

UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DES FETTSÄURETRANSPORTPROTEINS 4 (FATP4)

SEIN EINFLUSS AUF DIE ENTSTEHUNG
DES PHÄNOTYPS VON FATP4-DEFIZIENTEN
MÄUSEN UND PATIENTEN MIT LETALER
RESTRIKTIVER DERMOPATHIE

UTE BENNEMANN



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin,
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Neiger
und
der Medizinischen Klinik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,
Abteilung Innere Medizin IV,
Gastroenterologie, Infektionskrankheiten und Vergiftungen
Betreuer: Priv.-Doz. Dr. T. Herrmann

Untersuchungen zur Bedeutung des Fettsäuretransport- proteins 4 (FATP4)

Sein Einfluss auf die Entstehung des Phänotyps von Fatp4-defizienten Mäusen
und Patienten mit letaler restriktiver Dermopathie

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Ute Bennemann
Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2006

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan:

Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. R. Neiger

Priv.-Doz. Dr. T. Herrmann

Tag der Disputation: 19.06.2006

Meinen Eltern
Annegret und Dr. Karl Hirsch

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die physiologische Bedeutung langkettiger Fettsäuren	1
1.2. Untersuchungen zur zellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren	2
1.3. Die Familie der Fettsäuretransportproteine (FATP)	2
1.3.1. Das Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4)	3
1.4. Herstellung einer konstitutiven Knockoutmaus zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von FATP4	4
1.4.1. Entwicklung der <i>Fatp4-K</i> -Mauslinie (Herrmann et al., 2003).....	4
1.4.2. Beschreibung des Phänotyps der <i>Fatp4-K</i> -Maus	7
1.5. Vergleich mit der letalen restriktiven Dermopathie des Menschen	10
1.6. Möglichkeiten zur genaueren Untersuchung der Bedeutung von FATP4 in der Haut	11
1.6.1. Das Cre/LoxP - Rekombinationssystem.....	11
1.7. Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Geräte.....	14
2.1.2. Chemikalien.....	15
2.1.3. Kits.....	15
2.1.4. Oligonukleotide	16
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	16
2.2.1. Isolierung genomischer DNA.....	16
2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.3. Agarosegelelektrophorese	17
2.2.3.1. Elektrophoresepuffer:	18
2.2.3.2. Gel-Ladepuffer:	18
2.2.3.3. Größenmarker.....	18
2.2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	18
2.2.4.1. pH-Puffer:.....	18

2.2.5. Sequenzierung	19
2.2.6. Computeranalyse	19
2.2.7. Fällung von DNA mit Ethanol	20
2.3. Histologische Techniken	20
2.3.1. Probengewinnung für histologische Analysen.....	20
2.3.2. Probengewinnung für immunhistologische Analysen.....	21
2.3.3. Antikörper für immunhistochemische Nachweise	21
2.3.3.1. Primäre Antikörper (AK)	21
2.3.3.2. Sekundäre Antikörper	22
2.4. Tierexperimentelle Methoden	22
2.4.1. Tiere.....	22
2.4.2. Herstellung der Mäuse.....	22
2.4.2.1. Genotypisierung der Mäuse	23
2.4.2.2. Hautspezifische Inaktivierung des Fettsäuretransportproteins 4 (Fatp4).....	25
2.4.2.2.1. Mäuse mit einem <i>Fatp4</i> -Nullallel	25
2.4.2.2.2. Mäuse mit gefloxtem <i>Fatp4</i> -Allel.....	26
2.4.2.2.3. Mäuse mit induzierbarer <i>Fatp4</i> -Inaktivierung in der Epidermis	27
2.4.3. Tamoxifenbehandlung	28
2.4.4. Nachweis der epidermisspezifischen Exzision von Exon 3	28
2.5. Verschiedene Methoden	29
2.5.1. Überprüfung der Hautdurchlässigkeit	29
2.5.1.1. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β , D-Galactopyranosid (X-Gal)	29
2.5.1.1.1. Lösungen für die Permeabilitätsprüfung der Haut (X-Gal)	30
2.5.1.2. Lucifergelb	30
3. Ergebnisse.....	32
3.1. Epidermisspezifische Inaktivierung des <i>Fatp4</i> -Gens durch Tamoxifen	32
3.2. Phänotypische Beurteilung der tamoxifeninduzierten hautspezifischen <i>Fatp4</i> -Mutanten.....	33
3.2.1. Makroskopische Analysen.....	33
3.2.2. Histologische Analysen	34
3.2.2.1. Ergebnisse der histologischen Analysen der Epidermis	34
3.2.2.2. Ergebnisse der immunhistologischen Analysen der Epidermis	36
3.2.2.2.1. <i>Fatp4</i>	36
3.2.2.2.2. Ki67-Antigen.....	37
3.2.2.2.3. Keratine	37
3.2.2.2.4. Loricrin, Filaggrin und Transglutaminase-1	40

3.2.2.2.5. Tight-junction-Proteine	41
3.3. Funktionelle Analysen der epidermalen Lipidbarriere.....	42
3.3.1. Überprüfung der Hautpermeabilität durch X-Gal	42
3.3.2. Überprüfung der Hautpermeabilität durch Lucifergelb	43
3.4. Sequenzierung aller kodierenden Bereiche des humanen <i>FATP4</i> -Gens	44
3.4.1. Ergebnisse der Primer-Testreihe	44
3.4.2. Sequenzanalysen.....	50
4. Diskussion	52
4.1. Herleitung der Fragestellung	52
4.1.1. Mögliche Funktionen von <i>Fatp4</i>	52
4.2. Epidermisspezifische Inaktivierung von <i>Fatp4</i>	53
4.2.1. <i>Fatp4</i> spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung der epidermalen Lipidbarriere	54
4.2.2. Die Inaktivierung von <i>Fatp4</i> führt zu einer Strukturveränderung der Epidermis	54
4.2.3. Vergleich mit der konstitutiven <i>Fatp4</i> -Defizienz.....	55
4.3. Der Zusammenhang zwischen <i>Fatp4</i> -Defizienz und der letalen restriktiven Dermopathie	57
4.4. Schlussfolgerung und Ausblick.....	58
5. Zusammenfassung	60
6. Summary	62
7. Anhang.....	64
7.1. Abkürzungen	64
7.2. Auflistung aller verwendeten Primer zur Sequenzierung des humanen <i>FATP4</i> -Gens	65
7.3. <i>Hfe</i> -spezifische Primer	67
8. Literaturverzeichnis	68
9. Danksagung	75
10. Erklärung	76

1. Einleitung

1.1. Die physiologische Bedeutung langkettiger Fettsäuren

Langkettige Fettsäuren erfüllen eine Vielzahl von Funktionen im prokaryotischen und eukaryotischen Organismus. Aus mit der Nahrung aufgenommenen Triglyceriden werden sie von lingualen und pankreatischen Lipasen freigesetzt und von den Enterozyten des Jejunum und Ileum resorbiert. Reesterifiziert gelangen sie in Chylomikronen über die Lymphbahn in das Blutgefäßsystem, wo sie an Albumin gebunden ihre Wirkungsorte erreichen. Für viele Gewebe stellen langkettige Fettsäuren eine äußerst wichtige Energiequelle dar. Sie werden entweder, wie zum Beispiel von Kardiomyozyten, durch β -Oxidation (Bing et al., 1954) in Energie umgewandelt oder dienen in Form von Triglyceriden als Energiespeicher, wie beispielsweise in Adipozyten oder Hepatozyten. Gebunden an Proteine, können langkettige Fettsäuren deren Eigenschaften verändern und ihren gezielten Einbau in spezifische Membrandomänen ermöglichen (Bouvier et al., 1995; Jackson et al., 1995; Mundy 1995). Sie können direkt Einfluss nehmen auf die Aktivität von Ionenkanälen, auf Enzymfunktionen und Synapsenübertragung (Anderson et al., 1990; Ordway et al., 1991; Übersicht s. Abumrad et al., 1998). Sie sind Ausgangspunkt der Synthese von Hormonen (Hwang et al., 2000) und wirken selbst als intrazelluläre Signalmoleküle (Duplus et al., 2000). Zusammen mit Ceramiden und Cholesterin sind langkettige und sehr langkettige Fettsäuren wichtige Bestandteile der epidermalen Lipidbarriere (Norlen, 2001). Durch eine ganz bestimmte Anordnung und Zusammensetzung dieser drei Bestandteile werden hydrophobe interzelluläre Lamellen gebildet, die zum einen Schutz gegenüber äußeren physikalischen und mechanischen Einflüssen bieten und zum anderen den transkutanen Wasserverlust minimieren.

1.2. Untersuchungen zur zellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren

Bevor langkettige Fettsäuren ihre Funktionen in der Zelle erfüllen können, müssen sie zunächst die Plasmamembran passieren. Der genaue Mechanismus dieser zellulären Aufnahme ist noch nicht vollständig bekannt. Man ging zunächst davon aus, dass langkettige Fettsäuren ausschließlich durch passive Diffusion in das Zellinnere gelangen (Kamp et al., 1992). Dies trifft aber nur bei hoher Konzentration dieser Fettsäuren zu (Kamp et al., 1992). Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass die zelluläre Aufnahme ein Zusammenspiel von passiver Diffusion und einem Protein-vermittelten Transportsystem ist. Dieser hochaffine und spezifische Transport, den Zellen wie Kardiomyozyten, Hepatozyten, Adipozyten und Keratinozyten zeigen, ist bei den niedrigen physiologischen Substratkonzentrationen von Bedeutung (Stremmel et al., 1986; Stremmel und Berk, 1986; Stremmel, 1988a; Stremmel, 1988b; Vyska et al., 1988; Schürer et al., 1994).

Inzwischen wurden verschiedene Proteine identifiziert, die im direkten Zusammenhang mit einem Anstieg der zellulären Fettsäureaufnahme stehen. Zu ihnen gehören unter anderem FABPpm (fatty acid binding protein der Plasmamembran) (Zhou et al., 1992), FAT/CD36 (fatty acid translocase) (Abumrad et al., 1993) und die Familie der FATP (fatty acid transport proteins) (Schaffer und Lodish, 1994). Die größte Bedeutung wird den Mitgliedern der FATP-Familie beigemessen, da nur diese ausschließlich in Fettsäure metabolisierenden Geweben nachgewiesen wurden (Abumrad et al., 1993; Stahl et al., 1999) und nur sie an der Plasmamembran lokalisiert werden konnten (Schaffer und Lodish, 1994; Stahl et al., 1999).

1.3. Die Familie der Fettsäuretransportproteine (FATP)

1994 wurde das erste Mitglied der FATP-Familie mittels einer Expressionsklonierungstechnik entdeckt (Schaffer und Lodish, 1994). In den folgenden Jahren fand man sowohl beim Menschen als auch bei der Maus noch weitere fünf Mitglieder dieser Familie (hsFATP1-6; mmFatp1-6) (Hirsch et al., 1998; Gimeno et al., 2003). Es handelt sich bei ihnen um eine Gruppe evolutionär hoch konservierter Proteine (Hirsch et al., 1998), denen eine Signatur-Sequenz (Kernsequenz) gemein ist, auf der sich eine - auch für Acyl-CoA-Synthetasen charakteristische - AMP-Bindungsstelle befindet (Hirsch et al., 1998).

Eine der Acyl-CoA-Synthetase ähnliche Aktivität konnte für FATP1, 2, 4 und 5 nachgewiesen werden, wobei nur FATP1, 2 und 4 langkettige Fettsäuren aktivieren (Berger et al., 1998; Coe et al., 1999; Steinberg et al., 1999; Herrmann et al., 2001). Wie die Enzymaktivität mit der zellulären Aufnahme von Fettsäuren zusammenhängt, ist noch unklar.

Das Expressionsmuster der einzelnen FATPs unterscheidet sich. FATP1 wurde in Fettgewebe, Muskulatur, Gehirn und Herz nachgewiesen (Schaffer und Lodish, 1994). FATP2 fand man ausschließlich im Nierenkortex und in der Leber (Hirsch et al., 1998). In der Lunge ist nur FATP3 vorhanden, das aber auch noch in anderen Geweben exprimiert wird (Hirsch et al., 1998). FATP4 wurde als einziges Mitglied der FATP-Familie im Darm nachgewiesen (Stahl et al., 1999). Es wird außerdem in Gehirn, Fettgewebe, Herz, Niere, Leber und Haut exprimiert (Herrmann et al., 2001). FATP5 wurde nur in der Leber (Hirsch et al., 1998; Stahl et al., 1999) und FATP6 ausschließlich im Herz gefunden (Gimeno et al., 2003). Mittels Überexpressionsversuchen konnte die Beteiligung der Mitglieder der FATP-Familie an der aktiven Aufnahme langkettiger und sehr langkettiger Fettsäuren und deren Metabolisierung gezeigt werden. Die Aufnahme konnte bis zum Vierfachen gesteigert werden (Schaffer und Lodish, 1994), wobei der genaue molekulare Ablauf dieses Vorgangs noch nicht vollständig geklärt ist. Die Tatsache, dass an isolierten Enterozyten durch FATP4-Antisense-Oligonukleotid-Behandlung die Aufnahme von Oleat und Palmitat um 50 % vermindert werden konnte (Stahl et al., 1999), zeigt die wesentliche Bedeutung von FATP4 im Darm.

1.3.1. Das Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4)

FATP4 konnte an der apikalen Plasmamembran des Dünndarms lokalisiert werden (Stahl et al., 1999). Um seine Bedeutung bei der Fettsäureaufnahme im Darm auch *in vivo*, mittels Geninaktivierung bei Mäusen, untersuchen zu können, wurde als Voraussetzung dafür das murine *Fatp4*-Gen kloniert, vollständig sequenziert und charakterisiert (Herrmann et al., 2001). Es konnte bei der Maus auf der Bande B des Chromosoms 2 lokalisiert werden, was der Region 9q34 des humanen Gens entspricht. Sein offener Leseraster umfasst 1929 Basenpaare (bp) und kodiert ein 643 Aminosäuren beinhaltendes Protein. Innerhalb der kodierenden Bereiche, die 12 Exons umfassen, zeigen das menschliche und das murine *FATP4*-Gen eine hohe Übereinstimmung von 92,2 % (Herrmann et al., 2001).

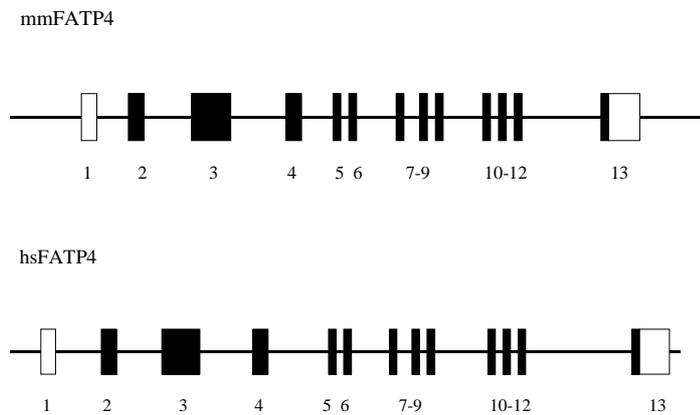


Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Genstruktur des murinen *Fatp4*- und des humanen *FATP4*-Gens. Exons sind durch Rechtecke wiedergegeben, kodierende Bereiche sind schwarz ausgefüllt, nicht kodierende Bereiche leer. Die Exonnummern sind jeweils angegeben.

1.4. Herstellung einer konstitutiven Knockoutmaus zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von FATP4

1.4.1. Entwicklung der *Fatp4*-K-Mauslinie (Herrmann et al., 2003)

Seit man bei der Maus gezielt Gene inaktivieren kann, hat sich eine weitere Möglichkeit ergeben, die physiologische Bedeutung und Funktion von Proteinen zu untersuchen. Die Bildung des zu untersuchenden Proteins wird in diesen sogenannten Knockoutmäusen mittels Inaktivierung des entsprechenden Gens verhindert, so dass anhand eines Vergleichs mit Kontrolltieren einerseits die Auswirkungen der Geninaktivierung genau charakterisiert und andererseits Rückschlüsse auf die eigentliche Bedeutung des Proteins gezogen werden können. Die Modifikation des jeweiligen Gens wird in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus vorgenommen. Diese werden aus Blastozysten, die superovulierten Spendertieren am Tag 3,5 post coitum entnommen werden, gewonnen. Ziel ist es nun, die Sequenz des entsprechenden Gens so zu verändern, dass die Synthese des Proteins nicht mehr möglich ist. Dies wird mit Hilfe von Targetingvektoren erreicht. Hierbei handelt es sich um konstruierte DNA-Sequenzen, deren 5'- und 3'-Enden homolog zu einer Teilsequenz des Zielgens gewählt werden. Nachdem diese Genkonstrukte mittels Elektroporation in den Kern der ES-Zellen

transfiziert worden sind, kommt es unter Ausnutzung der zellulären Rekombinationsmaschinerie zum gezielten Einbau des Targetingvektors in seinem chromosomalen Äquivalent (homologe Rekombination). Mit Hilfe positiver Selektionsmarker und Southern-Blot-Analysen erfolgt eine Selektion der Zellen, bei denen eine korrekte Rekombination stattgefunden hat. Diese nun genetisch modifizierten ES-Zellen werden in Blastozysten reinjiziert, die wiederum in den Uterus scheinträchtiger Mäuse implantiert werden. Da der Hormonhaushalt dieser Tiere nach Verpaarung mit vasktomierten Männchen dem einer trächtigen Maus entspricht, kommt es zur Einnistung der Blastozysten und zum Austragen chimärer Tiere. Es handelt sich hierbei um Tiere, die aus Zellen mit dem unveränderten Genom und aus Zellen bestehen, die Träger des Targetingvektors sind. Aufgrund der Pluripotenz von ES-Zellen kann das DNA-Konstrukt in allen Gewebearten gefunden werden. Nur wenn auch Keimzellen Vektorträger sind, kann die Mutation auf die Tochtergeneration übertragen werden. Welche Jungtiere Träger der zusätzlichen Sequenz sind, kann nun mittels Southern-Blot-Analyse und PCR ermittelt werden. Durch gezielte Kreuzung heterozygoter Tiere erhält man frühestens in der F2-Generation Tiere, die das veränderte Allel homozygot tragen.

Im konkreten Fall wurde das *Fatp4*-Gen der Maus gezielt inaktiviert (Herrmann et al., 2003). Dazu wurde ein Targetingvektor konstruiert, dessen Insert in das Intron 2 integriert wurde und eine 7172 bp lange Kassetten beinhaltete. Diese setzte sich aus einem Spleißakzeptor (SA), einer internen Ribosomen-Bindungsstelle (IRES), einem lacZ-Reporter-Gen, einem Neomycinresistenz-Gen, einem Poly(A)⁺-Signal, das die Transskription beendet, und einer das lacZ-Reporter-Gen und das Neomycinresistenz-Gen verbindenden Sequenz (β -geok) zusammen. Um für spätere Versuche auch die Herstellung konditionaler *Fatp4*-defizienter Mäuse zu ermöglichen, wurde diese Kassetten auf beiden Seiten von FRT-Stellen flankiert, die das Herausschneiden der Kassetten durch die FLP-Rekombinase erlauben. Zusätzlich wurde Exon 3 von zwei LoxP-Stellen umrahmt, die Schnittstellen der Cre-Rekombinase sind. Mit diesem Konstrukt (*Fatp4-K*) wurden zwei verschiedene Klone embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) transfiziert. Durch das integrierte Neomycinresistenz-Gen konnten die transfizierten Zellen nun antibiotisch selektiert werden, so dass nur die Zellen übrig blieben, in denen eine Rekombination mit dem Insert des Targetingvektors stattgefunden hatte. Da es auch zu einem fehlerhaften Einbau des Vektors kommen kann, musste dies durch Southern-Analyse ausgeschlossen werden. Die ES-Zell-Klone wurden in Blastozysten injiziert und diese in Mäuse implantiert. Die geborenen chimären Jungtiere wurden miteinander verpaart. Neben homozygoten Wildtyp-Mäusen (+/+) entstanden auch

heterozygote Trägertiere (+/-), die durch Southern-Analysen und PCR genomischer DNA ermittelt wurden. Durch gezielte Paarung gingen in der F2-Generation unter anderem Tiere hervor, die das *Fatp4*-Defektallel homozygot trugen (-/-).

Um auszuschließen, dass es sich bei dem konstruierten Allel nur um ein hypomorphes, nicht aber um ein Defekt-Allel handelt, das in einer vollständigen Inaktivierung von *Fatp4* resultiert, hat man zur Kontrolle ein zweites verändertes Allel erzeugt. Hierzu wurden Mäuse, die das *Fatp4-K*-Allel mit der beschriebenen Kassette tragen, mit Mäusen gekreuzt, die transgen für PGK-Cre, eine ubiquitär exprimierten Cre-Rekombinase (Schwenk et al., 1995), waren. Folglich entstanden in der F1-Generation Tiere mit einem *Fatp4*-Allel, das zwar noch die Kassette enthielt, aus dem Exon 3 aber durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten worden war (*Fatp4-KO*). Durch eine Rasterverschiebung an dem modifizierten Allel entsteht ein Stopcodon, das die Bildung von *Fatp4* unmöglich macht. Es liegt folglich eine Null-Mutante vor. Die Tatsache, dass die homozygoten *Fatp4-K*-Mäuse morphologisch identisch mit den homozygoten *Fatp4-KO*-Mäusen waren, zeigt, dass das *Fatp4-K*-Allel vollständig inaktiviert und somit die Gen-Kassette hocheffektiv ist.

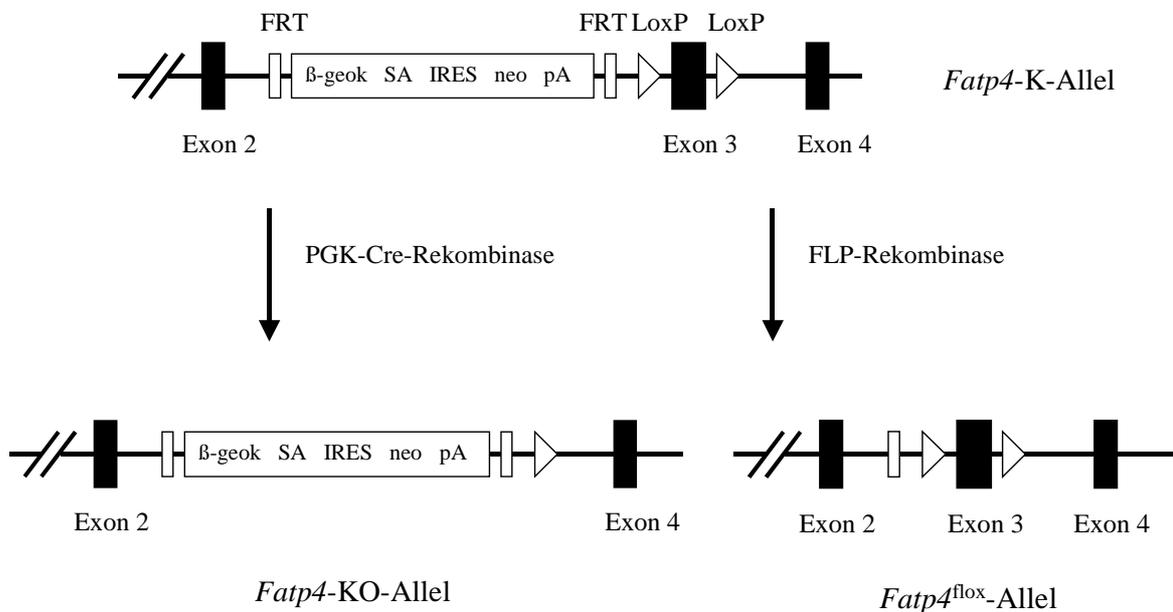


Abbildung 2: Das Defektallel *Fatp4-K*. Nach Exzision des von zwei LoxP-Stellen flankierten Exon 3 durch die PGK-Cre-Rekombinase bleibt das Allel funktionell inaktiv. Dagegen entsteht nach Exzision der von zwei FRT-Stellen flankierten Kassette wieder ein funktionell aktives „gefloxtes“ *Fatp4*-Allel.

1.4.2. Beschreibung des Phänotyps der *Fatp4-K*-Maus

Während sich die heterozygoten Mäuse von den Wildtyp-Mäusen nicht unterscheiden, starben die *Fatp4* ^{-/-} Mäuse nur Minuten bis wenige Stunden nach ihrer Geburt. Phänotypisch fielen sie durch eine komprimierte, kugelige Körperform auf. Sie schienen von einer verdickten, schuppigen und faltenfreien Haut starr eingengt zu werden, was eine Fixation ihrer Gelenke in Beugehaltung und eine Gesichtsdysmorphie mit offen stehendem Maul zur Folge hatte. Aufgrund der massiven Bewegungseinschränkung waren auch die Atmung und das Saugen behindert. Die histologische Untersuchung der Haut zeigte eine Verdickung des Stratum corneum als eine hyperkeratotische, homogene, eosinophile Masse. Auch das Stratum spinosum wies eine größere Anzahl von Zellschichten auf, und im Stratum granulosum war eine Verkleinerung der Keratohyalingranula festzustellen. Im Vergleich zur Haut der Wildtyp-Mäuse zeigte die *Fatp4*-defiziente Haut eine flache dermo-epidermale Verbindungszone ohne Reteleisten und eine verminderte Ausbildung der Hautanhangsgebilde (Haarfollikel, Schweißdrüsen, Talgdrüsen).

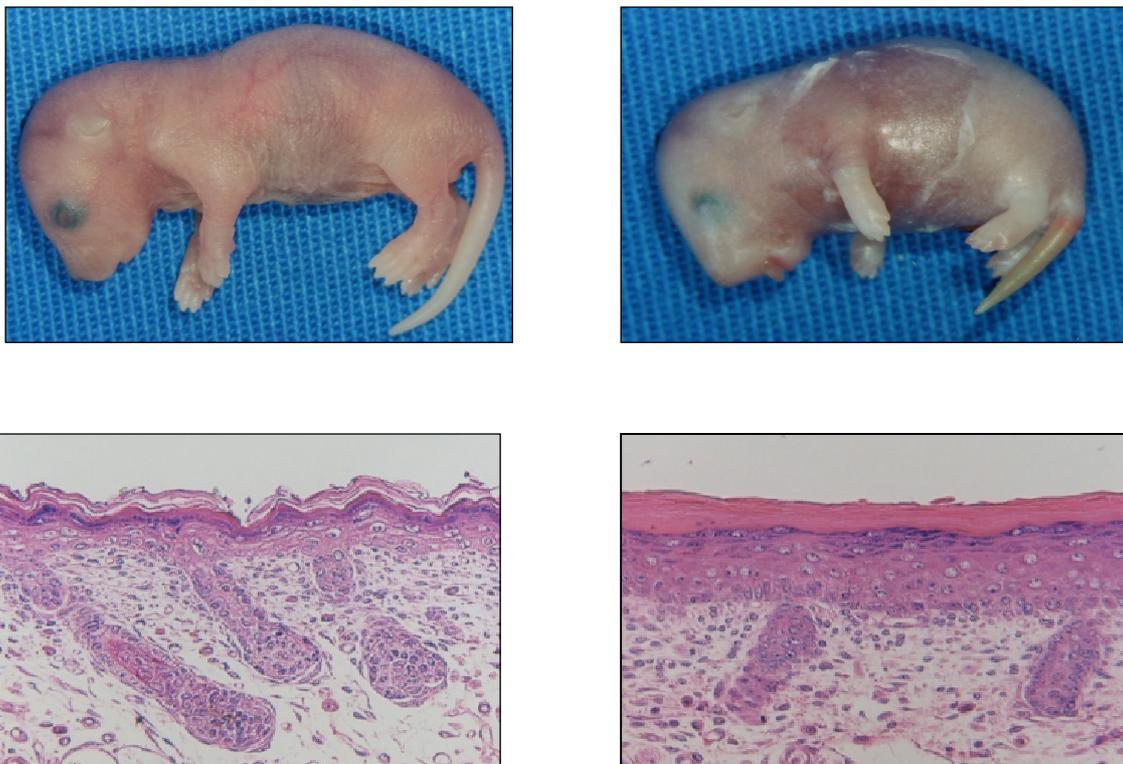


Abbildung 3: Morphologie neugeborener *Fatp4* ^{-/-} Mäuse. Oben: Neugeborene *Fatp4* ^{+/+} Kontrollmaus (links) im Vergleich mit einer *Fatp4* ^{-/-} Maus (rechts) aus dem gleichen Wurf. Unten: Histologisch zeigt die Epidermis von *Fatp4* ^{-/-} Mäusen (rechts) eine Hyperkeratose und eine Akanthose (HE Färbung, Vergrößerung jeweils 20x).

Diese histologischen Befunde ließen eine wesentliche Bedeutung von *Fatp4* in der Haut vermuten. *Fatp4* mRNA war in der Haut bereits nachgewiesen worden (Herrmann et al., 2001), der Bildungsort innerhalb der Haut war jedoch noch nicht bekannt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte als dieser das Stratum spinosum und das Stratum granulosum identifiziert werden (Herrmann et al., 2003).

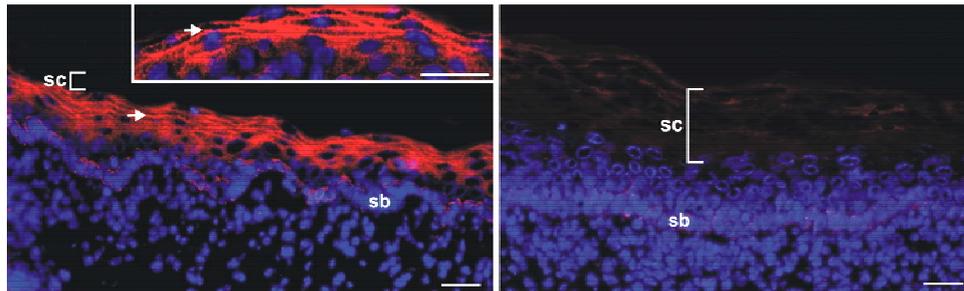


Abbildung 4: Fatp4-Expression in der Haut. Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem *Fatp4*-spezifischen Antikörper. *Fatp4* $+/+$ Kontrollmaus (links) im Vergleich mit einer *Fatp4* $-/-$ Maus (rechts). Die Haut der Kontrollmaus zeigt im Bereich des Stratum spinosum und des Stratum granulosum eine deutliche *Fatp4*-spezifische Färbung (Pfeil, rot). In der Epidermis der Knockoutmaus verlief der Nachweis von *Fatp4* negativ. sc: Stratum corneum, sb: Stratum basale. Maßstab 50 μ m.

Das hyperkeratotische sowie parakeratotische Erscheinungsbild der Haut veranlasste zu einer genaueren Untersuchung der Keratinozytendifferenzierung. Zu diesem Zweck wurden im Besonderen die Proteine, die am Verhornungsprozess der oberen Hautschichten beteiligt sind, mittels Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Sowohl die epidermisspezifischen Keratine (K5, K14, K10, K2e, K6 und K16) als auch die zur Bildung der Hornhülle (cornified envelope) benötigten Proteine Loricrin, Filaggrin, Periplakin und Transglutaminase-1 wurden, verglichen mit der Haut der *Fatp4* $+/+$ Kontrollmäuse, in deutlich erhöhtem Ausmaß nachgewiesen (Herrmann et al., 2003). Dies bestätigte, dass bei den *Fatp4* $-/-$ Mäusen tatsächlich eine Proliferation und Hyperkeratinisierung der Epidermis vorlag.

Wie sich durch Versuche mit Lucifergelb und X-Gal zeigte, war auch die Barrierefunktion der *Fatp4* $-/-$ Haut gestört. So durchdrang einerseits der Fluoreszenzfarbstoff Lucifergelb, der bei den *Fatp4* $+/+$ Kontrollmäusen nicht mehr als das Stratum corneum passieren konnte, die gesamte Epidermis der *Fatp4* $-/-$ Mäuse. Andererseits konnte das blaue Präzipitat, das bei der

Spaltung von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β , D-Galactopyranosid (X-Gal) durch die endogene β -Galactosidase entsteht, in der Haut von *Fatp4*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Die Epidermis der *Fatp4*^{+/+} Kontrollmäuse war hingegen für X-Gal undurchlässig (Herrmann et al., 2003). Darüberhinaus konnte ein Anstieg des transkutanen Wasserverlustes um den Faktor neun nachgewiesen werden (Herrmann et al., 2003).

Die lichtmikroskopische Untersuchung der übrigen Organe, ergab nur bei der Lunge Auffälligkeiten. Hier wurden nicht vollständig entfaltete Alveolen und eine Hyperproliferation der Septen festgestellt. Eine Untersuchung der Surfactant ergab keinen besonderen Befund (Herrmann et al., 2003).

Fatp4 scheint, wie weitere Untersuchungen ergaben, bei der Entwicklung von Fettzellen keine wesentliche Rolle zu spielen. Es wurde jedoch festgestellt, dass eine *Fatp4*-Defizienz Auswirkungen auf die Fettzusammensetzung hat. In Darm, Leber, Lunge, Gehirn, Dermis und Epidermis wurde das Vorkommen und die Zusammensetzung von Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPM), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Ceramiden (CER), Cholesterin (FC), Triglyceriden (TG) und Cholesterylester (CE) untersucht. Nur in der Epidermis fand man folgende Veränderungen: Die molaren Konzentrationen von PC, PE und CE waren vermindert, von FC und CER hingegen erhöht. Bei der genaueren Betrachtung der epidermalen Ceramide fiel auf, dass sie einen niedrigeren Anteil von sehr langkettigen Fettsäuren aufwiesen, während Fettsäuren mit weniger als 26 C-Atomen einen deutlich höheren Anteil ausmachten. Zusätzlich wurde eine Zunahme von ungesättigten und eine Abnahme von gesättigten, sehr langkettigen Fettsäuren festgestellt, was die Acyl-CoA-Synthetaseaktivität von *Fatp4* im Besonderen für sehr langkettige Fettsäuren erneut belegen könnte (Herrmann et al., 2003).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die morphologischen Veränderungen der *Fatp4*-defizienten Epidermis mit einem Verlust der Barrierefunktion einhergehen. Die wesentlichen Bestandteile dieser Barriere können nicht mehr in der erforderlichen Zusammensetzung gebildet werden. Der Tod der *Fatp4*-defizienten Mäuse wird vermutlich durch die massive Bewegungseinschränkung des Thorax und die daraus resultierende respiratorische Insuffizienz oder durch die progressive Dehydratation verursacht.

1.5. Vergleich mit der letalen restriktiven Dermopathie des Menschen

Der gesamte Phänotyp der *Fatp4*-defizienten Mäuse ähnelt in bemerkenswerter Weise dem Erscheinungsbild einer sehr seltenen Hauterkrankung des Menschen, der restriktiven Dermopathie (RD) (Herrmann et al., 2003; Moulson et al., 2003). Es handelt sich hierbei um eine letal verlaufende, autosomal rezessive Genodermatose, deren Pathogenese bislang nicht bekannt ist (Holbrook et al., 1987; Nijsten et al., 2002). Weltweit sind weniger als 50 Fälle beschrieben. Die betroffenen Kinder werden meist zu früh und mit vermindertem Geburtsgewicht geboren. Sie umspannt eine straffe, glatte, dünne und rissige Haut, die Bewegung kaum zulässt und die Atmung durch die Thoraxkompression massiv erschwert. Weitere Folgen der unnachgiebigen Haut sind ein kleiner offenstehender Mund, eine zusammengepresste Nase, tief ansetzende deformierte Ohren und Beugekontraktionen fast aller Gelenke. Der Tod tritt aufgrund insuffizienter Lungenventilation innerhalb von Stunden bis höchsten vier Wochen nach der Geburt ein.



Abbildung 5: Ein Säugling mit letaler restriktiver Dermopathie. Links: Typische Beugekontraktionen bei neugeborenen RD-Patienten. Rechts: Eine durchscheinende, dünne und rissige Haut, ein offen stehender Mund und tiefansetzende, deformierte Ohren als deutliches Kennzeichen der RD. (Entnommen aus Nijsten et al., 2002)

Histologisch zeigt die Haut eine verdickte hyperkeratotische Epidermis, eine flache dermoepidermale Verbindungszone und eine verminderte Anzahl von Hautanhangsgebilden, die nicht vollständig ausgebildet sind. Das Stratum granulosum weist in der Form veränderte Keratohyalin granula auf. Die Dermis ist dünn und enthält parallel zur Epidermis verlaufende Kollagenfasern. Das Unterhautfettgewebe besteht aus einer vermehrten Anzahl von

Zellschichten (Holbrook et al., 1987; Nijsten et al., 2002), womit dies der einzige Punkt ist, in dem sich die Merkmale der RD von denen der *Fatp4*^{-/-} Mäusen unterscheiden. Aufgrund infauster Prognose werden nach Diagnosestellung keine weiteren Therapieversuche unternommen.

Die aufgezeigten Parallelen zwischen RD und *Fatp4*-Defizienz werfen die Frage auf, ob der gesuchte genetische Defekt nicht auf dem *FATP4*-Gen zu suchen ist.

1.6. Möglichkeiten zur genaueren Untersuchung der Bedeutung von FATP4 in der Haut

Es ist bislang ungeklärt, ob die Veränderungen der Haut von *Fatp4*^{-/-} Mäusen primär durch das Fehlen von *Fatp4* in der Haut entstehen oder als sekundäre Effekte der generalisierten *Fatp4*-Defizienz. Da die homozygot defizienten Tiere kurz nach der Geburt sterben, ist dies schwierig zu untersuchen. In einer solchen Situation ist die Etablierung einer Mauslinie mit induzierbarer gewebspezifischer Geninaktivierung eine Methode der Wahl (Metzger et al., 2001). Hierbei spielt unter anderem das Cre/LoxP-Rekombinationssystem eine wichtige Rolle, worauf im Folgenden etwas genauer eingegangen werden soll.

1.6.1. Das Cre/LoxP - Rekombinationssystem

Das Cre/LoxP-Rekombinationssystem wurde ursprünglich beim Bakteriophagen P1 entdeckt, und was diesem als Überlebensstrategie dient, wird heute zur Herstellung gewebspezifischer Knockoutmäuse genutzt.

Die Cre-Rekombinase gehört zu der Familie der lambda-Integrasen und ist fähig, bestimmte Sequenzen der DNA (sogenannte LoxP-Sequenzen) zu erkennen und zu rekombinieren. LoxP-Sequenzen umfassen 34 Basenpaare (bp), welche sich aus zwei 13 bp-langen invertierten- und einer 8 bp-langen Kernsequenz zusammensetzen (Sternberg und Hamilton, 1981). Erkennt die Cre-Rekombinase ein LoxP-Sequenzen-Paar in der DNA, rekombiniert sie es. Je nach Orientierung der Kernsequenz kommt es zu einer Inversion oder zu einer Exzision der zwischen den beiden LoxP-Sequenzen liegenden DNA (Kilby et al.,

1993). Sollten sich die zwei LoxP-Schnittstellen in verschiedenen DNA-Molekülen befinden, werden die betreffenden Sequenzen ausgetauscht. Da das Cre/LoxP-System keine Kofaktoren benötigt, kann es auch in Säugerzellen zum Einsatz kommen (Sauer und Henderson, 1990).

Zur Entwicklung einer Mauslinie mit gewebsspezifischer Inaktivierung eines Gens benötigt man zunächst Mäuse, die an einem essentiellen Teil dieses Gens LoxP-Sequenzen aufweisen. Diese werden mittels Targetingvektor in Blastozysten injiziert und Mäusen implantiert, bei deren chimären Nachfolgegeneration dieses modifizierte Gen auch in die Keimbahn gelangen kann. In der F2-Generation erhält man dann Tiere, die Träger zweier zusätzlicher LoxP-Sequenzen sind (Mäuse mit gefloxtem Zielallel).

Des Weiteren ist eine zweite Mauslinie erforderlich, die die Cre-Rekombinase als Transgen exprimiert (Cre-transgene Mäuse). Durch die Wahl einer geeigneten Enhancer- und Promotorsequenz, unter deren Kontrolle die Transkription abläuft und die nur in bestimmten Organen oder Zelltypen vorkommen, kann die Bildung der Cre-Rekombinase auf gezielte Orte begrenzt werden. Eine Kreuzung von Mäusen mit gefloxtem Zielallel und Cre-transgenen Mäusen bringt demzufolge unter anderem Tiere hervor, bei denen es zu einer gewebsspezifischen Inaktivierung des gewünschten Gens kommt. Da die Integration des Vektors für das Cre-Transgen nicht vorhersehbar ist (Montford und Smith, 1995) und die Rekombinationseffizienz in den Zielzellen nicht bei 100 % liegt, sollten immer mehrere transgene Linien für einen verwendeten Vektor hergestellt werden.

Um nun aufgrund der frühzeitigen Letalität der Mäuse eine Mutation zu erzielen, die bei adulten Tieren induziert werden kann, bedarf es einer Veränderung der Cre-Rekombinase, die ihre Aktivität regulierbar macht. Beispielsweise kann mittels einer Fusion der Cre-Rekombinase mit der Ligandenbindungsdomäne eines modifizierten, humanen Östrogenrezeptors eine Aktivität nur dann ausgelöst werden, wenn das entsprechende Substrat am Rezeptor bindet (Indra et al., 1999; Metzger et al., 2001). Da es sich um einen modifizierten, humanen Rezeptor handelt, hat die Maus keine körpereigenen Substrate, die dies können. Durch die Injektion des entsprechenden Liganden wird die Cre-Rekombinase aktiviert und der Zeitpunkt der Geninaktivierung kann folglich exakt bestimmt werden. Li et al. haben erstmals eine zeitlich kontrollierbare Genausschaltung in der Maus erzielt, die hautspezifisch war (Li et al., 2000).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die konstitutiven *Fatp4*-Knockoutmäuse sterben kurz nach ihrer Geburt. Die Veränderungen, die man bei ihnen findet, sind zusätzlich aufgrund der fast ubiquitären Exprimierung des *Fatp4*-Gens äußerst schwierig einzustufen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen morphologische Analysen und funktionelle Untersuchungen an Mäusen mit induzierbarer gewebspezifischer *Fatp4*-Defizienz Erkenntnisse über die Funktion von *Fatp4* in der Epidermis und über seine Bedeutung für den Aufbau der epidermalen Lipidbarriere liefern. Mittels dieses Mausmodells ist es möglich, die Auswirkungen einer *Fatp4*-Defizienz in der Epidermis am adulten Tier exakt zu untersuchen. Im Gegensatz zu einer generalisierten *Fatp4*-Defizienz können hieraus wesentlich genauere Schlussfolgerungen gezogen werden.

Die auffälligen phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen Säuglingen mit restriktiver Dermopathie und homozygoten Mäusen der *Fatp4*-defizienten Linie legen den Verdacht nahe, dass das *FATP4*-Gen von wesentlicher Bedeutung bei der Entstehung dieser letalen Erkrankung sein könnte. Als weiteres Ziel dieser Arbeit soll die Isolierung humaner genomischer DNA aus Blut, die Sequenzierung der Exon-Bereiche und der Intron-Exon-Übergänge des humanen *FATP4*-Gens sowie die Sequenzanalysen, als Grundlage und Voraussetzung für die Untersuchung von Blut von Patienten mit restriktiver Dermopathie, in unserem Labor etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Autoklav:	System V-65 der Firma System GmbH
Automatisches DNA Sequenziergerät:	„ABI Prism 310 Genetic Analyser“ der Firma Applied Biosystems
Gelkammern:	verschiedene horizontale Systeme der Firma Angewandte Gentechnologie Systeme
Heizplatte und Magnetrührer:	„Ikarus Ret“ der Firma Janke & Kunke
Kamera:	Polaroid MP-4 Land Camera
Kryostat:	„Mod. 2700-Frigocut“ der Firma Reichert-Jung
Mikroskope:	„Olympus Provis“ mit angeschlossener Quecksilberlampe „Olympus U-RFL-T“ (Fluoreszenzmikroskopie) und einer „Color view 12“ Kamera zur Übertragung auf das Computerprogramm „AnalySIS“ „Olympus SZX 12“
Mikrowellenofen:	„ER638“ der Firma Toshiba
Netzgeräte:	„Elektrophorese Stromversorgungsgerät EPS 301“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech
PCR Geräte:	„PCR Sprint Temperature Cycling System“ der Firma Hybaid
PH Meter:	„Cyberscan 510“
Thermostate:	„Thermomixer comfort“ der Firma Eppendorf
Ultraschallwasserbad:	Sonorex RK 510 S der Firma Bandelin
UV Transilluminator:	Gerät der Firma Renner

Reagenzgefäßmischer:	Vortexer der Firma Jahnke & Kunkel bzw. Heidolph
Waage:	„Modell 3716“ und „CP323S-OCE“ der Firma Sartorius
Wärmeschrank:	Typ SUT 6060 der Firma Heraeus
Zentrifugen:	„Biofuge Fresco“ und „Biofuge Pico“ der Firma Heraeus Instruments

2.1.2. Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen erworben: Sigma, Roth, Merck und Stratagene.

2.1.3. Kits

Isolierung genomischer DNA aus Vollblut:	QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
Isolierung genomischer DNA aus Gewebe:	DNeasy® Tissue Kit (Qiagen)
Gewinnung von DNA aus Agarosegelen:	GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit der Firma Amersham Bioscience
Sequenzierung:	ABI Prism® BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems
PCR:	Herculase®Enhanced DNA Polymerase der Firma Stratagene

PCR zur Genotypisierung:

PuReTaqTM Ready-To-Go PCR-
beads der Firma Amersham
Biosciences

2.1.4. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech hergestellt. Eine Übersicht der eingesetzten Primer findet sich im Anhang.

Die Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) wurden von der Firma Amersham Biosciences bezogen.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Isolierung genomischer DNA

Aus humanem EDTA-Blut wurde genomische DNA mittels des QIAamp®DNA Blood Mini Kit gewonnen. Zur DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen und anderem Gewebe wurde der DNeasy® Tissue Kit verwendet. Beides wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Prinzipiell wurde das entsprechende Gewebe zunächst unter Einsatz von Protease beziehungsweise von Proteinase K lysiert. Nach Überführung in ein Gefäß mit einer Silikagel-Membran wurde die DNA an diese gebunden. Mittels zweier Waschvorgängen mit Zentrifugation wurde die Probe von Salzen und anderen Kontaminationen befreit. Die aufgereinigte DNA wurde schließlich von der Membran eluiert und in einem geeigneten Puffer aufgefangen.

2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zu 2 µl genomischer DNA wurden 5 µl 10 x Herculase® Reaktions-Puffer (Firma Stratagene), 1 µl dNTP-Mix (Amersham Pharmacia; 10 mM jedes dNTP), je 1 µl 10 mM Primer (MWG-Biotech AG), 0,5 µl Herculase® Enhanced DNA Polymerase (Firma Stratagene) und HPLC H₂O ad 50 µl gegeben.

Die Reaktionsbedingungen wurden üblicherweise folgendermaßen gewählt:

Auf eine dreiminütige Denaturierung bei 95 °C folgten 35 Zyklen:

- 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C,
- 30 Sekunden Annealing bei 60 °C,
- 1 Minute Polymerisierung bei 72 °C.

Im letzten Zyklus wurde die Polymerisierung auf acht Minuten verlängert.

Durch das Zufügen von DMSO (Firma Stratagene) oder MgCl₂ (MBI Fermentas) sowie durch die Veränderung der Zyklenanzahl konnten gegebenenfalls Ergebnisse verbessert werden.

2.2.3. Agarosegelelektrophorese

Eine Menge von 1,5 g Agarose wurde durch Aufkochen in 150 ml 1x TAE-Puffer gelöst. Während des Abkühlens wurden 7,5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben und das Gel in einen 15 x 15 cm Gelschlitten gegossen. Dieser war zuvor so in die Elektrophoresekammer eingebracht worden, dass seine beiden offenen Seiten jeweils mit den Seitenwänden der Kammer abschlossen. Ein eingesetzter Kamm sorgte für die Aussparungen (Taschen), in die später die Probenlösungen geladen wurden. Nach dem Erstarren wurde das Gel samt Schlitten so gedreht, dass die Taschen Richtung Kathode zeigten. Die Elektrophoresekammer wurde nun mit 1,5 l Laufpuffer (1x TAE) gefüllt. Der Kamm wurde nach etwa fünf Minuten entfernt und danach die DNA-Proben, denen jeweils 10 µl Laufpuffer zugegeben worden war, und der Größenmarker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch das Anlegen einer Spannung zwischen 30 und 100 V.

2.2.3.1. Elektrophoresepuffer:

1x TAE:	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA

2.2.3.2. Gel-Ladepuffer:

5x Blue Run:	150 mM EDTA
	25 mM Tris-HCL
	25 % Glycerin
	0,05 % Bromphenolblau

2.2.3.3. Größenmarker

1 kb DNA Ladder (Gibco BRL)

2.2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen zur Weiterverarbeitung zu gewinnen, wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung von Fragmenten bis zu 5 kb Länge erfolgte mit dem GFXTM PCR DNA and Band Purification Kit nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 50 µl TE (pH 8,0) resuspendiert.

2.2.4.1. pH-Puffer:

TE (pH 8,0):	10 mM Tris-HCL
	1 mM EDTA

2.2.5. Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem ABI Prism® BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Sie erfolgte als Cycle Sequencing in einem PCR-Gerät mit folgender Programmierung:

Zunächst wurde drei Minuten bei 96 °C denaturiert. Darauf folgten 25 Zyklen:

- 10 Sekunden Denaturierung bei 96 °C,
- 5 Sekunden Annealing bei 55 °C,
- 4 Minuten Polymerisierung bei 60 °C.

Die Proben wurden abschließend auf einer Temperatur von 4 °C gehalten.

Nach Ethanolfällung (s.unten) und Aufnahme in Template suppression-Reagenz (Applied Biosystems) wurden die Produkte zwei Minuten bei 94 °C denaturiert und in einem vom Gerät in eine Kapillare gepressten Gel elektrophoretisch getrennt und automatisch analysiert.

Die DNA Sequenzierung dieses Gerätes beruht auf dem Didesoxyverfahren nach Sanger (1977). Neben den Desoxynukleotidphosphaten (dNTPs) werden dem Reaktionsgemisch in geringer Menge auch Didesoxynukleotidphosphate (ddNTPs) hinzugegeben. Durch den Einsatz einer modifizierten Taq-Polymerase (AmpliTaq®DNA Polymerase) werden auch die ddNTPs in die neu entstehenden Sequenzen eingebaut. Da Letzteren die 3`hydroxyl-Gruppe fehlt, kann kein weiteres Nukleotid an ihnen binden und es kommt folglich zum Kettenabbruch. Aufgrund der zahlreichen Vervielfältigung entstehen Fragmente, die sich jeweils um die Länge eines Nukleotids unterscheiden. Durch das Markieren der vier verschiedenen Didesoxynukleotide mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, kann jeweils das letzte Nukleotid eines Sequenzfragmentes identifiziert werden. Mittels der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Fragmente nach ihrer Größe, wird das Ablesen der Ursprungssequenz möglich. Die durch einen Laser ausgelöste nukleotidtypische Fluoreszenz wird in digitale Signale transformiert und als farbiges Kurvendiagramm sichtbar gemacht.

2.2.6. Computeranalyse

Zur Analyse der erhaltenen Sequenzen wurden Computerprogramme aus dem HUSAR-Paket des DKFZ-Heidelberg verwendet, wie zum Beispiel „Similarity“ und „Reverse“.

Zusätzlich wurde mit dem Sequenzanalyseprogramm „Chromas Version 1.55“ gearbeitet. Beispiele hierfür werden im Ergebnisteil in den Abbildungen 23 und 24 dargestellt.

2.2.7. Fällung von DNA mit Ethanol

Um die nach dem Cycle Sequencing entstandene Nukleinsäurelösung in einen für die Sequenzierung geeigneten Puffer zu überführen, wurde in der Regel eine Ethanolfällung durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6-4,8) und 2,5 Volumina 100%igem Ethanol (-20 °C) gemischt. Der Ansatz wurde entweder direkt im Anschluss oder nach einer Lagerung bei -20 °C über Nacht für 20 Minuten bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 70%igem Ethanol erneut gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 µl Template-suppression-Reagenz gelöst.

2.3. Histologische Techniken

2.3.1. Probengewinnung für histologische Analysen

Die Herstellung der histologischen Schnitte der verschiedenen Organe und Gewebe sowie deren Färbung wurde von der Abteilung für zelluläre und molekulare Pathologie des Deutschen Krebsforschungszentrums, DKFZ, in Heidelberg durchgeführt. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte durch mich.

Den getöteten Mäusen wurden die zu analysierenden Organe (Gehirn, Darm, Leber, Milz, Myokard, Lunge, Skelettmuskulatur und Epidermis) möglichst schnell entnommen und in einer 4%igen neutralen Formaldehydlösung fixiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Inkubation in Xylol wurden die Proben schließlich in Paraffin eingebettet. Das Schneiden erfolgte in einer Schnittdicke von 3 µm. Nach Übertragung der Schnitte auf Objektträger wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung vorgenommen.

2.3.2. Probengewinnung für immunhistologische Analysen

Die Herstellung der immunhistochemischen Schnitte zur Fluoreszenzmikroskopie wurden von der Abteilung für Zellbiologie des DKFZ in Heidelberg durchgeführt. Das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie richtete sich dabei im Wesentlichen nach den Angaben in Herrmann et al., 2003, Schmidt et al., 1997 und Langbein et al., 2003. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte durch mich.

Aus der Fußsohle und aus der Schnauze entnommene Haut wurde zunächst schockgefroren, um daraufhin Gefrierschnitte anfertigen zu können. Die Schnitte wurden anschließend für fünf Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert. Nach einer zweiminütigen Permeabilisierung mit 0,1%igem TritonX-100/PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5%igem Ziegen Serum in PBS abgesättigt. Es folgte sowohl mit den primären als auch mit den sekundären Antikörpern jeweils eine 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Um den Verlust der löslichen Antigene (z.B. Fatp4) durch die Fixierung mit Aceton zu vermeiden, wurde hierfür eine Fixierung mit Formaldehyd gewählt. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte entweder für 45 Minuten oder in einer kürzeren Zeit und ohne Zugabe von Detergentien. Die Kontrollversuche erfolgten nur mit den sekundären Immunglobulin-Antikörpern für die jeweilige Spezies. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde den sekundären Antikörpern DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) hinzugefügt.

2.3.3. Antikörper für immunhistochemische Nachweise

2.3.3.1. Primäre Antikörper (AK)

- Zur Herstellung eines murinen Fatp4-AK wurde mittels eines synthetischen Peptids (APKHLPSHPDKGFID), das Meerschweinchen injiziert wurde, das Antiserum gewonnen (1:500) (Peptide Specialty Laboratories)
- Keratin K14-AK (1:3000) und Keratin K2e-AK (1:2000) des Meerschweinchens, Firma Progen Biotechnik
- Transglutaminase-1-AK der Maus (1:20), Firma Cell Systems

- Keratin K10-AK (1:500), Filaggrin-AK (1:500), Loricrin (1:500) und Keratin K6-AK (1:500) des Kaninchens, Firma Covance
- Claudin-AK (1:100) des Kaninchens, Firma Neomarkers Labvision
- Ki-67-AK (1:200) (Proliferationsmarker) der Ratte, Firma DAKO

2.3.3.2. Sekundäre Antikörper

Hierbei handelt es sich für die indirekte Immunfluoreszenz um Meerschweinchen-, Kaninchen- beziehungsweise Mausimmunglobulin-AK der Ziege, die an Alexa 568 gebunden sind (1:200) (Firma Molecular Probes)

2.4. Tierexperimentelle Methoden

2.4.1. Tiere

Die verwendeten K14-Cre-ER^{T2}-transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Pierre Chambon, Institut für Genetik und Molekularbiologie, Illkirch Cedex, Frankreich, zur Verfügung gestellt. Diese sowie die *Fatp4*-spezifischen Knockoutmäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gemäß den Richtlinien des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Heidelberg gehalten. Alle Arbeiten mit Tieren waren vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt bzw. dort angezeigt.

2.4.2. Herstellung der Mäuse

Zur Erzeugung von Mäusen mit induzierbarer hautspezifischer *Fatp4*-Defizienz wurde auf die ursprüngliche Mauslinie *Fatp4-K* (Herrmann et al., 2003) zurückgegriffen. Mäuse dieser Linie beinhalten, wie bereits beschrieben, eine von FRT-Stellen flankierte Kassetten in Intron 2, sowie LoxP-Schnittstellen beidseits von Exon 3. Durch die Kreuzung von *Fatp4-K*-Mäusen mit Mäusen, die transgen für die FLP-Rekombinase sind, wurde die Kassetten aus Intron 2

herausgeschnitten. Folglich entstanden nun Tiere ohne Kassetten, deren Exon 3 aber noch von zwei LoxP-Schnittstellen flankiert war („gefloxtes“ *Fatp4*-Allel). Da Mäuse mit homozygot „gefloxtem“ *Fatp4*-Allel keinerlei phänotypischen Veränderungen aufwiesen, konnte man davon ausgehen, dass das *Fatp4^{flox}*-Allel vollständig aktiv war (s. Einleitung, Abbildung 2).

Das gesteckte Ziel wurde durch die Kreuzung von *Fatp4^{flox}*-Tieren mit einer transgenen Mauslinie, die Träger des *K14-Cre-ER^{T2}*-Transgens war, erreicht (Li et al., 2000). Die Expression der Cre-Rekombinase wurde folglich unter die Kontrolle des K14-Promotors gestellt. Da dieser ausschließlich in der Basalzellschicht von mehrschichtigem Plattenepithel vorkommt, wurde somit eine hautspezifische Expression der Cre-Rekombinase ermöglicht. Die Induzierbarkeit der Cre-Rekombinase Aktivität wurde durch das Anfügen des kodierenden Bereiches für die Ligandenbindungsdomäne eines Östrogenrezeptors (ER^{T2}) erlangt. Es handelt sich hierbei um einen humanen Rezeptor, der aufgrund einer Mutation nicht auf Östrogen, sondern auf das Östrogenanalogon, Tamoxifen, anspricht.

2.4.2.1. Genotypisierung der Mäuse

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde den zu genotypisierenden Mäusen mittels Scherenschlag die Schwanzspitze entfernt. Nach Präparation der Schwanzhaut wurde diese in Aquadest für 10 Sekunden auf 65 °C erhitzt. Durch diesen Vorgang konnten Dermis und Epidermis voneinander getrennt werden. Unter Einsatz des DNeasy® Tissue Kit wurde, wie unter 2.2.1. beschrieben, fortgefahren.

Die eigentliche Genotypisierung wurde mittels PCR unter Verwendung des PuReTaqTM Ready-To-Go-Kit durchgeführt. Den vorliegenden PCR-Beads wurden 2 µl genomische DNA, je 1 µl 10 mM Primer und HPLC H₂O ad 30 µl zugegeben. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen:

Einer fünfminütigen Denaturierung bei 94 °C schlossen sich 35 Zyklen an:

- 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C,
- 30 Sekunden Annealing bei 55 °C,
- 1 Minute Polymerisierung bei 72 °C.

Im abschließenden Zyklus wurde für acht Minuten bei 72 °C polymerisiert. Folgende Primer kamen zum Einsatz:

Allel	Forward Primer/ Reverse Primer	5'.....3'
floxed und wt	F10N2-3,9U2	-GAG CTT CTA TGG CAG TGA GG-
	mmF4-wtIn2r	-GAA GCT ATC AGT GCT AAG CC-
NeoΔex 3	F4-pUX4-F4	-AAA TGA CCG ACC AAG CGA CG-
	F10N2-3,9U2	-CAC TAC CTC ATG ACC ACA GC-
Δex 3	mmF4-In2f-2	-GCC TAG GAG ACA AGG TAG TA-
	F10 N2-3,9U2	-CAC TAC CTC ATG ACC ACA GC-
Cre	TK 139	-ATT TGC CTG CAT TAC CGG TC-
	TK 141	-ATC AAC GTT TTC TTT TCG G-

Tabelle 1: wt = Wildtyp; neoΔex 3 = Allel mit Kassetten, ohne Exon 3; Δex 3 = ohne Kassetten, ohne Exon 3; cre = mit K14-Cre-ER^{T2(tg0)}-Transgen

Das floxed- beziehungsweise wt-Allel entsprach einem 434- bzw 341 bp-langen Fragment, das neoΔex 3-Allel einem 1 kb langen Fragment, das Δex 3-Allel einem 850 bp langen Fragment und das cre-Allel einem 350 bp langen Fragment. Mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht, konnten die einzelnen Banden bestimmten Genotypen und Mäusen zugeordnet werden (Abb. 6).

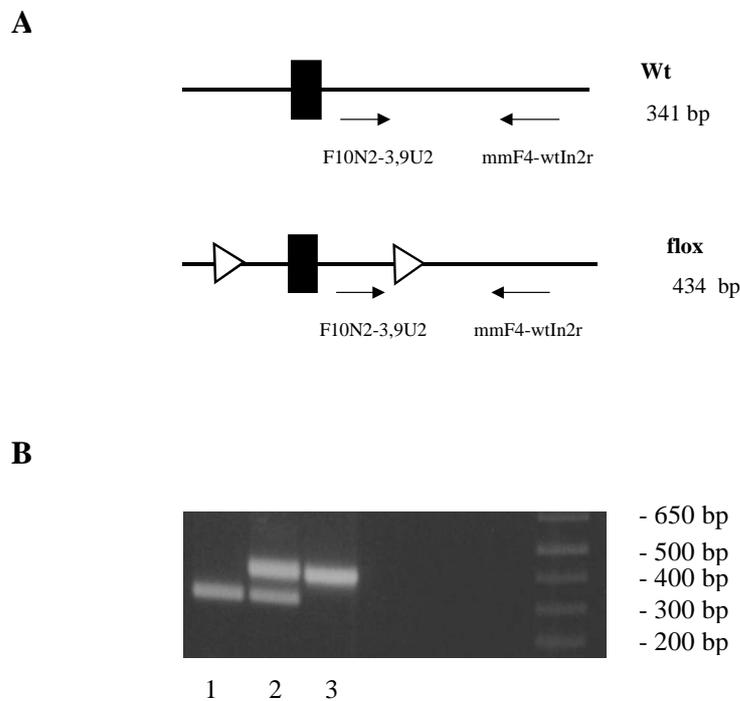


Abbildung 6: Genotypisierungsstrategie am Beispiel des Nachweises von wt- bzw floxed-Allelen. (A): Das wt-Allel ergibt nach Amplifikation mittels PCR ein 341 bp langes Fragment, das floxed-Allel ergibt ein Fragment von 434 bp. (B): Die Trennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel. 1: wt/wt; 2: wt/floxed; 3: floxed/floxed; rechts im Bild: Größenmarker 1 kb DNA Ladder.

2.4.2.2. Hautspezifische Inaktivierung des Fettsäuretransportproteins 4 (Fatp4)

Da die Rekombinationseffizienz des Cre-Transgens nicht bei 100 % liegt, man aber bestrebt ist, die größtmögliche tamoxifeninduzierte Inaktivierung des *Fatp4*-Gens zu erzielen, wurden die Versuche mit Tieren durchgeführt, bei denen auf einem Allel die gewünschte Mutation bereits vorliegt und das zweite Allel an entsprechender Stelle gefloxt ist.

2.4.2.2.1. Mäuse mit einem *Fatp4*-Nullallel

Zur Herstellung heterozygoter *Fatp4*-defizienter Tiere, wurden Mäuse der bereits beschriebenen *Fatp4*-K-Linie (*Fatp4*^{neoflox/wt}) mit PGK-Cre transgenen Mäusen (Schwenk et al., 1995) gekreuzt. Die PGK-Cre-Rekombinase wird ubiquitär exprimiert und ließ Tiere entstehen, deren *Fatp4*-Allel die Neomycinresistenzkassette noch enthielt, Exon 3 aber nicht mehr (*Fatp4*^{neoΔex3/wt}). Die Überprüfung des Genotyps wurde mittels PCR unter der Verwendung der Primer F4-pUX4-F4 und F10N2-3,9U2 durchgeführt. Nach erfolgter Exzision des dritten Exons entstand ein 1 kb großes Fragment, wodurch die Identifizierung der entsprechenden Tiere, nach Auftrennung ihrer genomischen DNA im Agarosegel, möglich war.

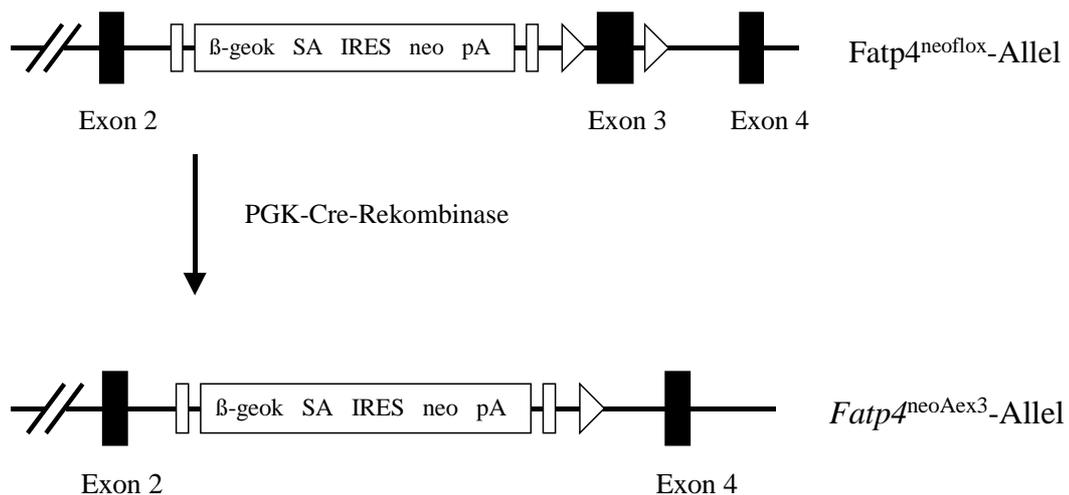


Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Herstellung eines *Fatp4*-Nullallels. Das von zwei LoxP-Schnittstellen (offene Dreiecke) flankierte Exon 3 wird durch die PGK-Cre-Rekombinase entfernt und lässt das *Fatp4*^{neoΔex3} Allel entstehen. Dieses enthält nur noch die von zwei FRT-Stellen (offene schmale Rechtecke) flankierte Kassettenstruktur.

2.4.2.2.2. Mäuse mit gefloxtem *Fatp4*-Allel

Um Mäuse zu erhalten, bei denen Exon 3 des *Fatp4*-Gens heterozygot von zwei LoxP-Stellen flankiert wird, wurden heterozygote Tiere der *Fatp4*-K-Linie mit Mäusen gekreuzt, die ein Transgen für die FLPe-Rekombinase tragen (Rodriguez et al., 2000). Durch PCR-Genotypisierung mit den Primern F10N2-3,9U2 und mmF4-wtIn2r konnten wir die Tiere ermitteln, bei denen die von zwei FRT-Stellen flankierte Kasette entfernt worden war und die nur noch das „gefloxt“ Exon 3 (flox) enthielten. Durch die zwei zusätzlichen LoxP-Sequenzen entstand nach Amplifikation anstelle des 341 bp-langen Wildtyp-Fragmentes ein 434 bp-langes Fragment. Die auf diese Weise nachgewiesenen Mäuse wurden *Fatp4*^{flox/wt} genannt.

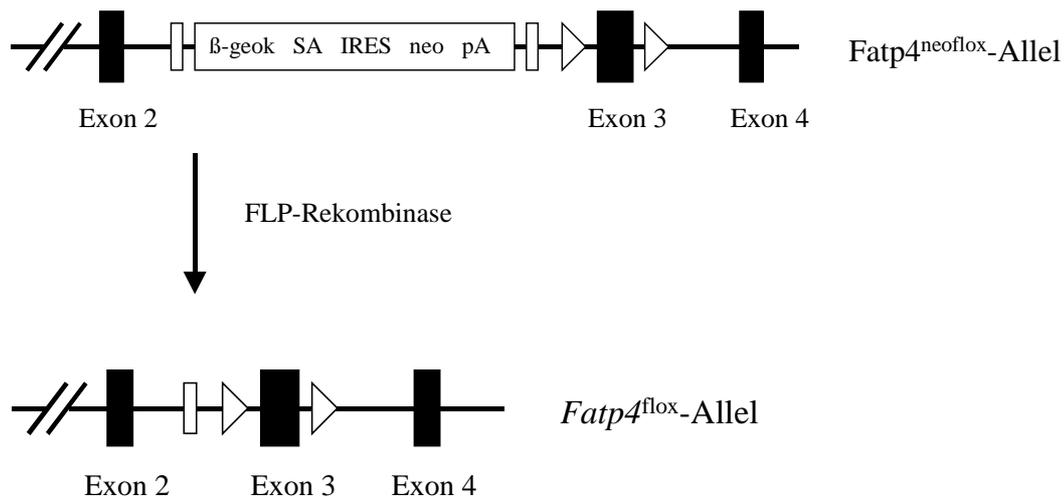


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Herstellung eines „gefloxtes“ *Fatp4*-Allels. Die durch zwei FRT-Schnittstellen (offene schmale Rechtecke) flankierte Kasette wird durch die FLP-Rekombinase entfernt und lässt das *Fatp4*^{flox}-Allel entstehen. Dieses enthält nur noch das von zwei LoxP-Stellen (offene Dreiecke) flankierte Exon 3.

Durch das Verpaaren der *Fatp4*^{flox/wt}-Tiere mit Mäusen der transgenen *K14-Cre-ER*^{T2}-Linie, entstanden unter anderem *Fatp4*^{flox/wt} *K14-Cre-ER*^{T2 (tg/0)}-Doppelmutanten. Allgemein zu befolgende Standardbedingungen sehen vor, dass bei Versuchen mit transgenen Tieren stets hemizygoten Mutanten (tg/0) eingesetzt werden

2.4.2.2.3. Mäuse mit induzierbarer *Fatp4*-Inaktivierung in der Epidermis

Das Kreuzen der Mauslinien, deren Entstehung unter 2.4.2.2.1. und 2.4.2.2.2. beschrieben wurde, brachte folgende Tiere hervor:

Zum einen entstanden *Fatp4*^{neoΔex3/flox} *K14-Cre-ER*^{T2(0/0)}-Mäuse. Da diese Tiere keine Träger des modifizierten Cre-Rekombinase-Transgens waren, konnte mittels Tamoxifengabe keine Inaktivierung des *Fatp4*-Gens erreicht werden. Diese Tiere sollten demzufolge als eine der Kontrollgruppen dienen (Kontrollgruppe 1).

Zum anderen wurden *Fatp4*^{neoΔex3/flox} *K14-Cre-ER*^{T2(tg/0)}-Mäuse nachgewiesen. Da diese Tiere sowohl Träger eines Null- als auch eines „gefloxten“ Allels waren und zudem über ein Transgen verfügten, stellten sie die gewünschten induzierbaren *Fatp4*-Nullmutanten dar (Tam-Gruppe). Bei der Genotypisierung der Doppelmutanten kamen zusätzlich die Primer TK 139 und TK 141 zum Einsatz. Das hiermit amplifizierte Fragment bestand aus 350 bp und diente dem Nachweis der Cre-transgenen Tiere.

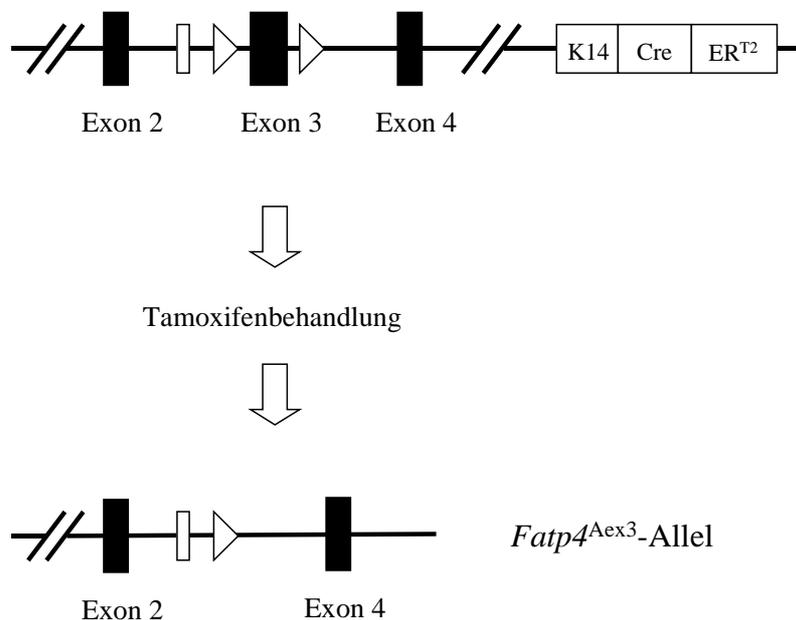


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Herstellung eines induzierten epidermisspezifischen *Fatp4*-Nullallels. Aus dem funktionell aktiven induzierbaren *Fatp4*^{flox}-Allel, das zusätzlich Träger des *K14-Cre-ER*^{T2}-Konstruktes ist, wird durch Tamoxifenbehandlung das von zwei LoxP-Schnittstellen flankierte Exon 3 entfernt. Es entsteht ein funktionell inaktives *Fatp4*-Allel.

2.4.3. Tamoxifenbehandlung

Das Östrogenanalogon Tamoxifen (4-Hydroxytamoxifen, Sigma) wurde, wie von Li et al., 2000 beschrieben, 10 Wochen alten weiblichen Mäusen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen einmal täglich intraperitoneal injiziert. Dies wurde jeweils nach zwei, vier und sechs Wochen wiederholt (Abb. 10). Eine Injektion enthielt 0,1 mg Tamoxifen in 100 µl autoklaviertem Sonnenblumenöl. Zum Erlangen einer Dispersion wurde diese Mischung vor jeder Injektion 30 Minuten in ein Ultraschallwasserbad gegeben. Als Kontrollgruppen dienten gleichaltrige Tiere, die mit oben genannter Tamoxifenlösung behandelt wurden, aufgrund ihres Genotyps damit aber keine Inaktivierung des *Fatp4*-Gens erzielt werden konnte (Kontrollgruppe 1, s. 2.4.2.2.3.), Tiere, denen jeweils nur 100 µl Sonnenblumenöl ohne Tamoxifen injiziert wurde (Kontrollgruppe 2) und Tiere, die unbehandelt blieben (Kontrollgruppe 3). Jeweils die Hälfte der vier verschiedenen Versuchstiergruppen wurde sieben Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung durch cervikale Dislokation getötet. Die verbleibenden Tiere wurden sechs Wochen später, also 13 Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung unter Anwendung derselben Methode getötet.

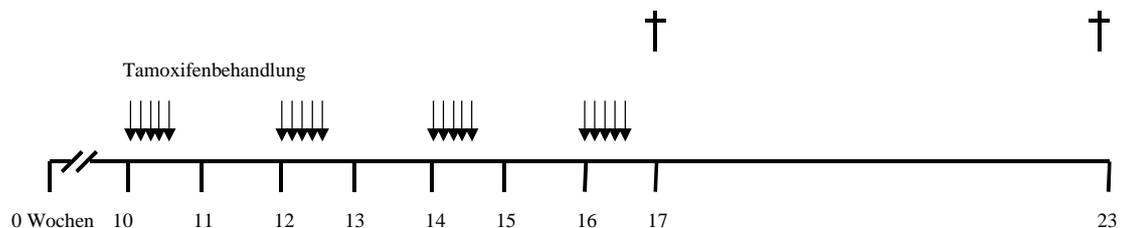


Abbildung 10: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Tamoxifenbehandlung. Die Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen erstmals an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit Tamoxifen behandelt. Dies wurde nach zwei, vier und sechs Wochen wiederholt. Sieben beziehungsweise 13 Wochen nach der ersten Tamoxifenverabreichung wurden die Tiere getötet.

2.4.4. Nachweis der epidermisspezifischen Exzision von Exon 3

Von den getöteten Mäusen der Kontrollgruppen und der Mutanten wurde genomische DNA von Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum,

Colon und Haut gewonnen. Die entnommenen Hautpartien stammten von Schnauze, Augenlid, Ohr, Rücken, Bauch, Fußsohle und Schwanz, wobei Epidermis und Dermis des Schwanzes voneinander getrennt wurden. Die zum Nachweis für die erfolgte Exzision von Exon 3 eingesetzten Primer mmF4-In2f-2 und F10N2-3,9U2 ergaben ein 850 bp langes Fragment. Mittels der parallel eingesetzten *Hfe*-spezifischen Primer konnte nachgewiesen werden, dass sich in den Proben genomische DNA befand.

2.5. Verschiedene Methoden

2.5.1. Überprüfung der Hautdurchlässigkeit

Bei intakter Hautbarriere ist das Eindringen von X-Gal sowie von Lucifergelb durch die Epidermis in die Dermis nicht möglich. Ist der Fluoreszenzfarbstoff Lucifergelb beziehungsweise das blaue Präzipitat von X-Gal in der Haut nachweisbar, spricht dies für eine gestörte epidermale Barriere.

2.5.1.1. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β , D-Galactopyranosid (X-Gal)

Die β -Galactosidase spaltet X-Gal und lässt das tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo entstehen. Da die Haut bei niedrigem pH-Wert eine hohe endogene β -Galactosidase Aktivität aufweist, kann X-Gal zur Überprüfung der Hautdurchlässigkeit eingesetzt werden (Hardmann et al., 1998). Eine Ohrmuschel der zuvor getöteten Mäuse wurde zunächst für 45 Minuten bei 4 °C fixiert (Fixierungslösung s. 2.5.1.1.1.). Bei Raumtemperatur wurde sie anschließend dreimal für jeweils 10 Minuten gewaschen (Waschlösung s. 2.5.1.1.1.). Die Färbung erfolgte meist über Nacht bei 37 °C, wobei darauf zu achten war, dass hierbei die Schnittstelle der Ohrmuschel nicht mit der Lösung in Kontakt kam (Färbelösung s. 2.5.1.1.1.). Am darauffolgenden Tag wurde nach kurzem Waschen in PBS eine Dehydrierung in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde für 30 Minuten mit 45 %igem EtOH und anschließend wiederum für 30 Minuten mit 55 %igem EtOH dehydriert. Die Proben wurden in 70 %igem EtOH bei 4 °C gelagert.

2.5.1.1.1. Lösungen für die Permeabilitätsprüfung der Haut (X-Gal)

Fixierungslösung:	1 % Formaldehyd 0,2 % Glutaraldehyd 5 mM EGTA pH 8.0 0,02 % Nonidet P40
Waschlösung:	2 mM MgCl ₂ 0,01 % Na-deoxycholat 0,02 % Nonidet P40 5 mM EGTA pH 8.0
Färbelösung:	5 mM K ₃ Fe(CN ₆) 5 mM K ₄ Fe(CN ₆) 3 H ₂ O 2 mM MgCl ₂ 0,01 % Na-deoxycholat 0,02 % Nonidet P40 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β, DGalactopyranosid (X-Gal)
alle Lösungen in PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄

2.5.1.2. Lucifergelb

Bei Lucifergelb handelt es sich um einen wasserlöslichen und nicht membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptionsspektrum bei 420-430 nm und dessen Emissionsspektrum bei 528-540 nm liegt. Die abgetrennten Ohrmuscheln wurden zunächst in 70%iges EtOH getaucht und anschließend abgetupft. Bei 37 °C wurden sie, ohne dabei die Schnittstellen zu benetzen, für eineinhalb Stunden in 1 mM Lucifergelb-Ringerlösung (pH 7,4) getaucht. Nachdem die Proben in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren worden

waren, wurden am Kryostaten bei ca. -20°C Gefrierschnitte in einer Schnittdicke von $5\ \mu\text{m}$ angefertigt. Auf einem Objektträger luftgetrocknet konnten diese anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1. Epidermisspezifische Inaktivierung des *Fatp4*-Gens durch Tamoxifen

Die unter 2.4.4. beschriebene Untersuchung der genomischen DNA von Kontrolltieren und tamoxifenbehandelten *Fatp4*^{neo Δ ex3/flox} *K14-Cre-ER*^{T2(tg/0)}-Mäusen (Mutanten) ergab folgende Ergebnisse:

Das mit Kontrolltier-DNA beladene ethidiumbromidhaltige Agarosegel zeigte erwartungsgemäß nur Hfe-spezifische Banden (Abb. 11A). Die Auswertung der mit Mutanten-DNA beladenen Gele ergab sowohl sieben Wochen (Abb. 11B) als auch 13 Wochen (Abb. 11C) nach der ersten Tamoxifenbehandlung in den mit Haut-DNA beladenen Bahnen zusätzlich Δ ex3-spezifische Banden. Anhand dieser Banden konnte der Nachweis für das erfolgreiche tamoxifeninduzierte Entfernen von Exon 3 erbracht werden. Somit war eine gewebsspezifische Inaktivierung des *Fatp4*-Gens bei adulten Tieren erfolgt.

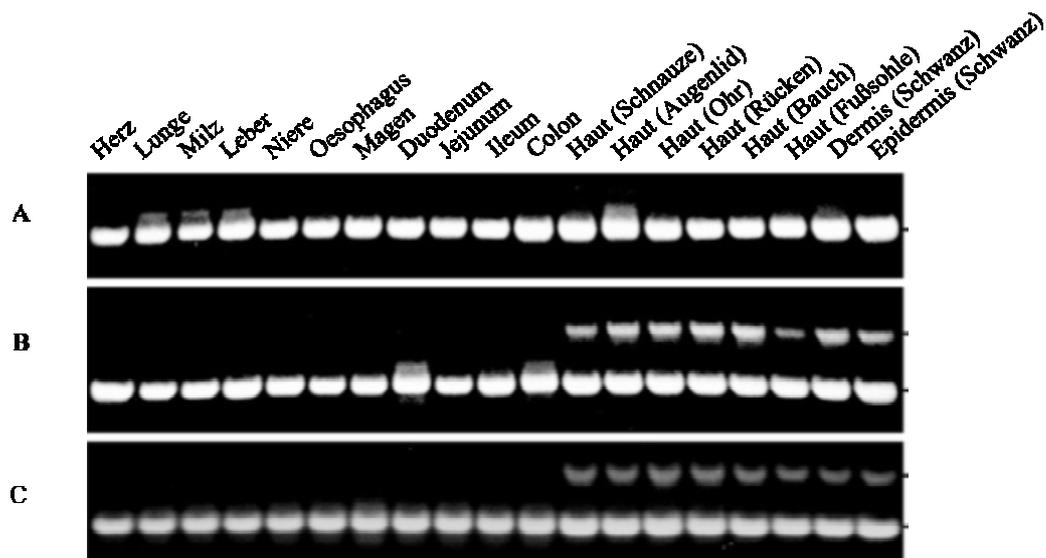


Abbildung 11: Ethidiumbromidhaltiges Agarosegel zum Nachweis der erfolgten Exzision von Exon 3 in der Epidermis. Die Bahnen 1-11 wurden mit DNA folgender Gewebe beladen (von links nach rechts): Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon. Die Bahnen 12-19 enthalten DNA von Haut verschiedener Herkunft (von links nach rechts): Schnauze, Augenlid, Ohr, Rücken, Bauch, Fußsohle, Schwanzdermis und Schwanzepidermis. (A): DNA von Kontrolltieren, sieben Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung. Es liegen nur Hfe-spezifische Banden vor. (B): DNA der Mutanten (*Fatp4^{neoΔex3/flox} K14-Cre-ER^{T2(tg⁰)}*), sieben Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung. Bei der unteren Bandenspur handelt es sich um Hfe-spezifische Amplifikationsprodukte. Die obere Bandenspur erscheint nur in den mit Haut-DNA beladenen Bahnen. Die Banden beinhalten 850 bp-lange Amplifikate, die nach erfolgter Exzision von Exon 3 unter Einsatz der spezifischen Primer entstehen. (C): DNA der Mutanten, 13 Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung. Die Ergebnisse entsprechen den unter B beschriebenen. Die untere Bandenspur enthält Hfe-spezifisch Amplifikate. In den mit Haut-DNA befüllten Bahnen 11-19 liegen Δ ex3-spezifische Banden vor.

3.2. Phänotypische Beurteilung der tamoxifeninduzierten hautspezifischen *Fatp4*-Mutanten

3.2.1. Makroskopische Analysen

Es standen vier verschiedene Versuchstiergruppen (s. 2.4.2.2.3. und 2.4.3.) über einen Zeitraum von sieben beziehungsweise 13 Wochen nach erster Tamoxifengabe unter Beobachtung. Jede Gruppe bestand aus insgesamt vier weiblichen Tieren. Im Laufe der besagten Zeit konnten bei den Mäusen der Tam-Gruppe keine makroskopischen Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. Sie unterschieden

sich weder durch ihr Verhalten noch durch ihr äußeres Erscheinungsbild von den Kontrolltieren.

3.2.2. Histologische Analysen

Sieben beziehungsweise 13 Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung wurden die Tiere aller Versuchsgruppen getötet. Die lichtmikroskopische Untersuchung von Gehirn, Darm, Leber, Milz, Myokard, Lunge und Skelettmuskulatur zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen, wohingegen bei der histologischen Untersuchung der Epidermis deutliche Veränderungen bei den Tieren der Tam-Gruppe gefunden wurden. Die Epidermis der Tiere aller Kontrollgruppen erschien in ihrer physiologischen Struktur unverändert.

3.2.2.1. Ergebnisse der histologischen Analysen der Epidermis

Die histologischen Schnitte von Schnauzen-, Augenlid-, Ohren-, Rücken- und Fußsohlenhaut der Tam-Gruppe fielen durch ein deutlich verdicktes Stratum corneum auf. Darüberhinaus zeigte das Stratum spinosum eine größere Anzahl von Zellschichten als sie bei den Tieren der Kontrollgruppen gefunden wurde. Bei den Ergebnissen der sieben und der 13 Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung getöteten Tam-Mäuse wurden keine besonderen Unterschiede in Bezug auf die Ausprägung der Veränderungen festgestellt.

Beide Abweichungen waren jedoch verglichen mit den Befunden der konstitutiven Knockoutmaus mit generalisierter Fatp4-Defizienz (Herrmann et al., 2003; s. Einleitung, Abb. 3) weniger stark ausgeprägt. Eine abgeflachte dermo-epidermale Verbindungszone, eine verminderte Dichte von Hautanhangsgebilden und eine komprimierte Dermis, wie sie bei den neugeborenen Mäusen mit generalisierter Fatp4-Defizienz gefunden worden waren, konnten weder bei den Tieren, die sieben Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung getötet wurden, noch bei nach 13 Wochen getöteten Tieren festgestellt werden.

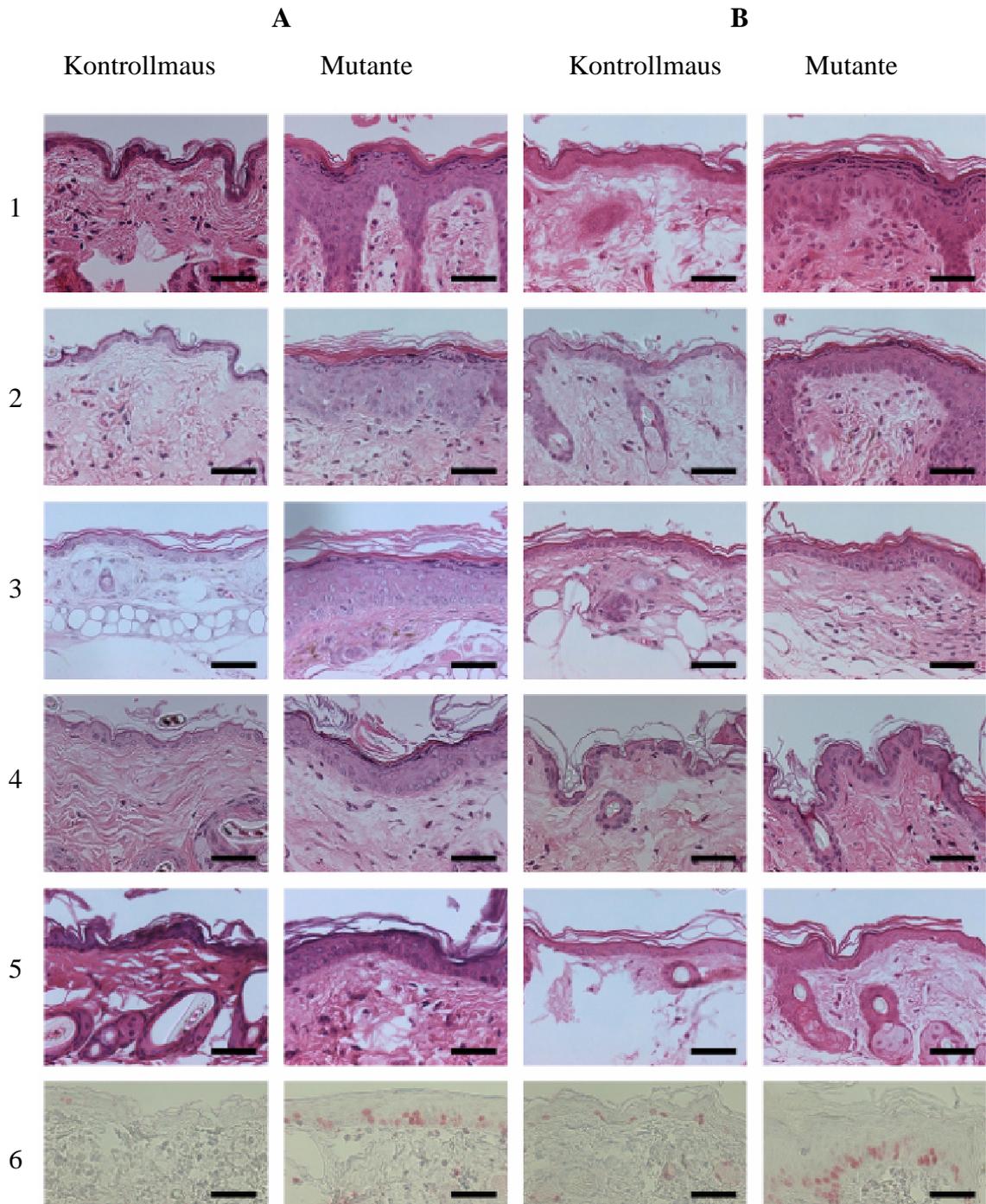


Abbildung 12: Haut von Kontrollmäusen und *Fatp4*^{neoΔex3/flox} *K14-Cre-ER*^{T2(tg/0)}-Mäusen (Mutanten) im Vergleich, sieben (A) beziehungsweise 13 Wochen (B) nach der ersten Tamoxifenbehandlung. (1-5): HE-gefärbte Hautschnitte von Schnauze (1), Augenlid (2), Ohr (3), Rücken (4) und Fußsohle (5). Alle Abbildungen zeigen eine Verdickung des Stratum corneum und eine erhöhte Anzahl von Zellschichten im Stratum spinosum der *Fatp4*-defizienten Haut. (6) Ein immunhistochemischer Nachweis der sich in Teilung befindenden Zellen mittels des Proliferationsmarkers Ki67 zeigt eine deutliche Hyperproliferation in der *Fatp4*-defizienten Haut. Maßstab 50 μ m

3.2.2.2. Ergebnisse der immunhistologischen Analysen der Epidermis

Die immunhistochemischen Untersuchungen dienten zum einen dazu, das Fehlen von Fatp4 in der Haut der Tam-Mäuse zu kontrollieren und zum anderen die beobachtete Hyperkeratose genauer zu charakterisieren.

3.2.2.2.1. Fatp4

Das Stratum spinosum sowie das Stratum granulosum konnten in vorangegangenen Arbeiten als Lokalisation von Fatp4 in der Haut identifiziert werden (Herrmann et al., 2003). Bei den Tieren der Kontrollgruppen konnte Fatp4 am Rande des Stratum granulosum direkt unterhalb des Stratum corneum (Abb. 13, sc) nachgewiesen werden (Abb. 13, weißer offener Pfeil).

Der immunhistochemische Nachweis von Fatp4 bei Tieren der Tam-Gruppe verlief negativ. Weder im Stratum spinosum noch im Stratum granulosum war eine Immunfärbung zu erkennen (Abb. 13, gelber offener Pfeil). Dies bestätigte die erfolgreiche Inaktivierung des *Fatp4*-Gens infolge der Tamoxifenbehandlung.

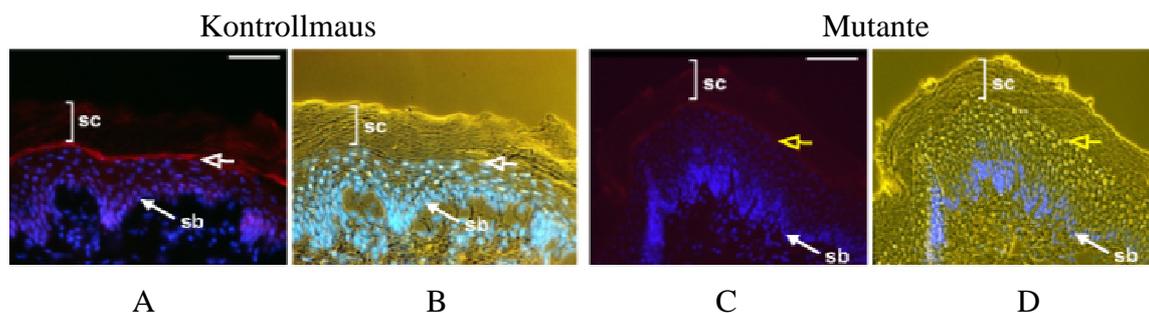


Abbildung 13: Inaktivierung von *Fatp4* in der Epidermis. (A+C): Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem Fatp4-spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 µm.

3.2.2.2.2. Ki67-Antigen

Ob es sich bei der Hyperkeratose um eine hyperproliferative Form handelt, sollte mit Hilfe des Ki67-Antikörpers untersucht werden. Dieser findet hauptsächlich in der Tumordiagnostik Anwendung und dient dort, indem er das sich nur in teilungsfähigen Zellen befindende Ki67 sichtbar macht, als Proliferationsmarker. Da nur das Stratum basale und die Haarfollikel als Bildungsorte für Keratinozyten über teilungsfähige Zellen verfügen, war nur hier eine Immunreaktion zu erwarten.

Während sich in der Haut der Kontrollmäuse die angefärbten, sich in Teilung befindenden Zellkerne hauptsächlich im Stratum basale, aber auch in den Haarfollikeln befanden, war in der Haut der Tam-Mäuse eine erhöhte Anzahl positiver Zellen im Stratum basale zu beobachten und eine zusätzliche Anfärbung in den ersten Schichten der Suprabasalzellen. Sieben Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung befanden sich bei den Tieren der Tam-Gruppe 45 % der Zellen in Teilung, wohingegen es bei den Tieren der Kontrollgruppen nur 9 % waren. Entsprechend wurden 13 Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung in der Tam-Gruppe 42 % und in den Kontrollgruppen 19 % teilungsfähige Zellen nachgewiesen. Es konnte folglich auf eine hyperproliferative Hyperkeratose geschlossen werden (Abb. 12(6)).

3.2.2.2.3. Keratine

Als Strukturproteine der Epidermis und deren Anhangsgebilde geben Keratine den Keratinozyten Stabilität und Form. Die auch als Hornstoff bezeichneten Keratine werden im Stratum spinosum gebildet, sind wasserunlöslich und wenig quellbar. Mittlerweile kennt man eine Vielzahl spezifischer Keratine, die sich aufgrund ihrer Verteilung und ihrer verschiedenen Wirkungsorte unterscheiden. Eventuelle Veränderungen in der Verteilung und dem Vorkommen einzelner Keratine sollten Aufschluss über die Keratinozytendifferenzierung geben.

Das Vorliegen von K14 war in der Haut der Kontrollmäuse auf das Stratum basale (Abb. 14, sb) beschränkt. In der Haut der Tam-Mäuse fand sich eine vergleichbare Färbung des Stratum basale. Darüberhinaus wurde K14 aber auch in den ersten Schichten der Suprabasalzellen nachgewiesen (Abb. 14, gelber offener Pfeil).

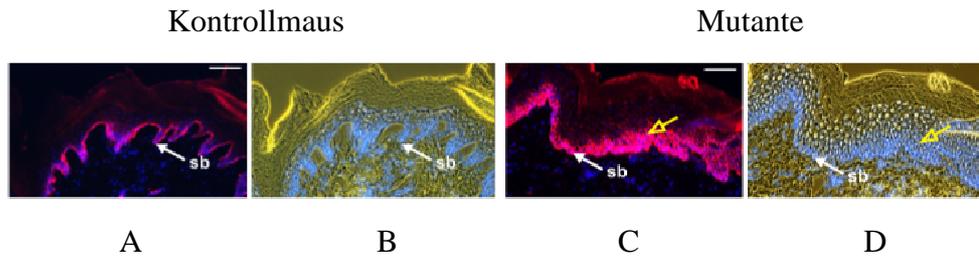


Abbildung 14: Nachweis des Keratin K14. (A+C): Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem K14-spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 μ m.

K6 befindet sich gewöhnlich in den Keratinozyten des Stratum basale und vereinzelt in Suprabasalzellen. Diese Verteilung traf bei den Mäusen der Kontrollgruppe zu (Abb. 15, weißer offener Pfeil), wohingegen die Epidermis der Tam-Mäuse dieses Keratin zusätzlich im Stratum spinosum und im Stratum granulosum aufwies (Abb. 15, gelbe Klammer).

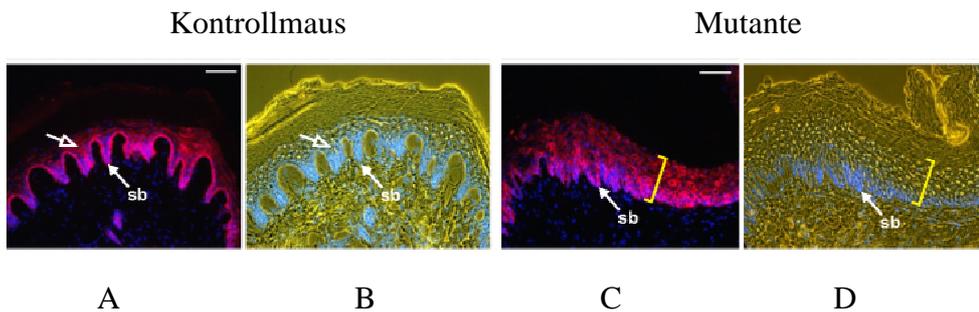


Abbildung 15: Nachweis des Keratin K6. (A+C): Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem K6-spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 μ m.

Das Keratin K10 zeigte in allen lebenden Zellen der Suprabasalschichten eine deutliche Immunreaktion, die in der Haut der Tam-Mäuse allerdings stärker (Abb. 16, gelbe Klammer, ss und sg) als bei den Mäusen der Kontrollgruppe (Abb. 16, weiße Klammer, ss und sg) ausfiel. Weder im Stratum basale noch im Stratum corneum wurde K10 nachgewiesen.

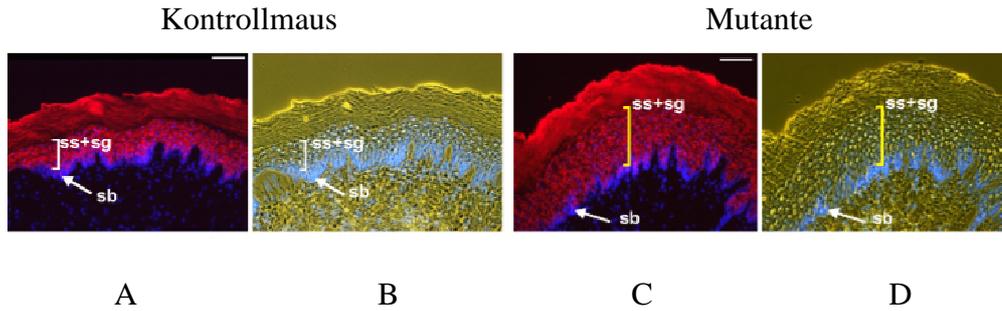


Abbildung 16: Nachweis des Keratin K10. (A+C): Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem K10-spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 μm .

Erst gegen Ende der Keratinozytendifferenzierung wird das Keratin K2e gebildet, so dass dessen Immunreaktion in der Epidermis der Kontrollmäuse auf das Stratum granulosum beschränkt war (Abb. 17, weiße Klammer, sg). Bei den Tieren der Tam-Gruppe war darüberhinaus eine deutliche Ausweitung auf die oberen Schichten des Stratum spinosum festzustellen (Abb. 17, gelbe Klammer, ss und sg).

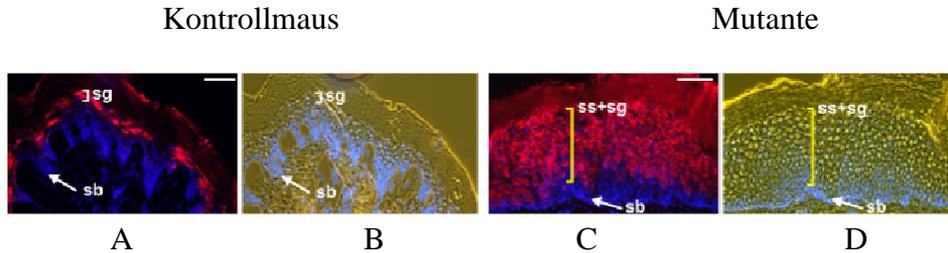


Abbildung 17: Nachweis des Keratin K2e. (A+C): Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem K2e-spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 μm .

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es in der *Fatp4*-defizienten Haut zu einer vermehrten Bildung von Keratinen kommt. Bedingt durch die Hyperproliferation findet man die Keratine in einer größeren Anzahl von Zellen, was zu dem hyperkeratotischen bis parakeratotischen Erscheinungsbild der Haut führt.

3.2.2.2.4. Loricrin, Filaggrin und Transglutaminase-1

Um das Verhornungsstadium der Keratinozyten zu untersuchen, wurden Proteine nachgewiesen, die an der Bildung des „cornified envelope“ beteiligt sind. Dieser befindet sich in der Zellperipherie des Stratum corneum und stellt eine aus Proteinen und Lipiden bestehende unlösliche Membranstruktur dar (Matsuki et al., 1997). Im Stratum spinosum und im Stratum granulosum exprimiert und gebildet spielt die Transglutaminase-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung des „cornified envelope“. Als membrangebundenes Isozym katalysiert sie das Binden der Proteine aneinander. Eines ihrer Substrate ist Loricrin, welches als Keratinozytenprotein Bestandteil des „cornified envelope“ wird. Filaggrin entsteht im Stratum corneum aus Profilaggrin und reagiert dort unter Bildung von Keratinfilamenten mit Keratinmolekülen. Auf diese Weise entsteht das unlösliche Material Keratin, das die Hornzellen ausfüllt.

Sowohl bei den Tieren der Kontrollgruppen als auch bei den Tieren der Tam-Gruppe wurden die drei Proteine an ihren typischen Lokalisationen, dem Stratum spinosum und Stratum granulosum, nachgewiesen. Eine größere Anzahl von angefärbten Zellschichten bei den Tieren der Tam-Gruppe (Abb. 18, gelbe Klammern, ss und sg) zeigt jedoch, dass es neben der Hyperproliferation zu einer Hyperkeratinisierung der Fatp4-defizienten Haut kommt.

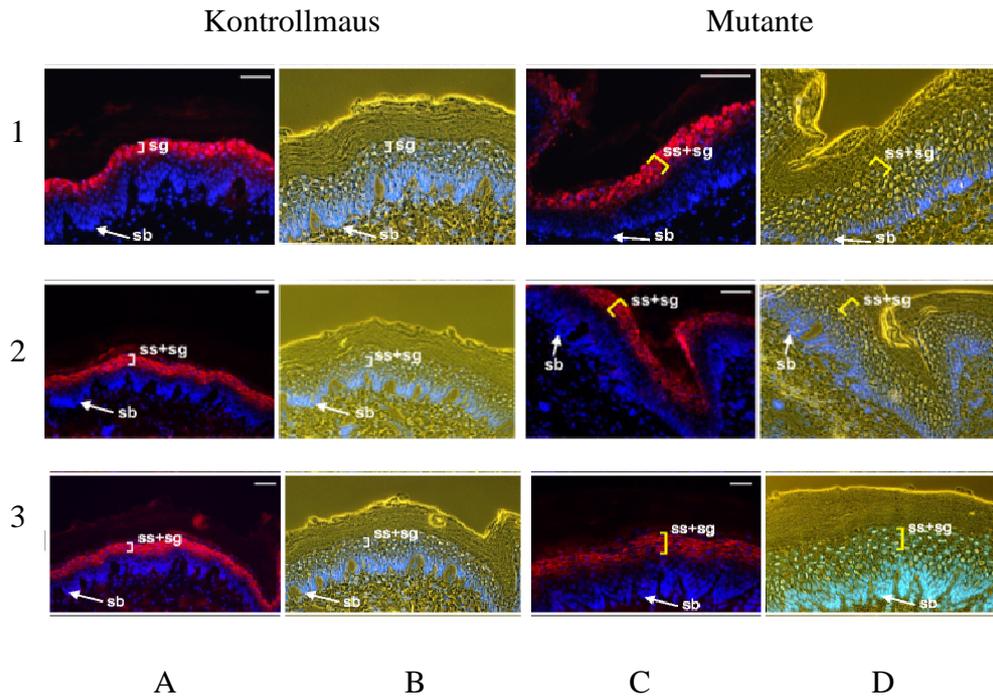


Abbildung 18: Nachweis von Loricrin (1), Filaggrin (2) und Transglutaminase-1 (3). Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 μ m.

3.2.2.5. Tight-junction-Proteine

Tight junctions findet man in verschiedenen Epithelzellarten, wo sie durch Verschmelzung von Plasmamembranarealen einen Zellkontakt bilden, der parazellulären Transport kontrolliert beziehungsweise verhindert. Neben der epidermalen Lipidbarriere stellen sie eine zweite essentielle Komponente der Barrierefunktion der Haut dar. Claudin 1, Occludin und Protein ZO-1 sind integrale Membranproteine, die als Bestandteile von Tight junctions identifiziert wurden (Furuse et al., 1993 und 2002; Tsukita et al., 2000; Morita et al., 1998).

Occludin kommt ausschließlich im Stratum granulosum vor, wohingegen Protein ZO-1 und Claudin 1 auch in allen darunterliegenden Schichten gefunden werden (Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002). Der immunhistochemische Nachweis mit Claudin-Antikörpern, zeigte dieses Tight-junction-Protein bei den Kontroll- und bei den Tam-Tieren an seinem üblichen Platz. Dies lässt auf eine intakte Barrierefunktion der Tight junctions bei allen Mausgruppen schließen. Aufgrund der verdickten Haut bei den Fatp4-defizienten Mäusen, lag Claudin 1 in einer größeren Anzahl von Zellschichten vor (Abb. 19, gelbe Klammer, ss und sg).

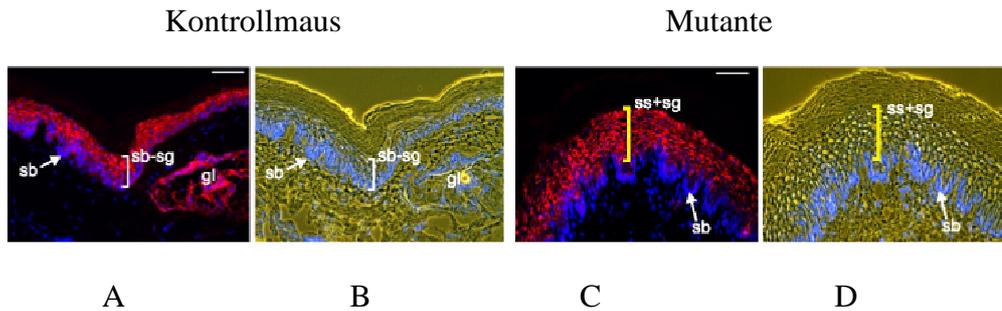


Abbildung 19: Nachweis von Claudin 1. (A+C): Immunhistochemische Färbung von Epidermis mit einem Claudin 1-spezifischen Antikörper (s. 2.3.3.) (rot), Kontrollmaus und Mutante im Vergleich. Kernfärbung mittels DAPI (blau). (B+D): Phasenkontrastaufnahme des jeweils links davon abgebildeten Schnittes. Maßstab 50 µm.

3.3. Funktionelle Analysen der epidermalen Lipidbarriere

3.3.1. Überprüfung der Hautpermeabilität durch X-Gal

Um die Bedeutung von *Fatp4* für eine intakte epidermale Lipidbarriere bei adulten Tieren zu untersuchen, wurden abgetrennte Ohrmuscheln von Kontrolltieren und Mutanten wie unter 2.5.1.1. beschrieben, mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β , D-Galactopyranosid versetzt. Vergleichbar mit den Ergebnissen der konstitutiven *Fatp4*-Knockoutmäuse wurde auch bei den konditionalen tamoxifenbehandelten *Fatp4*-defizienten Mäusen eine deutliche Blaufärbung der Haut sichtbar (Abb. 20B). Die Ohrhaut der Kontrolltiere hingegen war erwartungsgemäß für X-Gal undurchlässig und behielt ihre ursprüngliche Farbe (Abb. 20A).

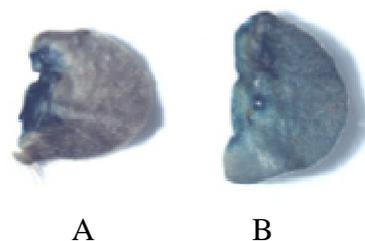


Abbildung 20: Nachweis des Barrierefunktionsverlustes in *Fatp4*-defizienter Haut. (A): Ohr eines Kontrolltieres. Hier verhindert die intakte Barrierefunktion das Eindringen von X-Gal in die Haut. (B): Ohr einer *Fatp4*^{neo Δ ex3/flox} *K14-Cre-ER*^{T2(tg⁰)}-Maus. Aufgrund des Verlustes der Hautbarriere kann X-Gal die Haut durchdringen und wird dort von der β -Galctosidase gespalten. Es entsteht das nun sichtbare 5-Brom-4-Chlor-Indigo (blau).

3.3.2. Überprüfung der Hautpermeabilität durch Lucifergelb

Der Fluoreszenzfarbstoff Lucifergelb durchdrang die gesamte Epidermis der abgetrennten Ohren von den mutanten Tieren (Abb. 21B), wohingegen er bei der Haut der Kontrolltiere nicht mehr als die obersten Schichten des Stratum corneum passieren konnte (Abb. 21A).

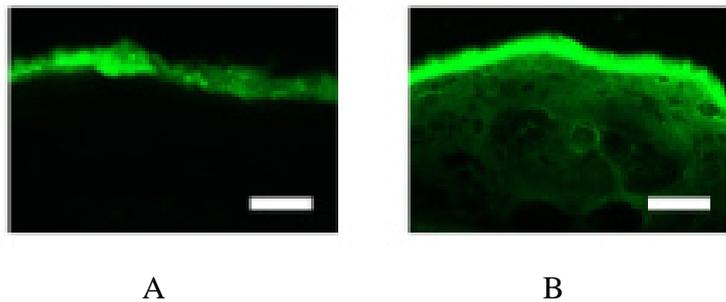


Abbildung 21: Nachweis des Barrierefunktionsverlustes in der *Fatp4*-defizienten Haut unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifergelb. (A): Schnitt durch die Ohrhaut eines Kontrolltieres. Der Fluoreszenzfarbstoff kann nicht mehr als das Stratum corneum durchdringen. (B): Schnitt durch die Ohrhaut eines mutanten Tieres. Hier ist es für den Fluoreszenzfarbstoff aufgrund der gestörten Barrierefunktion möglich, die gesamte Epidermis zu durchdringen. Maßstab 50 μm .

Bei den konditionalen *Fatp4*-Knockoutmäusen kommt es zu einem Verlust der Barrierefunktion der Haut. Wie unter 3.2.2.2.5. beschrieben, hatte das Fehlen von *Fatp4* in der Epidermis auf das Bestehen des Tight-junction-Systems keinen Einfluß. Da für die Aufrechterhaltung einer intakten Barrierefunktion der Haut sowohl das Tight-junction-System als auch die epidermale Lipidbarriere notwendig sind, muss demzufolge die Funktion der zuletzt genannten Komponente gestört sein. Dies lässt den Schluss zu, dass *Fatp4* tatsächlich für die Funktion einer intakten epidermalen Lipidbarriere von wesentlicher Bedeutung ist.

3.4. Sequenzierung aller kodierenden Bereiche des humanen *FATP4*-Gens

Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise eine Mutation des humanen *FATP4*-Gens Ursache für die Entstehung der letalen restriktiven Dermopathie des Menschen ist, soll eine Sequenzierung des *FATP4*-Gens von Betroffenen und deren Angehörigen Aufschluss bringen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zur Etablierung der dafür notwendigen Methoden alle Versuche mit uns zur Verfügung stehenden Vollblutproben von Kontrollpersonen wie folgt durchgeführt.

Zunächst wurde aus den vorliegenden Proben genomische DNA isoliert. Ziel sollte es nun sein, die Bereiche des *FATP4*-Gens zu sequenzieren, die die Synthese von FATP4 kodieren. Es handelte sich hierbei um Exon 2 - 13 (Herrmann et al., 2001). Da allerdings auch Mutationen in den Übergangsbereichen von Intron zu Exon Auswirkungen auf die entstehende Proteinstruktur haben können, musste dies bei der Auswahl der Primer berücksichtigt werden. Grundsätzlich sollte jedes zu untersuchende Exon in beide Richtungen sequenziert werden. Demzufolge wurden jeweils in dem auf der 5'-Seite liegenden Intron und in dem auf der 3'-Seite liegenden Intron des jeweiligen Exons ein Primer bestimmt. Die beiden entgegengesetzt entstehenden Sequenzen sollten sich gegebenenfalls ergänzen und gleichzeitig durch ihre Kompatibilität als Kontrolle für die Richtigkeit der Basenabfolge dienen.

3.4.1. Ergebnisse der Primer-Testreihe

Durch einen Abstand der Primersequenz von mindestens 40 Basen zum 5'- beziehungsweise 3'-Ende jedes zu bestimmenden Exons wurde das Sequenzieren der Intron-Exon-Übergänge gewährleistet. Die Tatsache, dass der nicht kodierende Bereich zwischen Exon 5 und Exon 6 nur 102 Basenpaare umfasst und die beiden Exons selbst mit 70 beziehungsweise 92 Basenpaaren sehr kurz sind, machte ihre Sequenzierung mit nur zwei Primern möglich. Bei der Auswahl aller Testprimer wurde berücksichtigt, dass ein 3'-Ende mit Guanin oder Cytosin eine bessere Bindung und Elongation bewirkt sowie eine Abfolge von mehr als vier gleichen Basen eine Fehlhybridisierung und Leserasterverschiebung zur Folge haben kann.

Mit den ausgewählten Primerkombinationen für Exon 2, 4, 5, 6, 9 und 12 konnten nach Optimierung der PCR-Bedingungen sehr gut auswertbare Sequenzierergebnisse erzielt

werden. Da bei Exon 3, 7, 8, 10, 11 und 13 auch nach Variieren der Versuchsbedingungen eine Sequenzanalyse kaum bis nicht durchführbar war, mussten verschiedene Primer in unterschiedlichen Kombinationen gefunden und ausprobiert werden. Eine Auflistung aller verwendeten Primer findet sich im Anhang.

Im Folgenden sind die Primer in die Sequenz des humanen *FATP4*-Gens eingefügt, mit denen gute Sequenzierergebnisse erzielt wurden.

```

..... cagcctcctg cttctcactc
3051 ttggaattcc tcacctcaag tgccaagccc ctagcctgcc cttccaggc
3101 caagcctgga aagggacccc tgtggtcagt cacccaactc agtatggcta Ex 2f
3151 agccttacca caggctgtcc ccttgggatc acagtggcct ggctgtctgg
3201 gctgggaggt aggagacctg gagggttggg tgtttgggtc cactaactgc
3251 cctgtgtccg cagGCCACAA TGCTGCTTGG AGCCTCTCTG GTGGGGGTGC Startcodon
3301 TGCTGTTCTC CAAGCTGGTG CTGAAACTGC CCTGGACCCA GGTGGGATTC Exon 2
3351 TCCCTGTTGT TCCTCTACTT GGGATCTGGC GGCTGGCGCT TCATCCGGGT
3401 CTTCATCAAG ACCATCAGGC GCGATATCTT gtgagtacct ggcccagcct
3451 ttcttggggg ctgccacact acagtgagct tctgggtcccc caaatctccc
3501 caggccgac ctcatgttct ctaccagcac agggcagctg agctgagttc Ex 2r
3551 cagaacagca gcctctgctc cacacccgta ccctggcaat agtacctggg
3601 ccctccatct ccaaggtcaa agtcttctcc cagggaatct ccctaacttg
5051 ..... tgtaagggga ggggaatcat
5101 acgaactctc agtgttattg agaggcatca gtaaggcagt gcatgttccc
5151 agcaggagcc aggagataga agtgttgtag ggggtctggc tcatgaagca Ex 3f
5201 taggctggcg aggcagcagc ctggggtagg gtgtcaggac ccctccctcc
5251 caacatggc agacacagcg ccctctcttg ttcacacaca gTGGCGGCCT
5301 GGTCCTCTCG AAGGTGAAGG CAAAGGTGCG ACAGTGCCTG CAGGAGCGGC
5351 GGACAGTGCC CATTTTGTTC GCCTCTACCG TTCGGCGCCA CCCCGACAAG
5401 ACGGCCCTGA TCTTCGAGGG CACAGATACC CACTGGACCT TCCGCCAGCT Exon 3
5451 GGATGAGTAC TCAAGCAGTG TAGCCAACCT CCTGCAGGCC CGGGGCCTGG

```

5501 **CCTCGGGCGA TGTGGCTGCC ATCTTCATGG AGAACCGCAA TGAGTTCGTG**
 5551 **GGCCTATGGC TGGGCATGGC CAAGCTCGGT GTGGAGGCAG CCCTCATCAA**
 5601 **CACCAACCTG CGGCGGGATG CTCTGCTCCA CTGCCTCACC ACCTCGCGCG**
 5651 **CACGGGCCCT TGTCTTTGGC AGCGAAATGG CCTCAG**gtga gccccaaaggg
 5701 ggcggggggac aagcaggaac cccatgggat **tttacacaga ccacagctcc** **Ex 3r**
 5751 **cttcc**agccc tgccaaggct gtgtgggtca gtggttaagg gcacagagtg
 5801 gagtcagaca gcttaggcag tgccacgagt aaacgagatc ctggggaagg
 8451 agcggaccta ctctgtggtt
 8501 agcccatggc taatagaacc attgccggtg cccctgtcaa cactgaaggc
 8551 ccagttgctt cactgcctct cctc**ctgccc agccagtatc ctcagcaaca** **Ex 4f**
 8601 tggccagccc tgctgggagc agaggtccct gggaaacatgg ggttttctg
 8651 cctgcctgct gactgccctg tctccccaca g**CCATCTGTG AGGTCCATGC**
 8701 **CAGCCTGGAC CCCTCGCTCA GCCTCTTCTG CTCTGGCTCC TGGGAGCCCG** **Exon 4**
 8751 **GTGCGGTGCC TCCAAGCACA GAACACCTGG ACCCTCTGCT GAAAGATGCT**
 8801 **CCCAAGCACC TTCCCAGTTG CCCTGACAAG GGCTTCACAG** gtgggctcca
 8851 tcccctcccc atagagggggc tctcacacag gccctggaca gagcactggc
 8901 ctcagtcca gaaggaggct tttct**ggaaa cttgccatgt gcctggaaca** **Ex 4r**
 8951 tgtcacgtca cctccctttt tccatctgga aaatggtgac agtaaactg
 9001 ggccactcca gggttactgt gaaggtgaca tgagctgatg tgtatcagtg
 10201 caccagggcc tagcacagag
 10251 caagggccca ggaaatattt gttggaatgg atgccggtgt tagagctgaa
 10301 tggtatctga ggttatcaga acaggcttcc tagc**aagggt gtgatgggaa** **Ex 5f**
 10351 **caggtgttga** aggggtgcaca cctgcagggtg tccatttgtg tgaccctttg
 10401 cccagccctg agctgcccc gacagccact cgcgtctggt ttcttttag**AT**
 10451 **AAACTGTTCT ACATCTACAC ATCCGGCACC ACAGGGCTGC CCAAGGCCGC** **Exon 5**
 10501 **CATCGTGGTG CACAGCAG**gt aaggggcagg tgcccagggt ggggtaggca
 10551 caggcagggc tggggagcct ccttctgctt ttctagggcc cgctcagccc
 10601 ttggccctgt gccttcccag **GTATTACCGC ATGGCTGCCC TGGTGTACTA**
 10651 **TGGATTCCGC ATGCGGCCCA ACGACATCGT CTATGACTGC CTCCCCCTCT** **Exon 6**
 10701 **ACCACTCAGC AG**gtaactct agggctgtca cacagcctcc agcacctgcc

10751 aggtctctag gaaccccacc cccatcaggc agtgtgctgc agtagaaaca **Ex 6r**

10801 cacagctttg ggccagggcgc agtgactcac acctgtaatc ccagcacttt

10851 gggaggccaa ggtgggcgga tcacttgagg ccaggagttc gagaccagcc

10901 tggccaacat ggcaaaaccc catctctact aaaaatacaa aaattaggct

12401 atttcagttt gtttccacag

12451 atatgcatgg cattgctgct tgtttgtagg ggcttaaggg aagacagctt

12501 gaataaatat agctcctgcc ctccaggtgc ttagagtcgg gtgtatatgt **Ex 7f2**

12551 gagtgtagga gagaggcagg gagcaagagg gcagcaccag ggaagagcct

12601 ggtgatggaa gccggggagg cttcttgagg gaggtcacc aaaggcaggca **Ex 7f**

12651 gatgtgaggt gcagaagcct gcagggcagc acaagcctgc ctggctggat

12701 ggcagtatca ctgatttggg gccggggagg gtcttcatct cgctgaccct

12751 caggggccat ccctctgect ccagGAAACA TCGTGGGAAT CGGCCAGTGC **Exon 7**

12801 **CTGCTGCATG GCATGACGGT GGTGATTCCG AAGAAGTTCT CAGCCTCCCG**

12851 **GTTCTGGGAC GATTGTATCA AGTACAAC TG CACG**gtgagc gagagcggga

12901 agggtgagct gtccctttcc cctagttacc ctcttcccaa ctacactccg

12951 gggcatctgt cttatagctg aggtggccag tcattccaaa gggctcattt **Ex 8f2**

13001 gtggcaaagt tcccattgtt cagatgggaa ggctgagacc cggagagggga **Ex 7r2**

13051 aaggatggca tggccagccc ctggggagag taggggcttg agggatcagg

13101 agaatcctag tgtagtgagg gcagcctctg gagcctcgaa tcacaccaag

13151 ttcacccccca gATTGTGCAG TACATTGGTG AACTGTGCCG CTACCTCCTG **Exon 8**

13201 **AACCAGCCAC CGCGGGAGGC AGAAAACCAG CACCAGGTTT GCATGGCACT**

13251 **AGGCAATGGC CTCCGGCAGT CCATCTGGAC CAACTTTTCC AGCCGCTTCC**

13301 **ACATACCCCA GGTGGCTGAG TTCTACGGGG CCACAGAGTG CAACTGTAGC**

13351 **CTGGGCAACT TCGACAGCCA** Ggtgcggcca ggttggggat gggcgaggct

13401 gctgcagggga tggcccacag aaggcactgg atgcagaggg gagggcagag **Ex 9f**

13451 ttcgagcgtg agagtggtggg tgctggagtc ccacttcccc ctcatgtcc

13501 agttttgggc ccatggtgag agagcccagg cccaagtott ggcttcgca

13551 gGTGGGGGCC TGTGGTTTCA ATAGCCGCAT CCTGTCCTTC GTGTACCCCA **Ex 8r2**

13601 TCCGGTTGGT ACGTGTCAAC GAGGACACCA TGGAGCTGAT CCGGGGGCCC **Exon 9**

13651 **GACGGCGTCT GCATTCCCTG CCAGCCAG**gt ctgccacttc ggggtcagag

13701 agggaggggt tggcctggga aggaaggagg ccaggcgcgt gtggatgggg

13751 agccttggttc tgaccagtgg ccatcagtta tctctgctct tagggttaca Ex 9r

13801 agttactcat ttatttgtgt atccatccat tcattcattc attcgccatt

13851 ctatctgtac atcagtcocat tcattcattc tttttttttt ttttatttga

13901 gacggagtct cgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg cgggatctcg

14901 aaaaaaaaaa ttagctgggc

14951 ctggtggcgt gtgcctgtaa tctcagctac tcaggaggct aaggcaggag

15001 aattgcttga acccaggagg tagaggttgc agtaagccaa gattgcactg Ex10f2,10f

15051 ctgcactcca gcctgggcaa caagagcaaa actccgtctc aaaaaaaaaa

15101 aaaaaaaaaa agacgcaggg tacacctggt gacaggacgg gtgggagagg

15151 ctgcctaggg cagatctgac cctgccttcc ccaccccagG **TGAGCCGGGC**

15201 **CAGCTGGTGG GCCGCATCAT CCAGAAAGAC CCCCTGCGCC GCTTCGATGG** Ex 11f2

15251 CTACCTCAAC CAGGGCGCCA ACAACAAGAA GATTGCCAAG GATGTCTTCA Exon 10

15301 **AGAAGGGGGA CCAGGCCTAC CTTACTG**gtg ggtccccagc cttcacagc

15351 cccttctga gggttggggg aggaggggac cttctccac ctccagagga

15401 caccttccca ggactccccc agtcctggcc cttgtggtca acaaatcct Ex 10r2

15451 tgggctccag caaagcctcc ctggcttgag ccctgggtctc agagctggcc Ex 11f,10r

15501 aggccagcc ctgcctcacc cggccccctcc ctag**GTGATG TGCTGGTGAT**

15551 **GGACGAGCTG GGCTACCTGT ACTTCCGAGA CCGCACTGGG GACACGTTCC** Exon 11

15601 **GCTGGAAGG TGAGAACGTG TCCACCACCG AGGTGGAAGG CACACTCAGC**

15651 **CGCCTGCTGG ACATGGCTGA CGTGGCCGTG TATGGTGTCTG AGGTGCCAGg** Ex 12f

15701 tatgtgcagg caggcgcgag gtgtgggtag ggaggcacca cccaggggca

15751 ccaccagcta ctcagtgtct accctgccac ccccag**GAAC CGAGGGCCGG** Ex 11r

15801 **GCCGGAATGG CTGCTGTGGC CAGCCCCACT GGCAACTGTG ACCTGGAGCG** Exon 12

15851 CTTTGCTCAG GTCTTGAGA AGGAACTGCC CCTGTATGCG CGCCCCATCT Ex 11r2

15901 **TCCTGCGCCT CCTGCCTGAG CTGCACAAAA CAG**gtgtgtc cctccccctgc

15951 tccagctctc ggatcccagg tcccttcccg tttccttctg gagagaccg

16001 gttggctggt acttgacctc tgcacacagc ctggccgggc agttggtaaa Ex 12r

16051 gtgacctgcc tgtgtagagg tgagcagacg gggctggcag agaagacaca

16101 cattgttctc tagtagaaca catattaggt gccaggcaca gcgctaagcc

16151 tcgggatacg gctggtgagc totggatggt ttgccttctt ggagttttag

```
20151 .....tctgctgtca ctcagcatgt
20201 gacactaggc aaatagcctc ccttctccag gcttgTTTTc ccatctgcaa
20251 agtaggggtg ggtgggtaac tagcagctgt ccccatgccc caactttgcc Ex 13f
20301 acagctgctg tatgaccatt ctttgcaaac tgtaaagggc tgtgcctcct
20351 cccccacttc cctccccctgt ttgtcctcca gccctgctcc ctgccttctc
20401 cagtactggt ggttgggaag ctgggagctc gggccccctgc cctgcactga
20451 gtcttcttcc ctgctctccc agGAACCTAC AAGTTCCAGA AGACAGAGCT Exon 13
20501 ACGGAAGGAG GGCTTTGACC CGGCTATTGT GAAAGACCCG CTGTTCTATC
20551 TAGATGCCCA GAAGGGCCGC TACGTCCCGC TGGACCAAGA GGCCTACAGC
20601 CGCATCCAGG CAGGCGAGGA GAAGCTGTGA TTCCCCCAT CCTCTGAGG Stopcodon
20651 GCCGGCGGAT GCTGGATCCG GAGCCCCAGG TTCCGCCCCA GAGCGGTCCT
20701 GGACAAGGCC AGACCAAAGC AAGCAGGGCC TGGCACCTCC ATCCTGAGGT Ex 13r
20751 GCTGCCCTC CATCCAAAAC TGCCAAGTGA CTCATTGCCT TCCCAACCCT
20801 TCCAGAGGCT TTCTGTGAAA 21401
```

Abbildung 22: Alle kodierenden Bereiche des humanen *FATP4*-Gens (Exon 2-13) und die zu deren Sequenzierung verwendeten Primer. Die Exons sind durch fett gedruckte Großbuchstaben zu erkennen. Primersequenzen sind fett gedruckt und unterstrichen (Ex 10r2 ist zusätzlich kursiv geschrieben, da sie sich mit anderen Primersequenzen überschneidet). Start- und Stopcodon sind durch eine gepunktete Linie gekennzeichnet. f = forward , r = reverse

3.4.2. Sequenzanalysen

Nachdem Reverse-Sequenzen mit dem HUSAR-Programm „Reverse“ umgeschrieben worden waren, konnten sie wie auch die Forward-Sequenzen mit dem Programm „Similarity“ mit der Ursprungssequenz auf Homologie überprüft werden (Abb. 23). Unter Anwendung des Sequenzanalyseprogramms „Chromas“ konnten eventuell aufgetretene Unstimmigkeiten überprüft werden. „Chromas“ setzt die Sequenz in Form von Kurvendiagrammen um und erlaubt eine Differenzierung zwischen Artefakten und tatsächlichen Sequenzabweichungen (Abb. 24).

```

13097 CAGGAGAATCCTAGTGTAGTGAGGGCAGCCTCTGGAGCCTCGAATCACAC
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  107  CAGGAGAATCCTAGTGTAGTGAGGGCAGCCTCTGGAGCCTCGAATCACAC

13147 CAAGTTCACCCCCAGATTGTGCAGTACATTGGTGAAGTGTGCCGCTACCT
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  157  CAAGTTCACCCCCAGATTGTGCAGTACATTGGTGAAGTGTGCCGCTACCT

13197 CCTGAACCAGCCACCGCGGGAGGCAGAAAACCAGCACCAGGTTTCGCATGG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||
  207  CCTGAACCAGCCACCGCGGGAGGCAGAAANCCAGCACCAGGTTTCGCATGG

13247 CACTAGGCAATGGCCTCCGGCAGTCCATCTGGACCAACTTTTCCAGCCGC
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  257  CACTAGGCAATGGCCTCCGGCAGTCCATCTGGACCAACTTTTCCAGCCGC

13297 TTCCACATACCCCAGGTGGCTGAGTTCTACGGGGCCACAGAGTGCAACTG
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  307  TTCCACATACCCCAGGTGGCTGAGTTCTACGGGGCCACAGAGTGCAACTG

```

Abbildung 23: Sequenzabschnitt des humanen *FATP4*-Gens im Vergleich mit der Ursprungssequenz. Überprüfung auf Homologie. Die jeweils untere Zeile entstammt der Proben-DNA. Die obere Zeile ist die entsprechende Stelle der humanen *FATP4*-Sequenz. Eventuell auftretende Fehler (N) der Proben-DNA werden durch das Fehlen des Verbindungsstriches hervorgehoben (siehe Zeile drei).

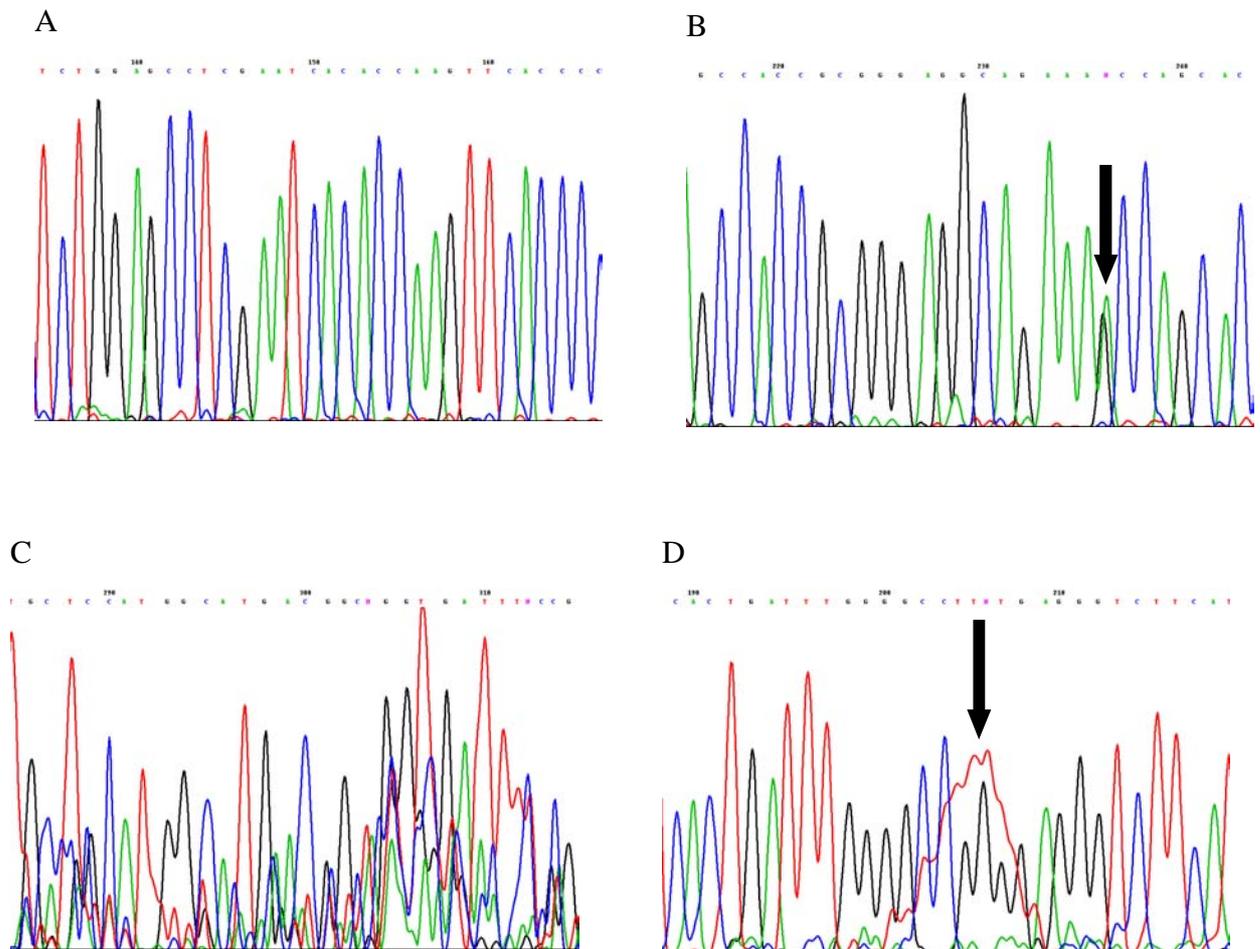


Abbildung 24: Sequenzabschnitte des humanen *FATP4*-Gens mit dem Computerprogramm Chromas als Kurvendiagramme dargestellt. (A): Darstellung einer fehlerfreien, gut auswertbaren Sequenz. (B): Diese Sequenz enthält einen Doppelpeak (Pfeil). Folglich liegt an dieser Stelle heterozygot eine abweichende Basenabfolge vor. Tritt dieser Fehler wiederholt und in verschiedenen Proben auf, kann auf eine Punktmutation geschlossen werden. (C): Darstellung einer fehlerhaften, nicht auswertbaren Sequenz. Die verwendeten Primer haben keine sequenzierfähigen Amplifikate ergeben. (D): Diese Sequenz ist auswertbar, da es sich bei der vorliegenden Abweichung (durch Pfeil markierte rote Kurve) um ein Artefakt handelt.

4. Diskussion

4.1. Herleitung der Fragestellung

Mäuse mit generalisierter Fatp4-Defizienz sterben kurz nach der Geburt. Eine histologische Untersuchung der Haut ergab eine Hyperkeratose sowie eine Akanthose, eine flache dermo-epidermale Verbindungszone ohne Reteleisten und eine verminderte Anzahl von Hautanhangsgebilden. Diese morphologischen Veränderungen gingen mit dem Verlust der Hautbarrierefunktion einher (Herrmann et al., 2003). Es stellte sich die Frage, ob das Fehlen von Fatp4 in der Haut oder das Fehlen von Fatp4 an anderer Stelle für diese phänotypischen Auswirkungen mit letaler Folge verantwortlich ist.

4.1.1. Mögliche Funktionen von Fatp4

Fatp4 wurde bisher in Darm, Gehirn, Fettgewebe, Herz, Niere Leber und Haut nachgewiesen, wobei es im Darm als einziger Vertreter der FATP-Familie vorkommt (Stahl et al., 1999; Herrmann et al., 2001). Als Substrate von Fatp4 wurden hauptsächlich langkettige und sehr langkettige Fettsäuren nachgewiesen, wozu auch die essentiellen Fettsäuren, wie zum Beispiel Linolsäure, zählen (Stahl et al., 1999). Diese nicht synthetisierbaren Fettsäuren sind für den Organismus lebenswichtig und müssen in bestimmten Mengen zugeführt werden. Ein Wegfall von Fatp4 im Darm und die daraus resultierende Störung der enteralen Resorption könnte einen Mangel an essentiellen Fettsäuren hervorrufen. Da Linolsäure von den Keratinozyten zur Synthese der epidermalen Lipidbarriere benötigt wird und einen wesentlichen Bestandteil des Ceramid 1 darstellt (Wright, 1991; Schürer et al., 1994), könnte ein genetisch bedingter Mangel durchaus Auswirkungen auf die Ausbildung der Barrierefunktion der Haut haben.

Darüber hinaus konnte eine hohe Fatp4-Expression in der Dottersackplazenta der Maus nachgewiesen werden (Gimeno et al., 2003). Dies könnte Hinweis auf seine Bedeutung bei

der diaplazentaren Passage von essentiellen Fettsäuren sein. Bei einer generalisierten *Fatp4*-Defizienz könnte es folglich schon an dieser Stelle zu einer Unterversorgung des Fetus mit Linolsäure kommen.

Dies würde bedeuten, dass nicht das Ausschalten von *Fatp4* in der Haut sondern sein Fehlen an den Stellen der Aufnahme von essentiellen Fettsäuren für das Entstehen des Mutantenphänotyps verantwortlich ist.

Aus diesem Grund haben 2003 Moulson und Kollegen Haut von *Fatp4*-defizienten Mäusen gesunden Tieren transplantiert. Obwohl dem transplantierten Hautareal somit ausreichend Linolsäure zur Verfügung stand, konnte keine Regeneration der *Fatp4*-defizienten Haut beobachtet werden. Dies könnte einerseits in Schäden begründet sein, die die Haut während ihrer Entwicklung genommen hat und die irreversibel sind. Andererseits könnte es ebenso ein Hinweis darauf sein, dass *Fatp4* auch in der Haut notwendig ist, um die essentiellen Bestandteile für eine intakte Epidermis bereitzustellen.

4.2. Epidermisspezifische Inaktivierung von *Fatp4*

Vor diesem Hintergrund wurde in unserem Labor eine Mauslinie mit induzierbarer epidermisspezifischer *Fatp4*-Defizienz entwickelt. Ziel war es, bei adulten Tieren das *Fatp4*-Gen spezifisch in der Epidermis zu inaktivieren, um somit dessen Bedeutung in der Haut weiter definieren zu können. Es gelang, Mäuse zu entwickeln, bei denen nach Behandlung mit Tamoxifen *Fatp4* in der Epidermis mittels PCR und Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr nachweisbar war. Morphologische und funktionelle Analysen der Haut sieben und 13 Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung ergaben eine Hyperproliferation und Hyperkeratinisierung der Epidermis sowie eine Einschränkung der Barrierefunktion der Haut. Diese Veränderungen sind allein auf das Fehlen von *Fatp4* in der Epidermis zurückzuführen und sind Beweis für seine essentielle Bedeutung bei der Bildung und Aufrechterhaltung einer intakten Hautstruktur.

4.2.1. Fatp4 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung der epidermalen Lipidbarriere

Da die Epidermis einem ständigen Erneuerungsprozess unterliegt, bedarf es auch einer dauernden Aufrechterhaltung der epidermalen Barrierefunktion. Während des vierwöchigen Zyklus der Keratinozytendifferenzierung werden die zwei wesentlichen Komponenten der Epidermis-Barriere, das Tight-junction-System und die interzelluläre Lipidschicht, immer wieder neu ausgebildet. Die für die epidermale Lipidbarriere notwendigen Bestandteile (Ceramide, Cholesterin und freie Fettsäuren) werden im oberen Stratum granulosum synthetisiert, bevor sie im Stratum corneum durch exozytotische Freisetzung in den interzellulären Raum gelangen. Sowohl frei vorliegend als auch als Bestandteil von Ceramiden und Cholesterin sind langkettige und sehr langkettige Fettsäuren für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der epidermalen Lipidbarriere von essentieller Bedeutung. Da Fatp4 zum einen als Transporter und zum anderen als Acyl-CoA-Synthetase fungiert (Herrmann et al., 2001; Hall et al., 2005), ist es denkbar, dass durch das induzierte Ausschalten von *Fatp4* bei tamoxifenbehandelten Tieren einerseits die Versorgung der Keratinozyten mit bestimmten Fettsäuren zum Erliegen kommt und andererseits, wie es bei den Tieren mit generalisierter Defizienz festgestellt wurde, eine gestörte Fettsäurezusammensetzung der epidermalen Ceramide entsteht. Ein Aufrechterhalten der epidermalen Lipidbarriere ist somit nicht mehr möglich, zumal offenbar kein anderes Transportprotein beziehungsweise Enzym die Funktionen von Fatp4 vollständig übernehmen kann. Auch ein intaktes Tight-junctions-System kann den Wegfall der zweiten Barrierekomponente nicht kompensieren.

4.2.2. Die Inaktivierung von *Fatp4* führt zu einer Strukturveränderung der Epidermis

Mit dem Verlust der Barrierefunktion ging eine Hyperproliferation und eine Hyperkeratinisierung der Epidermis einher. Interessanterweise konnte man Vergleichbares auch bei anderen Mausmodellen beobachten, die Tiere mit gestörter Hautbarriere hervorbrachten. 1997 entwickelten Matsuki et al. beispielsweise Transglutaminase-1-defiziente Mäuse, die neben einem defekten Stratum corneum ebenfalls eine hyperplastische

und hyperkeratotische Epidermis entwickelten. Man geht nach wie vor davon aus, dass es sich dabei um einen Versuch des Organismus handelt, die Barrierestörung zu kompensieren (Williams, 1992; Williams und Elias, 1985). Da Ceramide jedoch neben ihrer strukturellen Funktion in der Epidermis auch in verschiedene Signalwege involviert sind, die die Differenzierung und Proliferation der Keratinozyten kontrollieren (Huwiler et al., 2000), ist es auch denkbar, dass eine veränderte Lipidzusammensetzung Auswirkungen auf diese Signalwege und damit die Bildung der Epidermis hat.

4.2.3. Vergleich mit der konstitutiven *Fatp4*-Defizienz

Verglichen mit den konstitutiven *Fatp4*-Knockoutmäusen sind die histologischen Befunde bei den Tieren mit induzierter epidermisspezifischer Defizienz weniger stark ausgeprägt. Die Hyperkeratose sowie die Akanthose liegen jeweils in geringgradigerer Form vor. Eine abgeflachte dermo-epidermale Verbindungszone und eine verminderte Anzahl von Hautanhangsgebilden konnte weder bei den nach sieben noch bei den nach 13 Wochen getöteten Tieren festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Tiere, bei denen aufgrund der angeborenen Defizienz zu keinem Zeitpunkt in der Epidermis *Fatp4* gebildet wird, ausgeprägtere histologische Veränderungen aufweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *Fatp4* während des Aufbaus und der Entwicklung der Haut eine besonders wesentliche Rolle spielt. Bei den Tieren mit generalisierter *Fatp4*-Defizienz waren die Hautveränderungen nicht vor Tag 16,5 der embryonalen Entwicklung nachweisbar. Eineinhalb Tage zuvor, am 15. Tag der embryonalen Entwicklung, beginnt die Reifung der Haut. In dieser Phase kommt es offenbar zu einer Fehldifferenzierung der Keratinozyten mit letalen Folgen. Vergleichbares wurde in verschiedenen Mausmodellen beobachtet, bei denen Komponenten, die bei der Formation der Hautbarriere beteiligt sind, ausgeschaltet wurden. 1997 haben Tarutani et al. beispielsweise gezeigt, dass „GPI-anchored“ Proteine am Transport der Ceramide in den extrazellulären Raum des Stratum corneum beteiligt sind. Durch eine Störung des dafür codierenden *Pig-a*-Gens waren Mäuse mit einer faltigen und blassen Haut, die von einer dichten, stark verdickten epidermalen Hornschicht bedeckt war, entstanden. Ihr Tod trat wenige Tage nach der Geburt ein. Auch die bereits beschriebenen Transglutaminase-1-defizienten Mäuse sterben aufgrund einer gestörten Ausbildung des Stratum corneum und der daraus resultierenden defekten Barrierefunktion der Haut (Matsuki et al., 1997). Eine Störung

des Tight-junction-Systems bei Mäusen mit einer Claudin-1-Defizienz verlief trotz normal erscheinender Keratinozytendifferenzierung ebenfalls letal (Furuse et al., 2002). Die Tatsache, dass Mäuse mit einer generalisierten *Fatp4*-Defizienz aufgrund ähnlicher Befunde sterben, weist auf eine vergleichbar essentielle Rolle von *Fatp4* im Besonderen beim Aufbau einer physiologischen Hautstruktur und bei der Formation der Hautbarriere hin.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlich ausgeprägten Hautveränderungen bei den zwei verschiedenen *Fatp4*-Knockoutmausmodellen könnten die multiplen Funktionen sein, die einige Gene während der Ontogenese einnehmen. Folglich können die Auswirkungen eines Genausfalls während der Ontogenese komplexer sein als beim adulten Tier (Metzger und Chambon, 2001).

Bei der Frage nach den Ursachen für die schwächere Ausprägung der histologischen Hautveränderungen bei den konditionalen Knockoutmäusen müssen allerdings auch die Versuchsbedingungen in Betracht gezogen werden. Li et al. haben im Jahr 2000 eine Mauslinie mit induzierbarer epidermisspezifischer $\text{RXR}\alpha$ -Defizienz entwickelt. Unter Verwendung einer *K5-Cre-ER^T*-transgenen Linie erzielten sie sechs Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung eine Rekombination von 80 % und 12 Wochen nach der ersten Behandlung eine nahezu vollständige Rekombination. Mittels der *K14-Cre-ER^{T2}*-transgenen Linie wurde bereits zwei und acht Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung eine vollständige epidermisspezifische Rekombination erreicht, die durch PCR- und Southern-Blot-Analysen nachgewiesen wurde. Dementsprechend konnten wir in der Epidermis unserer konditionalen Knockoutmäuse, die unter Verwendung der *K14-Cre-ER^{T2}*-transgenen Linie hergestellt wurden, mittels Immunfluoreszenz *Fatp4* nicht mehr nachweisen. Dennoch ist es möglich, dass es durch die Behandlung mit Tamoxifen zu keiner 100%igen Inaktivierung des *Fatp4*-Gens gekommen ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch eine verbleibende geringfügige Produktion von *Fatp4*, die Folgen einer induzierten *Fatp4*-Defizienz nicht ihr volles Ausmaß angenommen haben. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die erzielte Inaktivierung genau zu quantifizieren. Die dafür durchgeführten Southern-Blot-Analysen ergaben bis zum Erstellen dieser Dissertation kein befriedigendes Ergebnis.

Ein weiteres wichtiges Kriterium stellt der Zeitraum, in dem die Tiere der Tamoxifenbehandlung unterzogen wurden, dar. Die konditionalen gewebsspezifischen

Knockoutmäuse wurden über eine Zeitspanne von sieben Wochen mit Tamoxifen behandelt. Sieben beziehungsweise 13 Wochen nach erster Tamoxifenbehandlung wurden die Tiere getötet und den Analysen unterzogen. Möglicherweise reicht dieser Zeitraum für eine stärkere Ausprägung der Befunde sowie für die Ausbildung der fehlenden Charakteristika nicht aus. Eine längere Behandlung der Versuchstiere mit Tamoxifen beziehungsweise ein längerer Beobachtungszeitraum nach abgeschlossener Behandlung könnte gegebenenfalls zu anderen Ergebnissen führen.

4.3. Der Zusammenhang zwischen *Fatp4*-Defizienz und der letalen restriktiven Dermopathie

Aufgrund des auffallend ähnlichen Phänotyps von Mäusen mit generalisierter *Fatp4*-Defizienz und Säuglingen mit restriktiver Dermopathie stellte sich die Frage, ob möglicherweise eine Mutation auf dem *FATP4*-Gen für das Entstehen dieser letalen Erkrankung des Menschen verantwortlich ist. Eine Sequenzierung dieses Gens bei Betroffenen und deren Angehörigen könnte darüber Aufschluss bringen. Da uns von der Hautklinik Heidelberg Proben von sechs RD-Patienten und deren Angehörigen in Aussicht gestellt wurden, haben wir die nötigen Voraussetzungen zur Untersuchung dieser Proben in unserem Labor geschaffen.

Die Anzeichen auf das Vorliegen einer restriktiven Dermopathie des Kindes während der Schwangerschaft sind gering. Die ersten zwei Drittel der Schwangerschaft verlaufen weitestgehend unauffällig. Erst ab der 31. Schwangerschaftswoche wird bei der Großzahl der beschriebenen Fälle von Polyhydramnionen, reduzierter Kindsbewegung, intrauteriner Wachstumsretardierung und eventuellen Gelenkskontrakturen berichtet. Vereinzelt fiel auch während der sonographischen Untersuchung ein offenstehender Mund auf. Die histologischen Veränderungen der Haut können nicht vor der 21. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden. Wie auch bei den *Fatp4*-defizienten Mäusen treten diese erst kurz vor Abschluss der Hautdifferenzierung auf. Dies zeigte auch eine intrauterin entnommene Hautbiopsie in der 20. Schwangerschaftswoche, die in einem Fall ein falsch-negatives Ergebnis hervorbrachte (Holbrook et al., 1986; Groß et al., 1999; Nijsten et al., 2002). Sollte sich auf dem *FATP4*-Gen der Betroffenen homozygot und auf dem der Angehörigen heterozygot eine Mutation

finden, könnte diese Erkenntnis zusammen mit der Untersuchungsmethodik zur Entwicklung pränataler Diagnosemöglichkeiten beitragen. Mittels einer Amniozentese könnte eine frühzeitige Diagnosestellung möglich werden. Darüberhinaus könnte im Hinblick auf eine erneute Schwangerschaft die genetische Untersuchung der Eltern vor einer Wiederholung dieses traumatischen Erlebnisses schützen.

Aufgrund des äußerst seltenen Auftretens der restriktiven Dermopathie, müssen auch kombinierte heterozygote Mutationen als Ursache dieser Erbkrankheit in Betracht gezogen werden. Entsteht eine Krankheit infolge zweier oder mehrerer heterozygoter Mutationen, spricht man von kombinierter Heterozygotie. Im Rahmen der Erforschung von Laminopathien haben Navarro et al. 2004 beispielsweise bei zwei Patienten mit restriktiver Dermopathie Veränderungen des LMNA-Gens und bei sieben Patienten mit restriktiver Dermopathie Veränderungen des ZMPSTE24-Gens festgestellt. Das LMNA-Gen kodiert Lamin A, welches der Familie der Intermediärfilamenten angehört und Bestandteil der Kernlamina ist. Eine an der Bildung von Lamin A beteiligte Metalloproteinase wird von dem ZMPSTE24-Gen kodiert. Da es sich bei den festgestellten Veränderungen bei allen Patienten jedoch nur um eine heterozygot vorliegende Mutation handelt, konnte zwar ein Zusammenhang zwischen Laminopathien und restriktiver Dermopathie hergestellt werden, als alleinige Krankheitsursache können sie allerdings nicht angesehen werden. Es ist daher durchaus denkbar, dass mehrere heterozygote Mutationen für die Entstehung der restriktiven Dermopathie verantwortlich sind.

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass *Fatp4* bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Hautstruktur und der epidermalen Lipidbarriere eine bedeutende Rolle spielt. Ob nun aufgrund der *Fatp4*-Defizienz die Aufnahme von langkettigen und sehr langkettigen Fettsäuren in die Keratinozyten, die Synthese der Ceramide oder beides gestört ist, bleibt weiterhin offen. Zur Klärung dieser Fragen bedarf es weiterer Untersuchungen. Eine Isolierung von Keratinozyten der epidermispezifischen *Fatp4*-defizienten Tiere soll diesbezüglich eine genaue Untersuchung der Aufnahme von Fettsäuren im Vergleich zu Kontrollkeratinozyten ermöglichen. Die bereits bei den *Fatp4-K*-Mäusen durchgeführten Lipidanalysen (Herrmann et al., 2003) zeigten eine deutliche Veränderung der

Ceramidzusammensetzung und sollen nun auch bei den epidermisspezifischen *Fatp4*-defizienten Mäusen durchgeführt werden, um die Bedeutung von *Fatp4* für den Ceramidmetabolismus weiter zu klären.

Mittels des von uns etablierten Mausmodells wird es möglich sein, die Entstehung der hyperproliferativen Hyperkeratose in einzelnen Schritten zu untersuchen. Zusätzliche histologische Untersuchungen der Epidermis auch während des Behandlungszeitraumes werden diesbezüglich von großem Nutzen sein.

In Anlehnung an das Modell der epidermisspezifischen *Fatp4*-Defizienz wäre es außerdem interessant, eine gewebsspezifische Inaktivierung in anderen Organen zu etablieren. Eine spezifische Ausschaltung beispielsweise in Darm oder Leber könnte Funktionen aufdecken, die möglicherweise durch den frühen Tod der konstitutiven Knockoutmäuse verborgen geblieben sind.

Diesbezüglich könnte eine induzierbare generalisierte *Fatp4*-Defizienz bei adulten Tieren ebenfalls aufschlussreich sein. Mittels einer Kreuzung von Tieren der *Fatp4-K*-Linie mit Tieren, die transgen für eine induzierbare ubiquitär exprimierte Cre-Rekombinase sind, könnte aufgrund der hervorgerufenen ubiquitären Inaktivierung des *Fatp4*-Gens am adulten Tier auch die Funktion von *Fatp4* in anderen Organen deutlicher hervortreten.

5. Zusammenfassung

Bislang ist über die zelluläre Aufnahme von Fettsäuren nur wenig bekannt. Man geht davon aus, dass es sich um ein Zusammenspiel von passiver Diffusion und aktivem Transport handelt. Der Familie der Fettsäuretransportproteine („fatty acid transport proteins“, FATP) wird dabei eine besondere Bedeutung beigemessen. Im Rahmen der gastroenterologischen Forschung galt das Hauptinteresse FATP4, welches als einziges der Transportproteine im Darm exprimiert wird. Um seine Bedeutung für den Fettsäurestoffwechsel auch *in vivo* zu untersuchen, wurde eine konstitutive *Fatp4*-Knockoutmaus hergestellt. Der Phänotyp dieser Maus wurde durch markante Hautveränderungen geprägt, die bereits Minuten bis Stunden nach der Geburt zum Tode führten und in bemerkenswerter Weise dem Erscheinungsbild der letalen restriktiven Dermopathie des Menschen ähnelten. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob diese Hautveränderungen primär auf das Fehlen von *Fatp4* in der Haut zurückzuführen sind, oder ob sie sekundäre Effekte der generalisierten *Fatp4*-Defizienz sind. Des Weiteren sollten im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Voraussetzungen für eine Sequenzierung der relevanten Regionen des humanen *FATP4*-Gens im Hinblick auf eine Klärung der Ätiologie der restriktiven Dermopathie geschaffen werden.

Mit Hilfe konditionaler, epidermisspezifischer *Fatp4*-Knockoutmäuse sollten die Folgen einer auf die Epidermis beschränkten Inaktivierung des *Fatp4*-Gens bei adulten Tieren untersucht werden. Zur Herstellung dieser Tiere wurde auf das Cre/LoxP-Rekombinationssystem zurückgegriffen. Durch die Kreuzung von *Fatp4^{neoΔex3/flox}*-Mäusen mit Tieren, die Träger des *K14-Cre-ER^{T2}*-Transgens sind, entstanden Mäuse, die einerseits ein durch LoxP-Sequenzen modifiziertes *Fatp4*-Allel (*flox*) enthielten und andererseits ein epidermisspezifisches induzierbares Transgen für eine Cre-Rekombinase (Cre) trugen. Unter die Kontrolle des hautspezifischen K14-Promotors (K14) gestellt, konnte die Expression der Cre-Rekombinase auf die Epidermis beschränkt werden. Die Induzierbarkeit wurde durch das Anfügen eines modifizierten Östrogenrezeptors (ER) erreicht, dessen Ligand das Östrogenanalogon Tamoxifen (T2) ist. Es erfolgte also erst nach Applikation von Tamoxifen

eine Aktivierung der Cre-Rekombinase in der Haut und damit eine Inaktivierung des *Fatp4*-Gens.

Nachdem zehn Wochen alte Mäuse (*Fatp4*^{neoΔex3/flox}K14-Cre-ER^{T2(tg/0)}) über einen Zeitraum von sieben Wochen mit Tamoxifen behandelt worden waren, wurde die eine Hälfte der Tiere sieben und die andere Hälfte 13 Wochen nach der ersten Tamoxifenbehandlung getötet. Zunächst konnte gezeigt werden, dass ausschließlich in der Haut eine tamoxifeninduzierte Exzision der LoxP-flankierten Bereiche stattgefunden hatte. Die morphologischen und funktionellen Analysen der Haut ergaben eine Hyperproliferation und eine Hyperkeratinisierung der Epidermis sowie eine Reduktion der epidermalen Lipidbarrierefunktion. Diese Ergebnisse lassen tatsächlich auf eine essentielle Bedeutung von *Fatp4* für die Bildung und Aufrechterhaltung der physiologischen Struktur und Barrierefunktion der Epidermis schließen.

Ob eine Mutation des humanen *FATP4*-Gens für die Entstehung der letalen restriktiven Dermopathie verantwortlich ist, kann nun, nachdem die Methoden zur Sequenzierung der relevanten Bereiche etabliert wurden, geklärt werden.

6. Summary

The mechanism of cellular fatty acid uptake is still poorly understood. Passive diffusion and carrier-mediated uptake are thought to operate in conjunction. The family of fatty acid transport proteins is considered to play an essential role in the overall process of cellular fatty acid uptake. Fatty acid transport protein 4 (Fatp4) is of particular interest, since it has been identified as the major intestinal Fatp. To analyze the functional significance of Fatp4 *in vivo*, a mouse line with targeted disruption of the Fatp4 gene was generated. Examinations of the resulting phenotype revealed marked alterations of the skin, which led to death shortly after birth and resembled a human neonatally lethal restrictive dermopathy. Aim of the present study was to find out whether Fatp4 deficiency in the epidermis alone can cause changes in the epidermal structure or whether the observed abnormalities are secondary phenomena due to the loss of Fatp4 in another tissue or other tissues. Furthermore the prerequisites for sequencing all relevant parts of the human *FATP4* gene were obtained in order to find out whether a mutation on the *FATP4* gene is responsible for the origin of the lethal restrictive dermopathy.

To evaluate the functional significance of Fatp4 in the epidermis, a mouse line with inducible Fatp4 deficiency in the skin was generated by using a conditional Cre/lox system. Crossing mice carrying the mutant allele Fatp4^{neoΔex3/flox} with transgenic mice expressing the K14-Cre-ER^{T2} transgene created double-mutant mice with a floxed Fatp4 allele (flox) and a transgene for an inducible epidermis-specific Cre recombinase (Cre). The expression of the Cre recombinase was directed by the K14 promoter, which is specifically active in the epidermis. Due to the fusion with a mutated ligand binding domain of the human estrogen receptor (ER) the activity of the Cre recombinase could be induced by the synthetic ligand tamoxifen. Not until tamoxifen administration conditional mutagenesis of Fatp4 was confined to the epidermis.

At the age of ten weeks mice were treated with tamoxifen for five consecutive days, and again for five consecutive days, two, four and six weeks later. Animals were sacrificed 7 weeks or 13 weeks after the first tamoxifen treatment. First of all we found the tamoxifen-induced excision of exon 3 indeed to be restricted to the skin. Morphological and functional

analysis of the Fatp4 deficient skin revealed a hyperproliferative hyperkeratosis with a disturbed epidermal barrier. These findings demonstrate that Fatp4 itself is essential for the formation and maintenance of a normal epidermal structure und barrier function.

Having established the sequencing of all exons and exon-intron boundaries of the human *FATP4* gene, investigations wether a mutation of this gene causes the lethal restrictive dermopathy can be started.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

A	Base: Adenin
Acyl-CoA	Acyl-CoenzymA
AMP	Adenosinmonophosphat
bp	Basenpaare
C	Base: Cytosin
Cre	Cre-Rekombinase
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER ^{T2}	Tamoxifeninduzierbarer Östrogenrezeptor
FLP	FLP-Rekombinase
FRT	Erkennungsstelle der FLP-Rekombinase, (Flp recognition target)
G	Base: Guanin
HCL	Salzsäure
Hfe	Hämochromatosegen
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie, (high performance liquid chromatography)
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources
K	Keratin
kb	Kilobasen
LoxP	Erkennungsstelle der Cre-Rekombinase,

	(locus of crossover)
mM	Millimolar (mmol/l)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, (phosphate buffered saline)
PGK	Phosphoglyceratkinase
rpm	rounds per minute
T	Base: Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-HCl-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β ,Dgalactopyranosid

7.2. Auflistung aller verwendeten Primer zur Sequenzierung des humanen *FATP4*-Gens

Primer hs F4, Exon	Sequenz 5'.....3'
2f	AGT CAC CCA ACT CAG TAT GGC TAA G
2r	CTG TGC TGG TAG AGA ACA TGA GGT C
3f	AAG CAT AGG CTG GCG AGG CAG CAG C
3r	GGA AGG GAG CTG TGG TCT GTG TAA G
<i>3f2</i>	<i>CCC AGC AGG AGC CAG GAG ATA GAA G</i>
<i>3r2</i>	<i>CAC TCT GTG CCC TTA ACC ACT GAC C</i>
<i>3f3</i>	<i>CCT GAT CTT CGA GGG CAC AGA TAC C</i>
<i>3r3</i>	<i>TGG TGT TGA TGA GGG CTG CCT CCA C</i>
4f	CTG CCC AGC CAG TAT CCT CAG CAA C
4r	TGT TCC AGG CAC ATG GCA AGT TTC C

5f	AAG GGT GTG ATG GGA ACA GGT GTT G
6r	GCC CAA AGC TGT GTG TTT CTA CTG C
7f	GGC AGG CAG ATG TGA GGT GCA GAA G
7r	GCC CTT TGG AAT GAC TGG CCA CCT C
7f2	AAT ATA GCT CCT GCC CTC CAG GTG C
7r2	CGG GTC TCA GCC TTC CCA TCT GAA C
8f	TTG TTC AGA TGG GAA GGC TGA GAC C
8r	AGC ACC CAC ACT CTC ACG CTC GAA C
8f2	CTG AGG TGG CCA GTC ATT CCA AAG G
8r2	ATG GGG TAC ACG AAG GAC AGG ATG C
9f	AGT TCG AGC GTG AGA GTG TGG GTG C
9r	CAG AGA TAA CTG ATG GCC ACT GGT C
10f	CAA GAT TGC ACT GCT GCA CTC CAG C
10r	GGA GCC CAA GGA TTT GTT TGA CCA C
10f2	ATT GCT TGA ACC CAG GAG GTA GAG G
10r2	TGT TTG ACC ACA AGG GCC AGG ACT G
10f3	<i>AAA GAC GCA GGG TAC ACC TGG TGA C</i>
10r3	<i>AGC TCG TCC ATC ACC AGC ACA TCA C</i>
11f	GTG GTC AAA CAA ATC CTT GGG CTC C
11r	TGG CAG GGT AGA CAC TGA GTA GCT G
11f2	CCG CTT CGA TGG CTA CCT CAA CCA G
11r2	GCA GTT CCT TCT CCA AGA CCT GAG C
12f	ATG GTG TCG AGG TGC CAG GTA TGT G
12r	GCC AGG CTG TGC AGA GGT CAA GT
13f	TGC CAC AGC TGC TGT ATG ACC ATT C
13r	CTG CTT GCT TTG GTC TGG CCT TGT C
13f1	<i>AGC TGT CCC CAT GCC CCA ACT TTG C</i>
13r1	<i>CAG TTT TGG ATG GAG GGG CAG CAC C</i>

f = forward; r = reverse; **fett gedruckte** Primer = wurden mit gutem Ergebniss eingesetzt;

kursiv gedruckte Primer = ergaben keine auswertbaren Ergebnisse

7.3. *Hfe*-spezifische Primer

Primer	Sequenz 5'.....3'
Mm <i>Hfe</i> -Ex2f	CAC AGT AAG GGT ACG TGG AG
Mm <i>Hfe</i> -In2r	TGG AGA CAG TGC AGT AGA GC

8. Literaturverzeichnis

Abumrad, N., el-Maghrabi, M., Amri, E., Lopez, E., and Grimaldi, P. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* *268*, 17665-17668.

Abumrad, N., Harmon, C., and Ibrahimi, A. (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J. Lipid Res.* *39*, 2309-2318.

Anderson, M., and Welsh, M. (1990). Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 7334-7338.

Berger, J., Truppe, C., Neumann, H., and Forss-Petter, S. (1998). A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *247*, 255-260.

Bing, R.J., Siegel, A., Ungar, I., and Gulbert, M. (1954). Metabolism of the human heart. *Am. J. Med. Sci.* *16*, 504-515.

Bouvier, M., Moffett, S., Loisel, T.P., Mouillac, B., Hebert, T., and Chidiac, P. (1995). Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochem. Soc. Trans.* *23*, 116-120.

Brandner, J.M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., and Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* *81*, 253-263.

Coe, N.R., Smith, A.J., Frohnert, B.I., Watkins, P.A., and Bernlohr, D.A. (1999). The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* *274*, 36300-36304.

Duplus, E., Glorian, M., and Forest, C. (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* *275*, 30749-30752.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* *156*, 1099-1111.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* *123*, 1777-1788.

Gimeno, R.E., Hirsch, D.J., Punreddy, S., Sun, Y., Ortegon, A.M., Wu, H., Daniels, T., Stricker-Krongrad, A., Lodish, H.F., and Stahl, A. (2003). Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J. Biol. Chem.* *278*, 49512-49516.

Gimeno, R.E., Ortegon, A.M., Patel, S., Punreddy, S., Ge, P., Sun, Y., Lodish, H.F., and Stahl, A. (2003). Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J. Biol. Chem.* *278*, 16039-16044.

Gross, C., Hausser, I., von der Wense, A., Langner, C., Simoens, W., Bau, O., Rompel, R., Meyer, W., and Ruschoff, J. (1999). Restrictive dermatopathy. *Pathologie* *20*, 365-370.

Hall, A.M., Wiczler, B.M., Herrmann, T., Stremmel, W., and Bernlohr, D.A. (2005). Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. *J. Biol. Chem.* *280*, 11948-11954.

Hardman, M., Sisi, P., Banbury, D., and Byrne, C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* *125*, 1541-1552.

Herrmann, T., Buchkremer, F., Gosch, I., Hall, A.M., Bernlohr, D.A., and Stremmel, W. (2001). Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase. *Gene* 270, 31-40.

Herrmann, T., van der Hoeven, F., Grone, H.-J., Stewart, A.F., Langbein, L., Kaiser, I., Liebisch, G., Gosch, I., Buchkremer, F., Drobnik, W., Schmitz, G., and Stremmel, W. (2003). Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *J. Cell Biol.* 161, 1105-1115.

Hirsch, D., Stahl, A., and Lodish, H.F. (1998). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8625-8629.

Holbrook, K.A., Dale, B.A., Witt, D.R., Hayden, M.R., and Toriello, H.V. (1987). Arrested epidermal morphogenesis in three newborn infants with a fatal genetic disorder (restrictive dermopathy). *J. Invest. Dermatol.* 88, 330-339.

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 63-99.

Hwang, D. (2000). Fatty acids and immune responses--a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 431-456.

Indra, A., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J., Xiao, J., Chambon, P., and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* 27, 4324-4327.

Jackson, C.S., Zlatkine, P., Bano, C., Kabouridis, P., Mehul, B., Parenti, M., Milligan, G., Ley, S.C., and Magee, A.I. (1995). Dynamic protein acylation and the regulation of localization and function of signal-transducing proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 568-571.

Kamp, F., and Hamilton, J. (1992). pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11367-11370.

Kilby, N.J., Snaith, M.R., and Murray, J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* *9*, 413-421.

Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J.M., Moll, I., and Franke, W.W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell Biol.* *81*, 419-435.

Langbein, L., Rogers, M.A., Praetzel, S., Winter, H., and Schweizer, J. (2003). K6irs1, K6irs2, K6irs3, and K6irs4 represent the inner-root-sheath-specific type II epithelial keratins of the human hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* *120*, 512-522.

Li, M., Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., and Chambon, P. (2000). Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR[alpha] mutations in mouse epidermis. *Nature* *407*, 633-636.

Matsuki, M., Yamashita, F., Ishida-Yamamoto, A., Yamada, K., Kinoshita, C., Fushiki, S., Ueda, E., Morishima, Y., Tabata, K., Yasuno, H., Hashida, M., Iizuka, H., Ikawa, M., Okabe, M., Kondoh, G., Kinoshita, T., Takeda, J., and Yamanishi, K. (1998). Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 1044-1049.

Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* *24*, 71-80.

Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 511-516.

Moulson, C.L., Martin, D.R., Lugas, J.J., Schaffer, J.E., Lind, A.C., and Miner, J.H. (2003). Cloning of wrinkle-free, a previously uncharacterized mouse mutation, reveals crucial roles for fatty acid transport protein 4 in skin and hair development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 5274-5279.

Mountford, P., and Smith, A. (1995). Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet.* *11*, 179-184.

Mundy, D. (1995). Protein palmitoylation in membrane trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* *23*, 572-576.

Navarro, C.L., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Boccaccio, I., Boyer, A., Genevieve, D., Hadj-Rabia, S., Gaudy-Marqueste, C., Smitt, H.S., Vabres, P., Faivre, L., Verloes, A., Van Essen, T., Flori, E., Hennekam, R., Beemer, F.A., Laurent, N., Le Merrer, M., Cau, P., and Levy, N. (2004). Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 2493-503.

Nijsten, T.E.C., De Moor, A., Colpaert, C.G., Robert, K., Mahieu, L.M., and Lambert, J. (2002). Restrictive dermopathy: A case report and a critical review of all hypotheses of its origin. *Pediatr. Dermatol.* *19*, 67-72.

Norlen, L. (2001). Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 830-836.

Ordway, R.W., Singer, J.J., and Walsh, J.V.J. (1991). Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* *14*, 96-100.

Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* *25*, 139-140.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* *24*, 104-108.

Sauer, B., and Henderson, N. (1990). Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol.* *2*, 441-449.

Schaffer, J.E., and Lodish, H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427-436.

Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Pratzel, S., Zimbelmann, R., and Franke, W.W. (1997). Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res.* 290, 481-499.

Schürer, N., Stremmel, W., Grundmann, J., Schliep, V., Kleinert, H., Bass, N., and Williams, M. (1994). Evidence for a novel keratinocyte fatty acid uptake mechanism with preference for linoleic acid: comparison of oleic and linoleic acid uptake by cultured human keratinocytes, fibroblasts and a human hepatoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1211, 51-60.

Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 5080-5081.

Stahl, A., Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L.A., and Lodish, H.F. (1999). Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell* 4, 299-308.

Steinberg, S.J., Mihalik, S.J., Kim, D.G., Cuebas, D.A., and Watkins, P.A. (2000). The human liver-specific homolog of very long-chain acyl-CoA synthetase is cholate:CoA ligase. *J. Biol. Chem.* 275, 15605-15608.

Sternberg, N., Hamilton, D., and Hoess, R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J. Mol. Biol.* 150, 487-507.

Stremmel, W. (1988). Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. *J. Clin. Invest.* 81, 844-852.

Stremmel, W. (1988). Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J. Clin. Invest.* 82, 2001-2010.

Stremmel, W., and Berk, P.D. (1986). Hepatocellular influx of [14C]oleate reflects membrane transport rather than intracellular metabolism or binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3086-3090.

Stremmel, W., Strohmeyer, G., and Berk, P.D. (1986). Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3584-3588.

Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1997). Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7400-7405.

Tsukita, S., and Furuse, K. (2000). The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 915, 129-135.

Vyska, K., Machulla, H.J., Stremmel, W., Fassbender, D., Knapp, W.H., Notohamiprodjo, G., Gleichmann, U., Meyer, H., Knust, E.J., and Korfer, R. (1988). Regional myocardial free fatty acid extraction in normal and ischemic myocardium. *Circulation* 78, 1218-1233.

Williams, M. (1992). Ichthyosis: mechanisms of disease. *Pediatr. Dermatol.* 9, 365-368.

Williams, M., and Elias, P. (1985). Heterogeneity in autosomal recessive ichthyosis. Clinical and biochemical differentiation of lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch. Dermatol.* 121, 477-488.

Wright, S. (1991). Essential fatty acids and the skin. *Br. J. Dermatol.* 125, 503-515.

Zhou, S.L., Stump, D., Sorrentino, D., Potter, B.J., and Berk, P.D. (1992). Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 267, 14456-61.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Stremmel danke ich für die Bereitstellung aller materiellen und apparativen Voraussetzungen für diese Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. T. Herrmann möchte ich sehr herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas, seine stetige und freundliche Unterstützung und für seine vielfältigen Anregungen, die er mir während meiner Arbeit zukommen ließ, danken.

Herrn Prof. Dr. R. Neiger möchte ich sehr herzlich für die spontane Bereitschaft danken, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen zu betreuen. Darüber hinaus bin ich ihm für seine hilfreichen Anmerkungen und das äußerst schnelle und genaue Durchsehen der Arbeit sehr dankbar.

Mein ganz besonderer Dank gilt Iris Kaiser und Isabella Gosch, die mir den praktischen Teil der Arbeit durch ihre kompetente und geduldige Einarbeitung und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft so angenehm gemacht haben. Herzlichen Dank für die stets freundschaftliche und fröhliche Arbeitsatmosphäre, auch allen übrigen Mitarbeitern der Abteilung Innere IV. Durch Inga Weiße entstand der Kontakt zu dieser Abteilung, wofür ich ihr natürlich ganz besonders dankbar bin.

Für die Herstellung der histologischen und immunhistochemischen Schnitte danke ich der Abteilung für zelluläre und molekulare Pathologie und der Abteilung für Zellbiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Mann dafür danken, dass sie mich zur Erstellung dieser Arbeit ermuntert und dies durch ihre finanzielle Unterstützung überhaupt möglich gemacht haben.

10. Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

édition scientifique
WB LAUFERSWEILER VERLAG

WB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5056-8



9 783883 519505

