion begann mit der Äquilibrierung der Schnitte in MAB-Puffer für mindestens 5 min. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit Hilfe einer 2 %-igen Blocklösung abgesättigt und die Gewebeschnitte über Nacht bei 4°C mit dem Anti-Digoxigenin AP Fab-Fragment inkubiert.

Daraufhin wurden die Objektträger 5 x je 1 h in Maleinsäurepuffer gewaschen. Für die Entwicklung wurde NBT / BCIP verwendet, das zusätzlich 2 mM Levamisol enthielt, um endogene Phosphatasen zu inhibieren. Die Entwicklung erfolgte im Dunkeln in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur.

#### 4.4.4 BrdU-Markierungs-Reaktion

5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, das bei der Zell-Replikation in die neu synthetisierten DNA-Stränge inkorporiert wird. Die BrdU-Aufnahme von sich teilenden Zellen ist ein guter Marker für die zelluläre Proliferationsrate.

Für dieses Experiment wurden P10 alte Tiere verwendet. Den Mäusen wurden intraperitoneal jeweils 10µl BrdU-Labeling-Reagenz (100 mg/ml; BioGenex, San Ramon, CA, USA) / g Körpergewicht 2,5 h vor deren Tötung injiziert. Die Rückenhaut wurde in Paraffin eingebettet und es wurden 4-6 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Nach der Deparaffinierung wurden die Objektträger für 30 min bei 37°C in 2 N HCl inkubiert und anschließend gut in 1x PBS gewaschen. Danach folgte eine 30-minütige Behandlung in 0,1 % Trypsinlösung in PBS bei 37°C. Nach erneutem Waschen wurden die Hautschnitte mit dem BrdU-Antikörper (BioGenex) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Signale mit dem *Super Sensitive™ Link-Label IHC* Detektionssystem (BioGenex) mit 3,3´Diaminobenzidin als Substrat detektiert. Die Hautschnitte wurden für 30 sec mit Hämatoxylin gegengefärbt, um die Histologie besser erkennen zu können. Die Einbettung erfolgte mit einem Polyvinyl-Alkohol-Einbettmedium.

#### 4.4.5 H&E-Färbung

Unter der H&E-Färbung versteht man das Anfärben von Zellen und Gewebeschnitten mit Hämatoxylin, das die Zellkerne dunkelblau färbt, und anschließend mit Eosin, das das Zytoplasma rosa anfärbt. Diese Methode dient der histologischen Strukturanalyse. Dabei werden die Schnitte 30-90 sec lang in Hämalaun-Lösung inkubiert und dann in warmem Leitungswasser gebläut, bis das Wasser klar ist. Es folgt eine 30 sec lange Inkubation in der Eosin-Lösung und daraufhin werden die Schnitte in einer aufsteigend konzentrierten Ethanol-Reihe dehydriert. Nach einer abschließenden Inkubation in absolutem Ethanol werden die Schnitte in Xylol geklärt und mit DPX eingedeckelt.

#### 4.4.6 PAS-Färbung (*Perjodsäure-Schiff-Reagenz*)

Für die PAS-Färbung wurden Paraffinschnitte des Dünn- und Dickdarms verwendet, die zunächst entparaffiniert wurden. Dafür wurden die Objektträger 2x für 10 min in Xylol getaucht, weiterhin für jeweils 1 min in eine absteigend konzentrierte Ethanol-Reihe (100 %, 95 %, 75 % und 50 %) und abschließend kurz in dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Schnitte in einer frisch hergestellten 0,5 %-igen Perjodsäure-Lösung in dH<sub>2</sub>O für 10 min inkubiert. Nach einem 10-minütigen Waschschriff mit Leitungswasser wurden diese für 10 min mit Schiff's Reagenz versetzt. Danach wurde für 1 min in Leitungswasser gewaschen und für eine bessere histologische Darstellung kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach Waschen in warmem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zuletzt 2x 5 min lang mit Xylol versetzt. Die Objektträger wurden schließlich mit DPX eingedeckelt.

#### 4.4.7 *LacZ-Färbung*

Das E. coli Gen *lacZ* codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches das farblose Substrat X-Gal zu einem blauen unlöslichen Indigofarbstoff umsetzt.

Die Gefrierschnitte der unterschiedlichen Gewebe von FA2H-heterozygoten (+/-) und FA2H-KO-Tieren (-/-) wurden LacZ-gefärbt, um die FA2H-Expression in bestimmten Organen zu untersuchen. Dafür wurden die Gefrierschnitte für 5 min im LacZ-Fixierungspuffer inkubiert, zweimal mit LacZ-Waschpuffer gewaschen und bei 37°C in der LacZ-Färbelösung inkubiert. Die Färbedauer war abhängig von der FA2H-Menge und lag bei 1 h bis 3 Tage. Anschließend wurde 2x im Waschpuffer gewaschen, gegebenenfalls mit Hämatoxylin gegengefärbt und schließlich in Kaisergelatine eingedeckelt.

#### 4.4.8 *OilRedO-Färbung an Gefrierschnitten und Zellen*

Die Gefrierschnitte oder die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden zunächst für 5-10 min in einer 4 %-igen Formol-Calcium-Lösung (Baker, 1946) fixiert. Anschließend wurde kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 5 min in 60 %-igem Isopropanol äquilibriert. Es folgte eine Inkubation für 10 min in der OilRedO-Stammlösung B, die durch kurzes Waschen (20 sec) in 60 %-igem Isopropanol beendet wurde. Danach wurde kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen, kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt sowie mit warmem Leitungswasser gebläut und anschließend mit Kaiser's Gelatine eingedeckelt.

### 4.5 Lipidanalytik

#### 4.5.1 *Lipidextraktion*

Die Lipidextraktionen wurden mit organischen Lösungsmitteln in genau definierten Verhältnismengen durchgeführt. Zum Einsatz kamen hauptsächlich Chloroform, Methanol und Aceton.

##### 4.5.1.1 Lipidextraktion aus Geweben

Für die Lipidextraktion aus Organgeweben wurden diese zunächst mit Hilfe des Ultra Turrax in einem kleinen Volumen 1x TBS homogenisiert und anschließend in dem zehnfachen des Gewebevolumentums an Lösungsmitteln extrahiert. Die erste Extraktion erfolgte in Chloroform/Methanol 2/1 für 4 h unter Rühren in einem 60°C heissen Wasserbad. Die nach dieser Zeit nicht extrahierten Gewebeanteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (1000 x g, 5 min) pelletiert und der klare Überstand wurde durch mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipetten filtriert. Das Gewebe-Pellet wurde für weitere 4 h in Chloroform/Methanol 1/1 unter Rühren bei 60°C extrahiert. Erneut wurde das nicht gelöste Gewebematerial durch Zentrifugieren und Filtrieren abgetrennt und die

zusammengefügten Filtratfraktionen wurden bei 50°C unter Stickstoff-Gas eingedampft. Die danach erhaltenen Lipide wurden in 300 µl Chloroform/Methanol 1/1 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Verseifung und Abtrennung von Triglyceriden und Phospholipiden wurden die Gesamtlipide in Methanol aufgenommen und durch Zugabe von 4 M NaOH für 2 h bei 37°C alkalisch hydrolysiert. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 10 µl Eisessig gestoppt und die Lipide konnten unter Stickstoff-Gas eingedampft werden. Die wieder in Methanol aufgenommenen Lipide wurden daraufhin entsalzt. Zur Entsalzung des Lipidextrakts wurden selbstgestopfte Säulen aus mit Glaswolle abgedichteten Pasteurpipetten verwendet, die mit LiChroprep-RP-18-Material (Merck) gefüllt und 2x mit 1 ml Chloroform/Methanol/0,1 M KCl 6/96/94 äquilibriert wurden. Die eingedampfte Lipidfraktion wurde in 1 ml Methanol aufgenommen, mit 1 ml 300 mM Ammoniumacetat versetzt und auf die Säule gegeben. Nach dem Durchsickern wurde die Säule 6x mit 1 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und die an die Säule gebundenen Lipide wurden durch Zugabe von 1 ml Methanol gefolgt von 6x 1 ml Chloroform/Methanol 1/1 eluiert. Der entsalzte Lipidextrakt wurde bei 50°C im N<sub>2</sub>-Strom eingedampft und in 600 µl Chloroform/Methanol 1/1 aufgenommen.

Für die Lipidextraktion aus der Epidermis oder aus der gesamten dorsalen Haut und den Ohren wurde die oben beschriebene Methode etwas abgewandelt. Die Homogenisierung des Hautgewebes erfolgte durch Mörsern mit Hilfe eines Pistills in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser. Das dadurch erhaltene Gewebepulver wurde für die Lipidextraktion verwendet. Die erste Extraktion wurde mit Chloroform/Methanol/Wasser 1/2/0,5 bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die zweite Extraktion erfolgte in Chloroform/Methanol 1/1 bei 37°C für ca. 9-10 h. Es schloss sich eine dritte Extraktion bei 37°C in Chloroform/Methanol 2/1 über Nacht an. Die zusammengefügten Überstände der Extraktionen enthielten die nicht kovalent gebundenen Lipide, die unter Stickstoff-Gas eingedampft wurden. Die Lipide wurden daraufhin in 500 µl Chloroform/Methanol 1/1 in Glasfläschchen aufgenommen.



Im verbleibenden Pellet befanden sich die an Proteine kovalent gebundenen Lipide. Um diese zu waschen, wurde das Pellet 3 x mit je 2 ml Methanol für 5 min bei RT versetzt und wieder abzentrifugiert. Für die Extraktion wurde das Gewebepellet 2x für 2 h in 95 %-igem Methanol bei 60°C extrahiert. Die Überstände der Extraktionen wurden zusammengefasst und zur Spaltung der kovalenten Bindungen wurde 1 ml 1 M KOH in 95%-igem Methanol zugegeben und 2 h bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml dH<sub>2</sub>O und 2 ml Chloroform zugegeben. Die herausgelösten Lipide gingen dabei in die lipophile Chloroform-Phase über und konnten so isoliert werden. Die abgetrennte Chloroform-Phase wurde unter Stickstoff-Gas eingedampft und die Lipide in Chloroform/Methanol 1/1 aufgenommen und in Glasfläschchen überführt. Diese konnten ebenfalls bei -20°C gelagert werden.

#### 4.5.1.2 Lipidextraktion aus Zellen

Die Lipidextraktion aus Zellen erfolgte nach Bligh and Dyer (1959). Das Medium wurde dabei abgenommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Daraufhin wurden PBS/EDTA zugegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet aus einem konfluenten 6-*well* wurde in 400 µl 1x PBS resuspendiert und mit 1,5 ml Chloroform/Methanol 1/2 versetzt und kräftig gevortext. Darauf kamen 0,5 ml Chloroform und nach kurzem Vortexen folgte eine Zugabe von 0,5 ml dH<sub>2</sub>O. Nach kurzem Vortexen wurde eine Phasentrennung mit Hilfe eines Zentrifugationsschritts (2 min, 3000 x g) erreicht. Die untere, lipophile Phase wurde abgenommen und im Vakuum in einer *SpeedVac*-Vakuumpumpe abgedampft. Die Lipide wurden in Chloroform/Methanol 1/1 aufgenommen und konnten bei -20°C gelagert werden.

Wurden für die Lipidextraktion mehr oder weniger Zellen verwendet, so wurden die Volumina der eingesetzten Lösungsmittel dafür angepasst, wobei aber immer das gleiche Verhältnis von Chloroform/Methanol/Wasser beibehalten wurde.

#### 4.5.1.3 Extraktion von Oberflächenlipiden (Sebumlipiden), Festphasenextraktion und alkalische Hydrolyse zur Freisetzung von Alkan-1,2-Diolen aus Wachsdiestern

Die hauptsächlich aus den Talgdrüsen stammenden Oberflächenlipide wurden gewonnen, indem die Mäuse nach Genickbruch mehrmals komplett in 10-20 ml Aceton getaucht wurden. Der Aceton-Extrakt wurde durch Glaswolle filtriert und unter N<sub>2</sub>-Strom bei 50°C eingedampft. Die Lipide wurden in 1 ml Hexan aufgenommen und konnten bei -20°C gelagert werden.

Für die Festphasenextraktion wurden Aminopropyl-Säulchen (Chromabond, Macherey-Nagel) verwendet, die anfangs mit 10-15 ml Hexan äquilibriert wurden. Die in Hexan gelösten Lipide wurden daraufhin auf die Säule geladen und mit verschiedenen Hexan-Toluol-Verhältnissen in unterschiedliche Fraktionen eluiert.

- 1 Fraktion: Durchfluss des in Hexan gelösten Lipidextraktes
- 2 Fraktion: Elution mit 3 ml Hexan → einige Sterolester und Wachsmonoester (WME)
- 3 Fraktion: Elution mit 3 ml Hexan/Toluol 95/5 → Sterolester und WME
- 4 Fraktion: Elution mit 3 ml Hexan/Toluol 90/10 → Wachsdier
- 5 Fraktion: Elution mit 3 ml Hexan/Toluol 85/15 → evtl. restliche Wachsdier
- 6 Fraktion: Elution mit 3 ml Hexan/Toluol 80/20 → bisher unbekannte Substanz

Die einzelnen Fraktionen wurden unter N<sub>2</sub>-Strom bei 50°C eingedampft und in 0,5 ml Hexan aufgenommen. Die Lipidauftrennung nach der Festphasen-Extraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie in Hexan/Toluol 1/1 überprüft.

Die WDE-Fraktion wurde weiterhin alkalisch hydrolysiert, um die Alkan-1,2-Diole und Fettsäuren freizusetzen. Dafür wurden 300 µl von der Fraktion 4 verwendet und mit 3 ml Chloroform sowie 3 ml 0,6 M NaOH in Methanol versetzt und 4 h bei 42°C inkubiert. Anschließend kamen 2,4 ml dH<sub>2</sub>O zu dem Gemisch. Nach gründlichem Mischen wurden die Phasen mit Hilfe eines Zentrifugationsschritts wieder getrennt und die untere, lipophile Phase wurde unter N<sub>2</sub>-Strom bei 50°C eingedampft und in 0,5 ml Chloroform aufgenommen. Die Lipide wurden daraufhin wieder auf Aminopropyl-Säulchen (Chromabond, Macherey-Nagel) gegeben, die vorher mit 3 ml Chloroform äquilibriert

wurden. Es erfolgte wieder eine Elution der einzelnen Bestandteile mit verschiedenen zusammengesetzten Lösungsmitteln:

- 1 Fraktion: Durchfluss des in Chloroform gelösten Lipidextraktes
- 2 Fraktion: Elution mit 3 ml Chloroform → Fettsäuremethylester (FAME's)
- 3 Fraktion: Elution mit 3 ml Chloroform und 30 µl Methanol → Kontrolle
- 4 Fraktion: Elution mit 2x 3 ml Chloroform und 60 µl Methanol → 1,2-Diole
- 5 Fraktion: Elution mit 3 ml Chloroform und 150 µl Methanol → Kontrolle

Die einzelnen Fraktionen wurden unter N<sub>2</sub>-Strom bei 50°C eingedampft und in 0,2 ml Chloroform/Methanol 1/1 aufgenommen. Nach der Festphasen-Extraktion wurde die Lipidauftrennung mittels DC im Laufmittel Chloroform/Methanol 80/20 für 1,2-Diole und in Hexan/Toluol 1/1 für FAME's überprüft.

#### *4.5.2 Schmelzpunktmessung von Oberflächenlipiden*

Die Oberflächenlipide wurden durch das Tauchen der getöteten Mäuse in Aceton gewonnen. Nach Filtration durch Glaswolle wurden die Lipide unter N<sub>2</sub>-Strom eingetrocknet. Diese wurden anschließend in einem kleinen Volumen an n-Hexan aufgenommen und in Schmelzpunktröhrchen überführt. Das Hexan wurde über Nacht bei 37°C eingedampft. Die Schmelzpunkte der eingetrockneten Oberflächenlipide wurden mit einem Kapillar-Schmelzpunktmeßgerät (Buchi Modell 535) bestimmt. Da sich im Sebum viele verschiedene Substanzen befinden, konnte kein genauer Schmelzpunkt definiert werden. Es wurden zwei Temperaturen gemessen. Die erste Temperatur wurde notiert, wenn der Schmelzprozess eindeutig eingesetzt hatte und die zweite, wenn das Gemisch komplett flüssig war.

### 4.5.3 Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) diente der Auftrennung und Aufreinigung von Lipidgemischen. Dafür wurden die gesamten Lipidextrakte zusammen mit entsprechenden Lipidstandards mit Hilfe eines Dünnschichtplatten-Auftragegerätes (Camag) auf Kieselgel 60-Dünnschichtplatten (Merck) aufgesprüht und in Kammern entwickelt, die mit einem geeigneten Fließmittel befüllt und gesättigt waren. Die verwendeten Lipidvolumina wurden aus dem Gesamtgewicht der zur Extraktion eingesetzten Gewebe berechnet. Zur Visualisierung der Lipide wurden die DC-Platten mit der DC-Färbelösung (625 mM CuSO<sub>4</sub> in 8 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) eingesprüht, mit einem Fön getrocknet und bei 180°C 5 min inkubiert. Dadurch kam es zu einer sichtbaren Veraschung der Kohlenstoff-Moleküle. Nach dem Einscannen der Platte konnten die Lipidbanden mit der Software AIDA (Advanced Image Data Analyzer; Raytest, Straubenhardt) densitometrisch quantifiziert werden.

Verwendete Fließmittel:

DC-Laufmittel	Chloroform/Methanol/dH <sub>2</sub> O	70/30/5
Sphingolipide		65/25/4
DC-Laufmittel	Chloroform/Methanol/Essigsäure	190/90/1 (2x laufen lassen)
Ceramide		
DC-Laufmittel	Hexan/Toluol	1/1
Sebumlipide		15/65
DC-Laufmittel	Chloroform/Methanol	80/20
1,2-Diole		
DC-Laufmittel	Chloroform/Methanol	60/6
Fettsäuren, 1,2-Diole		60/4
und Fettalkohole		

## 4.6 Proteinanalytik

### *4.6.1 Zellysate*

Zur Isolation von Proteinen aus Zellen wurde das Medium von den Schalen abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 2 mM EDTA/PBS und einem Zellschaber vom Zellkulturgefäß abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 3000 x g) wurde das Zellpellet im Lysepuffer für Zellen aufgenommen und 30-60 min auf Eis lysiert, wobei das Reaktionsgefäß alle 5-10 min gevortext wurde. Abschließend wurde das nicht gelöste Material 15 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Die zu untersuchenden Proteine befanden sich im Überstand und konnten für folgende Experimente verwendet werden.

### *4.6.2 Proteinbestimmung*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zellysat oder Gewebehomogenat wurde das BioRad DC Assay System nach Herstellerangaben verwendet, das auf der Lowry-Methode basiert (Lowry et al., 1951). Zur Erstellung einer Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen (0,1-1,6 mg/ml) einer BSA-Lösung als Standard verwendet. Sowohl von den Proben als auch von den Standardlösungen wurden jeweils Dreifachwerte vermessen. Nach erfolgter Reaktion wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Plattenlesegerätes bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen.

### *4.6.3 Elektrophoretische Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE*

Die Trennung der Proteine eines Gesamt-Gewebehomogenates oder / -Zellysates erfolgte aufgrund derer molekularen Massenunterschiede durch diskontinuierliche SDS-PAGE. Dafür wurden denaturierende, SDS-haltige Acrylamid-Gele nach Laemmli angefertigt (Laemmli et al., 1970), die ein niederprozentiges Sammelgel und ein höherprozentiges Trenngel enthielten.

Nach einer Proteinbestimmung wurden 10-50 µg Gesamtprotein mit 4-fach-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels gegeben und die Elektrophorese gestartet. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker *Prestained Page Ruler* der Firma Fermentas verwendet.

#### *4.6.4 Proteintransfer mittels Western Blot*

Unter Western-Blot versteht man den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran. Mit dieser Methode können definierte Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe spezifischer Antikörper erkannt werden. Nach einem bestimmten Aufbausystem von SDS-Gel, Nitrocellulose-Membran und Whatman-Papier in Blot-Puffer wurde die Elektrotransferkammer verschlossen und das SDS-Gel auf die Membran geblottet.

Nach dem Blot erfolgte eine Überprüfung des gelungenen Blot-Resultates mittels PonceauS-Färbung. Daraufhin wurde die Membran mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 5 %-iger Magermilchblockierlösung für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach diesem Schritt wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach 3x 15 min Waschen mit TBS-T wurde der an Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, um an den Primärantikörper zu binden. Es folgte ein weiteres 3x 15 min Waschen wie oben beschrieben. Die Detektion des Signals erfolgte über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). Die Membran wurde dabei in die ECL-Lösung getaucht und anschließend konnte ein Foto-Film, der auf die Membran aufgelegt worden ist, belichtet und mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt werden.

## 4.7 Verwendung von Mausgeweben / Arbeiten mit Tieren

### 4.7.1 *Genotypisierung*

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde die Schwanzspitze (ca. 0,5 cm) in 750 µl Lysepuffer mit 100 µg/ml Proteinase K über Nacht bei 56°C in einem Schüttler lysiert. Am nächsten Tag wurden 250 µl 6 M NaCl hinzugefügt und weitere 5 min geschüttelt. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde das Reaktionsgefäß 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert und 750 µl des Überstandes wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die genomische DNA sichtbar und konnte mit einer gelben Pipettenspitze herausgefischt werden. Alternativ konnte die DNA auch mittels kurzzeitiger Zentrifugation pelletiert werden. Die DNA wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und anschließend in 300 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Für eine PCR-Analyse wurde die Konzentration bestimmt und für eine Reaktion wurden ca. 200 ng der genomischen DNA verwendet.

### 4.7.2 *Gewebeschnitte*

Für histologische Untersuchungen und für die Detektion von bestimmten Proteinen oder Nukleinsäuren in Geweben wurden Gewebeschnitte von Organen der Maus hergestellt.

#### 4.7.2.1 Gefrierschnitte (Cryoschnitte)

Das zu untersuchende Organ wurde herauspräpariert und entweder nach einer Fixierung mit 4 % PFA über Nacht oder ohne Fixierung auf Trockeneis vorsichtig eingefroren. Daraufhin folgte das Einbetten des Gewebes in Tissue Tek OTC und Herstellung von Gewebeschnitten mit Hilfe eines Kryostaten. Die Schnittdicke variierte abhängig vom Gewebe zwischen 8-12 µm. Die Schnitte wurden auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen und für ca. 1 h luftgetrocknet. Danach konnten diese für Analysen verwendet werden oder wurden für eine spätere Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.7.2.2 Paraffinschnitte

Das zu untersuchende Organ wurde herauspräpariert und nach einer Fixierung mit 4 % PFA über Nacht 2x in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde weiterhin mit Hilfe einer Paraffiniermaschine dehydriert sowie paraffiniert und konnte anschließend mit einem Mikrotom geschnitten werden. Die Schnitte wurden auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht luftgetrocknet. Die Schnittdicke betrug 4-6 µm. Die Objektträger konnten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Bevor die Paraffinschnitte zur Analyse eingesetzt werden konnten, mussten diese entparaffiniert werden. Dafür wurden die Objektträger 2x für 10 min in Xylol getaucht, weiterhin für jeweils 1 min in eine absteigend konzentrierte Ethanol-Reihe (100 %, 95 %, 75 % und 50 %) und abschließend kurz in dH<sub>2</sub>O.

#### *4.7.3 Depilation der Rückenhaare*

Die dorsale Haut von 45-46 Tage alten, männlichen WT und KO Mäusen wurde epiliert bzw. wurden die Tiere mit Ether betäubt und die Haare wurden herausgerupft. In dieser Zeit befanden sich die Tiere in spät katagener bzw. früher telogener Haarzyklusphase. Nach der Depilation schimmerte die Haut rosa, was für die dünnere Haut in der telogenen Phase spricht. Die Tiere wurden jeden Tag fotografiert und das Wiederherauswachsen der Haare und Färbung der Haut wurden beobachtet. Nach 6, 10 und 20 Tagen wurden die Tiere getötet. Ein Teil der Rückenhaut wurde für RNA-Experimente verwendet und die andere für Hautschnitte und verschiedene Färbungen.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die Rolle der Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) in der Haut- und Haarfollikel-Homöostase der Maus

Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass das Enzym Fettsäure-2-Hydroxylase (FA2H) in den Keratinozyten der Haut des Menschen exprimiert wird und dort für die Ausbildung der epidermalen Membranlamellen sowie für die Barrierefunktion der Haut von Bedeutung ist (Uchida, 2007). Northern Blot-Analysen von murinen Geweben konnten die Existenz der FA2H in der Haut der Maus ebenfalls bestätigen (Eckhardt, 2005). Die Rolle dieses Enzyms bei der Haut- und Haarentwicklung wurde anhand von FA2H-KO-Mäusen untersucht, die anstatt der funktionellen FA2H ein Fusionsprotein exprimieren, das aus der N-terminalen Cytochrom-b5-Domäne und der  $\beta$ -Galaktosidase besteht (Zöller, 2008).

#### *5.1.1 Verzögertes Fellwachstum und zyklisch auftretende Alopezie in FA2H-KO-Mäusen*

Das Enzym FA2H wird in der murinen Haut stark exprimiert (Eckhardt, 2005). Die Expressionsmenge in Wildtyp-Mäusen (WT) unterliegt dabei zyklischen Veränderungen, die von der Haarwachstumsphase abhängig sind. Die Enzymexpression wird während der Morphogenese sowie den folgenden anagenen Wachstumsphasen hochreguliert und sinkt wieder während der telogenen Ruhephasen (Maier, 2011).

Neugeborene FA2H-KO-Tiere unterscheiden sich äußerlich nicht von WT-Geschwistern des gleichen Wurfes. Im Alter von 5-7 Tagen sieht die Haut der FA2H-KO-Tiere allerdings schuppig und trocken aus, sodass sie dadurch von ihren heterozygoten sowie WT-Geschwistern eindeutig unterschieden werden können (Daten nicht gezeigt). Die Rückenhaut der neugeborenen WT-Mäuse wird 2-3 Tage nach der Geburt verstärkt grau und das erste Fell ist an Tag 6-7 sichtbar. An Tag 9 ist die dorsale Haut komplett von

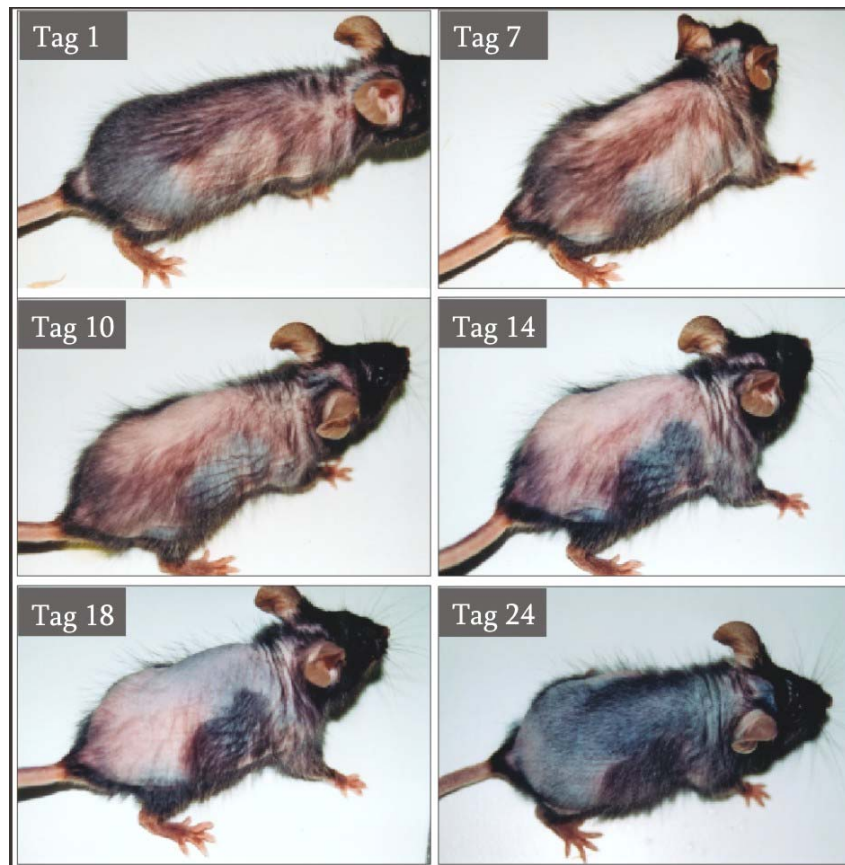
einem Fell bedeckt. Die FA2H-KO-Tiere haben an Tag 6 dagegen noch kein Fell und zeigen eine um ca. 2 Tage verschobene Fellentwicklung, sodass das erste dichte Fell erst an Tag 11 zu sehen ist. Abbildung 5-1 zeigt beispielhaft zwei Geschwister eines Wurfes an P9 und P11 und das sichtbar verzögerte Fellwachstum in der FA2H-KO-Maus.



**Abb. 5-1 Verzögertes Fellwachstum in FA2H-KO-Tieren.** Dargestellt sind jeweils ein WT- und ein FA2H-KO-Tier des gleichen Wurfes an P9 und P11. Die FA2H-KO-Maus weist eine um zwei Tage verzögerte Fellentwicklung auf. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Nach der kompletten Fellentwicklung an der gesamten Hautoberfläche waren in den FA2H-KO-Tieren nur noch kleine Unterschiede bezüglich der Haardichte und der Haaroptik festzustellen. Die Haare der FA2H-KO-Tiere waren weniger dicht, irregulär verteilt und zeigten zum Teil längere, abstehende Haare (Daten nicht gezeigt). Das gesamte Rückenfell war glanzloser als in den WT-Geschwistern und sah stumpf aus. An der Haut und an den Haaren konnten kleine, weiße Schüppchen beobachtet werden. Nach Abschluss der Morphogenese und mit dem Beginn der ersten telogenen Phase verloren einige FA2H-KO-Tiere ihr gesamtes Rückenfell. Während der folgenden Haarzyklen konnte dieser Haarverlust bei allen FA2H-KO-Mäusen beobachtet werden. Die kahlen Hautareale waren rosa bis pink, sodass angenommen werden konnte, dass die Haarfollikel sich beim Haarverlust in telogener Phase befanden. In dieser Phase ist die Haut sehr dünn und die durchschimmernden Blutgefäße geben der Haut eine rosa Färbung. Anfangs wuchsen die Haare bei den FA2H-KO-Tieren wieder normal nach. Mit der Zeit und dem fortwährenden zyklischen Haarverlust in jeder telogenen Phase wurden

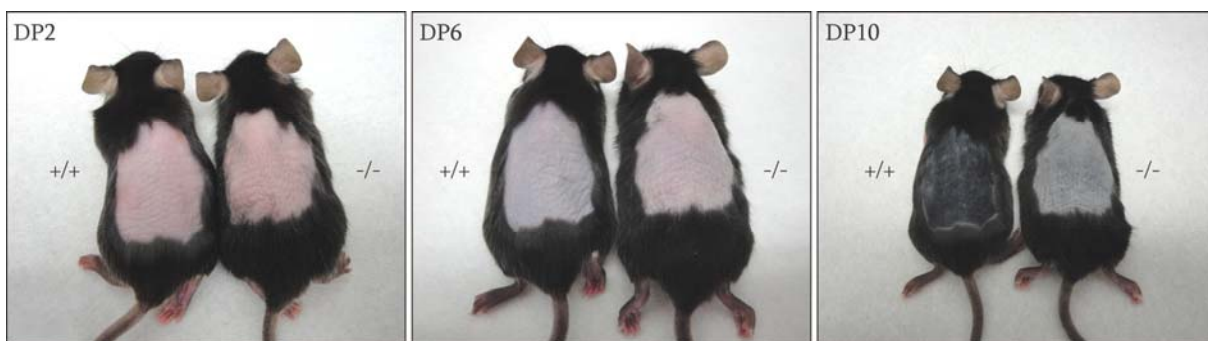
die FA2H-KO-Tiere jedoch komplett kahl. Abb. 5-2 zeigt den bei einer 6 Monate alten Maus beobachteten Haarverlust in telogener Phase und das erneute Herauswachsen der Haare, was die zyklisch auftretende Alopezie in FA2H-KO-Tieren verdeutlicht.



**Abb. 5-2 Zyklisch auftretende Alopezie in FA2H-KO-Mäusen.** Dargestellt ist eine 6 Monate alte FA2H-KO-Maus, die über einen Zeitraum von 24 Tagen beobachtet und fotografiert wurde, um den Haarverlust in telogener Phase, das erneute Herauswachsen der Haare und die zyklisch auftretende Alopezie in den FA2H-KO-Tieren zu verdeutlichen.

Nach der Morphogenese sollte auch die Regenerationsfähigkeit der Haarfollikel untersucht werden. Für dieses Experiment wurden 45-46 Tage alte Mäuse verwendet, deren Haut zu diesem Zeitpunkt unter dem Fell rosa schimmerte. Diese Beobachtung ließ die Vermutung zu, dass die Haarfollikel sich gegen Ende der katagenen Phase oder am Anfang der telogenen Ruhephase befanden. Die Tiere wurden mit Ether betäubt und anschließend konnten deren Rückenhaare leicht ausgerupft werden. Mit der Depilation (DP) wurde in allen Haarfollikeln eine neue Wachstumsphase gleichermaßen eingeleitet. Die Induktion der anagenen Phase ähnelt damit der Morphogenese des Haarfollikels nach

der Geburt. Auf diesem Wege sollte herausgefunden werden, ob auch nach einer Depilation das Haarwachstum der FA2H-KO-Mäuse verändert war. Die Tiere wurden täglich beobachtet und an Tag 2, 6 und 10 fotografiert. Das erneute Herauswachsen der Haare war in den FA2H-KO-Tieren nach Depilation in der Tat ebenfalls verzögert. Abb. 5-3 zeigt beispielhaft eine WT- und FA2H-KO-Maus nach Depilation sowie das verzögerte Haarwachstum im FA2H-KO-Tier.



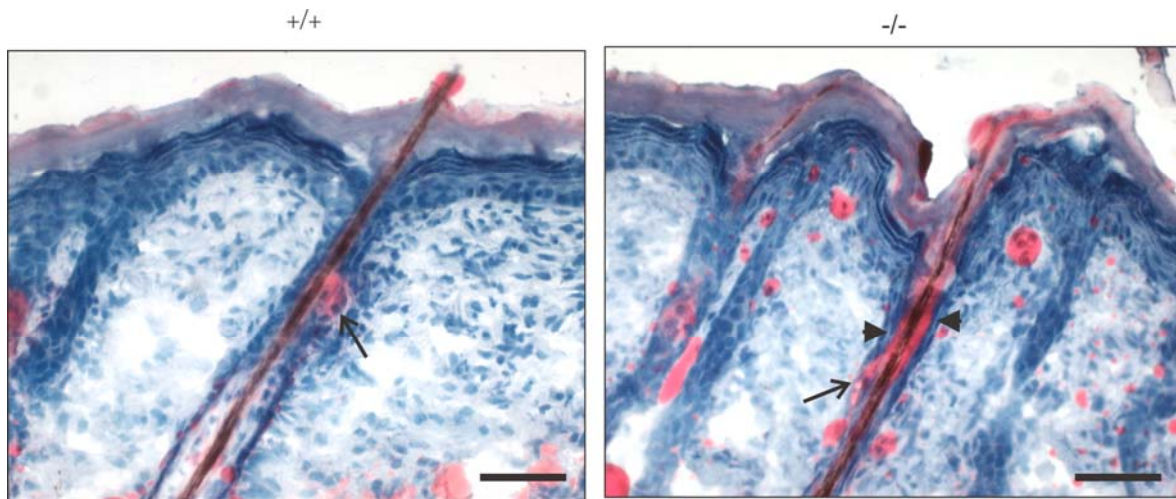
**Abb. 5-3 Verzögertes Herauswachsen der Haare bei FA2H-KO-Tieren nach Depilation.** Dargestellt ist das erneute Herauswachsen der Haare von Mäusen, die im Alter von 45-46 Tagen depiliert worden sind. Die Depilation dient dazu eine neue anagene Phase in allen Haarfollikeln gleichermaßen zu induzieren. Zwei Tage nach der Depilation (DP2) waren keine Unterschiede zwischen WT- und FA2H-KO-Mäusen zu erkennen. Am Tag 6 (DP6) war die Haut der WT-Mäuse bereits grau, was mit einem regenerierten Haarfollikelwachstum einherging. Die FA2H-KO-Tiere waren dagegen noch leicht rosa und es waren keine Haare sichtbar. Zehn Tage nach Depilation (DP10) war die signifikante Verzögerung des Fellwachstums in den FA2H-KO-Tieren eindeutig erkennbar. Diese erinnerte an das zwei Tage später einsetzende Haarwachstum während der Morphogenese. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Zwei Tage nach der Depilation (DP2) hatten die Tiere bezüglich Aussehen und Hautfarbe ein ähnliches Erscheinungsbild. Am sechsten Tag (DP6) jedoch war ein leichter Unterschied zu beobachten. Die Haut der WT-Tiere zeigte bereits eine Regeneration des Haarfollikelwachstums, was an der grauen Farbe der Haut und der damit einhergehenden anagenen Phase erkennbar war. Die Haut der FA2H-KO-Tiere war dagegen noch immer leicht rosa. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass sich die Haarfollikel der FA2H-KO-Tiere noch immer am Ende der telogenen bzw. erst am Anfang der anagenen Phase befanden. An Tag 10 nach der Depilation (DP10) war bei den WT-Mäusen ein neu gewachsenes Fell über den gesamten Rücken zu beobachten. Die FA2H-KO-Tiere hatten eine stark grau gefärbte Haut, jedoch war noch kein Haarwachstum sichtbar. Nach

12 Tagen, also 2 Tage später als bei den WT-Mäusen, zeigten die FA2H-KO-Tiere ebenfalls einen komplett mit Fell bedeckten Rücken und ab diesem Zeitpunkt konnte optisch kein Unterschied mehr zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sich der Haarzyklus bei den FA2H-KO-Tieren nach einer Depilation ebenfalls um zwei Tage verlängert, ähnlich wie das bei der Morphogenese des Haarfollikels der Fall war. Histologische Untersuchungen der DP-Haut von WT- und FA2H-KO-Tieren haben gezeigt, dass nach der Depilation in beiden Genotypen eine anagene Phase induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache verdeutlicht, dass die beobachtete Verzögerung des Herauswachsens der Haare in den FA2H-KO-Mäusen tatsächlich auf einer Retention des Haarschaftwachstums beruht und nicht eine verzögerte Induktion der anagenen Phase dafür verantwortlich ist.

### *5.1.2 Histologische Untersuchungen der Haarfollikel*

Die makroskopisch beobachtete Verzögerung des Haarwachstums und der zyklisch auftretende Haarverlust in FA2H-KO-Tieren sollte in weiteren Experimenten mikroskopisch untersucht werden. Dafür wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte der Haut von 9 Tage alten Mäusen hergestellt. Diese wurden einer OilRed-Färbung unterzogen, die lipophile Bestandteile rot anfärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, um die histologischen Hautstrukturen besser erkennen zu können. In der Haut sind OilRed-positive Signale in der Talgdrüse, wo das Sebum angefärbt wird, und im subkutanen Fettgewebe zu erwarten. Abbildung 5-4 zeigt die Haut einer WT- und einer FA2H-KO-Maus aus einem Wurf. Gezeigt ist die vergrößerte Darstellung eines Haarfollikels und der zugehörigen Talgdrüse.

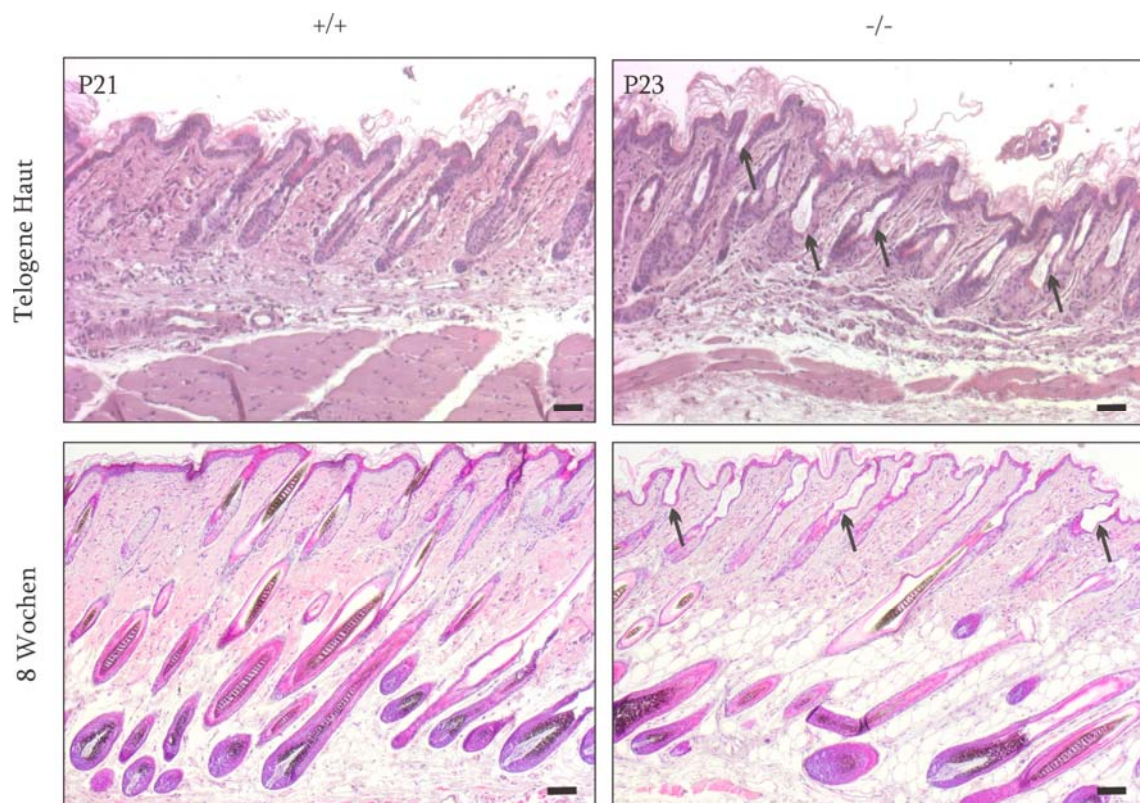


**Abb. 5-4 Lipidverstopfte Haarkanäle in Gefrierschnitten von 9 Tage alten Mäusen.** Gefrierschnitte von 9 Tage alten WT- und FA2H-KO-Mäusen wurden einer OilRed-Färbung unterzogen und anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt. Im WT-Schnitt sind die Talgdrüsen (Pfeil) und deren Sebumlipide rot gefärbt. Im FA2H-KO-Gewebe ist neben der Talgdrüse (Pfeil) auch der Haarkanal (Pfeilspitze) und zum Teil auch die Hautoberfläche rot angefärbt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Im WT-Gewebeschnitt sind die rot angefärbten, lipophilen Bestandteile des Sebums, welches ein Produkt der Talgdrüsenzellen ist, zu sehen. In den FA2H-KO-Tieren waren dagegen nicht nur die Talgdrüsen gefärbt, sondern auch im darüber liegenden Haarkanal war eine intensive, rote Färbung zu erkennen. Die in den FA2H-KO-Tieren beobachtete Verstopfung der Haarkanäle mit Lipiden ist vermutlich der Grund für das verzögerte Herauswachsen der Haare. Die Haare scheinen die Lipidverklumpungen im Haarkanal erst später durchdringen zu können. Die rote Färbung lief bei den FA2H-KO-Tieren zum Teil bis zur Hautoberfläche hinauf, was die sichtbaren, weissen Schüppchen, die evtl. Lipidklumpen darstellen, auf der Haut dieser Tiere erklären könnte.

Ungefähr 19-21 Tage nach der Geburt setzt bei Mäusen im kaudalen Rückenbereich die erste telogene Phase ein, die bis zum Tag 27 andauern kann. Am Tag 28 beginnt die anagene Haarwachstumsphase (Müller-Röver, 2001). Bei den FA2H-KO-Mäusen kam es ungefähr vier Wochen nach der Geburt (Tag 25-28) zu einem drastischen Haarverlust. Dieser wiederholte sich ungefähr alle vier Wochen, was sich in einer zyklischen Alopezie manifestierte. Anfangs wuchsen die Haare in jeder neuen anagenen Phase wieder nach, jedoch verloren die Tiere mit jedem weiteren Haarverlust immer mehr Haare des Rückenfalls, sodass alte FA2H-KO-Mäuse fast komplett kahl waren.

Um zu untersuchen, was den Haarverlust bedingt, sollte die dorsale Haut in der ersten telogenen Phase mikroskopisch analysiert werden. Ausgewählte Mäuse wurden dafür beobachtet und als die Hautfarbe eindeutig von grau zu rosafarben wechselte, wurde vom Beginn einer telogenen Phase ausgegangen und die Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt getötet. Es wurden 6 µm dicke Paraffinschnitte der Rückenhaut von WT- und FA2H-KO-Mäusen angefertigt. Die WT-Mäuse waren dabei 21 Tage und die FA2H-KO-Tiere 23 Tage alt. Diese unterschiedlichen Altersstufen wurden gewählt, um sicherzustellen, dass sich die Hautproben in der gleichen Haarzyklus-Phase befanden. Zusätzlich wurden Hautparaffinschnitte von 8 Wochen alten Tieren hergestellt. Diese Altersstufe wurde gewählt, da in dieser Zeit die zweite telogene Phase durchlaufen wird und bei den FA2H-KO-Tieren ein Haarausfall beobachtet werden konnte. Die Paraffinschnitte der Rückenhaut wurden H&E-gefärbt. Abbildung 5-5 zeigt beispielhaft die histologischen Unterschiede zwischen WT- und FA2H-KO-Mäusen.



**Abb. 5-5 Weit offene Haarkanäle in telogener Haut von FA2H-KO-Tieren.** Dargestellt sind H&E-gefärbte Paraffinschnitte der Rückenhaut von WT- und FA2H-KO-Mäusen in zwei unterschiedlichen Altersstufen. Die Hautschnitte zeigen die Rückenhaut in der ersten (WT P21/ KO P23) und in der zweiten telogenen Wachstumsphase (nach 8 Wochen), in der jeweils ein Haarverlust in den FA2H-KO-Mäusen beobachtet werden konnte. In der FA2H-KO-Haut sind weit offene Haarkanäle sowie Verformungen des Haarfollikels zu erkennen (Pfeile). Maßstabsbalken = 50 µm. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

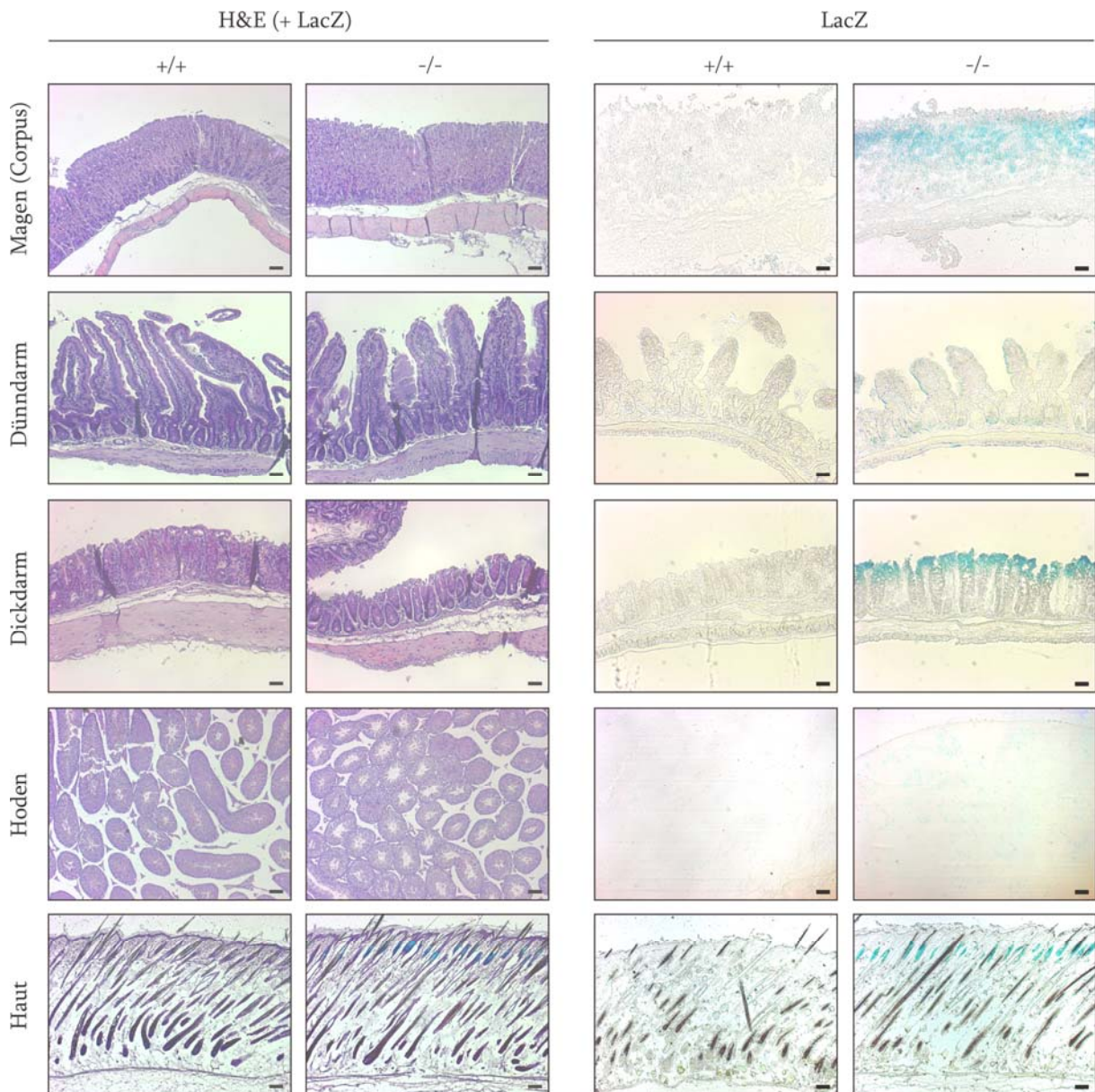
Die FA2H-KO-Haut weist in der telogenen Phase im Vergleich zur WT-Haut weit offene Haarkanäle auf. Diese sind neben Verformungen des Haarfollikels sowie des Haarschaftes ein Anzeichen für eine Haarfollikeldystrophie (Hendrix, 2005) und konnten auch in der zweiten telogenen Phase (8 Wochen alte Tiere) beobachtet werden. Gefrierschnitte der Haut von gleichaltrigen Tieren konnten zeigen, dass die geöffneten Haarkanäle zum Teil mit Lipiden gefüllt waren. Letztere Beobachtung konnte ebenfalls mit einer OilRed-Färbung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Haarfollikeldystrophie mit den offenen Haarkanälen sowie den dort angereicherten, vermutlich unterschiedlich zusammengesetzten Lipiden sind mutmaßlich der Grund für den beobachteten Haarverlust in den FA2H-KO-Tieren.

### *5.1.3 Expression der FA2H in verschiedenen Mausgeweben*

FA2H-KO-Mäuse exprimieren anstatt des funktionellen Enzyms FA2H ein Fusionsprotein, das aus der N-terminalen Cytochrom-b5-Domäne und der  $\beta$ -Galaktosidase besteht. Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das artifizielle Glykosid X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) in Galaktose und einen blauen, wasserunlöslichen Indigofarbstoff. Mit dieser Farbreaktion konnte die Expression der FA2H bzw. des LacZ-Reportergens in verschiedenen Geweben der Maus untersucht werden. Es wurden Paraffin- und Gefrierschnitte verschiedener Gewebe von WT- und FA2H-KO-Mäusen hergestellt. Die Paraffinschnitte wurden für eine histologische Analyse H&E-gefärbt und die Gefrierschnitte entweder nur einer LacZ-Färbereaktion oder einer LacZ- sowie einer H&E-Färbung unterzogen. Mit diesem Experiment sollte bestätigt werden, dass die FA2H tatsächlich in den Organen exprimiert wird, die bereits mittels Northern Blot-Analyse Aufschlüsse über deren Existenz gegeben hatten (Eckhardt, 2005). Weiterhin sollte es dazu dienen, die genauen Regionen oder Zelltypen zu identifizieren, welche die FA2H in dem jeweiligen Organ exprimieren. Es wurden 10  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte von 3 Monate alten WT- und FA2H-KO-Mäusen von folgenden Organen angefertigt: Magen, Dünndarm, Dickdarm, Hoden und dorsale Haut.



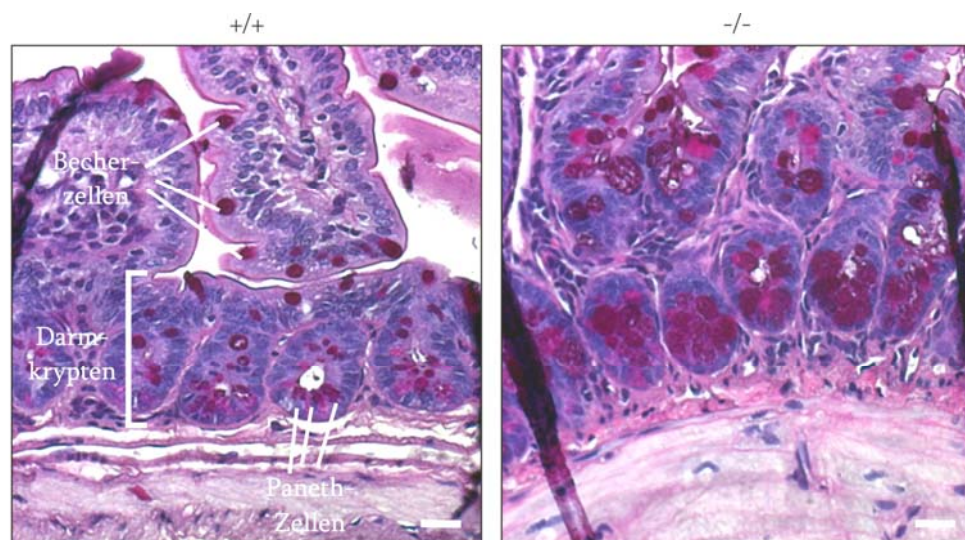
Die Gefrierschnitte wurden einer LacZ-Färbereaktion unterzogen, um das Cyt-b5- $\beta$ -Gal-Reportergen zu detektieren. Abbildung 5-6 gibt einen repräsentativen Überblick über die Ergebnisse dieser Untersuchungen.



**Abb. 5-6 Expression des LacZ-Reportergens in verschiedenen Mausgeweben.** Dargestellt sind 10  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte verschiedener Organe von WT- und FA2H-KO-Mäusen. Die Cryoschnitte wurden für den Histologievergleich H&E-gefärbt und um das Cyt-b5- $\beta$ -Gal-Reportergen zu detektieren, wurden die Schnitte einer LacZ-Färbung unterzogen. Alle 5 dargestellten Organe zeigten eine LacZ-positive Blaufärbung auf, die jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt war. Maßstabsbalken: Magen, Hoden, Haut = 100  $\mu$ m, Dün- und Dickdarm = 50  $\mu$ m. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Northern Blot-Analysen (Eckhardt, 2005) haben gezeigt, dass die FA2H in verschiedenen Organen der Maus exprimiert wird. Eine starke Expression zeigen das Gehirn, die Niere, die Haut, der Magen und die Hoden. Mit den obigen Untersuchungen konnte die Expression im Magen, in den Hoden und in der Haut bestätigt werden. Im Magen wird die FA2H sowohl im Vormagen (Daten nicht gezeigt) als auch im Drüsenmagen (Corpus) exprimiert. Es sind vermutlich die Neben- und/oder Becherzellen, die in der LacZ-Färbung stark blau angefärbt sind. Die Färbung war ebenfalls recht schwach im Dünndarm und sehr stark im Dickdarm positiv. Im Dünndarm ist die Färbung im unteren Bereich der Krypten sichtbar. Dort sind die Paneth-Zellen lokalisiert und vermutlich exprimieren diese Zellen das FA2H-Enzym. Die Intensität der Färbung im Dünndarm nahm vom Duodenum zum Ileum zu. Im Dickdarm war das Drüsenepithel durchgehend stark LacZ-positiv und auch das gesamte Zäkum der Maus zeigte eine intensive Blaufärbung (Daten nicht gezeigt). Die Hoden wiesen eine nur sehr schwache Blaufärbung auf, die jeweils kreisrund um das Lumen eines Samenkanälchens verlief. Ob Spermatozyten, Spermatogonien oder die Sertoli-Zellen oder aber alle drei Zelltypen das LacZ-Reportergen exprimieren, lässt sich anhand dieser Färbemethode nicht genau untersuchen und bedarf weiterer Analysen. Die Haut wies eine starke Blaufärbung im Bereich der Talgdrüsen auf und wurde im Folgenden noch weiter untersucht. Der histologische Vergleich zwischen WT und KO mit Hilfe der H&E-Färbung zeigte in den meisten Geweben keine Unterschiede. Lediglich die Talgdrüsen der Haut zeigten Abnormalitäten, auf die im Folgenden noch genauer eingegangen wird. Die im Dünndarm lokalisierten Paneth-Zellen und deren Granula wiesen ebenfalls Unterschiede auf. Die Zellen schienen in den FA2H-KO-Tieren vermehrt und verändert zu sein. Um darauf näher eingehen zu können, wurden Paraffinschnitte aus den verschiedenen Dünndarmabschnitten (Duodenum, Jejunum sowie Ileum) angefertigt und einer PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reagenz) unterzogen, die zur Anfärbung von Glykogen, Cellulose, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteiden sowie Glykolipiden dient. Direkt danach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Mit dieser Methode sollten die Unterschiede zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren

deutlicher dargestellt werden. In allen drei Abschnitten des Dünndarms waren in den Krypten Farbunterschiede zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren zu erkennen. Die intensive Färbung nahm in den FA2H-KO-Schnitten vom Bereich des Duodenums zum Ileum stark zu. Abbildung 5-7 zeigt beispielhaft die Schnitte von WT- und FA2H-KO-Mäusen vom Bereich des Ileums und eine Vergrößerung des erwähnten Kryptenbereiches.



**Abb. 5-7 PAS- und Hämatoxylin-Färbung von Dünndarmschnitten im Bereich des Ileums.** Paraffinschnitte des Ileums wurden einer PAS-Färbung unterzogen und anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt. In den Darmzotten sind die schleimbildenden, PAS-positiven Becherzellen zu erkennen. Am Grund der Dünndarm-Krypten sind die Paneth-Körnerzellen lokalisiert, deren Granula mit der PAS-Färbung rot angefärbt wurden. In den FA2H-KO-Tieren war die rote Färbung über die gesamte Krypte ungeordnet verteilt. Entweder war die Anzahl der Paneth-Zellen in den FA2H-KO-Mäusen erhöht oder die Menge an zytosolischen Granula war stark vermehrt. Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

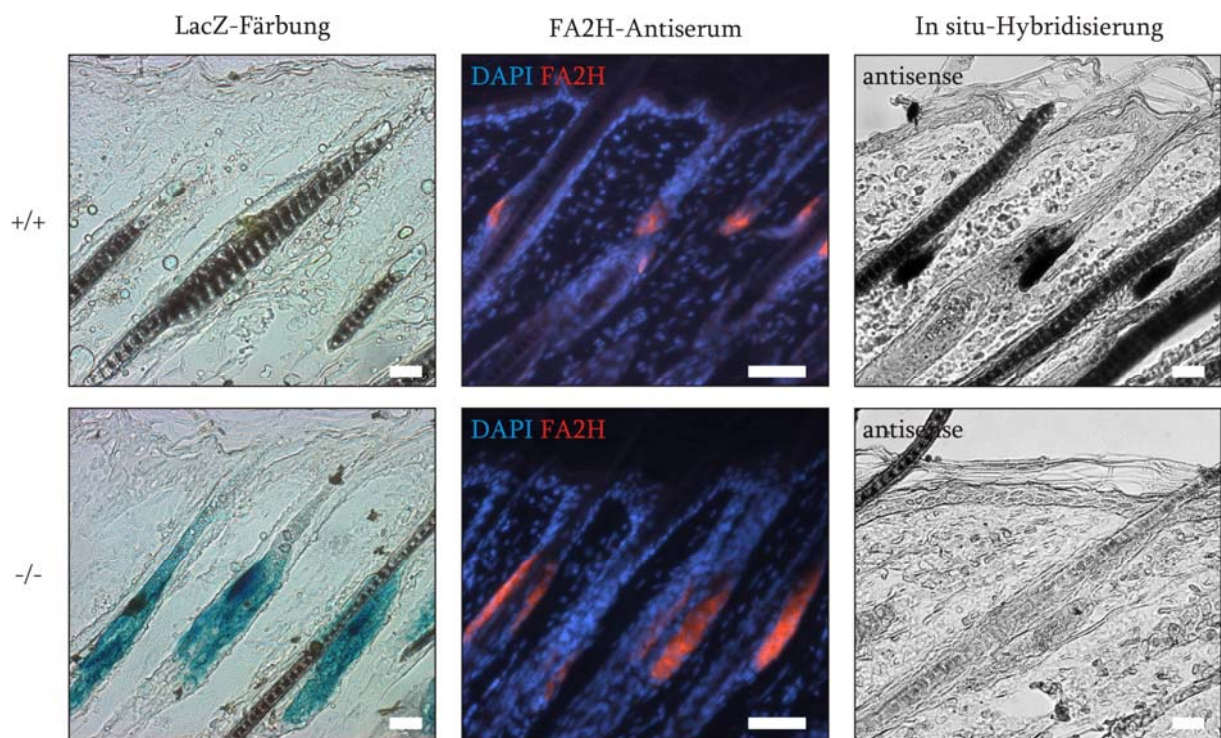
Mit der PAS-Färbung können einerseits die schleimbildenden Becherzellen in den Darmzotten, andererseits das granuliertes Zytoplasma der Paneth-Zellen dargestellt werden. Die Paneth-Zellen werden auch als Paneth-Körnerzellen bezeichnet. Sie sind am Grund der Dünndarmkrypten lokalisiert und enthalten stark eosinophile Granula. Aufgabe der Paneth-Zellen ist die Sekretion von Lysozymen, Peptidasen, Laktoferrin und Defensinen. Im WT-Schnitt waren am Grund der Darmkrypte jeweils einzelne Paneth-Zellen und deren rot gefärbte Granula erkennbar. Im FA2H-KO-Schnitt war die Färbung viel stärker ausgeprägt. Die roten Granula waren über die gesamte Krypte verteilt und die Färbung war viel intensiver. Aus diesem Versuch ging allerdings nicht hervor, ob

in den FA2H-KO-Mäusen die Anzahl der Paneth-Zellen vermehrt war oder ob die Zellen viel mehr Granula produzierten, die ungeordnet in der Darmkrypte vorlagen und mit der PAS-Färbung angefärbt werden konnte. Erste weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass im Dünndarm der FA2H-KO-Tiere ebenfalls Unterschiede bezüglich der Expression verschiedener Gene vorhanden waren (Daten in Zusammenarbeit mit Jan Wehkamp, IKP Stuttgart). Dafür wurden die einzelnen Darmabschnitte auf RNA-Ebene mittels quantitativer *Real-Time*-PCR-Analyse untersucht und die relative mRNA-Expression von Cryptdin1 und Cryptdin4 (gehören beide zu den  $\alpha$ -Defensinen) sowie Lysozym gemessen. Im Duodenum konnten keine Unterschiede in der Expression dieser drei Gene festgestellt werden, was mit der Tatsache, dass im Duodenum kaum histologische Veränderungen zu beobachten waren, gut übereinstimmt. Im Jejunum war die relative mRNA-Expression bereits um ca. 50 % erhöht. Im Ileum waren die Mengen an mRNA für alle drei Proteine auf das drei- bis vierfache erhöht, was gut mit der intensiven PAS-Färbung in diesem Abschnitt übereinstimmt. Welche Einflüsse die Anhäufung dieser immunologisch aktiven Proteine auf die Mäuse und deren Darmflora hat und welcher biochemische Zusammenhang zwischen der FA2H und den Paneth-Zellen besteht, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden und ist Bestandteil zukünftiger Untersuchungen.

#### 5.1.4 FA2H-Expression in der murinen Haut

Um die genaue Lokalisation der FA2H in der Haut zu bestimmen, wurden verschiedene, voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Zum einen wurden Gefrierschnitte der Haut einer LacZ-Färbung unterzogen, um in der FA2H-KO-Haut die Expression des Cyt-b5- $\beta$ -Gal-Reportergens zu verfolgen. Weiterhin wurden die Hautschnitte in einer Immunfluoreszenz-Analyse mit einem FA2H-Antiserum angefärbt, das gegen einen Bereich in der cytosolischen Cytochrom-b5-Domäne gerichtet ist, welcher in den FA2H-KO-Mäusen noch immer vorhanden ist. Drittens wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten FA2H-cRNA-*antisense*-Sonde

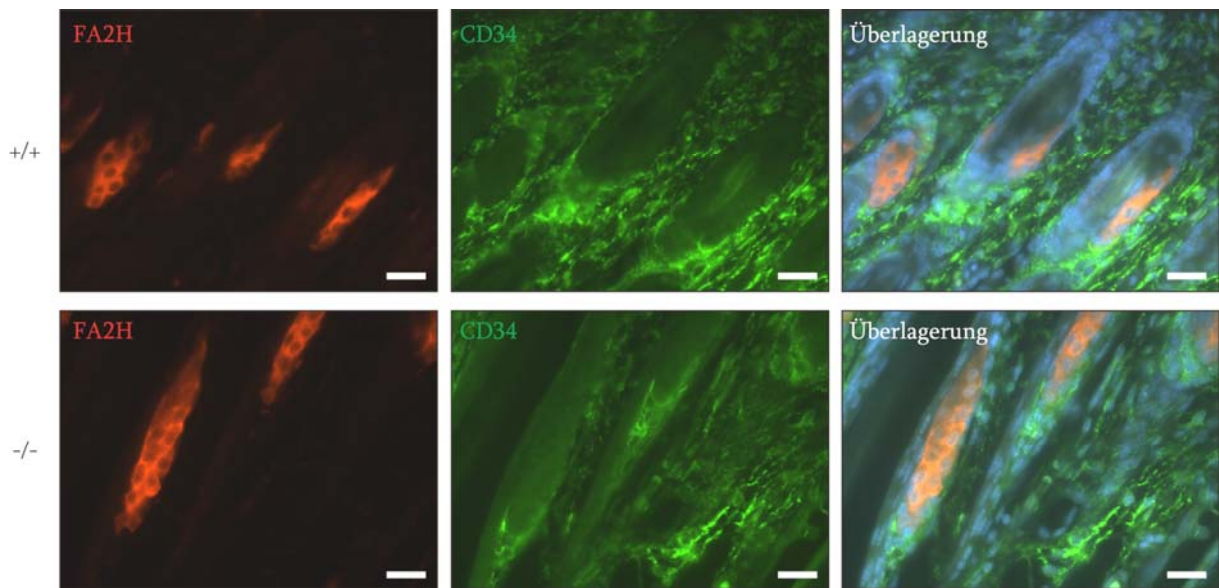
durchgeführt, welche die Existenz der FA2H in den WT-Hautschnitten auf mRNA-Ebene bewies. In den Hautschnitten von FA2H-KO-Tieren konnten mit der gleichen Sonde keine Signale festgestellt werden. Zur Kontrolle wurde dieses Experiment auch mit einer FA2H-cRNA-*sense*-Sonde durchgeführt. In diesem Fall konnte weder bei der WT- noch bei der FA2H-KO-Haut ein Signal beobachtet werden. Für die LacZ-Färbung wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte und für die Immunfluoreszenz-Färbung sowie *in situ*-Hybridisierung 4-6 µm dicke Paraffinschnitte der Rückenhaut von 10 Tage alten WT- und FA2H-KO Tieren verwendet. Abbildung 5-8 zeigt die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente und verdeutlicht die spezifische FA2H-Lokalisation in den Talgdrüsen der Haut.



**Abb. 5-8 Lokalisation der FA2H in den Talgdrüsen der Haut.** Dargestellt ist die spezifische Expression der FA2H in den Talgdrüsen der Haut. Mit der LacZ-Färbung konnte bei den FA2H-KO-Gewebeschnitten auch nach 7 Tagen Inkubation in der LacZ-Färbelösung nur eine spezifische Blaufärbung im Bereich der Talgdrüsen detektiert werden. Das FA2H-Antiserum ist gegen einen Bereich in der cytosolischen Cytochrom-b5-Domäne gerichtet, welchen es bei der Immunfluoreszenz-Analyse sowohl an WT- als auch an FA2H-KO-Hautschnitten erkennt. Die Signale (rot) konnten nur in den Talgdrüsen beobachtet werden. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI angefärbt (blau). Die *in situ*-Hybridisierung mit einer entsprechenden Digoxigenin-markierten FA2H-cRNA-*antisense*-Sonde (anti) zeigte nur in den WT-Talgdrüsen ein Signal und bestätigte ebenfalls den funktionellen *Knock-Out*. Maßstabsbalken: LacZ-Färbung und *in situ*-Hybridisierung = 20 µm, Immunfluoreszenz = 50 µm. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

In allen drei Versuchen war die Färbung strikt auf den Bereich der Talgdrüsen beschränkt. Es gab keine Signale in Keratinozyten der Epidermis oder in anderen Zellen des Haarfollikels. Die Gefrierschnitte wurden bis zu 7 Tage in der LacZ-Färbelösung bei 37°C inkubiert. Auch nach dieser Zeit war in der FA2H-KO-Haut keine Färbung außerhalb der Talgdrüsen zu erkennen. Im WT-Schnitt war nach gleicher Inkubationszeit erwartungsgemäß gar keine Färbung zu sehen. Die Immunfluoreszenz-Analyse und die *in situ*-Hybridisierung konnten die spezifische Expression der FA2H alleine in den Talgdrüsen bestätigen. Die *in situ*-Hybridisierung konnte darüber hinaus zeigen, dass der *Knock-Out* funktionell war und in den FA2H-KO-Tieren tatsächlich keine mRNA für die FA2H mehr gebildet wurde.

Die obigen Untersuchungen zeigen, dass die gefärbten Bereiche den Talgdrüsen entsprechen, jedoch ist kein exakter Grenzbereich erkennbar, da die Färbungen an den Rändern leicht verlaufen. Direkt unterhalb der Talgdrüse ist die Wulstregion (*bulge*) lokalisiert. Diese Ausbuchtung des Haarfollikels stellt ein Reservoir an geringfügig aktiven, multipotenten Stammzellen dar, die vor allem für das Auswachsen des Haarfollikels während der anagenen Phase verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass isolierte Wulst-Stammzellen, die nach einiger Zeit in Kultur auf die Rückenhaut von immuntoleranten Mäusen transplantiert wurden, sowohl in einen Haarfollikel, in Talgdrüsen als auch in die Epidermis ausdifferenzieren können (Blanpain, 2004). Dieser Bereich ist mit seinen Stammzellen für den gesamten Haarfollikel und auch für die interfollikuläre Epidermis von besonderer Bedeutung. Es galt deshalb zu untersuchen, ob auch die Zellen der Wulstregion die FA2H exprimieren. Dafür wurden 6 µm dicke Paraffinschnitte der Rückenhaut von 10 Tage alten WT- und FA2H-KO-Tieren verwendet. Diese wurden mit dem FA2H-Antiserum sowie einem Marker für die Zellen der Wulst-Region, CD34, co-gefärbt (Abbildung 5-9).



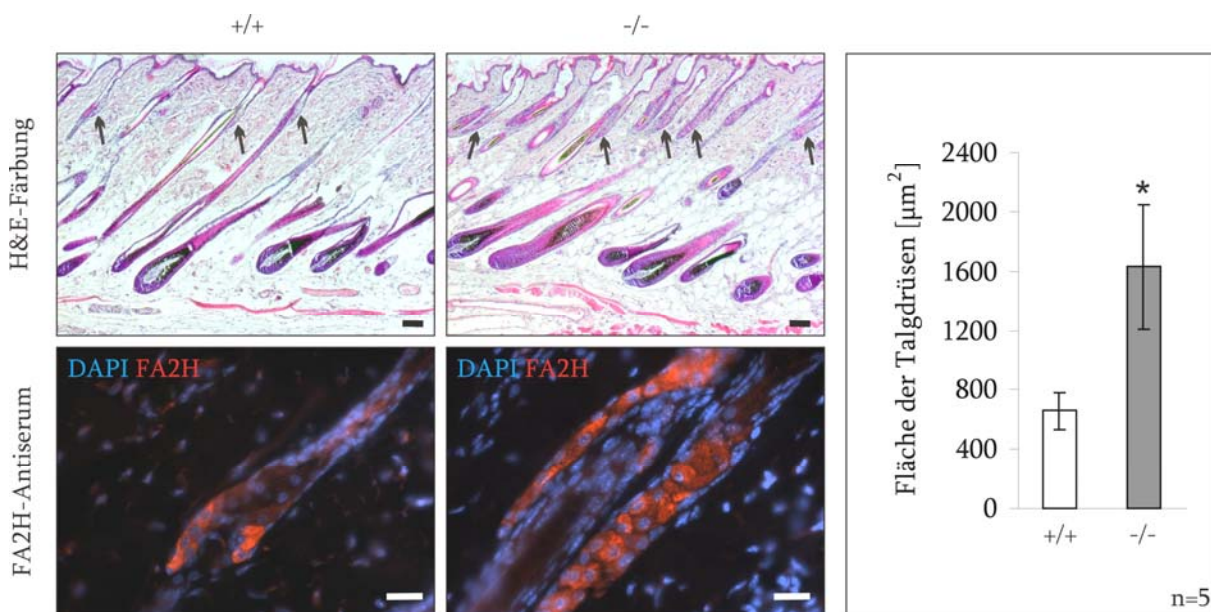
**Abb. 5-9 Co-Färbung von FA2H und dem Stammzell-Marker der Wulst-Region CD34.** Dargestellt ist die Co-Färbung von FA2H (rot) in den Talgdrüsen und CD34 (grün) in der Wulstregion an Rückenhautschnitten von 10 Tage alten Tieren. Die Überlagerung der Bilder zeigte keine Co-Lokalisation der beiden Marker. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Das FA2H-Antiserum gab nur ein Signal in den Talgdrüsen (rot), CD34-positive Zellen der Wulst-Region waren unterhalb der Talgdrüsen angefärbt (grün). Es konnte keine Co-Lokalisation von FA2H und CD34 festgestellt werden. Dieser Sachverhalt spricht dafür, dass die Zellen der Wulstregion keine FA2H exprimieren.

### *5.1.5 Hyperproliferation der Sebozyten und vergrößerte Talgdrüsen in FA2H-KO-Mäusen*

Die Talgdrüsen sind in WT-Mäusen ungefähr am vierten Tag nach der Geburt zum ersten Mal sichtbar (Paus, 1999). Während der Morphogenese und in den folgenden anagenen Phasen wird die gesamte Haut dicker und die Größe der Haarfollikel sowie der Talgdrüsen nimmt zu. In der katagenen Regressionsphase werden die unteren zwei Drittel der Haarfollikel durch Apoptose zerstört und auch die Talgdrüsengröße wird reduziert, um dann in der telogenen Ruhephase ein Minimum zu erreichen. Verschiedene histologische Untersuchungen der Haut konnten die FA2H-Expression nur in den

Talgdrüsen nachweisen (siehe 5.1.4). Die Talgdrüsen der FA2H-KO-Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren während der Morphogenese sowie in einer nach Depilation induzierten anagenen Phase sichtbare Unterschiede auf. Um diese Beobachtungen genauer zu analysieren, wurden 6  $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte der Haut von 10 Tage alten Tieren und von 45-46 Tage alten Tieren zehn Tage nach Depilation (DP10) verwendet. Die Schnitte wurden H&E-gefärbt oder mit dem FA2H-Antiserum inkubiert. Die Flächen, die die Talgdrüsen in der Immunfluoreszenz eingenommen hatten, wurden ausgemessen und die daraus hervorgehenden Werte wurden quantitativ ausgewertet. Insgesamt wurden pro Genotyp jeweils 5 Tiere untersucht. Von jedem Tier wurden mindestens drei Schnitte zur Auswertung herangezogen und die Fläche aller gefärbten Talgdrüsen wurde vermessen.



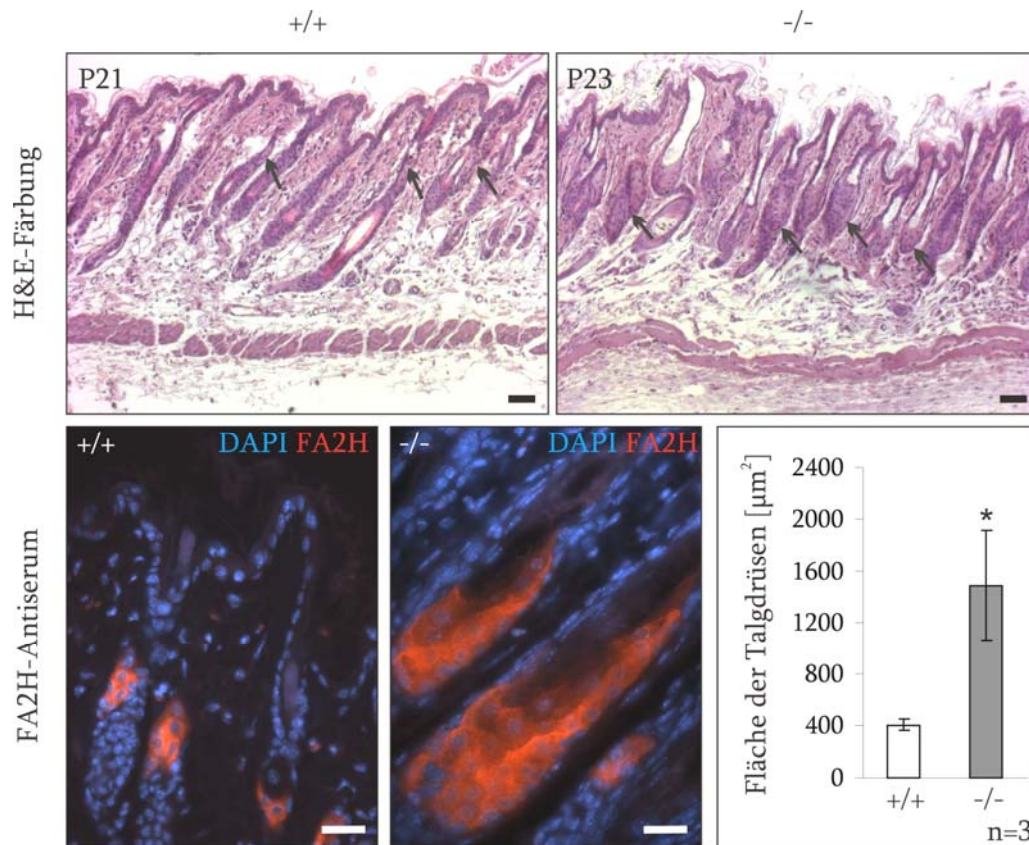
**Abb. 5-10 Vergrößerte Talgdrüsen in FA2H-KO-Tieren in einer nach Depilation induzierten anagenen Phase (DP10).** Dargestellt sind Paraffinschnitte der Haut von 45-46 Tage alten Tieren 10 Tage nach einer Depilation (DP10). Die Schnitte wurden H&E-gefärbt oder einer Immunfärbung mit dem FA2H-Antiserum (rot) unterzogen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Mit beiden Färbemethoden war eine Talgdrüsenvergrößerung in den FA2H-KO-Tieren zu erkennen (siehe Pfeile). Die Fläche, die die gefärbten Talgdrüsen in der Immunfärbung einnahmen, wurde ausgemessen und die Werte wurden quantitativ ausgewertet. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar. Die FA2H-KO-Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren statistisch signifikant vergrößerte Talgdrüsen auf (WT 657  $\mu\text{m}^2$ , KO 1626  $\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,005$ ; t-Test). Maßstabsbalken: H&E-Färbung = 50  $\mu\text{m}$ , Immunfluoreszenz = 20  $\mu\text{m}$ . (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Abbildung 5-10 gibt einen repräsentativen Überblick über die Talgdrüsengröße in DP10 Mäusen und zeigt die quantitative Auswertung von DP10 Schnitten, die mit dem



FA2H-Antiserum angefärbt worden sind. Sowohl mit der H&E-Färbung als auch mit der Immunfluoreszenz-Färbung mit dem FA2H-Antiserum war in den FA2H-KO-Tieren eine Vergrößerung der Talgdrüsen erkennbar. Die quantitative Auswertung der Werte nach der Vermessung der Talgdrüsengröße wies einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren auf ( $p < 0,005$ ; t-Test). Die Querschnittsfläche einer WT-Talgdrüse war im Mittel  $657 \mu\text{m}^2$  groß und die der FA2H-KO-Mäuse durchschnittlich  $1626 \mu\text{m}^2$ . Ähnliche Unterschiede bezüglich der Talgdrüsengröße konnten ebenfalls während der Morphogenese an Hautschnitten von 10 Tage alten Mäusen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu den Untersuchungen während der Morphogenese (P10) und an den DP10 Hautschnitten wurden auch die Haut und die Talgdrüsengröße von Mäusen untersucht, die sich in der telogenen Phase befanden. Es galt herauszufinden, ob die in der anagenen Phase stark vergrößerten Talgdrüsen der FA2H-KO-Mäuse in telogener Phase wieder kleiner werden. Dafür wurde die Haut von Tieren in deren erster Ruhephase verwendet. Pro Genotyp wurden jeweils drei Tiere untersucht. Die Haut der WT-Tiere war an P21 deutlich rosa geworden, was für die telogene Phase sprach. Die FA2H-KO-Tiere hatten den gleichen Zustand an Tag P23 erreicht und wurden dementsprechend erst zwei Tage später zur Analyse herangezogen, um zu gewährleisten, dass beide Genotypen sich in derselben Phase des Haarzyklus befanden. Es wurden  $6 \mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte angefertigt, die für die histologische Darstellung H&E-gefärbt wurden. Für die quantitative Ausmessung der eingenommenen Flächen der gefärbten Talgdrüsen wurden die Hautschnitte mit dem FA2H-Antiserum inkubiert. Abbildung 5-11 zeigt die Talgdrüsengröße in der telogenen Haut von WT- und FA2H-KO-Tieren.

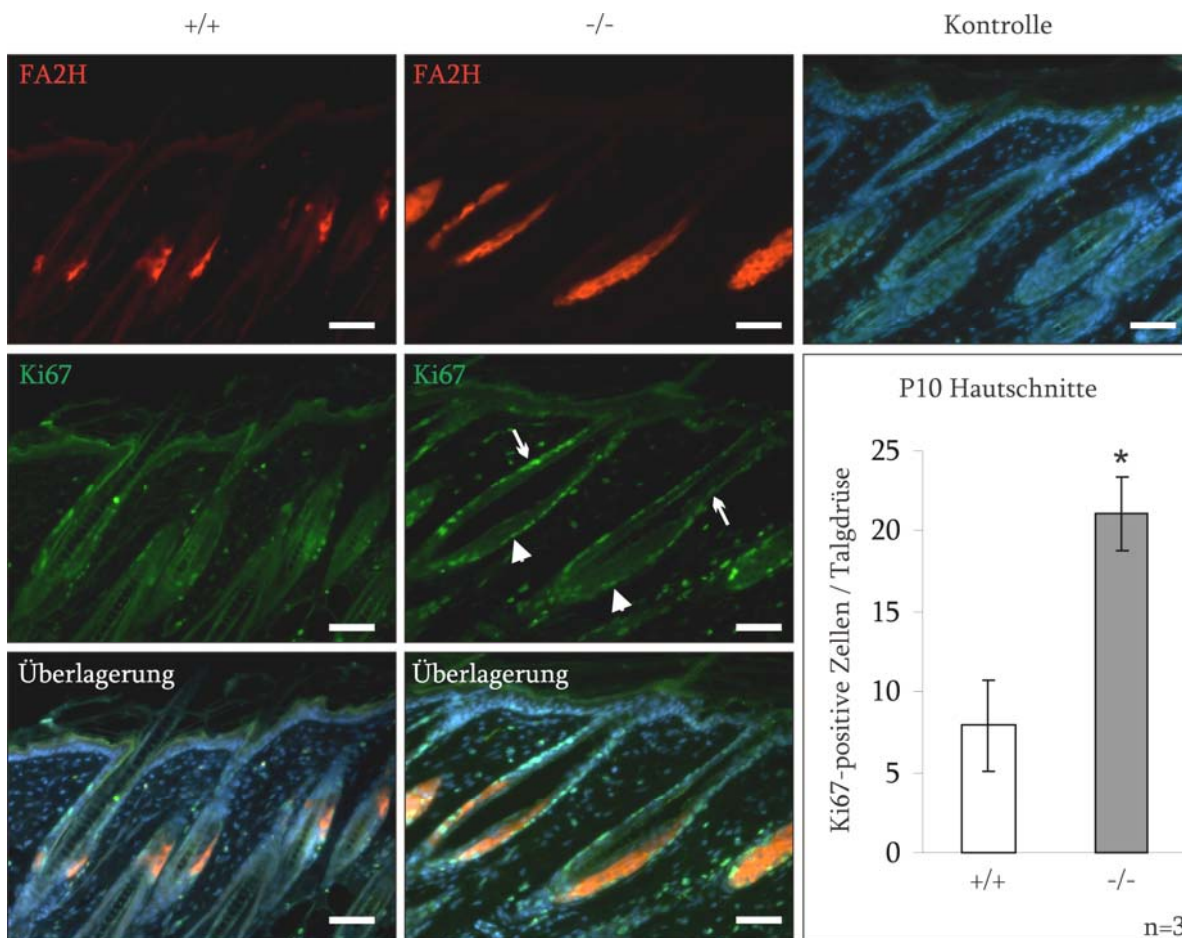


**Abb. 5-11 Talgdrüsengröße in der telogenen Haut von WT- und FA2H-KO-Tieren.** Die telogene Haut von P21 alten WT- und P23 alten FA2H-KO-Mäusen wurde zur histologischen Darstellung H&E-gefärbt. Die Pfeile zeigen auf die sichtbaren Talgdrüsen, die in den FA2H-KO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich vergrößert waren. Nach der Inkubation mit dem FA2H-Antiserum (rot) konnte die Fläche, welche die gefärbten Talgdrüsen in der Immunfärbung einnahmen, ausgemessen und die Werte quantitativ ausgewertet werden. Pro Genotyp wurden jeweils drei Tiere untersucht. Von jedem Tier wurden mindestens drei Schnitte zur Auswertung herangezogen. Die FA2H-KO-Tiere wiesen in der telogenen Haut im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls statistisch signifikant vergrößerte Talgdrüsen auf (WT  $404 \mu\text{m}^2$ , KO  $1487 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,05$ ; t-Test). Maßstabsbalken: H&E-Färbung =  $50 \mu\text{m}$ , Immunfluoreszenz =  $20 \mu\text{m}$ . (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Anhand der Lokalisation der dermalen Papille, der verkürzten Haarfollikel sowie der gesamten Reduktion der Hautdicke konnte bei den histologischen Hautschnitten der P21/P23 alten Tiere von der telogenen Wachstumsphase ausgegangen werden. Wie in der Literatur beschrieben (Paus, 1999) geht in der katagenen Phase auch die Größe der Talgdrüsen zurück, um in der telogenen Phase ein Minimum zu erreichen. Die durchschnittliche Größe der Querschnittsfläche einer WT-Talgdrüse in DP10 Tieren nach der induzierten anagenen Phase war  $657 \mu\text{m}^2$  groß. In telogener Phase wurde die Fläche auf  $404 \mu\text{m}^2$  reduziert, was einer Verkleinerung um ca. 38 % entspricht. Bei den

FA2H-KO-Tieren ging die Talgdrüsengröße zwar ebenfalls zurück, war aber im Vergleich zu den Kontrolltieren noch immer statistisch signifikant vergrößert ( $p < 0,05$ ; t-Test). In der Haut von DP10 FA2H-KO-Tieren war die durchschnittliche Größe der Querschnittsfläche einer Talgdrüse  $1626 \mu\text{m}^2$  groß und wurde in der telogenen Ruhephase um ca. 10 % auf  $1487 \mu\text{m}^2$  reduziert. In der telogenen Haut war also ein noch deutlicherer Größenunterschied zwischen WT- und FA2H-KO-Talgdrüsen erkennbar. In der nach Depilation induzierten anagenen Phase (DP10) waren die FA2H-KO-Talgdrüsen ungefähr 2,5x größer, während sie in der telogenen Haut ca. 4x größer als die Talgdrüsen der Kontrolltiere waren.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die beobachtete Talgdrüsenvergrößerung durch eine verstärkte Proliferation der Sebozyten und eine vermehrte Sebozytenanzahl oder durch vergrößerte Sebozyten hervorgerufen wird. Dafür wurden Paraffinschnitte der gleichen Haut wie bei den obigen Versuchen zur Bestimmung der Talgdrüsengröße verwendet. Schnitte der P10 Haut und der Haut von DP10 Tieren wurden einer Co-Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und FA2H unterzogen. Abbildung 5-12 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Co-Färbung mit dem Anti-Ki67-Antikörper (grün) und dem FA2H-Antiserum (rot) an Paraffinschnitten der Haut von P10 alten Mäusen. Pro Genotyp wurden jeweils drei Tiere untersucht. Die Ki67-positiven Zellen wurden im Bereich von jeweils sechs Talgdrüsen pro Tier ausgezählt und die Werte wurden quantitativ ausgewertet.

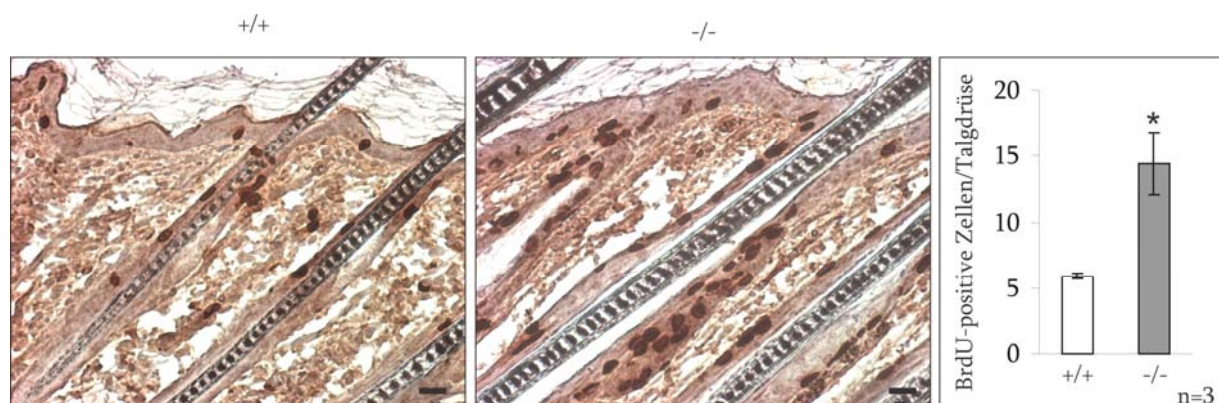


**Abb. 5-12 Co-Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und FA2H an Paraffinschnitten der Haut von 10 Tage alten Tieren.** Mit dem FA2H-Antiserum konnten die vergrößerten Talgdrüsen in den FA2H-KO-Tieren angefärbt werden (rot). Der Proliferationsmarker Ki67 (grün) zeigte in den FA2H-KO-Mäusen eine vermehrte Anzahl an proliferierenden, undifferenzierten Zellen in der Basalschicht der Talgdrüsen (siehe Pfeilköpfe), sowie in den benachbarten, darüber liegenden Zellen der äußeren Wurzelschicht (siehe Pfeile). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die Kontrollfärbung zeigt einen Paraffinschnitt, der nur mit den beiden Sekundär-Antikörpern inkubiert wurde. Die graphische Darstellung zeigt das Ergebnis der Auszählung Ki67-positiver Zellen im Bereich der Talgdrüsen. Es wurden jeweils 3 Tiere pro Genotyp verwendet. Pro Tier wurden sechs Talgdrüsen ausgezählt. In den WT-Schnitten waren durchschnittlich  $7,9 \pm 2,8$  Zellen pro Talgdrüse Ki67-positiv und in den FA2H-KO-Schnitten  $21,1 \pm 2,3$ . Die statistische Auswertung konnte zeigen, dass die proliferierenden Zellen in den FA2H-KO-Tieren signifikant vermehrt waren ( $p < 0,05$ ; t-Test). Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ . (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Die Auszählung der proliferierenden, Ki67-positiven Zellen im Bereich der Talgdrüsen ergab für die FA2H-KO-Tiere statistisch signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ; t-Test). In der WT-Haut waren durchschnittlich  $7,9 \pm 2,8$  Zellen pro Talgdrüse Ki67 positiv, in den FA2H-KO-Schnitten dagegen  $21,1 \pm 2,3$  Zellen. Die vermehrte Proliferation im Bereich der Talgdrüsen und die Tatsache, dass keinerlei Hinweise auf eine verstärkte Apoptose in den Hautschnitten der FA2H-KO-Mäuse

beobachtet werden konnten, sind vermutlich Ursache für die beobachtete Vergrößerung der Talgdrüsenfläche in den FA2H-KO-Tieren.

Zusätzlich zu der Analyse mit dem Proliferationsmarker Ki67 wurde eine Markierung mit BrdU (5'-Bromo-2'-desoxyuridin) durchgeführt. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das bei der Zell-Replikation in die neu synthetisierten DNA-Stränge inkorporiert wird. Die BrdU-Aufnahme von sich teilenden Zellen ist damit ein guter Marker für die zelluläre Proliferationsrate. Für dieses Experiment wurden 10 Tage alte Tiere verwendet. Den Mäusen wurden 2,5 h vor deren Tötung jeweils 10  $\mu$ l BrdU-Labeling-Reagenz / g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Rückenhaut wurde in Paraffin eingebettet und anschließend wurden 4-6  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Immunfluoreszenz-Analyse mit einem Anti-BrdU-Antikörper hat bezüglich vermehrter Proliferation in der FA2H-KO-Haut ähnliche Resultate wie die Ergebnisse mit dem Anti-Ki67-Antikörper gezeigt.



**Abb. 5-13 BrdU-positive Markierung an Paraffinschnitten der Haut von 10 Tage alten Mäusen.** Den untersuchten Tieren wurden 2,5h vor ihrer Tötung intraperitoneal je 10 $\mu$ l BrdU-Labeling-Reagenz/g Körpergewicht injiziert. Die danach angefertigten Paraffinschnitte wurden mit einem Anti-BrdU-Antikörper inkubiert, um die BrdU Inkorporation zu detektieren. Zur besseren Darstellung der histologischen Hautstrukturen wurden die Schnitte kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die BrdU-positiven Zellen wurden im Bereich der Talgdrüsen ausgezählt und quantitativ ausgewertet. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Die FA2H-KO-Tiere wiesen eine statistisch signifikant vermehrte Anzahl an gefärbten Zellen auf ( $p < 0,05$ ; t-Test). In den WT-Schnitten waren durchschnittlich  $5,9 \pm 0,2$  Zellen pro Talgdrüse BrdU-positiv und in den FA2H-KO-Schnitten waren es  $14,4 \pm 2,3$ . Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Abbildung 5-13 zeigt beispielhaft die mit einem Anti-BrdU-Antikörper gefärbte Haut im Bereich der Talgdrüsen von 10 Tage alten WT- und FA2H-KO-Tieren. Für das

Experiment wurden pro Genotyp jeweils drei Tiere untersucht. Die BrdU-positiven Zellen wurden im Bereich von jeweils zehn Talgdrüsen pro Tier gezählt und die mittlere Anzahl BrdU-positiver Zellen pro Talgdrüse bestimmt. Bei den FA2H-KO-Tieren konnte nach quantitativer Analyse eine signifikant vermehrte Anzahl an BrdU-positiven Zellen im Bereich der Talgdrüsen festgestellt werden ( $p < 0,05$ ; t-Test). In der WT-Haut waren durchschnittlich  $5,9 \pm 0,2$  Zellen pro Talgdrüse BrdU-positiv, in den FA2H-KO-Schnitten waren es dagegen  $14,4 \pm 2,3$  Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Hyperproliferation der basalen Zellen in der Talgdrüse, die bereits im Experiment mit dem Proliferationsmarker Ki67 festgestellt werden konnte. Folglich war davon auszugehen, dass die FA2H-Defizienz während der anagenen Wachstumsphase eine Hyperproliferation der basalen Sebozyten zur Folge hatte, welche zu einer deutlichen Vergrößerung der Talgdrüsen führte.

Um Veränderungen in der Gen-Expression festzustellen, die möglicherweise zur Identifizierung der Signalwege, die für die Hyperproliferation der Sebozyten verantwortlich sind, wurden einige *microarray*-Hybridisierungs-Experimente und quantitative *Real-Time*-PCR-Analysen durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Lihua Wang-Eckhardt und Matthias Eckhardt). Diese Untersuchungen haben über 300 verschiedene Gene identifiziert, die in der Haut der FA2H-KO-Tiere unterschiedlich exprimiert wurden, wobei die meisten untersuchten Gene hochreguliert waren. Tabelle 5-1 gibt einen Überblick über einige ausgesuchte Gene, die in der FA2H-KO-Haut unterschiedlich exprimiert wurden.

<i>Microarray</i> -Hybridisierungs-Experimente		
Keratine		
1451551_at	K16	0,5
1427700_x_at	K6a	2,8-3,1 <sup>a</sup>
1423952_a_at	K7	5,7
Liganden der ErbB-Rezeptoren		
1421161_at	$\beta$ -Cellulin	2,4
1418350_at	HB-EGF	2,4-3,1 <sup>a</sup>
1449994_at	Epigen (Epgn)	9,4
1421681_at	Neuregulin 4 (Nrg4)	5,1
Talgdrüsen-Marker		
1426960_a_at	Fa2h	0,0 (fehlt)
1420715_a_at	Ppary	2,5
1415965_at	Scd1	2,6
1423366_at	Scd3	0,13-0,26 <sup>a,b</sup>
1417781_at	CerS4/Lass4	3,5-4,4
Synthese der Sebumlipide		
1417695_a_at	Sterol-O-Acyltransferase 1	2,5-3,0 <sup>a</sup>
1418295_s_at	Dgat1	2,4
1435621_at	Far2	3,3-5,2 <sup>a</sup>
1426369_at	Far1	2,4-4,7

**Tab. 5-1 *Microarray*-Hybridisierungs-Experimente.** Die angegebenen Werte zeigen jeweils die relative Expressionsmenge ausgewählter Gene in der dorsalen Haut von 10 Tage alten FA2H-KO-Männchen verglichen mit WT-Männchen der gleichen Altersstufe.

<sup>a</sup> Die veränderte Gen-Expression wurde mit mehr als nur einem *microarray*-Proben-Set gezeigt.

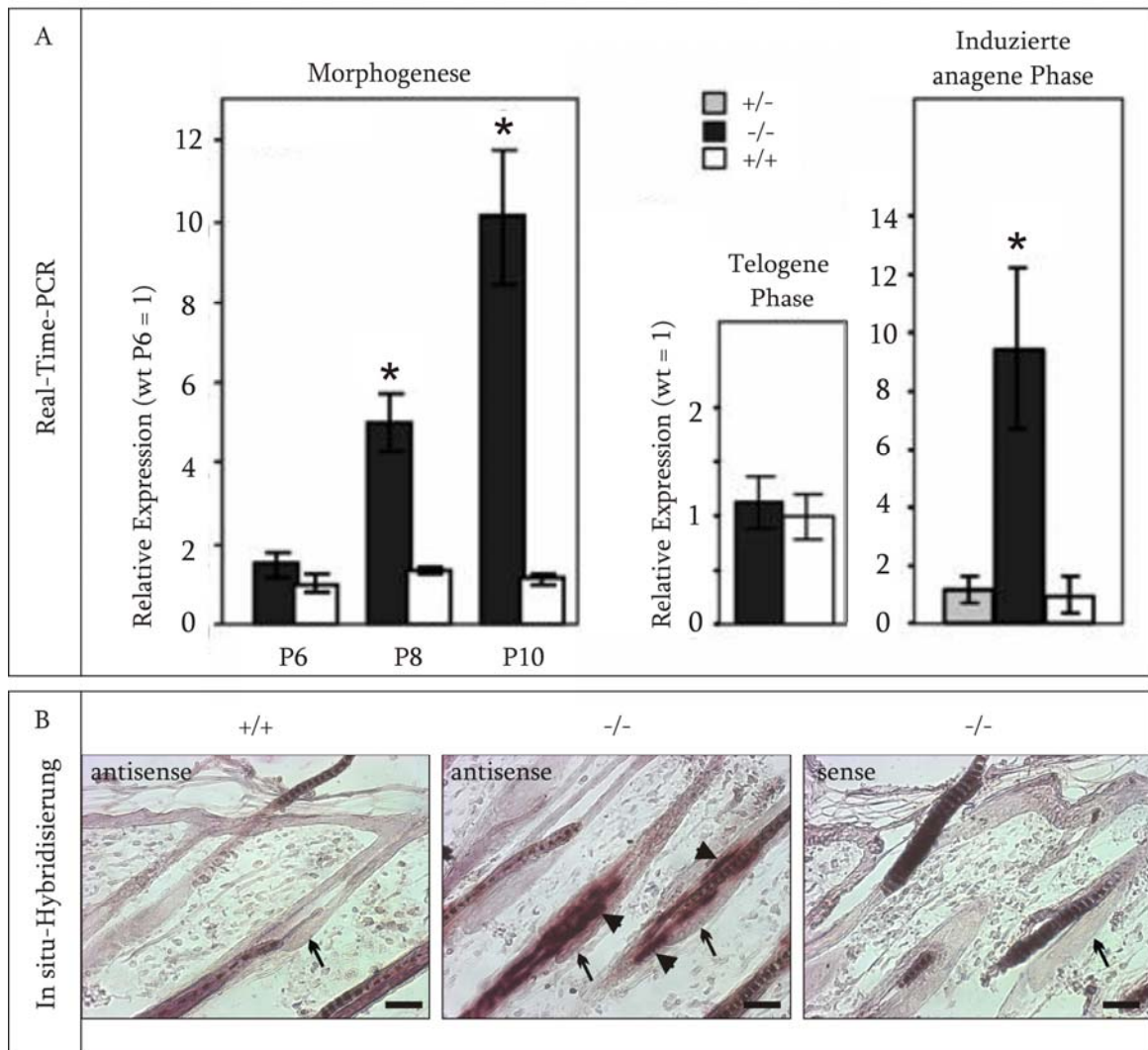
<sup>b</sup> Die Herunter-Regulation der Scd3-Expression konnte nicht mittels *Real-Time*-PCR bestätigt werden.

(Daten in Zusammenarbeit mit Lihua Wang-Eckhardt und Matthias Eckhardt)

Die Gene, die für Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) bzw. des ErbB-Rezeptors codieren, waren in der FA2H-KO-Haut um den Faktor 2,4-9,4 x hochreguliert. Zu diesen stärker exprimierten Liganden zählen z.B. Epigen (Epgn),  $\beta$ -Cellulin und Neuregulin 4. *Real-Time*-PCR-Analysen haben gezeigt, dass die Menge an Epigen in den FA2H-KO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren vor allem während der Morphogenese zwischen P6 und P10 und in

einer nach Depilation induzierten anagenen Phase sehr stark hochreguliert war. Dies entsprach den Zeitpunkten, an denen bei den FA2H-KO-Mäusen die Talgdrüsen-Hyperproliferation beobachtet werden konnte. In telogener Wachstumsphase, in der die Talgdrüsengröße im Regelfall reduziert wird, war dieser signifikante Unterschied zwischen den WT- und FA2H-KO-Tieren nicht feststellbar. Da die Epigen-Menge bereits zwischen dem sechsten und achten Tag nach der Geburt stark anstieg, aber die Talgdrüsen erst an Tag 10 gegenüber den WT-Talgdrüsen signifikant vergrößert waren, lag die Vermutung nahe, dass die deutliche Hochregulation des Epigen die Hyperproliferation der Sebozyten und die Talgdrüsenvergrößerung bedingt hatte. Zusätzlich zu den *Real-Time*-PCR-Analysen wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Epigen-cRNA-*antisense*-Sonde an Paraffinschnitten der Haut von 10 Tage alten Tieren durchgeführt. Das Experiment sollte die Lokalisation des Epigen in der Haut darstellen und untersuchen, welche Zellen genau das Epigen hochregulierten. Zur Kontrolle wurde dieses Experiment auch mit einer FA2H-cRNA-*sense*-Sonde durchgeführt. Abbildung 5-14 zeigt die Ergebnisse der quantitativen *Real-Time*-PCR-Analysen zur Expression von Epigen in der Haut zu verschiedenen Zeitpunkten und gibt einen repräsentativen Überblick über die *in situ*-Hybridisierung mit Epigen-Sonden an Paraffinschnitten von 10 Tage alter WT- und FA2H-KO-Haut.





**Abb. 5-14 Analyse der Expression von Epigen mittels *Real-Time*-PCR und *in situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten der Haut von 10 Tage alten Mäusen.** (A) Die Ergebnisse der *Real-Time*-PCR zeigen den statistisch signifikanten Anstieg der relativen Epigen-Expression in FA2H-KO-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren, deren Werte gleich 1 gesetzt wurden ( $p < 0,05$ ; t-Test). Dieser konnte sowohl während der Morphogenese als auch in einer nach Depilation bedingten anagenen Phase festgestellt werden. In telogener Wachstumsphase wurde die Epigen-Expression in den FA2H-KO-Tieren wieder runterreguliert und es konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren erkannt werden. Die Daten wurden mit Hilfe der  $2^{-\Delta Ct}$ -Methode mit Ubiquitin C als Referenz ausgewertet. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD dar. Die Anzahl der verwendeten Tiere lag bei  $n=3-4$ . (B) Die *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Epigen-cRNA-*antisense*-Sonde an Paraffinschnitten der Haut von 10 Tage alten Mäusen konnte die Ergebnisse der *Real-Time*-PCR bestätigen. Im FA2H-KO-Schnitt waren deutlich gefärbte Signale in den Talgdrüsen (Pfeile) zu erkennen. Zusätzlich zu diesen waren auch benachbarte Bereiche der äußeren Wurzelschicht gefärbt (Pfeilköpfe). Im WT-Schnitt und in der Kontrolle mit der Digoxigenin-markierten Epigen-cRNA-*sense*-Sonde konnten keine Signale ausgemacht werden. Maßstabsbalken = 20 µm. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

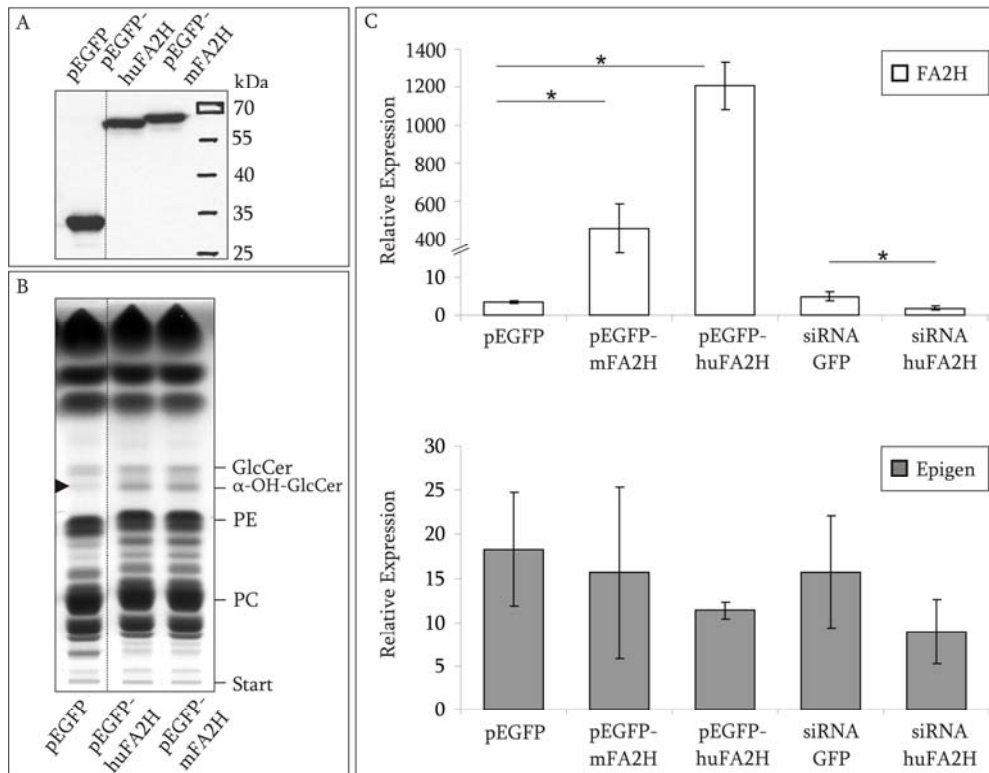
In der graphischen Darstellung der *Real-Time*-PCR-Analysen (Abb. 5-14 A) wurden die Durchschnittswerte der WT-Tiere gleich 1 gesetzt und die Werte der FA2H-KO-Tiere

wurden darauf bezogen. Die Graphik zeigt in den FA2H-KO-Mäusen einen starken Anstieg der relativen Epigenexpression während der Morphogenese und in einer nach Depilation induzierten anagenen Phase. In der telogenen Wachstumsphase konnte dieser Unterschied zwischen den WT- und FA2H-KO-Tieren nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung an P10 Hautschnitten konnten die Resultate der *Real-Time*-PCR-Analysen während der Morphogenese bestätigen (Abb. 5-14 B). Anhand der Bilder waren deutlich die starken Signale in den basalen Talgdrüsenzellen der FA2H-KO-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erkennen. Zusätzlich zu den Sebozyten sind auch einige benachbarte Zellen der äußeren Wurzelschicht intensiv gefärbt. Die Kontrolle mit einer Digoxigenin-markierten Epigen-cRNA-*sense*-Sonde zeigte bei den FA2H-KO-Hautschnitten keine Signale. Die dargestellten Untersuchungen bekräftigen die Vermutung, dass die stark hochregulierte Epigen-Expression für die Hyperproliferation der Sebozyten und die Talgdrüsenvergrößerung in den FA2H-KO-Tieren verantwortlich ist.

#### *5.1.6 Überexpression und Gen-Knock-Down von FA2H haben keinen direkten Effekt auf die Epigen-Expression*

Die oben beschriebene *Real-Time*-PCR-Analyse sowie die *in situ*-Hybridisierung (Abb. 5-14) lassen vermuten, dass die in den FA2H-KO-Tieren beobachtete erhöhte Menge an Epigen einen entscheidenden Einfluss auf deren Talgdrüsengröße hat. Diese Annahme wird durch die Tatsache bekräftigt, dass Epigen-überexprimierende, transgene Mäuse über vergrößerte Talgdrüsen verfügen. Diese Tiere weisen auch ein verzögertes Herauswachsen der Haare auf (Dahlhoff, 2010). Beide Beobachtungen ähneln stark dem Phänotyp der hier untersuchten FA2H-KO-Tiere. Ob ein Zusammenhang zwischen dem FA2H-*Knock-Out* und der erhöhten Epigen-Expression besteht und welcher Art dieser ist, sollte in den folgenden Experimenten *in vitro* in Zellkulturmodellen untersucht werden. Für diese Versuche hätten primär isolierte Sebozyten aus der Haut von WT- und FA2H-KO-Tieren den größten Vorteil. Die Isolierung der Talgdrüsen aus der murinen

Haut war aufgrund ihrer Größe allerdings sehr schwierig und die Versuche eine Sebozyten-Primärkultur zu generieren, hatten keinen Erfolg. Die immortalisierte, humane Sebozyten-Zelllinie SZ95 (Zouboulis, 1999) konnte für diese Zwecke ebenfalls nicht verwendet werden, da sich die Zellen nur sehr schlecht transfizieren lassen. Deshalb wurde die immortalisierte, humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp, 1988) für die folgenden Experimente verwendet, da diese Zellen wie die Sebozyten ebenfalls endogen FA2H und Epigen exprimieren, was mit Hilfe einer RT-PCR-Analyse gezeigt werden konnte (siehe 5.2.2, Abb. 5-32 B). Die Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP-huFA2H und pEGFP-mFA2H oder mit dem Kontrollvektor pEGFP transient transfiziert. Die Expression der Proteine (EGFP: 29 kDa, EGFP-huFA2H: 70 kDa, EGFP-mFA2H: 72 kDa) wurde mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 5-15 A). Die Lipidanalyse der mit pEGFP-huFA2H oder pEGFP-mFA2H transfizierten HaCaT-Zellen zeigte weiterhin das Vorkommen von zusätzlichen  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipid-Banden, die in den Kontrollzellen nicht vorhanden waren (Abb. 5-15 B, siehe Pfeilkopf). Neben der transienten Transfektion zur Überexpression von FA2H wurden die HaCaT-Zellen auch mit siRNA gegen humane FA2H transfiziert, um einen FA2H-Gen-*Knock-Down* oder sogar eine FA2H-Defizienz hervorzurufen, wie sie in den FA2H-KO-Tieren besteht. Als Negativkontrolle wurde siRNA verwendet, die gegen GFP gerichtet war. Die transient transfizierten HaCaT-Zellen sowie mit siRNA inkubierten Zellen sollten für die folgenden Versuche verwendet werden. Nach RNA-Extraktion und Umschreibung in cDNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase wurde eine quantitative *Real-Time*-PCR-Analyse mit FA2H- und Epigen-Primern durchgeführt. Die *Real-Time*-PCR wurde mit Hilfe der  $2^{-\Delta Ct}$ -Methode mit Aktin als Referenz ausgewertet. Es sollte untersucht werden, ob der siRNA-bedingte FA2H-*Knock-Down* oder die FA2H-Überexpression in den transfizierten Zellen eine Auswirkung auf die Epigen-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen hat. Abbildung 5-15 C zeigt die Auswertung der *Real-Time*-PCR-Daten von jeweils drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 5-15 Überexpression und Gen-*Knock-Down* von FA2H in HaCaT-Zellen.** (A) Western Blot-Analyse von transient transfizierten HaCaT-Zellen. Für die Transfektion wurden die Plasmide pEGFP-huFA2H und pEGFP-mFA2H verwendet. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Kontrollvektor pEGFP transfiziert. Nach Zelllyse wurden 20 µg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Inkubation mit einem Anti-GFP-Antikörper zeigt die Expression des GFP-Proteins (29 kDa) und der beiden Fusionsproteine EGFP-huFA2H (70 kDa) und EGFP-mFA2H (72 kDa). (B) Dünnschichtchromatographische Lipidanalyse von transient transfizierten HaCaT-Zellen. Die mit den Plasmiden pEGFP-huFA2H und pEGFP-mFA2H transfizierten Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine sichtbar vermehrte Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer auf (siehe Pfeilkopf). Das Laufmittel zur Auftrennung der Sphingolipide setzt sich wie folgt zusammen: Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4. Verwendete Abkürzungen: GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer,  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin. (C) *Real-Time*-PCR-Analyse von mit Plasmiden (pEGFP, pEGFP-huFA2H, pEGFP-mFA2H) transient transfizierten und mit siRNA für 24h (gegen GFP, gegen huFA2H) transfizierten HaCaT-Zellen. Die Transfektion mit pEGFP-huFA2H und pEGFP-mFA2H geht im Vergleich zur Kontrolltransfektion erwartungsgemäß mit einem signifikanten Anstieg an humaner bzw. muriner FA2H einher. Mit der Transfektion von einer gegen die humane FA2H gerichteten siRNA konnte ein signifikanter Gen-*Knock-Down* von ca. 60 % beobachtet werden, der aber nach Transfektion einer GFP-siRNA nicht festgestellt werden konnte ( $p < 0,05$ ; t-Test). Die unterschiedliche Menge an FA2H-mRNA in den jeweiligen Ansätzen hatte allerdings keinen direkten Einfluss auf die Menge der Epigen-mRNA. Die relative Expressionsmenge von Epigen wies in allen Ansätzen keinen signifikanten Unterschied auf. Die Daten wurden mit Hilfe der  $2^{-\Delta C_t}$ -Methode mit Aktin als Referenz ausgewertet. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten dar.

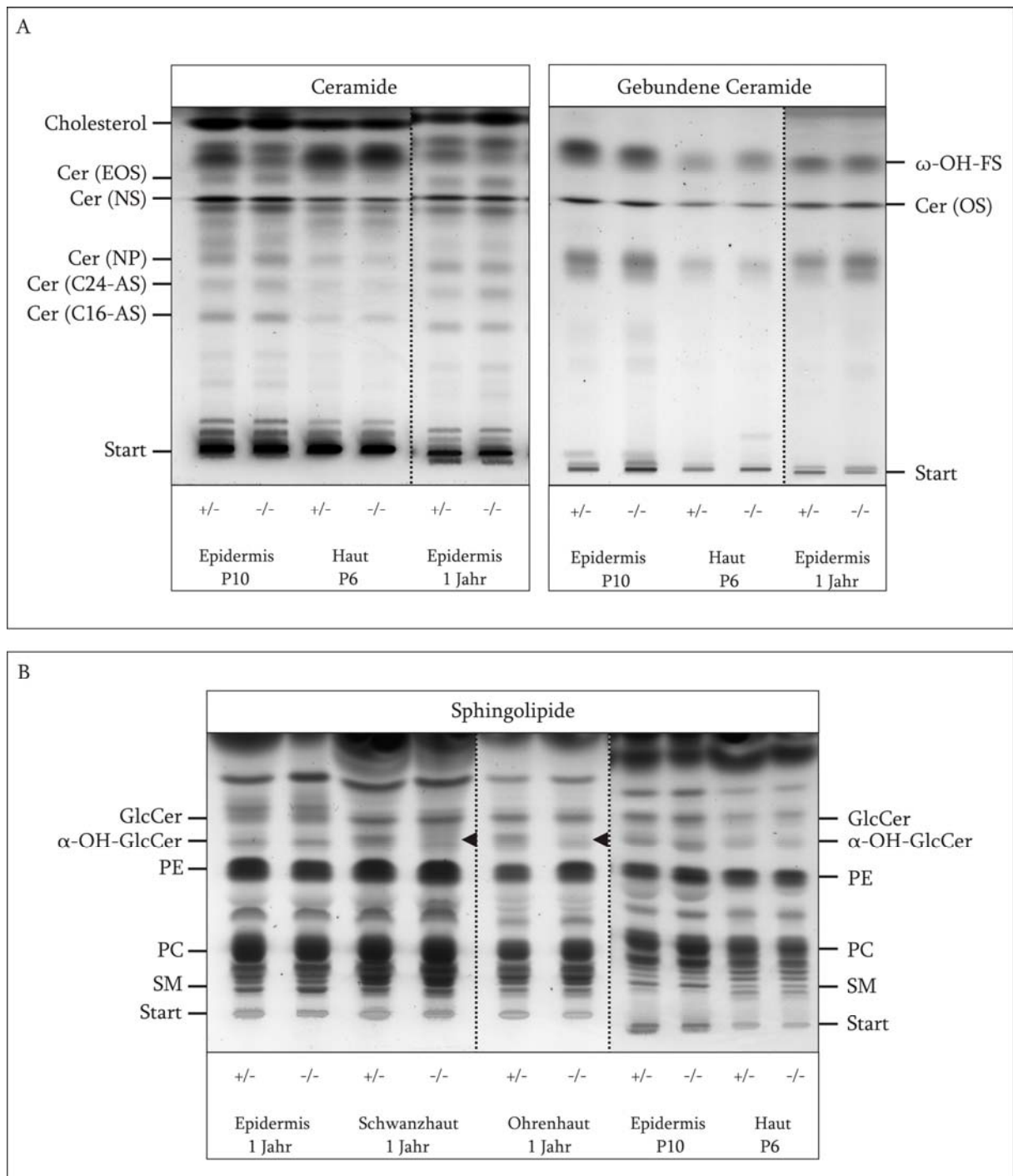
Sowohl die transiente Transfektion mit den Plasmiden pEGFP-huFA2H und pEGFP-mFA2H als auch die Transfektion mit einer gegen die humane FA2H gerichteten siRNA hatten einen deutlichen Effekt auf die Menge an der FA2H-mRNA (Abb. 5-15 C).

Im Vergleich zu den mit dem Plasmid pEGFP transfizierten Kontrollzellen, wiesen die HaCaT-Zellen, die mit pEGFP-huFA2H oder pEGFP-mFA2H transfiziert worden waren, erwartungsgemäß eine statistisch signifikant erhöhte Menge an humaner bzw. muriner FA2H-mRNA auf (relative Expressionswerte: EGFP = 3,5; EGFP-mFA2H = 456,3; EGFP-huFA2H = 1208,9). Die Transfektion mit der gegen die humane FA2H gerichteten siRNA zeigte im Vergleich zu den mit GFP-siRNA transfizierten Zellen eine signifikante Reduktion der Menge an humaner FA2H-mRNA um ca. 60 % (relative Expressionswerte: siRNA-GFP = 4,8; siRNA-huFA2H = 1,9). Die statistisch signifikant unterschiedlichen Mengen an FA2H-mRNA hatten allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Menge an Epigen-mRNA. Diese variierte zwar etwas zwischen den verschiedenen Ansätzen, doch konnte das *in vitro* Experiment die *in vivo* beobachtete Situation nicht darstellen. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die Hochregulation von Epigen in der Haut von FA2H-KO-Mäusen wahrscheinlich kein direkter Effekt der FA2H-Defizienz ist.

### 5.1.7 Analyse der Haut- und Epidermislipide

Das Enzym FA2H katalysiert die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Fettsäuren, die in der Haut frei oder als Bestandteile von Ceramiden und Sphingolipiden vorkommen können. In der Literatur ist beschrieben, dass  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide neben  $\omega$ -hydroxylierten Sphingolipiden eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der epidermalen Barrierefunktion spielen (Bouwstra, 2006 und Uchida, 2007). In den folgenden Experimenten wurden die Lipide der Epidermis sowie Lipide der Gesamthaut von verschiedenen Arealen des Körpers von WT- und FA2H-KO-Tieren analysiert. Damit sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die FA2H-Defizienz auf die Lipidzusammensetzung hat und ob das Fehlen der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide und Ceramide für den beobachteten Phänotyp verantwortlich war. Für die epidermale Lipidanalyse wurde die lyophilisierte dorsale Epidermis von 10 Tage und 1 Jahr alten Tieren verwendet. Für die Lipidanalyse der gesamten Haut wurden die Rückenhaut von 6 Tage alten Mäusen sowie die Schwanzhaut und die kompletten Ohren von 1 Jahr alten

Tieren untersucht. Es wurden jeweils drei FA2H-heterozygote und drei FA2H-KO-Tiere untersucht und miteinander verglichen. Die Gesamtlipide der verschiedenen Altersstufen und Hautbereiche wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Es wurden immer die gleichen Mengen an Gesamtlipid, bezogen auf das Ausgangsgewicht des zur Lipidextraktion eingesetzten Hautstücks, eingesetzt. Abbildung 5-16 zeigt die Lipidauftrennung von ungebundenen Ceramiden und den in der Haut an Proteine gebundenen Ceramidformen, die durch Hydrolyse freigesetzt werden konnten. Des Weiteren zeigt die Abbildung die aufgetrennten Sphingolipide. Dargestellt sind die Lipide von verschiedenen Altersstufen und von der Haut aus unterschiedlichen Bereichen des Körpers.



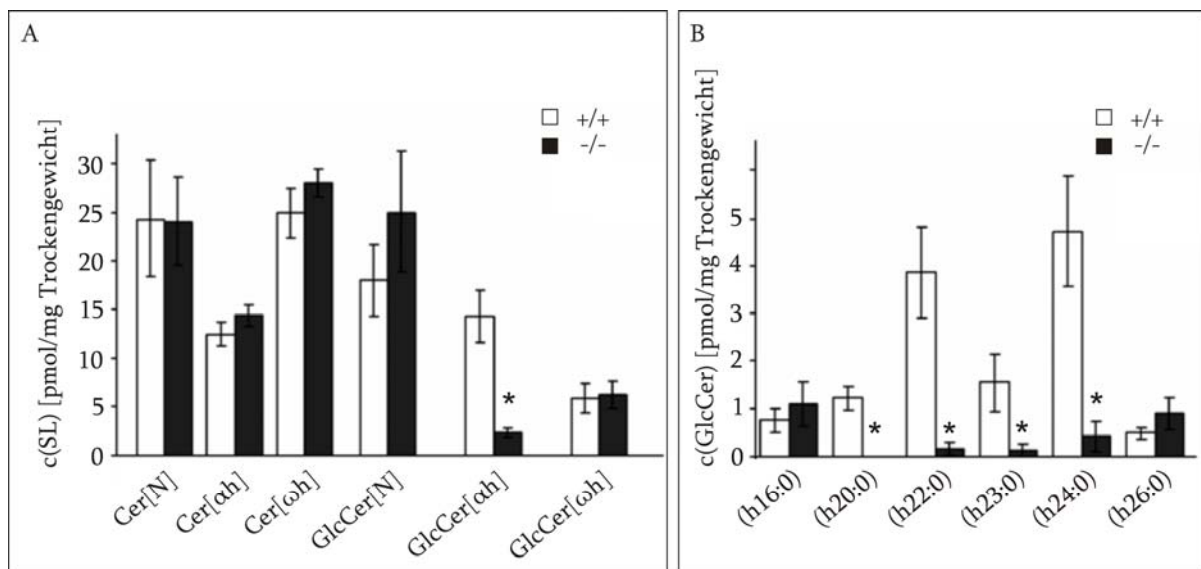
**Abb. 5-16 Dünnschichtchromatographische Analyse der Haut- und Epidermislipide.** Verwendet wurden jeweils Tiere verschiedener Altersstufen (P6, P10 und 1 Jahr alt) sowie die abgetrennte Epidermis oder die gesamte Haut aus unterschiedlichen Bereichen des Körpers. **(A)** Die ungebundenen Ceramide (Cer) und die an Proteine gebundenen Ceramide aus der Epidermis sowie dorsaler Gesamthaut zeigen keinen Unterschied zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren. In letzteren sind trotz des FA2H-Knock-Outs noch immer  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide (Cer-AS) zu finden, die auch mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Das Laufmittel zur Auftrennung der Ceramide setzt sich folgendermaßen zusammen: Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1. Die DC-Platte wurde darin 2x entwickelt. Verwendete Abkürzungen der verschiedenen Ceramidspezies: N, A, O und EO machen eine Aussage über die amidgebundene Fettsäure; N: nicht-hydroxylierte Fettsäure; A:  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure; O:  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure; EO:  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure, die an der Hydroxylgruppe verestert ist. S und

P zeigen das Sphingoid-Grundgerüst; S: Sphingosin; P: Phytosphingosin. **(B)** Die Analyse der Sphingolipide aus der Epidermis und der dorsalen Gesamthaut ergab ebenfalls keinen Unterschied zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren. Bei der Untersuchung der Schwanzhaut und der gesamten Ohrmuschel allerdings konnte auf der DC-Platte eine deutliche Reduktion an  $\alpha$ -hydroxyliertem Glucosylceramid (GlcCer) in den FA2H-KO-Mäusen beobachtet werden (Pfeilköpfe). Das Laufmittel zur Auftrennung der Sphingolipide setzt sich wie folgt zusammen: Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4. Verwendete Abkürzungen: GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer,  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; SM, Sphingomyelin. (FA2H-Heterozygot = +/-; FA2H-KO = -/-).

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der ungebundenen Ceramide und der an Proteine gebundenen Ceramide ergab keinen offensichtlichen Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Tieren mit FA2H-Defizienz (Abb. 5-16 A). Sowohl in der Gesamthaut von P6 alten FA2H-KO-Tieren, als auch in der Epidermis von P10 sowie 1 Jahr alten FA2H-KO-Tieren existierten noch immer quantitativ vergleichbare Mengen an  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden (Cer-AS mit 16 und 24 C-Atomen). Für die Auftrennung der Ceramide wurde das Laufmittel Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1 verwendet. Die gleichen Gesamtlipide wurden weiterhin im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 aufgetrennt. Die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Glucosylceramid (GlcCer) in der Epidermis sowie der Gesamthaut des Rückens war in den FA2H-KO-Tieren ebenfalls nicht verändert (Abb. 5-16 B). Das Vorkommen der  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide in der Haut und der Epidermis wurde zusätzlich mit Hilfe von ESI-MS nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die dünnschichtchromatographischen sowie massenspektrometrischen Ergebnisse waren nicht überraschend und stimmten mit der Tatsache überein, dass die FA2H-Expression in der murinen Haut ausschließlich in den Talgdrüsen beobachtet wurde und nicht in den Keratinozyten der Epidermis. Deshalb wurden neben der Analyse der dorsalen Gesamthaut auch zusätzlich Lipide aus der abgezogenen Schwanzhaut sowie der gesamten Ohren untersucht. Diese Hautbereiche wurden zur Analyse herangezogen, um die Menge an Triglyceriden aus der Subcutis zu reduzieren. Zusätzlich besitzen die Ohrmuscheln sowohl an deren Innen- als auch an der Außenseite Talgdrüsen. Damit kommt den Lipiden der Talgdrüsen in diesem Hautbereich eine größere Gewichtung zu als in anderen Hautabschnitten. Die Analyse der Ceramide mittels Dünnschichtchromatographie wies keinen Unterschied zwischen Ohren sowie Rücken- und Schwanzhaut auf (Daten nicht gezeigt). Bei der Untersuchung der



Sphingolipide konnte allerdings ein Unterschied zwischen den WT- und FA2H-KO-Tieren beobachtet werden (Abb. 5-16 B). Die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer war in der Schwanzhaut und in den Ohrmuscheln der FA2H-KO-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert (Pfeilköpfe). Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie bestätigt werden. Dafür wurden die gesamten Aurikel von jeweils drei WT- und FA2H-KO-Tieren homogenisiert und mit Hilfe eines Gefriertrockners lyophilisiert. Die Lipide wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und nach Zugabe von internen Standards mit Hilfe der Nano-Elektrospray-Ionization qualitativ und quantitativ vermessen. Abbildung 5-17 zeigt die quantitative Auswertung der Aurikel-Lipidzusammensetzung von WT- und FA2H-KO-Tieren.



**Abb. 5-17 Quantitative Auswertung der Lipidzusammensetzung der gesamten Ohrmuschel von WT- und FA2H-KO-Tieren.** (A) Die massenspektrometrische Analyse der Sphingolipide (SL) aus den Ohrmuscheln von jeweils drei WT- und FA2H-KO-Tieren zeigt keine Unterschiede in der Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Ceramid oder anderen Ceramidformen. Bei Betrachtung von Glucosylceramid (GlcCer) konnte in den FA2H-KO-Tieren allerdings eine signifikante Reduktion an  $\alpha$ -hydroxyliertem Glucosylceramid im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden ( $p < 0,05$ ; t-Test). Bei dem verwendeten Ionen-Modus wurden nur Sphingolipide mit Dihydrosphingosin (18:1) als Sphingoid-Grundgerüst analysiert. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n=3$ ). Verwendete Abkürzungen: SL, Sphingolipide; Cer, Ceramid; GlcCer, Glucosylceramid; N, nicht hydroxylierte Fettsäure;  $\alpha$ h,  $\alpha$ -hydroxyliert;  $\omega$ h,  $\omega$ -hydroxyliert; c, Menge an SL pro mg Trockengewicht. (B) Die genaue Analyse der verschiedenen  $\alpha$ -hydroxylierten (h) GlcCer-Spezies zeigte in beiden Genotypen normale Mengen an  $\alpha$ -hydroxyliertem C16- und C26-GlcCer. Die GlcCer-Varianten mit  $\alpha$ -hydroxylierten C22-, C23- und C24-Fettsäuren waren in den FA2H-KO-Mäusen dagegen signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ; t-Test). Die Menge an GlcCer mit  $\alpha$ -hydroxylierter C20-Fettsäure war in den FA2H-KO-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht mehr detektierbar. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Die mit Hilfe der Massenspektrometrie gewonnenen Daten von den Ohrmuschellipiden haben bezüglich der  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide sowie der anderen Ceramidformen keine Unterschiede zwischen den WT- und FA2H-KO-Tieren gezeigt (Abb. 5-17 A). Auch in der Dünnschichtchromatographie (DC) waren keine Unterschiede zu sehen (Daten nicht gezeigt). Die massenspektrometrische Analyse von Sphingolipiden wies jedoch sowohl in der DC-Analyse (Abb. 5-16 B) als auch in der Massenspektroskopie (Abb. 5-17 A) eine signifikante Reduktion an  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer auf ( $p < 0,05$ ; t-Test). Die genaue Analyse der verschiedenen  $\alpha$ -hydroxylierten GlcCer-Spezies zeigte normale Mengen an  $\alpha$ -hydroxyliertem C16- und C26-GlcCer. Die GlcCer-Varianten mit  $\alpha$ -hydroxylierten C22-, C23- und C24-Fettsäuren waren signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ; t-Test) und die Menge an GlcCer mit  $\alpha$ -hydroxylierter C20-Fettsäure konnte in den FA2H-KO-Tieren nicht mehr detektiert werden (Abb. 5-17 B). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass die FA2H nur einen Teil der Fettsäuren hydroxyliert, die in  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden und Ceramiden der murinen Haut vorkommen. Die weiterhin in den FA2H-KO-Tieren präsenten  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und Sphingolipide müssen mit Hilfe einer zweiten Hydroxylase entstehen, die vermutlich sowohl in den Sebozyten als auch in den Keratinozyten der Epidermis exprimiert wird.

Die spezifische Reduktion von  $\alpha$ -hydroxyliertem C20-GlcCer bis zu einer nicht mehr detektierbaren Menge stimmt mit der Beobachtung überein, dass in den Talgdrüsen hauptsächlich die Ceramidsynthase 4 (CerS 4) exprimiert wird, die bei der Ceramidsynthese im Vergleich zu den anderen fünf Ceramidsynthasen die höchste Präferenz für C20:0-Coenzym A hat (Mizutani, 2005). Die Expression der CerS 4 konnte auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer *in situ*-Hybridisierung mit Cer 4-Sonden gezeigt werden. Dafür wurden Paraffinschnitte der Rückenhaut von 10 Tage alten WT- und FA2H-KO-Tieren mit einer Digoxigenin-markierten CerS 4-cRNA-*antisense*-Sonde inkubiert. Die *in situ*-Hybridisierung konnte deutliche Signale in den Talgdrüsen aufzeigen, aber nicht in den Keratinozyten der Epidermis. Zur Kontrolle wurden die Schnitte mit einer *sense*-Sonde hybridisiert, bei der keine Färbung beobachtet werden

konnte. Abbildung 5-18 gibt beispielhaft die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung wieder.



**Abb. 5-18** *In situ*-Hybridisierung mit CerS 4-Sonden an Paraffinschnitten der Haut von 10 Tage alten Tieren. Dorsale Paraffinschnitte wurden mit einer Digoxigenin-markierten CerS 4-cRNA-*antisense*-Sonde hybridisiert. Die positiven Signale zeigen eine spezifische Expression von CerS 4 in den Talgdrüsen, aber nicht in den Keratinozyten der Epidermis. Die Menge an CerS 4 scheint in den FA2H-KO-Tieren im Vergleich zum WT verstärkt zu sein. Ursache dafür sind vermutlich die vergrößerten Talgdrüsen in den FA2H-KO-Tieren. Die Inkubation mit einer Digoxigenin-markierten CerS 4-cRNA-*sense*-Sonde als Kontrolle wies keine spezifischen Hybridisierungssignale auf. Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

### 5.1.8 Primärkultur von murinen Keratinozyten

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass sowohl die humane Epidermis als auch primäre humane Keratinozytenkulturen das Enzym FA2H exprimieren, das für die Synthese von  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden und Sphingolipiden verantwortlich ist. Die Aktivität des Enzyms nimmt dabei mit dem Differenzierungsstadium der Keratinozyten zu (Uchida, 2007). Die murine FA2H konnte mit Hilfe von Immunfärbungsreaktionen, *in situ*-Hybridisierung sowie einer LacZ-Färbung zur Detektion des Cytochrom-b5- $\beta$ -Galaktosidase-Fusionproteins in den FA2H-KO-Mäusen in der Haut spezifisch nur in den Talgdrüsen ausgemacht werden (siehe 5.1.4). Mit keiner der drei Versuchsmethoden konnte eine FA2H-Expression in der Epidermis gezeigt werden. Die Analyse der Haut- und Epidermislipide von WT- und FA2H-KO-Tieren wies keine offensichtlichen Unterschiede auf (siehe 5.1.7). Die FA2H-KO-Tiere verfügten in der Haut noch immer über  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide und Sphingolipide. In den folgenden Versuchen sollte eine murine Keratinozyten-Primärkultur aus neonataler WT- und FA2H-KO-Epidermis isoliert werden, um die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Existenz von

$\alpha$ -hydroxylierten Lipiden in der Haut und der Epidermis von FA2H-KO-Mäusen zu bestätigen. Weiterhin sollte damit der Unterschied zwischen Mensch und Maus bezüglich der FA2H-Expression in der Haut gezeigt werden.

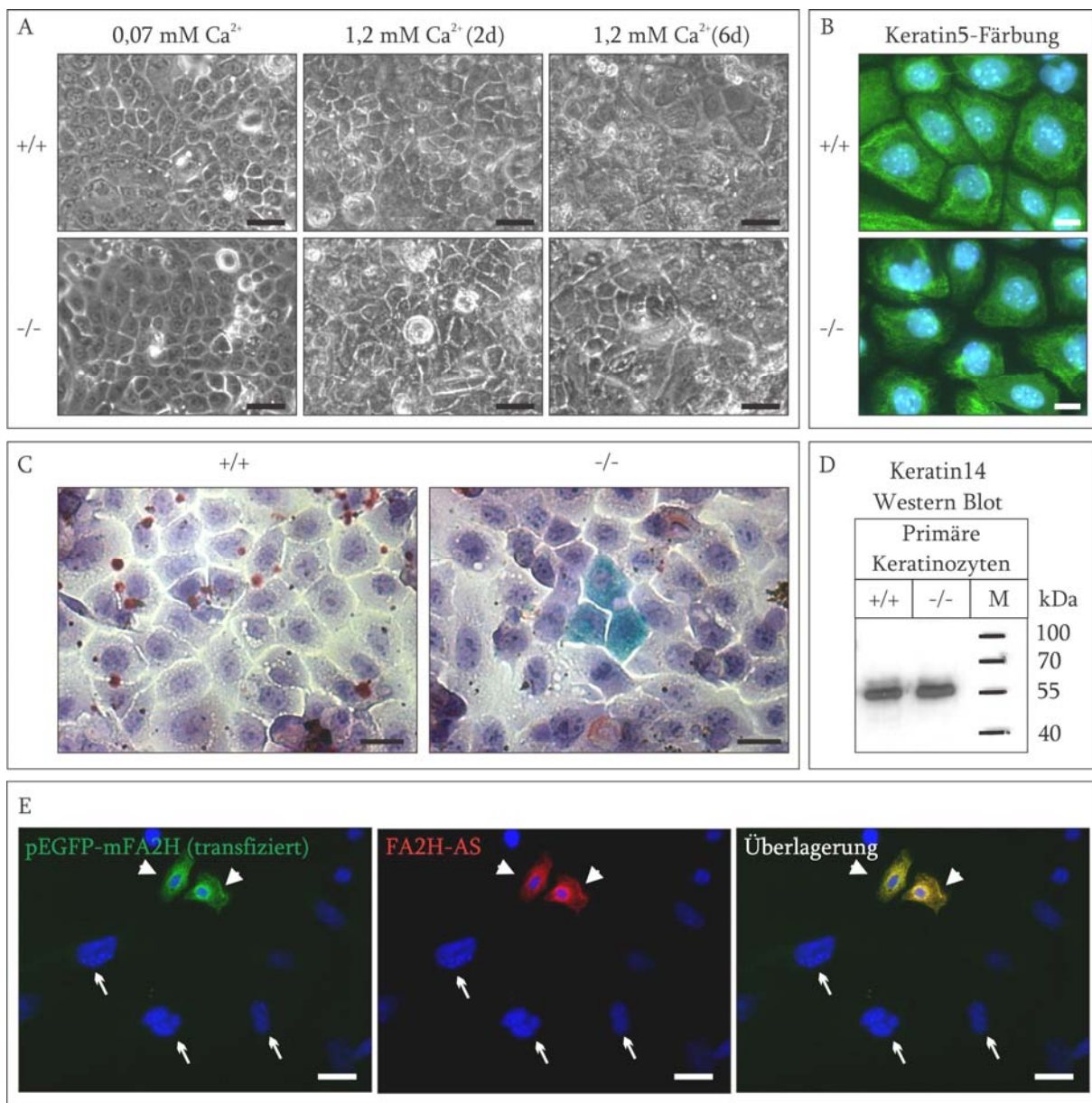
#### 5.1.8.1 Biochemische Untersuchungen

Primäre Keratinozyten lassen sich unter bestimmten Bedingungen in großen Mengen aus neonataler Epidermis isolieren. Um den undifferenzierten Status der Zellen zu gewährleisten und während der Kultivierung zu erhalten, werden speziell definierte Kulturmedien verwendet, die sehr wenig Calcium und kein fetales Kälberserum (FCS) enthalten. Die Zellen können allerdings in einem subkonfluenten Zustand (90-95 %) mittels einer Erhöhung der Calcium<sup>2+</sup>-Konzentration im Medium zum Ausdifferenzieren stimuliert werden.

Primäre Keratinozyten wurden aus der Epidermis von neugeborenen WT- und FA2H-KO-Tieren gewonnen. Die epidermalen Keratinozyten exprimieren eine große Anzahl an strukturgebenden Proteinen. Einen sehr großen Anteil machen dabei die Keratine aus. Basale Keratinozyten exprimieren die beiden Keratine 5 und 14. Die darüber liegenden, differenzierenden Zellen weisen dagegen große Mengen an K1 und K10 auf (Blanpain, 2006). Die aus der Epidermis isolierten, primären WT- und FA2H-KO-Keratinozyten wurden einer Immunfluoreszenz-Analyse gegen K5 unterzogen, um zu zeigen, dass es sich bei der Kultur tatsächlich um Keratinozyten in undifferenziertem Stadium handelte (Abb. 5-19 B). Die K5-Färbung ist in grün dargestellt, die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Zusätzlich wurde die Expression des Proteins K14 mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 5-19 D). In beiden Genotypen konnte im Vergleich zum Protein-Standard eine Bande bei ungefähr 55 kDa beobachtet werden. Das berechnete Molekulargewicht für K14 liegt bei 52 kDa und stimmt gut mit dem Ergebnis des Western Blots überein.

Abbildung 5-18 A zeigt konfluente, basale Keratinozyten in einem Medium mit geringem Calciumgehalt (0,07 mM) sowie die differenzierenden Zellen 2 und 6 Tage nach

zusätzlicher Calciumzugabe (1,2 mM). Zwischen den FA2H-KO-Keratinocyten und den Kontrollzellen konnte optisch kein morphologischer Unterschied ausgemacht werden. In beiden Fällen waren Kopfsteinpflaster-artige Zellen zu beobachten, die in kleinen Inseln gleich schnell gewachsen sind. Zwei Tage nach Calciumzugabe waren deutliche morphologische Veränderungen der Zellen zu sehen. Ungefähr 50 % der Zellen hatten ein verformtes Aussehen und das Zellvolumen hatte stark zugenommen. Diese optischen Veränderungen konnte 6 Tage nach Erhöhung der Calcium<sup>2+</sup>-Konzentration in beiden Genotypen gleichermaßen bei fast allen Zellen beobachtet werden (Abb. 5-19 A). Die Tatsache, dass in FA2H-KO-Keratinocyten *in vitro* eine normale Ausdifferenzierung veranlasst werden konnte, ließ die Vermutung zu, dass in der Epidermis der FA2H-KO-Tiere die Wanderung der Zellen aus dem *Stratum basale* ins *Stratum Corneum* mit den damit einhergehenden Veränderungen in den Zellen ebenfalls regulär ablief und eine funktionsfähige Barrierefunktion der Haut aufgebaut werden konnte.



**Abb. 5-19 Biochemische Analyse von primären, murinen Keratinozyten.** (A) Primäre Keratinozyten wurden aus der Epidermis des Rückens neonataler WT- und FA2H-KO-Mäuse isoliert. In einem definierten Medium mit geringem Calciumgehalt (0,07 mM) konnten die Zellen in ihrem basalen, undifferenzierten Stadium kultiviert werden. Durch eine Erhöhung der Calcium<sup>2+</sup>-Konzentration auf 1,2 mM wurden die Zellen zum Ausdifferenzieren gebracht, was an der Veränderung der Zellform und einer Zunahme des Zellvolumens erkannt werden konnte. Bereits nach 2d waren die ersten Veränderungen zu sehen und nach 6d waren alle Zellen sichtbar verformt. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ausgemacht werden. (B) Immunfluoreszenz-Färbung gegen das strukturenbende Protein Keratin5, das ein Marker für basale Keratinozyten ist. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). (C) WT- und FA2H-KO-Keratinozyten wurden einer LacZ-Färbung unterzogen, um die Expression des Cytochrom-b5-β-Galaktosidase-Fusionproteins in den FA2H-KO-Zellen nachzuweisen. Eine sehr geringe Anzahl der FA2H-KO Keratinozyten war LacZ-positiv (<0,01 %). Es wurde vermutet, dass die LacZ-positiven Zellen möglicherweise Vorläuferzellen von Sebozyten sein könnten. Die WT-Zellen wiesen erwartungsgemäß keine Färbung auf. Für eine bessere Darstellung der Zellstrukturen wurden die Zellen nach der LacZ-Färbung mit Hämatoxylin gegengefärbt. (D) Dargestellt ist eine Western Blot-Analyse gegen den basalen Keratinozyten-Marker K14. Beide Genotypen haben ein Signal in erwarteter Größe gezeigt (berechneter Wert für K14 = 52 kDa) M = Proteinstandard. (E) Immunfluoreszenzmikroskopische

Darstellung muriner FA2H in primären WT-Keratinocyten nach einer Transfektion mit einem Plasmid, welches für das Fusionsprotein EGFP-mFA2H codiert. Die meisten Zellen konnten mit dem FA2H-Antiserum nicht angefärbt werden (Pfeile). Alleine die mit pEGFP-mFA2H transfizierten Zellen, die aufgrund des GFP-Signals an der Grünfärbung erkannt werden konnten, waren ebenfalls mit dem FA2H-Antiserum (rot) gefärbt (Pfeilköpfe). Maßstabsbalken: A = 50  $\mu\text{m}$ , B = 10  $\mu\text{m}$ , C + E = 20  $\mu\text{m}$ . (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

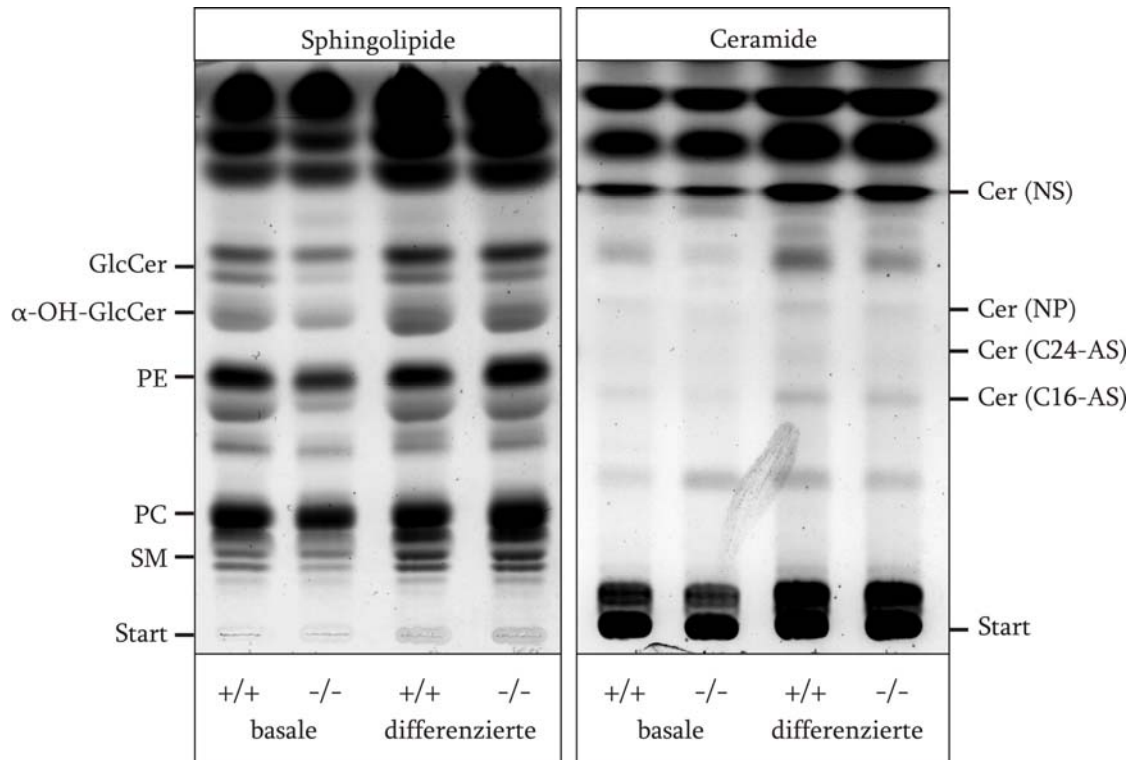
Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei den Primärkulturen um basale Keratinocyten handelt, die ein normales Aussehen haben und zur Ausdifferenzierung befähigt sind, sollten die Zellen auf das Vorhandensein der FA2H untersucht werden. Dafür wurden die WT- und FA2H-KO-Primärzellen auf Deckgläschen in eine 24-*well* Platte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Darauf folgte eine LacZ-Färbung der Zellen, um die Expression des Cytochrom-b5- $\beta$ -Galaktosidase-Fusionproteins in den FA2H-KO-Zellen nachzuweisen. Die Keratinocyten wurden nach Fixierung in einer LacZ-Färbelösung bei 37°C inkubiert. Bereits nach ca. 9 h konnte bei den FA2H-KO-Zellen eine sehr geringe Anzahl an blau gefärbten Zellen beobachtet werden. Die Inkubation wurde auf weitere 2-3 Tage ausgedehnt, doch die Zahl der gefärbten Zellen erhöhte sich dabei nicht. In einem konfluenten 24-*well* (2 cm<sup>2</sup>) waren ungefähr 10-15 gefärbte Zellen zu sehen, was einem Anteil von weniger als 0,01 % entspricht (Abb. 5-19 C). Die LacZ-positiven Zellen könnten möglicherweise Vorläuferzellen von Sebozyten sein, da bekannt ist, dass während der Morphogenese die Talgdrüsen aus den basalen Keratinocyten des Haarfollikels entstehen (Fuchs, 2007). Die WT-Keratinocyten haben erwartungsgemäß keinerlei Blaufärbung der Zellen gezeigt. Nach der beendeten LacZ-Färbung wurden die Zellen für eine bessere histologische Untersuchung kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt. Neben der LacZ-Färbung wurden die Keratinocyten auch einer Immunfluoreszenz-Analyse mit dem FA2H-Antiserum unterzogen. Zur Kontrolle des Versuchs wurden primäre WT-Keratinocyten für 24 h mit einem pEGFP-mFA2H-Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurden die WT-Keratinocyten mit dem FA2H-Antiserum inkubiert. Abbildung 5-19 E zeigt das Ergebnis dieser Färbung. Die meisten Keratinocyten waren nicht gefärbt (Pfeile). Nur die mit dem Plasmid pEGFP-mFA2H transfizierten Zellen, die an der GFP-Grünfärbung erkannt werden konnten, waren ebenfalls mit dem FA2H-Antiserum (rot) gefärbt (Pfeilköpfe). Die

Überlagerung der Bilder zeigt deutlich eine Co-Lokalisation (gelb) des grünen EGFP-mFA2H-Signals und der roten Färbung der murinen FA2H. Somit konnte sowohl mit der LacZ-Färbung als auch mit der Immunfluoreszenz-Analyse das Fehlen der murinen FA2H in primären Keratinozyten der Maus bestätigt werden.

#### 5.1.8.2 Lipidanalyse von primären Keratinozyten

Die Analyse der Haut- und Epidermislipide von WT- und FA2H-KO-Tieren wies im Vergleich keine offensichtlichen Unterschiede auf (siehe 5.1.7). Die FA2H-KO-Tiere verfügten in der Haut trotz des FA2H-*Knock-Outs* über  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide und Sphingolipide. Diese Beobachtung sollte auf zellulärer Ebene bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde das Lipidmuster von primär isolierten WT- und FA2H-KO-Keratinozyten untersucht. Sowohl die Lipide der basalen als auch der durch eine Erhöhung der Calcium<sup>2+</sup>-Konzentration bedingten differenzierenden Zellen wurden für die Lipidanalytik herangezogen. Basale Keratinozyten synthetisieren hauptsächlich Cer (NS) und geringe Mengen an Cer (NP). Während des Differenzierungsprozesses kommen komplexere freie sowie kovalent gebundene Ceramide dazu und das Muster wird insgesamt vielfältiger (Breiden, 2007). In der ausdifferenzierenden Keratinozytenkultur wird ein ähnliches Lipidmuster wie in der Epidermis beobachtet. Zusätzlich konnte sowohl *in vitro* (Sando, 1996) als auch *in vivo* (Chujor, 1998) gezeigt werden, dass während der epidermalen Differenzierung die Aktivität des Enzyms Glucosylceramid-Synthase gesteigert wird. Diese Zunahme ist für ein verändertes Lipidmengenmuster in den ausdifferenzierenden Zellen verantwortlich (Holleran, 2006). Die Keratinozyten wurden in 6-*well*-Platten kultiviert, bis sie konfluent waren. Die Zelllipide wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) in verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt. Auf die DC-Platte wurden jeweils die Lipide von Zellen eines konfluenten 6-*well*s (10 cm<sup>2</sup>) aufgetragen. Abbildung 5-20 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen.



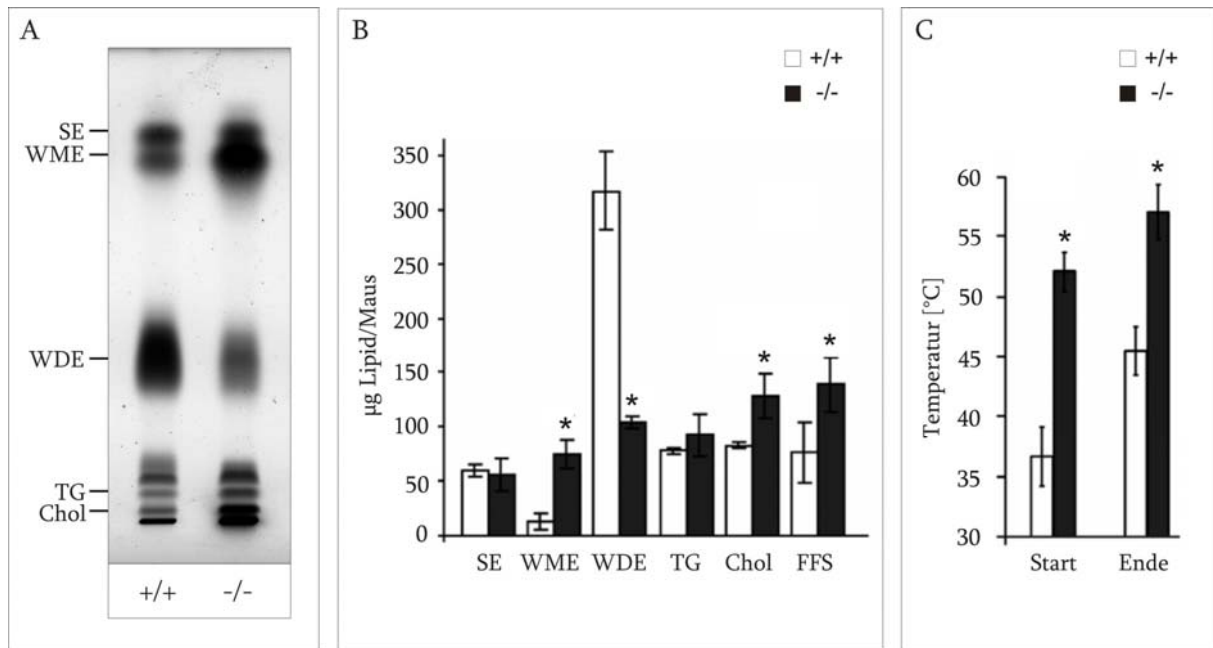


**Abb. 5-20 Dünnschichtchromatographische Lipidanalyse von primären Keratinozyten.** Für die Lipidanalytik wurden sowohl die Lipide der basalen als auch der durch eine Erhöhung der Calcium<sup>2+</sup>-Konzentration bedingten differenzierenden Zellen herangezogen. Die Lipide wurden in dem Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 sowie Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1 aufgetrennt. Wie bereits bei den epidermalen Lipiden gezeigt, waren auch auf zellulärer Ebene keine qualitativen Unterschiede zwischen WT- und FA2H-KO-Zellen bezüglich der  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide sichtbar. Die differenzierten Zellen weisen im Vergleich zu den basalen Zellen insgesamt mehr Lipid auf. Verwendete Abkürzungen der verschiedenen Ceramidspezies: N und A machen eine Aussage über die amidgebundene Fettsäure; N: nicht-hydroxylierte Fettsäure; A:  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure; S und P zeigen das Sphingoid-Grundgerüst; S: Sphingosin; P: Phytosphingosin. GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer,  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; SM, Sphingomyelin. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Die primär isolierten Keratinozyten zeigen ein ähnliches Lipidmuster wie die Epidermis. Basale Zellen weisen insgesamt weniger Lipide als die differenzierenden Zellen auf. Der Vergleich von WT- und FA2H-KO-Lipiden hat in beiden Differenzierungsstadien keinen Unterschied ergeben. Die FA2H-KO-Keratinozyten verfügen trotz des Fehlens der FA2H über  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide und Sphingolipide. Diese konnten auch mit Hilfe von ESI-MS qualitativ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### *5.1.9 Analyse der Sebumlipide*

Zusätzlich zu den Lipiden der Epidermis und der Gesamthaut wurden die Oberflächenlipide von WT- und FA2H-KO-Tieren verschiedener Altersstufen untersucht. Diese stammen hauptsächlich aus den Sebozyten der Talgdrüsen und werden deshalb als Sebum bezeichnet. Sie können mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln von der Haut und den Haaren extrahiert werden, indem die Tiere nach deren Tötung komplett in ein organisches Lösungsmittel eingetaucht werden. Das Sebum ist sehr spezie-spezifisch aufgebaut und besteht aus einem Gemisch von apolaren Lipiden, dessen Lipidkomponenten z.T. einzigartig sind und nur im Sebum vorkommen. Die wichtigsten Bestandteile stellen Squalen (nicht in Mäusen), Sterole und Sterolester (SE), Wachsmonoester (WME), Wachsdierester (WDE) vom Typ I und II (nicht im Menschen), Triglyceride (TG) und freie Fettsäuren (FFS) dar. Die Oberflächenlipide von WT- und FA2H-KO-Tieren verschiedener Altersstufen (P5, P10 und 3 Monate alt) wurden mit Aceton extrahiert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) in verschiedenen Laufmitteln analysiert. Das untersuchte Sebum enthielt nur sehr geringe Mengen an Sphingolipiden (Daten nicht gezeigt) und dafür große Mengen an sehr apolaren Lipiden, die in dem apolaren Fließmittel Hexan/Toluol 1/1 aufgetrennt werden konnten. Dabei wurden jeweils die gleichen Mengen Lipide, bezogen auf die Gesamtoberfläche der Maus, auf die DC-Platte aufgetragen. Abbildung 5-21 A zeigt ein repräsentatives Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der murinen Sebumlipide von 3 Monate alten Mäusen. Die einzelnen Lipidkomponenten wurden weiterhin mittels Densitometrie quantitativ ausgewertet und graphisch in Abbildung 5-21 B dargestellt.



**Abb. 5-21 Analyse der murinen Oberflächenlipide.** (A) Die Oberflächenlipide von 3 Monate alten WT- und FA2H-KO-Tieren wurden nach Extraktion mit Aceton dünn-schichtchromatographisch in einem apolaren Fließmittel (Hexan/Toluol 1/1) aufgetrennt. Die Menge an Wachsdiestern (WDE) war in den FA2H-KO-Tieren stark reduziert und die Menge der Wachsmoester (WME) erhöht. Der Gehalt an Cholesterin (Chol) war nur leicht erhöht und die Triglyceride (TG) sowie Sterolester (SE) waren unverändert. (B) Eine densitometrische Analyse der Sebumlipide zeigte in den FA2H-KO-Tieren eine signifikante Erhöhung an WME und eine Reduktion der WDE-Menge um ca. 70-75 %. Der Gehalt an Cholesterin und freien Fettsäuren war ebenfalls signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ; t-Test). Die quantitative Auswertung stellt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von jeweils vier untersuchten Tieren dar ( $n=4$ ). Verwendete Abkürzungen: SE, Sterolester; WME, Wachsmoester; WDE, Wachsdier; TG, Triglyceride; Chol, Cholesterin; FFS, freie Fettsäuren. (C) Bei der Schmelzpunktanalyse des Sebums von WT- und FA2H-KO-Tieren wurden zwei Temperaturen vermessen. Die erste wurde bestimmt, wenn das Sebum gerade anfang zu schmelzen (Start) und die zweite, wenn das ganze Gemisch komplett flüssig war (Ende). Beide Temperaturen waren in den FA2H-KO-Tieren signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ; t-Test). Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n=3-4$ ). (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Murines Sebum enthält im Vergleich zu humanem Sebum kein Squalen. Stattdessen stellen die Wachsdier (WDE) eine Sebumkomponente dar, die in Mäusen einen sehr großen Anteil ausmacht und generell nur in Säugetieren mit einem Fell vorkommt. Typ I-WDE entstehen aus einer  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure, deren Carboxylgruppe mit einem Fettalkohol verestert ist und die Hydroxylgruppe mit einer weiteren Fettsäure kondensiert. Typ II-WDE entstehen dagegen durch die Kondensation von einem Alkan-1,2-Diol mit zwei Fettsäure-Acylresten. Auf der DC-Platte migrieren die beiden WDE-Typen gleich schnell und können bei dieser Untersuchungsmethode nicht voneinander unterschieden werden. Wachsmoester (WME) bestehen aus einem

aliphatischen, langkettigen, gesättigten oder einfach ungesättigten Monoalkohol, der mit einer Fettsäure verestert ist. Die dünnschichtchromatographische Analyse der Oberflächenlipide von 3 Monate alten WT- und FA2H-KO-Mäusen ergab deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 5-21 A). Eine quantitative Auswertung der einzelnen Komponenten hat ergeben, dass die Gesamtmenge an WDE in den FA2H-KO-Tieren signifikant erniedrigt war (um ca. 70-75 %) und die Menge an WME war im Vergleich zu den Kontrolltieren um den Faktor 3-4 signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ; t-Test). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die jüngeren Altersstufen P5 und P10 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Menge der Sterolester und Triglyceride war nicht verändert. Es waren allerdings geringe, aber signifikante Unterschiede beim Gehalt von Cholesterol und der freien Fettsäuren erkennbar, die im Sebum der FA2H-KO-Tiere erhöht waren (Abb. 5-21 B).

Die in den FA2H-KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Mäusen beobachtete unterschiedliche Zusammensetzung des Sebums sollte im Folgenden auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht werden. Dafür wurde der Schmelzpunkt des Sebums von 3 Monate alten Tieren bestimmt. Die Oberflächenlipide von jeweils 3-4 Tieren pro Genotyp wurden extrahiert und in Schmelzpunktröhrchen überführt. Da es sich beim Sebum um ein Gemisch verschiedener apolarer Komponenten handelt, konnte mit einem Schmelzpunktmeßgerät kein einzelner Schmelzpunkt bestimmt werden, da die verschiedenen Substanzen bei unterschiedlichen Temperaturen schmelzen. Stattdessen wurde erstens die Temperatur abgelesen, bei dem das Gemisch anfang zu schmelzen (Start) und zweitens die Temperatur bei dem das ganze Gemisch komplett flüssig war (Ende). Abbildung 5-21 C stellt den Schmelzbereich des Sebums von WT- und FA2H-KO-Tieren graphisch dar. Beim Sebum aus WT-Mäusen begann der Schmelzprozess bei 37°C, während dieser beim Sebum aus den FA2H-KO-Tieren erst bei über 50°C beobachtet werden konnte. Auch die zweite gemessene Temperatur war in den FA2H-KO-Tieren statistisch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ; t-Test). Diese Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass das Sebum der FA2H-KO-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren solider und wachsartiger aufgebaut ist. Dieser Unterschied in der

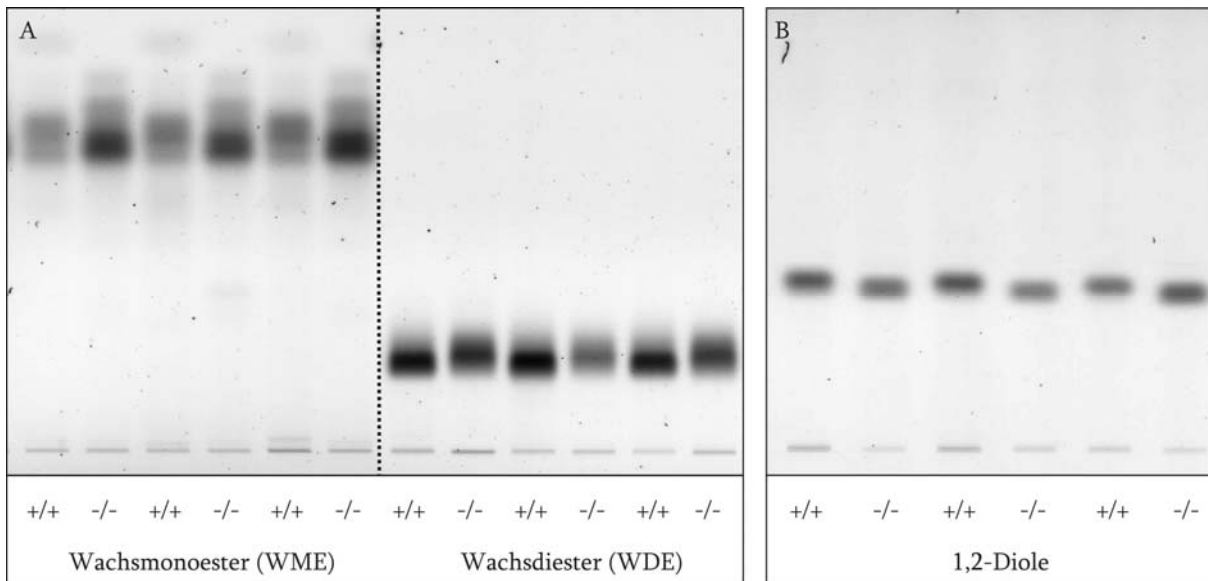
Zusammensetzung erlaubt keinen geschmeidigen, fließenden Transport oder Durchfluss durch den Haarkanal an die Hautoberfläche. Diese Tatsache stimmt mit den histologischen Analysen der Haut von FA2H-KO-Tieren überein, bei denen Sebumpfropfen in den weit offenen Haarkanälen und an der Hautoberfläche erkennbar waren. Diese Verstopfungen sind wahrscheinlich sowohl der Grund für das verzögerte Herauswachsen der Haare während der Morphogenese und in einer nach Depilation induzierten anagenen Phase als auch für die zyklisch auftretende Alopezie in den FA2H-KO-Tieren.

Der gesamte Sebumextrakt von 5 Tage sowie 3 Monate alten Tieren wurde in den folgenden Experimenten mit Hilfe einer Festphasenextraktion über Aminopropyl-Säulchen in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt, die daraufhin einzeln untersucht wurden (Abb. 5-22 A). Von besonderem Interesse waren dabei die Typ II-Wachsdierester, die durch die Kondensation von einem Alkan-1,2-Diol mit zwei Fettsäure-Acylresten entstehen. Die isolierten Wachsdierester (WDE) wurden einer alkalischen Methanolyse unterzogen, um die Esterbindungen zu verseifen und die WDE in ihre einzelnen Bestandteile (1,2-Diole und Fettsäuremethylester) zu spalten. Nach der alkalischen Hydrolyse wurde das Gemisch ebenfalls mit Hilfe einer Festphasenextraktion über Aminopropyl-Säulchen in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie in unterschiedlichen Fließmitteln untersucht. Die Fettsäuremethylester (FAME's) konnten in dem Laufmittel Hexan/Diethylether/Essigsäure 85/25/1 aufgetrennt werden. Dabei waren keine Unterschiede zwischen WT- und FA2H-KO-Mäusen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die FAME's wurden weiterhin mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Um die vorhandenen FAME's für die GC-Analyse flüchtiger zu machen, wurden diese mit MSTFA (N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid) bei 80°C inkubiert, um die Hydroxylgruppen zu silylieren. Die auf diesem Weg entstandenen Derivate wurden daraufhin in eine GC-MS-Anlage injiziert und ihrer Größe und Flüchtigkeit nach aufgetrennt. Die erhaltenen Massenspektren wurden mit einer Datenbank abgeglichen, sodass ein qualitatives und semiquantitatives Muster derjenigen

Fettsäuren (FS) vorlag, die Bestandteile der WDE waren. WT- und FA2H-KO-Tiere konnten auf diese Weise miteinander verglichen werden. Die gefundenen Fettsäuren wiesen in beiden Genotypen Kettenlängen von C14-C24 auf, wobei C16- und C18-FS den größten Teil ausmachten. Neben den Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen konnten in beiden Genotypen ebenfalls geringe Mengen an Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl (C19, C21, C23) detektiert werden. Die Fettsäuren waren zum Teil einfach ungesättigt und auch verzweigte Formen waren nachweisbar. Das Vorkommen verzweigter FS-Ketten sowie von Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen als Bestandteile von Sebumlipiden wurde in der Literatur als einzigartiges Charakteristikum des Sebums beschrieben (Smith, 2008). In keiner Messung konnten  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren beobachtet werden (GC-MS-Daten aufgrund von Datenexportproblemen nicht gezeigt). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bezüglich der FAME's-Analyse keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gefunden wurden.

Die Alkan-1,2-Diole konnten als zweite Komponente der WDE nach der alkalischen Methanolyse mittels DC in einem Fließmittel-Gemisch von Chloroform/Methanol 20/1 dargestellt werden. Da die WT-Tiere im Vergleich zu den FA2H-KO-Tieren über mehr WDE verfügen (Abb. 5-22 A), konnte bei diesen nach der alkalischen Methanolyse auch eine größere Menge an 1,2-Diolen beobachtet werden, da für die Methanolyse bei beiden Genotypen die gleiche Gesamt-Lipidmenge bezogen auf die Oberfläche der Maus eingesetzt worden war. Abbildung 5-22 B zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der 1,2-Diole von 5 Tage alten WT- und FA2H-KO-Tieren. Die 1,2-Diole der FA2H-KO-Mäuse migrierten auf der DC-Platte langsamer als die der Kontrolltiere, hatten also einen kleineren Rf-Wert. Dieser Unterschied ließ die Vermutung zu, dass die FA2H-KO-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren über WDE mit kürzeren 1,2-Diolen verfügten. Dass es sich bei den Lipiden um Diole handelt, wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen. Dafür wurden die isolierten Diole von 5 Tage alten WT-Tieren in zwei gleiche Fraktionen aufgeteilt und eingedampft. Die erste Fraktion wurde in einem Gemisch von Chloroform/Methanol 1/1 aufgenommen. Die zweite

Fraktion wurde mit deuteriertem Chloroform/Methnaol 1/1 versetzt und im Ultraschallbad für 5-10 min inkubiert. Dabei wurden die zwei OH-Gruppen des Diols in zwei OD-Gruppen umgewandelt, was mit einer Massenzunahme von 2 einherging. Beide Fraktionen wurden massenspektrometrisch vermessen. In der ersten Fraktion konnten Diole mit 14-24 C-Atomen detektiert werden. Auch in der zweiten Fraktion waren diese zu finden, jedoch war die Masse jeweils um 2 erhöht (Daten aufgrund von Software-Problemen nicht gezeigt). Die Vermutung, dass die 1,2-Diole der WT- und FA2H-KO-Tiere Unterschiede in der Länge aufweisen, die den unterschiedlichen Rf-Wert auf der DC-Platte erklären würde, konnte mit Hilfe von ESI-MS nicht gezeigt werden. In beiden Genotypen konnten 1,2-Diole mit Kettenlängen von 14-26 C-Atomen beobachtet werden. Bei der Vermessung der Proben wurden allerdings neben den zu den 1,2-Diolen zugeordneten Massen-Peaks viele, sehr intensive unbekannte Peaks (vermutlich bei der Probenaufbereitung verschleppte Polymere) detektiert, die eine quantitative Auswertung der 1,2-Diole nicht erlaubte. Die Tatsache, dass sowohl in den WT- als auch in den FA2H-KO-Tieren 1,2-Diole mit den gleichen Kettenlängen gefunden wurden, ließ den Schluss zu, dass die Tiere beider Genotypen qualitativ gesehen über die gleichen 1,2-Diole verfügten, jedoch die quantitativen Mengen an den verschiedenen Kettenlängen unterschiedlich waren. Die FA2H-KO-Mäuse würden im Vergleich zu den WT-Tieren dementsprechend vermutlich über eine größere Menge an kürzerkettigen 1,2-Diolen verfügen und die Menge an längeren Kettenlängen wäre wahrscheinlich reduziert. Dieser quantitative Unterschied hätte vermutlich den geringeren Rf-Wert auf der DC-Platte zur Folge.



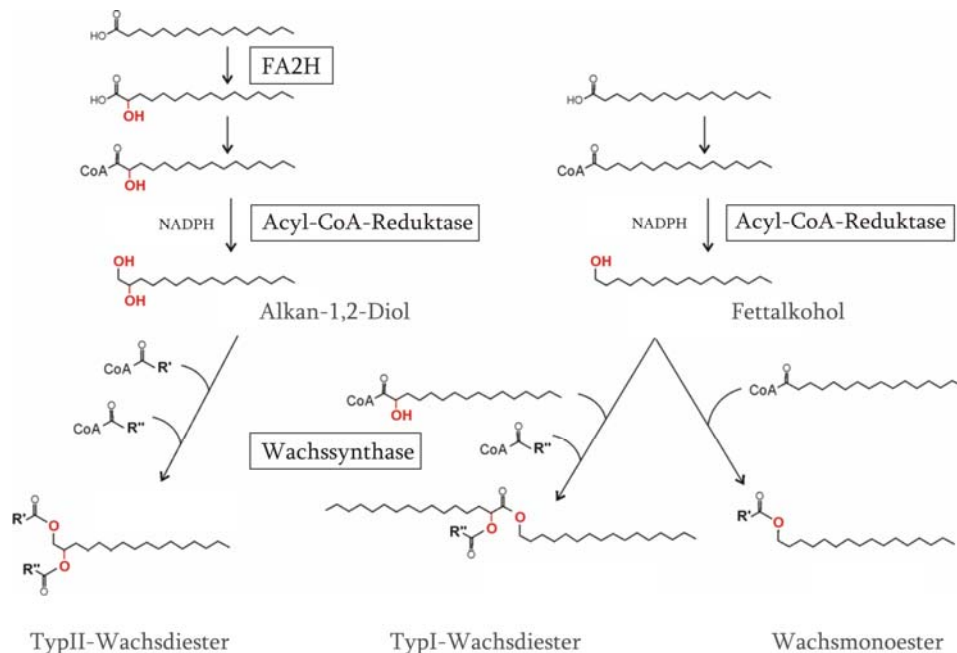
**Abb. 5-22 Dünnschichtchromatographische Analyse der einzelnen Sebumkomponenten.** (A) Das gesamte Sebum von P5 jungen WT- und FA2H-KO-Tieren wurde mittels Festphasenextraktion über Aminopropyl-Säulchen in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden dünn-schichtchromatographisch (Hexan/Toluol 1/1) analysiert, um die Trennung zu gewährleisten. Links sind die weniger polaren Wachsmoester (WME) zu sehen, die zusammen mit Sterolestern eluiert wurden. Daneben ist die reine Wachsdierster-Fraktion dargestellt. Die FA2H-KO-Mäuse weisen vermehrt WME auf und die Menge an WDE ist signifikant reduziert. (B) Aus der WDE-Fraktion konnten nach einer alkalischen Methanolyse die Alkan-1,2-Diole freigesetzt werden. Diese zeigten in der Dünnschichtchromatographie (Chloroform/Methanol 20/1) einen Unterschied im Laufverhalten. Die 1,2-Diole der FA2H-KO-Tiere wanderten langsamer als die der Kontrolltiere, hatten also einen kleineren Rf-Wert. Dieser Unterschied lässt die Vermutung zu, dass die FA2H-KO-Tiere im Vergleich zu den WT-Mäusen über WDE mit kürzeren 1,2-Diolen verfügen. Interessant ist allerdings die Beobachtung, dass die WDE der FA2H-KO-Tiere einen leicht höheren Rf-Wert haben (siehe Abb. 5-21 A) als die der WT-Tiere. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

### 5.1.10 WDE-Synthese *in vitro*

Das Enzym FA2H wird in der murinen Haut ausschließlich in den Talgdrüsen exprimiert. Die FA2H-KO-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren in allen untersuchten Altersstufen (P5, P10 und 3 Monate alt) eine abnormale Zusammensetzung des Sebums (siehe 5.1.9). Die signifikante Reduktion der WDE-Menge in den FA2H-KO-Tieren legte die Vermutung nahe, dass die FA2H mit der Synthese der WDE in Zusammenhang steht. Die Typ II-Wachsdierster entstehen durch Kondensation eines Alkan-1,2-Diols mit zwei Fettsäure-Acylresten. Es ist wahrscheinlich, dass die FA2H bei der Bildung der 1,2-Diole eine entscheidende Rolle spielt, da auch hier Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet wurden (siehe 5.1.9). Abbildung 5-23 gibt einen schematischen



Überblick über die Synthese der WDE sowie WME und die vermutete Funktion der FA2H bei der Entstehung der Alkan-1,2-Diole.



**Abb. 5-23 Biosyntheseweg der Wachsdiester (WDE) und Wachsmoester (WME).** Typ II-Wachsdiester entstehen durch Kondensation von einem Alkan-1,2-Diol mit zwei Fettsäure-Acylresten. Die FA2H spielt vermutlich im ersten Syntheseschritt bei der Entstehung der 1,2-Diole eine entscheidende Rolle. Die Fettsäuren werden mit Hilfe der FA2H zuerst α-hydroxyliert und unter Einwirkung einer Fettsäure-Reduktase zu einem 1,2-Diol reduziert. Die Verknüpfung mit zwei Fettsäure-Acylresten durch eine Wachssynthase schließt die Typ II-WDE-Synthese ab. Typ I-WDE und WME entstehen aus einem Fettalkohol mit nur einer Hydroxylgruppe, die ebenfalls mit Hilfe einer Fettsäure-Reduktase gebildet wird. Die FA2H scheint bei der Synthese dieser zwei Produkte nicht relevant zu sein.

Am Beispiel der Palmitinsäure (C16) soll die WDE-Synthese und die vermutete Rolle der FA2H bei dieser Synthese erläutert werden. Die FA2H katalysiert im ersten Schritt die Hydroxylierungs-Reaktion am α-C-Atom der C16-Fettsäure. Nach Aktivierung der α-hydroxylierten Fettsäure wird deren Carboxylgruppe mit Hilfe einer Acyl-CoA-Reduktase in Abhängigkeit von NADPH zu einer Hydroxylgruppe reduziert. Damit entsteht aus der α-hydroxylierten Fettsäure 1,2-Hexadecandiol. An die zwei Hydroxylgruppen werden mit Hilfe einer Wachssynthase zwei Fettsäure-Acylreste geknüpft, was die WDE-Synthese damit abschließt. Sowohl für die Synthese der Typ I-WDE als auch für die der Wachsmoester (WME) wird ein Fettalkohol mit nur einer Hydroxylgruppe benötigt, der mit Hilfe einer Acyl-CoA-Reduktase ebenfalls in

Abhängigkeit von NADPH aus einer Fettsäure entstehen kann. Die FA2H scheint an der Synthese dieser zwei Produkte nicht beteiligt zu sein.

Die WDE-Synthese sollte in den folgenden Experimenten *in vitro* nachgestellt werden, um die mögliche Bedeutung der FA2H bei der Entstehung der WDE zu bestätigen. Für diese Versuche wurden die in der Tabelle 5-2 aufgelisteten Plasmide genutzt, die transient in unterschiedliche Zellen einzeln oder co-transfiziert wurden. Nach der Transfektion wurden die Lipide der Zellen auf das Vorkommen von WDE analysiert. Einige zur Transfektion verwendeten Plasmide wurden von externen Arbeitsgruppen (Russell, Dallas USA) zur Verfügung gestellt und zum Teil nur in andere Vektoren umkloniert. Weitere Plasmide wiederum wurden gekauft oder im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Im Folgenden werden die verwendeten Plasmide tabellarisch dargestellt (Tab. 5-2).

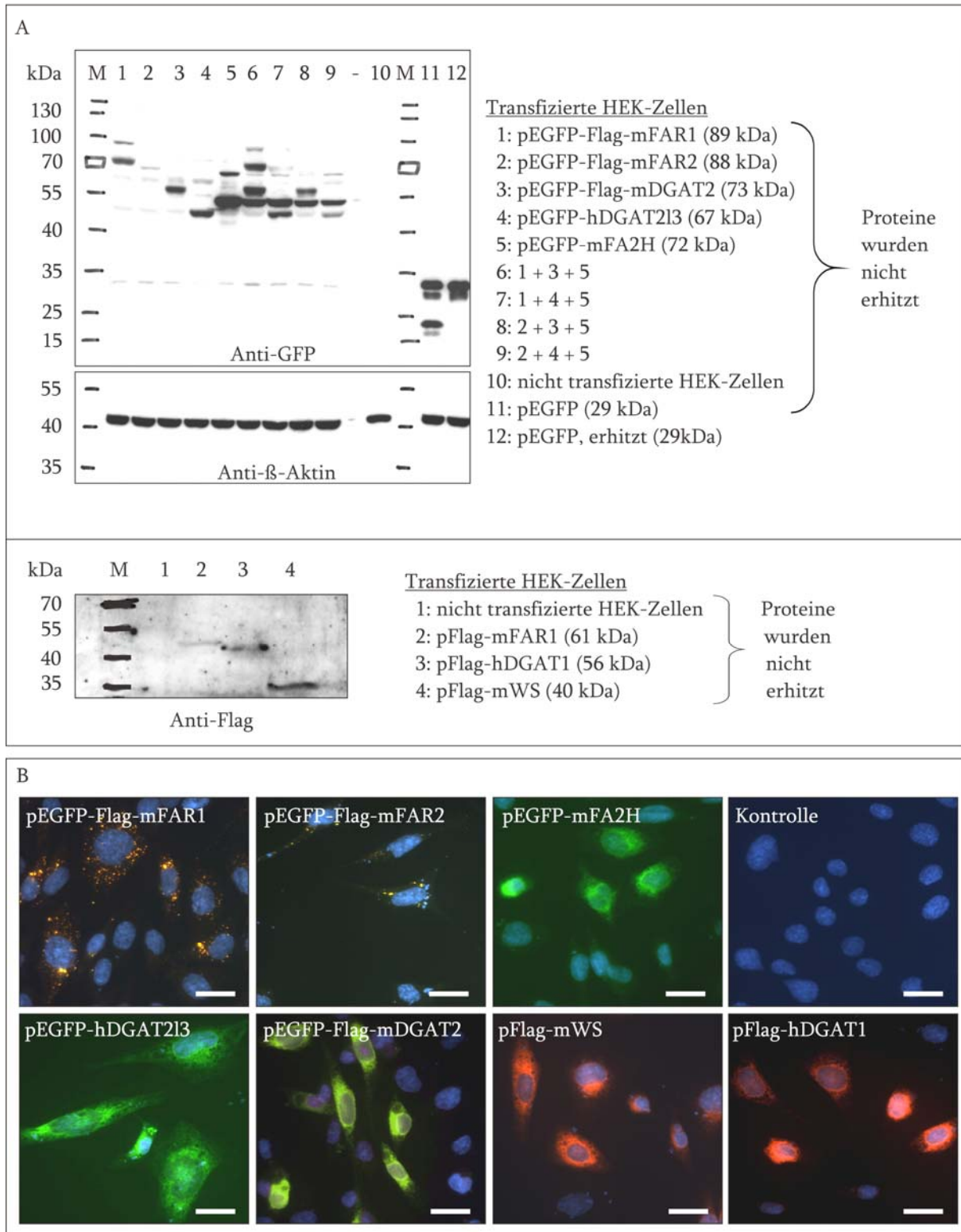
Die Plasmide wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen jeweils in drei unterschiedliche Zelllinien transfiziert: CHO-K1-Zellen, HEK-Zellen und HaCaT-Zellen. Die ersten beiden Zelllinien wurden hauptsächlich wegen ihrer einfachen Kulturbedingungen und der hohen Transfektionseffizienz ausgewählt. HaCaT-Zellen wurden zusätzlich als dritte Zelllinie untersucht, weil sie den Sebozyten vom Ursprung her am ähnlichsten sind und für eine *in vitro* WDE-Synthese vermutlich am besten geeignet wären, da eventuell noch andere Faktoren ausser den transfizierten Plasmiden für die WDE-Synthese notwendig sein könnten, die die HaCaT-Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien haben könnten. Die immortalisierte, humane Sebozyten-Zelllinie SZ95 (Zouboulis, 1999) wurde anfangs ebenfalls für diese Experimente verwendet, konnte aber aufgrund ihrer sehr geringen Transfektionseffizienz in den folgenden Versuchen nicht mehr eingesetzt werden.

Für die <i>in vitro</i> WDE-Synthese verwendeten Plasmide			
Kontrollvektor	FA2H-Aktivität	Reduktase-Aktivität ( <i>fatty acid reductase</i> , FAR)	Wachssynthese-Aktivität (Diacylglycerol-Acyltransferase, DGAT)
pEGFP (29 kDa)	pEGFP-mFA2H (72 kDa)	pEGFP-Flag-mFAR1 (89 kDa)	pEGFP-Flag-mDGAT2 (73 kDa)
		pEGFP-Flag-mFAR2 (88 kDa)	pEGFP-hDGAT2l3 (67 kDa)
			pCMV-Script-Flag-hDGAT1 (56 kDa)
			pCMV6-Flag-mWS (Wachssynthese, WS) (40 kDa)
		Beide Enzyme haben Fettsäure-AcylCoA-Ester als Substrate und benötigen NADPH als Co-Faktor. Sie werden in den Peroxisomen exprimiert und sind bei der Wachssynthese für die Umwandlung von Fettsäuren zu Fettalkoholen bekannt (Cheng, 2004).	Die DGAT-Enzyme 1 und 2 sind hauptsächlich für die Acylierung des Diacylglycerols bei der Biosynthese von Triglyceriden bekannt. Allerdings wurde in der Literatur auch gezeigt, dass deren Aktivität ebenfalls bei der Synthese von Wachsmoestern und Wachsdiestern von Bedeutung ist (Yen, 2005). Neben den DGAT-Enzymen spielt auch die Wachssynthese bei der Synthese von Wachsen eine Rolle (Cheng, 2004).

**Tab. 5-2 Für die *in vitro* WDE-Synthese verwendeten Plasmide.** Für die WDE-Synthese sind vermutlich drei verschiedene Enzyme von Bedeutung. Die FA2H katalysiert dabei im ersten Schritt die Hydroxylierungs-Reaktion am  $\alpha$ -C-Atom einer Fettsäure. Nach Aktivierung der  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure wird deren Carboxylgruppe mit Hilfe einer Acyl-CoA-Reduktase in Abhängigkeit von NADPH zu einer Hydroxylgruppe reduziert. An die zwei Hydroxylgruppen des 1,2-Diols werden mit Hilfe einer Wachssynthese zwei Fettsäure-Acylreste geknüpft, was die WDE-Synthese damit abschließt. Die hier tabellarisch aufgelisteten Plasmide wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen in unterschiedliche Zelllinien transient transfiziert. Die extrahierten Zelllipide wurden auf das Vorkommen von WDE untersucht. (WDE: Wachsdierster)

Nach der Transfektion der Zellen wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem Anti-GFP- und Anti-Flag-Antikörper untersucht, ob die gewünschten Enzyme exprimiert werden. Mit einer Immunfluoreszenz-Analyse wurde die zelluläre Lokalisation des jeweiligen Proteins untersucht. Abbildung 5-24 zeigt die Western Blot-Analyse von

transfizierten HEK-Zellen (A) und die Immunfluoreszenz-Färbung an transfizierten CHO-K1-Zellen (B).



**Abb. 5-24** Transiente Transfektion der WDE-Plasmide. (A) Anti-GFP- und Anti-Flag-Western Blot von HEK-Zellen, die einzeln oder in Kombination mit den verschiedenen EGFP- und Flag-Plasmiden transfiziert wurden. Um die exprimierten Fusionsproteine im Western Blot detektieren zu können, durfte

das Proteingemisch nicht erhitzt werden, da es sonst zu einem Signalverlust kam. Vermutlich führte das Erhitzen bei 95°C zu einer Aggregation der hydrophoben Proteine, die eine normale Auftrennung im SDS-Gel und die Detektion mit den Antikörpern nicht mehr ermöglichte. Die nicht erhitzten Proteine wiesen dagegen Signale auf, hatten aber ein anderes Laufverhalten als erwartet gezeigt. Die Proteine migrierten im SDS-Gel weiter als erwartet, sodass die detektierten Proteinbanden ungefähr 20 kDa niedriger als die berechneten Größenwerte zu sehen waren. Sowohl die einzeln als auch in Kombination transfizierten Plasmide führten zur Expression der jeweils codierten Proteine. Die nicht transfizierten Zellen sowie die Kontroll-Transfektion mit dem Kontrollvektor pEGFG wiesen keine Signale in diesem Bereich auf. **(B)** Mit den WDE-Plasmiden transfizierte CHO-K1-Zellen wurden bei einer Immunfluoreszenz-Analyse teilweise mit einem Anti-Flag-Antikörper inkubiert, um eine Co-Lokalisation (gelb) zwischen dem EGFP-Signal (grün) und dem Flag-Signal (rot) zu erkennen. Die Transfektion mit den Plasmiden pFlag-mWS und pFlag-hDGAT1 konnte nur mit dem Anti-Flag-Antikörper dargestellt werden (rot). Zur Kontrolle wurden CHO-K1-Zellen nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert, um unspezifische Signale auszuschließen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die beiden Fettsäure-Reduktasen zeigten eine peroxisomale Lokalisation. Die anderen fünf Proteine waren im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Maßstabsbalken = 20 µm.

Die HEK-Zellen wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen mit den Plasmiden für die WDE-Synthese transfiziert. Vor der Gelelektrophorese wurden 20 µg des Gesamtproteins mit Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Western Blot-Analyse mit einem Anti-GFP-Antikörper hat bei dieser Vorgehensweise bis auf die mit pEGFP-mFA2H und den Kontrollvektor (pEGFP) transfizierten Zellen keine Signale gezeigt. Auch mit einem Anti-Flag-Antikörper konnten nach Erhitzen der Proteine keine Signale nachgewiesen werden. Deshalb wurden die Proben in einem neuen Ansatz 30 min mit Lämmli-Puffer bei RT inkubiert und dann ohne zu erhitzen auf ein 10 % SDS-Gel geladen. Diese Western Blot-Analysen haben in jeder Probe Signale gezeigt (Abb. 5-24 A). Zu beachten ist allerdings, dass die nicht erhitzten Proteinsignale hauptsächlich ca. 20 kDa unterhalb des berechneten und erwarteten Größenwerts mit den Antikörpern detektiert werden konnten. Bei der Transfektion des Plamids pEGFP-Flag-mFAR1 (Spur 1) und pEGFP-mFA2H (Spur 5) waren jeweils zwei Banden pro Spur zu erkennen. Eine etwas schwächere bei der erwarteten kDa-Größe (89 bzw. 72 kDa) und eine recht starke bei ungefähr 70 bzw. 55 kDa. Um zu zeigen, dass die Inkubation bei RT im Vergleich zum Erhitzen bei 95°C Einfluss auf das Laufverhalten hat, wurde die Proteinprobe der Zellen, die mit dem Kontrollvektor pEGFP transfiziert waren, einmal nicht erhitzt (Spur 11) und in einem zweiten Ansatz zur Kontrolle bei 95°C erhitzt (Spur 12). Beide Proteinproben wurden im gleichen SDS-Gel aufgetrennt, zeigten aber ein

unterschiedliches Laufverhalten. Das nicht erhitzte Proteingemisch (Spur 11) wies sowohl ein Signal bei der berechneten Größe (29 kDa) als auch ein zweites Signal bei ca. 20 kDa auf. Die erhitzte Probe hatte nur bei der erwarteten kDa-Größe von 29 kDa ein Signal. Das unterschiedliche Laufverhalten dieser beiden Proben erlaubte die Annahme, dass die bei einem kleineren kDa-Wert detektierten Signale in den anderen Spuren dennoch für die richtige Expression der jeweiligen Proteine sprachen. Neben den Spuren der einzeln transfizierten Plasmide (Spuren 1-5) zeigten auch die transfizierten Plasmid-Kombinationen (Spuren 6-9) alle erwarteten Signale, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass alle Proteine, die zur WDE-Synthese benötigt werden, tatsächlich exprimiert wurden. Die Negativkontrolle (Spur 10) zeigt nicht transfizierte HEK-Zellen, die erwartungsgemäß über keine Signale verfügen.

Die Expression der Flag-Plasmide pFlag-mFAR1 (welches zusätzlich zum pEGFP-Flag-mFAR1 analysiert wurde), pFlag-hDGAT1 und pFlag-mWS konnte ebenfalls mittels Western Blot-Analyse mit einem Anti-Flag-Antikörper nachgewiesen werden. Auch hier wurden die Proteine ca. 20 kDa unterhalb des berechneten und erwarteten Größenwerts mit dem Anti-Flag-Antikörper detektiert (Abb. 5-24 A).

Zusätzlich zur Western Blot-Analyse wurden die Expression und die Lokalisation der exprimierten Fusionsproteine mittels Immunfluoreszenz-Färbungen an transfizierten CHO-K1-Zellen untersucht. Dafür wurden die Plasmide ebenfalls einzeln und in Kombinationen in die Zellen transfiziert. Nach der Transfektion mit den pEGFP-Flag-Konstrukten wurden die Zellen zum Teil mit einem Anti-Flag-Antikörper inkubiert, sodass eine Co-Lokalisation (gelb) zwischen dem EGFP-Signal (grün) und dem Anti-Flag-Signal (rot) beobachtet werden konnte. Abbildung 5-24 B zeigt repräsentative Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analyse an transfizierten CHO-K1-Zellen. Die mit den beiden Fettsäure-Reduktase-Plasmiden pEGFP-Flag-mFAR1 und pEGFP-Flag-mFAR2 transfizierten Zellen zeigten eine punktuelle, über die ganze Zelle verteilte Färbung, wie sie in der Literatur für Peroxisomen beschrieben wird. Die Transfektionseffizienz bei den Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP-Flag-mFAR2 transfiziert wurden, war allerdings viel geringer als bei den mit pEGFP-Flag-mFAR1 transfizierten Zellen. Die geringere

Expression des Fusionproteins EGFP-Flag-mFAR2 war auch im Western Blot mit dem Anti-GFP-Antikörper zu sehen (Abb. 5-24 A, Spur 2). Bei der Transfektion der Plasmide pEGFP-Flag-mDGAT2, pEGFP-Flag-hDGAT2l3 und pEGFP-mFA2H wurde nur die durch die Transfektion bedingte GFP-Fluoreszenz (grün) dargestellt. Die Expression der Fusionsproteine Flag-mWS und Flag-hDGAT1 wurde mit dem Anti-Flag-Antikörper nachgewiesen (rot). Die FA2H ist im ER lokalisiert (Eckhardt, 2005) und auch die Immunfluoreszenz-Färbungen der vier Enzyme mit einer Wachssynthese-Aktivität wiesen vermutlich eine ER-Lokalisation auf, was auch in der Literatur für diese Enzyme beschrieben ist (Yen, 2005).

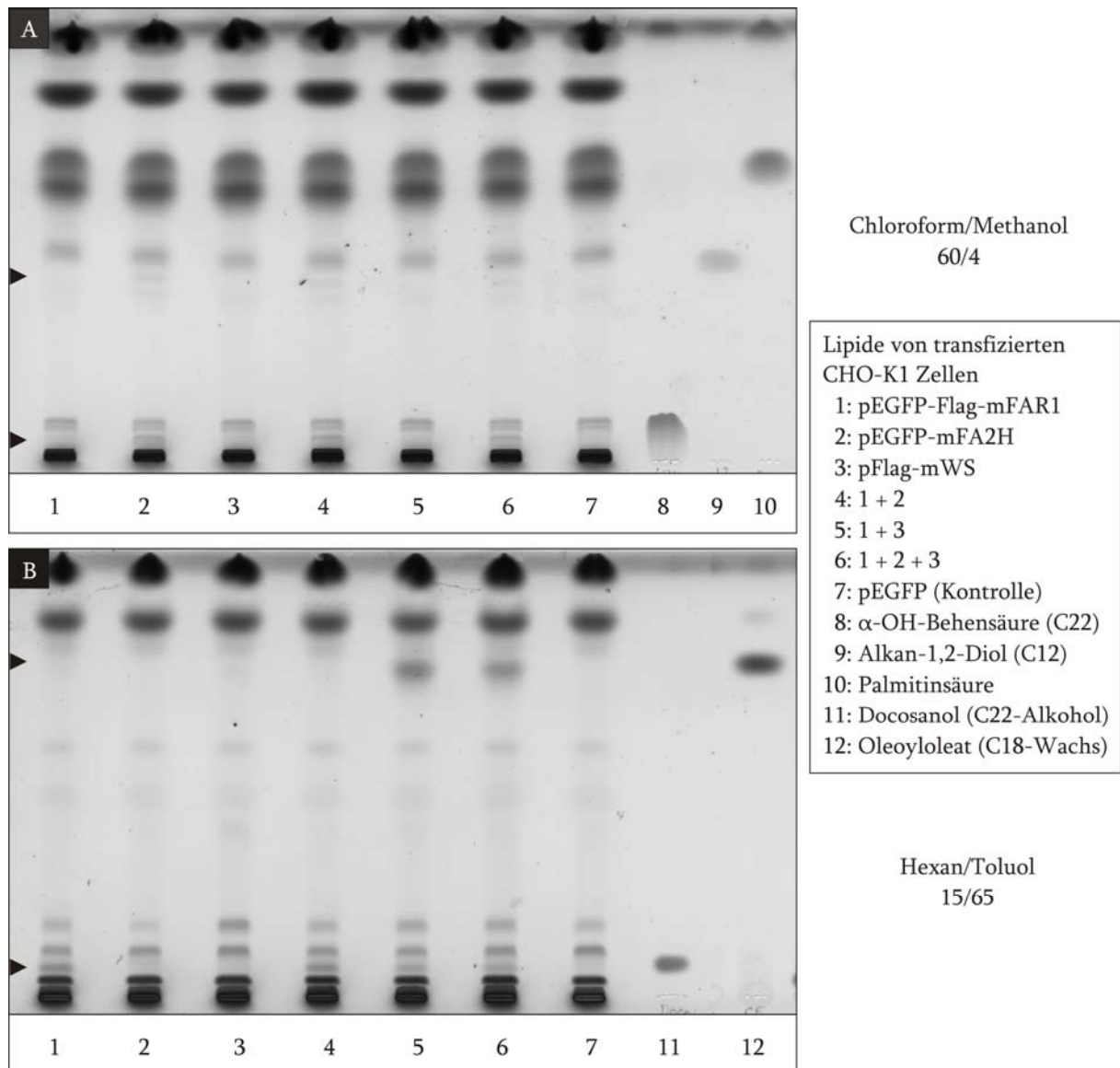
Nachdem die Expression der Enzyme gewährleistet war, wurden die Plasmide erneut einzeln und in verschiedenen Kombinationen in CHO-K1-, HEK- sowie HaCaT-Zellen transfiziert. Die Lipide der transfizierten Zellen wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) in verschiedenen Fließmitteln auf das Vorkommen von Fettalkoholen, 1,2-Diolen sowie Wachsmoestern und Wachsdiestern analysiert. Nach der Transfektion der Plasmide für die beiden Fettsäure-Reduktasen konnte zwar deren Expression mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz-Analyse gezeigt werden (Abb. 5-24 A), doch nur nach Transfektion mit pEGFP-Flag-mFAR1 konnten bei der Lipidanalyse auch vermehrt Fettalkohole nachgewiesen werden (Abb. 5-25 A). Bei der Transfektion mit pEGFP-Flag-mFAR2 war dagegen keine zusätzliche Fettalkohol-Bande sichtbar, obwohl für beide Proteine deren Funktionalität gezeigt worden ist (Cheng, 2004). Möglicherweise war die deutlich geringere Expression des Fusions-Proteins EGFP-Flag-mFAR2 im Vergleich zu EGFP-Flag-mFAR1 dafür verantwortlich, dass keine zusätzlichen Fettalkohole nachgewiesen werden konnten.

Nach der Co-Transfektion von pEGFP-mFA2H zusammen mit pEGFP-Flag-mFAR1 sowie jeweils einem Wachssynthese-Plasmid (pEGFP-Flag-mDGAT2, pEGFP-hDGAT2l3 oder pFlag-hDGAT1) waren bei der dünnschichtchromatographischen Analyse der Zelllipide keine zusätzlichen Lipidbanden sichtbar, die Wachsmoestern oder Wachsdiestern hätten zugeordnet werden können (Daten nicht gezeigt). In der Literatur wurde für das

Protein DGAT1 allerdings beschrieben, dass es neben der Synthese von Triglyceriden auch für die Synthese von Diacyl-Glycerol, Wachsen und Retinyl-Estern verantwortlich ist (Yen, 2005). Deshalb war im Rahmen dieser Arbeit ein ähnliches Ergebnis für dieses Enzym erwartet worden. Dass auch die Proteine mDGAT2 und hDGAT2l3 zur Synthese von Wachsen befähigt sein können, wurde nur vermutet und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Jedoch führte keines der drei oben erwähnten Proteine nach Co-Transfektion mit pEGFP-mFA2H und pEGFP-Flag-mFAR1 zur Synthese von Wachsen. Entweder war die Expression der Proteine zu gering oder die Fusions-Proteine waren aus bisher unbekanntem Gründen nicht funktionell. Bei den beiden Proteinen mDGAT2 und hDGAT2l3 ist weiterhin nicht klar, ob diese Enzyme überhaupt an der Synthese von Wachsen beteiligt sind.

Nach der Co-Transfektion von den Plasmiden pEGFP-mFA2H, pEGFP-Flag-mFAR1 und pFlag-mWS konnten allerdings bei der Lipidanalyse zusätzliche Lipidbanden nachgewiesen werden. Abbildung 5-25 gibt einen repräsentativen Überblick über die dünnschichtchromatographische Analyse der Lipide von transfizierten CHO-K1-Zellen, die mit den drei oben genannten Plasmiden einzeln oder in Kombination transfiziert worden waren.





**Abb. 5-25 Dünnschichtchromatographische Lipidanalyse transient transfizierter CHO-K1-Zellen.** (A) Im Fließmittel Chloroform/Methanol 60/4 konnten in den Spuren 2, 4 und 6 zusätzliche Banden im Vergleich zur Kontrollspur 7 beobachtet werden (siehe Pfeilköpfe). Diese Banden kamen aufgrund des transfizierten Plasmids pEGFP-mFA2H und der Expression des funktionellen Fusionsproteins GFP-mFA2H zustande. Sie entsprachen im Vergleich zu den parallel aufgetragenen Lipidstandards vermutlich  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren und Alkan-1,2-Diolen. (B) Auftrennung der Lipide von transfizierten Zellen im Laufmittel Hexan/Toluol 15/65. Die Expression des Fusionsproteins EGFP-Flag-mFAR1 in den Spuren 1, 4, 5 und 6 führte zu einer vermehrten Bildung von Fettalkoholen, was an der zusätzlichen Bande sichtbar wurde, die auf der Höhe des Lipidstandards Docosanol lief (siehe unterer Pfeilkopf). Wurde zusätzlich zum Protein EGFP-Flag-mFAR1 noch das Enzym Flag-mWS exprimiert (Spur 5 und 6), wurde eine Bande auf der Höhe des Lipidstandards C18-Wachs sichtbar (siehe oberer Pfeilkopf). Die Expression der mFAR1 gemeinsam mit der mWS führte folglich zur Synthese von Wachsmonoestern. Die zusätzliche Expression der mFA2H hatte allerdings keinen zusätzlichen Einfluss und zeigte keine weiteren Lipide. Trotz der Expression aller drei Enzyme in den Zellen, deren Zelllipide in Spur 6 aufgetragen wurden, konnten bei der Lipidanalyse keine Wachsdiester beobachtet werden.

Die Lipide aus den transfizierten CHO-K1-Zellen wurden in zwei verschiedenen Fließmitteln analysiert. Im Laufmittel Chloroform/Methanol 60/4 konnten die aufgetragenen Lipidstandards  $\alpha$ -OH-Behensäure (C22), 1,2-Dodecandiol (C12) sowie Palmitinsäure (C16) gut voneinander getrennt werden (Abb. 5-25 A). Die Lipide der Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP-mFA2H transfiziert waren (Spuren 2, 4 und 6), zeigten bei der Lipidanalyse im Vergleich zu den Kontrolllipiden (Spur 7) zwei zusätzliche Banden (siehe Pfeilköpfe). Eine Bande lief auf der Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäure-Standards und eine weitere Bande (eigentlich eine Doppelbande) auf der Höhe des Lipidstandards 1,2-Dodecandiol. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass in den transfizierten Zellen durch die Katalysereaktion der exprimierten FA2H vermehrt  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren entstanden sind. Ob die beobachtete Doppelbande, die auf der gleichen Höhe wie der Diol-Lipidstandard lief, tatsächlich 1,2-Diole mit evtl. unterschiedlichen Kettenlängen darstellte, konnte mit den Analysemethoden ESI-MS sowie GC-MS aufgrund von technischen und methodischen Problemen nicht bestätigt werden. Es wurde zusätzlich versucht, die vermutete Diol-Doppelbande aus der DC-Platte herauszukratzen, um damit weitere chemisch-analytische Versuche durchzuführen. Experimente zur Derivatisierung von Diolen zu Isopropyliden-Derivaten oder Oxidation zu Fettsäuren sowie die Spaltung von vicinalen Diolen mit Perjodat waren bei der Identifizierung der beobachteten Doppelbande allerdings nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

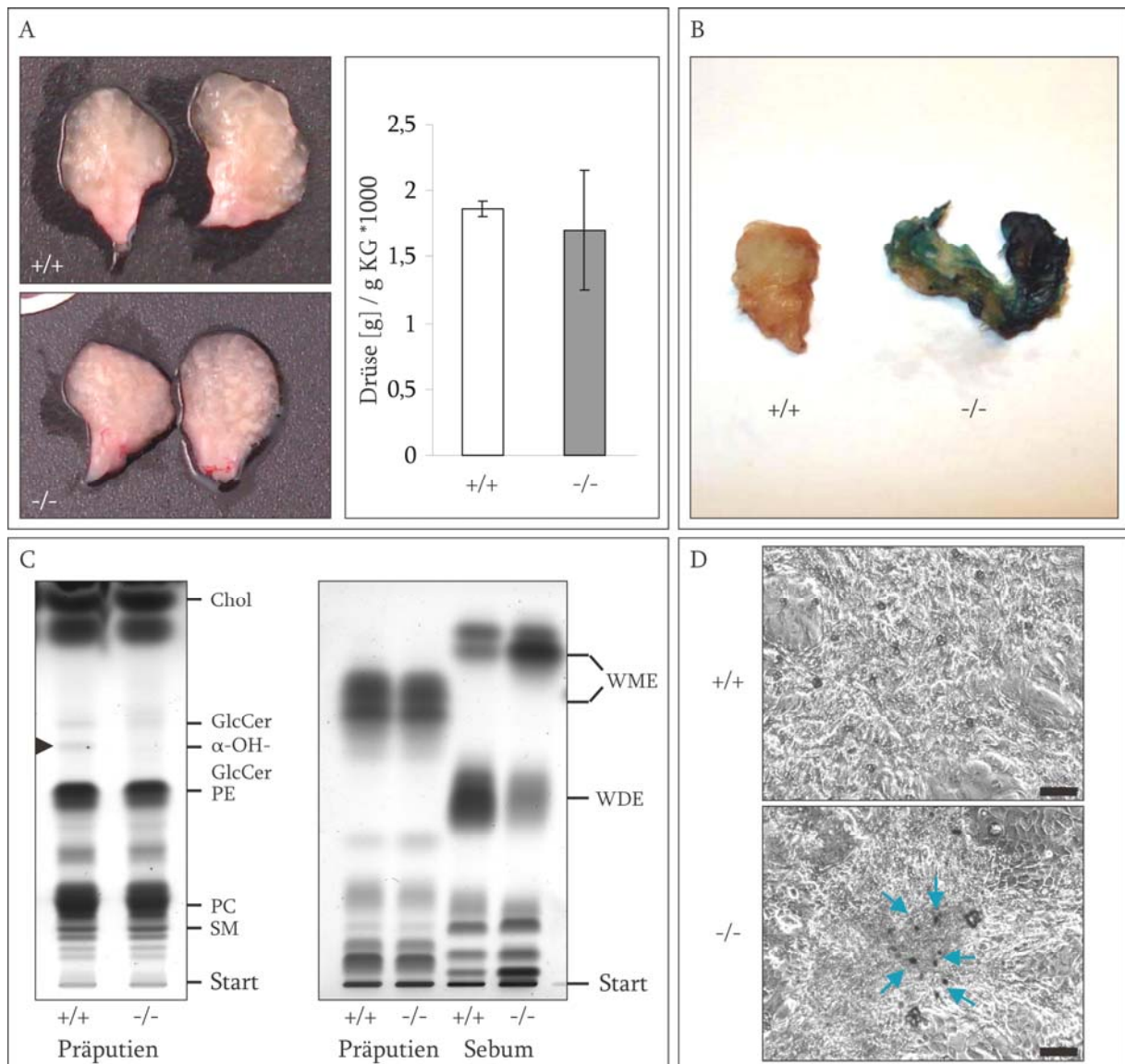
Die DC-Platte in Abb. 5-25 B zeigt die aufgetrennten Zelllipide im Laufmittel Hexan/Toluol 15/65. In diesem Laufmittel war es möglich die Lipidstandards Docosanol (primärer C22-Fettalkohol) und Oleoyloleat (Wachs aus der Ölsäure und einem C18-Fettalkohol) gut voneinander zu trennen. Im Vergleich zu den Kontrolllipiden der Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP transfiziert waren (Spur 7), wiesen die Zelllipide der Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP-Flag-mFAR1 transfiziert waren (Spuren 1, 4, 5 und 6) eine zusätzliche Bande auf der Höhe des Lipidstandards Docosanol auf (siehe unterer Pfeilkopf). Dafür verantwortlich war die katalytische Aktivität des exprimierten Enzyms mFAR1, das vermehrt Fettsäuren zu Fettalkoholen reduzierte. Eine weitere zusätzliche

Bande, die auf der Höhe des Lipidstandards C18-Wachs lief, konnte bei den Lipiden der Zellen beobachtet werden, die mit den beiden Plasmiden pEGFP-Flag-mFAR1 und pFlag-mWS co-transfiziert wurden (Spuren 5 und 6). Die zusätzlich beobachteten Lipide in diesen beiden Spuren bekräftigten den in Abb. 5-23 dargestellten Syntheseweg für Wachsmoester und bestätigten die Ergebnisse von Chen et al. (2004), die besagten, dass die Enzyme mFAR1 und mWS bei der Wachssynthese von Bedeutung sind. Dabei wurden die endogenen Fettsäuren mit Hilfe der mFAR1 vermehrt zu Fettalkoholen reduziert und die mWS acylierte vermehrt Fettsäure-Acylreste an diese Fettalkohole, sodass eine Bande auf Höhe der Wachsmoester sichtbar wurde. Wurden die Plasmide einzeln transfiziert (Spur 1 und 3), konnte diese Lipidbande nicht beobachtet werden. Damit wurde gezeigt, dass nur ein Zusammenspiel der beiden Proteine mFAR1 und mWS zur Synthese der Wachsmoester führte. Wurde zusätzlich zu diesen beiden Plasmiden auch das Plasmid pEGFP-mFA2H in die Zellen transfiziert (Spur 6), zeigten die Lipide dieser Zellen keine Unterschiede im Vergleich zu den Zelllipiden der Zellen, die keine mFA2H exprimierten. Die durch Transfektion bedingte Überexpression der mFA2H führte zwar zu einer sichtbar vermehrten Menge an  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren und evtl. zu 1,2-Diolen (Abb. 5-25 A, Spur 6), jedoch hatte die Expression der FA2H zusammen mit den Enzymen mFAR1 sowie mWS keine Bildung von Wachsdiestern zur Folge (Abb. 5-25 B, Spur 6).

### *5.1.11 Analyse der Präputialdrüsen*

Neben den Talgdrüsen in der Haut existieren noch weitere Talgdrüsen im Körper, die an keinen Haarfollikel gebunden sind und damit frei vorliegen. Die Präputialdrüsen von männlichen Nagetieren sind für die Produktion und die Abgabe von Pheromonen wichtig, die zum einen beim Paarungsverhalten eine Rolle spielen und zum anderen bei der Territorialabgrenzung genutzt werden. Da das Enzym FA2H in den Talgdrüsen der Haut exprimiert wird, sollten auch die Präputialdrüsen von WT- und FA2H-KO-Mäusen analysiert werden. Das primäre Ziel war es zu untersuchen, ob die Beobachtungen, die an den Talgdrüsen der Haut gemacht worden sind, in der gleichen oder ähnlichen Weise in

den Präputialdrüsen zu finden waren. In sehr jungen Tieren (P10) waren die Drüsen noch nicht ausgebildet, sodass ein Größenvergleich erst mit den Drüsen älterer Tiere möglich war. Abbildung 5-26 A zeigt beispielhaft die Präputialdrüsen von jeweils einem 6 Monate alten WT- und FA2H-KO-Männchen. Es wurden insgesamt 6 Drüsen pro Genotyp vermessen und gewogen. Das Gewicht der Drüsen wurde auf das gesamte Körpergewicht der Maus bezogen und graphisch dargestellt. Weder das Gewicht noch die Größe der Präputialdrüsen waren in den FA2H-KO-Mäusen verändert. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Präputialdrüsen überhaupt die FA2H exprimieren. Dafür wurden die kompletten Drüsen von 1 Jahr alten Mäusen einer LacZ-Färbung unterzogen, um nach der Expression des Cyt-b5- $\beta$ -Gal-Reportergens zu schauen. Die Präputialdrüsen der FA2H-KO-Tiere haben sich bereits nach 30 min in der Färbelösung komplett dunkelblau gefärbt (Abb. 5-26 B). Bei den Drüsen der Kontrolltiere konnte auch nach 3 h keinerlei Färbung beobachtet werden. Die positive LacZ-Färbung in den FA2H-KO Drüsen spricht eindeutig für eine FA2H-Expression in den WT-Tieren. Deshalb sollten in den folgenden Experimenten die Lipide der Präputialdrüsen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysiert werden (Abb. 5-26 C).



**Abb. 5-26 Analyse der Präputialdrüsen.** (A) Die Präputialdrüsen von 6 Monate alten WT- und FA2H-KO-Tieren weisen keine Unterschiede bezüglich ihrer Größe oder ihres Gewichts auf (n=6). (B) Die kompletten Präputialdrüsen von 1 Jahr alten Tieren wurden einer LacZ-Färbung unterzogen, um nach der Expression des Cyt-b5-β-Gal-Reportergens zu schauen. Die Drüsen der FA2H-KO-Männchen waren in kürzester Zeit dunkelblau angefärbt. Bei den WT-Drüsen war auch nach längerer Inkubation keine Verfärbung sichtbar. (C) Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Gesamtlipide von WT- und FA2H-KO-Präputialdrüsen. Letzteren fehlt bei der Auftrennung im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 eine Bande auf der Höhe des α-hydroxylierten GlcCer-Standards (siehe Pfeilkopf), wobei auch die Menge an GlcCer reduziert zu sein scheint. Im apolaren Fließmittel Hexan/Toluol 1/1 ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Lipide von Präputien und des Sebums der Haut erkennbar. Die Präputialdrüsen synthetisieren keine WDE und deren WME zeigen ein anderes Laufverhalten, als die des Sebums. Beim Vergleich von WT und KO ist allerdings kein Unterschied feststellbar. (D) Primärkultur von isolierten Drüsenzellen auf einem *Layer* von 3T3-Feeder-Zellen, die einer LacZ-Färbung unterzogen war. In der FA2H-KO Kultur waren einige Zellen blau angefärbt (siehe blaue Pfeile), die ihren Ursprung eindeutig in den Präputialdrüsen hatten. Die Zellen wuchsen allerdings nicht weiter bzw. differenzierten aus und starben, sodass eine Weiterkultivierung der Zellen und darauf beruhende Experimente nicht möglich waren. Verwendete Abkürzungen: Chol, Cholesterol; GlcCer, Glucosylceramid; α-OH-GlcCer, α-hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; SM, Sphingomyelin; WME, Wachsmonoester; WDE, Wachsdiester. Maßstabsbalken = 100 μm. (FA2H-WT = +/+; FA2H-KO = -/-).

Für die Lipidextraktion wurden die Präputialdrüsen von 6-7 Monate alten Männchen verwendet. Jeweils 3 Tiere pro Genotyp wurden dabei untersucht. Die Gesamtlipide wurden mit organischen Lösungsmitteln extrahiert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmitteln aufgetrennt. Abbildung 5-26 C zeigt einmal die Lipidauftrennung im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 und weiterhin im Fließmittel Hexan/Toluol 1/1. Die linke DC-Platte zeigt, dass in den FA2H-KO Drüsen im Vergleich zu der Kontrolle eine Bande im Bereich des  $\alpha$ -hydroxylierten Lipidstandards Glucosylceramid fehlt (siehe Pfeilkopf). Auch die Lipidauftrennung im Laufmittel Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1 konnte im FA2H-KO-Tier fehlende Banden auf Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramid-Standards darstellen (Daten nicht gezeigt). Die rechte DC-Platte zeigt die Auftrennung der sehr apolaren Lipide der Präputialdrüsen im Vergleich zu den Sebumlipiden der Haut. Das Sebum der Präputialdrüsen von WT- und FA2H-KO-Tieren weist keine Unterschiede auf. Die Präputialdrüsen synthetisieren im Gegensatz zu den Talgdrüsen der Haut keine Wachsdierester (WDE) und die vorhandenen Wachsmoester (WME) zeigen ein anderes Laufverhalten als die des Sebums. Diese Beobachtung bestätigt die Aussage, dass die Lipide der verschiedenen Talgdrüsen im Körper nicht nur sehr spezie-spezifisch sind, sondern auch im Vergleich untereinander ein unterschiedliches Lipidmuster aufweisen (Nikkari, 1974).

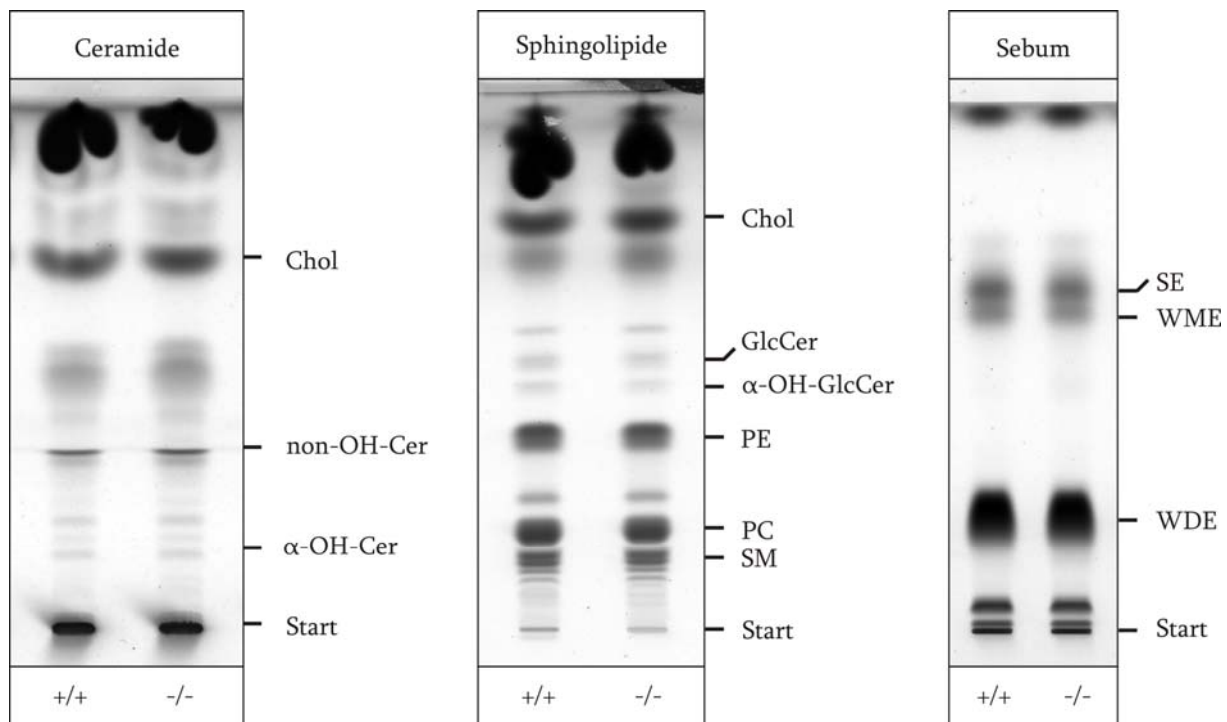
Da die Präputialdrüsen die FA2H exprimieren, Unterschiede bezüglich der Ceramide und Sphingolipide aufweisen und sich im Gegensatz zu den Talgdrüsen der Haut sehr leicht isolieren lassen, sollte in den folgenden Experimenten versucht werden, eine Primärkultur aus den Drüsenzellen zu gewinnen (nach Rosenfield, 1989). Die isolierten Zellen wurden auf 3T3-Feeder-Zellen ausgesät, die vorher 2h mit Mitomycin C (8-16  $\mu$ g/ml) vorbehandelt worden waren. Die Platten wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis deutlich kleine Zell-Inseln erkennbar waren. Die Zellen wurden noch in den 6-*well*-Schalen einer OilRed-, Nile-Red- und einer LacZ-Färbung unterzogen. Mit den ersten beiden Färbemethoden ließen sich kleine Lipidtröpfchen innerhalb der Sebozyten anfärben, die unter dem Mikroskop beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Mit der LacZ-Färbung konnten in den FA2H-KO-Kulturen erwartungsgemäß blau angefärbte Zellen ausgemacht werden, die eindeutig aus den Präputialdrüsen stammen mussten. (Abb. 5-26 D, siehe blaue Pfeile). Nach diesen ersten Versuchen wuchsen die Sebozyten allerdings kaum weiter. Sie veränderten ihre Form, wurden voluminöser und es sah so aus, als ob sie ausdifferenzierten und danach starben. Aus diesem Grund war eine Weiterkultivierung der Zellen nicht möglich und darauf beruhende Experimente konnten nicht durchgeführt werden.

### 5.1.12 *Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase (PHYH)*

Die FA2H ist das einzige bisher bekannte Enzym, das für die  $\alpha$ -Hydroxylierung von unverzweigten Fettsäuren verantwortlich ist (Hama, 2010). Das peroxisomale Enzym Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase (PHYH) ist an der  $\alpha$ -Oxidation von 3-Methylverzweigten Fettsäuren beteiligt und wandelt beim Abbau der Phytansäure deren aktivierte Form Phytanoyl-CoA in 2-Hydroxy-Phytanoyl-CoA um (Watkins, 1994). Mutationen im *phyh*-Gen des Menschen werden mit der Erkrankung *Refsum disease* (RD) assoziiert, deren wichtigsten Symptome die Polyneuropathie, zerebellare Ataxie und *Retinitis pigmentosa* darstellen (Jansen, 1997). Um die Pathogenese der Refsum-Erkrankung besser charakterisieren und untersuchen zu können, wurden PHYH-KO-Mäuse generiert (Ferdinandusse, 2008). Da das Enzym PHYH ebenfalls eine  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Reaktion katalysiert und in der Literatur beschrieben worden ist, dass das Enzym PHYH *in vitro* zur  $\alpha$ -Hydroxylierung von unverzweigten Fettsäuren befähigt ist (Mukherji, 2002), sollten in den folgenden Experimenten die Hautlipide der PHYH-KO-Mäuse untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob die Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase in einem Zusammenhang mit den  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden und Sphingolipiden der Haut steht und ob sie einen Einfluss auf die Synthese der Wachstdiester (WDE) in den Talgdrüsen hat. Dafür wurden eingefrorene Stücke dorsaler Haut sowie eingetrocknete Sebumlipide von PHYH-KO- und Kontroll-Tieren analysiert (zur Verfügung gestellt von Sacha Ferdinandusse, Amsterdam. Nach der Extraktion der

Gesamtlipide aus der Rückenhaut mit organischen Lösungsmitteln, wurden diese mittels Dünnschichtchromatographie (DC) in den Laufmitteln Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 und Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1 aufgetrennt. Die Sebumlipide wurden im Laufmittel Hexan/Toluol 1/1 untersucht. Abbildung 5-27 gibt einen repräsentativen Überblick über die dünnschichtchromatographische Lipidanalyse.



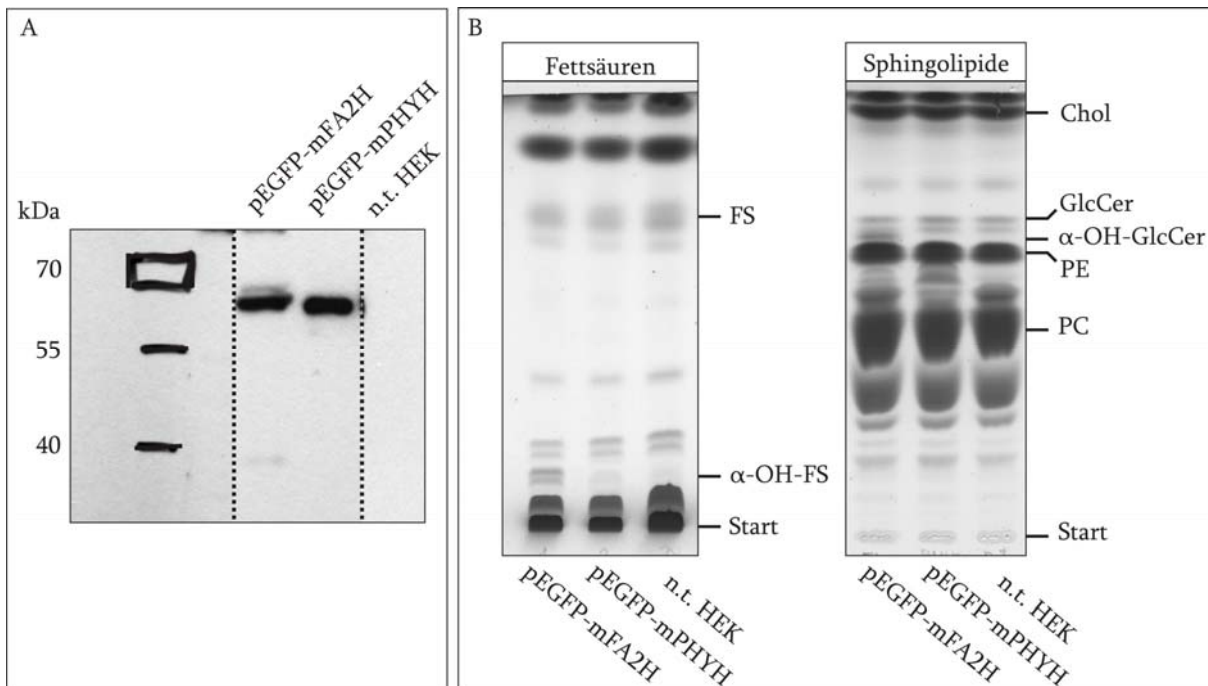
**Abb. 5-27 Dünnschichtchromatographische Analyse der Haut- und Oberflächenlipide von WT- und PHYH-KO-Mäusen.** Für die Lipidanalyse wurden die Gesamtlipide dorsaler Haut sowie Sebumlipide von 2 Monate alten Tieren verwendet (Probenmaterial aus Amsterdam, Niederlande von S. Ferdinandusse). Die aufgetrennten Ceramide und Sphingolipide zeigen keinen Unterschied zwischen WT- und PHYH-KO-Tieren. Das Laufmittel zur Auftrennung der Ceramide setzt sich folgendermaßen zusammen: Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1. Die DC-Platte wurde darin 2x entwickelt. Das Laufmittel zur Auftrennung der Sphingolipide setzt sich wie folgt zusammen: Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4. Die Auftrennung der Sebumlipide im apolaren Fließmittel Hexan/Toluol 1/1 hat ebenfalls keinen Unterschied zwischen WT- und PHYH-KO-Mäusen gezeigt. Verwendete Abkürzungen: Chol, Cholesterol; Cer, Ceramide;  $\alpha$ -OH-Cer,  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide; GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer,  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; SM, Sphingomyelin; SE, Sterolester; WME, Wachsmonoester; WDE, Wachsdierester. (PHYH-WT = +/+; PHYH-KO = -/-).

Die aufgetrennten Lipide der WT- und PHYH-KO-Tiere zeigen im Vergleich keine Unterschiede. Die PHYH-KO-Mäuse weisen in der Haut normale Mengen an  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden und Sphingolipiden auf. Die Synthese der WDE scheint



durch den *Knock-Out* ebenfalls nicht beeinträchtigt zu sein, da in beiden Genotypen die gleiche Zusammensetzung des Sebums beobachtet werden kann (Abb. 5-27).

Zusätzlich zu den Hautproben sollte in den folgenden Versuchen auch *in vitro* gezeigt werden, dass die Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase nicht die  $\alpha$ -Hydroxylierung von unverzweigten Fettsäuren katalysiert. Dafür wurde die cDNA der murinen PHYH in einen pEGFP-Vektor inseriert (pEGFP-mPHYH) und dieser wurde parallel zum Plasmid pEGFP-mFA2H in HEK-Zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für eine Western Blot-Analyse mit einem Anti-GFP-Antikörper verwendet, um zu zeigen, dass beide Fusionsproteine exprimiert wurden. Anschließend wurden die isolierten Lipide mittels Dünnschichtchromatographie (DC) in verschiedenen Laufmitteln aufgetrennt. Abbildung 5-28 gibt einen repräsentativen Überblick über die durchgeführte Western Blot- und Lipid-Analyse. Für die Western Blot-Analyse wurden jeweils 20  $\mu$ g Gesamtprotein des Zelllysates in einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Inkubation der Membran mit einem Anti-GFP-Antikörper konnte die beiden Fusionsproteine EGFP-mFA2H (72 kDa) und EGFP-mPHYH (65 kDa) nachweisen (Abb. 5-28 A). Die nicht transfizierten HEK-Zellen (n.t. HEK) haben erwartungsgemäß kein EGFP-Signal gezeigt. Die isolierten Lipide aus den transfizierten Zellen wurden mittels Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 und Chloroform/Methanol 60/6 aufgetrennt (Abb. 5-28 B). Die mit dem Plasmid pEGFP-mFA2H transfizierten HEK-Zellen wiesen im Vergleich zu den Zellen, die mit pEGFP-mPHYH transfiziert wurden, und den nicht transfizierten Zellen eine zusätzliche Bande auf der Höhe von  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren auf (Abb. 5-28 B, linke DC-Platte). Im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 war bei den gleichen Zelllipiden eine zusätzliche Bande auf der Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten Glucosylceramids erkennbar (Abb. 5-28 B, rechte DC-Platte). Diese konnte nach der Transfektion von pEGFP-mPHYH oder bei den nicht transfizierten Zellen nicht beobachtet werden. Diese Tatsache zusammen mit den nicht veränderten Haut- und Oberflächenlipiden in den PHYH-KO-Mäusen zeigt, dass das Enzym Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase nicht zu einer  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Reaktion von unverzweigten Fettsäuren befähigt ist.



**Abb. 5-28 Western Blot- und Lipid-Analyse von transfizierten HEK-Zellen.** (A) HEK-Zellen wurden mit den beiden Plasmiden pEGFP-mFA2H und pEGFP-mPHYH transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nicht transfiziert waren (n.t. HEK). Nach Zellyse wurden 20 µg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Inkubation mit einem Anti-GFP-Antikörper zeigt die Expression der beiden Fusionsproteine EGFP-mFA2H (72 kDa) und EGFP-mPHYH (65 kDa). (B) Die isolierten Zelliglipide wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie im Fließmittel Chloroform/Methanol 60/6 oder im Fließmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 aufgetrennt. Nur in den Zellen, die mit pEGFP-mFA2H transfiziert waren, konnten zusätzliche Lipidbanden auf der Höhe von α-hydroxylierten Fettsäuren und α-hydroxyliertem Glucosylceramid beobachtet werden. Die Zelliglipide der mit pEGFP-mPHYH transfizierten Zellen und die nicht transfizierten (n.t. HEK) Zellen weisen in diesem Bereich keine zusätzlichen Banden auf. Verwendete Abkürzungen: FS, Fettsäuren; Chol, Cholesterol; GlcCer, Glucosylceramid; α-OH-GlcCer: α-hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; SM, Sphingomyelin.

## 5.2 Humane FA2H

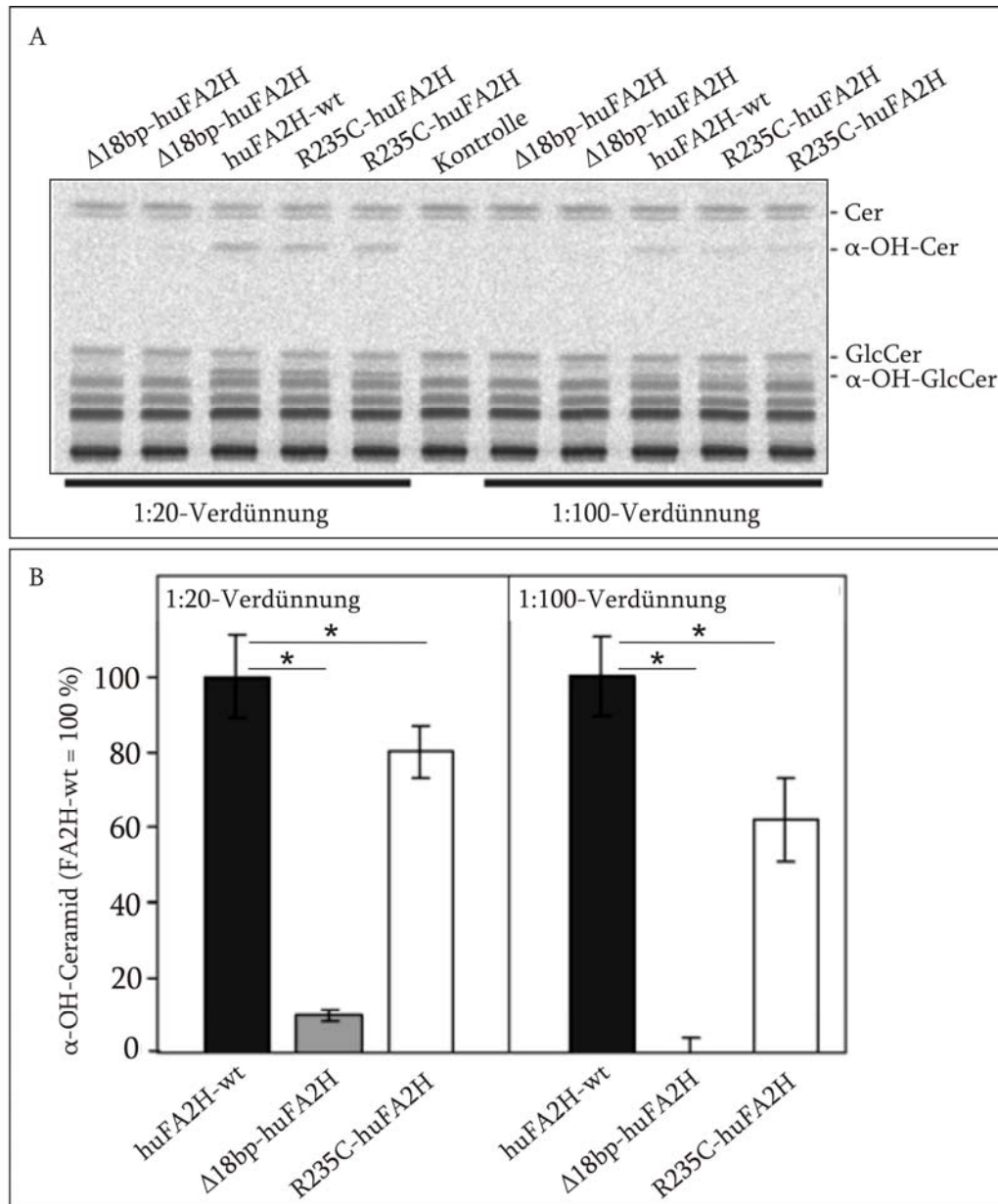
Die Rolle der FA2H und die Existenz von α-hydroxylierten Ceramiden und Sphingolipiden wurden bisher hauptsächlich im Nervensystem, in der Epidermis und in den Nieren von Säugetieren beschrieben (Hama, 2010). Homozygote Mutationen im humanen *Fa2h*-Gen sind mit drei neurodegenerativen Funktionsstörungen assoziiert: einer Form der komplizierten spastischen Paraplegie (SPG35), Leukodystrophie mit spastischer Paraparese und Dystonie sowie eine Neurodegeneration mit Eisenablagerungen im Gehirn (Garone, 2011). Diese Krankheitsbilder unterstreichen die

Bedeutung von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden im Nervensystem, die einen wichtigen Anteil am Myelin darstellen. Ob die betroffenen Menschen auch einen Haut- und/oder Haarphänotyp aufweisen, ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht bekannt.

### *5.2.1 Untersuchungen zur $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität von humanen FA2H-Mutanten*

Vererbare spastische Paraplegien (*hereditary spastic paraplegia*, HSP) stellen eine heterogene Gruppe an erblich bedingten, neurodegenerativen Erkrankungen dar, die mit einer Degeneration von Motoneuronen einhergehen und die in den betroffenen Patienten zu einer progressiven Spastizität und Lähmung der unteren Extremitäten führen (Salinas, 2008). SPG35 stellt eine autosomal-rezessive Form der HSP dar. Es konnte gezeigt werden, dass diese Erkrankungsform vermutlich durch Mutationen im humanen *Fa2h*-Gen hervorgerufen wird (Dick und Eckhardt, 2010). Es wurden dabei in zwei verschiedenen Familien zwei unterschiedliche Mutationen nachgewiesen: eine FA2H-18bp-Deletionsmutante ( $\Delta$ 18bp R53\_I58) und eine FA2H-Punktmutante (R235C). Die mutierten Enzyme sollten in den folgenden Versuchen *in vitro* auf ihre  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität im Vergleich zum WT-Enzym untersucht werden. Die FA2H-Mutanten wurden durch eine zielgerichtete Mutagenese mit geeigneten Oligonukleotiden aus FA2H-wt-cDNA generiert und in einen pEGFP-Vektor kloniert. Neben den beiden Mutanten (pEGFP- $\Delta$ 18bp-huFA2H und pEGFP-R235C-huFA2H) wurden für den Aktivitätsvergleich das Plasmid pEGFP-huFA2H-wt und zur Kontrolle das Plasmid pEGFP in CHO-K1-Zellen transient transfiziert. Dabei wurden die FA2H-Plasmide 1:20 bzw. 1:100 mit dem Kontrollvektor pEGFP verdünnt, da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass bei transienter Überexpression die FA2H-Expression nicht limitierend für die Synthese  $\alpha$ -hydroxylierter Sphingolipide ist. Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem Anti-GFP-Antikörper nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Für die Lipidanalyse wurden die Zellen nach der Transfektion für 24h mit [ $^{14}$ C]-Serin (0,5  $\mu$ Ci/6-*well*) metabolisch markiert. Danach

wurden die Zelligipide isoliert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Um sowohl die Ceramide als auch die Glucosylceramide auf einer DC-Platte nachzuweisen, wurde die DC-Platte zuerst komplett in Chloroform, anschließend zu ca. 60 % in Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 und zuletzt 2x komplett in Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1 entwickelt. Abbildung 5-29 A zeigt die aufgetrennten Lipide der mit [<sup>14</sup>C]-Serin metabolisch markierten CHO-K1-Zellen.



**Abb. 5-29** *In vitro* Untersuchungen zur  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität der zwei bekannten FA2H-Mutanten  $\Delta 18bp$ -huFA2H und R235C-huFA2H. (A) Gezeigt sind die mit [<sup>14</sup>C]-Serin metabolisch markierten und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennten Zelligipide von transient transfizierten CHO-K1-Zellen. Die Zellen wurden dabei jeweils mit pEGFP-huFA2H-wt, pEGFP-R235C-huFA2H und pEGFP- $\Delta 18bp$ -huFA2H (1:20 bzw. 1:100 mit dem Kontrollvektor verdünnt) oder mit dem Kontrollvektor

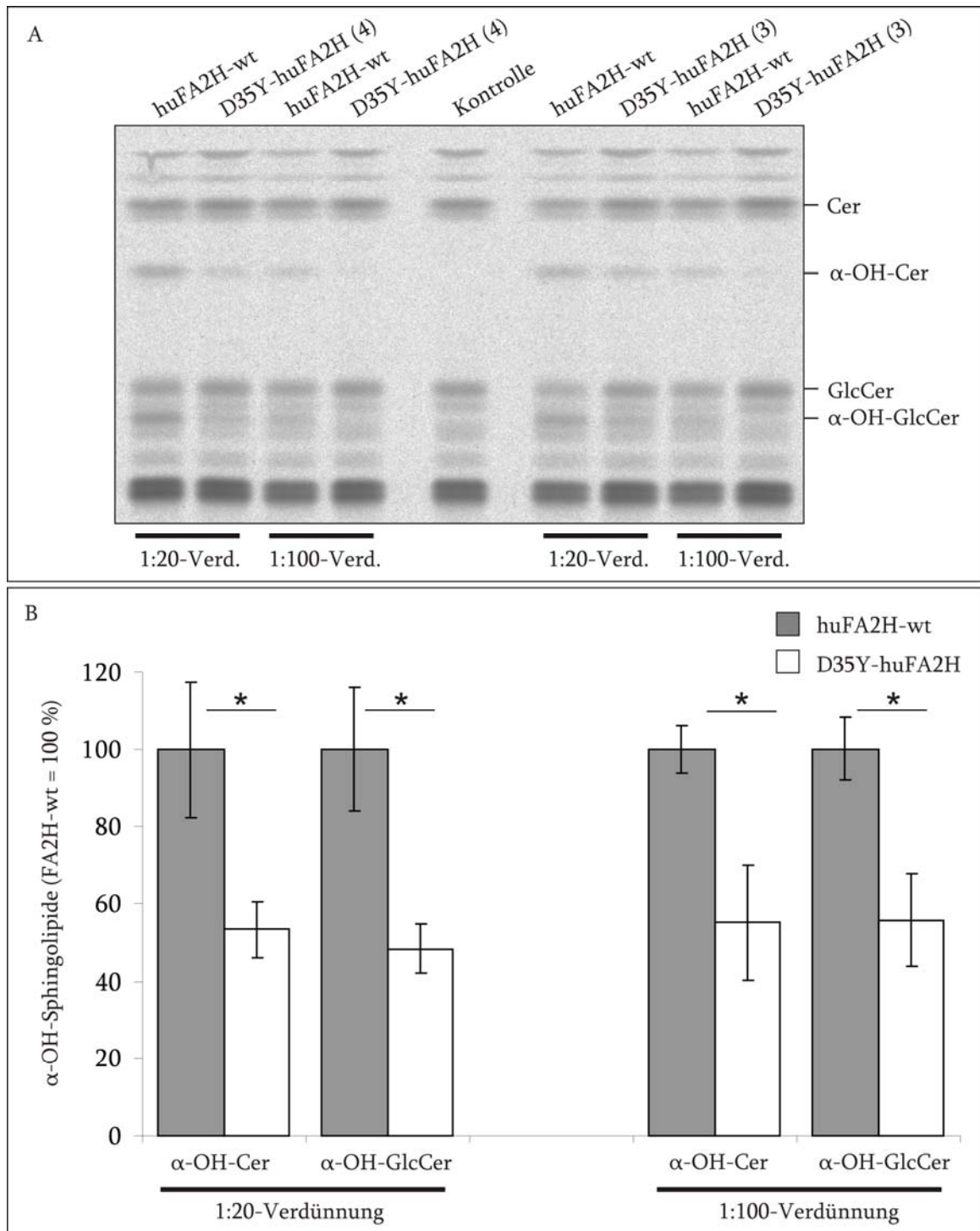
pEGFP alleine transfiziert und anschließend für 24h mit [<sup>14</sup>C]-Serin metabolisch markiert. Aufgrund der Expression von EGFP-huFA2H-wt sind zusätzliche Banden auf der DC-Platte sichtbar, die  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer entsprechen. Nach der Transfektion des Kontrollvektors sind diese nicht sichtbar. Im Vergleich zum WT-Enzym ist nach Expression der zwei mutierten Enzyme die Menge an  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer deutlich reduziert. Verwendete Abkürzungen: Cer, Ceramide;  $\alpha$ -OH-Cer,  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide; GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer,  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid. **(B)** Quantifizierung der  $\alpha$ -OH-Cer-Menge in unterschiedlich transfizierten CHO-K1-Zellen. Die beobachtete Signalintensität nach Transfektion mit pEGFP-huFA2H-wt wurde dabei gleich 100 % gesetzt. Die Transfektion der beiden FA2H-Mutanten führte im Vergleich zum WT-Enzym in beiden Verdünnungen zu einer signifikant reduzierten Menge an  $\alpha$ -OH-Cer ( $p < 0,05$ ; t-Test). Ausgewertet wurde mit der AIDA-Software. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten dar.

Die mit dem Plasmid pEGFP-huFA2H-wt transfizierten CHO-K1-Zellen wiesen deutliche Banden an  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden ( $\alpha$ -OH-Cer) und Glucosylceramiden ( $\alpha$ -OH-GlcCer) auf (Abb. 5-29 A). Letztere konnten ebenfalls mit ESI-MS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese zusätzlichen Banden waren in den Zellen, die mit dem Kontrollvektor pEGFP transfiziert waren, nicht zu erkennen. Die Transfektion des Plasmids pEGFP-R235C-huFA2H hatte eine signifikante Reduktion der  $\alpha$ -OH-Cer-Menge im Vergleich zur Transfektion mit pEGFP-huFA2H-wt zur Folge (Abb. 5-29 B). Bei der 1:20-Verdünnung konnte eine Reduktion um 20 % und bei der 1:100-Verdünnung eine Reduktion um 40 % nachgewiesen werden. Bei den Zellen, die mit dem Plasmid pEGFP- $\Delta$ 18bp-huFA2H transfiziert waren, konnte bei der 1:20-Verdünnung eine Reduktion um 90 % beobachtet werden und bei der 1:100-Verdünnung wurden gar keine  $\alpha$ -OH-Ceramide mehr detektiert. Nach der Transfektion der FA2H-Deletionsmutante konnte mit Hilfe der DC in beiden Verdünnungen kein  $\alpha$ -OH-GlcCer nachgewiesen werden (Abb. 5-29 A).

Neben den beiden oben untersuchten FA2H-Mutanten sind in der Literatur weitere Mutationen im *Fa2h*-Gen des Menschen beschrieben, die sich durch ein schweres Krankheitsbild mit Leukodystrophie, spastischer Paraparese und Dystonie auszeichnen (Edvardson, 2008). Für diese Form der Erkrankung wurde unter anderem die FA2H-Punktmutation (D35Y) verantwortlich gemacht, bei der an Position 35 der Cytochrom-b5-Domäne Aspartat gegen Tyrosin ausgetauscht ist. Untersuchungen der oben erwähnten Arbeitsgruppe, die die Umwandlung von [3,3,5,5-D<sub>4</sub>]-Tetracosansäure in  $\alpha$ -OH-[3,3,5,5-D<sub>4</sub>]-Tetracosansäure mittels Gaschromatographie quantitativ vermessen

haben, zeigten einen vollständigen Aktivitätsverlust des mutierten FA2H-Enzyms (Edvardson, 2008). In den folgenden Experimenten sollte dieses Ergebnis bestätigt werden. Dafür wurde die D35Y-FA2H-Mutante wie die zwei bereits oben beschriebenen Mutanten durch eine zielgerichtete Mutagenese mit geeigneten Oligonukleotiden aus FA2H-wt-cDNA generiert und in einen pEGFP-Vektor kloniert. Die Mutante (pEGFP-D35Y-huFA2H) wurde ebenfalls mit dem Kontrollvektor pEGFP 1:20 bzw. 1:100 verdünnt und in CHO-K1-Zellen transient transfiziert. Die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Ceramid und Glucosylceramid wurde nach metabolischer Markierung und Extraktion der Zelllipide im Vergleich zur Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-huFA2H-wt bestimmt. Abbildung 5-30 A zeigt die aufgetrennten Lipide der mit [ $^{14}$ C]-Serin metabolisch markierten CHO-K1-Zellen. Durch die Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-huFA2H-wt wurden zusätzliche Banden beobachtet, die  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden ( $\alpha$ -OH-Cer) und  $\alpha$ -hydroxylierten Glucosylceramiden ( $\alpha$ -OH-GlcCer) zugeordnet werden konnten (Abb. 5-30 A). Der transfizierte Kontrollvektor pEGFP führte zu keinen zusätzlichen Banden. Die Transfektion des Plasmids pEGFP-D35Y-huFA2H hatte eine signifikante Reduktion der  $\alpha$ -OH-Cer- und  $\alpha$ -OH-GlcCer-Menge im Vergleich zur Transfektion mit pEGFP-huFA2H-wt zur Folge (Abb. 5-30 B). In beiden Verdünnungen konnte eine Reduktion um ca. 50 % nachgewiesen werden, jedoch kein vollständiger Aktivitätsverlust wie er in der Literatur beschrieben worden ist (Edvardson, 2008).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hier untersuchten FA2H-Mutanten nur noch bedingt zur  $\alpha$ -Hydroxylierung befähigt sind und dass die daraus resultierende reduzierte Menge an  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer vermutlich vor allem im Gehirn den Phänotyp in den betroffenen Patienten bedingt.



**Abb. 5-30 *In vitro* Untersuchungen zur  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität der FA2H-Mutante D35Y-huFA2H.** (A) Gezeigt sind die mit [ $^{14}$ C]-Serin metabolisch markierten und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennten Zelllipide von transient transfizierten CHO-K1-Zellen. Die Zellen wurden dabei jeweils mit pEGFP-D35Y-huFA2H (Klon 3 und 4) und pEGFP-huFA2H-wt (1:20 bzw. 1:100 mit dem Kontrollvektor verdünnt) oder dem Kontrollvektor pEGFP alleine transfiziert und anschließend für 24h mit [ $^{14}$ C]-Serin metabolisch markiert. Aufgrund der Expression von EGFP-huFA2H-wt sind zusätzliche Banden auf der DC-Platte sichtbar, die  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer entsprechen. Nach Transfektion des Kontrollvektors sind diese nicht sichtbar. Im Vergleich zum WT-Enzym ist nach Expression des mutierten Enzyms die Menge an  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer deutlich reduziert. Verwendete Abkürzungen: Cer, Ceramide;  $\alpha$ -OH-Cer,  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide; GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer,  $\alpha$ -hydroxyliertes

Glucosylceramid; Verd., Verdünnung. **(B)** Quantifizierung der  $\alpha$ -OH-Cer- und  $\alpha$ -OH-GlcCer-Menge in transfizierten CHO-K1-Zellen. Die beobachtete Signalintensität nach Transfektion mit pEGFP-huFA2H-wt wurde dabei gleich 100 % gesetzt. Die Transfektion der D35Y-FA2H-Mutante führte im Vergleich zum WT-Enzym in beiden Verdünnungen zu einer signifikant reduzierten Menge an  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer ( $p < 0,05$ ; t-Test). Ausgewertet wurde mit der AIDA-Software. Die Graphik stellt jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten dar.

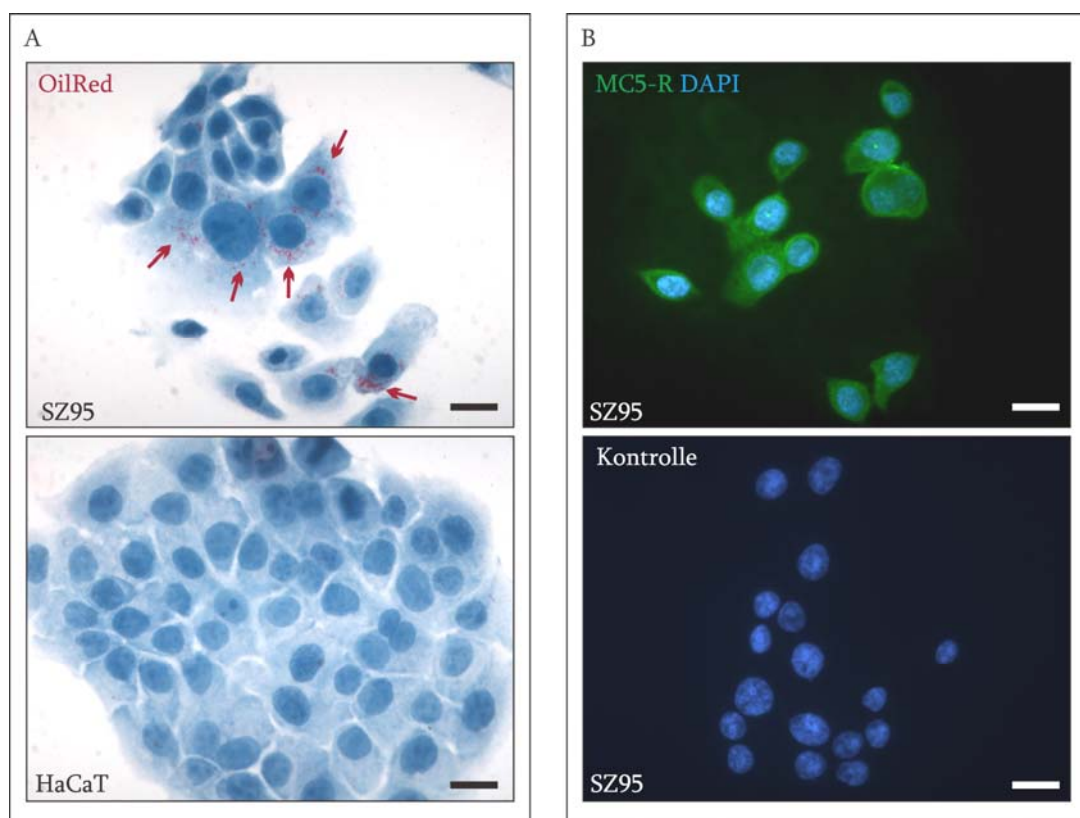
### 5.2.2 HaCaT, SZ95 und primäre humane Keratinozyten

Das Enzym FA2H wird in den Keratinozyten der Haut des Menschen exprimiert und katalysiert die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Fettsäuren, die Bestandteile von Sphingolipiden sind. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -hydroxylierte Ceramide und Sphingolipide in der Epidermis zu einer additiven Stabilisierung der lamellaren Lipidstrukturen führen und dementsprechend vermutlich für die Bildung der epidermalen Barrierefunktion von Bedeutung sind (Uchida, 2007). In der murinen Haut konnte die Expression der FA2H allerdings spezifisch nur in den Talgdrüsen nachgewiesen werden (siehe 5.1.4). Aufgrund dieser beobachteten Divergenzen sollten in den folgenden Experimenten die beiden humanen, immortalisierten Zelllinien HaCaT und SZ95 sowie eine primäre humane Keratinozytenkultur auf die Expression der FA2H untersucht werden.

Die SZ95-Zelllinie entstand aus isolierten Sebozyten der menschlichen Gesichtshaut nach der Transfektion mit einem Plasmid, das für das *SV40 large-T Antigen* codierte (Zouboulis, 1999). Die Sebozytenzelllinie weist die gleichen morphologischen, phenotypischen und funktionellen Eigenschaften wie normale menschliche Sebozyten auf. Die Zellen sind zur Lipidsynthese befähigt (Zouboulis, 1999). Die Lipide akkumulieren dabei im Cytoplasma in kleinen Lipidtröpfchen (*lipid droplets*), die mit einer OilRed-Färbung rot angefärbt werden können (Abbildung 5-31 A). In HaCaT-Zellen konnten mit der OilRed-Färbung dagegen keine Lipidtröpfchen nachgewiesen werden. Zur besseren Darstellung der histologischen Zellstrukturen wurden die Zellen nach der OilRed-Färbung mit Hämatoxylin gegengefärbt. Sebozyten exprimieren an ihrer Oberfläche viele Hormon- und Neurotransmitter-Rezeptoren, deren Liganden z.B. die Proliferation und die Differenzierung der Zellen sowie die Lipogenese

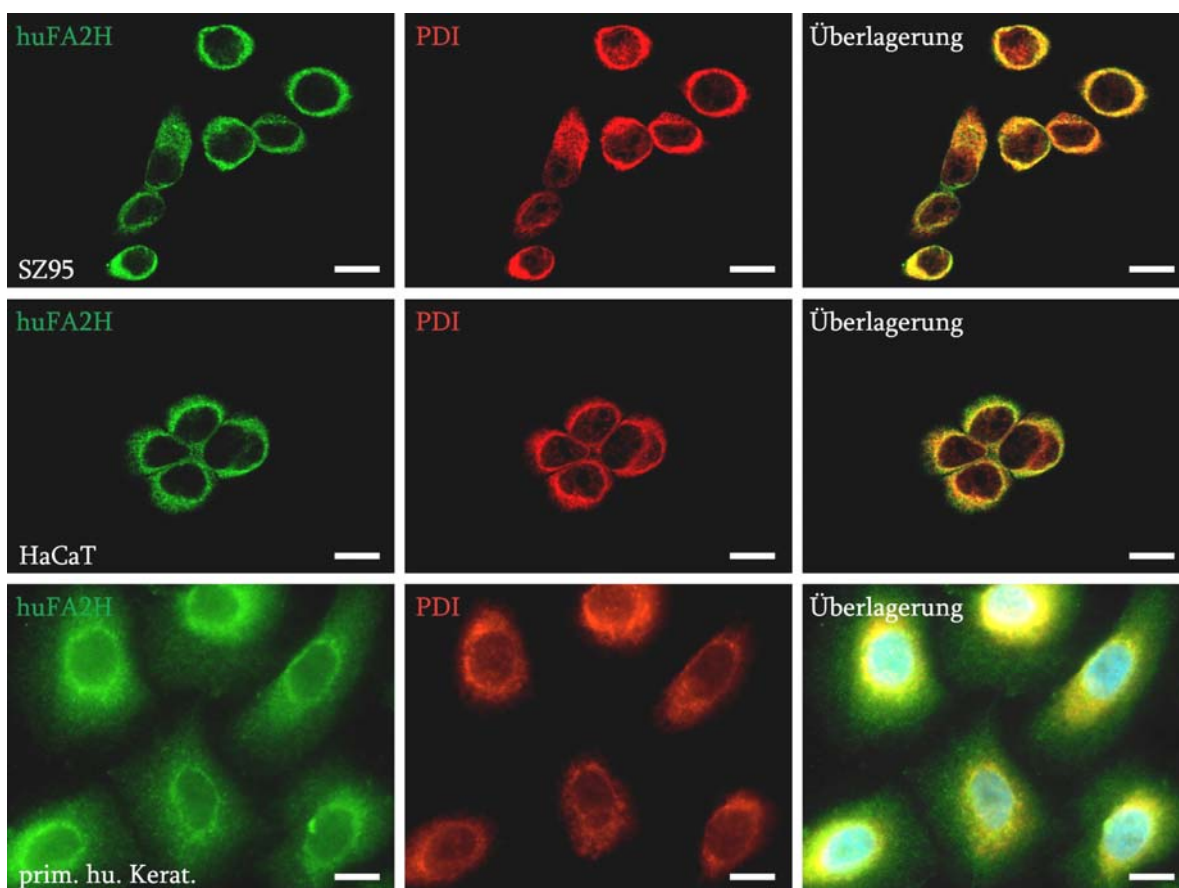


steuern können (Zouboulis, 2010). Der Melanocortin5-Rezeptor (MC5-R) stellt einen Marker für die Sebozyten-Differenzierung dar und konnte in humanen Talgdrüsen der Haut nachgewiesen werden (Smith, 2008). SZ95-Zellen wurden deshalb mit einem Antikörper inkubiert, der gegen den MC5-Rezeptor gerichtet war (zur Verfügung gestellt von Diane Thiboutot, Pennsylvania USA). Die Immunfluoreszenz-Analyse mit dem Anti-MC5-Antikörper konnte in den SZ95-Zellen eine positive Färbung (grün) zeigen (Abbildung 5-31 B), wie sie in der Literatur beschrieben wird (Thiboutot, 2000). Alle Zellen der Zelllinie waren allerdings gleichermaßen gefärbt und es konnte bezüglich der Differenzierung kein Unterschied in einzelnen Zellen festgestellt werden. Als Negativkontrolle wurde die Färbung nur mit dem fluoreszierenden Sekundär-Antikörper durchgeführt, was erwartungsgemäß keine Färbung zeigte.



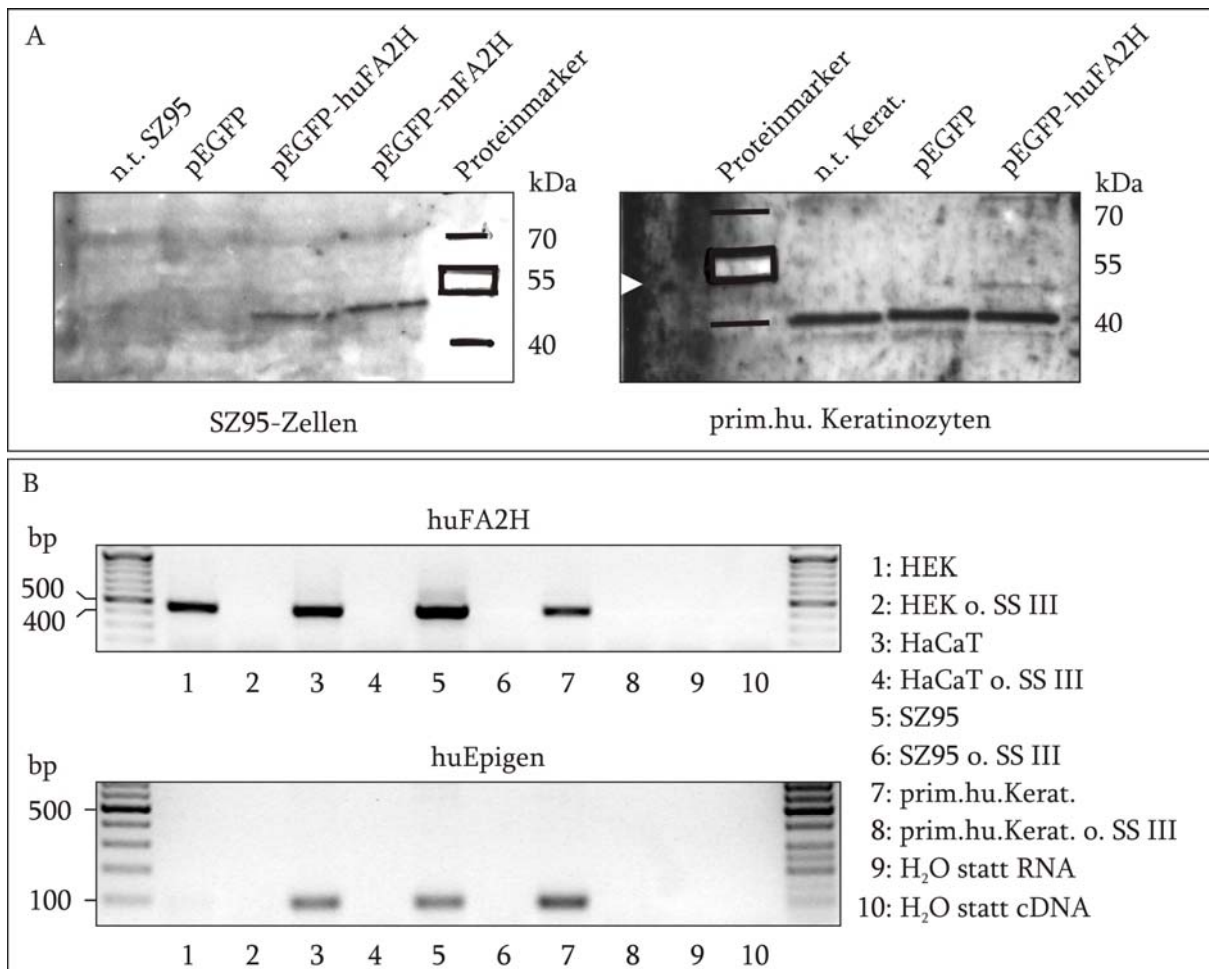
**Abb. 5-31 Charakterisierung der SZ95-Zelllinie.** (A) SZ95-Zellen wurden einer OilRed-Färbung unterzogen, um die Lipidtröpfchen (*lipid droplets*) im Cytoplasma (rot) darzustellen (siehe rote Pfeile). Zur besseren Darstellung der Zellstrukturen wurden die Zellen mit Hämatoxylin gegengefärbt. HaCaT-Zellen weisen im Vergleich keine positive OilRed-Färbung auf. (B) SZ95-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen den Melanocortin5-Rezeptor (MC5-R) inkubiert (zur Verfügung gestellt von Diane Thiboutot, Pennsylvania USA) und zeigten eine positive Färbung (grün). Die Zellen, die zur Kontrolle nur mit dem Sekundär-Antikörper behandelt wurden, wiesen keine Signale auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

In den folgenden Versuchen wurden die beiden Zelllinien HaCaT und SZ95 sowie eine primäre humane Keratinozytenkultur, die aus der Vorhaut von mehreren Patienten gewonnen wurde (Universität Tübingen), auf die Expression von FA2H untersucht. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag für eine Immunfluoreszenz-Analyse mit einem Anti-huFA2H-Antikörper verwendet. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem Anti-PDI-Antikörper (Protein-Disulfid-Isomerase) als ER-Marker (Endoplasmatisches Retikulum) inkubiert, um eine Co-Lokalisation der beiden Proteine zu zeigen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau), die aber bei den Aufnahmen mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) nicht dargestellt werden. Abbildung 5-32 gibt einen repräsentativen Überblick über die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Anti-huFA2H-Antikörper.



**Abb. 5-32 Immunfluoreszenz-Analyse an humanen Zellen.** SZ95- und HaCaT-Zellen sowie primäre humane Keratinozyten wurden mit den Antikörpern Anti-huFA2H (grün) und Anti-PDI (rot) angefärbt, um eine Co-Lokalisation (gelb) der beiden Proteine im ER zu zeigen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Letztere Färbung wurde bei Aufnahmen mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) nicht dargestellt. Verwendete Abkürzungen: ER, endoplasmatisches Retikulum; huFA2H, humane FA2H; PDI, Protein-Disulfid-Isomerase. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

In allen drei untersuchten Zelllinien konnte um den Zellkern eine kreisrunde FA2H-Färbung (grün) beobachtet werden, die etwas ins Cytoplasma streute. Die zusätzliche Inkubation mit dem Anti-PDI-Antikörper (rot) konnte eine Co-Lokalisation (gelb) zwischen den beiden exprimierten Proteinen zeigen und damit die Lokalisation der FA2H im endoplasmatischen Retikulum bestätigen (Abb. 5-32). Des Weiteren wurde mit dem gleichen Anti-huFA2H-Antikörper eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden nicht transfizierte Zellen verwendet und Zellen, die vor dem Experiment für 24 h mit den Plasmiden pEGFP-huFA2H, pEGFP-mFA2H und pEGFP als Negativkontrolle transfiziert waren. Die Transfektion des huFA2H-Plasmids sollte eine Positivkontrolle für die Western Blot-Analyse darstellen. Für diesen Versuch wurden SZ95-Zellen und primäre humane Keratinozyten herangezogen. Nach Transfektion und Zellyse wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein in einem 10 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Inkubation der Membran mit dem Anti-huFA2H-Antikörper zeigte bei nicht transfizierten und mit dem pEGFP-Plasmid transfizierten Zellen kein Signal (Abb. 5-33). Die Zellen, die mit den Plasmiden für die humane oder murine FA2H transfiziert waren, wiesen dagegen Signale auf. Die entsprechenden Banden (beide unter 55 kDa) waren allerdings kleiner als die berechneten Proteinmassen (EGFP-huFA2H: 70 kDa, EGFP-mFA2H: 72 kDa). Eine ähnliche Beobachtung (die in HEK-Zellen transfizierte humane FA2H (43 kDa) zeigte im Western Blot eine Bande bei 37 kDa) wurde auch vom Hersteller des Antikörpers (abcam) gemacht. Die endogene huFA2H-Expression konnte in den SZ95-Zellen und den primären humanen Keratinozyten mittels Western Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden, sondern nur die Überexpression des Fusionsproteins nach transients Transfektion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Anti-huFA2H-Antikörper ebenfalls die murine FA2H erkennt (Abb. 5-33 A).



**Abb. 5-33 Western Blot- und RT-PCR-Analyse.** (A) Für die Western Blot-Analyse mit dem Anti-huFA2H-Antikörper wurden SZ95-Zellen und primäre humane Keratinozyten verwendet. Die Zellen wurden vor der Immunfluoreszenz-Färbung für 24h mit den Plasmiden pEGFP-huFA2H, pEGFP-mFA2H und pEGFP als Negativkontrolle transfiziert. Der Anti-huFA2H-Antikörper erkennt in der Western Blot-Analyse nur das transient überexprimierte Fusionsprotein EGFP-huFA2H und EGFP-mFA2H, aber nicht die endogene FA2H in den nicht transfizierten (n.t. SZ95) Zellen sowie in den Zellen, die mit dem Kontrollvektor pEGFP transfiziert waren. Die beobachteten Banden (beide unter 55 kDa) waren allerdings kleiner als die berechneten Größenwerte (EGFP-huFA2H: 70 kDa, EGFP-mFA2H: 72 kDa). Im Western Blot der humanen Keratinozyten weisen alle drei Spuren eine starke, unspezifische Bande bei 40 kDa auf. Die viel schwächere Bande des Fusionsproteins EGFP-huFA2H liegt darüber (siehe weißer Pfeilkopf). (B) HEK-, HaCaT- und SZ95-Zellen sowie primäre humane Keratinozyten wurden auf die Expression von FA2H und Epigen auf RNA-Ebene mittels einer RT-PCR untersucht. Bei allen vier Zelllinien konnte ein Signal für die FA2H (420 bp) beobachtet werden. Eine Epigen-Bande (92 bp) konnte bei HaCaT- und SZ95-Zellen sowie primären humanen Keratinozyten nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen (dH<sub>2</sub>O anstatt RNA und cDNA, sowie eine cDNA-Synthese ohne Zusatz der reversen Transkriptase SuperScript III) wiesen erwartungsgemäß keine Signale auf.

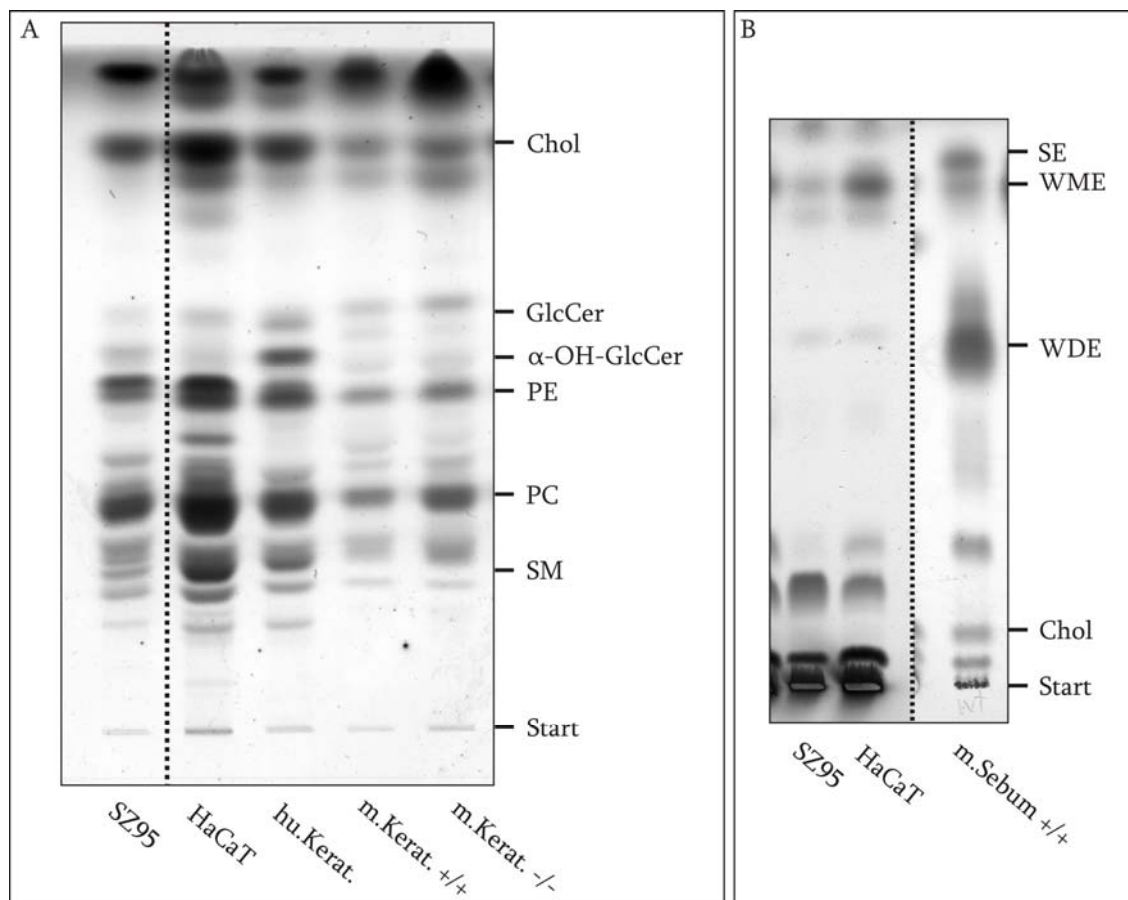
Die endogene FA2H-Expression sollte auch auf RNA-Ebene dargestellt werden. Dafür wurden HEK-, SZ95- und HaCaT-Zellen sowie primäre humane Keratinozyten verwendet. Nach RNA-Isolation und Umschreibung in cDNA mit Hilfe einer reversen

Transkriptase wurde eine RT-PCR-Analyse mit huFA2H- und huEpigen-Primern durchgeführt. Der Nachweis der Epigen-Expression war für die Analyse zum möglichen Einfluss der FA2H auf die Epigen-Menge von Bedeutung (siehe 5.1.6). Als Negativkontrollen wurden bei der Umschreibung von RNA in cDNA erstens anstatt RNA dH<sub>2</sub>O verwendet und zweitens wurde jeweils ein Ansatz ohne Zusatz der reversen Transkriptase (SuperScript III) angefertigt. Bei der RT-PCR wurde als Negativkontrolle dH<sub>2</sub>O anstatt cDNA verwendet. Nach der RT-PCR wurden die Ansätze in einem Agarosegel (huFA2H: 1 %, huEpigen: 2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Bei allen vier Zelllinien konnte die huFA2H (420 bp) auf cDNA-Ebene nachgewiesen werden. Das humane Epigen konnte in den HaCaT- und SZ95-Zellen sowie in den primären humanen Keratinozyten beobachtet werden (92 bp), jedoch nicht in den HEK-Zellen. Alle parallel durchgeführten Kontrollen haben keine Signale gezeigt (Abb. 5-33 B).

Aus den untersuchten Zellen wurden in den folgenden Versuchen die Lipide isoliert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmitteln aufgetrennt. Im Laufmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 wurden die Lipide der HaCaT- und SZ95-Zellen sowie von humanen und murinen Keratinozyten aufgetragen, um diese miteinander zu vergleichen (Abb. 5-34 A). Die Zellen wiesen teilweise quantitative Unterschiede im Lipidmuster auf, doch in allen untersuchten Zellen war eine Bande zu erkennen, die auf der Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten GlcCer-Standards gelaufen war. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass das FA2H-Enzym in den Zellen funktionell ist und zur Synthese von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden führt. Die murinen Keratinozyten zeigten im Bereich des GlcCer-Standards Unterschiede im Vergleich zu den humanen Keratinozyten, doch zwischen den WT- und FA2H-KO-Keratinozyten waren keine Unterschiede sichtbar.

Die Lipide der HaCaT- und SZ95-Zellen wurden weiterhin im Fließmittel Hexan/Toluol 15/65 aufgetrennt, um die Existenz von Wachsen zu überprüfen (Abb. 5-34 B). Parallel wurden auch isolierte Sebumlipide von einem WT-Tier mitaufgetragen. Beide Zelllinien wiesen keine Wachsdier auf. Dieses Ergebnis stimmt mit der Tatsache überein, dass das

humane Sebum im Gegensatz zum Sebum vieler Tiere mit einem Fell über keine Wachsdierester verfügt (Nikkari, 1974).



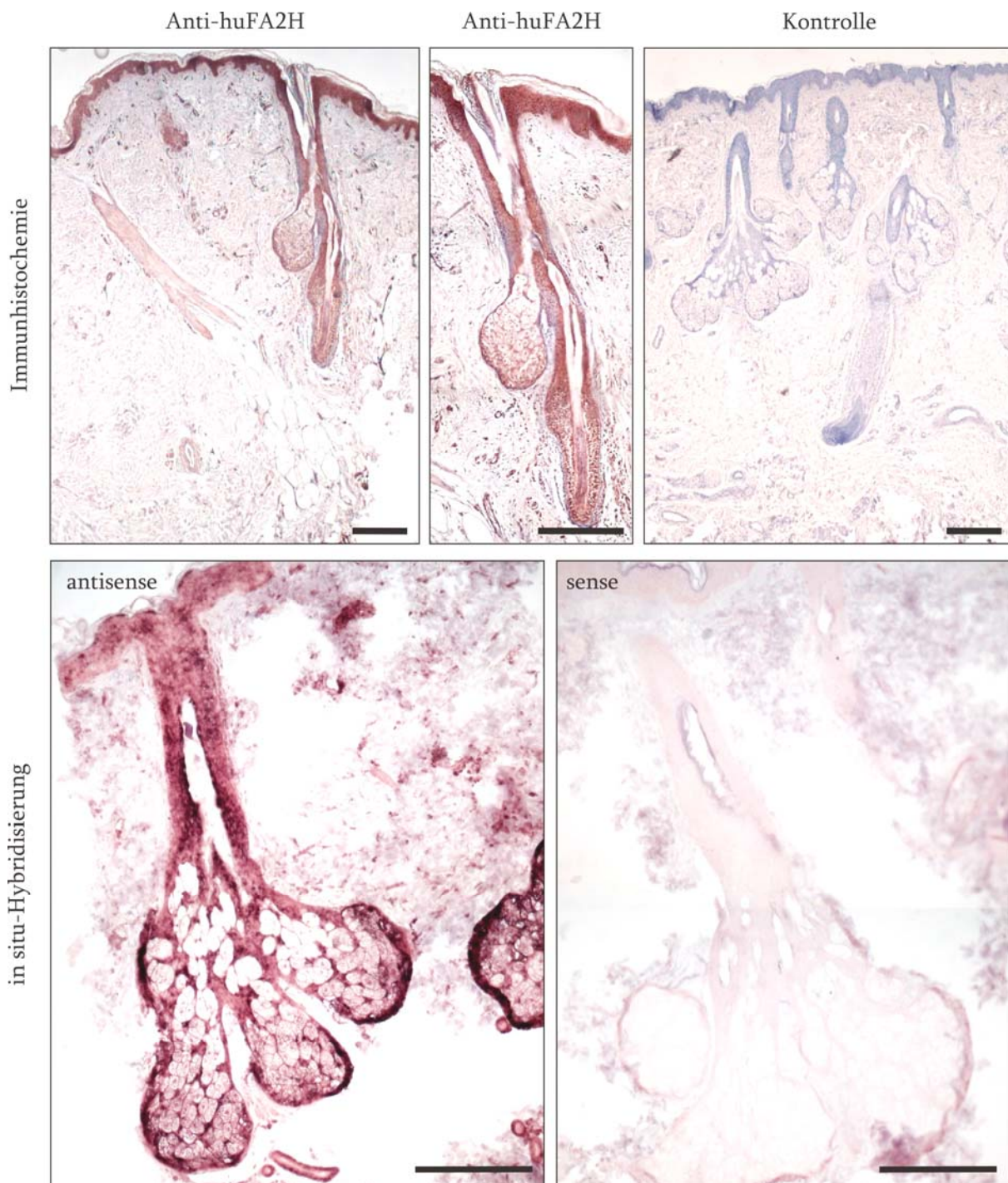
**Abb. 5-34 Lipid-Analyse von humanen Zellen.** (A) Die isolierten Zelllipide aus HaCaT- und SZ95-Zellen sowie aus humanen und murinen Keratinozyten wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie im Fließmittel Chloroform/Methanol/dH<sub>2</sub>O 65/25/4 aufgetrennt. Bei allen Zellen konnte eine Lipidbande auf der Höhe des  $\alpha$ -hydroxylierten Glucosylceramid-Standards beobachtet werden. Verwendete Abkürzungen: Chol, Cholesterol; GlcCer, Glucosylceramid;  $\alpha$ -OH-GlcCer:  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; SM, Sphingomyelin. (B) Die Lipide der SZ95- und HaCaT-Zellen wurden parallel zum Sebumextrakt aus einer WT-Maus im Laufmittel Hexan/Toluol 15/65 aufgetrennt. In beiden Zelllinien konnten keine Wachsdierester festgestellt werden. Verwendete Abkürzungen: SE, Sterolester; WME, Wachsmoester; WDE, Wachsdierester; Chol, Cholesterol.

### 5.2.3 Humane Haut

Nachdem gezeigt werden konnte, dass primäre humane Keratinozyten und die humanen, immortalisierten Zelllinien HaCaT und SZ95 das Enzym FA2H exprimieren (siehe 5.2.2), sollten auch menschliche Gewebeproben der Haut auf die FA2H-Expression untersucht

werden. Dafür wurden bereits in Paraffinblöcken eingebettete Hautstücke von fünf verschiedenen Probanden verwendet (zur Verfügung gestellt von Uschi Reuter, Bonn). Es wurden 6 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die einer immunhistochemischen Färbung der humanen FA2H unterzogen wurden. Als Negativkontrolle wurden 1) humane Hautschnitte nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert und 2) Paraffinschnitte der murinen Haut mit dem Anti-huFA2H-Antikörper inkubiert, um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers auszutesten. Zur besseren Darstellung der Hautstrukturen wurden die Schnitte nach der Inkubation mit dem DAB-Chromogen mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung wurden huFA2H-cRNA-Sonden synthetisiert, die für eine *in situ*-Hybridisierung verwendet wurden. Abbildung 5-35 zeigt repräsentative Ergebnisse der beiden durchgeführten Experimente. Die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-huFA2H-Antikörper hat eine positive braune Färbung in der Epidermis, den Haarfollikeln und in den Talgdrüsen gezeigt (Abb. 5-35). Im Gegensatz zu der Situation in der Maus, in der die FA2H nur in den Talgdrüsen nachgewiesen werden konnte (siehe 5.1.4), war im Menschen in der ganzen epidermalen Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) die Expression der FA2H zu erkennen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der vorhergehenden Experimente überein, bei denen auch in primären humanen Keratinozyten, in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und der Sebozyten-Zelllinie SZ95 die FA2H nachgewiesen werden konnte (5.2.2). Die Negativkontrolle, bei der der Hautschnitt nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurde, zeigte keine Signale und war nur durch das Hämatoxylin bläulich angefärbt (Abb. 5-35). Die murine Haut, die mit dem humanen Anti-huFA2H-Antikörper inkubiert worden war, wies ebenfalls keine positive Braunfärbung auf (Daten nicht gezeigt). Der Antikörper erkannte zwar im Western Blot das transient überexprimierte Fusionsprotein EGFP-mFA2H (siehe Abb. 5-33 A), zeigte aber in der immunhistochemischen Färbung keine Signale. Die *in situ*-Hybridisierung konnte die oben erwähnten Ergebnisse auf RNA-Ebene bestätigen. Mit einer Digoxigenin-markierten FA2H-cRNA-*antisense*-Sonde waren in der gesamten epidermalen Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) Signale erkennbar, ähnlich zu

der immunhistochemischen Analyse. Die Negativkontrolle mit einer FA2H-cRNA-*sense*-Sonde wies nach gleicher Inkubationszeit keine Färbung auf.



**Abb. 5-35 Analyse humaner Hautgewebestücke.** Paraffinschnitte von humaner Haut wurden einer immunhistochemischen Färbereaktion mit einem Anti-huFA2H-Antikörper und einer *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten FA2H-cRNA-Sonden (*antisense*, *sense* zur Kontrolle) unterzogen. Beide Versuche zeigten eine positive Färbung in der gesamten epidermalen Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*). Bei den parallel durchgeführten Negativkontrollen konnten keine Signale beobachtet werden. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m.



## 6 Diskussion

### 6.1 Hydroxylierte Lipide und die Barrierefunktion der Haut

Die FA2H ist das einzige bisher bekannte Enzym, das für die  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Reaktion von unverzweigten Fettsäuren verantwortlich ist (Hama, 2010). Die Expression der FA2H konnte mittels Northern Blot-Analysen in verschiedenen Geweben der Maus nachgewiesen werden. Eine starke Expression wurde hauptsächlich im Gehirn, in der Haut, in den Organen des Verdauungstraktes, in den Hoden und in den Nieren gezeigt (Eckhardt, 2005). Die Expression der FA2H korreliert dabei mit dem Vorkommen von  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramiden und Sphingolipiden in den jeweiligen Organen. Das Enzym FA2H wird im Menschen ebenfalls exprimiert (Alderson, 2004). Im Hinblick auf die Haut wurde gezeigt, dass die Keratinozyten in der Haut des Menschen die FA2H exprimieren und dass die in diesen Zellen synthetisierten  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide zu einer additiven Stabilisierung der lamellaren Lipidstrukturen führen und vermutlich für die Ausbildung der epidermalen Barrierefunktion von Bedeutung sind (Uchida, 2007). Neben  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren kommen in epidermalen Ceramiden sehr langkettige  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäurereste vor, die ebenfalls einen entscheidenden Beitrag zur epidermalen Barrierefunktion leisten (Bouwstra, 2006), was am folgenden Forschungsergebnis verdeutlicht wird. Die Fettsäure-Elongase 4 (ELOVL4) hat die C26- $\omega$ -OH-Fettsäure als Substrat und katalysiert die weitere Elongation zu sehr langkettigen Fettsäuren. ELOVL4-*Knock-Out*-Mäuse weisen in ihrer Epidermis keine  $\omega$ -OH-Fettsäuren mit  $\geq 28$  C-Atomen auf und zeigen eine Akkumulation von C26-Fettsäuren (Li, 2007). Die neugeborenen Tiere sterben wenige Stunden nach der Geburt aufgrund eines sehr hohen transepidermalen Wasserverlustes. Ein ähnliches Erscheinungsbild zeigen neugeborene Mäuse, die eine Keratinozyten-spezifische Defizienz für den Transkriptionsfaktor *ARNT* (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) aufweisen, dessen Verlust mit einer reduzierten Aktivität des Enzyms Desaturase-2 (DES-2) einhergeht. Dadurch haben die Tiere deutlich verringerte Mengen

am Ceramid-Grundgerüst 4-Hydroxy-Sphingarin und sterben wegen einer Dehydrierung kurz nach der Geburt (Takagi, 2003). Aufgrund dieser Beispiele, bei denen die hydroxylierten Lipide einen entscheidenden Einfluss auf die Permeabilitätsbarriere darstellten, lag die Vermutung nahe, dass eine FA2H-Defizienz in Mäusen mit einem Verlust an  $\alpha$ -hydroxylierten Lipiden einhergeht, der in der Haut zu einem Zusammenbruch der epidermalen Barrierefunktion führen könnte.

Den größten Schwerpunkt dieser Arbeit machten deshalb die Untersuchungen zur Lokalisation der FA2H in der murinen Haut und die Analyse des durch die FA2H-Defizienz bedingten Phänotyps in der Maus aus.

## 6.2 FA2H-Expression in der murinen und humanen Haut

Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass die FA2H in der murinen Haut exprimiert wird (Eckhardt, 2005). Um die genaue Lokalisation der FA2H zu bestimmen, wurden verschiedene, voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die LacZ-Färbung diente dem Nachweis des Cyt-b5- $\beta$ -Gal-Reportergens, welches in den FA2H-KO-Tieren anstatt des WT-Enzyms exprimiert wird. Mit dieser Färbemethode konnte die Expression des LacZ-Reportergens spezifisch nur in den Talgdrüsen der FA2H-KO-Tiere nachgewiesen werden. Eine parallel durchgeführte Immunfluoreszenz-Analyse mit einem FA2H-Antiserum konnte dieses Ergebnis untermauern. Der Nachweis der FA2H-Expression auf RNA-Ebene wurde mit einer *in situ*-Hybridisierung gezeigt. In der WT-Haut waren die Signale nur in den Talgdrüsen sichtbar. Die FA2H-KO-Haut wies erwartungsgemäß keine Färbung auf. Diese Beobachtung bestätigte, dass der *Knock-Out* funktionell war und dass in den FA2H-KO-Tieren tatsächlich keine nachweisbaren Mengen an FA2H-mRNA gebildet wurden. Für die Zellen der Wulstregion (*bulge*), die direkt unterhalb der Talgdrüsen liegen, konnte anhand von Co-Lokalisationsfärbungen mit Markern für die Wulst-Region (CD34) und dem FA2H-Antiserum keine FA2H-Expression nachgewiesen werden.

Die spezifische Expression der murinen FA2H in Sebozyten und das Fehlen der FA2H-Expression in Keratinozyten konnte auch mit einer primären Keratinozyten-Kultur gezeigt werden, die aus der Epidermis von neugeborenen WT- und FA2H-KO-Mäusen isoliert wurde. Die primären Keratinozyten waren positiv für die Keratine K5 und K14, die beide als Marker für basale Keratinozyten beschrieben werden (Blanpain, 2006). Die Zellen beider Genotypen haben bei einer Immunfluoreszenz-Analyse mit dem FA2H-Antiserum keine Signale aufgewiesen. Die LacZ-Färbung konnte bei den FA2H-KO-Keratinozyten allerdings eine sehr geringe Anzahl an blau gefärbten Zellen nachweisen (< 0,01 %). Es ist bekannt, dass Talgdrüsen während der Morphogenese aus basalen Keratinozyten entstehen (Fuchs, 2007), sodass vermutet werden konnte, dass die wenigen LacZ-positiven Zellen Vorläuferzellen von Sebozyten waren. Es wäre möglich, dass die basalen Keratinozyten während der Kultivierung vor allem durch einen subkonfluenten Zustand dazu angeregt wurden, in andere Zellen des Haarfollikels auszudifferenzieren. Die Möglichkeit, dass bei der Isolation der Zellen aus der Epidermis auch geringe Mengen an Sebozyten mitkultiviert wurden, kann eher ausgeschlossen werden, da die ersten Sebozyten während der Haarfollikel-Morphogenese erst 3-4 Tage nach der Geburt sichtbar werden (Paus, 1999). Für die Keratinozyten-Kultur wurden aber neugeborene Mäuse verwendet, sodass eine Mischkultur aus Keratinozyten und Sebozyten als unwahrscheinlich angesehen werden kann. Die Möglichkeit, dass in der Haut der neugeborenen Mäuse bereits Sebozyten-Vorläuferzellen existieren, die bei der Isolation der Zellen mitkultiviert wurden, kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden. Jedoch würden die sehr geringe Anzahl der LacZ-positiven Zellen und deren Kopfsteinpflaster-artige Morphologie, wie sie für Keratinozyten beschrieben ist, eher dagegen sprechen.

Im Gegensatz zu der spezifischen Expression in den Talgdrüsen der murinen Haut, konnte in humanen Hautproben ein anderes Expressionsmuster beobachtet werden. Immunhistochemische Färbungen mit einem huFA2H-Antikörper sowie eine *in situ*-Hybridisierung mit humanen FA2H-cRNA-Sonden konnten die FA2H-Expression in der Epidermis, im gesamten Haarfollikel und in den Talgdrüsen nachweisen. Die

Beobachtung der FA2H-Expression in allen Zellen der epidermalen Haar-Talgdrüsen-Einheit (*pilosebaceous unit*) wurde durch Untersuchungen an der humanen, immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp, 1988) und Sebozyten-Zelllinie SZ95 (Zouboulis, 1999) unterstützt. In beiden Zelllinien konnte die FA2H-Expression mit Hilfe einer Anti-FA2H-Immunfärbung und mittels einer RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden. Die gleichen Ergebnisse wurden in einer primären humanen Keratinozyten-Kultur festgestellt, die aus der Vorhaut männlicher Patienten gewonnen wurde. In der Immunfluoreszenz-Analyse mit einem huFA2H-Antikörper waren in den beiden Zelllinien und in der Primärkultur alle Zellen gleichermaßen stark gefärbt. Mit der RT-PCR-Analyse konnte bei der SZ95-Zelllinie ein leicht stärkeres FA2H-Signal als in den HaCaT-Zellen und den primären Keratinozyten beobachtet werden, was jedoch mit einer quantitativen *Real-Time*-PCR-Analyse nachgewiesen werden müsste. Die im Rahmen dieser Arbeit an humanem Probenmaterial durchgeführten Experimente stimmen mit früheren Ergebnissen überein, welche die FA2H-Expression in kultivierten humanen Keratinozyten und in der humanen Epidermis gezeigt haben (Uchida, 2007).

Wie das unterschiedliche FA2H-Expressionsmuster in der humanen und murinen Haut zustande kommt, kann nicht ganz geklärt werden. Es ist aber offensichtlich, dass die in der murinen Epidermis vorhandenen  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und Sphingolipide nicht durch eine FA2H-Einwirkung entstehen können, da das Enzym in den murinen Keratinozyten nicht exprimiert wird. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellen über ein zweites Hydroxylierungs-Enzym verfügen, das für die  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide verantwortlich ist. Es ist ebenfalls wahrscheinlich, dass diese zweite  $\alpha$ -Hydroxylase oder noch eine weitere Enzymvariante auch im Menschen exprimiert wird. Diese Vermutung wird durch Experimente an kultivierten Haut-Fibroblasten von FA2H-defizienten Menschen bestätigt. Die FA2H-Defizienz äußert sich bei den Patienten mit Symptomen, die vor allem das Nervensystem betreffen, und geht mit einer Leukodystrophie mit spastischer Paraparese einher (Edvardson, 2008; Dick und Eckhardt, 2010). In den isolierten Haut-Fibroblasten konnte allerdings trotz der FA2H-Defizienz eine normale

Fettsäure-2-Hydroxylase-Aktivität gemessen werden (Edvardson, 2008). Das Vorkommen einer weiteren  $\alpha$ -Hydroxylase in der humanen Haut würde erklären, warum zwar das Gehirn und das Nervensystem bei den Patienten symptomatisch betroffen sind, aber keine Symptome bezüglich eines Haut-Phänotyps in den verschiedenen Arbeiten erwähnt werden.

### 6.3 Haut- und Epidermislipide

Die FA2H-Defizienz führte im murinen Nervensystem zu einem kompletten Verlust an  $\alpha$ -hydroxyliertem Galaktosylceramid und Sulfatid (Zöller, 2008). In den jungen FA2H-KO-Mäusen konnte trotzdem anfangs eine normale Myelinausbildung im zentralen und peripheren Nervensystem beobachtet werden. Ältere Tiere (> 18 Monate) zeigten jedoch eine Degeneration in Axonen und im Myelin (Zöller, 2008). Die Analyse der Haut- und Epidermislipide erbrachte dagegen keinen Unterschied zwischen WT- und FA2H-KO-Tieren. Letztere haben trotz des funktionellen *Knock-Outs* in jeder untersuchten Altersstufe  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide in der Haut aufgewiesen. Das Ceramid- und Sphingolipid-Muster von primär aus der Epidermis von neugeborenen FA2H-KO-Mäusen isolierten Keratinozyten wich ebenfalls nicht von dem Muster der WT-Tiere ab.

Den hydroxylierten Sphingolipiden der Epidermis wird eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der epidermalen Barrierefunktion zugesprochen (Wertz, 1998). Da die FA2H-Expression in der murinen Haut spezifisch nur in den Talgdrüsen nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die in der FA2H-KO-Epidermis vorhandenen  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und Sphingolipide unabhängig von der FA2H-Expression in den Keratinozyten synthetisiert werden können. Aus diesem Grund war es nicht überraschend, dass eine Beeinflussung oder gar ein Zusammenbruch der Barrierefunktion in den FA2H-KO-Mäusen nicht beobachtet wurde.

Neben den Lipiden der abgetrennten Epidermis und der gesamten dorsalen Haut wurden auch die Lipide der Ohren untersucht. Letztere wurden zur Analyse herangezogen, um

die Menge an Triglyceriden aus der Subcutis zu reduzieren. Zusätzlich besitzen die Ohrmuscheln sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite Talgdrüsen, sodass in diesem Hautbereich den Lipiden der Talgdrüsen mehr Gewichtung zukommt. Die Lipide der FA2H-KO-Ohrmuscheln haben eine signifikante Reduktion (um ca. 70-80 %) an der Gesamtmenge von  $\alpha$ -hydroxyliertem Glucosylceramid (GlcCer) gezeigt. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass sich der größte Teil des  $\alpha$ -hydroxylierten Glucosylceramids ( $\alpha$ -OH-GlcCer) der murinen Haut in den Talgdrüsen befindet, wo die FA2H die  $\alpha$ -Hydroxylierung der Fettsäuren katalysiert. Das  $\alpha$ -OH-GlcCer scheint dabei eine besondere Funktion in den Sebozyten auszuüben, die aber bisher nicht bekannt ist.

Alle sechs bekannten Ceramidsynthasen (CerS) können  $\alpha$ -hydroxylierte Acyl-CoA-Reste als Substrate bei der Ceramidsynthese verwenden, wobei aber jede Enzym-Isoform eine Präferenz für bestimmte Fettsäure-Kettenlängen aufweist (Riebeling, 2003 und Mizutani, 2008). C20-Acyl-CoA ist ein Substrat für die CerS 2, CerS 3 und CerS 4, wobei das letztere Enzym die höchste Präferenz dafür aufweist (Mizutani, 2005). Der komplette Verlust an GlcCer mit  $\alpha$ -hydroxylierter C20-Fettsäure in den Aurikeln der FA2H-KO-Tiere und die Tatsache, dass die CerS4 spezifisch nur in den Talgdrüsen und nicht in den Keratinozyten exprimiert wird, lässt die Vermutung zu, dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide in den Talgdrüsen aufgrund des *Knock-Outs* stark reduziert sind oder sogar komplett fehlen. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten die Lipide von primär isolierten Sebozyten untersucht werden, was zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht gelungen ist. Es ist weiterhin nicht klar, ob die Menge des gesamten Glucosylceramids reduziert ist oder ob die fehlenden  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipide durch nicht-hydroxylierte Lipidformen substituiert werden. Die nicht veränderten Mengen an C16- und C26- $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer haben ihren Ursprung vermutlich in Zellen außerhalb der Talgdrüsen, die wahrscheinlich über ein zweites, bisher unbekanntes  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Enzym verfügen.

Die Art und Erscheinungsform dieser weiteren Hydroxylase, die für die  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und Sphingolipide in den murinen Keratinozyten verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt. Die in den Peroxisomen lokalisierte Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase

(PHYH) ist an der  $\alpha$ -Oxidation von 3-Methyl-verzweigten Fettsäuren beteiligt und wandelt beim Abbau der Phytansäure deren aktivierte Form Phytanoyl-CoA in 2-Hydroxy-Phytanoyl-CoA um (Watkins, 1994). In der Literatur wurde weiterhin beschrieben, dass das Enzym PHYH *in vitro* ebenfalls zur  $\alpha$ -Hydroxylierung von unverzweigten Fettsäuren befähigt ist (Mukherji, 2002). Ob das Enzym unverzweigte Fettsäuren auch *in vivo*  $\alpha$ -hydroxylieren kann und damit einen Einfluss auf die  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide der Haut hat, war bisher allerdings nicht bekannt. Die Analyse der Hautlipide von generierten PHYH-KO-Mäusen (Ferdinandusse, 2008) hat im Vergleich zu den Lipiden der WT-Tiere keine Unterschiede gezeigt. Sowohl die  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide als auch Sphingolipide waren in den PHYH-KO-Mäusen unverändert. Weiterhin führte die Überexpression der Phytanoyl-CoA-2-Hydroxylase nach einer transienten Transfektion mit dem pEGFP-mPHYH-Plasmid in HEK-Zellen zu keinen zusätzlichen  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren, die bei der Transfektion des pEGFP-mFA2H-Plasmids aber deutlich zu erkennen waren. Dieses Ergebnis widerspricht deutlich den Ergebnissen von Mukherji et al, 2002. Auch die Synthese von zusätzlichem  $\alpha$ -hydroxyliertem GlcCer konnte nach der Transfektion mit pEGFP-mPHYH nicht festgestellt werden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das PHYH-Enzym keinerlei Auswirkungen auf die  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Reaktion von unverzweigten Fettsäuren in der Haut hat und dementsprechend nicht für die Existenz von  $\alpha$ -hydroxylierten Lipiden in der Haut von FA2H-KO-Mäusen verantwortlich sein kann. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache bekräftigt, dass bei Menschen, die Mutationen im *phyh*-Gen aufweisen (Refsum-Erkrankung), hauptsächlich Symptome wie Polyneuropathie, zerebellare Ataxie und *Retinitis pigmentosa* mit Nachtblindheit beschrieben werden (Jansen, 1997), aber in der Literatur nie ein Phänotyp der Haut erwähnt wird. Die Patienten haben in seltenen Fällen trockene und schuppige Haut (Skjeldal, 1987), doch diese Tatsache kann eher auf die übermäßige Speicherung der Phytansäure in der Haut zurückgeführt werden als auf eine Störung der epidermalen Barrierefunktion, die mit einem Verlust von  $\alpha$ -hydroxylierten Lipiden einhergehen könnte.

Es ist möglich, dass die zweite Hydroxylase, die in den murinen und eventuell auch in den humanen Keratinozyten vorkommt und für die Synthese der  $\alpha$ -hydroxylierten Ceramide und Sphingolipide verantwortlich ist, ebenfalls wie das Enzym FA2H aus der Familie der Cytochrom-Enzyme stammt. In der Haut existieren einige Enzyme dieser Familie, vor allem Cytochrom-P450-Enzyme (Baron, 2008), doch bisherige Untersuchungen zur Auffindung einer weiteren, vielleicht sogar hautspezifischen Hydroxylase haben diese Vermutung noch nicht bestätigen können.

## 6.4 Sebumlipide

Unter Sebum versteht man das von den Talgdrüsen der Haut sekretierte Produkt. Es wird von den Sebozyten während ihrer Differenzierung synthetisiert und gelangt nach holokriner Ruptur der Zellen durch den Haarkanal an die Hautoberfläche. Aus diesem Grund entstammen die meisten Hautoberflächenlipide dem Sebum. Das Enzym FA2H ist neben der  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Reaktion von Fettsäuren, die in Sphingolipide eingebaut werden können, auch an der Synthese von Typ II-Wachsdiestern (WDE) beteiligt. Diese haben den größten Anteil an murinem Sebum und kommen nur in Säugetieren mit einem Fell und nicht im Menschen vor (Nikkari, 1974). Da die Menge an Wachsdiestern im Sebum der FA2H-KO-Tiere in jeder untersuchten Altersstufe signifikant reduziert war, lag die Vermutung nahe, dass die FA2H eine direkte Rolle bei deren Synthese spielt. Dabei wurde angenommen, dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren durch eine Fettsäure-Reduktase (*fatty acid reductase*, FAR1 oder FAR2) zu Alkan-1,2-Diolen reduziert werden, an deren Hydroxylgruppen eine Wachssynthase (z.B. Diacylglycerol-Acyltransferase, DGAT1) zwei Fettsäure-Acylreste bindet und damit die Typ II-WDE-Synthese vervollständigt. Mit Hilfe von *microarray*-Hybridisierungs-Experimenten und *Real-Time*-PCR-Analysen konnte die Existenz und Expression der Gene *dgat1*, *far1* und *far2* nachgewiesen werden, sodass angenommen werden konnte, dass die reduzierte WDE-Menge nicht durch eine reduzierte oder fehlende Expression dieser Gene verursacht wird, sondern vermutlich tatsächlich auf die FA2H-Defizienz zurückzuführen



ist. Da die WDE-Menge im Sebum der FA2H-KO-Mäuse zwar deutlich reduziert, aber nicht komplett fehlte, muss die Möglichkeit der Existenz eines zweiten Enzyms mit einer  $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität in Betracht gezogen werden. Es ist wahrscheinlich, dass die in den murinen Keratinozyten vermutete zweite Hydroxylase auch für die Synthese der restlichen Wachstdiester in den Sebozyten verantwortlich ist. Das zweite Hydroxylierungs-Enzym könnte regulär einen Teil der Fettsäuren  $\alpha$ -hydroxylieren, die bei der WDE-Synthese verwendet werden, oder das Enzym übernimmt diese Funktion als Kompensationsmaßnahme auf die FA2H-Defizienz. Die Analyse der aus den WDE freigesetzten 1,2-Diole spricht aber eher für die erste Möglichkeit. Die freigesetzten 1,2-Diole der FA2H-KO-Mäuse zeigten bei der dünnschichtchromatographischen Lipidauftrennung einen etwas kleineren Rf-Wert als die 1,2-Diole der WT-Tiere. Vermutlich kann das auf eine kürzere Kettenlänge in den 1,2-Diolen zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis spricht für die Möglichkeit, dass die FA2H und die zweite Hydroxylase jeweils Präferenzen bzw. eine unterschiedliche Substratspezifität bezüglich der Fettsäure-Kettenlänge aufweisen. Die FA2H wäre dementsprechend für die  $\alpha$ -Hydroxylierung von länger-kettigen und das zweite Hydroxylierungs-Enzym für die kurz-kettigen Fettsäuren verantwortlich, die anschließend zu 1,2-Diolen reduziert und für die WDE-Synthese verwendet würden. Es wäre weiterhin möglich, dass nicht wie vermutet verschiedene Kettenlängen in beiden Genotypen die unterschiedlichen Rf-Werte bedingen, sondern dass die Diole der FA2H-KO-Tiere eventuell methyliert oder anderweitig chemisch modifiziert sind, was ebenfalls zu einem veränderten Laufverhalten führen könnte. Für diese Vermutung gibt es aber derzeit keinerlei Hinweise und auch die Rolle der FA2H bzw. deren Fehlen wäre bei dieser Modifizierung nicht klar.

Dass die FA2H eine direkte Rolle bei der WDE-Synthese spielt, konnte *in vitro* in Zellkulturmodellen nicht nachgewiesen werden. Es wurden für diese Versuche unterschiedliche Plasmide einzeln und in Kombination in verschiedene Zelllinien transient transfiziert, für deren Proteinprodukte vermutet wurde, dass sie für die WDE-Synthese von Bedeutung sind. Für das Enzym DGAT1 (Diacylglycerol-Acyltransferase 1) ist in der Literatur beschrieben worden, dass es die Synthesereaktion

von Wachsmonoestern (WME) und Wachsdiestern (WDE) katalysiert, wenn dem Versuchsansatz Fettalkohole (Mono- und Di-ole) und Fettsäuren zugesetzt wurden (Yen, 2005). Für die beiden Enzyme DGAT2 und mWS (Wachssynthase) wurde nachgewiesen, dass sie bei der Synthese von Wachsmonoestern eine Rolle spielen (Cheng, 2004). Aus diesem Grund wurden diese Enzyme zusammen mit zwei Fettsäure-Reduktasen (mFAR1 und mFAR2) und der mFA2H bei den Experimenten für die *in vitro* WDE-Synthese verwendet. Zwar konnte nach Transfektion der Plasmide die Expression aller Enzyme mittels Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analyse nachgewiesen werden, jedoch schienen einzelne Enzyme nicht aktiv zu sein, da bei der Untersuchung der Lipide nicht die erwarteten Lipide nachgewiesen werden konnten. Die Tatsache, dass in den Zellen eventuell für die katalytische Reaktion nicht ausreichende Mengen exprimiert wurden, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da bei den in der Literatur beschriebenen Arbeiten Insektenzellen (Sf9) verwendet wurden, die mit rekombinanten Baculoviren infiziert wurden, was im Regelfall vermutlich eine höhere Proteinexpression bedingt (Yen, 2005).

Nur nach Transfektion der Plasmide pEGFP-mFA2H, pEGFP-Flag-mFAR1 und pFlag-mWS konnten zusätzlich synthetisierte Lipide beobachtet werden. Dazu zählten vermehrte Mengen an  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren und möglicherweise von Diolen nach Transfektion mit pEGFP-mFA2H, vermehrte Mengen an Fettalkoholen durch die Fettsäure-Reduktase-Aktivität der mFAR1 und die Synthese von Wachsmonoestern durch Einwirkung der mFAR1 zusammen mit der murinen Wachssynthase (mWS). Durch die Expression aller drei Enzyme konnte allerdings keine Synthese von Wachsdiestern nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Expression der drei Enzyme mFA2H, mFAR1 und mWS *in vitro* nicht zur Synthese von Wachsdiestern führt. Entweder weil noch weitere Enzyme oder bisher unbekannte Faktoren bei der WDE-Synthese von Bedeutung sind oder weil die murine Wachssynthase generell nicht für die WDE-Synthese verantwortlich ist. In der Literatur wurde für dieses Enzym zwar die Synthese von Wachsmonoestern beschrieben (Cheng, 2004), ob aber das Enzym auch auf die Synthese von Wachsdiestern untersucht wurde, geht aus dieser Arbeit nicht

hervor. Möglicherweise würde die Expression der drei Enzyme mFA2H, mFAR1 und DGAT1 zur Synthese von WDE führen, da für das letztere Enzym in der Literatur ein Einfluss bei der Synthese von WME und WDE beschrieben worden ist (Yen, 2005). Diese Vermutung konnte eventuell aufgrund von zu geringer DGAT1-Expression oder der Expression eines nicht funktionellen Enzyms nicht bestätigt werden.

Als Alternative zu einem direkten Einfluss der FA2H bei der WDE-Synthese besteht die Möglichkeit, dass  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren oder Sphingolipide einen regulatorischen Einfluss auf die Substrate oder Enzyme, die bei der WDE-Synthese eine Rolle spielen, ausüben und diese über einen bisher unbekanntem Mechanismus steuern. Sphingolipide wurden in der Literatur bereits häufig als bioaktive Signalmoleküle beschrieben (Hannun, 2008). Dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren oder Sphingolipide die Expressionsmenge der Enzyme, die für die WDE-Synthese als wichtig erachtet werden, tatsächlich beeinflussen, konnte in den durchgeführten Experimenten allerdings nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe von *microarray*-Hybridisierungs-Experimenten und quantitativen *Real-Time*-PCR-Analysen konnte zwar festgestellt werden, dass in den FA2H-KO-Tieren die Expression einiger teilweise Talgdrüsen-spezifischer Gene um das 2-3-fache hochreguliert war, doch diese Zunahme ging vermutlich allein mit der beobachteten Talgdrüsen-Hyperplasie einher und konnte nicht auf eine gezielte Gen-Hochregulation zurückgeführt werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren oder Sphingolipide über einen anderen, bisher unbekanntem Weg die WDE-Synthese steuern und diese deshalb in den FA2H-KO-Tieren verändert ist. In der Literatur konnte für das Sphingolipid Glucosylceramid gezeigt werden, dass dessen Existenz in Melanozyten Voraussetzung für eine geregelte intrazelluläre Sortierung der melanosomalen Proteine Tyrosinase und Tyrosinase-verwandtes Protein 1 (Tyrp 1) sowie für eine normale Biogenese der Melanosomen ist (Groux-Degroote, 2008). In der Melanozyten-Zelllinie GM95, die eine Glykosphingolipid-Defizienz aufweist, ist der intrazelluläre Transport der Tyrosinase und des Tyrp1 gestört, sodass die Zellen kein Melanin mehr synthetisieren können und folglich nicht zur Pigmentierung fähig sind (Sprong, 2001). Möglicherweise hat  $\alpha$ -hydroxyliertes GlcCer

einen ähnlichen Einfluss auf intrazelluläre Transportvorgänge in Sebozyten und ist verantwortlich für die Sortierung von Proteinen oder anderen bisher unbekanntem Faktoren, die bei der Synthese der Wachsdierster eine entscheidende Rolle spielen. Für diese Vermutung gibt es aber derzeit keine konkreten Hinweise und es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese Hypothese zu bestätigen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung des Sebums in den FA2H-KO-Tieren veränderte dessen physikochemische Eigenschaften und hatte einen signifikant erhöhten Schmelzpunkt zur Folge. Während das Sebum der WT-Mäuse bei der normalen Körpertemperatur von 37°C zu schmelzen begann, konnte das beim Sebum der FA2H-KO-Tiere erst bei über 50°C beobachtet werden. Zum veränderten Schmelzpunkt trugen wahrscheinlich sowohl die reduzierte WDE-Menge und der starke Anstieg an Wachsmonoestern als auch die leicht, aber signifikant erhöhten Mengen an Cholesterol und freien Fettsäuren bei. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass das Sebum der FA2H-KO-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren solider und wachsartiger ist und dass dadurch kein geschmeidig fließender Transport des Sebums aus den Talgdrüsen durch den Haarkanal an die Hautoberfläche ermöglicht wird. Diese Veränderungen sind wahrscheinlich der Grund für den Haar-Phänotyp, der in den FA2H-KO-Mäusen beobachtet und im Folgenden noch ausführlicher besprochen wird.

Die Sebumlipide der Talgdrüsen, die sehr apolare Lipide und Wachse beinhalten, bilden mit ihren Öl-artigen Eigenschaften einen Film auf der Hautoberfläche und dem Fell aus, der eine wasserabweisende Wirkung hat (Eisinger, 2011). Dass die richtige Zusammensetzung des Sebums eine wichtige Rolle dabei spielt, zeigen DGAT1-KO-Mäuse (Diacylglycerol-Acyltransferase). Der komplette Verlust von Typ II-Wachsdierstern im Sebum dieser Tiere führte zu einer verminderten Wasserabstoßung und einer defekten Thermoregulation (Chen, 2002). Die unterschiedliche Sebum-Zusammensetzung und die signifikante Reduktion der WDE in den FA2H-KO-Tieren verursachte allerdings keine Veränderung in der Fähigkeit Wasser abzustößen, was möglicherweise mit der, im Gegensatz zu den DGAT1-KO-Mäusen, noch gering vorhandenen WDE-Menge erklärt werden kann.

## 6.5 Verzögerte Fellentwicklung und zyklisch auftretende Alopezie in FA2H-KO-Tieren

In FA2H-KO-Mäusen konnte während der Haarfollikel-Morphogenese eine um zwei Tage verzögerte Fellentwicklung beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis wurde auch in einer durch Depilation induzierten anagenen Phase festgestellt. Das verzögerte Herauswachsen der Haare ähnelte dabei den Beobachtungen, die 1965 in der *Asebia*-Maus zum ersten Mal beschrieben worden sind. Diese entstand durch eine spontane Mutation und ist durch fehlende Talgdrüsen, Hyperkeratose und Alopezie charakterisiert (Gates, 1965). Später konnte gezeigt werden, dass in der *Asebia*-Mutation das *Scd1*-Gen betroffen ist, das für das Protein Stearoyl-CoA-Desaturase1 (*Scd1*) codiert (Sundberg, 2000), welches in der murinen Haut spezifisch nur in den Talgdrüsen exprimiert wird (Stenn, 2001). Die *Scd1*-defizienten-Tiere weisen hypoplastische Talgdrüsen auf und die Sebumproduktion ist entweder auf ein Minimum reduziert oder fehlt komplett. Bei der genaueren Untersuchung der Sebumlipide konnte festgestellt werden, dass die Menge an Sterolestern und Cholesterol stark reduziert ist und die Typ II-Wachsdierester in diesen Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren komplett fehlen (Sundberg, 2000). Die Haare der Mäuse wachsen aufgrund von Verstopfungen mit verhorntem Zellmaterial in der *follicula ostia* später heraus, was vermutlich auf die veränderte bzw. defiziente Sebumproduktion zurückzuführen ist. Zwar waren die Talgdrüsen in den FA2H-KO-Tieren nicht hypoplastisch, doch die unterschiedliche Zusammensetzung des Sebums hatte veränderte physikochemische Eigenschaften zur Folge, was mit einer Schmelzpunkterhöhung und eventuell einer höheren Viskosität einherging. Diese Veränderungen führten vermutlich zu den beobachteten, OilRed-positiven Verstopfungen in den Haarkanälen von 9 Tage alten Tieren, die das Herauswachsen der Haarschäfte während der Morphogenese zum normalen Zeitpunkt verhinderten.

Eine um zwei Tage verzögerte Fellentwicklung wurde auch in Mäusen beschrieben, die defizient für die lysosomale Protease Cathepsin L (*CtsL*) sind. Die Tiere zeichnen sich durch einen periodischen Haarverlust, epidermale Hyperplasie und Hyperkeratose aus

(Roth, 2000). Die Verzögerung des Haarwachstums wurde durch eine fehlerhafte Differenzierung und proteolytische Abschuppung von Zellen der inneren Wurzelschicht (*inner root sheath*, IRS) im Bereich der Talgdrüsen erklärt, die zu Verstopfungen in den Haarkanälen mit IRS-Material und nicht abtransportiertem Sebum führten und das Herauswachsen der Haare verhinderten (Tobin, 2002). In den FA2H-KO-Tieren konnten keine Veränderungen innerhalb der inneren Wurzelschicht beobachtet werden, aber die verminderte Fluidität des unterschiedlich zusammengesetzten Sebums reichte vermutlich schon alleine aus, um die Haarkanäle zu blockieren und das Herauswachsen der Haarschäfte zu verzögern. Ob CtsL einen Einfluss auf die Sebumproduktion und die Zusammensetzung der Lipide hat, ist nicht klar, da das Sebum der CtsL-KO-Tiere in den oben erwähnten Arbeiten nicht untersucht wurde. Die Möglichkeit aber, dass CtsL regulatorische Funktionen in den Sebozyten ausübt und damit die Sebumproduktion beeinflusst, kann hier nicht ausgeschlossen werden.

Neben der verzögerten Fellentwicklung zeigten die FA2H-KO-Tiere eine progrediente zyklische Alopezie, die in jeder telogenen Phase beobachtet werden konnte. Anfangs wuchsen die Haare zwar wieder normal nach, aber mit der Zeit und dem fortwährenden zyklischen Haarverlust wurden die FA2H-KO-Tiere komplett kahl. Im Normalfall werden in WT-Mäusen die Haare in telogenen Haarfollikeln nicht abgestoßen, sondern verbleiben über mehrere Zyklen hindurch im Haarfollikel, bis sie schließlich in einer separaten Phase (exogen) kontrolliert abgeworfen werden (Tobin, 2002). Während dieser Haarzyklen entsteht in jedem Haarfollikel bereits ein neuer Haarschaft, der den Verlust nach exogener Phase ausgleicht, sodass der reguläre wiederkehrende Haarverlust im Normalfall keine Haarlosigkeit zur Folge hat (Schneider, 2009). In den FA2H-KO-Tieren konnte in jeder telogenen Phase ein Haarverlust beobachtet werden. Das Nachwachsen der Haare konnte den zyklischen Verlust nicht ausgleichen, sodass die Tiere einen progredienten Haarverlust aufwiesen und im Alter von ca. 1 Jahr am Bauch und Rücken komplett kahl waren. Der beobachtete Haarverlust ist vermutlich mit der veränderten Sebumzusammensetzung in den FA2H-KO-Tieren und dessen erhöhter Viskosität zu erklären. Das solidere Sebum kann nicht regulär zur Hautoberfläche abtransportiert

werden und verstopft dabei den Bereich des Infundibulum, den trichterförmigen Bereich des Haarfollikels, der sich zwischen dem Talgdrüsenkanal-Ausgang und dem Follikelostium befindet. Die starren Sebumpfropfen üben dabei möglicherweise einen Druck in ihrer Umgebung aus und führen damit zu einer Weitung des Gewebes, das sowohl oberhalb als auch unterhalb des Infundibulums liegt. Diese mechanische Gewebedehnung verursacht eventuell Kontaktverluste zwischen den einzelnen Haarfollikelschichten oder miteinander zusammenhängenden Zellen im Follikelostium. Dadurch wird die feste Verankerung des sogenannten Kolbenhaars (*club hair*) in der telogenen Phase nicht mehr gewährleistet, das Haar verbleibt zunächst lose im Haarfollikel und fällt letztendlich aus. Der Effekt wird vermutlich durch Reibung und eventuelles Kratzen der Tiere verstärkt. Eine weitere Erklärung wäre, dass der Haarverlust durch den Abtransport der Sebumpfropfen eingeleitet und gefördert wird. Neben der Möglichkeit der instabilen Haar-Verankerung kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass durch die eingelagerten Sebumpfropfen bestimmte Signale ausgehen, durch die eine frühzeitige exogene Phase eingeleitet wird, die sich jeder telogenen Phase anschließt und deshalb zum progredienten Haarverlust in den FA2H-KO-Mäusen führt.

Die durch spontane Mutation entstandene *furless*-Maus wurde bereits 1954 beschrieben. Die Tiere zeigten einen periodisch auftretenden Haarverlust und die Epidermis wies eine Hyperplasie und Hyperkeratose auf (Green, 1954). Erst später konnte gezeigt werden, dass der *furless*-Phänotyp die Folge einer Punktmutation im Cathepsin L (*ctsl*)-Gen war (Roth, 2000). In der *furless*-Maus wurden ebenfalls weit geöffnete Haarkanäle und eine fehlerhafte Formation der Kolbenhaare (*club hair*) für die zyklische Alopezie verantwortlich gemacht, wobei der Haarverlust hier aber in der katagenen Phase beobachtet wurde (Roth, 2000).

Eine weitere spontane Mutation, die in Mäusen zu einem kompletten Haarverlust führt, wird als *Defolliculated* bezeichnet (Porter, 2001). Die Tiere zeigen eine abnormale Talgdrüsen-Differenzierung, die mit nur einer geringen oder gar keinen Sebumproduktion einhergeht und dadurch zum Verlust aller Haarfollikel führt. Zusammen mit der

*Asebia*-Maus verdeutlicht diese Mutation die Bedeutung der Talgdrüse und des Sebums und zeigt, dass die Talgdrüse nicht nur der Produktionsort eines natürlichen Emollients ist, sondern Einfluss auf die komplette Haarfollikelbiologie und auch auf den Haarzyklus hat. Mäuse und Ratten, die mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt wurden, zeigten eine primäre Degeneration der Talgdrüsen, die anschließend mit einem kompletten Haarverlust einherging (Selleri, 2006). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Chemotherapie-induzierte Alopezie wahrscheinlich eine Folge der fehlenden Talgdrüsenfunktion ist und unterstreicht damit die Bedeutung der Talgdrüsen für den gesamten Haarfollikel und das Haarwachstum. Weitere *in vitro* Experimente an der humanen, immortalisierten Sebozyten-Zelllinie SZ95 konnten nachweisen, dass Doxorubicin den Differenzierungsprozess in den Zellen induziert und zu einer frühzeitigen Apoptose der Sebozyten führt (Selleri, 2006). Es kann weiterhin vermutet werden, dass in der Pathogenese einiger Formen der humanen, narbenbildenden Alopezie ebenfalls eine primäre Mitwirkung der Talgdrüsen besteht (Stenn, 2001), sodass die erwähnten Tiermodelle zusammen mit der FA2H-KO-Maus eine gute Basis zur Erforschung dieser Erkrankung darstellen. Da in den FA2H-KO-Mäusen die Talgdrüsen nicht wie in der *Asebia*- und *Defolliculated*-Maus degeneriert sind, können mit diesem Mausmodell sowohl Talgdrüsen-spezifische Signale als auch Sebum-relevante Einflüsse auf die Haarfollikel-Entwicklung und auf den Haarzyklus untersucht werden.

## 6.6 FA2H-Defizienz verursacht eine Talgdrüsen-Hyperplasie

Histologische Untersuchungen der murinen Haut haben gezeigt, dass die Talgdrüsen der FA2H-KO-Tiere während der Morphogenese und in einer nach Depilation induzierten anagenen Phase signifikant vergrößert waren. Eine Immunfluoreszenz-Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 konnte eine erhöhte Menge an proliferierenden, undifferenzierten Sebozyten im basalen Außenbereich der Talgdrüsen und teilweise auch im oberen Bereich der äußeren Wurzelschicht nachweisen. Eine BrdU-Markierung konnte ebenso eine vermehrte Anzahl sich teilender Zellen im basalen Außenbereich der



Talgdrüsen darstellen. Dementsprechend konnte der Schluss gezogen werden, dass die FA2H-Defizienz in den Wachstumsphasen des Haarzyklus zu einer Hyperproliferation der Sebozyten bzw. deren Vorläuferzellen führt und damit die Talgdrüsen-Hyperplasie bedingt.

*Microarray*-Hybridisierungs-Experimente und quantitative *Real-Time*-PCR-Analysen haben gezeigt, dass die Menge der Gen-Expression für einige Liganden der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-/ ErbB-Rezeptoren in der Haut von FA2H-KO-Mäusen um den Faktor 2,4-9,4 hochreguliert war. Darunter waren z.B. Epigen (*Epgn*),  $\beta$ -Cellulin, Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (*heparin-binding EGF-like growth factor*) und Neuregulin 4. Eine Hochregulation um den Faktor 2-3 kann wahrscheinlich alleine auf die beobachtete Talgdrüsen-Hyperplasie zurückgeführt werden. Der starke Anstieg der Gen-Expression von *epgn* um den Faktor 9,4, der vor allem während der Morphogenese zwischen P6 und P10 und in einer nach Depilation induzierten anagenen Phase, aber nicht in der telogenen Phase, beobachtet wurde, ging zeitlich gesehen der Hyperproliferation der Talgdrüsen voran und kann vermutlich für diese verantwortlich gemacht werden. Eine *in situ*-Hybridisierung an P10-Hautschnitten von FA2H-KO-Mäusen konnte den signifikanten Anstieg der Epigenmenge ebenfalls in den basalen Zellen der Talgdrüsen und in benachbarten Bereichen nachweisen.

Die Signalwege über die EGF-/ ErbB-Rezeptoren sind in der Haut von Bedeutung, da das zyklische Wachsen der Haare durch den Einfluss diverser Wachstumsfaktoren reguliert wird (Mak, 2003). Für den Liganden EGF konnte gezeigt werden, dass dessen Expression die anagene Phase und das Haarwachstum initiiert und dass bei einer kontinuierlichen EGF-Einwirkung der Übergang von der anagenen zur katagenen Phase inhibiert wird (Mak, 2003). Epigen ist ein EGF-ähnlicher Faktor, der eine viel geringere Affinität zum EGF/ErbB-Rezeptor aufweist, aber sich durch eine hohe mitogene Aktivität auszeichnet (Kochupurakkal, 2005). Eine selektive Überexpression von Epigen in der Haut von Mäusen hatte stark vergrößerte Talgdrüsen und ein verzögertes Herauswachsen der Haare zur Folge (Dahlhoff, 2010). Beide Beobachtungen ähneln stark dem Phänotyp der hier untersuchten FA2H-KO-Tiere und bekräftigen die Vermutung, dass die stark erhöhte

Epigen-Expression für die Talgdrüsen-Hyperplasie verantwortlich ist. Da die Epigen-Signale in der *in situ*-Hybridisierung nicht nur im Bereich der Talgdrüsen gefunden wurden, sondern auch benachbarte Zellen der äußeren Wurzelschicht, die keine FA2H exprimieren, gefärbt waren, liegt die Vermutung nahe, dass die FA2H-Expression bzw. die  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren oder Sphingolipide keinen direkten Einfluss auf die Epigen-Expression haben. Es ist wahrscheinlicher, dass die FA2H bzw. ihre Produkte bisher unbekannte Signalwege beeinflussen, welche die Epigen-Expression eventuell über einen parakrinen Sekretionsmodus beeinträchtigen. Dass die FA2H-Menge keinen direkten Einfluss auf die Epigen-Expression hat, konnte ebenfalls mit *in vitro* Experimenten an der humanen Zelllinie HaCaT gezeigt werden. Trotz signifikant erhöhter FA2H-Überexpression nach transienter Transfektion der Plasmide pEGFP-huFA2H und pEGFP-mFA2H konnte mittels *Real-Time*-PCR-Analyse kein Einfluss auf die Epigen-Expression festgestellt werden. Da die FA2H-Defizienz in den FA2H-KO-Mäusen zu einer signifikanten Hochregulation der Epigen-Expression geführt hatte, hätte eventuell eine FA2H-Überexpression im Umkehrschluss zu einer reduzierten Epigen-Expression führen können. Das war aber nicht der Fall. Es ist allerdings auch nicht bekannt, ob und wie sich eine erhöhte FA2H-Menge auf die Epigen-Menge auswirken mag. Ein Grund warum nach FA2H-Überexpression keine veränderte Epigen-mRNA-Menge beobachtet wurde, könnte weiterhin darin liegen, dass eine transiente FA2H-Expression von 24h zeitlich gesehen nicht ausreicht, um einen deutlichen Einfluss auf die Epigen-Expression zu haben. Aus diesem Grund müssten stabil transfizierte HaCaT-Zellklone zur Analyse herangezogen werden.

Nach der Transfektion von huFA2H-siRNA konnte eine FA2H-mRNA-Reduktion von ca. 60 % beobachtet werden. Diese reichte allerdings nicht aus, um einen sichtbaren Einfluss auf die Epigenmenge auszuüben. Wahrscheinlich ist eine komplette FA2H-Defizienz, wie sie in den FA2H-KO-Tieren vorliegt, notwendig, um die Epigen-Expression hochzuregulieren. Die noch zu 40 % vorhandene FA2H-Menge hatte dementsprechend keinen regulatorischen Effekt auf die Epigen-Expression. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendete humane Keratinozyten-Zelllinie

für diese Experimente nicht geeignet war, da die Epigen-*in situ*-Hybridisierung an murinen Hautschnitten keine erhöhten Signale in den Keratinozyten, sondern nur in den Sebozyten und den Zellen der äußeren Wurzelschicht gezeigt hat. Die HaCaT-Zellen exprimieren zwar sowohl die FA2H als auch Epigen, aber diesen Zellen fehlt womöglich ein bestimmender Faktor, der die FA2H und Epigen in einen direkten Zusammenhang bringt. Versuche an der vermutlich besser geeigneten humanen Sebozyten-Zelllinie SZ95, die ebenfalls sowohl FA2H als auch Epigen exprimiert, konnten aufgrund der sehr schlechten Transfizierbarkeit dieser Zellen aber nicht durchgeführt werden.

Diversen Sphingolipiden, vor allem Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-Phosphat, Ceramid-1-Phosphat und Lyso-Sphingomyelin, wird eine bioaktive Signalfunktion nachgesagt, die z.B. das Zellwachstum, den Alterungsprozess, die Zellmigration und die Angiogenese beeinflussen kann (Hannun, 2008). Für die  $\alpha$ -hydroxylierte Ölsäure konnte eine anticancerogene Wirkung in humanen Lungenkrebs-Zellen (A549) und Leukämie-Jurkat-Zellen gezeigt werden (Lladó, 2009). Dabei soll die  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure die Expression der Dihydrofolat-Reduktase hemmen, was einen Zellzyklus-Arrest und Apoptose der Zellen verursacht. Inwieweit auch andere  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide regulatorisch wirken und ob vor allem die  $\alpha$ -Hydroxylgruppe als Modifikation dabei eine besondere Funktion ausübt, ist allerdings nicht bekannt.

Bisherige Arbeiten haben gezeigt, dass das Enzym FA2H einen negativen regulatorischen Einfluss auf den Zellzyklus zu haben scheint und den cAMP-abhängigen Zellzyklus-Austritt in D6P2T-Schwanzzellen der Ratte fördert (Alderson, 2009). Weiterhin wurde beschrieben, dass die mittels siRNA-Transfektion bedingte Inhibition der FA2H-Expression in 3T3-L1 Adipozyten zu einer veränderten Mobilität von sogenannten *lipid raft*-Lipiden und zu einer Reduktion von GLUT4 und Insulinrezeptor-Proteinen aufgrund von deren verstärkter Degradation geführt hatte (Guo, 2010). Diese Ergebnisse zeigen also deutlich, dass  $\alpha$ -hydroxylierte Sphingolipide als mögliche Kandidaten zur Beeinflussung von Signaltransduktionswegen in Frage kommen und in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden sollten.

## 6.7 Präputialdrüsen

Präputialdrüsen sind stark modifizierte, paarweise vorkommende, holokrine Talgdrüsen, die unabhängig von einem Haarfollikel vorkommen (Zhang, 2008). Sie existieren in fast allen männlichen Nagetieren und sind hauptsächlich für die Produktion von Pheromonen verantwortlich, die beim Paarungsverhalten und bei der Territorialabgrenzung eine wichtige Rolle spielen (Smith, 2008). Ähnlich wie in den Talgdrüsen der Haut konnte die FA2H-Expression in den Präputialdrüsen der FA2H-KO-Tiere über eine positive LacZ-Färbung gezeigt werden. Bei der Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie war bei den FA2H-KO-Männchen kein  $\alpha$ -hydroxyliertes Glucosylceramid ( $\alpha$ -OH-GlcCer) mehr nachweisbar. Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, dass die in den Ohrmuscheln beobachtete signifikante Reduktion an  $\alpha$ -OH-GlcCer tatsächlich alleine auf die FA2H-Defizienz in den Talgdrüsen zurückzuführen ist und dass für die noch gering vorkommenden Mengen an C16- und C26- $\alpha$ -OH-GlcCer andere Zellen verantwortlich sein müssen.

Das Sebum der Präputialdrüsen hatte beim Vergleich von WT- und FA2H-KO-Tieren keine Unterschiede gezeigt. Die Präputialdrüsen synthetisieren im Gegensatz zu den Talgdrüsen der Haut keine Wachsdierester (WDE), sodass die FA2H-Defizienz hier keine Auswirkungen hatte. Die Synthese der anderen apolaren Lipide ist unabhängig von der FA2H-Expression und blieb folglich unverändert. Die vorhandenen Wachsmoester (WME) haben ein etwas anderes Laufverhalten als die des Sebums gezeigt, was die Aussage bestätigt, dass die Lipide der verschiedenen Talgdrüsen im Körper nicht nur sehr spezie-spezifisch sind, sondern auch im Vergleich untereinander ein unterschiedliches Lipidmuster und Laufverhalten haben (Nikkari, 1974).

Neben der unterschiedlichen Lipid-Zusammensetzung haben die Präputialdrüsen noch einen weiteren Unterschied gezeigt. Während bei den Talgdrüsen der FA2H-KO-Haut während der Morphogenese und nach Depilation eine Hyperplasie beobachtet wurde, konnten diese Größenunterschiede in den Präputialdrüsen nicht festgestellt werden. Die Größenanalyse der Präputialdrüsen von älteren Tieren zeigte bei den FA2H-KO-Mäusen keine Größenzunahme. In 10 Tage alten Mäusen waren die Präputialdrüsen noch nicht

sichtbar und konnten aus diesem Grund nicht untersucht werden. Im Gegensatz zu den Talgdrüsen der Haut, deren Größe vom Haarzyklus abhängt und in den verschiedenen Phasen deutlich variiert (Paus, 1999), ist dies in Präputialdrüsen nicht beschrieben worden.

Vermutlich ist die Hyperplasie der Talgdrüsen in der FA2H-KO-Haut auf eine Hochregulation des EGF-ähnlichen Faktors Epigen zurückzuführen. Inwieweit die Liganden der EGF-/ ErbB-Rezeptoren Einfluss auf die Entwicklung und die Größe der Präputialdrüsen haben ist nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor in verschiedenen Geweben des männlichen Reproduktionstrakts und den begleitenden Sexualdrüsen der Ratte vorkommt (Traish, 1987 und Suárez-Quian, 1990). Das operative Entfernen der Unterkieferspeicheldrüse, die in Nagetieren die bedeutendste Quelle von EGF darstellt, resultierte in einer signifikanten Reduktion der EGF-Konzentration im Plasma der Ratten. Diese Beobachtung hatte eine veränderte Morphologie der Präputialdrüsen zur Folge und beeinflusste deren sekretorische Funktion (de Luna, 2009). Ob aber auch Epigen in den Präputialdrüsen exprimiert wird und dort deren Wachstum aufgrund der FA2H-Defizienz eventuell anders reguliert, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

## 6.8 Mutationen im humanen *Fa2h*-Gen

SPG35 ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die zu der Gruppe der erblich bedingten spastischen Paraplegien (HSP, *hereditary spastic paraplegia*) gehört. Diese Form der Paraplegie ist in den betroffenen Patienten mit einer geistigen Behinderung und Anfällen assoziiert. Aufgrund dieser zusätzlichen neurologischen Abnormalitäten wird von einer komplizierten Form der Paraplegie gesprochen (Dick und Eckhardt, 2010). Magnet-Resonanz-Tomographie-Aufnahmen zeigten bei den betroffenen Patienten starke Veränderungen in der weißen Substanz des Gehirns, die auf eine Leukodystrophie hindeuten (Dick und Eckhardt, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass SPG35 durch Mutationen im humanen *Fa2h*-Gen hervorgerufen wird. Es wurden dabei in zwei

Familien zwei Mutationen nachgewiesen: eine FA2H-18bp-Deletionsmutante ( $\Delta$ 18bp R53\_I58) und eine FA2H-Punktmutante (R235C). Die *in vitro* Untersuchungen zur  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität der beiden FA2H-Mutanten konnten eine signifikant reduzierte enzymatische Aktivität im Vergleich zum WT-Enzym zeigen. Dafür wurden die mutierten Enzymformen in CHO-K1-Zellen, die endogen keine FA2H exprimieren und folglich keine  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide synthetisieren (Eckhardt, 2005), transient transfiziert. Nach metabolischer Markierung der Zellen mit [ $^{14}$ C]-Serin und anschließender Lipidextraktion wurde die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem Ceramid ( $\alpha$ -OH-Cer) und  $\alpha$ -hydroxyliertem Glucosylceramid ( $\alpha$ -OH-GlcCer) bestimmt. Die Transfektion der beiden Mutanten hatte im Vergleich zur Transfektion des WT-Enzyms eine signifikante Reduktion der  $\alpha$ -OH-Cer- und  $\alpha$ -OH-GlcCer-Menge zur Folge. Dabei war die Menge der  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide nach Transfektion der FA2H-18bp-Deletionsmutante ( $\Delta$ 18bp R53\_I58) stärker reduziert als nach Transfektion der FA2H-Punktmutante (R235C). Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die in der Deletionsmutante deletierten Aminosäuren 53-58 in der Cytochrom-b5-Domäne lokalisiert sind, welche für die enzymatische Aktivität essentiell ist (Alderson, 2004). Die Deletion in diesem Bereich hat damit einen schwerwiegenderen Effekt auf die  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Aktivität der FA2H als die Punktmutation an Position 235, die im Vergleich zu einem geringeren Aktivitätsverlust führt. Dieser Aktivitätsunterschied hat auch einen unterschiedlichen Schweregrad der Erkrankung zur Folge, wobei die Patienten mit der FA2H-18bp-Deletionsmutante einen schwerwiegenderen Phänotyp aufweisen (Dick und Eckhardt, 2010). Neben den beiden hier untersuchten FA2H-Mutanten sind in der Literatur noch zwei weitere Mutationen im *Fa2h*-Gen des Menschen beschrieben worden, die sich ebenfalls durch ein schweres Krankheitsbild mit Leukodystrophie, spastischer Paraparese und Dystonie auszeichnen (Edvardson, 2008). Zum einen konnte eine FA2H-Punktmutation (D35Y) in der Cytochrom-b5-Domäne an Position 35 nachgewiesen werden, die in *in vitro* Untersuchungen zu einem kompletten Aktivitätsverlust des Enzyms geführt hatte. Weiterhin konnte eine Splice-Mutation (c.786+1G $\rightarrow$ A) identifiziert werden, die aufgrund der Auslassung von Exon 5 und 6 ein

um 426 bp verkürztes cDNA-Fragment zur Folge hatte. Bei dieser Mutation war die Sterol-Desaturase-Domäne der FA2H betroffen, was ebenfalls mit einem Aktivitätsverlust des Enzyms einherging (Edvardson, 2008). Eine weitere in Patienten nachgewiesene Mutation war die D35Y-FA2H-Punktmutation an Position 35 der Cytochrom-b5-Domäne, die in *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zu einem kompletten Aktivitätsverlust des Enzyms geführt hatte (Edvardson, 2008). Dabei wurde in der erwähnten Arbeit die Umwandlung von [3,3,5,5-D4]-Tetracosansäure in  $\alpha$ -OH-[3,3,5,5-D4]-Tetracosansäure mittels Gaschromatographie quantitativ vermessen. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente konnten allerdings zeigen, dass das mutierte D35Y-FA2H-Enzym nicht wie beschrieben vollständig inaktiv war, sondern ungefähr noch zu 50 % zur Synthese von  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer im Vergleich zum WT-Enzym befähigt war. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass der hier durchgeführte Versuchsansatz mit der quantitativen Bestimmung der synthetisierten  $\alpha$ -OH-Cer- und  $\alpha$ -OH-GlcCer-Menge sensitiver ist und sich daher besser zur Messung der  $\alpha$ -Hydroxylierungs-Restaktivität eignet. Da sowohl in der FA2H-18bp-Deletionsmutante als auch in der D35Y-FA2H-Punktmutante die für die katalytische Aktivität essentielle Cytochrom-b5-Domäne von der Mutation betroffen ist, war die in den *in vitro* Untersuchungen bestimmte Menge an  $\alpha$ -OH-Cer und  $\alpha$ -OH-GlcCer stärker reduziert als bei der R235C-FA2H-Punktmutante. Die beiden ersten Mutationen führen daher zu einem vergleichbaren Phänotyp und haben schwerwiegendere Auswirkungen als die R235C-FA2H-Punktmutante, die einen milderen Krankheitsverlauf zur Folge hat (Dick und Eckhardt, 2010).

Der durch die oben beschriebenen Mutationen bedingte Aktivitätsverlust des FA2H-Enzyms führte in den betroffenen Patienten vermutlich zu einem partiellen oder kompletten Verlust von  $\alpha$ -hydroxylierten Sphingolipiden im Gehirn, die einen wichtigen Anteil am Myelin haben. Die Bildung von Myelin im Gehirn des Menschen beginnt ca. 20 Wochen nach der Gestation und schreitet in den ersten Lebensjahren ungefähr bis zum 5-6 Lebensjahr fort (Kinney, 1994). Die Trockenmasse des Myelins besteht zu 30 % aus Proteinen (vor allem Proteolipid-Protein, PLP) und zu 70 % aus Lipiden, wobei hier

das Galaktosylceramid (GalCer) und dessen sulfatierte Form, das Sulfatid, von besonderer Bedeutung sind. Mehr als die Hälfte dieser Myelin-Lipide enthalten  $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäuren, die durch die Einwirkung der FA2H gebildet werden (Eckhardt, 2005) und vermutlich die Stabilität der Myelinscheiden durch Ausbildung von zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Bindungen erhöhen (Koshy, 1999). Die Menge an  $\alpha$ -hydroxyliertem GalCer nimmt mit dem Alter zu (Alderson, 2006), was die Vermutung nahelegt, dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide wahrscheinlich eher bei der Reifung des Myelins und dessen Aufrechterhaltung als bei der anfänglichen Myelinausbildung eine entscheidende Rolle spielen. Das würde auch erklären, warum die Patienten mit den oben beschriebenen FA2H-Mutationen anfangs eine normale Entwicklung zeigen und es erst im Alter von 4-6 Jahren zu klinischen Auffälligkeiten kommt (Edvardson, 2008; Dick und Eckhardt, 2010). Diese Vermutung wird weiterhin durch Untersuchungen an FA2H-KO-Mäusen bestätigt. Die FA2H-KO-Tiere weisen im Alter von 4 Wochen und 5 Monaten sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem eine normale Myelinisierung auf. Auch die gemessene Nervenleitgeschwindigkeit zeigt im Vergleich zu den Werten von gleichaltrigen WT-Tieren keinen Unterschied (Zöller, 2008). Erst im Alter von ca. 18 Monaten wurde bei den FA2H-KO-Mäusen eine fortschreitende Degeneration von Axonen und des Myelins beobachtet. Bei der Untersuchung der Lipide konnte aber in jeder untersuchten Altersstufe der Verlust von  $\alpha$ -hydroxyliertem GalCer und  $\alpha$ -hydroxyliertem Sulfatid sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden (Zöller, 2008). Deshalb liegt hier ebenfalls die Vermutung nahe, dass die  $\alpha$ -hydroxylierten Lipide bei der anfänglichen Myelinausbildung keine Rolle spielen, sondern eher längerfristig für dessen Stabilität und Aufrechterhaltung von Bedeutung sind.

Einige bekannte Formen der genetischen Leukodystrophien, wie z.B. Morbus Krabbe oder die metachromatische Leukodystrophie (MLD) zeichnen sich durch eine fortschreitende Demyelinisierung aus. Diese liegt aber nicht in einer veränderten Myelin-Zusammensetzung begründet, sondern wird vermutlich eher durch einen toxischen Effekt des akkumulierten Speichermaterials verursacht (Igisu, 1984;



Gieselmann, 2010). Mutationen im *Plp1*-Gen des Menschen, welches für das Proteolipid-Protein1 (PLP1) codiert, haben dagegen eine veränderte Proteinzusammensetzung im Myelin zur Folge, die für die Demyelinisierung in den Patienten verantwortlich ist (Saugier-Weber, 1994). Neben der veränderten Proteinzusammensetzung aufgrund von Mutationen im *Plp1*-Gen rücken mit den obigen Ergebnissen nun auch Veränderungen in der Lipidzusammensetzung des Myelins aufgrund von Mutationen im *Fa2h*-Gen in den Vordergrund. Vermutlich kann die FA2H-Defizienz deshalb als eine neue Form der Leukodystrophie angesehen werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alderson, N. L., Rembiesa, B. M., Walla, M. D., Bielawska, A., Bielawski, J., Hama, H. (2004) The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 279, 48562-48568
- Alderson, N. L., Maldonado, E. N., Kern, M. J., Hama, H. (2006) FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain. *J. Lipid. Res.* 47, 2772-2780
- Alderson, N. L., Hama, H. (2009) Fatty acid 2-hydroxylase regulates cAMP-induced cell cycle exit in D6P2T schwannoma cells. *J. Lipid. Res.* 50, 1203-1208
- Baron, J. M., Wiederholt, T., Heise, R., Merk, H. F., Bickers, D. R. (2008) Expression and function of cytochrome p450-dependent enzymes in human skin cells. *Curr. Med. Chem.* 15, 2258-2264
- Benavides, F., Starost, M. F., Flores, M., Gimenez-Conti, I. B., Guénet, J-L., Conti, C. J. (2002) Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in *nackt* mice, a Cathepsin L-deficient mutation. *Am. J. Pathol.* 161, 693-703
- Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L., Fuchs, E. (2004) Self-renewal multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118, 635-648
- Blanpain, C., Fuchs, E. (2006) Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22, 339-373
- Blanpain, C., Fuchs, E. (2009) Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 207-217
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* 106, 761-767

- Bouwstra, J. A., Ponec, M. (2006) The skin in healthy and diseased state.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1758, 2080-2095
- Breiden, B., Doering, T., Sandhoff, K. (2007) Optimization of submerged keratinocyte cultures for the synthesis of barrier ceramides. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 657-673
- Chen, H. C., Smith, S. J., Tow, B., Elias, P. M., Farese, R. V. Jr. (2002) Leptin modulates the effects of acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase deficiency on murine fur and sebaceous glands. *J. Clin. Invest.* 109, 175-181
- Cheng, J. B., Russell, D. W. (2004) Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *J. Biol. Chem.* 279, 37789-97
- Cheng, J. B., Russell, D. W. (2004) Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family. *J. Biol. Chem.* 279, 37798-37807
- Chujor, C. S., Feingold, K. R., Elias, P. M., Holleran, W. M. (1998) Glucosylceramide synthase activity in murine epidermis: quantitation, localization, regulation, and requirement for barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* 39, 277-285
- Dahlhoff, M., Müller A. K., Wolf, E., Werner, S., Schneider, M. R. (2010) Epigen transgenic mice develop enlarged sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol.* 130, 623-6
- Dick, K. J., Eckhardt, M., Paisán-Ruiz, C., Alshehhi, A. A., Proukakis, C., Sibtain, N. A., Maier, H., Sharifi, R., Patton, M. A., Bashir, W., Koul, R., Raeburn, S., Gieselmann, V., Houlden, H., Crosby, A. H. (2010) Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35).  
*Hum. Mutat.* 31, 1251-1260
- Downing, D. T. (1970) Lipolysis of human skin surface debris in organic solvents.  
*J. Invest. Dermatol.* 54, 395-398
- Eckhardt, M., Yaghoofam, A., Fewou, S. N., Zöllner, I., Gieselmann, V. (2005) A mammalian fatty acid hydroxylase responsible for the formation of  $\alpha$ -hydroxylated galactosylceramide in myelin. *Biochem. J.* 388, 245-254

- Edvardson, S., Hama, H., Shaag, A., Gomori, J. M., Berger, I., Soffer, D., Korman, S. H., Taustein, I., Saada, A., Elpeleg, O. (2008) Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophie with spastic paraparesis and dystonia. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 643-648
- Eisinger, M., Li, W. H., Anthonavage, M., Pappas, A., Zhang, L., Rossetti, D., Huang, Q., Seiberg, M. (2011) A melanocortin receptor 1 and 5 antagonist inhibits sebaceous gland differentiation and the production of sebum-specific lipids. *J. Dermatol. Sci.* 63, 23-32
- Ferdinandusse, S., Zomer, A. W., Komen, J. C., van den Brink, C. E., Thanos, M., Hamers, F. P., Wanders, R. J., van der Saag, P. T., Poll-The, B. T., Brites, P. (2008) Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 17712-17717
- Fluhr, J. W., Mao-Qiang, M., Brown, B., Wertz, P. W., Crumrine, W., Sundberg, J. P., Feingold, K. R., Elias, P. M. (2003) Glycerol regulates Stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice. *J. Invest. Dermatol.* 120, 728-737
- Fuchs, E., Raghavan, S. (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3, 199-209
- Fuchs, E. (2007) Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834-842
- Garone, C., Pippucci, T., Cordelli, D., Zuntini, R., Castegnaro, G., Marconi, C., Graziano, C., Marchiani, V., Verrotti, A., Seri, M., Franzoni, E. (2011) FA2H-related disorders: a novel c.270+3A>T splice-site mutation leads to a complex neurodegenerative phenotype. *Dev. Med. Child. Neurol.* 53, 958-961
- Gates, A. H., Karasek, M. (1965) Hereditary Absence of Sebaceous Glands in the Mouse. *Science* 148, 1471-1473
- Gieselmann, V., Krägeloh-Mann, I. (2010) Metachromatic leukodystrophy-an update. *Neuropediatrics.* 41, 1-6
- Green, E. L. (1954) The genetics of a new hair deficiency, *furless*. *J. Hered.* 45, 115-118

- Groux-Degroote, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., Neumann, S., Theos, A. C.,  
De Mazière, A. M., Klumperman, J., van Meer, G., Sprong, H. (2008) Glycolipid-  
dependent sorting of melanosomal from lysosomal membrane proteins by  
luminal determinants. *Traffic*. 9, 951-963
- Guo, L., Zhou, D., Pryse, K. M., Okunade, A. L., Su, X. (2010) Fatty acid 2-hydroxylase  
mediates diffusional mobility of Raft-associated lipids, GLUT4 level, and  
lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 285, 25438-25447
- Guy, R., Ridden, C., Kealey, T. (1996) The improved organ maintenance of the human  
sebaceous gland: modeling in vitro the effects of epidermal growth factor,  
androgens, estrogens, 13-cis retinoic acid, and phenol red.  
*J. Invest. Dermatol.* 106, 454-460
- Hama, H. (2010) Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology.  
*Biochim. Biophys. Acta.* 1801, 405-414
- Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from  
sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 139-150
- Hebert, J. M., Rosenquist, T., Gotz, J., Martin, G. R. (1994) FGF5 as a regulator of the hair  
growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78, 1017-25
- Hendrix, S., Handjiski, B., Peters, E. M., Paus, R. (2005) A guide to assessing damage  
response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced  
alopecia in mice. *J. Invest. Dermatol.* 125, 42-51
- Holleran, W. M., Takagi, Y., Uchida, Y. (2006) Epidermal sphingolipids: Metabolism,  
function, and roles in skin disorders. *FEBS. Lett.* 580, 5456-5466
- Horsley, V., O'Carroll, D., Tooze, R., Ohinata, Y., Saitou, M., Obukhanych, T.,  
Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Fuchs, E. (2006) Blimp1 defines a progenitor  
population that governs cellular input to the sebaceous gland. *Cell* 126, 597-609
- Igisu, H., Suzuki, K. (1984) Progressive accumulation of toxic metabolite in a genetic  
leukodystrophy. *Science* 224, 753-755

- Jansen, G. A., Ofman, R., Ferdinandusse, S., Ijlst, L., Muijsers, A. O., Skjeldal, O. H., Stokke, O., Jakobs, C., Besley, G. T., Wraith, J. E., Wanders, R. J. (1997) Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat. Genet.* 17, 190-193
- Jennemann, R., Sandhoff R., Langbein, L., Kaden, S., Rothermel, U., Gallala, H., Sandhoff, K., Wiegandt, H., Gröne, H-J. (2007) Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on Glucosylceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* 282, 3083-3094
- Kellum, R. E. (1967) Human sebaceous gland lipids. Analysis by thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol.* 95, 218-220
- Kinney, H. C., Karthigasan, J., Borenshteyn, N. I., Flax, J. D., Kirschner, D. A. (1994) Myelination in the developing human brain: biochemical correlates. *Neurochem. Res.* 19, 983-996
- Kochupurakkal, B. S., Harari, D., Di-Segni, A., Maik-Rachline, G., Lyass, L., Gur, G., Kerber, G., Citri, A., Lavi, S., Eilam, R., Chalifa-Caspi, V., Eshhar, Z., Pikarsky, E., Pinkas-Kramarski, R., Bacus, S. S., Yarden, Y. (2005) Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity. *J. Biol. Chem.* 280, 8503-8512
- Koshy, K. M., Wang, J., 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
- Kruer, M. C., Paisán-Ruiz, C., Boddaert, N., Yoon, M. Y., Hama, H., Gregory, A., Malandrini, A., Woltjer, R. L., Munnich, A., Gobin, S., Polster, B. J., Palmeri, S., Edvardson, S., Hardy, J., Houlden, H., Hayflick, S. J. (2010) Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann. Neurol.* 68, 611-618

- Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, M., Hoffmann, V., Ding, B., Proia R. L., Deng, C. (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. Bio. Sci.* 3, 120-128
- Lladó, V., Terés, S., Higuera, M., Alvarez, R., Noguera-Salva, M. A., Halver, J. E., Escribá, P. V., Busquets, X. (2009) Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 106, 13754-8
- Lui, K., Commens. C., Choong, R., Jaworski, R. (1988) Collodion babies with Gaucher's disease. *Arch. Dis. Child.* 63, 854-856
- de Luna, M. C. T., Lucero, J. L., Austria, A. L. E., de Ocampo, G. D., Estacio, M. A. C. (2009) Effect of Total Submandibular Sialoadenectomy on the Preputial and Bulbourethral Glands of Sexually Mature Rats. *Philipp. J. Vet. Med.* 46, 102-112
- Madison, K., C. (2003) Barrier function of the skin: "La Raison d'Être" of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231-241
- Maier, H., Meixner, M., Hartmann, D., Sandhoff, R., Wang-Eckhardt, L., Zöller, I., Gieselmann, V., Eckhardt, M. (2011) Normal fur development and sebum production depends on fatty acid 2-hydroxylase expression in sebaceous glands. *J. Biol. Chem.* 286, 25922-25934
- Mak, K. K., Chan, S. Y. (2003) Epidermal growth factor as a biologic switch in hair growth cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 26120-26126
- Mizutani, Y., Kihara, A., Igarashi, Y. (2005) Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem. J.* 390, 263-271
- Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H., Igarashi, Y. (2008) 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J. Lipid Res.* 49, 2356-2364
- Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., Igarashi, Y. (2009) Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie.* 91, 784-790

- Mukherji, M., Kershaw, N. J., Schofield, C. J., Wierzbicki, A. S., Lloyd, M. D. (2002) Utilization of sterol carrier protein-2 by phytanoyl-CoA 2-hydroxylase in the peroxisomal alpha oxidation of phytanic acid. *Chem. Biol.* 9, 597-605
- Müller-Röver, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., Foitzik, K., McKay, I. A., Stenn, K. S., 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
- Nakamura, M., Sundberg, J. P., Paus, R. (2001) Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables. *Exp. Dermatol.* 10, 369-390
- Nicolaides, N. (1967) The monoene and other wax alcohols of human skin surface lipid and their relation to the fatty acids of this lipid. *Lipids* 2, 266-275
- Nicolaides, N., Fu, H., Ansari, M. N. A. (1970) Diester waxes in surface lipids of animal skin. *Lipids* 5, 299-307
- Nicolaides, N., Fu, H., Rice, G. R. (1972) The fatty acids of wax esters and sterol esters from vernix caseosa and from human skin surface lipid. *Lipids* 7, 506-517
- Nikkari, T. (1969) The occurrence of diester waxes in human vernix caseosa and in hair lipids of common laboratory animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 795-803
- Nikkari, T. (1974) Comparative chemistry of sebum. *J. Invest. Dermatol.* 62, 257-267
- O'Shaughnessy, R. F. L., Christiano, A. M. (2004) Inherited disorders of the skin in human and mouse: from development to differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 171-179
- Paus, R., Cotsarelis, G. (1999) The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* 341, 491-497
- Paus, R., Müller-Röver, S., Van Der Veen, C., Maurer, M., Eichmüller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., Handjiski, B. (1999) A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 113, 523-532



- Porter, R. M., Jahoda, C. A., Lunny, D. P., Henderson, G., Ross, J., McLean, W. H., Wilson, N. J., Reichelt, J., Magin, T. M., 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
- Riebeling, C., Allegood, J. C., Wang, E., Merrill, A. H. Jr., Futerman, A. H. (2003) Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *J. Biol. Chem.* 278, 43452-43459
- Rosenfield, R. L. (1989) Relationship of sebaceous cell stage to growth in culture. *J. Invest. Dermatol.* 92, 751-754
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., von Figura, K., Paus, R., 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
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A., Warner, T. T. (2008) Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet. Neurol.* 7, 1127-1138
- Sando, G. N., Howard, E. J., Madison, K. C. (1996) Induction of ceramide glucosyltransferase activity in cultured human keratinocytes. Correlation with culture differentiation. *J. Biol. Chem.* 271, 22044-22051
- Saugier-Veber, P., Munnich, A., Bonneau, D., Rozet, J. M., Le Merrer, M., Gil, R., 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
- Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R., Paus, R. (2009) The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr. Biol.* 19, 132-142
- Schneider, M. R., Paus, R. (2010) Sebocytes, multifaceted epithelial cells: Lipid production and holocrine secretion. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42, 181-185

- Selleri, S., Seltmann, H., Gariboldi, S., Shirai, Y. F., Balsari, A., Zouboulis, C. C., Rumio, C. (2006) Doxorubicin-induced alopecia is associated with sebaceous gland degeneration. *J. Invest. Dermatol.* 126, 711-720
- Skjeldal, O. H., Stokke, O., Refsum, S., Norseth, J., Petit, H. (1987) Clinical and biochemical heterogeneity in conditions with phytanic acid accumulation. *J. Neurol. Sci.* 77, 87-96
- Smith, K. R., Thiboutot, D. M. (2008) Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid. Res.* 49, 271-281
- Sprong, H., Degroote, S., Claessens, T., van Drunen, J., Oorschot, V., Westerink, B. H., Hirabayashi, Y., Klumperman, J., van der Sluijs, P., van Meer, G. (2001) Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J. Cell. Biol.* 155, 369-380
- Stenn, K. S. (2001) Insights from the asebia mouse: a molecular sebaceous gland defect leading to cicatricial alopecia. *J. Cutan. Pathol.* 28, 445-447
- Suárez-Quian, C. A., Niklinski, W. (1990) Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis. *Biol. Reprod.* 43, 1087-1097
- Sundberg, J. P., Boggess, D., Sundberg, B., Eilertsen, K., Parimoo, S., Filippi, M., Stenn, K. (2000) Asebia-2J (*Scd1<sup>ab2J</sup>*): A new allele and a model for scarring alopecia. *Am. J. Pathol.* 156, 2067-2075
- Takagi, S., Tojo, H., Tomita, S., Sano, S., Itami, S., Hara, M., Inoue, S., Horie, K., Kondoh, G., Hosokawa, K., Gonzalez, F. J., 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
- Thiboutot, D., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z., Clawson, G. (2000) The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. *J. Invest. Dermatol.* 115, 614-619

- Thiboutot, D., Jabara, S., McAllister J. M., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z., Clawson, G. (2003) Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J. Invest. Dermatol.* 120, 905-914
- Thiele, J. J., Weber, S. U., Packer, L. (1999) Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J. Invest. Dermatol.* 113, 1006-1010
- Tobin, D. J., Foitzik, K., Reinheckel, T., Mecklenburg, L., Botchkarev, V. A., Peters, C., Paus, R. (2002) The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am. J. Pathol* 160, 1807-1821
- Traish, A. M., Wotiz, H. H. (1987) Prostatic epidermal growth factor receptors and their regulation by androgens. *Endocrinology* 121, 1461-1467
- Uchida, Y., Hama, H., Alderson, N., Douangpanya, S., Wang, Y., Crumrine D., Elias, P., Holleran, W. (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
- Watkins, P. A., Howard, A. E., Mihalik, S. J. (1994) Phytanic acid must be activated to phytanoyl-CoA prior to its alpha-oxidation in rat liver peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214, 288-294
- Wertz, P. W., 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
- Yen, C. L., Monetti, M., Burri, B. J., Farese, R. V. Jr. (2005) The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters. *J. Lipid Res.* 46, 1502-11
- Zhang, J. X., Sun, L., Zhang, J. H., Feng, Z. Y. (2008) Sex- and gonad-affecting scent compounds and 3 male pheromones in the rat. *Chem. Senses* 33, 611-621

- Zöller, I., Meixner, M., Hartmann, D., Büssow, H., Meyer, R., Gieselmann, V.,  
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
- Zouboulis, C. C., Seltmann, H., Neitzel, H., Orfanos, C. E. (1999) Establishment and  
characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95).  
*J. Invest. Dermatol.* 113, 1011-1020
- Zouboulis, C. C. (2010) Die Talgdrüse. *Der Hautarzt* 61, 467-477, Springer-Verlag

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
Ger	Ceramid
GerS	Ceramidsynthase
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CHO	Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters
Chol	Cholesterol
Cyt	Cytochrom
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPX	Dibutylphthalat-Xylol
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie

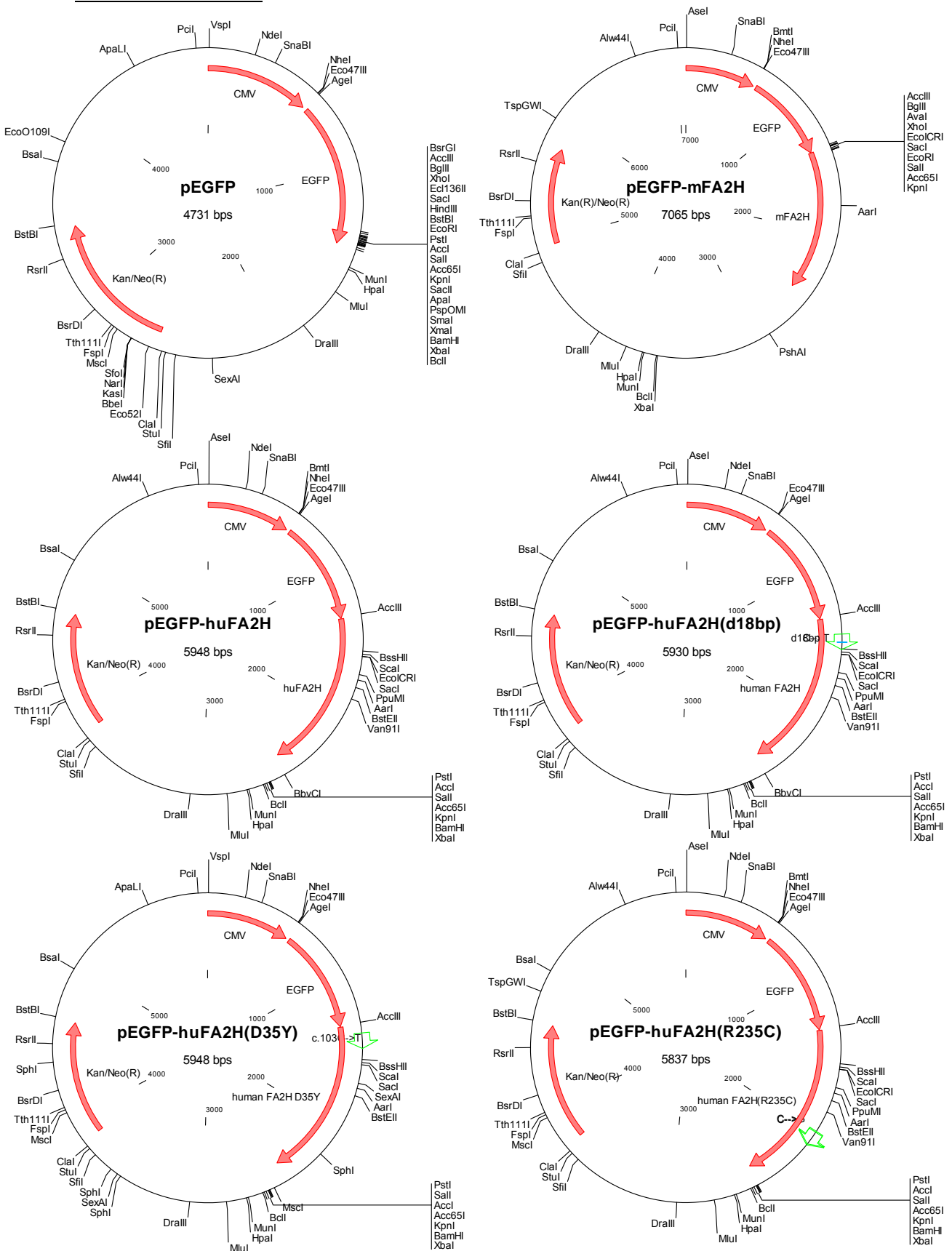
---

FA2H	Fettsäure-2-Hydroxylase
FAME	Fettsäuremethylester
FCS	Fötale Kälberserum
FFA	Freie Fettsäuren
FS	Fettsäure
GalCer	Galaktosylceramid
GlcCer	Glucosylceramid
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature</i> -Keratinozyten
H&E	Hämalaun/Eosin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i> -Zellen
HF	Haarfollikel
huFA2H	Humane FA2H
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
KO	Knock-Out
Konz.	Konzentration
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
mFA2H	murine FA2H
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Versuche / Anzahl der verwendeten Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT / BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid / 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat

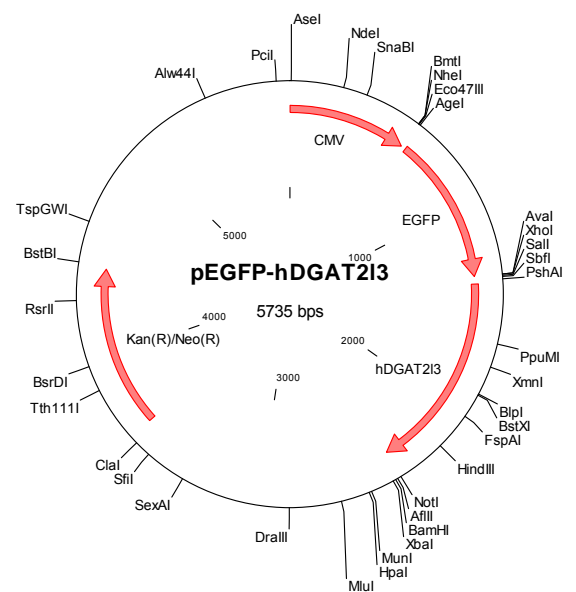
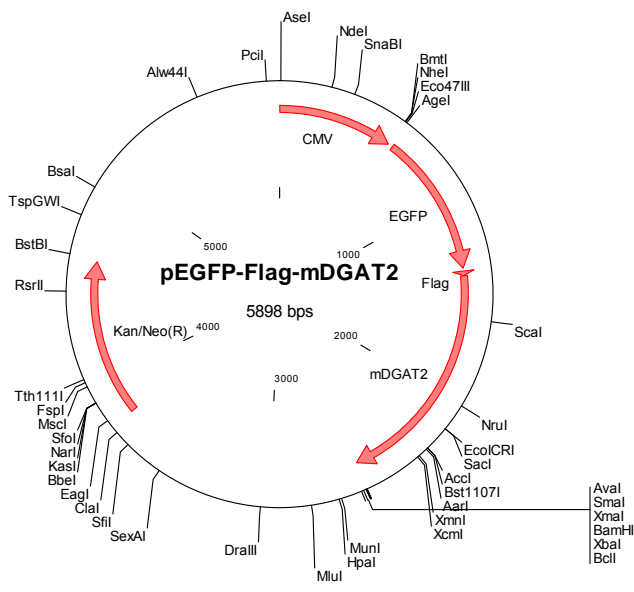
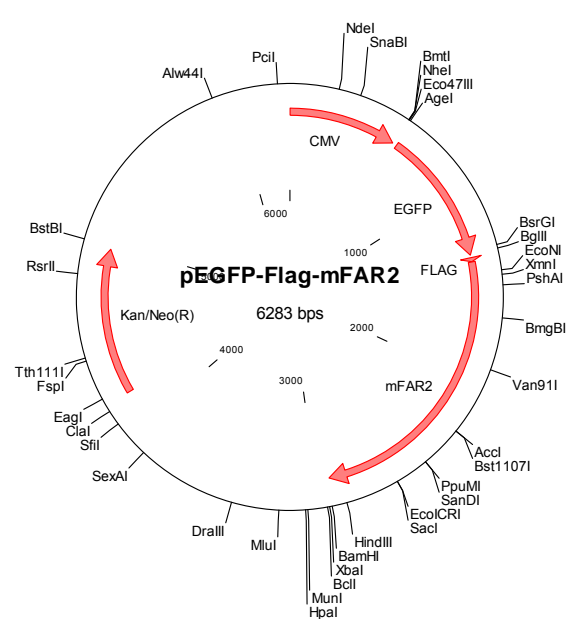
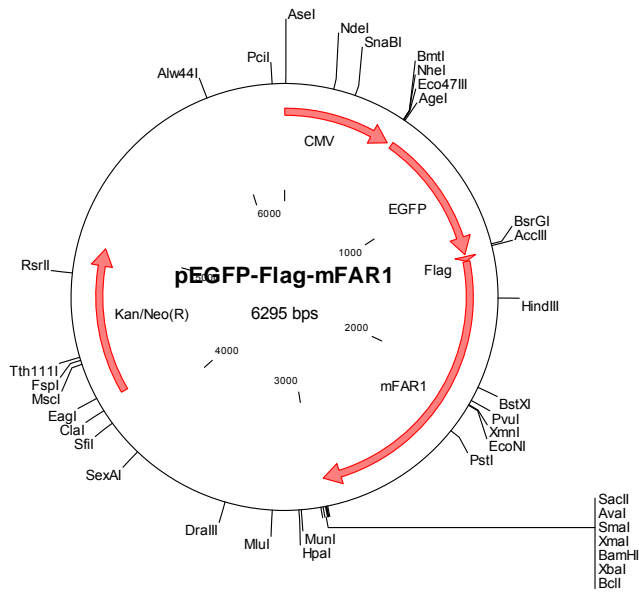
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Sterolester
siRNA	<i>short interfering</i> Ribonukleinsäure
SM	Sphingomyelin
SPE	Festphasenextraktion ( <i>solid phase extraction</i> )
SSC	Natrium-Citronensäure-Puffer
SZ95	Humane, adulte Sebozyten-Zelllinie
Tab.	Tabelle
TEA	Triethanolamin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Triglyceride
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot
WDE	Wachsdierester
WME	Wachsmonoester
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktosid

# 9 Anhang

## 9.1 Plasmidkarten







## 9.2 Publikationen

Ramakrishnan, H., Hedayati, K. K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Fewou, S. N., Maier, H., Goebel, H. H., Gieselmann, V., Eckhardt, M. (2007) Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci.* 27, 9482-9490

Dick, K. J., Eckhardt, M., Paisán-Ruiz, C., Alshehhi, A. A., Proukakis, C., Sibtain, N. A., Maier, H., Sharifi, R., Patton, M. A., Bashir, W., Koul, R., Raeburn, S., Gieselmann, V., Houlden, H., Crosby, A. H. (2010) Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum. Mutat.* 31, 1251-1260

Maier, H., Meixner, M., Hartmann, D., Sandhoff, R., Wang-Eckhardt, L., Zöller, I., Gieselmann, V., Eckhardt, M. (2011) Normal fur development and sebum production depends on fatty acid 2-hydroxylase expression in sebaceous glands. *J. Biol. Chem.* 286, 25922-25934

Jungnickel, J., Eckhardt, M., Haastert-Talini, K., Claus, P., Bronzlik, P., Lipokatic-Takacs, E., Maier, H., Gieselmann, V., Grothe, C. (2012) Polysialyltransferase overexpression in Schwann cells mediates different effects during peripheral nerve regeneration. *Glycobiology* 22, 107-115

### Posterpräsentationen

Marion Meixner, Helena Maier, Lihua Wang-Eckhardt, Volkmar Gieselmann and Matthias Eckhardt (2008) Fatty acid 2-hydroxylase is expressed in sebaceous glands and is required for normal hair cycling. SFB 645-Meeting, Bonn, Deutschland

Helena Maier, Marion Meixner, Inge Zöller, Volkmar Gieselmann and Matthias Eckhardt (2009) Fatty acid 2-hydroxylase does not account for synthesis of 2-OH-ceramides in murine skin. Gordon Research Conferences, Barrier Function of Mammalian Skin; Waterville Valley Resort, USA

Helena Maier, Marion Meixner, Inge Zöller, Volkmar Gieselmann and Matthias Eckhardt (2011) The expression of fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) in murine skin is restricted to sebaceous glands and accounts for hair follicle homeostasis. Gordon Research Conferences, Molecular & Cellular Biology of Lipids; Waterville Valley Resort, USA



Junior Scientist  
Award (2011)

### 9.3 Lebenslauf

## 9.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann für die Möglichkeit der Promotion und die stetige Unterstützung des Projektes bedanken.

Frau Prof. Dr. Christa E. Müller danke ich für die sehr freundliche und unkomplizierte Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Matthias Eckhardt. Von meinem ersten Western Blot bis zur vollständigen Fertigstellung der Dissertation konnte ich stets auf seine Hilfe und Unterstützung bauen. Er zeigte viel Geduld und Ideenreichtum, selbst als die wissenschaftliche Arbeit sich von „Haare raufen“ über „Mäuse melken“ bis zur „Kloforschung“ erweiterte.

Frau Lihua Wang-Eckhardt danke ich für die hilfreiche und sehr herzliche Einführung in die Welt der RNA und alle nötigen Tätigkeiten und Experimente drum herum.

Herrn Dr. Roger Sandhoff vom DKFZ in Heidelberg danke ich für die äußerst hilfreiche ESI-Analyse und Auswertung der Hautlipide.

Frau Uschi Reuter möchte ich für die freundliche Bereitstellung der humanen Hautproben und der verschiedenen Magin'schen Antikörper & Lösungen danken.

Frau Ivonne Becker danke ich für sehr viel kompetente Hilfe im Labor. Sowohl fachlich als auch persönlich war sie immer zur Stelle, hat oft bereits einen Schritt weitergedacht und hat meinen Arbeitsalltag durch viele interessante Gespräche sehr bereichert.

Weiterhin möchte ich mich bei so vielen Mitarbeitern des IBMB bedanken. Sowohl im Labor als auch im Doktorandenbüro herrschte stets eine sehr freundliche Atmosphäre, die durch unterhaltsame Gespräche, viele Spaßaktionen und einige feuchtfröhliche abendliche Aktivitäten verstärkt wurde. Hierbei sei vor allem die Fam. Eckhardt erwähnt, der gewisse „Altlasten“ wie Marion, Rebekka und Silvie angehören, aber auch neue Mitglieder wie Izzie, Julia und Raupe. Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich Pezzie. Er war mir in jeder Hinsicht und zu jeder Zeit eine „tolle Hilfe“ und hat mich durch meine gesamte Doktorandenzeit innerhalb und außerhalb des IBMB mit Rat und Tat begleitet. Viele alltägliche Rätsel wären ohne ihn womöglich unentdeckt und ungelöst geblieben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Während des Studiums und der Promotion sowie auch in jeder anderen Lebenssituation konnte ich stets auf eine uneingeschränkte Unterstützung und großartige Motivation zählen. Vielen Dank!

## 9.5 Eidesstattliche Erklärung

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

Bonn, Februar 2012

Helena Maier