

Die Inaktivierung des TGM3 Gens in der Maus und ihre Auswirkung auf die Haarmorphogenese



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Susan John

aus Köln

März 2006

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
im Institut für Biochemie II unter der Leitung von Prof. Dr. Mats Paulsson
angefertigt.



Gutachter: Herr Prof. Dr. Mats Paulsson
Herr Prof. Dr. Helmut W. Klein

Disputation: 01.06 2006

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
I. EINLEITUNG	1
1. Transglutaminasen	1
1.1 Nomenklatur	2
1.2 Genetischer Hintergrund	2
1.3 Katalytische Reaktionen der TGs	3
1.4 Substratspezifität.....	4
1.5 Posttranslationale Modifikation von TGs	6
2. Die physiologische Rolle der TGs	7
2.1 Stabilisierung von Geweben.....	7
2.2 Signaltransduktion	7
2.3 Beteiligung von TGs an Entwicklungsvorgängen.....	8
2.4 TGs in der extrazellulären Matrix.....	8
3. TGs in der Haut	9
3.1 Epidermis	9
3.2 Dermis	11
3.3 TGs in Zusammenhang mit Wundheilung	11
4. TGs der Haare	12
4.1 Trichohyalin	13
5. TG Beteiligung an pathologischen Prozessen	14
5.1 Lamellare Ichtiose (LI).....	14
5.2 Netherton Syndrom	14
5.3 Defekte des Faktor XIII	15
5.4 Deletion des TGM2 Gens	15
5.5 Neurodegenerative Erkrankungen	16
5.6 Gluten-sensitive Erkrankungen (GSD)	16
I. Zöliakie.....	17
II. Dermatitis herpetiformis (DH)	17
5.7 Fibrotische Erkrankungen	17
6. Epidermale/Haarfollikel TG (TG3)	18
6.1 Funktion	18
6.2 Struktur.....	18
6.3 Aktivierung.....	19
7. In vivo gene targeting	20
7.1 Übersicht.....	20
7.2 Aufbau eines <i>targeting vector</i>	20

8.Eigene Vorarbeiten	21
8.1 Genomische Organisation und Lokalisation des TGM3 Gens	21
8.2 Festlegung der Intron–Exon Grenzen.....	22
9. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	23
II. ERGEBNISSE.....	25
1. Deletion des TGM3 Gens	25
1.1 Klonierungsstrategie.....	25
1.2 Sonden	26
1.3 Hybridisierung	27
1.4 Herstellung des <i>targeting</i> Konstruktes	28
1.5 Transfektion und Analyse von ES-Zellen.....	29
1.6 Generierung chimärer Mäuse	30
1.7 Etablierung einer TG3-defizienten Mauslinie	31
2. Analyse der TG3-defizienten Mäuse.....	31
2.1 Genotypisierung	31
2.2 Phänotyp	33
2.3 Verifizierung des vollständigen Verlustes von TG3	34
2.4 Histologie und Morphologie keratinisierter Epithelien.....	36
2.5 Die Ultrastruktur der Haut TG3-defizienter Tiere	38
2.6 Expression anderer TG Isoformen	38
2.7 Die Barrierefunktion mutanter Haut.....	40
I. Luzifer Gelb Penetration.....	40
II. Toluidin Blau Retention	41
2.8 Morphologie und Lipidkomponenten von Korneozyten	43
2.9 Expression und Löslichkeitsverhalten verschiedener Strukturproteine der Haut	44
2.10 Knochenentwicklung.....	45
3. Morphologie und Struktur der Haare	47
3.1 Die Haarstruktur im Lichtmikroskop	47
3.2 Die Ultrastruktur mutanter Haare (REM)	48
3.3 Die Ultrastruktur mutanter Haare (TEM)	48
3.4 Expression und Löslichkeitsverhalten verschiedener Strukturproteine der Haare	51
4. Charakterisierung von TG6	53
4.1 Chromosomale Lokalisation	53
4.2 Gewinnung der Gesamt-RNA	54
4.3 Herstellung eines eukaryotischen TG6-Expressionsvektors	55
4.4 Überexpression von TG6 in 293 EBNA Zellen	56
4.5 Besonderheiten TG6-exprimierender 293 EBNA Zellen	56
4.6 Löslichkeit von TG6	58
4.7 Proteinaufreinigung.....	59
4.8 Herstellung von TG6-spezifischen Antikörpern	60
4.9 Affinitätsreinigung des Antiserums.....	61
4.10 Aktivitätstest	62
4.11 TG6 mRNA in verschiedenen Geweben	64

III. DISKUSSION.....	65
1. Die Haut TG3-defizienter Tiere	65
1.1 TG3 ist für die Entwicklung der Haut und ihrer Barrierefunktion nicht essentiell	65
1.2 Hinweise auf eine mögliche Kompensation von TG3 in der Haut	66
1.3 Embryonale Expression von TG3	68
2. Die Haare TG3-defizienter Tiere	69
2.1 TG3 ist eine Haarfollikel TG	69
2.2 Morphogenese und Wachstumszyklen des Haarfollikels	70
2.4 Atypische Quervernetzung und Löslichkeit von Haarproteinen	71
2.5 Löslichkeit von speziellen Haarkeratinen	73
2.6 Andere Mausmodelle mit ähnlichen Haaranomalien	74
2.7 Ungeklärte Aspekte der bisherigen Ergebnisse.....	75
3. Die Charakterisierung von TG6	77
3.1 Die rekombinante Expression und das Löslichkeitsverhalten von TG6	77
3.2 TG6 ist ein aktives Mitglied der TG Familie.....	78
4. Ausblick	79
IV. MATERIAL UND METHODEN	81
1. Material	81
1.1 Klonierungsvektoren	81
1.2 Selektionskassette	81
1.3 Oligonukleotide	81
1.3.1 Sequenzierung der Konstrukte	81
1.3.2 Amplifikation der homologen Regionen des TG3 <i>targeting</i> Konstruktes ..	82
1.3.3 TG3 Sonden für die <i>Southern blot</i> Analyse.....	82
1.3.4 TG6 RT PCR und PCR	82
1.4 Enzyme	83
1.5 Zellkultur	83
1.6 Antikörper	86
2. Methoden	87
2.1 Zellkultur.....	87
2.1.1 Isolation von Fibroblasten aus Mausembryonen	87
2.1.2 Einfrieren von Fibroblasten	88
2.1.3 Auftauen von Zellen.....	88
2.1.4 Passagieren von Zellen	88
2.1.5 Behandlung von Fibroblasten mit Mitomycin C.....	89
2.1.6 Kultivierung von ES-Zellen	89
2.1.7 Transfektion von ES-Zellen via Elektroporation	89
2.1.8 Selektion resistenter Klone durch G418	90
2.1.9 Isolation resistenter Klone	90
2.1.10 Kultivierung der isolierten Klone	90
2.1.11 Einfrieren von Klonen	91
2.1.12 Kultivierung von 293 EBNA Zellen	91
2.1.13 Transfektion von 293 EBNA Zellen mit Liporeagenzien	91

2.2 Molekularbiologische Methoden	92
2.2.1 Transformation.....	92
2.2.2 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien	92
2.2.3 DNA Reinigung	92
I. Phenol/Chloroform-Extraktion.....	92
II. Gelextraktionskit	92
2.2.4 Sequenzierung von DNA.....	93
2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien (Laird et al. 1991).....	93
2.2.6 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellklonen (Floss 1996)	93
2.2.7 <i>Southern Blot</i> (Southern et al. 1975)	93
2.2.8 Radioaktive Markierung von dsDNA.....	94
2.2.9 Hybridisierung membrangebundener DNA (modifiziert nach Church und Gilbert 1984)	94
2.2.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe mit Trizol.....	95
2.2.11 mRNA Extraktion aus Gesamt-RNA	95
2.2.12 Denaturierende Agarosegelelektrophorese (Lehrach 1977).....	95
2.2.13 <i>Northern blot</i> Analyse	95
2.2.14 Reverse Transkription (RT-PCR).....	95
2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	96
2.3 Proteinchemische Methoden	97
2.3.1 Trichloressigsäure (TCA) Fällung	97
2.3.2 Proteinextrakte aus Gewebe	98
2.3.3 Proteinextraktion aus Haaren.....	98
2.3.4 Extraktion von rekombinantem TG6 aus 293 EBNA Zellen	98
2.3.5 Affinitätsreinigung von rekombinantem TG6	99
2.3.6 Affinitätsreinigung von TG6 Antiserum	99
2.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)	99
2.3.8 <i>Western blot</i> Analyse	99
2.3.9 Aktivitätstest (modifiziert nach Slaughter et al. 1992).....	100
2.4 Histologische Methoden	101
2.4.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten.....	101
2.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen	101
2.4.4 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	102
2.4.5 Isolation von Korneozyten	103
2.4.6 Nil Rot Färbung.....	103
2.4.7 TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling).....	104
2.4.8 Knochen- und Knorpelfärbung.....	104
2.4.9 Farbausschlußtests.....	104
I. Luzifer Gelb.....	104
II. Toluidin Blau	104
2.4.10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	105
2.4.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	105
2.4.12 Messung des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL).....	105
LITERATURVERZEICHNIS	107
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	123
DANKSAGUNG.....	127

ERKLÄRUNG	129
LEBENS LAUF	131

Zusammenfassung

Transglutaminasen (TGs) sind eine Gruppe von Enzymen, die funktionell und strukturell miteinander verwandt sind und posttranslationale Modifikationen von Proteinen katalysieren. TGs werden in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert, wo sie spezifische physiologische Aufgaben erfüllen. Die Ca^{2+} abhängige Transglutaminase-Reaktion katalysiert die Verknüpfung eines spezifischen Glutaminrestes eines Substratproteins mit einem primären Amin. Das Resultat ist die Ausbildung einer ϵ - γ -Glutamyl-lysin Isopeptidbindung die sowohl zu intra- als auch intermolekularen, kovalenten Quervernetzungen von Proteinen führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine TG3-defiziente Mauslinie etabliert um die Rolle der epidermalen TG, TG3, *in vivo* genauer zu charakterisieren. Auch wenn in den bisher durchgeführten Experimenten keine signifikante Auswirkung des Verlustes von TG3 auf die Haut beobachtet wurde, konnte eindeutig gezeigt werden, dass TG3 Einfluss auf die Haarmorphogenese hat. TG3-defiziente Tiere besitzen ein gewelltes Fell und gekrümmte Schnurrhaare. Während der Haarphänotyp mit zunehmendem Alter nachlässt, bleibt die Krümmung der Schnurrhaare erhalten. Die Mutanten sind lebensfähig und fertil und wirken, abgesehen von den Haaren und einer etwas geringeren Größe, normal im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern. Sowohl bei lichtmikroskopischen als auch ultrastrukturellen Untersuchungen der Haare, war zu erkennen, dass die mutanten Haare teilweise dünner und in sich verdrillt sind. Die Orientierung der Kutikulaschuppen und die Furchung der einzelnen Haare erscheinen unregelmäßig. Das im Wildtyp schwer bis gar nicht lösliche TG3 Substrat Trichohyalin (THH), welches gemeinsam mit TG3 in der Medulla und der inneren Wurzelscheide des Haares exprimiert wird, weist bei den Mutanten eine extrem hohe Löslichkeit auf. Neben Involukrin konnten des Weiteren auch die Keratine 14, 17 und 6hf in größeren Mengen aus TG3-defizienten Haaren extrahiert werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Quervernetzung von THH *in vivo* von TG3 umgesetzt und durch ihren Verlust beeinträchtigt wird. Die involvierten Keratine bei der Ausbildung einer stabilen Matrix aus THH und Keratin Intermediärfilamenten (KIF) könnten, neben anderen, Keratin 17 und 6 hf sein, die durch den Verlust von TG3 ebenfalls nicht in der üblichen Form quervernetzt werden können, was ihre erhöhte Löslichkeit erklärt. Daher lässt sich eine essentielle Rolle von TG3 bei Quervernetzungen im Haar und somit bei der Entwicklung der Haarstruktur postulieren.

Abstract

Transglutaminases (TGs) are structurally and functionally related enzymes that catalyze the post-translational modification of proteins. TGs are expressed in a number of cells and tissues in which they fulfill specific physiological roles. In a Ca^{2+} dependent reaction, TGs mediate the crosslinking of a specific glutamine residue of a substrate protein with a primary amine. This results in an ϵ - γ -glutamyl-lysine isopeptide bond which leads to the formation of intra- and intermolecular covalent crosslinks between proteins. We have established a TG3 deficient mouse line to elucidate the role of the epidermal TG, TG3, *in vivo*. The loss of TG3 did not result in any discernable effect on the skin but our results suggest a role for TG3 in hair morphogenesis. TG3^{-/-} mice display a hair specific phenotype with a wavy coat and curled vibrissae. While the phenotype of the pelage becomes less obvious in time, the bending of the vibrissae persists. Despite the hair phenotype and a slight reduction in body weight the mutants are viable and fertile and seem normal when compared to their wildtype litter mates. TG3^{-/-} hairs are predominantly thinner than those from wildtype animals and they are twisted. Light and electron microscopy revealed irregular grooves and cuticle cells in the mutant hairs. The highly insoluble TG3 substrate trichohyalin (THH) which is expressed along with TG3 in the medulla and the inner root sheath (IRS) is easily extracted from mutant hairs. Along with involucrin, keratins 14, 17 and 6hf also show an increased solubility in the hairs of TG3-deficient mice. Our results suggest that the crosslinking of THH *in vivo* is mediated through TG3 and impaired upon its deletion. The keratins involved in building a stable matrix together with THH might be, amongst others, Keratin 17 and 6 hf which also display a higher solubility in mutant hairs possibly due to altered crosslinking. Hence, we suggest that TG3 is essential for crosslinking specific hair proteins which seems to play a crucial role in hair development.

I. Einleitung

1. Transglutaminasen

Transglutaminasen (TGs) sind eine Gruppe von Enzymen, die aufgrund ihrer Struktur und Funktion miteinander verwandt sind. Sie gehören zur Familie der Papain-ähnlichen Cystein Proteasen (Makarova et al. 1999) und werden in verschiedenen Zellen und Geweben prokaryotischer (Kanaji et al. 1993), als auch eukaryotischer (Del Duca et al. 1995, Yasueda et al. 1994) Organismen exprimiert. Viele physiologische Vorgänge hängen von der schnellen Ausbildung von quervernetzten Proteinpolymeren ab. TGs katalysieren hauptsächlich post-translationale Modifikationen, welche die kovalente Quervernetzung von Proteinen zur Folge haben (Aeschlimann und Paulsson 1994). Bei dieser Ca^{2+} -abhängigen Reaktion, wird ein primäres Amin, unter Austritt von Ammoniak, mit der Amidgruppe eines Glutaminrestes verknüpft (Abb.1). Die daraus resultierende Isopeptidbindung führt häufig zur Ausbildung unlöslicher, supramolekularer Strukturen, die der Stabilisierung von Geweben dienen (Greenberg et al. 1991). Bis heute sind neun homologe Mitglieder der TG Familie bekannt (Grenard et al. 2001), welche unterschiedliche Quervernetzungen katalysieren (Tab.1).

Enzym	TG1 (TGk)	TG2 (TGc)	TG3 (TGe)	TG4 (TGp)
Gen	TGM 1	TGM 2	TGM 3	TGM 4
Anzahl der Exons	15	13	13	13
Anzahl der Aminosäuren ohne das 1. Met	816	686	692	683
Molekulargewicht [kDa]	106	77	77	77
Vorkommen in Zellen, Geweben und Organen	Keratinozyten, Epithelien	ubiquitär	Epithelien, Haarfollikel	Prostata
Funktion	Ausbildung des CE	Vielfältig, z.B Stabilisierung, Signaltransduktion	Ausbildung des CE	Samenkoagulation bei Nagetieren
Lokalisation	Membran, Zytosol	Zytosol, extrazellulärer Raum , Membran, Nucleus	Zytosol	extrazellulärer Raum

Enzym	TG5 (TGx)	TG6 (TGy)	TG7 (TGz)	FXIIIa	EBP 4.2
Gen	TGM 5	TGM 6	TGM 7	F13A1	EBP42
Anzahl der Exons	13	13	13	15	13
Anzahl der Aminosäuren ohne das 1. Met	719	720	709	731	690
Molekulargewicht [kDa]	81	80	80	83	72
Vorkommen in Zellen, Geweben und Organen	ubiquitär	Haut, Gehirn	ubiquitär	Blutplasma, Blutplättchen, Monozyten, Makrophagen. Hepatozyten, Chondrozyten, Placenta	RBCs, Niere, Lunge Blutplättchen
Funktion	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Blutkoagulation	Erhaltung der Membran Integrität in Erythrocyten
Lokalisation	Zytoskelett	unbekannt	unbekannt	Zytosol, extrazellulärer Raum	Membran

Tab. 1 Aufstellung der neun bekannten Säuger Transglutaminasen Aufgeführt sind Gewebe, in denen die TGs besonders stark exprimiert werden, sowie ihre primäre Funktion (modifiziert nach Sardy 2002).

1.1 Nomenklatur

Die ursprüngliche Nomenklatur der TGs leitet sich von dem jeweiligen Gewebe ab, in dem sie exprimiert werden. So wird TG2 auch als tTG, für *tissue* oder TGc, was für *cellular* TG steht, bezeichnet. Die drei jüngst charakterisierten Mitglieder TGx (TG5), TGy (TG6) und TGz (TG7) sind der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach alphabetisch bzw. numerisch geordnet. Aufgrund der konfusen Namensgebung wurde zu einer numerischen Zuordnung der einzelnen TGs übergegangen. Die Nummerierung für FXIII und EPB 4.2 sind hiervon unbeeinflusst. Während TGM das kodierende Gen bezeichnet, so steht TG für das jeweilige Genprodukt, gefolgt von einer arabischen Nummer (Grenard 2001).

1.2 Genetischer Hintergrund

Die eukaryotischen TGs sind nicht mit denen der Prokaryoten verwandt. Sie sind ein Beispiel für konvergente Evolution, da ähnliche Reaktionen von Enzymformen umgesetzt werden, die unabhängig voneinander entstanden sind. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Transglutaminierung eine wichtige Rolle spielt. Ihren evolutionären Ursprung haben die TGs in den G-Proteinen. Diese Funktion ist in einigen Mitgliedern erhalten geblieben. TG2, TG3 und TG5 besitzen GTPase Aktivität (Nakaoka et al. 1994, Iismaa et al. 2000, Ahvazi et al. 2004, Candi et al. 2004). Die

TG Gene der Säuger sind alle in ähnlicher Art und Weise aufgebaut und hoch konserviert. Es ist anzunehmen, dass sich mindestens zwei Gruppen von TG Genen aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen entwickelt haben (Grenard et al. 2001). Die beiden unterschiedlichsten Familienmitglieder, FXIII und EPB 4.2, sind beim Menschen zu 26% in ihrer Aminosäuresequenz identisch. Alle aktiven TGs besitzen einen hohen Grad an Homologie in ihrem aktiven Zentrum (Grenard et al. 2001).

1.3 Katalytische Reaktionen der TGs

Es gibt verschiedene Arten von Reaktionen, die von TGs katalysiert werden (Abb. 1.3). Erstmals nachgewiesen wurden TGs aufgrund ihrer Fähigkeit, primäre Amine in andere Proteine zu inkorporieren (Clarke et al. 1957). Dabei kann es sich bei dem primären Amin entweder um ein Polyamin (z.B. Histamin, Serotonin, Spermidin, Putrescin) oder ein Protein-gebundenes Lysin handeln. Bis heute ist diese Methode einer der gängigsten Nachweise für die Aktivität von TGs. Die Transglutaminase-Reaktion, auch Amino- γ -glutamyl Transferase Reaktion genannt, katalysiert die Verknüpfung eines spezifischen Glutaminrestes eines Substratproteins mit einem primären Amin (Clarke et al. 1957). Diese Reaktion läuft in zwei Stufen und nur in Anwesenheit von Ca^{2+} ab (Folk und Finlayson 1977). Die Bindung von Ca^{2+} bedingt eine Konformationsänderung, durch welche die entsprechenden Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms zugänglich gemacht werden (Chung und Folk 1972). Der erste Schritt der Reaktion ist häufig eine Transaminierung. Ein spezifischer Glutaminrest eines passenden Substrates bindet an die Sulfhydrylgruppe eines spezifischen Cysteinrest im aktiven Zentrum der TG. Hierbei entsteht, unter Austritt von Ammoniak, ein γ -Glutamylthiolester (Acylenzym Intermediat) (Abb. 1.3 A). Durch die Freisetzung von NH_3 und dessen anschließender Protonierung steht die notwendige Energie zur Verfügung, um die Reaktion anzutreiben. Die Bildung des Acylenzym Intermediats ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion (Stenberg et al. 1975). Im zweiten Schritt der Reaktion findet, in den meisten Fällen, die Quervernetzung statt. Das Intermediat reagiert entweder mit der Aminogruppe des Lysins eines weiteren Proteins oder mit einem anderen primären Amin. Der greift die Thiolesterbindung an und bindet an das Intermediat. Es entsteht eine ϵ - γ -Glutamyl-lysin Isopeptidbindung, wobei das Enzym wieder freigesetzt wird (Folk und Finlayson 1977, Abb.1.3 B). Das Resultat ist ein kovalent verknüpftes Netzwerk von Proteinen. Steht kein geeigneter zur Verfügung, findet eine bedeutend langsamere Hydrolysereaktion statt, die eine Desaminierung oder die Spaltung der

Isoeptidbindung des Substrates zur Folge hat. In beiden Fällen entsteht ein Glutamatrest und das Enzym wird zurück gewonnen (Abb.1.3 C). Einige TGs besitzen die Fähigkeit zur Autokatalyse (Barry und Mosher 1990, Candi et al. 2001). Indem sie selbst als Substrat fungieren, bilden sie Verknüpfungen untereinander, was zu hochmolekularen Komplexen führt. Eine weitere Möglichkeit ist die Inkorporation von primären Aminen in die Enzyme selbst (Lorand et al. 1966). Nicht-katalytische Reaktionen der TGs, wie z.B. bei der Signaltransduktion, werden in Abschnitt 2 besprochen.

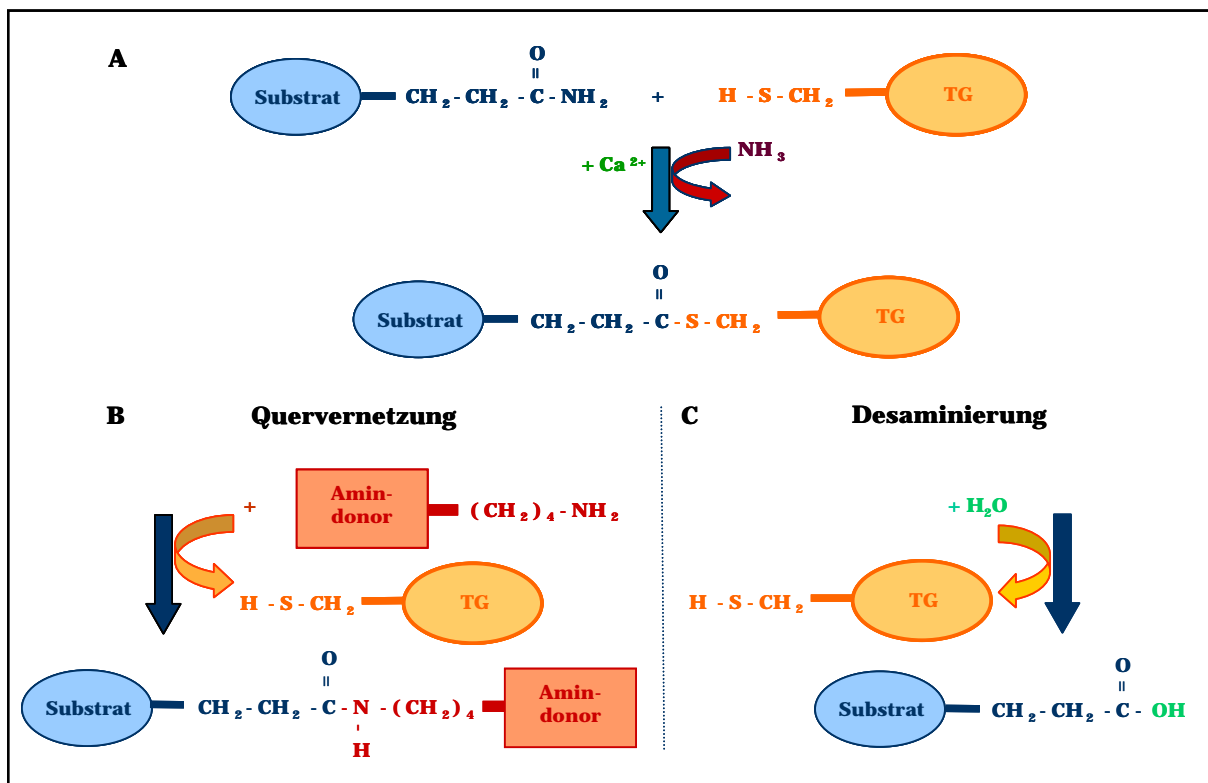


Abb. 1.3 Amino- γ -glutamyl Transferase Reaktion. Im ersten Schritt der Reaktion bildet die TG mit ihrem Substrat ein Acylenzym Intermediat unter Austritt von Ammoniak. Diese Reaktion kann nur in Anwesenheit von Calciumionen stattfinden (A). Das Intermediat reagiert mit einem primären Amin. Hierbei handelt es sich um die eigentliche Quervernetzung des Substrates mit dem primären Amin. Es entsteht eine Isoeptidbindung und die Transglutaminase wird wieder freigesetzt (B). Die Desaminierungsreaktion, aus der ein Glutamatrest hervorgeht, ist in (C) gezeigt.

1.4 Substratspezifität

Die einzelnen TGs weisen eine besondere Spezifität sowohl gegenüber ihren Glutamin- als auch ihren Lysinsubstraten auf (Lorand et al. 1992, Murthy et al. 1994). Die Wahl des Lysinrestes erfolgt jedoch weniger spezifisch, als die des Glutaminrestes. TGs reagieren ausschließlich mit γ -Aminen ausgesuchter Endo-

Glutaminreste in bestimmten Proteinen und Peptiden. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Ahvazi et al. 2002). *In vitro* Daten stützen die These, dass zwei benachbarte Glutaminreste als Aminakzeptor fungieren (Berbers et al. 1984, Hohenadl 1995). Bestimmte Aminosäuren können die Spezifität eines Substrates erhöhen oder verringern. Dies hängt davon ab, in welchem Abstand sie zu den passenden Glutaminresten positioniert sind. Man nimmt an, dass z.B. Glycin und Asparagin den Zugang zum Substrat begünstigen, wenn sie sich in unmittelbarer Nähe der spezifischen Glutaminreste befinden (Coussons et al. 1992). Andere Aminosäuren scheinen genau das Gegenteil zu bewirken. Befindet sich ein spezifisches Glutamin zwischen zwei Prolinresten, kann es von der jeweiligen TG nicht mehr als Substrat erkannt werden. Derselbe Fall tritt ein, wenn ein Glutaminrest am N- oder C Terminus des Substratproteins liegt (Pastor et al. 1999). Damit eine Reaktion ablaufen kann, müssen die Glutaminreste frei zugänglich an der Oberfläche des Substratproteins liegen. Die Vermutung, dass nicht nur eine bestimmte Konsensussequenz, sondern auch die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur eines Proteins eine Rolle dabei spielt, wo eine Quervernetzung stattfindet, liegt also nahe (Coussons et al. 1992). Einige Proteine, wie z.B. Lorikrin, eignen sich besonders gut als Substrat, da hier verschiedene Glutamin- und Lysinreste eines einzigen Proteins sowohl als Substrat als auch als Aminendonator genutzt werden können (Candi et al. 1995, Steinert et al. 1999). TG1 und TG3 bevorzugen *in vitro* und *in vivo* Lorikrin, SPRs 1, 2, 3, Keratine und Trichohyalin als Substrate (Candi et al. 1998, Steinert et al. 2003). Zusätzlich wird Involukrin als *in vitro* Substrat von TG5 verwendet (Candi et al. 2001). Eine Auswahl an TGs und deren Substrate sind in Tabelle 1.4 aufgeführt.

Enzym	Substrate
TG1	Lorikrin, SPRs 1,2 und 3, Keratin, Trichohyalin, Filaggrin, Cornifin
TG2	Osteonektin, Kollagen III, V, XI, Vimentin, Tau, Nidogen, RhoA, Aktin
TG3	Lorikrin, SPRs 1,2 und 3, Keratine, Trichohyalin, Filaggrin, Cornifin
TG4	SV I-V (seminal vesicle), Semenogelin
TG5	Lorikrin, SPRs 1,2 und 3, Involukrin, Filaggrin, Cornifin
FXIII	Fibronektin, Fibrinogen A, Filamin, Vinculin, Vitronektin, Kollagen XVI

Tab. 1.4 Einige bekannte Substrate für TG1-5 und FXIII (modifiziert nach Esposito und Caputo 2005)

1.5 Posttranslationale Modifikation von TGs

TGs unterliegen posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acylierung oder proteolytischer Spaltung, um sie ihren vielfältigen Aufgaben anzupassen (Howdle et al. 1984, Ikura et al. 1989, Rice et al. 1990). TG1 wird durch Fettsäureacylierung modifiziert. Sie ist auf der zytosolischen Seite in der Plasmamembran durch Palmitin- und Myristinsäureanker befestigt (Chakravarty et al. 1989). Ihre Phosphorylierung in der Nähe des Fettsäureankers durch Protein Kinase C (PKC) könnte zur Regulierung der Aktivität und/oder der Substratspezifität beitragen (Chakravarty et al. 1990). Durch proteolytische Spaltung des Fettsäureankers entsteht die lösliche Form der TG1.

FXIII, TG3 und TG4 sind Zymogene, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. FXIII wird durch Calcium und Thrombin in seine aktive Form, FXIIIa, überführt. Thrombin spaltet zwischen einem spezifischen Arginin- und einem Glycinrest (Lorand 1986), was in dem aktivierten Dimer FXIIIa resultiert (Greenberg et al. 1991). TG4 wird von der Koagulationsdrüse der Prostata sekretiert (Esposito und Caputo 2005) und durch die erhöhte Calciumkonzentration im extrazellulären Raum aktiviert (Williams-Ashman et al. 1977). Die Aktivierung von TG3 wird in Abschnitt 6.3 erläutert.

FXIII, TG2, und TG3 sind im extrazellulären Raum aktiv (Aeschlimann und Paulsson, 1991). Durch welchen Mechanismus sie sekretiert werden ist jedoch unklar. TGs fehlt jegliche Glykosylierung (Ausnahme: TG4 der Ratte [Esposito et al. 1996]), obwohl Stellen für potentielle N-Glykosylierung vorhanden sind (Ikura et al. 1988). Weiterhin besitzen sie trotz zahlreicher Cysteinreste keine Disulfidbrücken. Dies ist untypisch für Proteine, die durch das endoplasmatische Reticulum bzw. den Golgi-Apparat prozessiert wurden. Weiterhin fehlt allen Transglutaminasen ein entsprechendes Signalpeptid, das charakteristisch für Proteine ist, die in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Die meisten TGs werden in der Form modifiziert, dass das erste Methionin abgespalten und die darauf folgende Aminosäure acetyliert wird. Hierbei könnte es sich um ein alternatives Signal zur Sekretion handeln (Muesch et al. 1990).

2. Die physiologische Rolle der TGs

Viele physiologische Vorgänge hängen von der schnellen Generierung kovalenter Bindungen zwischen Proteinen ab. Durch ihre Fähigkeit solche kovalenten Bindungen zu vermitteln, tragen TGs in vielen Fällen zur Stabilisierung von Geweben bei. Auch bei Prozessen, die unabhängig von der Eigenschaft der TGs sind, Quervernetzungen zu vermitteln, wie die Signaltransduktion, spielen sie eine Rolle. Im Folgenden sind einige Beispiele aufgeführt.

2.1 Stabilisierung von Geweben

Während der späten Phase der Blutkoagulation, vermittelt die aktive Form des FXIII, FXIIIa, die kovalente Verknüpfung von Fibrin zu multimeren Komplexen. Die zwischen den einzelnen Fibrinmonomeren entstandenen Isopeptidbindungen stabilisieren das Koagulat (Ariens et al. 2002). Durch die Quervernetzung von α_2 -Antiplasmin und α_2 -Macroglobulin mit der Fibrin α Kette, wird das Koagulat vor proteolytischem Abbau durch Plasmin geschützt (Mortensen et al. 1981). TG2 ist das Mitglied der TG Familie mit dem breitesten Expressionsmuster. Intrazellulär verknüpft TG2 Spektrin, Ankyrin und EPB4.2 zur Stabilisierung der Plasmamembran und des Zytoskeletts während der Erythrozytenreifung (Lorand et al. 1984).

2.2 Signaltransduktion

Es gibt Hinweise darauf, dass TG2 neben ihrer Rolle als G-Protein, auch in eine Vielzahl von Prozessen bei der Signaltransduktion involviert ist. Die membrangebundene TG2 interagiert mit den Rezeptoren β 1- und β 3 Integrin und ist in der Lage, nicht-kovalent an Fibronectin zu binden (Bowness et al. 1987, Akimov et al. 2001). Man nimmt an, dass die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Zellhaftung auf die Rolle von TG2 als Korezeptor zurückzuführen sind (Akimov et al. 2000). Die Zellhaftung und Migration von Zellen, sowie die durch Fokalkontakte induzierte Phosphorylierung, werden durch die Anwesenheit von TG2 beeinflusst (Jones et al. 1997, Balklava et al. 2002).

Wundheilungsexperimente belegen, dass TG2 in Folge einer Verletzung, mit hoher Affinität an die extrazelluläre Matrix (ECM) bindet. TG2 interagiert mit Interleukin-2 (IL-2) und beeinflusst die Aktivierung des Wachstumsfaktors TGF- β (Verderio et al. 1999). Dies geschieht möglicherweise durch die Ausbildung von Quervernetzungen zwischen Plasminogen Aktivator Molekülen (Kojima et al.1993), was eine erhöhte

Plasminaktivität zur Folge hat. Daraus resultiert wiederum die Herabsenkung der Expression von Matrix Metalloproteasen (MMPs), sowie eine erhöhte Expression von Matrixmolekülen und TG2 selbst.

2.3 Beteiligung von TGs an Entwicklungsvorgängen

Die Entwicklung von Geweben wird häufig durch Apoptose reguliert. Hierbei ist eine erhöhte TG2 Expression zu beobachten (Fesus et al. 1987, Melino et al 1994). Die Induktion während der Apoptose dient dazu, intrazelluläre Proteine zu verknüpfen (Nemes et al. 1997, Verderio et al. 1998). Dies führt zur Stabilisierung der Zelle vor der Phagozytose, was eine Entzündung des angrenzenden Gewebes, sowie die Produktion von Autoantikörpern verhindern soll (Knight et al. 1991, Aeschlimann und Thomazy, 2000).

2.4 TGs in der extrazellulären Matrix

Eine Vielzahl an *in vitro* TG Substraten befindet sich im extrazellulären Raum. Ob es sich hierbei auch um *in vivo* Substrate handelt, wurde für viele dieser Proteine noch nicht nachgewiesen. Hier sind TGs an der Stabilisierung der ECM und deren korrekter Zusammensetzung beteiligt. Ähnlich wie das Zytoskelett im Inneren der Zelle, erfüllt die ECM eine Stützfunktion in dem die Zelle umgebenden Raum. Die Zelle sezerniert Matrixproteine in den extrazellulären Raum, wo diese sich zu Schichten bzw. Fasern zusammenlagern und eine gelartige Matrix bilden. Diese Matrix ermöglicht die Ansammlung von Zellen zu Geweben. Ein Zellverband, der zum größten Teil aus ECM besteht, ist das tierische Bindegewebe. Es existieren verschiedene Arten von Bindegeweben, deren Zugfestigkeit von der Menge und dem jeweiligen Typ an Kollagen und anderen Matrixkomponenten abhängt (Alberts, 2001). Damit von der Zelle sezernierte Proteine überhaupt in der Lage sind Gewebe zu stabilisieren, müssen diese Proteine quervernetzt werden. Hierbei handelt es sich in der Regel um kovalente Verknüpfungen, die von TGs katalysiert werden können. Ein Beispiel ist die Sekretion von TG2 aus hypertrophen Chondrozyten in den extrazellulären Raum, während der Entwicklung des Knochengewebes. Auch hier trägt TG2 zur Stabilisierung der ECM bei, bevor das Gewebe anschließend kalzifiziert wird (Aeschlimann et al. 1993, Aeschlimann et al. 1995).

3. TGs in der Haut

In der Haut werden sieben der neun bekannten TGs exprimiert. Die Untersuchungen der Haut sind maßgeblich daran beteiligt, dass die Komplexität der TGs erkannt wurde. Durch intensive Studien zur Charakterisierung von FXIII und TG2 fand man nach und nach weitere TGs. Es wurde nachgewiesen, dass TGs an einer Vielzahl von Prozessen in der Epidermis als auch in der Dermis beteiligt sind. Sie übernehmen die Quervernetzung epidermaler Proteine, was essentiell für die Ausbildung spezieller Strukturen der Haut ist.

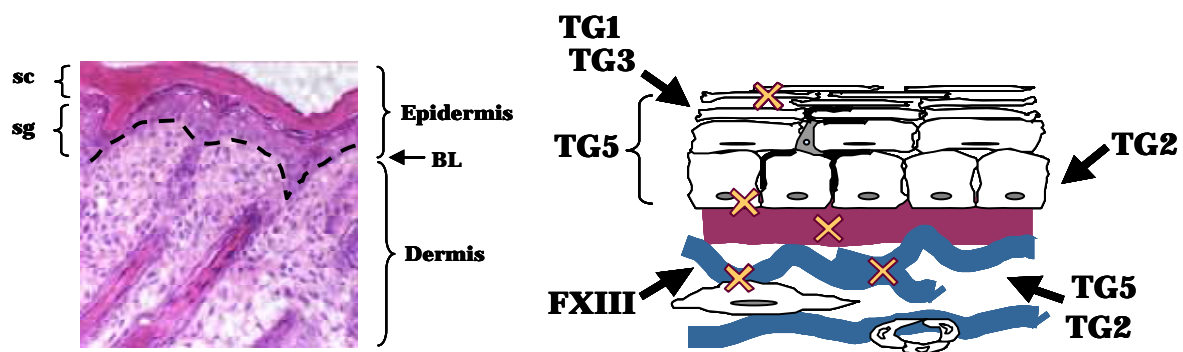


Abb.3 Querschnitt durch die murine Haut (links) und ihre schematische Darstellung (rechts). Die Pfeile markieren die Bereiche, in denen nachweislich TGs exprimiert werden. Die Kreuze markieren die Regionen der Haut, von denen angenommen wird, dass dort die Aktivität von Transglutaminasen eine wichtige Rolle spielt. TG6 und TG7 werden ebenfalls in der Haut exprimiert, wobei ihre genaue Lokalisation noch nicht bekannt ist (BL=Basallamina, sc=*stratum corneum*, sg=*stratum granulosum*).

3.1 Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Epithel, welches eine Barriere zwischen dem Organismus und seiner Umwelt darstellt. Ihre Ausbildung erfolgt durch sich differenzierende Keratinozyten. Die äußerste Schicht der Epidermis ist das *stratum corneum*, welches an seiner Peripherie eine Struktur aus terminal differenzierten Keratinozyten, den sog. Korneozyten besitzt (Eckert et al. 2005). Hierbei handelt es sich um den *cornified envelope* (CE), eine spezielle Hornschicht, die sich aus einer 10 nm dicken Proteinhülle und einer 5 nm dicken Lipidschicht zusammensetzt. Letztere wird durch die kovalente Anheftung von Ceramiden gebildet (Steinert und Marekov 1999, Nemes und Steinert 1999). TGs, vor allem TG1, 3 und 5, sind maßgeblich an der Entstehung des CE beteiligt (Simon und Green 1984, Nemes et al. 1999), da zahlreiche Vorläuferproteine des CE als Substrate für TGs fungieren. Diese Proteine, vorwiegend Lorikrin, Involukrin und SPRs 1, 2 und 3 werden sowohl über

Disulfidbrücken, als auch über Isopeptidbindungen, die von TGs vermittelt werden, verknüpft. Während der terminalen Differenzierung der Keratinozyten, werden diese Proteinaggregate unter der Plasmamembran deponiert (Kalinin et al. 2002). Defekte, sowohl der Lipidhülle als auch der Proteinkomponenten des CE bzw. deren Quervernetzung, führen zu einer Schwächung der Barrierefunktion und zu Erkrankungen, die als Ichtiosen bekannt sind (Ishida-Yamamoto et al. 1998) (siehe Abschnitt 5.1). Zahlreiche CE Proteine werden beim Menschen zu einer Gengruppe, die sich *epidermal differentiation complex* (EDC) nennt, zusammengefasst (Marenholz et al. 1996).

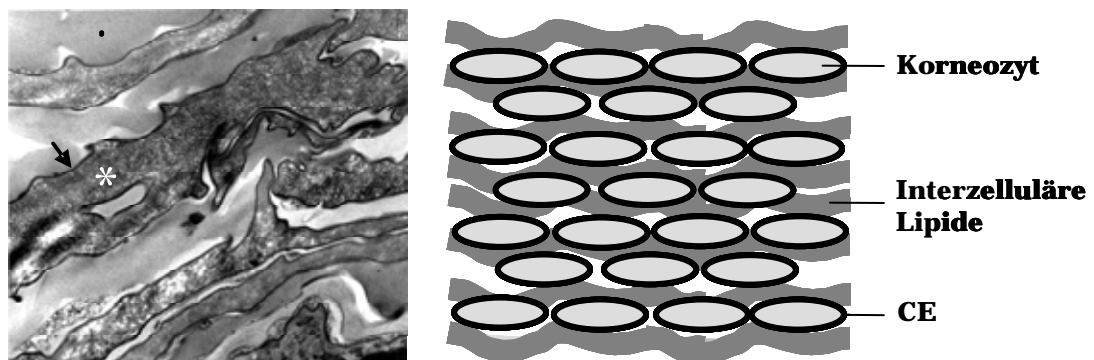


Abb. 3.1 Vereinfachtes Modell des *stratum corneum* (rechts). Die einzelnen Korneozyten sind in interzelluläre lamellare Lipide eingebettet und werden durch den CE, bestehend aus kovalent verknüpften Proteinen und Lipiden, begrenzt. Im TEM sind die jeweiligen Strukturen gekennzeichnet (Korneozyten-weiß, interzelluläre lamellare Lipide-schwarz, CE-Pfeil).

TG5, TG3 und die membrangebundene TG1 werden während des späten Stadiums der Keratinozytendifferenzierung exprimiert. Lorikrin, Involukrin und SPRs werden von allen drei Enzymen als Substrate zur Quervernetzung benutzt (Candi et al. 2002). Dennoch hat TG5 eine weiter verbreitete Expression (Aeschlimann et al. 1998, Candi et al. 2001). TG5 befindet sich zusätzlich in dem weniger differenzierten *stratum granulosum* und in der Dermis. Hier ist eine größere Auswahl an Substraten vorhanden, wie z.B. Keratin 14. Die unterste Schicht der Epidermis ist das *stratum germinativum*, in welchem sich Keratinozytenvorläuferzellen befinden. Hierbei handelt es sich um Stammzellen, die mit einer speziellen Art extrazellulärer Matrix, der Basalmembran, über Hemidesmosomen verbunden sind, und dauerhaft teilungsfähig bleiben. Diese basalen Keratinozyten exprimieren TG2. Sie werden durch Quervernetzung von Intermediärfilamenten und Keratin stabilisiert. Eine weitere TG, die neben TG2, TG3 und TG5 von Keratinozyten exprimiert wird, ist TG7 (Aeschlimann et al. 1998, Grenard et al. 2001). Auch TG6 mRNA konnte aus der

Haut isoliert werden. Ihre genaue Lokalisation ist jedoch bislang unklar (siehe Ergebnisse). Die Sekretion von TG2 trägt vermutlich zur Stabilisierung der Basalmembran bei. TG2 vernetzt die beiden ECM Proteine Laminin und Nidogen, welche wichtige Komponenten dieses speziellen Typs von ECM darstellen (Aeschlimann und Paulsson, 1991).

3.2 Dermis

In der Dermis werden Faktor XIII (FXIIIa), TG2 und TG5 (Aeschlimann et al. 1995, Candi et al. 2002) exprimiert. Alle drei Enzyme kommen in Makrophagen, Nervenzellen und Fibroblasten vor (Thomazy und Fesus, 1989). FXIIIa wird zusätzlich von Blutplättchen exprimiert. Die extrazelluläre Interaktion von FXIII und TG2 mit Kollagen XVI und Kollagen VII konnte *in vivo* nachgewiesen werden. Dies spielt eine Rolle bei der Verankerung von Filamenten (Raghunath et al. 1996), der dermalen Komponente der Hemidesmosomen. Vermutlich trägt dies zu deren besserer Haftung an die Dermis bei.

3.3 TGs in Zusammenhang mit Wundheilung

Als Reaktion auf äußere Verletzungen der Haut wird die TG Aktivität hochreguliert. Innerhalb von zwei Stunden nach einer Verletzung tritt eine erhöhte TG1 Expression auf (Inada et al. 2000). Die TG1 Aktivität nimmt in den die Wunde umgebenden Keratinozyten, welche die Wunde wieder schließen, zu. Bei Hautverpflanzungen von TG1 Nullmäusen ist eine verzögerte Wundheilung zu beobachten (Inada et al. 2000) (siehe Abschnitt 5). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Verlust von TG1 zur Ausbildung eines unreifen CE führt, welcher zum Schutz der Wunde notwendig ist.

Die Expression von TG2 ist, ca. 4-5 Stunden nach einer Verletzung, ebenfalls erhöht. Besondere Relevanz hat TG2 bei der Erneuerung von Gefäßen in der Dermis (Haroon et al. 1999). Die Aktivität von TG2 in Zusammenhang mit der Fibrinaggregation spielt gemeinsam mit TGF β und TNF α eine Rolle bei der Angiogenese.

4. TGs der Haare

Haare sind sog. epidermale Anhänge. Daher finden sich Strukturen der Haut, wie der CE, als auch Proteine, wie TGs und einige ihrer Substrate, in den Haaren wieder (Akiyama et al. 2002). Die einzelnen Stufen der Haarentwicklung, sowie der beteiligten Komponenten, sind außerordentlich komplex. Generell wird das Wachstum der Haare sowie ihre Morphologie vom Haarfollikel aus kontrolliert (Stenn und Paus 1999). Die Morphogenese des Haarfollikels nimmt ihren Ausgangspunkt bei einer Ansammlung von epidermalen Keratinozyten, welche nach und nach die einzelnen Strukturen des Haarfollikels ausbilden (Paus et al. 1999, Abb.4). Im menschlichen Haarfollikel findet die Ausbildung des CE in der Kutikula, der äußeren Wurzelscheide und dem Haarschaft statt (Akiyama et al. 1999). Dieselben TGs, die in der Epidermis die Quervernetzung der CE Proteine katalysieren, nämlich TG1, TG3 und TG5, werden auch in den Haaren exprimiert (Tamada et al. 1995, Candi et al. 2002, Thibaut et al. 2005). Der Haarfollikel durchläuft drei zyklisch wiederkehrende Transformationsphasen. Eine Wachstumsphase (anagen) wird abgelöst von einer Regressionsphase (katagen). Bevor der Follikel in die Wachstumsphase zurückkehrt durchläuft er eine Ruhephase (telogen). In Tabelle 4 sind die TGs aufgeführt, welche in anagenen, menschlichen Haarfollikeln nachgewiesen wurden, wobei die Verteilung im fötalen Haar im Vergleich zum adulten Haar variiert (Thibaut et al. 2005). Das TG3 Expressionsmuster in den Haaren der Maus, unterscheidet sich von dem beim Menschen. Im murinen Haarfollikel wurde die TG3 Expression in der inneren Wurzelscheide (IRS), der äußeren Wurzelscheide (ORS) und der Medulla detektiert (Lee et al. 1993). Zahlreiche Informationen zur Biologie der Haare konnten mit Hilfe von Mausmodellen gesammelt werden (Nakamura et al. 2001). Ein Beispiel hierzu wird in Abschnitt 5 besprochen.

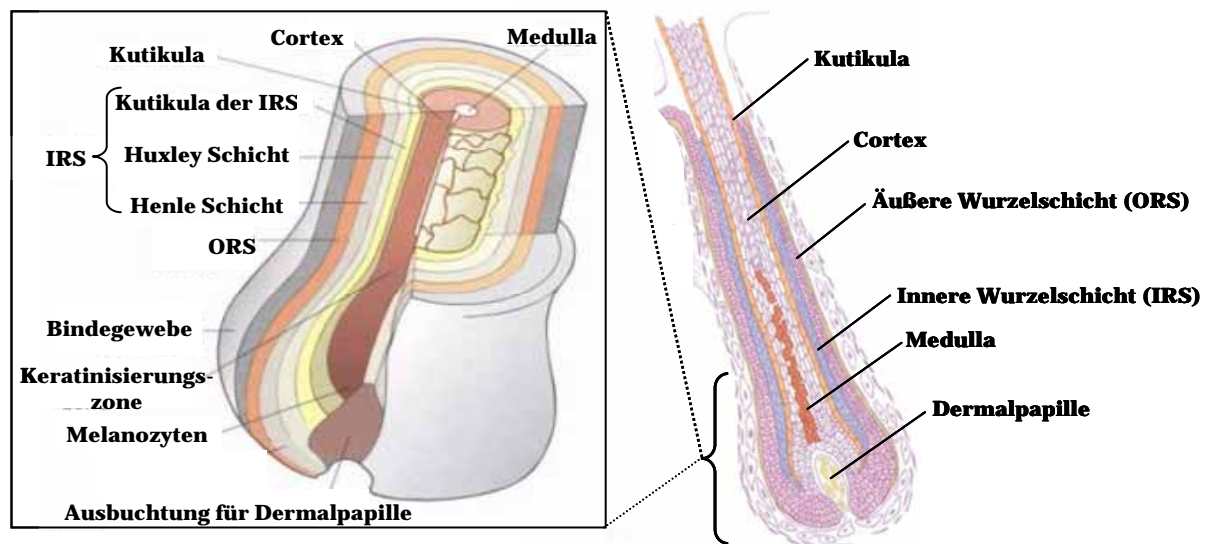


Abb. 4 Schematische Darstellung des Haars Gezeigt sind die verschiedenen Zellschichten des Haares inklusive Haarschaft (rechts). In der Vergrößerung ist ausschließlich der Haarfollikel zu sehen (links) (modifiziert nach Whiting und Howsden).

TG	Lokalisation im Haarfollikel
TG1	Innerste Schicht der ORS (distal), IRS (komplett)
TG3	Haarschaft (Kutikula und Cortex)
TG5	ORS (distal), IRS (komplett)

Tab. 4 Verteilung der TGs im Haarfollikel des Menschen TG3 wird ausschließlich im Schaft exprimiert, wo TG1 nicht nachgewiesen wurde. TG5 wird zwar auch im Schaft detektiert, jedoch deutlich schwächer als TG3. Die Expression von TG3 wurde bei der Maus für die IRS, ORS und die Medulla nachgewiesen (modifiziert nach Thibaut et al. 2005).

4.1 Trichohyalin

Trichohyalin (THH) ist ein Protein, dass vorwiegend in spezialisierten Epithelien exprimiert wird, die besonderer mechanischer Belastung unterliegen, wie z.B. dem Ösophagus, dem Magen und der Zunge. Hier wird THH gemeinsam mit anderen Vorläuferproteinen des CE, wie Involukrin und SPRPs exprimiert (Lee et al. 1993). THH ist ein wichtiges Strukturprotein der Haare und ist in den Zellen der IRS und der ORS des Haarfollikels, sowie der Medulla lokalisiert (Tarcsa et al. 1997). Die Expression von THH im Haar, sowie in Ösophagus und Magen von Nagetieren fällt mit der von TG3 zusammen. THH enthält besonders viele Glutaminreste und ist ein nachgewiesenes Substrat für TG3. Auch TG1 und TG5 werden im Haar exprimiert und verwenden THH als Substrat, allerdings mit einer geringeren Affinität als TG3 (Thibaut et al. 2005). Man nimmt an, dass die Modifikation von THH durch TGs als

eine Art Unterlage zur Anlagerung von Keratin Intermediär Filamenten (KIF) dient (Steinert et al. 2003).

5. TG Beteiligung an pathologischen Prozessen

Genetische Defekte bei Mensch und Maus

Rezessive Mutationen in TG Genen sind der Auslöser für eine Vielzahl von Erkrankungen.

5.1 Lamellare Ictiose (LI)

Diese Erkrankung wird durch einen Defekt des TGM1 Gens (TG1) ausgelöst und ruft Anomalien der Quervernetzung des CE hervor (Huber et al. 1995, Elias et al. 2002). Neugeborene, die an LI leiden, sind von einer durchsichtigen Membran umhüllt, welche die gesamte Körperoberfläche eng umspannt. Nachdem sich diese Membran abgelöst hat, beginnt die Haut hyperkeratinisierte Schuppen zu bilden, die den ganzen Körper bedecken (Russel et al., 1995). Eine beeinträchtigte Wundheilung ist die Folge. Um die Rolle von TG1 in Verbindung mit LI genauer zu untersuchen, wurden Mäuse generiert, deren TGM1 Gen deletiert ist. Sie zeigen ein ähnliches Erscheinungsbild wie Neugeborene beim Menschen. Die *knock out* Mausmodelle für diese Erkrankung sterben bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt an Dehydrierung (Matsuki et al. 1998, Kuramoto et al. 2002). Dies geschieht in Folge einer Störung der Barrierefunktion der Lipidhülle des CE, die dem Wasserverlust entgegenwirken soll. Die Wundheilung dieser Mäuse ist ebenfalls gestört (Inada et al. 2000). Als sekundärer Effekt ist, bei bestimmten Ictioseformen, zusätzlich die TG5 Expression erhöht, was ebenfalls zu dem Phänotyp der Hyperkeratinisierung der Haut beiträgt (Candi et al. 2002).

5.2 Netherton Syndrom

Ein Beispiel für ein Mausmodell, dass ein Krankheitsbild beim Menschen mit einem spezifischen Haarphänotyp widerspiegelt, ist die Deletion des Spink5 Gens in der Maus. Spink5 kodiert beim Menschen den Serinprotease Inhibitor LEKTI. Der Verlust von LEKTI resultiert in der Degradation von Desmoglein1 (Dsg1), einer der Hauptkomponenten der Desmosomen. Mutationen des Spink5 Gens, haben beim Menschen das Netherton Syndrom, eine autosomal-rezessive Hauterkrankung zur Folge (Netherton 1958, Chavanas et al. 2000). Die Symptome des Netherton

Syndroms beinhalten, neben Ictiose-ähnlichen Hauterscheinungen und chronischen Entzündungen der Haut, auch einen Defekt des Haarschaftes (Descargues et al. 2005). Die Spink5 Nullmäuse weisen neben dem auffälligen Hautbefund auch anormal gekrümmte Schurrhaare und ein gewelltes Fell auf. Untersuchungen der Haare zeigten einen Verlust der Zelladhäsion in den Zellen der IRS, sowie zwischen den Zellen der IRS und dem Haarschaft. Der Haarschaft in den Follikeln der Schurrhaare unterliegt einer Schrumpfung und weist eine unregelmäßige Form auf. Die Expression von TG1 und TG3 ist bei diesen Tieren ebenfalls gestört (Descargues et al. 2005).

5.3 Defekte des Faktor XIII

FXIII ist für die Stabilisierung des Fibrinaggregates im letzten Schritt der Blutkoagulation verantwortlich (Lorand 2001). Rezessive Erkrankungen, wie die Hämophilie, die auf Defekte des FXIII zurückzuführen sind, haben eine veränderte Stabilität der vernetzten Fibrinmoleküle, sowie lang anhaltende Blutungen zur Folge (Dicke, 1950). Menschen, bei denen eine Reduktion des Faktor XIIIa vorliegt, zeigen eine unzureichende Wundheilung, wahrscheinlich aufgrund einer fehlerhaften Quervernetzung der ECM. Auch nicht genetisch bedingte Krankheiten, wie chronische Magen-Darm Erkrankungen, bei denen eine verminderte FXIII Expression vorliegt, können eine eingeschränkte Wundheilung nach sich ziehen.

5.4 Deletion des TGM2 Gens

Es wurden zwei Mauslinien generiert, die keine TG2 Aktivität besitzen. Bisher ging man davon aus, dass es innerhalb dieser Enzymfamilie keine Redundanz gibt (Aeschlimann und Thomazy, 2000). Umso überraschender war die Beobachtung, dass diese Mäuse keinen offensichtlichen Phenotyp aufweisen (Nanda et al. 2001, De Laurenzi und Melino 2001). Eine genauere Untersuchung ergab, dass die Insulinsekretion in TG2^{-/-} Mäusen beeinträchtigt ist, und dass sie eine leichte Form von Glukose induziertem Diabetes mellitus aufweisen (Bernassola et al. 2002). Patienten mit Typ II Diabetes weisen ebenfalls eine verringerte TG2 Aktivität auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Patient mit MODY (Mature Onset Diabetes of the Young), einer Form von Typ II Diabetes, eine missense-Mutation im aktiven Zentrum von TG2 besitzt (Bernassola et al. 2002.). Eine gestörte Wundheilung mit veränderter Zellmobilität und Anomalien des Zytoskeletts sind ebenfalls für TG2 Nullmäuse beschrieben worden (Mearns et al. 2002).

5.5 Neurodegenerative Erkrankungen

Es gibt eine Vielzahl von neurodegenerativen Krankheiten, bei denen man die Beteiligung von TGs vermutet (Lesort et al. 2000). Das Krankheitsbild ist durch anormale Anhäufungen von unlöslichen Proteinaggregaten charakterisiert, die einen fortschreitenden Abbau neuronaler Zellen zur Folge haben. In vielen Fällen ist die TG2 Expression in pathogenen Hirnen erhöht. In Alzheimerplaques findet man vermehrt Quervernetzungen bestimmter Proteine wie z.B. TAU, die *in vitro* Substrate für TG2 darstellen. Man hat in Alzheimerpatienten eine verkürzte Spleißvariante von TG2 nachgewiesen, die in gesundem Hirngewebe nicht zu finden ist (Citron et al. 2001).

Bei Korea Huntington und anderen polyglutamin-assoziierten Krankheiten treten vermehrt (CAG)_n Wiederholungen in Exon I des Gens, welches für das Protein Huntingtin kodiert, auf. Die Folge dieser N-terminalen Verlängerung ist eine verlängerte Form des Proteins, welches ein geeignetes Substrat für TG2 *in vitro* darstellt (Karpuj et al. 2002). Seine Relevanz *in vivo* ist jedoch noch unklar (Cooper et al. 2002).

5.6 Gluten-sensitive Erkrankungen (GSD)

Zu den GSD gehören die beiden Autoimmunkrankheiten Zöliakie und Dermatitis *herpetiformis* (DH). Betroffen von beiden Arten sind Menschen, die eine bestimmte Genkonstellation aufweisen (HLA D2/8) (Sollid 2000, Greenberg et al. 1982). Die Erkrankungen beinhalten die Bildung von Antikörpern gegen Mitglieder der TG Familie. Die Immunantwort wird durch die Aufnahme von Gliadin, einem wasserunlöslichen Protein aus Weizen, erzeugt. Diese Autoimmunkrankheiten werden also durch die Aufnahme eines nicht körpereigenen Proteins hervorgerufen.

I. Zöliakie

Die Glutaminreste der Gliadinpolypeptide werden durch TGs zu Glutamatresten desaminiert und mit TG2, welches sich in der Darmschleimhaut befindet, verknüpft. Das Resultat ist ein antigener Gliadin-TG2 Komplex, der eine Immunantwort in speziellen T-Zellen, die eine Gliadin Reaktivität besitzen, hervorruft (Sollid et al. 2002, Fleckenstein et al. 2002). Dieses „neo-Antigen“ wird von den T-Zellen phagozytiert, prozessiert und TG-reaktiven B-Zellen angeboten (Anmerkung: Während der Entwicklung des Immunsystems *in utero* werden nur T-Zellen gegen körpereigene Antigene entfernt). Dies führt zu einer Autoimmunität, die durch ein, mit der Nahrung aufgenommenes Protein hervorgerufen wird. Die Anwesenheit von Immunoglobulin A (IgA) gegen TG2 eignet sich als Marker für Zöliakie. Man nimmt an, dass die Störung der TG2-Fibronektin Interaktion durch Antikörper, der Auslöser für Defekte in der Entwicklung des Darmepithels und die für Zöliakie typischen gastro-intestinalen Symptome ist (Sulkanen et al. 1998).

II. Dermatitis herpetiformis (DH)

Das Krankheitsbild der DH beinhaltet Blasenbildung der Haut, vorwiegend an den Gelenken, sowie IgA Ablagerungen an der dermalen–epidermalen Grenzschicht (Karpati et al. 1988). Patienten, die an dieser Hauterkrankung leiden, besitzen ebenfalls Antikörper gegen TG2. Allerdings zeigen diese Antikörper eine höhere Avidität zu TG3 (Sardy et al. 2002). Die charakteristischen IgA Ablagerungen in der Dermis sind wahrscheinlich Präzipitate eines zirkulierenden TG3-IgA Komplexes. Die beobachteten Ablagerungen treten ebenfalls in der Niere dieser Patienten auf.

5.7 Fibrotische Erkrankungen

TGs sind an einer Vielzahl von fibrotischen Erkrankungen, wie Leberzirrhose (Mirza et al. 1997) oder Arteriosklerose (Valenzuela et al. 1992) beteiligt. Passend zu diesen Befunden beobachtet man bei einer Mauslinie, in der TG2 in den Myozyten des Herzgewebes überexprimiert wurde, interstitiale Fibrose und leichte kardiale Hypertrophie (Small et al. 1999).

6. Epidermale/Haarfollikel TG (TG3)

6.1 Funktion

Generell ist eher wenig über die Rolle von TGs *in vivo* bekannt. Dies gilt auch für TG3. Man weiß, dass TG3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ebenso wie TG1 und TG5, mit Proteinen des CE interagiert und diese als Substrate zur Quervernetzung nutzt (Steinert et al. 2003). Deshalb hatte man bisher eine Rolle für TG3 bei der Erhaltung der Barrierefunktion der Haut angenommen (Kim et al. 2002). Dieses Enzym kann seine bisher bekannten Substratproteine nur oligomerisieren und nicht wie TG1, Polymere von hohem Molekulargewicht bilden (Kuramoto et al. 2001). TG3 ist im Zytosol lokalisiert und wird vorwiegend von differenzierenden Keratinozyten des *stratum granulosum* und des *stratum corneum* (Hitomi et al. 2003) sowie in Haarfollikeln (Martinet et al. 1988) exprimiert. Ihre Expression ist jedoch nicht auf die Haut und deren Anhänge beschränkt. Man hat unter anderem mRNA in Gehirn (Kim et al., 1999), Muskel (Choi et al. 2000), Ösophagus, Magen und Testis (Zhang et al. 2005) nachgewiesen. Ihre Funktion dort ist jedoch nicht geklärt, ebenso wenig wie die von TG1 und TG5. Daher wäre es möglich, dass diese drei Enzyme sich in den Geweben, in denen sie gemeinsam exprimiert werden, gegenseitig komplementieren.

6.2 Struktur

TG3 ist ein Protein von 77 kDa (Kim et al. 1993) und wird durch Proteolyse aktiviert. Es setzt sich, bei nativer Faltung, aus einer 47 und einer 30 kDa großen Polypeptidkette zusammen (Kim et al. 1990, Kim et al. 2001). Die 47 kDa Einheit beinhaltet das katalytische Zentrum. Es enthält das für die katalytische Aktivität essentielle Cystein innerhalb einer stark konservierten Region. Die Sekundärstruktur des Enzyms besteht aus vier Domänen, die alle aktiven TGs besitzen: die N-terminale β -*sandwich* Domäne (D1), gefolgt vom aktiven Zentrum (D2), welches in einer der α -Helices das reaktive Cystein beinhaltet. Es ist mit einem spezifischen Histidin- und einem Aspartatrest, welche in den angrenzenden β -Faltblättern lokalisiert sind, über Wasserstoffbrücken verbunden. Gemeinsam bilden diese Aminosäuren eine katalytische Triade (Aeschlimann und Thomazy 2000). Die beiden anderen Domänen bestehen aus zwei β -*barrel* Strukturen, *barrel 1* (D3) und *barrel 2* (D4) (Ahvazi et al. 2002, Abb. 6.2).

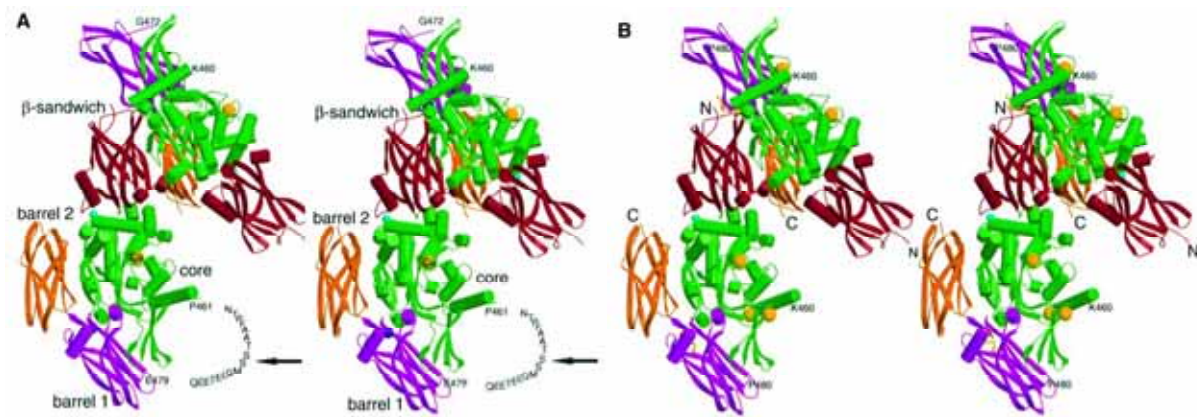


Abb. 6.2 TG3 Struktur Die Dimere der humanen TG3 sind als Zymogen (A) und dessen proteolytisch aktivierte Form, in der Anwesenheit von Ca^{2+} (B) dargestellt. Die Domänen sind das β -sandwich (rot), *barrel 1* und *barrel 2* (magenta und orange) und das katalytische Zentrum (grün). Die Pfeile in (A) markieren die Region der proteolytischen Spaltung (aus Ahvazi et al. 2002).

6.3 Aktivierung

TG3 ist ein Zymogen und wird durch proteolytische Spaltung aktiviert (Kim et al. 1993, Ahvazi et al. 2002). Bislang unbekannte Proteasen aktivieren das Enzym durch limitierte proteolytische Spaltung, während der epidermalen Differenzierung (Hitomi, 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass Calpaine, welche zu den Ca^{2+} -abhängigen Cystein Proteasen gehören, andere TGs *in vivo* aktivieren (Kim und Bae 1998). Die Behandlung von TG3 *in vitro* mit Dispase, Trypsin oder Thrombin resultiert in der aktiven Form des Enzyms. Da hierzu keine reduzierenden Bedingungen notwendig sind, liegt eine nicht-kovalente Bindung der beiden Polypeptidketten im nativen Enzym nahe. Die proteolytische Spaltung erfolgt an Ser 469 (Kim et al. 1990), welches sich in einem für TG3 spezifischen Sequenzmotiv von neun Aminosäuren befindet. Hierbei handelt es sich um ein flexibles Segment zur Separierung der beiden Untereinheiten. Die Anwesenheit von Ca^{2+} Ionen ist unerlässlich für die enzymatische Aktivität. Das Enzym kann drei dieser Metallionen an drei spezifischen Bindungsstellen innerhalb der 47 kDa Einheit binden. Die Bindung aller drei Calciumionen ist für die Aktivierung notwendig. Die dritte Calciumbindungsstelle wird, nach der proteolytischen Spaltung des flexiblen Segments, mit Magnesium besetzt. Nur wenn die intrazelluläre Calciumkonzentration ansteigt, wird Magnesium durch Calcium verdrängt, und TG3 aktiviert, was mit einer Konformationsänderung einhergeht. Daraufhin öffnet sich ein Kanal, der zwei reaktive Aminosäurereste nahe dem aktiven Zentrum freilegt (Ahvazi et al. 2003). Erst dann kann TG3 Quervernetzungen katalysieren (Ahvazi und

Steinert 2003). Dies läßt den Schluß zu, dass durch Calcium, die Substratbindung, und möglicherweise auch die Spezifität verbessert wird (Ahvazi et al. 2002). Zusätzlich wird die Aktivität von TG3 durch Guaninnukleotide reguliert. Das aktive Zentrum und die *barrel* 1 Domäne bilden eine Bindungstasche für GTP bzw. GDP. Die Bindung von GTP geht mit dem Austausch von Calcium zu Magnesium an der dritten Bindungsstelle einher. Die Hydrolyse von GTP überführt das Enzym wieder in seine aktive Form (Ahvazi et al. 2004). Der genaue Mechanismus der GTP Hydrolyse durch TG3 ist noch unklar, aber möglicherweise ähnelt er dem von TG2 (Iismaa et al. 1997, Iismaa et al. 2000).

7. *In vivo* gene targeting

7.1 Übersicht

Um mehr über die Funktion bestimmter Gene bzw. die Funktion der von ihnen kodierten Proteine *in vivo* herauszufinden, kann die Expression dieser Gene manipuliert werden. Sowohl die Überexpression, als auch das völlige Ausschalten eines Gens, kann hierbei hilfreich sein. Um einen kompletten Funktionsverlust hervorzurufen, führt man mit Hilfe der homologen Rekombination genetische Veränderungen an spezifischen Stellen im Genom ein. Hierzu verwendet man murine, embryonale Stammzellen (ES-Zellen). ES-Zellen sind totipotente Zellen aus der inneren Zellmasse von Mausembryonen (Robertson et al. 1986). Die gewünschten Veränderungen können zunächst in ES-Zellen induziert werden, um diese anschließend in drei Tage alte Maus Blastozysten zu injizieren (Gossler et al. 1986). Danach werden die Blastozysten in scheinchwangere Mäuse implantiert. Die chimären Nachkommen werden, zur Weitergabe des mutanten Allels, miteinander gekreuzt. Bei einer Besiedelung der Keimbahn dieser chimären Mäuse, gehen daraus Mauslinien hervor, denen spezifische Gene fehlen (Doetschman et al. 1987, Thomas und Capecchi 1987, Hooper et al. 1987)

7.2 Aufbau eines *targeting* vector

Die homologe Rekombination wird durch zwei ausgewählte Bereiche angetrieben. Diese beiden Abschnitte sind homolog zur genomischen DNA und flankieren den Bereich, der das Zielgen unterbrechen soll. Eine Reihe von Faktoren ist entscheidend für eine erfolgreiche homologe Rekombination (Hasty et al. 1991). Zum einen spielt die Länge der homologen Regionen des Vektors eine Rolle (Deng und Capecchi 1992).

Zum anderen ist es wichtig, dass diese Bereiche frei von häufigen Sequenzwiederholungen sind. Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die DNA des homologen Bereiches isogen ist, d.h. aus demselben Mausstamm isoliert wurde, wie die anschließend zu transfizierenden ES-Zellen. Der *targeting vector* besitzt eine positive Selektionskassette, wobei es sich üblicherweise um das Neomycin-Resistenzgen (*neo^r*) handelt. Die Selektionskassette wird an beiden Seiten von Bereichen flankiert, die homolog zu dem entsprechenden Lokus auf dem zu deletierenden Gen sind. Je größer die homologe Region des Vektors ist, umso wahrscheinlicher ist die Integration durch homologe Rekombination. Geeignet ist ein Abschnitt, der in einem Größenbereich von 5–10 kb liegt, wobei die beiden, den Vektor flankierenden Bereiche ungefähr gleich groß sein sollten. Nur die homologe Region und die Selektionskassette werden inseriert. Es gibt zwei Möglichkeiten, um herauszufinden ob eine homologe Rekombination in ES-Zellen stattgefunden hat. Dieses Ereignis kann über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und durch *Southern blot* Analyse (Southern et al. 1975) detektiert werden.

8.Eigene Vorarbeiten

Zur Inaktivierung des TGM3 Gens, aufgrund einer Verschiebung des Leserasters, war eine genaue Kenntnis der genomischen Organisation des zu deletierenden Bereiches notwendig. Hierzu war das Erstellen einer Restriktionskarte mit den Intron-Exongrenzen des TGM3 Gens erforderlich. Zu diesem Zweck und zur Entwicklung einer geeigneten Klonierungsstrategie, wurden folgende Daten bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit gesammelt.

8.1 Genomische Organisation und Lokalisation des TGM3 Gens

Wie die Gene der meisten anderen TGs (TGM2-TGM7, EPB42) besteht auch das TGM3 Gen aus 13 Exons und 12 Introns. Ausnahmen bilden TGM1 und F13A1, welche 15 Exons und 14 Introns umfassen (Grenard et al. 2001). Das Exon I dieser beiden TGs ist nicht kodierend, und ihr Exon II kodiert ein N-terminales Propeptid, welches die restlichen TGs nicht besitzen. Das TGM3 Gen ist 43 kb groß und kodiert für ein Protein von 692 Aminosäuren bzw. 77 kDa. Die Lokalisation des murinen TGM3 Gens war bereits zu Beginn der Diplomarbeit bekannt. TGM3 befindet sich bei der Maus auf Chromosom 2 in Abschnitt 2F3.

8.2 Festlegung der Intron–Exon Grenzen

Zunächst wurden Annahmen über die Intron–Exongrenzen des murinen TGM3 Gens durch Vergleiche mit der bereits bekannten genomischen Sequenz des humanen TGM3 Gens gemacht. Noch während der Diplomarbeit wurde die murine, genomische Sequenz zugänglich, und die Annahmen konnten verifiziert werden. So wurden die Spleißakzeptor- und donorsequenzen, das Leseraster jedes einzelnen Exons und die genauen Intron–und Exongrößen bestimmt (Tab.8.2).

Exon	Spleiß-akzeptor	Exonsequenz	Spleiß-donor	Introngröße [Bp]	Exongröße [Bp]	Codon-phase
1	-	... atg agtg	gt gagtg	1117	62	
2	ctcac ag	ctttac...ccaca	gt tactca	480	174	1
3	ctgac ag	gtccc...tgcaag	gt taggtc	670	240	1
4	caaac ag	cggat...ggaca	gt aaatg	1300	119	1
5	taaac ag	ttgaa...gccat	gt aagta	2800	132	0
6	tatac ag	attaat...acaca	gt gatata	98	177	0
7	ttt gt ag	tgctgc...cgtgt	gt aagtg	7360	137	1
8	tctgc ag	gaattt...gtcaa	gt aacctc	780	104	2
9	ccatc ag	gtgtgt...gtaca	gt atcca	3160	225	1
10	tgcac ag	gtcca...aagaa	gt aactg	2430	309	1
11	cctcc ag	aaatac...ctgga	gt aagag	3030	168	1
12	cctcc ag	gtgctg...gattg	gt aagtc	430	134	0
13	ctacc ag	tgtgcc...ctctga	gt gaccg	-	310	1

Tab. 8.2 Exon-Intron-Grenzen Neben Spleißakzeptor, Spleißdonor, Codonphasen und Exonsequenzen, sind in der Tabelle auch die Größen der Introns und Exons angegeben. Alle Introngrenzen gehorchen der ag-gt Konsensussequenz (Breathnach und Chambon, 1981) für Spleißakzeptoren - (grün) und donatoren (rot).

9. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Herstellung eines *targeting* Konstruktes vom Typ *replacement vector*, zur Etablierung einer TG3-defizienten Mauslinie und die anschließende Analyse der Tiere. Aus Verpaarungen der Heterozygoten sollten homozygote Mäuse hervorgehen, deren TGM3 Gen komplett inaktiviert wurde. Die folgenden Vergleiche von Wildtyp und Mutante sollten Aufschluß über das genaue Expressionsmuster und die Funktion von TG3 *in vivo* geben. Des Weiteren sollte eine mögliche Kompensation durch andere TGs untersucht werden. Zusätzlich sollte ein weiteres Mitglied der TG Familie, TG6, rekombinant exprimiert und auf Proteinebene analysiert werden. Mit dem rekombinanten Protein sollte ein polyklonaler Antikörper zur genaueren Untersuchung des Expressionsmusters von TG6 hergestellt werden. Bei TG6 handelt es sich um eines der neueren Mitglieder der TG Familie, bei welchem 63% der Aminosäuresequenz mit der von TG3 übereinstimmen. Wie bei den anderen TGs fehlt auch bei TG6 ein N-terminales Signalpeptid. Die in den anderen TGs konservierten Bereiche sind auch in TG6 vorhanden. Das reaktive Cystein liegt auch im katalytischen Zentrum von TG6 vor, was darauf hindeutet, dass es sich bei TG6 um ein aktives Mitglied der TG Familie handelt. Die Charakterisierung des Proteins sollte Hinweise liefern, in wiefern TG6 den anderen TGs, speziell TG3, gleicht, um eventuelle Rückschlüsse auf die Funktion von TG6 treffen zu können. Diese *in vitro* Daten sollten dann in weiterführenden *in vivo* Experimenten, die nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit stattfinden, genauer untersucht werden.

II. Ergebnisse

1. Deletion des TGM3 Gens

Ziel der Herstellung des *targeting vector* war die Generierung einer TG3-defizienten Mauslinie aufgrund einer Verschiebung des Leserasters. Um eine geeignete Klonierungsstrategie entwickeln zu können, wurde eine Restriktionskarte des TGM3 Gens erstellt und die Intron-Exongrenzen bestimmt (siehe Abschnitt 8). Die genaue Kenntnis der Restriktionsstellen im Genom sollte die Auswahl bestimmter Schnittstellen zur Analyse der ES-Zellen mit dem korrekt inserierten Konstrukt, und der späteren Genotypisierung der mutanten Mäuse ermöglichen.

1.1 Klonierungsstrategie

Mit der Information über die genaue Sequenz an Anfang und Ende der Exons, konnte eine Klonierungsstrategie entwickelt werden, die vorsah Exon VI zu unterbrechen. Im günstigsten Fall hätte die Insertion der Selektionskassette in Exon VI einen Abbruch des Proteintranskriptes zur Folge. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Verschiebung des Leserasters, falls Exon V zu Exon VII oder Exon VIII spleißen würde. Ein Spleißen zwischen Exon IV und Exon VII hätte zwar keine Verschiebung des Leserasters zur Folge, aber das resultierende Protein wäre viel kleiner und das katalytische Zentrum würde größtenteils entfernt werden, wodurch die enzymatische Aktivität verloren ginge.

Eine neomycinresistente Selektionskassette wurde mitten in Exon VI integriert. Sowohl das 5' als auch das 3' Fragment des Vektors wurden durch PCR von muriner, genomischer DNA amplifiziert. Für die anschließende Klonierung wurden passende Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welche nicht im homologen Bereich des Vektors enthalten sein sollten, in die PCR Fragmente eingeführt. Diese Schnittstellen wurden in die Oligonukleotide, mit denen die homologen Fragmente amplifiziert wurden, integriert. Sowohl die PCR Produkte, als auch die Selektionskassette wurden über diese Schnittstellen in das Plasmid kloniert (Abb. 1.1).

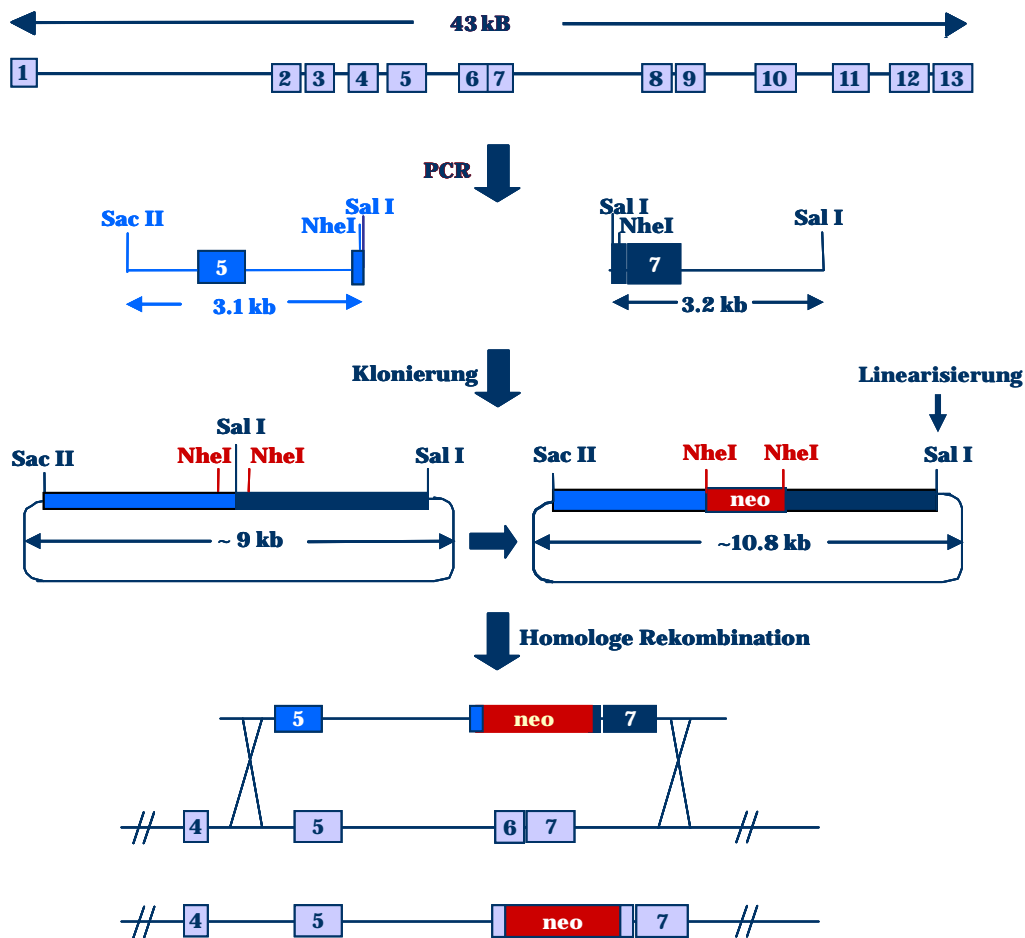


Abb. 1.1 Klonierungsstrategie zur Deletion des TGM3 Gens. Die homologen Bereiche des Vektors wurden via PCR amplifiziert und anschließend kloniert. Durch die entsprechenden Restriktionsstellen wurde danach die Selektionskassette, pgk Neo-pA-129 (Smyth et al.1999) eingeführt, und das Konstrukt linearisiert.

1.2 Sonden

Um mögliche Sequenzierungsfehler, sowie natürlich vorkommende Polymorphismen aufzudecken, wurden die Restriktionsstellen im Bereich von Exon VI durch genomische *Southern blot* Analyse verifiziert. Die dafür generierten Sonden konnten des Weiteren zur Detektion einer korrekten Integration des Konstruktes in ES-Zellen verwendet werden. Die externe 5' Sonde umfaßt 336 bp, während die des 3' Bereiches 303 bp groß ist. Zusätzlich wurde eine interne Sonde von 576 bp hergestellt, die an die Selektionskassette bindet. Sie dient der weiteren Überprüfung der ES-Zellen, bei denen bereits mit den anderen beiden Sonden eine korrekte Integration bestätigt wurde. Damit sollte eine zusätzliche, nicht homologe Integration des Konstruktes, an einer anderen Stelle im Genom ausgeschlossen werden. Die Amplifikation der Sonden erfolgte ebenfalls via PCR von muriner, genomischer DNA mit anschließender Subklonierung in den Vektor pCRII.

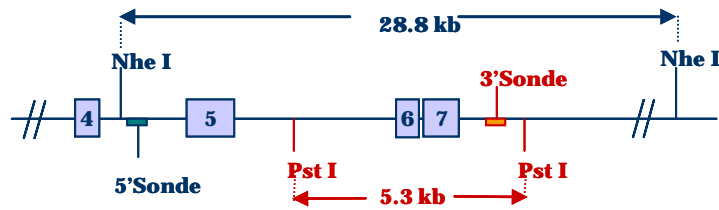


Abb. 1.2 Theoretische Fragmentgrößen des Wildtyps Bei einem Restriktionsverdau von genomischer Wildtyp DNA mit den Enzymen NheI (5' Sonde) bzw. PstI (3' Sonde) wurden folgende Fragmentgrößen für die Hybridisierung mit der jeweiligen Sonde vorhergesagt.

1.3 Hybridisierung

Um die Effizienz der Sonden zu testen und die Restriktionsstellen im Wildtyp zu überprüfen wurde genomische DNA aus ES-Zellen des Mausstammes 129/Ola mit der entsprechenden Auswahl an Enzymen fragmentiert. Anschließend wurde die DNA durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels *Southern blot* auf eine Nylonmembran transferiert. Der Blot wurde mit der jeweiligen externen Sonde, die durch die Hybridisierung zufälliger Oligonukleotide mit $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP radioaktiv markiert wurde, inkubiert. Danach wurden die Fragmentgrößen auf einem Autoradiogramm detektiert und mit den vorhergesagten Größen der Restriktionskarte verglichen (Abb. 1.3).

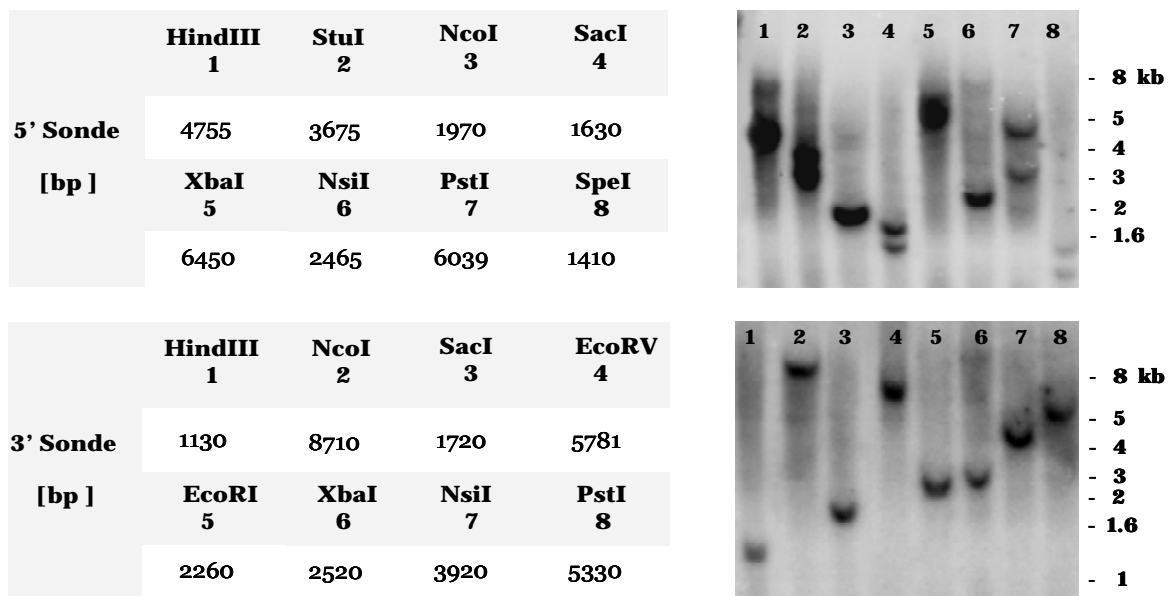


Abb. 1.3 Southern blot Analyse Die Tabellen zeigen die vorhergesagten Bandengrößen des Wildtyps, bei Fragmentierung der DNA mit einer Auswahl an verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Hybridisierung mit der 5' (oben) bzw. 3' Sonde (unten). Auf den Autoradiogrammen ist in den meisten Fällen die theoretische Fragmentgröße bestätigt. Zusätzlich auftretende Banden könnten auf eine weitere Schnittstelle, die nicht in der Datenbanksequenz verzeichnet war, zurückzuführen sein.

1.4 Herstellung des *targeting* Konstruktes

Die homologen Bereiche des Vektors wurden via PCR, von muriner, genomischer DNA des Typs 129/Ola amplifiziert. Über die Oligonukleotide wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die homologen Fragmente integriert. Das 3,1 kb große 5' Fragment wurde mit einer SacII (5') und einer SalI (3') Schnittstelle versehen, während das 3,2 kb große 3' Fragment ausschließlich über eine SalI Schnittstelle an beiden Seiten verfügt. Zusätzlich wurde eine, mit der SalI Sequenz überlappende NheI Schnittstelle, im 3' Bereich des 5' Fragmentes, sowie im 5' Bereich des 3' Fragmentes eingeführt. Die PCR Produkte wurden in den TA Klonierungsvektor pCRII ligiert und anschließend in Bakterien vervielfältigt. Nach Isolierung der DNA aus den Bakterienkulturen wurden die Fragmente mit den Restriktionsenzymen SacII und SalI bzw. nur SalI aus pCRII ausgeschnitten. Nach der anschließenden Gelelektrophorese wurden die homologen Fragmente aus dem Agarosegel eluiert. Es folgte die Subklonierung der einzelnen Fragmente in das Plasmid pBlueskriptKS. Zunächst wurde das Plasmid, ebenso wie das 5' Fragment, sequentiell mit den Restriktionsenzymen SacII und SalI geschnitten. Nach erfolgreicher Klonierung des 5' Fragmentes in pBluescriptKS wurde das Plasmid erneut mit SalI linearisiert, um das 3' Fragment einzuklonieren. Durch Linearisierung des, die beiden Fragmente enthaltenden Plasmids mit NheI, konnte die Selektionskassette pgk Neo-pA-129 (Smyth et al. 1999) eingefügt werden. Das fertige Konstrukt wurde in Bakterien amplifiziert und die DNA mittels Midi Präparation isoliert. Anschließend wurde der Vektor durch Restriktionspaltungen mit verschiedenen Enzymen und durch Sequenzierung, mit den Oligonukleotiden T3, T7, M13 *forward* und M13 *reverse*, welche an pBluescriptKS bzw. pCRII binden überprüft (Abb. 1.4). In Vorbereitung zur anschließenden Transfektion der ES-Zellen wurde der Vektor mit ClaI linearisiert und Phenol/Chloroform gereinigt.

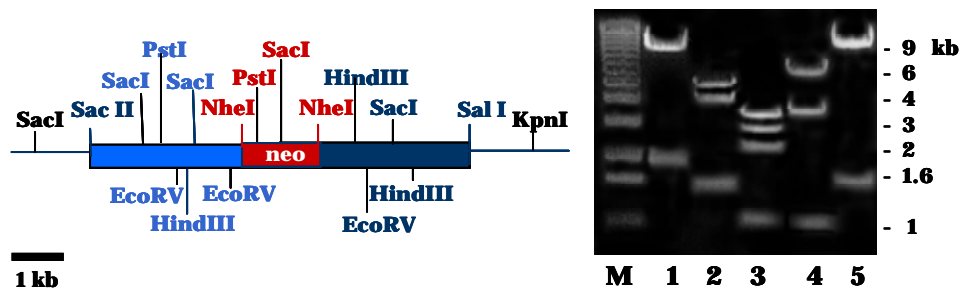


Abb. 1.4 Restriktionsanalyse des fertigen Konstruktes Nach der sequentiellen Klonierung des 5' bzw. 3' Fragmentes des Vektors wurde die Selektionskassette über eine NheI Schnittstelle in das Plasmid eingefügt. Das fertige Konstrukt wurde mehreren Restriktionsspaltungen mit verschiedenen Enzymen unterzogen, um seine korrekte Zusammensetzung zu überprüfen. Zusätzlich wurde der Vektor durch Sequenzierung überprüft. (Restriktionsenzyme: 1- PstI, 2-HindIII, 3-SacI, 4- EcoRV, 5- NheI)

1.5 Transfektion und Analyse von ES-Zellen

Die Transfektion der ES-Zellen vom Typ IB10 (Mausstamm 129/Ola), welche aus der Zelllinie E14 subkloniert wurden (Hooper 1987), erfolgte mit 40 µg des linearisierten Vektors via Elektroporation. Die transfizierten Zellen wurden durch G418 selektioniert und anschließend isoliert. Die resistenten Zellklone wurden expandiert, um ihre DNA zu isolieren und sie mit Hilfe der *Southern blot* Analyse auf homologe Rekombination testen zu können. Der größte Teil dieser Zellen wurde bis zum Ergebnis dieser Analyse bei -80°C eingefroren. Von ca. 800 Zellklonen zeigten drei (Klon 30, 73 und 183) bei der ersten Hybridisierung mit der 5' Sonde eine zusätzliche Restriktionsbande von 3,4 kb, wie sie im Fall einer homologen Rekombination in einem der beiden Allele, zu erwarten wäre. Bei einer erneuten Überprüfung der DNA dieser ES-Zellen mit beiden externen Sonden und der internen Sonde, erwies sich nur Klon 30 als korrekt (Abb.1.5). Die Hybridisierung von Klon 183 mit der internen Sonde zeigte eine weitere Bande, die auf eine zusätzliche, nicht homologe Integration des Konstruktes an einer anderen Stelle im Genom hinweist. Bei Klon 73 ist ebenfalls ein Signal mit der internen Sonde nachweisbar. Allerdings weist die Restriktionsbande nicht die zu erwartende Größe auf, was auf eine ausschließlich zufällige Integration schließen lässt. Daher ist bei der Hybridisierung mit den beiden externen Sonden keine Bande für das mutante Allel zu sehen. (Abb. 1.5).

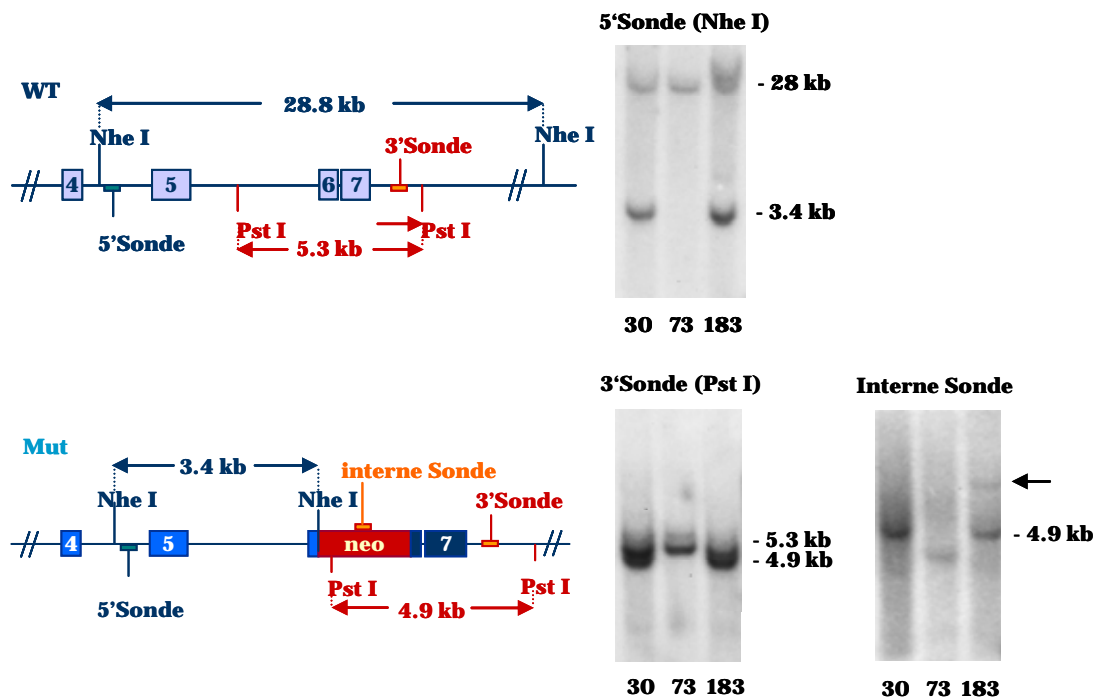


Abb. 1.5 Analyse der ES-Zellklone. Die Darstellung zeigt die zu erwartenden Bandengrößen von 28 kb für das wildtypische Allel bzw. 3,4 kb für das mutante Allel, nach Fragmentierung der ES-Zell DNA mit NheI und Hybridisierung mit der 5' Sonde. Bei einer Fragmentierung mit PstI für die Hybridisierung mit der 3' Sonde sind eine Wildtyp Bande von 5,3 kb und eine weitere bei 4,9 kb zu erwarten. Die interne Sonde weist die Integration der Selektionskassette nach, die bei korrekter Integration eine Bande von 4,9 kb hervorruft. Auf den Autoradiogrammen ist erkennbar, dass ausschließlich Klon 30 die korrekten Fragmentgrößen, bei der Hybridisierung mit allen drei Sonden, aufweist. Der Pfeil markiert die zusätzliche Bande von Klon 183 bei der Hybridisierung mit der internen Sonde. Bei Klon 73 hat ausschließlich eine nicht homologe Integration stattgefunden.

1.6 Generierung chimärer Mäuse

Zur Generierung der Chimären wurden Zellen des heterozygoten ES-Zellklons 30 in Blastozysten von Mäusen des Stammes C57Bl/6, welche ein schwarzes Fell besitzen, durch Mikroinjektion, eingebracht. Bei den verwendeten Foster-Tieren, in welche die Blastozysten implantiert wurden, handelte es sich um Weibchen aus einer Kreuzung der Mausstämmen BALB/c und C57Bl/6. Die Chimären konnten aufgrund ihrer Fellfarbe identifiziert werden, da es sich hier um eine Mischung aus dem schwarzen Fell der C57Bl/6 Blastozystenspender und den 129/Ola ES-Zellen handelt. Letztere tragen homozygot den Agouti-Pigmentloкус (A/A), der eine braune Fellfarbe zur Folge hat. Sowohl die Mikroinjektion als auch der Blastozystentransfer wurden im Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) durchgeführt.

1.7 Etablierung einer TG3-defizienten Mauslinie

Es gelang nur bei einer weiblichen Chimäre die Keimbahngängigkeit durch Verpaarung mit C57Bl/6 Männchen zu überprüfen und zu verifizieren. Die mit Hilfe von Schwanzspitzen-Biopsien als heterozygot identifizierten Nachkommen der F1 Generation wurden zur Zucht einer TG3-defizienten Mauslinie miteinander verpaart. Durch die Rückkreuzung von heterozygoten Tieren mit C57Bl/6 Mäusen, sollte ein reiner genetischer Hintergrund erzielt werden. Um später Experimente zur Wundheilung oder Verhaltensstudien der Mutanten durchführen zu können, sollten die Tiere ungefähr sechs Mal rückgekreuzt worden sein. Dadurch soll ausgeschlossen werden, dass auftretende Veränderungen möglicherweise auf den gemischten genetischen Hintergrund (129/Ola/C57Bl/6) zurückzuführen sind. Im Verlauf dieser Arbeit konnten heterozygote TG3 Mäuse vier Mal mit C57Bl/6 Tieren rückgekreuzt werden.

2. Analyse der TG3-defizienten Mäuse

2.1 Genotypisierung

Um den Genotyp der TG3 Mäuse bestimmen zu können, wurden Biopsien von den Schwänzen der Mäuse verwendet. Die DNA wurde, nach ihrer Isolation aus den Schwanzspitzen, gereinigt und mit NheI (5' Sonde) bzw. PstI (3' Sonde) fragmentiert. Anschließend wurde durch *Southern blot* Analyse mit den externen Sonden der Genotyp bestimmt. Die homozygoten Tiere weisen eine Restriktionsbande bei 3,4 kb bzw. 4,9 kb auf, während die Heterozygoten noch zusätzlich eine Bande für das Wildtyp-Allel bei 28 kb bzw. 5,3 kb besitzen. Im Wildtyp ist ausschließlich diese Bande zu sehen (Abb. 2.1). Zusätzlich zur Analyse durch *Southern blot* wurde eine PCR zur Genotypisierung etabliert. Hierbei wurden drei Oligonukleotide gleichzeitig verwendet, um zwischen den drei verschiedenen Genotypen unterscheiden zu können. Das verwendete 5' Oligonukleotid, welches in Intron V bindet und das 3' Oligonukleotid, das mit Exon VII der genomischen DNA hybridisiert, amplifizieren ein 648 bp großes Fragment im Wildtyp. Das dritte Oligonukleotid kann nur mit der Selektionskassette hybridisieren, was bei homozygoten Mutanten, gemeinsam mit dem 5' Oligonukleotid in einem 929 bp großen Produkt resultiert. Heterozygote weisen, wie bei der *Southern blot* Analyse sowohl das Wildtyp als auch das mutante Fragment auf (Abb. 2.2).

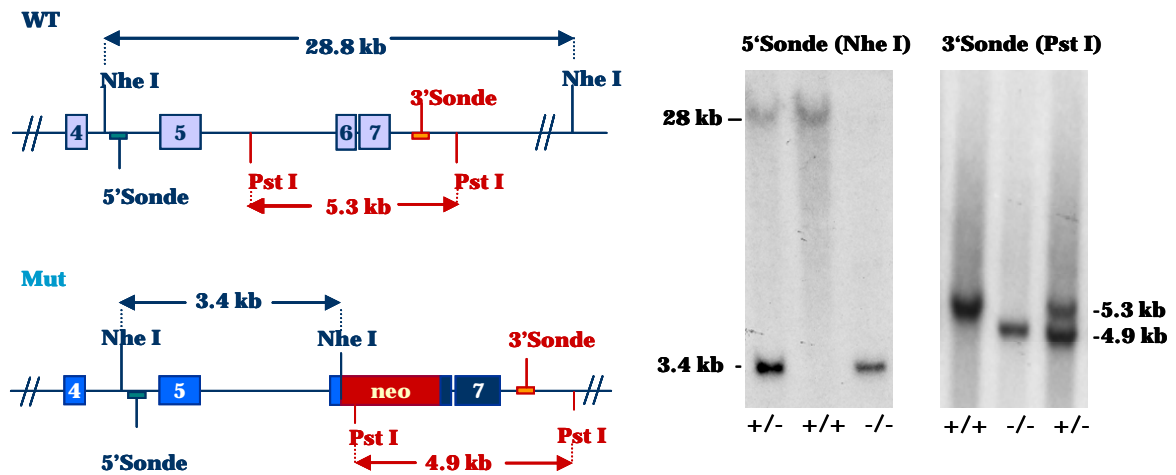


Abb. 2.1 Southern blot zur Genotypisierung. Die vorhergesagten Fragmentgrößen für Wildtyp (oben) und Mutante (unten) sind in der Abbildung dargestellt. Auf den Autoradiogrammen sind die zu erwartenden Banden für die drei möglichen Genotypen, bei einer Hybridisierung mit den beiden externen Sonden, gezeigt.

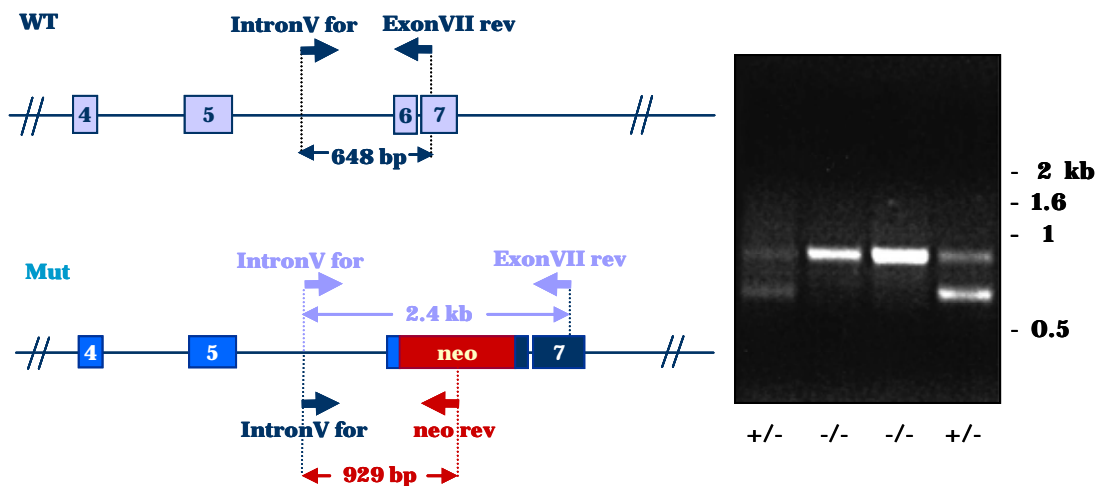


Abb. 2.2 PCR zur Genotypisierung. Bei der PCR mit drei verschiedenen Oligonukleotiden wird im Fall des Wildtyps ein 648 bp großes Produkt gebildet. Bei Hetero- und Homozygoten kann das *neo rev* Nukleotid an die Selektionskassette binden und es entsteht zusätzlich bzw. ausschließlich ein 929 bp großes Fragment. Das theoretisch mögliche 2,4 kb große Produkt in Hetero- und Homozygoten kann nicht nachgewiesen werden, da durch die Wahl der Parameter, die Amplifikation der kleineren Produkte begünstigt wird.

2.2 Phänotyp

Die TG3^{-/-} Mäuse konnten bereits wenige Tage nach ihrer Geburt (ca. P2), anhand der Morphologie ihrer Tasthaare identifiziert werden. Im Gegensatz zum Wildtyp besitzen diese Tiere auffällig gekrümmte Schnurrhaare. Mit Beginn des Fellwachstums (ca. P4) wird der Haarphänotyp noch deutlicher. Das Fell der TG3 Nullmäuse ist gewellt, was in den ersten zwei Wochen besonders ausgeprägt ist, aber mit zunehmendem Alter nachlässt. Tiere, die bereits einige Monate alt sind, können teilweise nicht mehr eindeutig von ihren wildtypischen bzw. heterozygoten Geschwistern unterschieden werden. Im Gegensatz dazu bleibt die Schnurrhaaranomalie weiter bestehen. Des Weiteren weisen die Mutanten eine etwas geringere Körpergröße auf. Trotz der offensichtlichen Unterschiede sind TG3^{-/-} Mäuse lebensfähig, fertil und im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern konnten bisher keine nennenswerten Unterschiede in ihrer Mobilität und ihrem Verhalten festgestellt werden. Die Tiere werden, den Mendelschen Regeln folgend, im Verhältnis 1:2:1 (wildtyp:heterozygot:homozygot) geboren und haben eine dem Wildtyp entsprechende Lebenserwartung von ca. 1,5 Jahren.

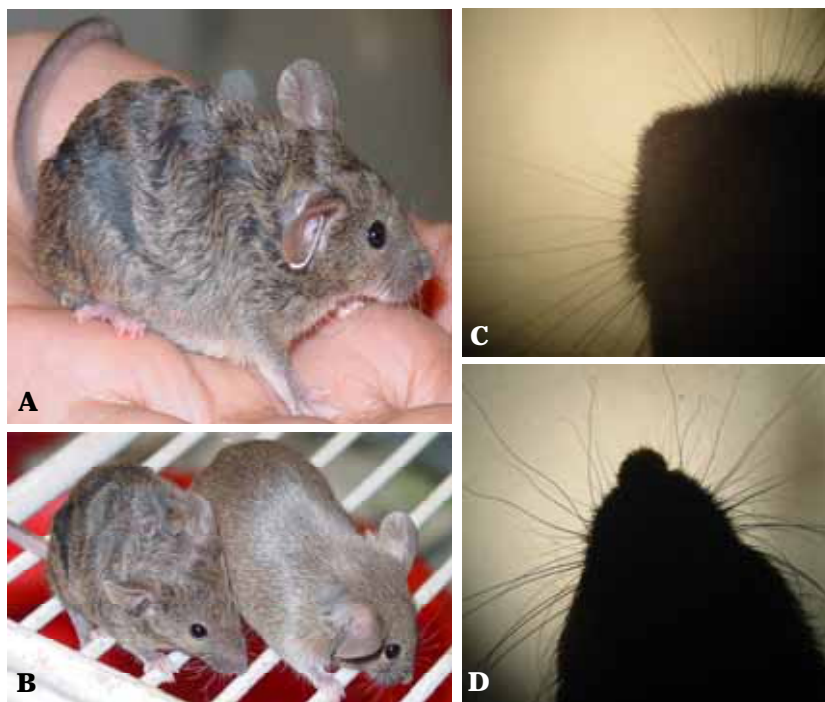


Abb. 2.3 Phänotyp der TG3 Nullmäuse. Die TG3-defizienten Tiere besitzen ein gewelltes Fell (A) während das ihrer wildtypischen Geschwister völlig glatt ist (B). Der gleiche Effekt ist bei den Schnurrhaaren von Mutanten (D) im Vergleich zum Wildtyp bzw. Heterozygoten (C) zu beobachten. Die Schnurrhaare der Homozygoten sind gekrümmt und in sich verdreht (D).

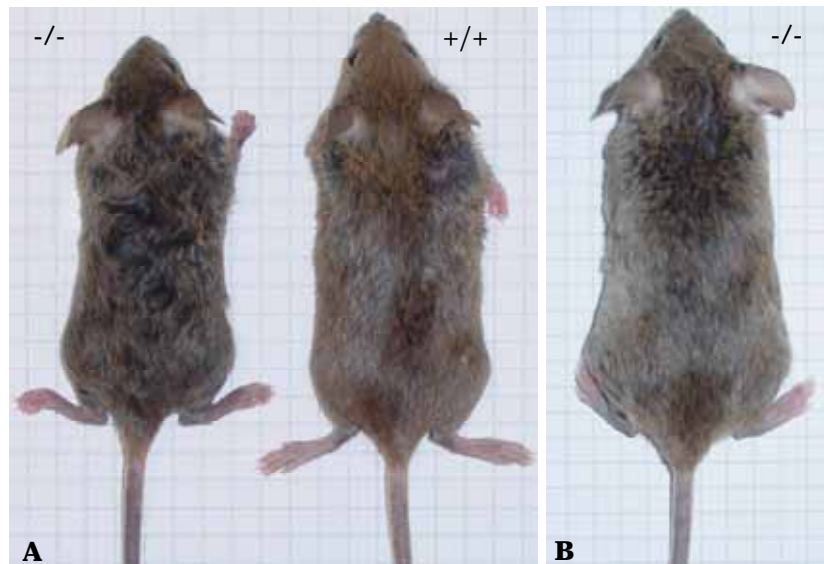


Abb. 2.4 Vergleich junger und älterer TG3^{-/-} Mäuse. In A sind vier Wochen alte Geschwistertiere zu sehen, wobei sich Mutante (links) und Wildtyp (rechts) deutlich in ihrer Größe und ihrem Fell unterscheiden. Die neun Wochen alte Mutante kann aufgrund ihres Fells nicht mehr vom Wildtyp unterschieden werden (B).

2.3 Verifizierung des vollständigen Verlustes von TG3

Die ersten Untersuchungen sollten nachweisen, dass bei den generierten Mäusen eine vollständige Inaktivierung des TGM3 Gens vorliegt. Zu diesem Zweck wurde Protein aus verschiedenen Geweben von wildtypischen und mutanten Tieren des gleichen Wurfes extrahiert. Die Proteinlysate wurden in einer 8%igen SDS PAGE aufgetrennt und anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen TG3 (zur Verfügung gestellt von Prof. Hitomi, Japan) durch *Western blot* Analyse miteinander verglichen. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass in den Mutanten kein Signal für TG3 detektierbar ist (Abb. 2.5). Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch Gefrierschnitte von Geweben des Wildtyps und Homozygoten, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen TG3 inkubiert wurden, bestätigt (Abb. 2.6).

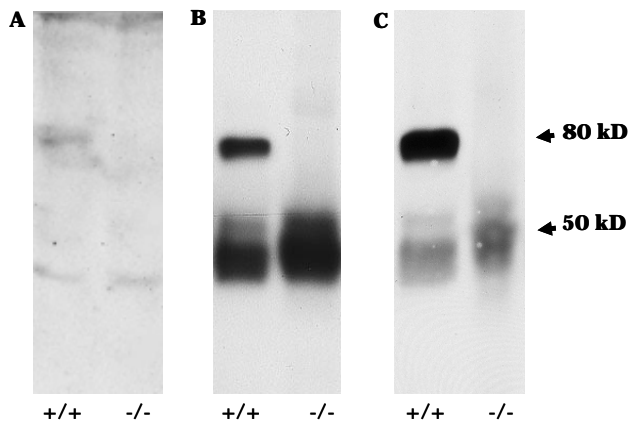


Abb. 2.5 Western blot Analyse

Proteinextrakte aus Haut (A), Zunge (B) und Ösophagus (C) von wildtypischen Tieren und TG3 Nullmäusen. Die im Wildtyp vorhandene TG3 Bande von 77 kD fehlt in Mutanten. Die zusätzliche Bande von 50 kD, welche in beiden Extrakten zu sehen ist, ist auf die Bindung des monoklonalen TG3 Antikörpers an endogenes Maus-IgG zurückzuführen.

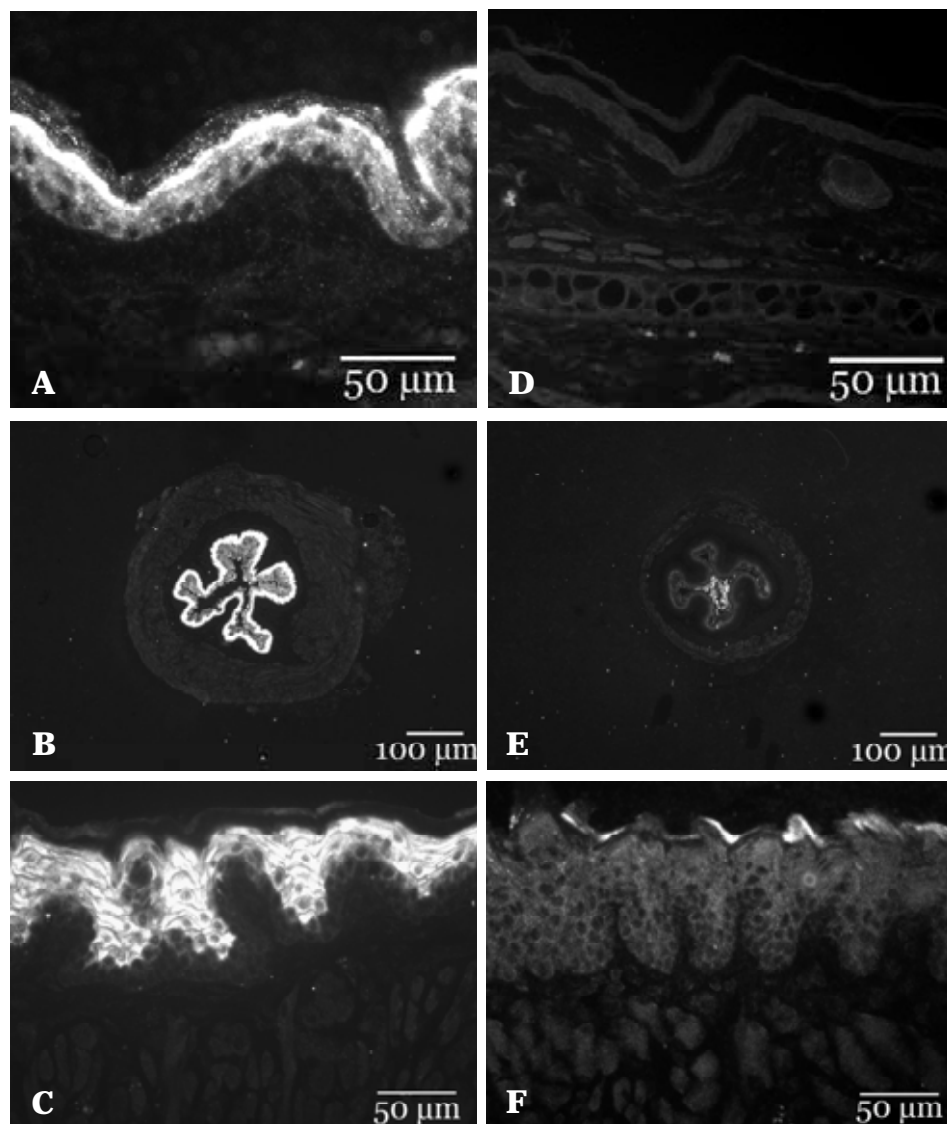


Abb. 2.6 Immunofluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten. Die fixierten Gefrierschnitte von Haut (A, D), Ösophagus (B, E) und Zunge (C, F) wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen TG3 inkubiert. Im Wildtyp (A-C) ist ein deutliches Signal in den keratinisierten Schichten der verschiedenen Epithelien zu sehen, welches in TG3^{-/-} Mäusen fehlt (D-F). Das Signal im Inneren des Ösophagus (E) ist auf Futterreste zurückzuführen.

2.4 Histologie und Morphologie keratinisierter Epithelien

Da es sich bei TG3 um die TG handelt, von der man annimmt, dass sie für 75% der TG Aktivität in der Epidermis verantwortlich ist (Kim et al. 1995), wurden zunächst intensive Untersuchungen der Haut durchgeführt. Es ist bekannt, dass TG3 neben der Haut, in weiteren keratinisierten Epithelien exprimiert wird, die unter anderem in Organen wie Zunge, Ösophagus und bei der Maus auch im Magen zu finden sind. Deshalb sollte untersucht werden, ob diese Organe bei den TG3-defizienten Tieren eine Veränderung aufweisen. Es wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) sowohl von Gefrier- als auch Paraffinschnitten gemacht und lichtmikroskopisch analysiert (Abb. 2.7 und 2.8). Neben der allgemeinen Morphologie wurde hierbei auf Veränderungen wie chronische Entzündungen geachtet. Außer im Fall des Ösophagus konnte bei keinem der analysierten Organe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Ösophagus der von uns untersuchten Mutanten, hatte einen deutlich kleineren Durchmesser als der des Wildtyps. Die einzelnen Epithelschichten des Ösophagus erschienen, bei gleicher Vergrößerung im Lichtmikroskop, in Homozygoten dünner als im Wildtyp (Abb. 2.8, B, F). Sowohl mit Hilfe der HE Färbung, als auch nach Färbung mit einem Entzündungsmarker (F480) konnten keine Hinweise auf eine Entzündung, wie z.B. eine Ansammlung von Neutrophilen gefunden werden.

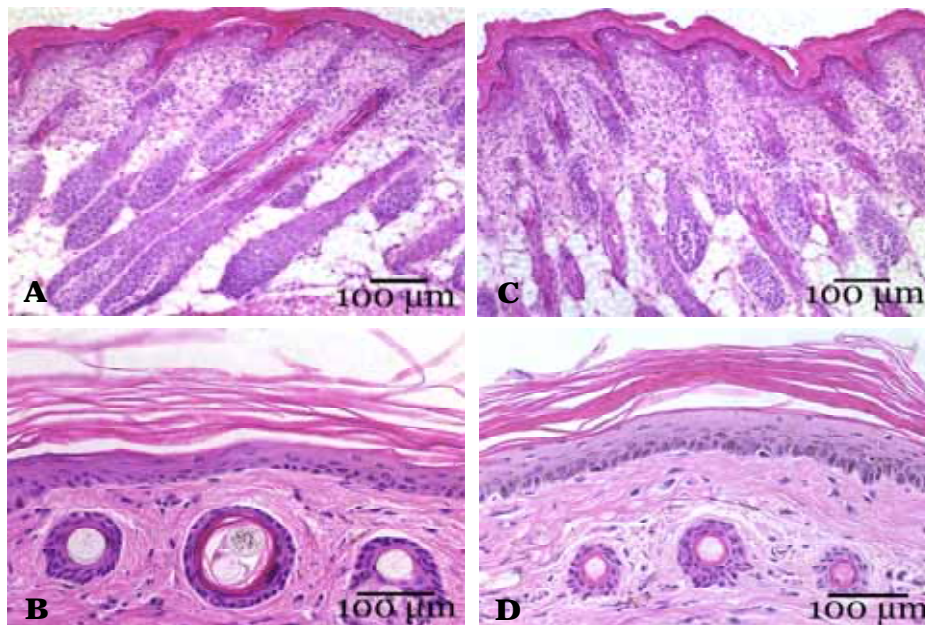


Abb. 2.7 HE Färbung der Haut Gezeigt sind Schnitte der Rückenhaut drei Tage alter Mäuse (A, C), sowie Haut vom Schwanz der Tiere (B, D). Sowohl die einzelnen Schichten der Epidermis (*stratum corneum*, *stratum granulosum*), als auch die Dermis und die in A und C sichtbaren Haarfollikel, unterscheiden sich im Wildtyp (A, B) nicht in ihrer Morphologie von den Homozygoten (C, D).

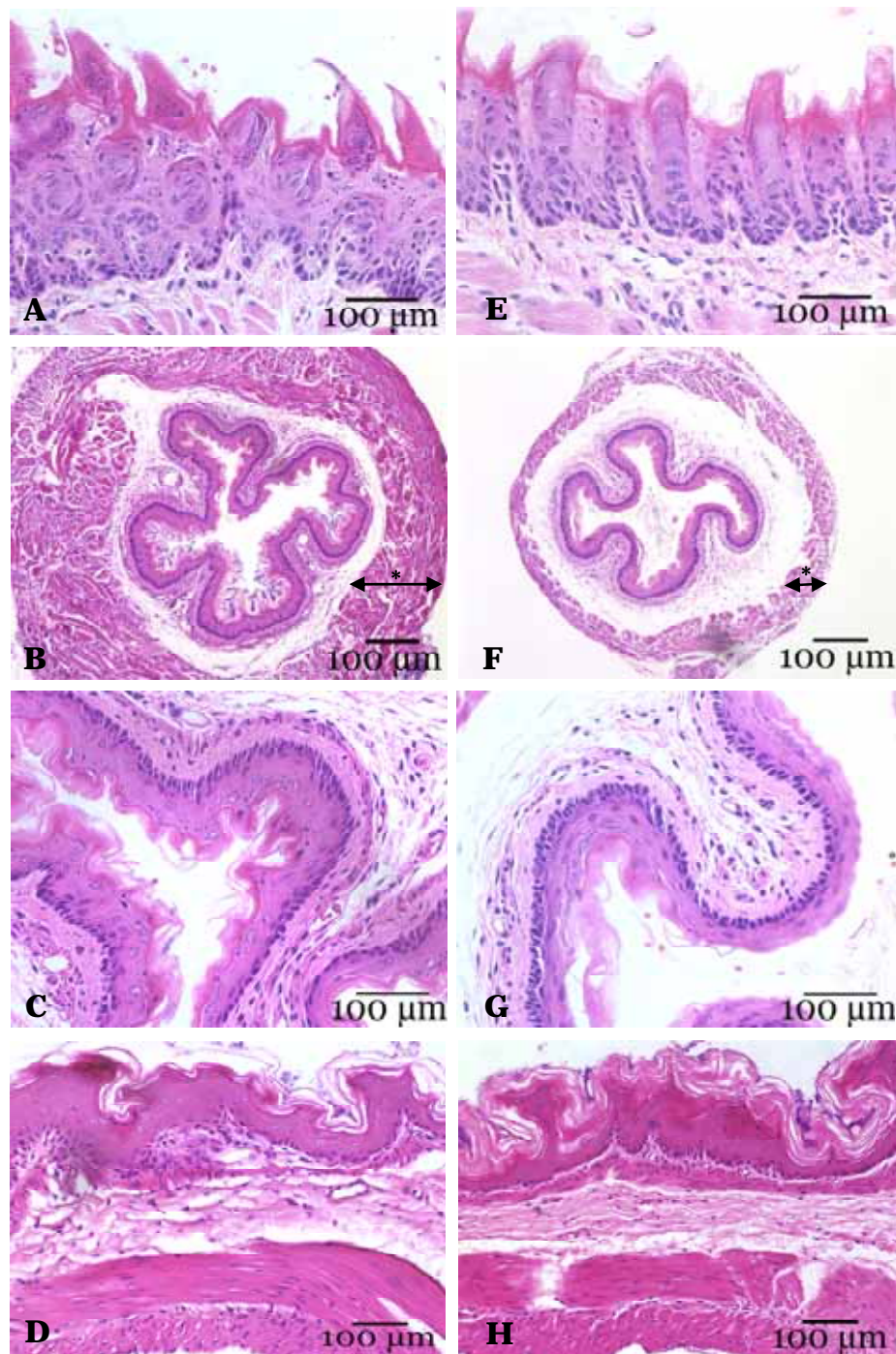


Abb. 2.8 HE Färbung keratinisierter Epithelien. Sowohl Zunge (A, E) als auch Magen (D, H) der TG3^{-/-} Mäuse (E-H) weisen keine Besonderheiten im Lichtmikroskop auf. Im Fall des Ösophagus (B, C, F, G) konnte bei gleicher Vergrößerung ein Unterschied im Durchmesser (B, F), sowie in den einzelnen Epithelschichten (*muscularis mucosae*, *submucosa*, *lamina propria* [Markierung B, C]) beim Wildtyp im Vergleich zur Mutante festgestellt werden.

2.5 Die Ultrastruktur der Haut TG3-defizienter Tiere

Da sich mit Hilfe der Gefrier- und Paraffinschnitte, sowie den entsprechenden Färbungen im Lichtmikroskop keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante nachweisen ließen, wurde Haut von Homozygoten und Wildtyp für das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) präpariert und untersucht. Hier ließen sich bei genauerer Betrachtung der einzelnen Schichten der Epidermis, speziell der Hornschicht, keine signifikanten Unterschiede feststellen. Auch in den tiefer gelegenen Schichten, wie dem *stratum granulosum* und der Dermis waren keine Veränderungen sichtbar.

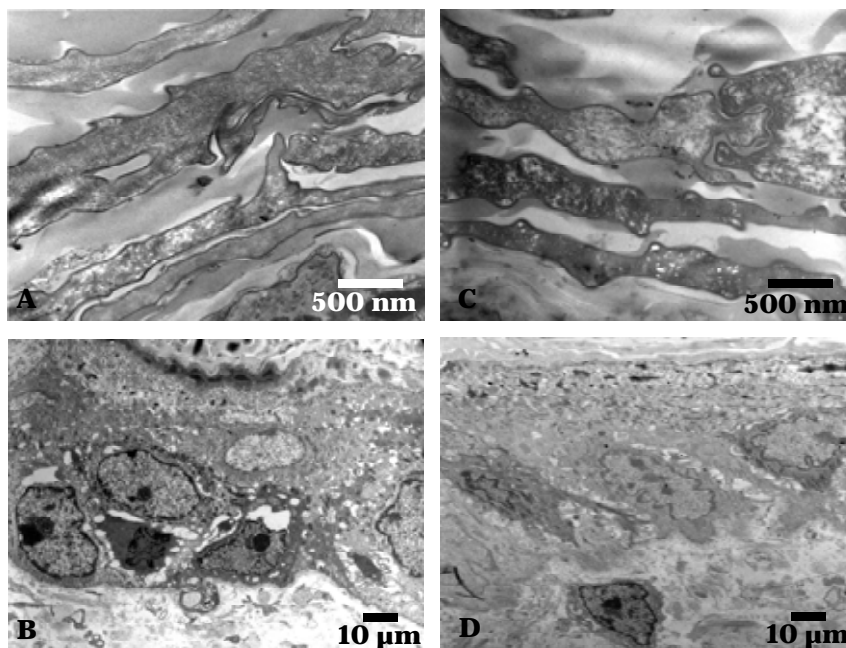


Abb. 2.9 TEM Bilder der obersten Hautschichten Der CE weist beim Vergleich von Wildtyp (A) und Mutante (C) keine Besonderheiten auf. Man erkennt bei beiden Genotypen mehrere Lagen der Hornschicht, die sich in ihrer Struktur nicht von einander unterscheiden. Auch in den tiefer gelegenen Schichten, wie dem *stratum granulosum* oder der Dermis sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp (B) und Mutante (D) sichtbar.

2.6 Expression anderer TG Isoformen

Sowohl die Tatsache, dass sich bisher keine ernsthaften Veränderungen der Haut oder anderer Organe nachweisen ließen, als auch das neben TG3 noch andere TG Isoformen in der Haut exprimiert werden, machten eine Untersuchung der Expression anderer TGs in den TG3^{-/-} Mäusen notwendig. Die Isoformen TG1 und TG2 wurden auf eine mögliche Änderung ihrer Expression in den Mutanten untersucht. Gefrierschnitte der Haut beider Genotypen wurden mit monoklonalen

Antikörpern gegen TG1 bzw. TG2 inkubiert. In beiden Fällen war die TG Expression der mutanten Haut vergleichbar mit der im Wildtyp. Es wurde weder eine verstärkte Signalintensität, noch eine veränderte Lokalisation des Signals für die jeweilige Isoform nachgewiesen. Vorläufige Untersuchungen mit einem polyklonalen Antikörper gegen TG6 zeigten ein ähnliches Ergebnis. Leider war es nicht möglich Vergleiche für die TG5 Expression anzustellen, da mit dem in unserem Labor vorhandenen TG5 Antikörper keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Ein ähnliches Problem ergab sich bei der *Western blot* Analyse von Proteinextrakten mit den, bei der Immunfluoreszenzfärbung erfolgreich verwendeten TG1 und TG2 Antikörpern.

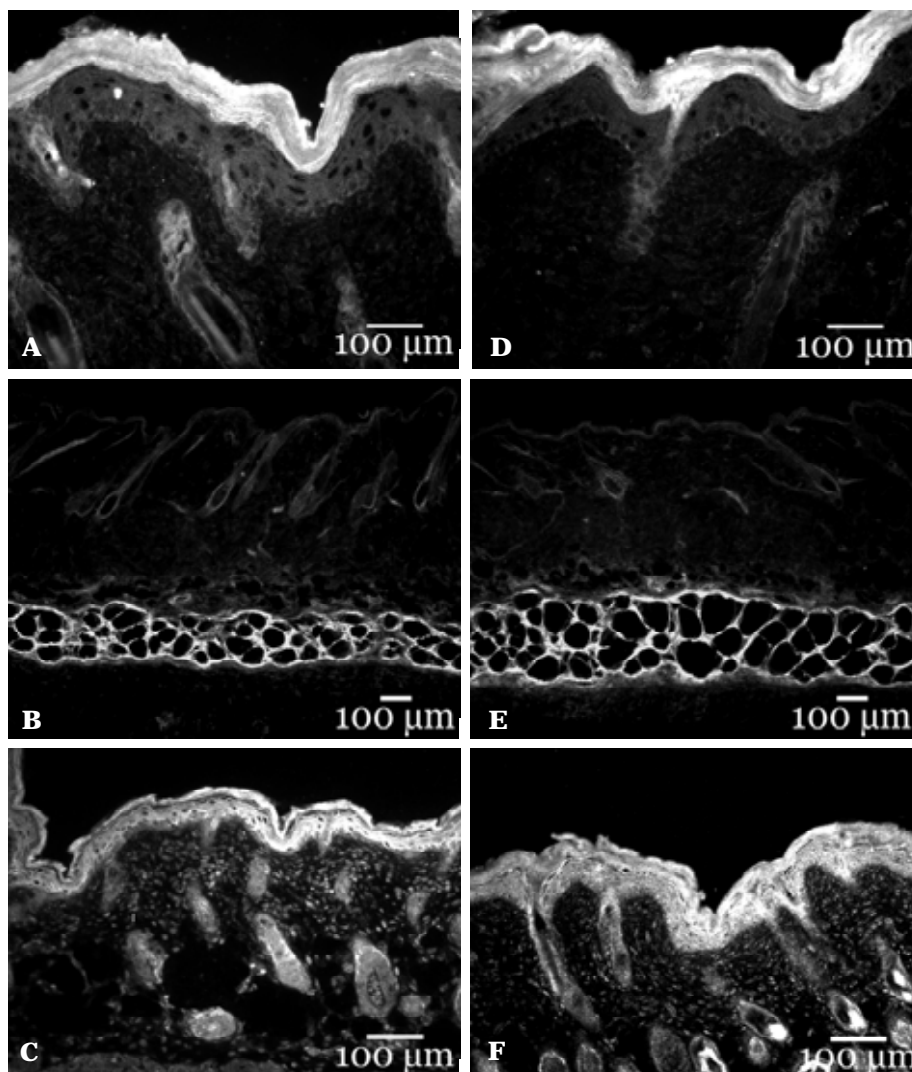


Abb. 2.10 Vergleich verschiedener TG Isoformen Monoklonale Antikörper gegen TG1 und TG2, sowie ein polyklonaler Antikörper gegen TG6 wurden auf Gefrierschnitten der Haut von Wildtyp (A-C) und Mutante (D-F) auf eine mögliche Änderung ihres Expressionsmusters in TG3-defizienten Tieren untersucht. Weder eine verstärkte Signalintensität, noch eine veränderte Lokalisation des Signals für die jeweilige Isoform wurden festgestellt.

2.7 Die Barrierefunktion mutanter Haut

Durch den Verlust von TG3 wären nicht nur morphologische Veränderungen der Epidermis denkbar, sondern auch funktionelle Störungen. Die Struktur des CE ist essentiell für die Barrierefunktion der Haut. Geringfügige Veränderungen könnten die Penetration von Substanzen, die normalerweise die Epidermis nicht passieren können, zur Folge haben. Zur Untersuchung der Barrierefunktion der TG3-defizienten Tiere wurden zwei verschiedene Farbausschlußtests durchgeführt.

I. Luzifer Gelb Penetration

Luzifer Gelb ist ein fluoreszierender, biologischer Farbstoff. Neugeborene Mäuse wurden über einen bestimmten Zeitraum in einer Luzifer Gelb Lösung fixiert. Anschließend wurden die Tiere getötet, um Gefrierschnitte der Rückenhaut anzufertigen. Im Fluoreszenzmikroskop war ein Signal in den äußersten Epidermisschichten bei beiden Genotypen sichtbar. Wie im Wildtyp, ist auch bei Mutanten kein Anzeichen für eine Diffusion des Farbstoffes durch die Epidermis in die basalen Schichten der Haut erkennbar.

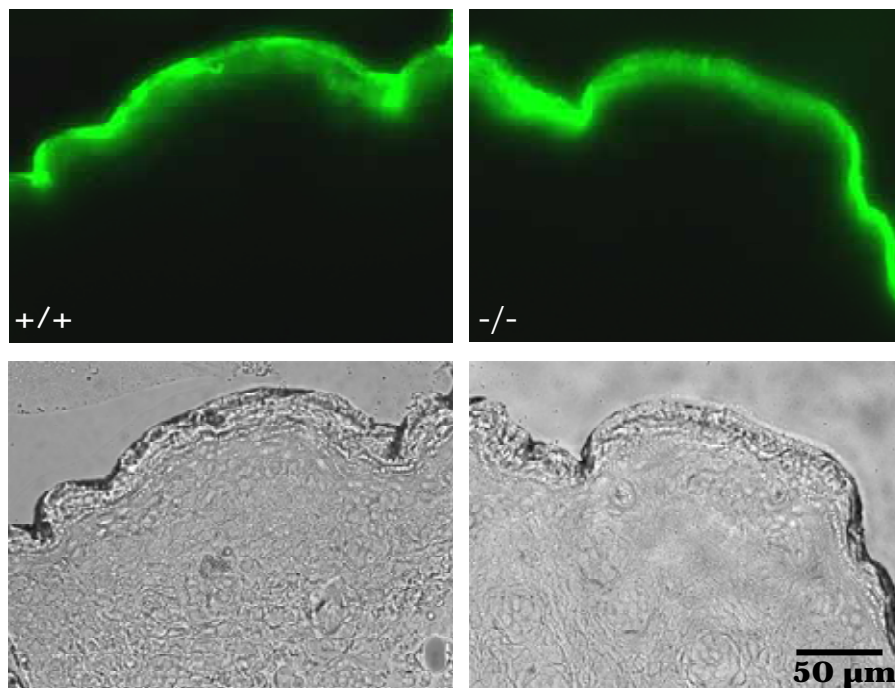


Abb. 2.11 Luzifer Gelb Penetration Die Färbung ist gleichermaßen im Wildtyp (links) als auch bei der Mutante (rechts) auf die äußerste Schicht der Haut beschränkt (oben). Um ausschließen zu können, dass bei der Prozessierung des Gewebes die äußerste Schicht entfernt wurde, und der Farbstoff möglicherweise doch tiefer in das Gewebe eingedrungen ist, wurden dieselben Schnitte auch im Hellfeld aufgenommen (unten).

II. Toluidin Blau Retention

Sowohl Neugeborene, als auch Embryonen zwischen Tag E16,5-18,5 wurden einer Färbung mit Toluidin Blau unterzogen. Die eigentliche Färbung findet am Ende einer De- bzw. Rehydrierungsreihe des Gewebes statt. Kann der Farbstoff in Anschluß an die Färbung durch Waschen mit PBS wieder entfernt werden, besteht keine Beeinträchtigung der Barrierefunktion von außen nach innen. Das Toluidin Blau ließ sich bei Neugeborenen beider Genotypen durch den Waschschrift von der Haut entfernen. Bei den TG3^{-/-} Tieren konnte jedoch der Verbleib des Farbstoffes am Ansatz der Schnurrhaare beobachtet werden, was beim Wildtyp nicht der Fall war. Derselbe Versuch mit Mäusen zum Zeitpunkt E16,5 zeigte eine Blaufärbung der Haut bei Wildtyp und Mutante, während am Tag E17,5 ausschließlich eine Färbung der Haut im ventralen Bereich der Mutanten zu erkennen war. Diese Färbung war bei TG3-defizienten Tieren am Tag E18,5 nicht mehr vorhanden. Bei den Untersuchungen der verschiedenen Embryonalstadien konnte erneut ein Größenunterschied zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden, sowie eine Retardierung der Augenentwicklung TG3 Nullmäusen. Zum Zeitpunkt E16,5 ist die Pigmentierung des Auges beim Wildtyp bereits vorhanden, während sie bei den Mutanten noch fehlt.

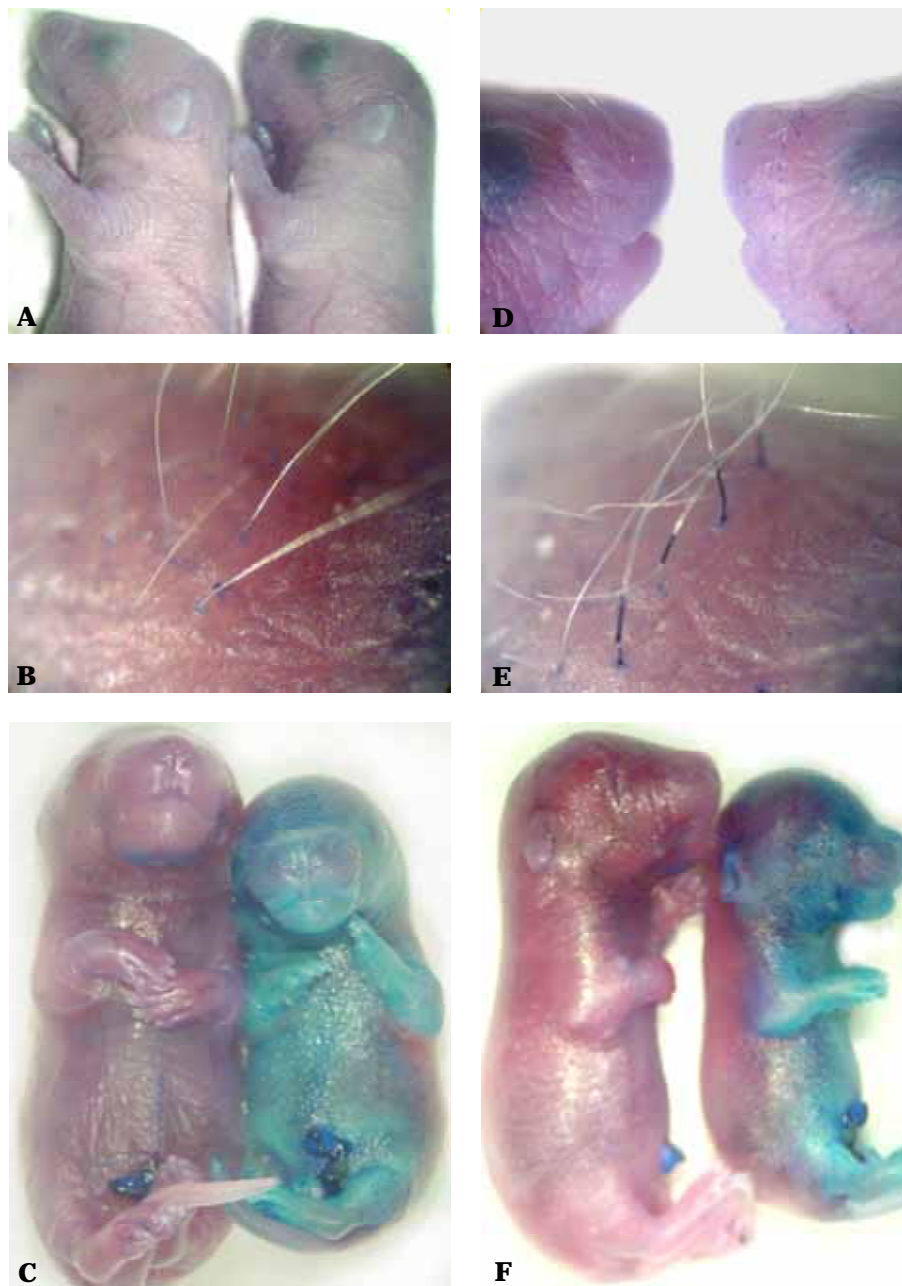


Abb. 2.12 Toluidin Blau Retention Die Färbung von Neugeborenen zeigt, dass sowohl im Wildtyp (links) als auch bei TG3 Nullmäusen (rechts) der Farbstoff mit PBS von der Haut abgewaschen werden kann (A). Auffällig ist, dass sich bei Homozygoten ein Teil der Schnurrhaare nicht entfärben lässt (D rechts, E). Homozygote Embryonen am Tag 17,5 weisen eine ventrale Färbung der Haut auf, die im Wildtyp nicht vorhanden ist (C, F).

2.8 Morphologie und Lipidkomponenten von Korneozyten

Eine weitere Methode um festzustellen, ob Veränderungen der Hornschicht vorliegen, ist die Isolation einzelner Zellen des CE, den Korneozyten (Dijan et al. 2000). Sie zeichnen sich durch besondere Resistenz gegen mechanische Einflüsse aus und können durch Aufkochen des Gewebes, in diesem Fall ein Teil des Ohres einer in einer SDS/Tris Lösung, isoliert werden ohne sie zu beschädigen. Nach der Isolation wurde die allgemeine Morphologie der Korneozyten im Lichtmikroskop analysiert, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden konnte. Die Anzahl an Korneozyten, welche aus dem Gewebe isoliert werden konnten, war bei beiden Tieren vergleichbar. Des Weiteren wurden die Korneozyten mit Nil Rot, einem lipophilen, fluoreszierenden Farbstoff angefärbt, um eine mögliche Veränderung der Lipidkomponenten des CE zu untersuchen. Die Korneozyten beider Genotypen ließen sich in vergleichbarer Art und Weise anfärben und waren im Fluoreszenzmikroskop nicht zu unterscheiden. Eine Messung zur Bestimmung eines möglichen transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) aufgrund einer Veränderung der Zusammensetzung des CE ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante.

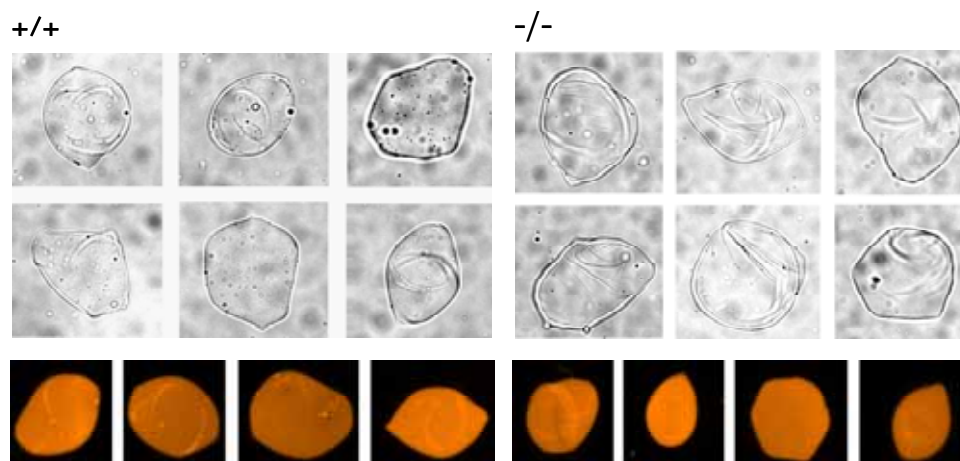


Abb. 2.13 Morphologie der TG3^{-/-} Korneozyten Die einzelnen Korneozyten weisen unterschiedliche Formen auf. Dennoch konnte kein Unterschied in der Morphologie der Korneozyten zwischen Wildtyp (links) und Mutante (rechts) festgestellt werden. Die Färbung der Korneozyten mit Nil Rot (unten) zeigt keine Veränderung der Lipidkomponenten des CE.

2.9 Expression und Löslichkeitsverhalten verschiedener Strukturproteine der Haut

Die Haut enthält eine Reihe von Strukturproteinen, wie z.B. bestimmte Keratine und die Komponenten des CE, die von TG3 als Substrat verwendet werden. Daher sollte untersucht werden, ob einige dieser Strukturproteine in TG3-defizienten Mäusen ein anderes Expressionsmuster aufweisen als im Wildtyp. Immunofluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten der Haut mit polyklonalen Antikörpern gegen diverse Strukturproteine, zeigten dasselbe Expressionsmuster und die gleiche Signalintensität in Wildtyp und Mutante.

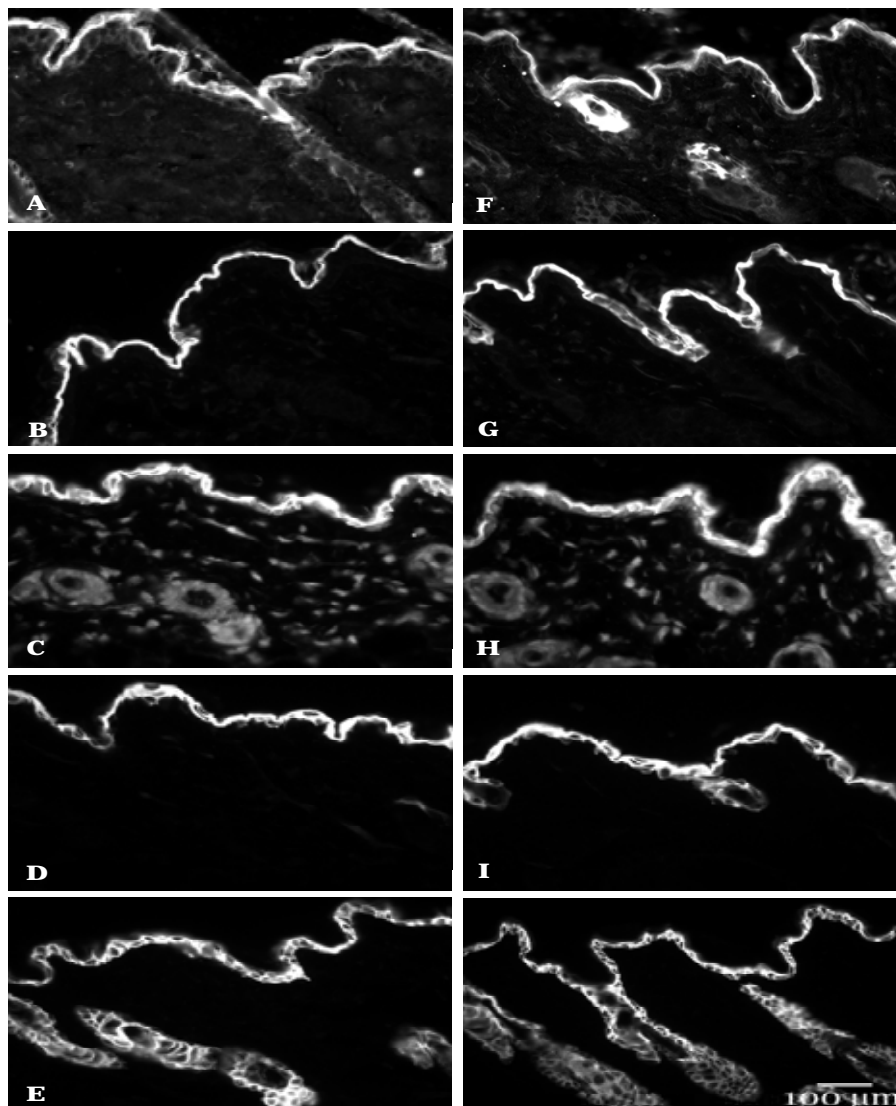


Abb. 2.14 Expression verschiedener Strukturproteine der Haut Paraffinschnitte adulter Maushaut wurden mit polyklonalen Antikörpern (zur Verfügung gestellt von Prof. Nischt, Köln) gegen verschiedene Strukturproteine wie Involukrin (A, F), Lorikrin (B, G), Keratin 1 (C, H), Keratin 10 (D, I) und Keratin 14 (E, J) inkubiert. Es konnte kein Unterschied in Intensität oder Lokalisation des Signals zwischen Wildtyp (A-E) und TG3-defizienten Tieren (F-J) festgestellt werden.

Nachdem die Expression der analysierten Strukturproteine in der Immunfluoreszenzfärbung bei beiden Genotypen identisch war, wurden Immunoblots mit den Antikörpern gegen die diversen Proteine inkubiert, um die Löslichkeit in Wildtyp und Mutante zu überprüfen. Die Proteinextraktion erfolgte aus der Haut von vier Wochen alten Tieren (Abb. 2.15). Die Proteinlysate wurden in einer SDS PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es konnte eine geringfügig erhöhte Löslichkeit von Trichohyalin (THH) aus der Haut der Mutanten beobachtet werden. Andere Strukturproteine wie Lorikrin und Involukrin wiesen keine Unterschiede im Vergleich von Wildtyp und Mutante in ihrer Löslichkeit auf.

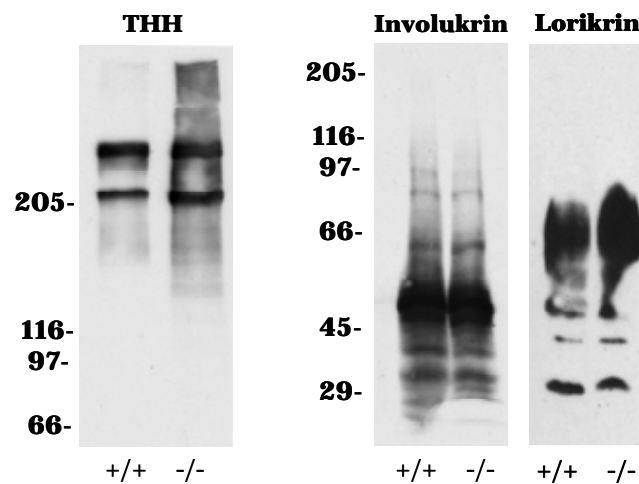


Abb. 2.15 Löslichkeit verschiedener Proteine aus der Haut TG3-defizienter Mäuse Die Extraktion der Strukturproteine THH, Involukrin und Lorikrin aus der Haut vier Wochen alter Tiere ergab, dass außer im Fall von THH, keine Veränderung der Löslichkeit bei TG3 Nullmäusen vorliegt. Für THH ließ sich eine geringfügig höhere Löslichkeit nachweisen.

2.10 Knochenentwicklung

Bereits in den Embryonalstadien (E16,5-E18,5) konnte ein Größenunterschied zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden, der bis ins adulte Stadium bestehen bleibt. Zusätzlich wirkte die Kopfform einiger Mutanten geringfügig gestaucht im Vergleich zu der ihrer wildtypischen Geschwister. Um eine Anomalie des Knochenskeletts als Ursache für die geringere Körpergröße der Homozygoten ausschließen zu können, erfolgte eine Färbung mit Alizarin Rot, sowie eine Alcian Blau Färbung des Knorpels von Neugeborenen (P0) und Tieren zum Zeitpunkt P8 und P14. Es wurde bei keinem der analysierten Tiere ein signifikanter Unterschied festgestellt.

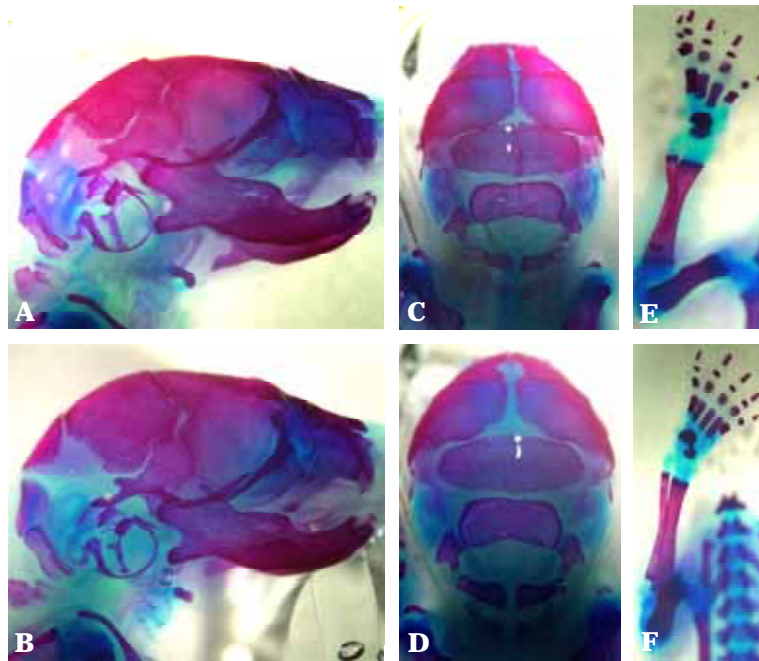


Abb.2.16 Skelett- und Knorpelfärbung Die Färbung der einzelnen Knochen (Alizarin Rot) und Knorpelpartien (Alcian Blau) in Kopf (A-D) und Extremitäten (E, F) weist keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp (A, C, E) und Homozygoten (B, D, F) auf.

3. Morphologie und Struktur der Haare

3.1 Die Haarstruktur im Lichtmikroskop

Der offensichtliche Haarphänotyp machte eine genauere Untersuchung der Haare notwendig. Zunächst wurden Haare von Wildtyp und Mutante mit einer Pinzette aus der Haut gezogen, um sie im Lichtmikroskop zu untersuchen. Bei gleicher Vergrößerung wirken die Haare der Homozygoten deutlich dünner. Da das Fell von Mäusen aus verschiedenen Arten von Haaren besteht, kann dieser Fund auch darauf zurückzuführen sein, dass der Prozentsatz eines bestimmten Haartyps bei Homozygoten geringer ist. Neben der offensichtlichen Krümmung der mutanten Haare war erkennbar, dass einige Haare in sich spiralförmig gedreht sind.

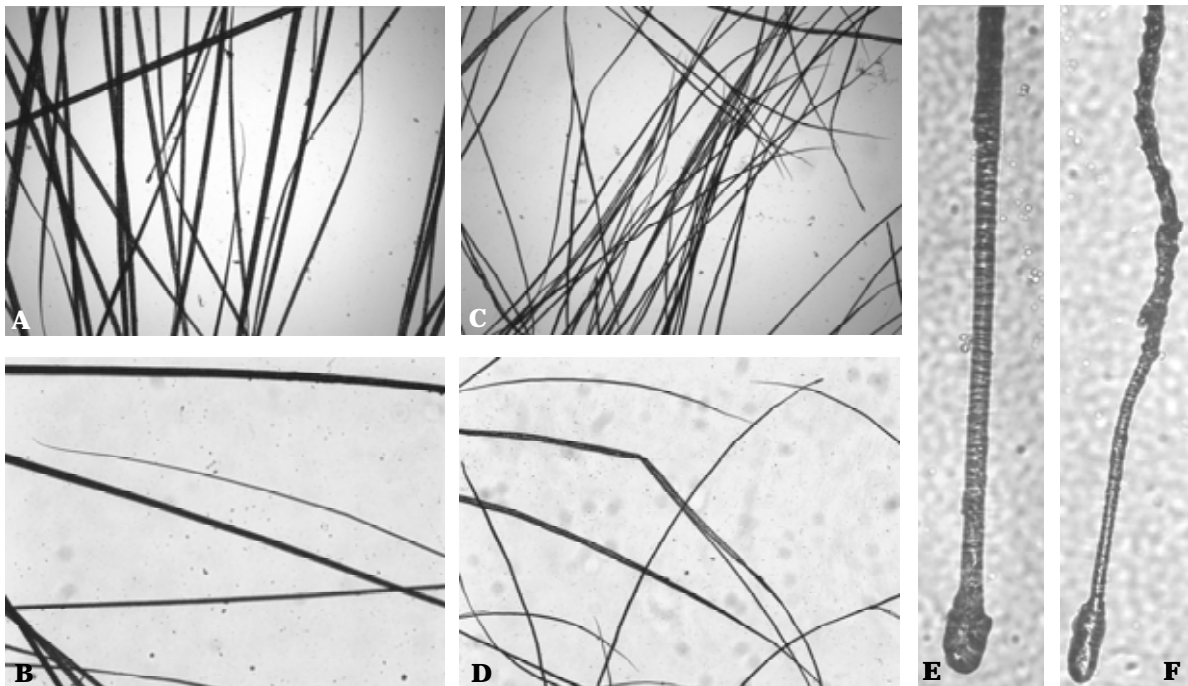


Abb. 3 Haarstruktur im Lichtmikroskop Bei gleicher Vergrößerung wirken die mutanten Haare (C, D, F) dünner als die des Wildtyps (A, B, E). Die mutanten Haare sind teilweise in sich gedreht (D, F) und weisen auch eine veränderte Oberfläche im Vergleich zum Wildtyp auf (F).

3.2 Die Ultrastruktur mutanter Haare (REM)

Um die strukturellen Veränderungen der TG3-defizienten Haare genauer analysieren zu können, wurden Aufnahmen einzelner Haare im Rasterelektronenmikroskop (REM) gemacht. Hier waren die Veränderungen der Kutikula des Haarschaftes noch deutlicher erkennbar als zuvor im Lichtmikroskop. Die Oberfläche der homozygoten Haare wirkte uneben und teilweise sogar brüchig. Die Schuppung der Kutikula ist im Vergleich zum Wildtyp diffus und auch die Furchung bestimmter Haartypen erscheint bei TG3 Nullmäusen unregelmäßig. Im Wildtyp sind, wahrscheinlich aufgrund der ebeneren Oberfläche, die Melanozyten im Inneren des Haares erkennbar, was bei den analysierten mutanten Proben selten der Fall war. Trotzdem gibt es keine augenfälligen Unterschiede in der Pigmentierung der Haare. Der Haarbalg ist in seiner Form und Oberflächenstruktur vergleichbar, obwohl es beim Entfernen der Haare mit der Pinzette den Anschein hatte, dass sich die Haare der Homozygoten leichter entfernen lassen. Bei *tape stripping* Experimenten des Fells der Mäuse, hafteten jedoch bei Wildtyp und Mutante eine vergleichbare Anzahl an Haaren an dem Klebestreifen.

3.3 Die Ultrastruktur mutanter Haare (TEM)

Die Untersuchung der Haare von Wildtyp und Mutante im TEM zeigte, dass die einzelnen Schichten des Haarschaftes, mit Ausnahme der Kutikula der inneren Wurzelscheide (IRS), bei beiden Genotypen alle vorhanden und intakt waren. Die in der, zur IRS gehörenden Huxley Schicht lokalisierten Trichohyalin granula zeigten keine Anomalie bei TG3-defizienten Tieren, obwohl dieses Protein im Wildtyp kaum extrahierbar war und bei mutanten Haaren eine extreme Löslichkeit festgestellt werden konnte (Abb. 3.2 A, D). Die Kutikula der IRS in TG3-defizienten Haaren wies Unregelmäßigkeiten auf, wobei die unter der Zellmembran lokalisierten Granula in einigen Fällen in geringerer Zahl vorhanden zu sein schienen und eine geringere Elektronendichte aufwies. Die beim Wildtyp im Kortex vorhandenen Keratinfilamente erschienen in den Mutanten oftmals kürzer und unregelmäßig (Abb. 3.2 C, F).

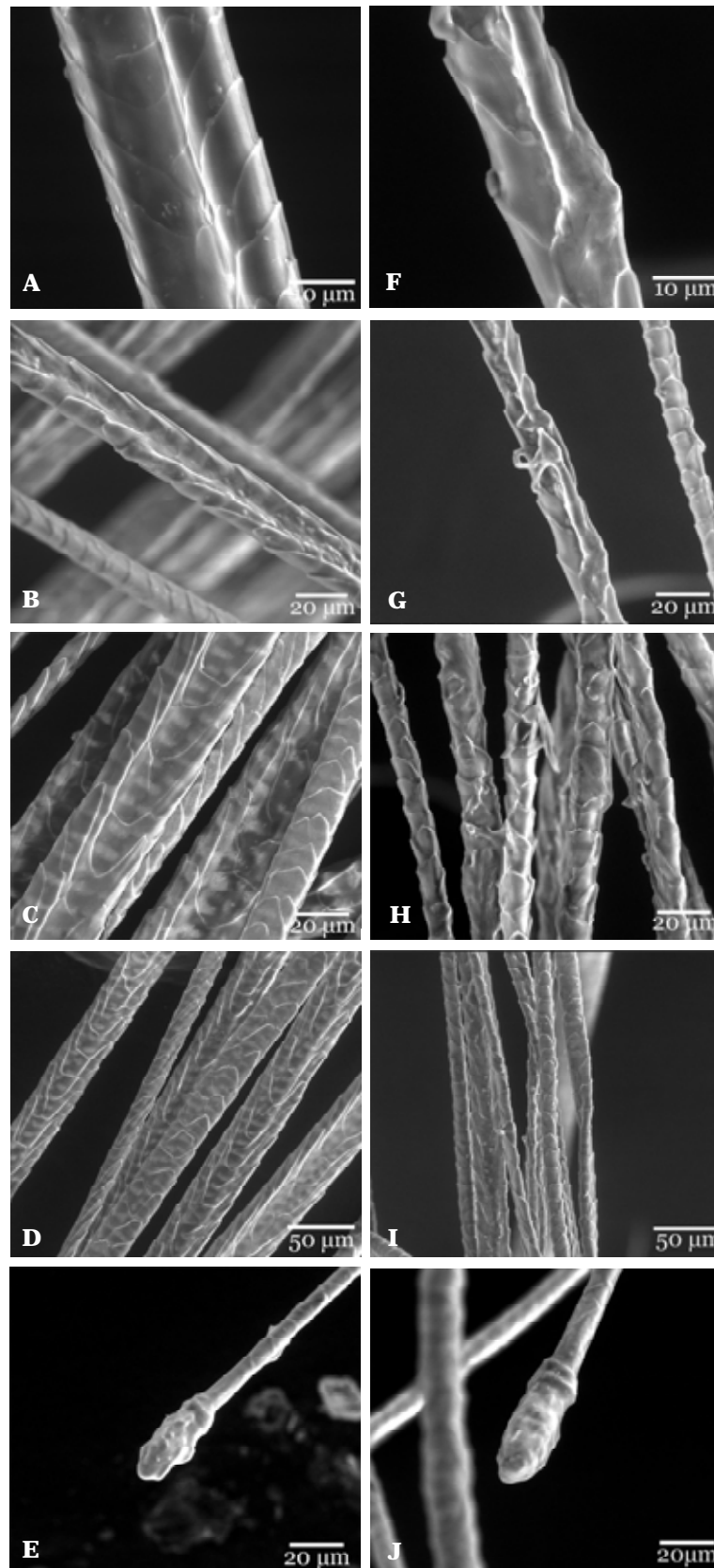


Abb. 3.1 Haarstruktur im Rasterelektronenmikroskop Die Haare des Wildtyps (A-E) weisen eine deutlich glattere Kutikula auf, als die der TG3 Nullmäuse (F-J). Furchung und Schuppung der Oberfläche scheinen beim Wildtyp in einer bestimmten Orientierung ausgerichtet zu sein (A, D), während die Ausrichtung bei Homozygoten eher zufällig wirkt (F, I).

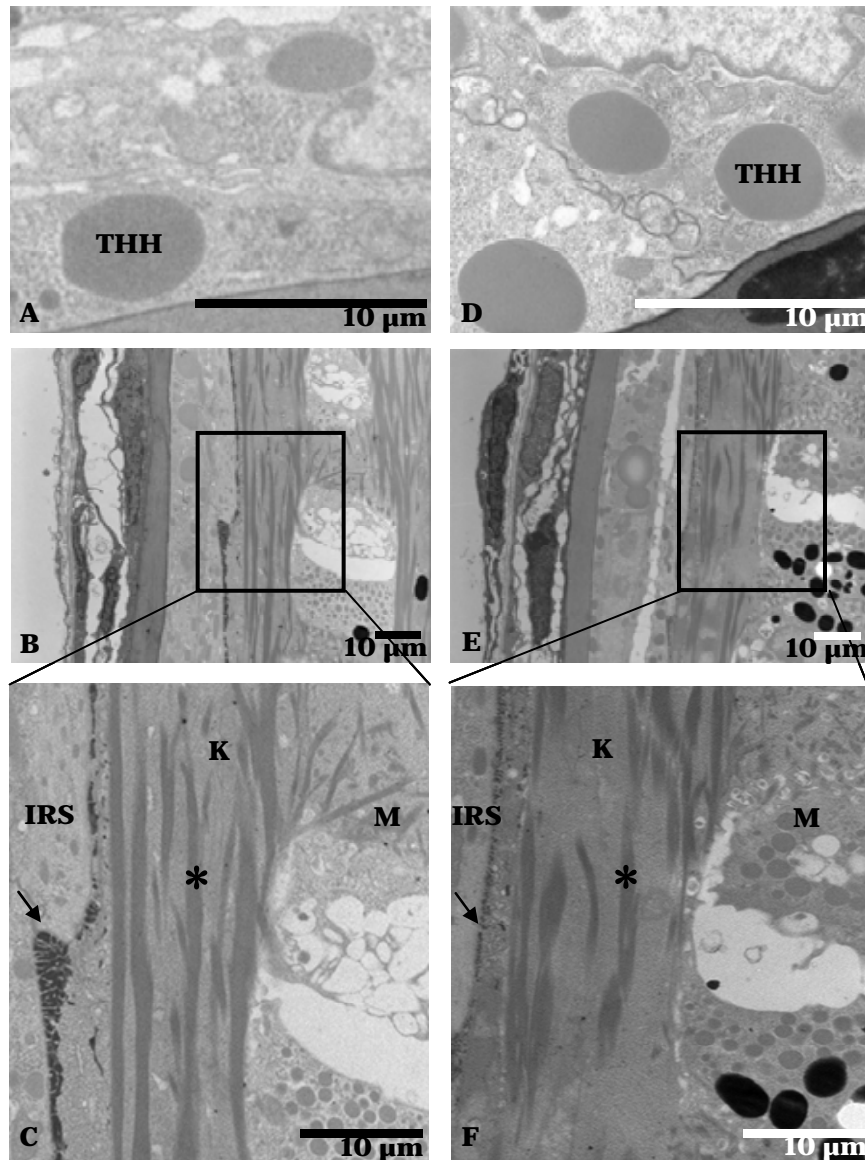


Abb. 3.2 Analyse der Haarstruktur im TEM Die in der Huxley Schicht lokalisierten Trichohyalingranula (A, D) TG3-defizienter Tiere (D-F) weisen keinen Unterschied zu denen des Wildtyps (A-C) auf. Die einzelnen Schichten des Haarschaftes sind bei beiden Genotypen vorhanden und intakt (B, E), wobei die Keratinfilamente im Kortex (C, F *schwarz) des Wildtyps in der Vergrößerung länger und dichter als bei der Mutante wirken. Auch die Kutikula der IRS scheint in den Mutanten verändert (Pfeil) (THH-Trichohyalin, IRS-innere Wuzelscheide, K-Kortex, M-Medulla).

3.4 Expression und Löslichkeitsverhalten verschiedener Strukturproteine der Haare

In Abschnitt 2.8 wurden bereits verschiedene Strukturproteine der Haut, die auch im Haar exprimiert werden, mittels Immunofluoreszenzfärbung auf ihr Expressionsmuster in der Haut von TG3 Nullmäusen überprüft. Es sollte nun analysiert werden, wie es sich mit der Löslichkeit dieser Strukturproteine in den Haaren von TG3-defizienten Tieren verhält. Haare von zwei Wochen und vier Monate alten, wildtypischen und homozygoten Tieren, wurden vor der Proteinextraktion in einem Exikator getrocknet und anschließend eingewogen. Danach wurden die Haare in einer SDS/ β -Mercaptoethanol Lösung inkubiert, aufgeköcht und der Überstand in einer SDS PAGE aufgetrennt. Auf dem Polyacrylamidgel waren, nach der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau, zwei Banden im Extrakt der Mutanten sichtbar, die im Wildtyp kaum zu erkennen waren. Die Peptidmassen der beiden Banden wurden durch Trypsinverdau und anschließende Analyse im Massenspektrometer identifiziert. Der Vergleich der Peptidmassen mit der Mascot Suchmaschine ergab eine Übereinstimmung mit Keratin 17 und Zytokeratin 6 hf (Keratin 6 hf) (Abb. 3.3 A). Der Grund für die Diskrepanz zwischen der vorhergesagten Größe für Keratin 6 hf von 60 kDa (Winter et al. 1998) und der Bande im Polyacrylamidgel (Abb. A b) ist bisher unklar. Ein weiterer Ansatz wurde zur *Western blot* Analyse verwendet. Auch hier war bereits bei der Ponceau Färbung erkennbar, dass deutlich mehr Protein aus den Proben der Mutanten extrahiert werden konnte (Abb. 3.3 A). Offensichtlich liegt bei TG3-defizienten Tieren eine veränderte Löslichkeit einiger Haarproteine vor. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen Trichohyalin (THH), welches wie TG3 im Haar des Wildtyps in der inneren Wurzelscheide (IRS), der äußeren Wurzelscheide (ORS) und der Medulla exprimiert wird, sowie Involukrin und verschiedene Keratine, welche ebenfalls im Haar exprimiert werden. THH zeigte eine besonders hohe Löslichkeit bei Homozygoten während es im Wildtyp nicht möglich war das Protein zu extrahieren bzw. überhaupt zu detektieren. Des Weiteren war die Löslichkeit bei älteren Tieren deutlich größer als bei jüngeren. Ein ähnliches Ergebnis konnte für Involukrin und Keratin 14 nachgewiesen werden. Andere Keratine, die untersucht wurden, zeigten keine Änderung ihrer Löslichkeit in Homozygoten verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 3.3 B).

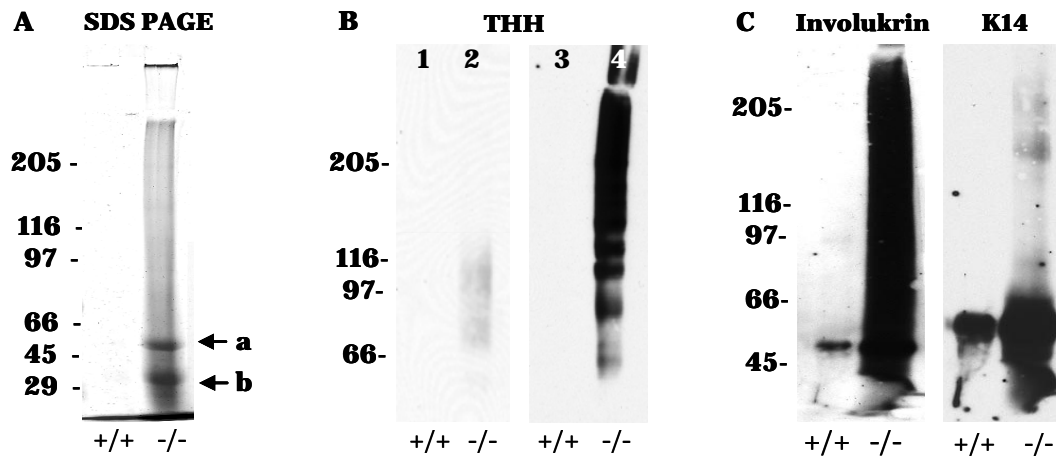


Abb. 3.3 Löslichkeit verschiedener Proteine aus Haaren TG3-defizienter Mäuse In der SDS PAGE ließen sich in dem Haarextrakt der Mutanten zwei Banden detektieren (A). Sie konnten als Keratin 17 (a) und Keratin 6 hf (b) identifiziert werden. Bei dem Vergleich der Haarextrakte von Wildtyp und Mutante im *Western blot* (B, C) zeigten sich bei der Inkubation der Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen Trichohyalin (THH) (zur Verfügung gestellt von Dr. O’Keefe, USA) sowohl in Extrakten von zwei Wochen (B 1, 2), als auch von 4 Monate alten Tieren (B 3, 4) eine deutlich erhöhte Löslichkeit von THH bei mutanten Haaren. Offensichtlich nimmt die Löslichkeit von THH mit dem Alter der Tiere zu. Mit polyklonalen Antikörpern gegen Involukrin und Keratin 14 (C) konnte für beide Proteine ebenfalls eine deutlich erhöhte Löslichkeit bei TG3-defizienten Tieren festgestellt werden.

Bei einem Vergleich der Proteinextraktion aus den Haaren mit der der Haut (Abschnitt 2.8) konnte bestätigt werden, dass es sich bei der veränderten Löslichkeit der Proteine, abgesehen von Trichohyalin, um ein haarspezifisches Ereignis handelt. Aus der Haut von Wildtyp und Mutante konnten die Proteine gleichermaßen extrahiert werden. Leider war es aufgrund der bereits in Abschnitt 2.5 erwähnten technischen Probleme nicht möglich, die Expression anderer TG Isoformen in den homozygoten Haaren zu analysieren.

4. Charakterisierung von TG6

4.1 Chromosomale Lokalisation

TG6 ist auch unter dem Synonym „TG3- ähnliches Protein“ in den Datenbanken verzeichnet. Die Sequenz des TGM6 Gens ist bereits seit einiger Zeit bekannt und die starke Homologie der Aminosäuresequenz von TG6 und TG3, 63% der Aminosäuren sind identisch, wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit genauer untersucht (John 2002). Das murine TGM6 Gen befindet sich in unmittelbarer Nähe von TGM3, im Bereich 2F3. Es liegt 70 kb von TGM3 entfernt und ist in der gleichen Orientierung angeordnet (Abb. 4.1). TGM6 ist 45 kb groß und umfasst, genau wie TGM3 und sechs weitere der neun bekannten Säuger TGs, 13 Exons. Es kodiert für ein Protein von 721 Aminosäuren bzw. 80 kDa. Wie bei den anderen TGs, fehlt auch bei TG6 ein N-terminales Signalpeptid. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von TG3 und TG6 zeigte, dass TG6 auch die in den anderen TGs konservierten Bereiche enthält. Des Weiteren besitzt TG6 das reaktive Cystein im katalytischen Zentrum, was vermuten läßt, dass es sich um ein enzymatisch aktives Mitglied der TG Familie handelt. Die Aminosäureschleife zwischen dem aktiven Zentrum und dem β_1 *barrel*, die bei TG3 von Proteasen erkannt wird, um das Zymogen zu aktivieren, ist auch bei TG6 vorhanden. Allerdings sind die Aminosäuren in diesem Bereich bei TG6 nicht konserviert (Abb.4.2). Aufgrund der starken Homologie zu TG3, und da es bis heute keine Veröffentlichung zu TG6 gibt, die das Protein genauer charakterisiert, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterführende Untersuchungen angestellt.

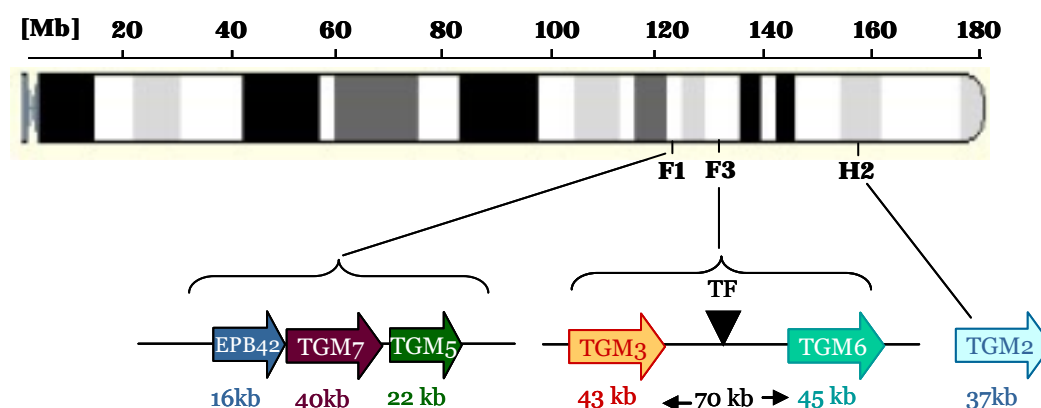


Abb. 4.1 Chromosom 2 der Maus TGM3 und TGM6 liegen im Bereich 2F3, getrennt durch ein Gen, welches vermutlich für einen Transkriptionsfaktor (TF) kodiert. 30 Mb davon entfernt, im Bereich 2H2, ist TGM2 lokalisiert. Auf demselben Chromosom, im Bereich 2F1, liegt die Gruppierung der drei Gene EPB42, TGM7 und TGM5.

1 MAGVRITKVDWQHSHKNGAAHHTQDYPCSELVVRGQLFSLTLDLSRVLDSSEALIFTVETGPHASEALH **69**
70 TKAVFQTAELEIGDTWTAAKEEQTENTITVSLSSPSNAVIGRYLLSVRPSSRRKHSDRKLQGFILLFNPWC **140**
141 PEDDVFLDSEEEERQEYVLNDSGVIFRGVEKHRAQGWNYGQLLWEQFEEDILNCLSILDRSPSHQEDPA **210**
211 TDVSHRHDPVYVTRIISAMVNSNDRGVVQGWQGGYGGTNPLNWRGSAVILSAHQWFKGGRYKPVK **275**
276 YGQCWVFA GVMCTVLRCLGIATRVSNFNDTDGNLSVDKYVDSYGRTLEDLTEDSMWNFHVWNESEWF **345**
346 ARQDLGPSYDQWQVLDATPQEESEGMFRCPASVTAIREGDVHLAHDGPFVFAEVNADYITWLWEDK **392**
393 RRERVYSDTKKIGRCISTKAVGSDSRVDITGLYKYPEGSHVRRVFPQGSRKERQVYSKAVKKLLSVEAWG **483**
484 RRRRIRRASVRGVWRDDLLEPVTKPSITGKFKVLEPPVLGQDLKLALCLTNLTARAQRVRVNVSGATILY **553**
534 TRKPVAEILRESHTVKLGPLEEKKIPVTISYSQYKGDLTEDLLAAMCLVSKGEKLLVEKDITLEDFITIKVL **628**
629 GPAVVGVTVTVEVLVINPLESESVKDCVLMVEGSGLLQGLSIEVPSLQPQEKALIQFNITPSKSGPRQLQV **699**
700 DLVSSQFPDIKGFVIIHVATAK **721**

Abb. 4.2 TG6 Aminosäuresequenz Die für alle TGs identische Region innerhalb des aktiven Zentrums existiert auch bei TG6 (rot). TG6 besitzt ebenso wie TG3 eine Aminosäureschleife (grün), die nicht konserviert ist und möglicherweise das Erkennungssignal für die proteolytische Spaltung enthält. Die Aminosäureschleife von TG6 ist kleiner (14 AS) als die von TG3 (19 AS) und das spezifische Serin, an welchem die Spaltung stattfindet, ist nicht konserviert.

4.2 Gewinnung der Gesamt-RNA

Während meiner Diplomarbeit wurde eine Datenbankrecherche mit der Sequenz von TGM6 nach EST Klonen durchgeführt. Das Resultat waren die komplette cDNA, isoliert aus der Haut sechs Tage alter Mäuse (RIKEN Klon von kompletter Länge [A030011p16-5]), sowie das Transkript eines EST Klons, das aus einem Lungenkarzinom beim Menschen isoliert wurde. Dieser Fund legte nahe, dass es sich bei TG6 um ein Produkt von Epithelzellen handelt. Daraufhin wurde zu Beginn dieser Arbeit die Haut von Mäusen zum Zeitpunkt P6 entfernt, um die Gesamt-RNA mit Trizol zu isolieren. Danach wurde eine RT-PCR mit OligodT-Nukleotiden durchgeführt, und nach Erhalt der cDNA erfolgte eine PCR mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden für TG6. Die PCR Produkte wurden anschließend, für den Restriktionsverdau und die Sequenzierung, in den TA Klonierungsvektor pDrive ligiert.

4.3 Herstellung eines eukaryotischen TG6-Expressionsvektors

Zur Proteinexpression in 293 EBNA Zellen wurde das PCR Produkt von 2,2 kb, welches für das gesamte TG6 Protein kodiert, in den eukaryotischen Expressionsvektor pCep-Pu kloniert. Für die Klonierung in pCep-Pu wurden zur Amplifikation des TG6 Transkriptes passende Restriktionsstellen in die Oligonukleotide integriert. Das 5' Oligonukleotid enthält eine HindIII und das 3' Oligonukleotid eine NotI Schnittstelle. Das Plasmid besitzt einen C-terminalen Histidin *tag* (His *tag*) für die spätere Aufreinigung. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden SeqU (5'-Bereich) und Rev2 (3'-Bereich), die an das Plasmid binden, sowie mit TG6 spezifischen Oligonukleotiden, die mit dem Insert hybridisieren, auf die korrekte Integration des Inserts, sowie die Aufrechterhaltung des Leserasters überprüft.

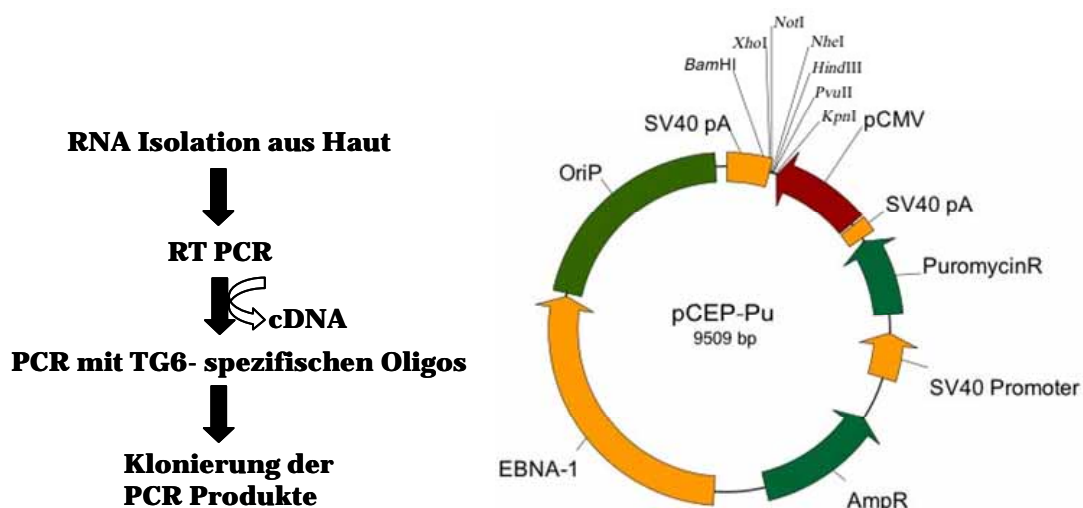


Abb. 4.3 Klonierung des TG6 Transkripts Nach der Isolation der Gesamt-RNA wurde durch RT PCR die cDNA generiert, womit dann eine herkömmliche PCR mit TG6 spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt werden konnte. Für die spätere Proteinexpression in eukaryotischen Zellen wurde das Transkript über seine, in die Oligonukleotide integrierten Restriktionsstellen, HindIII (5') und NotI (3') in pCep Pu kloniert.

4.4 Überexpression von TG6 in 293 EBNA Zellen

Das Konstrukt wurde zunächst durch Elektroporation in 293 EBNA Zellen transfiziert, jedoch konnte mit dieser Methode keine ausreichend hohe Transfektionsrate erzielt werden. Alle Versuche eine stabile Zelllinie zu etablieren, oder andere Zelllinien (Wi26, NIH3T3, HaCat) mit dem TG6 Konstrukt effizient zu transfizieren waren ohne Erfolg. Es war ausschließlich mit Hilfe von Liporeagenzien möglich eine transiente Transfektion in 293 EBNA Zellen zu erreichen. Die 293 EBNA Zellen wurden in einer Sucroselösung homogenisiert und nach Abnehmen des Sucroseüberstandes wurde das Zellpellet in 1x SDS Laufpuffer aufgekocht. Von jedem Schritt wurden Proben zurückbehalten, um sie in einer 8-%igen SDS PAGE zu analysieren. Das rekombinante TG6 Protein konnte im Immunoblot, durch Inkubation der Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen den His *tag*, detektiert werden. Der Sucroseüberstand enthielt kein Protein und es wurde ausschließlich ein Signal im Zellhomogenat und in dem mit SDS behandelten Zellpellet detektiert (Abb. 4.6 A). Eine Sekretion von TG6 aus den Zellen in das umgebende Medium wurde ebenfalls überprüft und konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei TG6 um ein membran- oder zytosklett-assoziiertes Protein handelt.

4.5 Besonderheiten TG6-exprimierender 293 EBNA Zellen

Bei dem Versuch eine stabile TG6-exprimierende Zelllinie zu etablieren, und die transfizierten 293 EBNA Zellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren, waren einige Veränderungen der transfizierten Zellen zu beobachten. Zum einen veränderte sich bereits drei bis vier Tage nach der Transfektion die Morphologie der Zellen, zum anderen nahm die Zellzahl ab (Abb.4.4). Die Zellen erschienen im Lichtmikroskop globulär und lösten sich vom Boden der Kulturschale. Daraufhin wurde überprüft, ob die Überexpression von TG6 eine apoptotische Wirkung hat. Es wurde eine TUNEL Färbung zum Nachweis von Apoptose durchgeführt, die den Verdacht auf Apoptose bestätigte (Abb.4.5).

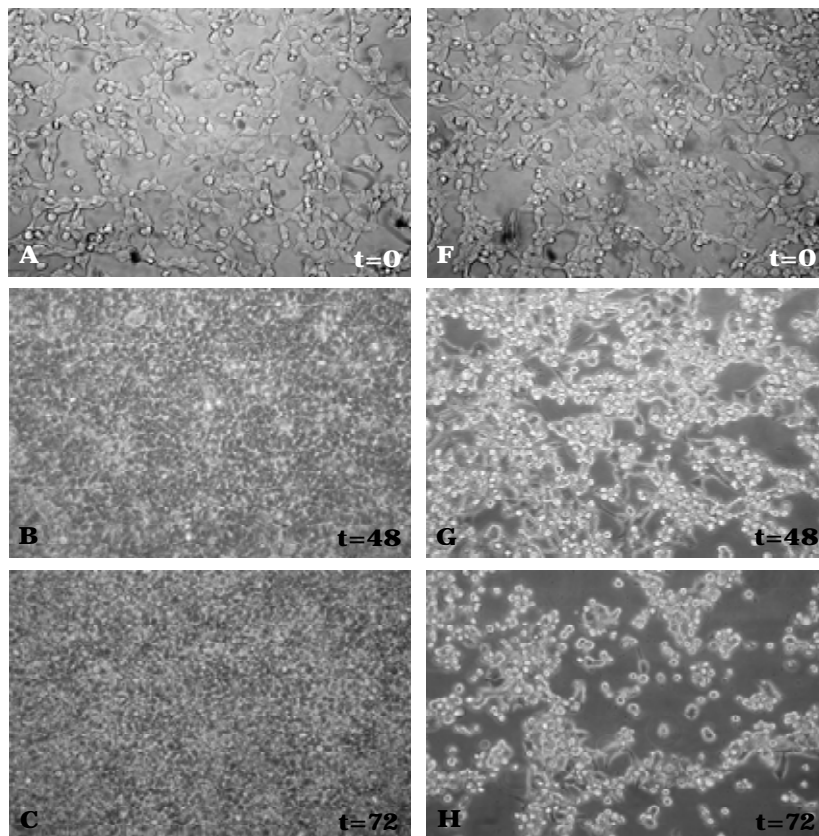


Abb. 4.4 Eigenschaften transfizierter EBNA 293 Zellen Untransfizierte Zellen (A-E) sind innerhalb von 48 Stunden ($t=48$) konfluent und bilden einen dichten Zellrasen (B). Im Vergleich dazu weisen Zellen, die TG6 rekombinant exprimieren (G-J), 48 Stunden nach der transienten Transfektion ein eingeschränktes Zellwachstum auf (G). Die Anzahl an Zellen nimmt sogar ab, was möglicherweise durch Zelltod verursacht wird (H, I).

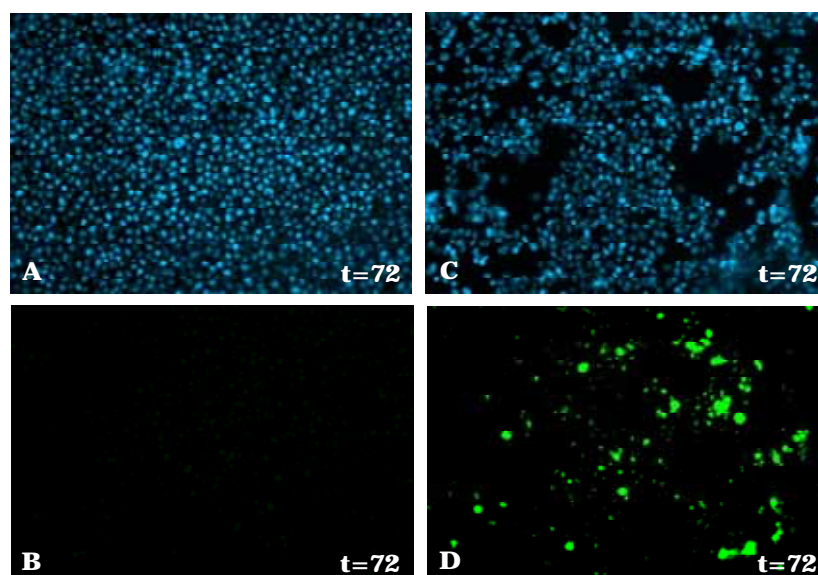


Abb. 4.5 Die TUNEL Färbung stützt die These, dass die Überexpression von TG6, Apoptose hervorrufen könnte. Als Kontrolle wurden die Nuclei mit DAPI angefärbt (A, C). Während in untransfizierten Zellen kein Signal für Apoptose detektierbar ist (B), ist die TUNEL Färbung in transfizierten Zellen positiv (D) (t =Zeit in Stunden).

4.6 Löslichkeit von TG6

Da das rekombinante TG6 Protein offensichtlich in einer unlöslichen Form vorliegt sollte überprüft werden, welche Extraktionsmittel in der Lage sind, die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen. Die abzentrifugierten Zellen aus verschiedenen Transfektionsansätzen wurden in Extraktionspuffer, der für jeden Ansatz mit einem anderen Extraktionsmittel versetzt wurde, homogenisiert, sonifiziert und zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und das Lysat zurückbehalten. Das zurückbleibende Pellet wurde danach in 1x SDS Laufpuffer aufgeköcht, um zu sehen wieviel Protein mit Hilfe des Detergenz aus dem Pellet extrahiert werden konnte. Die Analyse der Proben durch SDS PAGE und *Western blot* zeigten deutlich, dass TG6 nur mit besonders starken Lösungsmittel, wie SDS oder Harnstoff, aus den Zellen extrahiert werden kann. Die besten Resultate wurden immer dann erzielt, wenn der Extraktionspuffer SDS enthielt (Abb. 4.6 B). Im Immunoblot wurde, zusätzlich zu der erwarteten Bande von 80 kDa, eine höher molekulare Bande in der Größe eines Dimers beobachtet, was auf die Fähigkeit von TG6 zur Autokatalyse schließen lässt (Abb. 4.6 A).

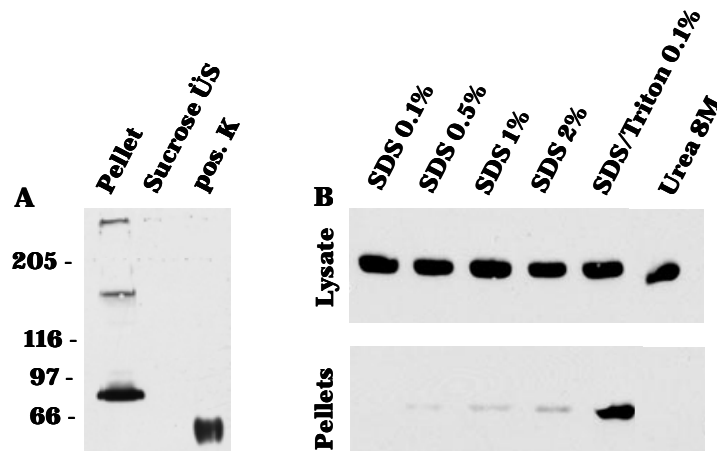


Abb. 4.6 Löslichkeit von TG6 Im *Western blot* ist erkennbar, dass allein durch Homogenisieren der transfizierten Zellen in einer Sucroselösung TG6 nicht in Lösung gebracht werden kann (A, Sucroseüberstand). Erst die Behandlung des Pellets mit SDS macht das Protein löslich (A, Pellet). Zusätzlich zu der 80 kDa Bande für TG6 ist eine weitere Bande in der Größe eines Dimers im Immunoblot zu sehen. Teile des gelösten Pellets, die aufgrund ihrer Größe nicht in das Trenngel eindringen konnten, befinden sich noch im Sammelgel (A, Pellet). Bei der Positivkontrolle handelt es sich um ein anderes, His-getagtes Protein. Der Löslichkeitstest mit verschiedenen Lösungsmitteln zeigt, dass eine Behandlung der TG6-exprimierenden Zellen sowohl mit SDS als auch mit Harnstoff den überwiegenden Teil des Proteins löslich macht (B).

4.7 Proteinaufreinigung

Aufgrund der Notwendigkeit eines Detergenz war die Kopplung des Proteins an ein passendes Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie problematisch. Erste Versuche das Fusionsprotein mit einem Strep *tag* zu exprimieren und über eine StrepTactin-Säule aufzureinigen waren nur von mäßigem Erfolg und wurden daher eingestellt. Es wurde auch ein Konstrukt zur Expression in Bakterien kloniert. Die Expression gelang, jedoch scheiterte auch hier die Aufreinigung an der Kopplung des Proteins an die verwendete Glutathion-Sepharosematrix. Die Expression in eukaryotischen Zellen mit einem His *tag* ermöglichte die Aufreinigung über eine Talonmatrix. Nachdem das Protein durch Sonifikation und Inkubation in SDS-haltigem Extraktionspuffer aus den Zellen gelöst werden konnte, wurde das Lysat zentrifugiert und anschließend mit der Talonmatrix inkubiert. Es wurden mehrere Pufferzusammensetzungen getestet, sowohl um das Protein löslich zu machen, als auch für die Kopplung an die Talonmatrix. Die Problematik war zum einen die Kopplung des Proteins, zum anderen die Elution. Der Zusatz von Harnstoff ermöglichte zwar eine Bindung an die Talonmatrix, jedoch war eine Elution nur mit einer 50%-tigen Ausbeute möglich (Abb. 4.7 B, unten). Ein optimales Resultat wurde durch die Zugabe von 0.1% SDS in Extraktions-, Kopplungs-, Wasch- und Elutionspuffer erzielt (Abb. 4.7 A; B, oben). Die Elution konnte zusätzlich zu der Zugabe von 250 mM Imidazol, durch einen pH-Gradienten optimiert werden. Das gereinigte Fusionsprotein konnte mit Hilfe der *mass fingerprint* Analyse überprüft und durch Vergleiche mit der Datenbank als TG6 identifiziert werden.

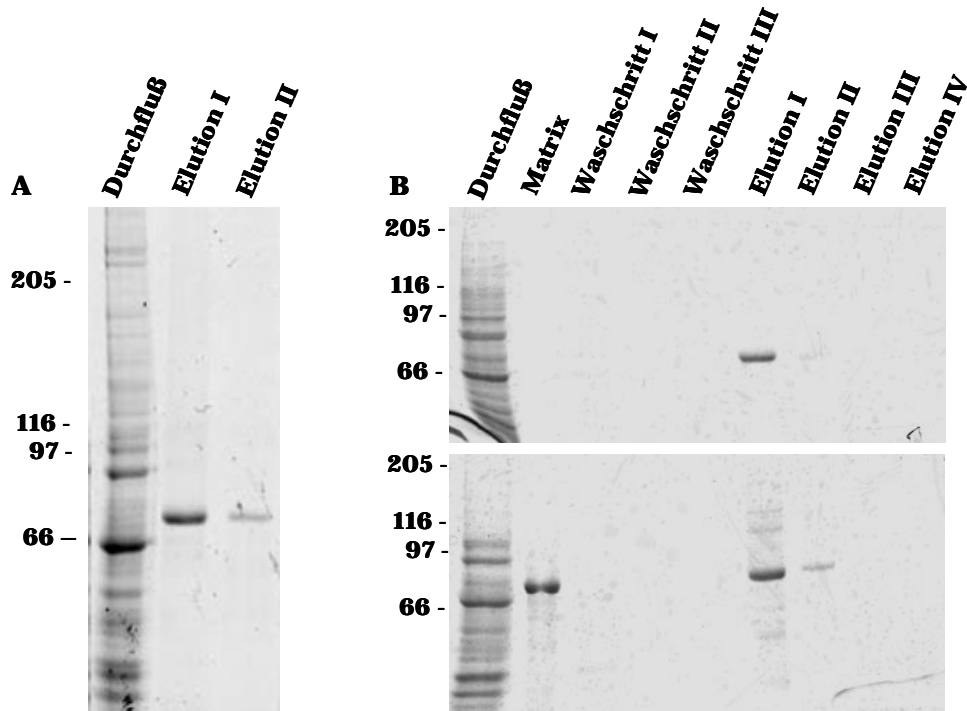


Abb. 4.7 Affinitätsreinigung Die SDS PAGE zeigt, dass die Bande für TG6 nicht mehr (A) oder nur noch zu einem geringen Teil (B) im Durchfluß vorhanden ist und somit das Protein fast vollständig an die Matrix gekoppelt werden konnte. Bei der Aufreinigung mit SDS ist im Anschluß an die Elution mit 250 mM Imidazol (Elution I-IV) keine Bande mehr in der Probe mit Talonmatrix erkennbar (B, oben) während bei der Aufreinigung mit Harnstoff-haltigem Puffer ungefähr die Hälfte des Proteins an die Matrix gekoppelt bleibt und nicht eluiert werden kann (B, unten).

4.8 Herstellung von TG6-spezifischen Antikörpern

Das gereinigte Protein wurde an den Pineda Antikörper Service geschickt, wo zwei Kaninchen rekombinantes TG6 zur Produktion von Antikörpern injiziert wurde. Die Antiseren wurden 61 bzw. 90 Tage nach der Injektion auf ihre Reaktivität mit rekombinantem TG6 und endogenem TG6 aus Hautextrakten untersucht. Eine mögliche Kreuzreaktivität mit rekombinantem TG2 und TG3 wurde ebenfalls überprüft (Abb.4.8). Da das Serum, das aus Tier 1 gewonnen wurde, eine hohe Kreuzreaktivität mit den anderen, getesteten TGs zeigte, wurde Tier 2 zur Gewinnung des gesamten Antiserums am Tag 90 nach der Injektion verwendet. Rekombinantes TG6 Protein konnte mit diesem Serum, bei einer Verdünnung von 1:10000 im *Western blot* detektiert werden, während TG2 und TG3 nicht erkannt wurden. Die Detektion von endogenem TG6 war bereits im *Western blot* problematisch und die Verwendung des Serums auf Gefrierschnitten der Haut zeigte eine unspezifische Färbung des gesamten Gewebes. Daraufhin wurde versucht eine Affinitätsreinigung des Serums durchzuführen.

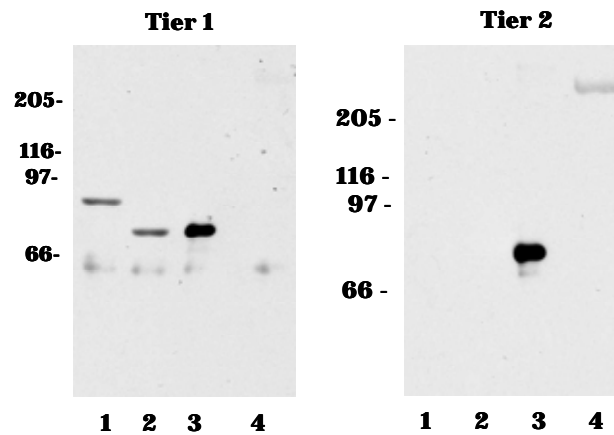


Abb. 4.8 Kreuzreaktivität des TG6 Antiserums Das Serum, welches aus Tier 1 gewonnen wurde, zeigte neben einer Reaktivität mit rekombinantem TG6 (3) auch eine Kreuzreaktivität mit rekombinantem TG2 (1) und TG3 (2), während das Serum aus Tier 2 ausschließlich rekombinantes TG6 erkennt. In Hautextrakten konnte ebenfalls ein schwaches Signal detektiert werden (4). Allerdings müsste es sich hierbei, wenn es endogenes TG6 sein sollte, aufgrund des Molekulargewichtes um ein Trimer handeln.

4.9 Affinitätsreinigung des Antiserums

Die Schwierigkeit der Affinitätsreinigung des Antiserums lag darin, dass TG6 nur mit Hilfe von SDS in Lösung gebracht werden konnte, welches nicht durch Dialyse entfernt werden kann. Es gelang daher nicht, das Protein, wie üblich, an eine Cyanbromid (CNBr)-Sephrosematrix zu koppeln. Aufgrund der problematischen Eigenschaften des rekombinanten TG6 Proteins wurde es, wie bei der Proteinaufreinigung an die Talonmatrix gekoppelt. Anschließend wurde das Protein jedoch nicht eluiert, sondern die Matrix wurde erst gewaschen und danach wurde das TG6 Antiserum über die Matrix gegeben. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich TG6 nach der Aufreinigung nur bei einem pH zwischen 7.5 und 8 eluieren lässt und es bei pH 6 präzipitiert, wurde der, für das CNBr-Sephrose Protokoll übliche Elutionsschritt bei pH 11.5 mit TEA für die Elution des affinitätsgereinigten Antikörpers gewählt.

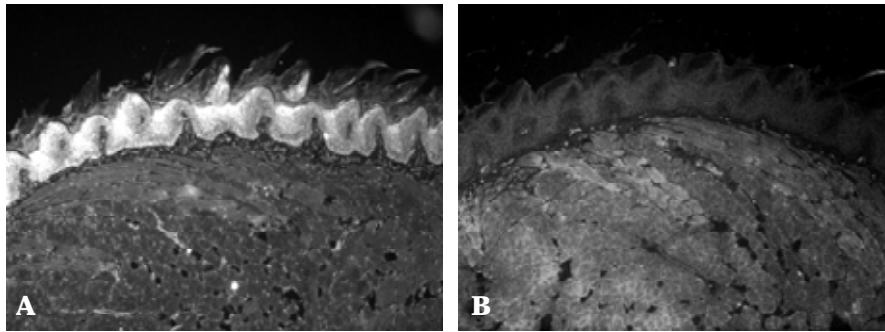


Abb. 4.9 Der affinitätsgereinigte TG6 Antikörper wurde auf Gefrierschnitten der Zunge mit einer Verdünnung von 1:200 getestet. Man erkennt deutlich das Signal im keratinisierten Epithelgewebe der Zunge (A), welches in der Negativkontrolle, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde, fehlt (B).

4.10 Aktivitätstest

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von TG3 und TG6 ergab, dass TG6 ebenfalls die Aminosäureschleife besitzt, die bei TG3 von Proteasen erkannt wird, um dass Zymogen durch proteolytische Spaltung zu aktivieren. Um näher zu untersuchen, ob TG6 eine aktive TG ist, wurde ein Aktivitätstest durchgeführt, der auf dem Prinzip beruht, dass TGs in der Lage sind, Substratproteine in Casein zu inkorporieren (Slaughter et al. 1992). Es sollte sowohl untersucht werden, ob TG6 in der Lage ist Proteine miteinander zu verknüpfen, als auch ob TG6 einer enzymatischen Spaltung bedarf, um aktiv zu sein. In einem Vorversuch wurden Homogenate transfizierter Zellen mit verschiedenen Enzymen wie Trypsin, Proteinase K und Dispase inkubiert. Im *Western blot* wurde mit einem TG6 spezifischen Antiserum getestet, ob TG6 von einem der Enzyme gespalten wird. Es zeigte sich, dass bei dem Ansatz der Dispase enthielt, zusätzliche niedermolekulare Banden von 50 und 30 kDa im Immunoblot vorhanden waren (Abb. 4.10 A) Hierbei könnte es sich, ähnlich wie bei TG3, um zwei proteolytisch freigesetzte Untereinheiten von TG6 handeln. Im Aktivitätstest konnte eine Aktivität von TG6, ähnlich der von TG2, nachgewiesen werden (Abb. 4.10 B). Allerdings war die Aktivität bei beiden TGs, nach der Zugabe von Dispase schwächer als zuvor ohne Enzym. Für dieses Experiment konnte aufgrund des notwendigen Detergenz nicht das gereinigte Protein verwendet werden. Daher wurden Homogenate transfizierter Zellen verwendet. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Zellen, sowie Ansätze die statt Calcium, EDTA enthielten. Die Positivkontrolle wurde mit rekombinantem TG2 durchgeführt.

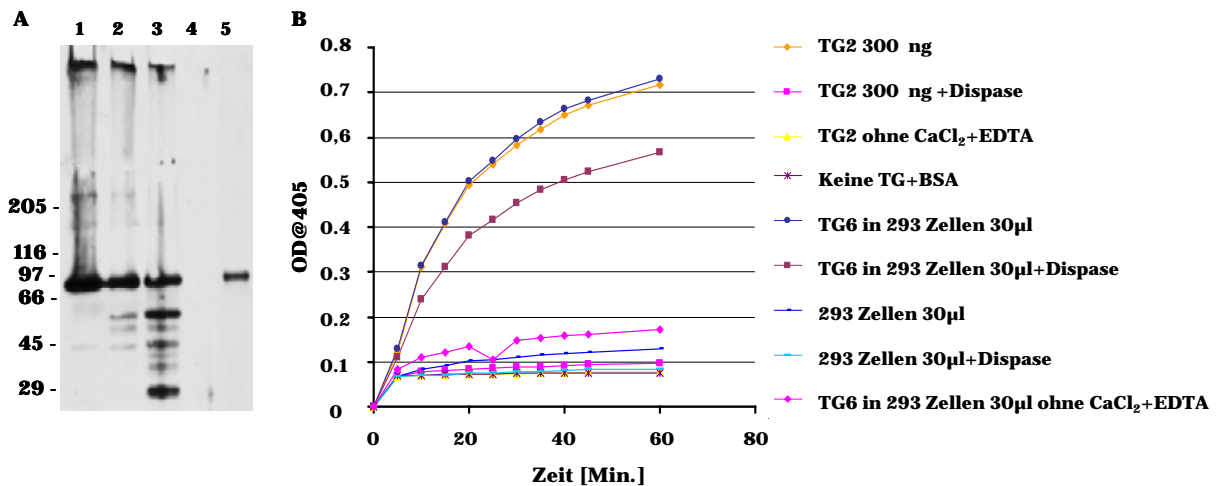


Abb. 4.10 Aktivitätstest TG6 wurde in Zellhomogenaten von transfizierten 293 EBNA Zellen (A 1-3) im *Western blot* mit einem polyklonalen Antiserum gegen TG6 detektiert, nachdem die Zellhomogenate mit Trypsin (A1), Proteinase K (A2) oder Dispase (A3) inkubiert wurden. In allen drei Proben ist die 80 kDa Bande für TG6 zu sehen, sowie auch in der Positivkontrolle mit rekombinantem TG6 (A5). In den beiden Proben, die mit Trypsin und Proteinase K behandelt wurden, sind kaum weitere Banden zu erkennen. In der mit Dispase inkubierten Probe sind, neben einigen unspezifischen Banden, zwei prominente Banden von 30 bzw. 50 kDa erkennbar (A3). Hierbei könnte es sich um Spaltungsprodukte handeln, ähnlich den proteolytisch freigesetzten Untereinheiten von TG3. Untransfizierte 293 EBNA Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet (A4). Im Aktivitätstest (B) konnte gezeigt werden, dass es sich bei TG6 um eine aktive TG handelt. Die hier gezeigte Aktivität ist mit der von TG2 (Positivkontrolle) vergleichbar. Die Inkubation mit Dispase führt bei beiden Enzymen zu einem Rückgang der Aktivität.

4.11 TG6 mRNA in verschiedenen Geweben

Neben den biochemischen Eigenschaften des TG Proteins, sollte auch untersucht werden, in welchen Geweben TG6 exprimiert wird. Hierzu wurde die mRNA aus der Gesamt-RNA verschiedener Gewebe adulter Mäuse isoliert. Danach wurden je 5 µg mRNA auf ein Formamid-Agarosegel aufgetragen und mittels *Northern blot* analysiert. In Anschluß an die Hybridisierung des Blots mit einer TG6-spezifischen Sonde, wurde die Membran für eine erneute Hybridisierung vorbereitet und zur Überprüfung der aufgetragenen mRNA Mengen mit einer Sonde gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) inkubiert. Es konnte ausschließlich ein Signal für TG6 in der Haut detektiert werden, obwohl eine zuvor durchgeführte RT-PCR auch Signale in anderen Geweben gezeigt hatte und ein breiteres Expressionsmuster für TG6 vermuten ließ.

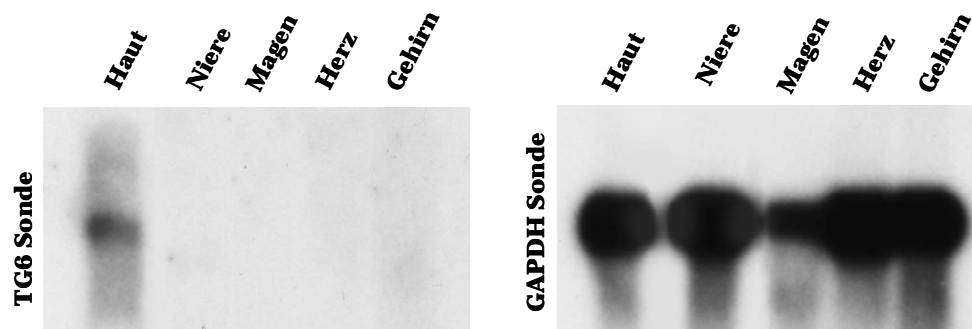


Abb. 4.11 Northern blot Analyse Es wurden je 5 µg mRNA aus Haut, Niere, Magen, Herz und Gehirn aufgetragen. Man erkennt ein deutliches TG6 Signal in der Haut. Derselbe Blot wurde nacheinander mit einer TG6 und GAPDH cDNA Sonde hybridisiert.

III. Diskussion

1. Die Haut TG3-defizienter Tiere

1.1 TG3 ist für die Entwicklung der Haut und ihrer Barrierefunktion nicht essentiell

Wir konnten mit der Etablierung unserer TG3-defizienten Mauslinie zeigen, dass entgegen der Behauptung, dass die Deletion des TGM3 Gens eine frühe embryonale Sterblichkeit zur Folge habe (Kim et al. 2002), der Verlust von TG3 in Mäusen nicht embryonal letal ist. TG3-defiziente Tiere zeigen nach ihrer Geburt, abgesehen von ihrer Haaranomalie und einem geringeren Gewicht, keine sichtbaren Unterschiede in Verhalten oder Motorik im Vergleich zu ihren wildtypischen und heterozygoten Geschwistern. Sie sind fertil und haben eine, so weit wir dies bisher verfolgen konnten, dem Wildtyp entsprechende Lebenserwartung. Dies lässt darauf schließen, dass die postnatale Entwicklung durch den Verlust von TG3 relativ unbeeinflusst ist. Die Morphologie und Histologie der adulten Haut sind bei Wildtyp und Mutante vergleichbar, sowohl auf mikroskopischer als auch auf ultrastruktureller Ebene. In der Immunofluoreszenz weisen verschiedene Strukturproteine, wie die Keratine 1, 6, 10 und 14, sowie Lorikrin und Involukrin, ein Signal von vergleichbarer Intensität in der Haut beider Genotypen auf. Daneben unterscheidet sich auch die Löslichkeit dieser Proteine bei den TG3-defizienten Tieren nicht vom Wildtyp, weder in adulter, noch in embryonaler Haut zum Zeitpunkt E16,5. Der einzige signifikante Unterschied zwischen der Haut von adulten Mutanten und der des Wildtyps ist eine leicht erhöhte Löslichkeit des TG3 Substrates Trichohyalin (THH) bei den Mutanten. Offensichtlich ist die Quervernetzung von THH durch TG3 nicht vollständig durch andere TGs kompensierbar, was sich auf die Löslichkeit von THH auswirkt (siehe Abschnitt 2.4). Wenn man bedenkt, dass Vermutungen zu Folge 75% der TG Aktivität der Epidermis auf TG3 zurückzuführen sein soll (Kim et al. 1995), ist das Ausbleiben gravierender Effekte auf die Funktion und Beschaffenheit der Haut der Mutanten relativ überraschend. Andererseits liegt durch die Tatsache, dass sechs weitere TGs in der Haut exprimiert werden die Vermutung nahe, dass das Fehlen von TG3 durch eine oder mehrere der anderen TG Isoformen kompensiert werden kann. Dennoch konnte, mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine Änderung der Expression von TG1, TG2 und TG6 nachgewiesen werden. Auch bei einer anderen TG

Mutation, in TG1 Nullmäusen konnte keine veränderte TG2 bzw. TG3 Expression detektiert werden (Matsuki et al. 1998). In diesem Fall ist die Kompensation durch andere TGs, aufgrund der essentiellen Rolle von TG1, nicht möglich und der Verlust von TG1 hat gravierende Schäden der Barrierefunktion zur Folge (Matsuki et al. 1998, Kuramoto et al. 2002) (siehe 1.2).

1.2 Hinweise auf eine mögliche Kompensation von TG3 in der Haut

Wenn man von den schwerwiegenden Auswirkungen des TG1^{-/-} Phänotyps absieht, gibt es andere Fälle, die belegen, dass der Verlust von bestimmten CE Komponenten, nicht so drastische Effekte hervorrufen muss, wie man zuvor vermutet hatte. Beispielsweise zeigen die Deletionsmutanten der Gene für Lorikrin, Involukrin und Envoplakin, dass ihr Verlust ohne nachhaltige Auswirkungen auf das Erscheinungsbild und die Barrierefunktion der Haut bleibt. Lorikrin^{-/-} Mäuse (Koch et al. 2000) weisen mit Hilfe der Toluidin Blaufärbung eine verzögerte Entwicklung der Barrierefunktion zum Zeitpunkt E16,5 auf. TG3-defizienten Tiere zeigen eine ähnliche Färbung zum Zeitpunkt E17,5 und in beiden Fällen scheint die Entwicklung der Hautbarriere einen Tag später abgeschlossen, da keine Retention des Farbstoffes mehr zu sehen ist. Dennoch ist bei den Lorikrinmutanten eine postnatale Rötung der Haut, die glänzend und durchsichtig wirkt, vorhanden, welche mit zunehmendem Alter (ab P4-5) nachlässt und sich normalisiert. Neugeborene Lorikrin Nullmäuse sind ohne histologischen Befund der Haut, jedoch ist die Stabilität der Korneozyten, unter besonders starker, mechanischer Belastung eingeschränkt. Der relativ milde Phänotyp ist, unter anderem auf die erhöhte Expression der anderen CE Komponenten, Repentin und bestimmter SPRPs, in Lorikrin-defizienten Tieren zurückzuführen. Envoplakin-defiziente Mäuse zeigen dieselbe Entwicklungsverzögerung während der Embryonalstadien E16,5-E17,5 wie Lorikrin^{-/-} Tiere, mit einem ebenfalls normalen Erscheinungsbild nach der Geburt (Määttä et al. 2001). Involukrin Nullmäuse weisen keine sichtbaren Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf, wobei die Embryonalstadien bislang nicht genauer untersucht wurden (Dijan et al. 2000). In beiden Fällen ist noch unklar, welche Faktoren das Fehlen von Envoplakin bzw. Involukrin kompensieren. So wie der Verlust dieser CE Komponenten durch andere kompensiert werden kann, so wäre dieser Mechanismus auch im Fall der TGs denkbar. Ein Hinweis für eine mögliche Redundanz zwischen den einzelnen Mitgliedern der TG Familie ist der überraschend milde Effekt der Deletion des TGM2 Gens. Der Verlust von TG2 hat keinen offensichtlichen Phänotyp

zur Folge (De Laurenzi und Melino 2001), obwohl es sich bei TG2 um eine ubiquitär exprimierte TG handelt, die in vielfältige biologische Prozesse involviert ist (Thomazy und Fesus 1989). Erst bei weiterführenden Untersuchungen konnten Veränderungen wie z.B. eine Glukoseintoleranz bei den Mutanten festgestellt werden (Bernassola et al. 2002). Hinweise auf die Expression der anderen TG Isoformen in den TG2-/- Tieren fehlen allerdings in den jeweiligen Publikationen. Das Gegenteil zeigt sich bei der Deletion des TGM1 Gens. Der Verlust von TG1 kann offensichtlich nicht kompensiert werden und führt daher zu einem schwerwiegenden Phänotyp. Der Tod der Mutanten wenige Stunden nach der Geburt aufgrund von Dehydrierung ist die Folge. TG1-/- Mäuse leiden unter einer gestörten Barrierefunktion der Haut aufgrund einer unvollständigen Degradierung einzelner Zellkomponenten während der Keratinisierung. Die Folge ist eine fehlerhafte Zusammensetzung des CE und damit ein defektes *stratum corneum* (Matsuki et al. 1998). Betrachtet man die zuvor aufgeführten Deletionsmutanten in Zusammenhang mit dem hier gezeigten Phänotyp für TG3-defiziente Tiere, so scheint die Rolle von TG3 als epidermale TG für die Ausbildung der Barrierefunktion der Haut nicht essentiell und durch andere, in der Haut exprimierte, Isoformen kompensierbar. Hierfür spricht auch die Retention von Toluidin Blau in der Haut mutanter Embryonen zum Zeitpunkt E17,5 die bereits einen Tag später nicht mehr vorhanden ist. Des Weiteren sind TG3-defiziente Korneozyten, selbst unter mechanischer Belastung, ebenso stabil wie die des Wildtyps. Ein potentieller Kandidat für die Kompensation von TG3, neben den hier untersuchten TGs 1, 2 und 6, könnte TG5 sein. TG5 wird unter anderem in den oberen Epidermisschichten exprimiert (Aeschlimann et al. 1998, Grenard 2001, Candi et al. 2001), wobei sich die Expression im oberen Teil des *stratum granulosum* mit der von TG3 überschneidet (Candi et al. 2002). Man nimmt an, dass TG5 auch an der Zusammensetzung des CE beteiligt ist (Aeschlimann et al. 1998, Candi et al. 2001) da TG5 eine hohe Affinität zu Lorikrin, Involukrin und SPRPs besitzt (Candi et al. 2002). Leider konnte die Expression von TG5 in TG3 Nullmäusen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da uns kein adäquater Antikörper zur Verfügung stand. Eine weitere TG, die für eine Kompensation von TG3 in Frage käme, ist TG6. Durch unsere bisherigen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass auch TG6 in der Haut exprimiert wird. Auch wenn in der Immunofluoreszenz bisher kein Unterschied in der Signalintensität oder dem Expressionsmuster zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden konnte, so bedarf es dennoch

einer genaueren Analyse der *in vivo* Expression von TG6 aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit TG3.

1.3 Embryonale Expression von TG3

TG3 wird vorwiegend von Keratinozyten während der späten Differenzierungsphase der Epidermis exprimiert. TG3 mRNA kann schwach zwischen E11,5-E14,5 mittels semiquantitativer RT-PCR im Periderm detektiert werden (Zhang et al. 2005). Das Periderm ist ein vorläufiges, einschichtiges Epithel. Die Peridermzellen werden vom Fruchtwasser nach und nach abgeschliffen (Polakowska et al. 1994) und durch sich differenzierende Keratinozyten ersetzt, um letztlich eine funktionsfähige Epidermis zu bilden (Piacentini et al. 2000). Die TG3 mRNA Expression nimmt während der Keratinisierung der Epidermis, zwischen E15,5 und E17,5 bis zur Geburt zu (Zhang et al. 2005). Die Entstehung und Komplettierung eines funktionellen *stratum corneum* findet ungefähr im gleichen Zeitraum, zwei bis drei Tage vor der Geburt, statt (Aszterbaum et al. 1992). Auch wenn dies eine wichtige Rolle von TG3 in der epidermalen Entwicklung bereits während der Embryonalentwicklung vermuten lässt, konnte im Rahmen dieser Arbeit außer dem Größenunterschied zwischen mutanten und wildtypischen Embryonen, der bis ins Erwachsenenalter bestehen bleibt, sowie einer möglichen Entwicklungsverzögerung, angedeutet durch die Retention von Toluidin Blau auf mutanter Haut zum Zeitpunkt E17,5, keine massive Retardierung festgestellt werden. Ein TG3 Signal in der Immunofluoreszenz konnte zudem, in eigenen Vorarbeiten (John, Diplomarbeit 2002), erst nach der Geburt detektiert werden. Dieses Signal nahm ebenfalls in dem untersuchten Zeitraum zwischen P0 und P5, sowie in adulten Tieren an Intensität zu. Auf Schnitten von embryonalem Gewebe der Stadien E10,5 bis E18,5 war kein Nachweis des TG3 Proteins in der Immunofluoreszenz möglich. Dennoch ist eine Rolle von TG3 in den frühen Entwicklungsstadien vor E16,5 nicht ausgeschlossen. Zusätzliche Untersuchungen des Periderms könnten Aufschluß darüber geben. Das Ergebnis der Toluidin Blaufärbung könnte ein Hinweis auf eine verlangsamte Entwicklung der Barrierefunktion oder aber auf eine verlangsamte Gesamtentwicklung sein. Die Entwicklung der Hautbarriere folgt einem dorso-ventralen Verlauf (Hardman et al. 1998), was die, auf den ventralen Bereich der Mutanten beschränkte, Blaufärbung am Tag E17,5 und deren Verschwinden einen Tag später erklärt. In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass es beim Wildtyp eine Übergangsphase in der Entwicklung der Barrierefunktion zwischen E16,5 und E17,5 gibt (Hardman et al.

1998, Segre et al. 1999). Die Retention von Toluidin Blau während der verschiedenen Embryonalstadien der Lorikrin- und Envoplakinmutanten ist am Tag E17,5 nicht mehr zu beobachten, während bei TG3 Nullmäusen zu diesem Zeitpunkt die Blaufärbung des ventralen Bereiches der Mutanten besteht. Nimmt man eine vernachlässigbare Rolle von TG3 bei der Etablierung der Barrierefunktion der Haut an und berücksichtigt man, dass TG3 auch noch in anderen Geweben wie dem Gehirn und dem Herz exprimiert wird (Hitomi et al. 2001), so könnte man dieses Ergebnis als eine Entwicklungsverzögerung *per se*, unabhängig von der Entwicklung der Barrierefunktion interpretieren. Ein weiterer Hinweis dafür wäre auch die verzögerte Augenentwicklung einiger Mutanten zum Zeitpunkt E16,5 und der Größenunterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Andererseits könnte man auch für die Embryonalentwicklung annehmen, dass TG3 ab einem bestimmten Stadium von der, für die Barrierefunktion so wichtigen, TG1 kompensiert werden kann. Ein möglicher Hinweis darauf könnte die, durch den TGM1 Promotor angetriebene Expression des lacZ Gens in transgenen Mäusen, ab dem Zeitpunkt E17,5 in keratinisierten Epithelien sein (Yamada et al. 1997). Zwischen E12,5 und E16,5 konnte bei diesen transgenen Mäusen kein TG1 Signal detektiert werden. Somit wäre es denkbar, dass TG1 ab dem Embryonalstadium E17,5 die Aufgaben von TG3 während der Hautentwicklung mit übernehmen kann.

2. Die Haare TG3-defizienter Tiere

2.1 TG3 ist eine Haarfollikel TG

Die Funktion von TG3 als epidermale TG hat offenbar einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Entwicklung und Erhaltung der Haut und ihrer Funktionen. Dennoch lässt sich eine essentielle Rolle für TG3 als Haarfollikel TG postulieren, deren Aufgabe bei der Entwicklung der Haarstruktur der Maus nicht durch andere TGs oder andere Komponenten übernommen werden kann. Im Gegensatz zum Wildtyp haben TG3 Nullmäuse gewelltes Fell und ihre Schnurrhaare sind gekrümmt und unregelmäßig. Des Weiteren sind die einzelnen Haare des Fells dünner bzw. der Prozentsatz an Deckhaaren, die einen größeren Durchmesser haben, ist bei den Mutanten geringer. Die Kutikula weist sowohl im Lichtmikroskop als auch im Rasterelektronenmikroskop ein unregelmäßiges Erscheinungsbild auf. Auffällig ist, dass dieser Haarphänotyp in jungen Tieren sehr ausgeprägt ist, mit zunehmendem

Alter aber deutlich abnimmt. Dieser Vorgang fällt mit einem neuen Haarzyklus zusammen.

2.2 Morphogenese und Wachstumszyklen des Haarfollikels

Der Haarfollikel ist eine komplexe Struktur, dessen Wachstum durch die Interaktion einer Vielzahl von Genen reguliert wird, von denen noch viele unbekannt sind. Jeder Haarfollikel durchläuft lebenslang wiederkehrende Zyklen, die von Wachstum (anagen), Regression (katagen) und anschließender Ruhe (telogen) bestimmt werden (Stenn und Paus 2001). Die Haare der Mutanten sind während der ersten vier Wochen noch stark gewellt, was im Anschluß an weitere Haarzyklen nachlässt. Der Vergleich von 2-4 Wochen alten Tieren mit 8 Wochen und älteren Tieren zeigt ein Nachlassen des gewellten Haares bei den Mutanten, wobei ein leicht „plüschiges“ Erscheinungsbild zurückbleibt. Die Dauer der Wachstumsphase eines Haarzyklus beträgt bei der Maus ca. 17 Tage, die Regression ca. 2 Tage (Randall und Dushoff 1956, Parakkal 1970, Sundberg und King 1996). In Anschluss an die Ruhephase treten die Haarfollikel erneut in die anagene Phase und somit in den nächsten Haarzyklus ein (Slee 1962, Sundberg und King 1996). Der erste postnatale Haarzyklus setzt drei Wochen nach der Geburt ein (McGowan et al. 2002). Somit könnte man spekulieren, dass unbekannte Faktoren, die pränatal noch nicht ihre vollständige Wirkung entfalten konnten, im Laufe späterer Haarzyklen in der Lage sind, den Haarphänotyp zu kompensieren. Eine andere mögliche Erklärung wäre der anfängliche Verlust bzw. das spätere Nachwachsen eines bestimmten Haartyps. Das Fell der Maus gliedert sich in verschiedene Haartypen: Leithaare (2%), Ahlen- und Knickhaare (28%), welche zu den Deckhaaren zählen, sowie Zick-Zack Haare (70%), die zu den Flaumhaaren (Unterfell) gehören (Sundberg und Hogan 1994). Es wäre denkbar, dass TG3-defiziente Tiere einfach dünnere Deckhaare oder keine bzw. weniger Deckhaare und/oder mehr Zick-Zack Haare besitzen. Letzteres ist aber insofern unwahrscheinlich, da Zick-Zack Haare viel kürzer sind als Leithaare und bei makroskopischen Untersuchungen des Fells nicht offensichtlich war, dass die Haare der Mutanten kürzer sind. Die Annahme hingegen, dass die vorhandenen Deckhaare der Mutanten dünner sind als die des Wildtyps könnte man dadurch erklären, dass die Zellen des normalerweise ein- bis zweireihigen Haarmarks (Medulla) der Leit- und Knickhaare bzw. das zwei- bis vierreihige Mark der Ahlenhaare, durch den Verlust von TG3, die im Mark des Wildtyps exprimiert wird (Lee et al. 1993), eine morphologische Änderung erfahren. In den bisherigen Untersuchungen von

Sagittalschnitten der Haare im Transmissionselektronenmikroskop konnte kein Hinweis hierauf gefunden werden. Dennoch wäre es denkbar, dass transversale Schnitte und zusätzliche Färbungen einen möglichen Unterschied besser sichtbar machen könnten. Die irreguläre Erscheinung der Kutikula lässt sich möglicherweise durch eine verringerte Verhornung der Kutikulaschuppen erklären. Der Durchmesser des Haares wird unter anderem durch den Verhornungsgrad bestimmt. Je verhornter das Haar, desto dicker ist es. Andererseits könnte das mutante Haar gegenüber Chemikalien empfindlicher sein als das wildtypische. Daher könnte die unregelmäßige Kutikula der Mutanten auch durch die Fixierung für das Elektronenmikroskop noch zusätzlich begünstigt worden sein. Die Keratinisierung im Haarfollikel findet in Wachstumsrichtung, in den verschiedenen Schichten zu verschiedenen Zeitpunkten statt. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit der Differenzierung der Keratinozyten in der Epidermis. Die Außenkutikula ist die letzte Schicht, welche keratinisiert (Forslind 1985). Somit könnte man die Toluidin Blau Rückstände in den Ansätzen der Schnurrhaare von TG3-defizienten Tieren damit erklären, dass auch bei der Entwicklung der Schnurrhaare die Mutanten in der Entwicklung geringfügig zurückbleiben. Wahrscheinlich ist der Haaransatz, im Gegensatz zum distalen Bereich des Haares der Mutanten noch nicht vollständig keratinisiert. Des Weiteren nimmt in älteren Haaren auch der Grad an Quervernetzungen zu, die offensichtlich in den Mutanten anders als im Wildtyp ausgebildet sind.

2.4 Atypische Quervernetzung und Löslichkeit von Haarproteinen

Die Erklärung, welche aufgrund der *in vitro* Eigenschaften von TG3 am plausibelsten für den Haarphänotyp scheint, ist eine mögliche Änderung der Quervernetzung von Haarproteinen, die als TG3 Substrate fungieren. Im Wildtyp ist eine Analyse von Haarproteinen aufgrund der geringen Löslichkeit nicht trivial und nur mit Hilfe von Detergenzien möglich (Clarke und Rogers 1970). Einer der Gründe für die geringe Löslichkeit ist die Aktivität von TGs im Haarfollikel (Chung und Folk 1972), welche für die Ausbildung bestimmter Quervernetzungen zwischen verschiedenen Haarproteinen verantwortlich ist (Harding und Rogers 1972). Besonders unlöslich sind die Proteine der Medulla und der Kutikula (Lee et al. 2006). Bei unseren Untersuchungen zur Löslichkeit verschiedener Haarkomponenten in TG3-defizienten Mäusen stellten wir fest, dass einige Proteine, die im Wildtyp kaum oder gar nicht extrahiert werden konnten, in den Mutanten eine viel höhere Löslichkeit aufwiesen.

Unterschiede zeigten sich bei der Extraktion von THH, Involukrin und Keratin 14. Während sich Involukrin und Keratin 14, wenn auch in weitaus geringerer Menge als bei den Mutanten, aus wildtypischen Haaren extrahieren ließen, so war die Änderung der Löslichkeit von THH am stärksten. THH ist das Hauptstrukturprotein der inneren Wurzelscheide und der Medulla. Es besitzt ein Molekulargewicht von über 200 kDa und ist unter physiologischen Bedingungen unlöslich (Tarcsa et al. 1997). Bei jungen TG3-defizienten Tieren (P 14) war bereits eine geringfügige Löslichkeit von THH erkennbar, die bei älteren Tieren (3 Monate) drastisch zunahm. Im Gegensatz dazu ließ der Haarphänotyp mit zunehmendem Alter nach. Im Wildtyp war es zu keinem Zeitpunkt möglich THH aus den Haaren zu extrahieren. Neben THH wird auch TG3 in den Medullazellen und der inneren Wurzelscheide wildtypischer Haare exprimiert (Rothnagel und Rogers 1986, Lee et al. 1993). Mit seinem hohen Anteil an Glutamin- und Lysinresten stellt THH ein hervorragendes *in vitro* Substrat für TG3 dar (Tarcsa et al. 1997) und man kann aufgrund unserer Ergebnisse annehmen, dass THH auch *in vivo* eine besondere Affinität zu TG3 besitzt. Man nimmt sogar an, dass TG3 absolut notwendig für die Quervernetzung von THH im Haar ist (Langbein et al. 2003). Die Modifikation von THH besteht in der Umwandlung von Arginin- zu Citrullinresten und erfolgt durch das Enzym Peptidylarginindeiminase (Rogers et al. 1977). Anschließend wird die von TG3 vermittelte Quervernetzung von THH mit Keratin Intermediär Filamenten (KIF) umgesetzt (O'Guin et al., 1992, Lee et al. 1993, Steinert et al. 2), wodurch das Haar besonders stabilisiert wird. Offensichtlich kann diese Quervernetzung im Haar nicht durch andere TGs wie TG1, 2 oder 5 übernommen werden, obwohl z.B. TG1 auch in der inneren Wurzelscheide exprimiert wird. Die Auswirkung des Ausbleibens der TG Aktivität auf das Löslichkeitsverhalten von Haarproteinen, wurde bereits bei Patienten mit lamellarer Ichtiose (LI) untersucht, deren Haarproteine aufgrund ihrer TG1 Defizienz ebenfalls eine höhere Löslichkeit aufwiesen (Rice et al. 1999). Auch wenn sich in der Haut TG3-defizienter Tiere ebenfalls eine geringfügig höhere Löslichkeit von THH gezeigt hat, sind bisher weder in der Haut noch in anderen THH exprimierenden Geweben der TG3 Mutanten, mit Ausnahme des Ösophagus (siehe 2.7), Veränderungen beobachtet worden. Dies ist in sofern überraschend, da die Expression von THH in Haut, Haar, Ösophagus, keratinisiertem Magen und den keratinisierten Papillen der Zunge mit der von TG3 zusammenfällt. Neben THH ließen sich, wie bereits erwähnt, auch Involukrin und Keratin 14 leichter aus den Haaren der Mutanten extrahieren. Dies könnte man im Fall von Involukrin darauf

zurückführen, dass Involukrin und THH verwandte Proteine sind und eine ähnliche Sekundärstruktur besitzen, die sie als TG3 Substrat begünstigt (Lee et al. 1999).

2.5 Löslichkeit von speziellen Haarkeratinen

Keratine gliedern sich in zwei verschiedenen Gruppen. Es gibt die Gruppe I der aziden Keratine und die Gruppe II der basischen/neutralen Keratine. Über 50 Keratin Gene sind bisher bekannt (Coulombe und Omary, 2002) und es wird meist ein Keratin der Gruppe I mit einem Keratin der Gruppe II als Polymerisierungspartner paarweise exprimiert (Coulombe 1993, Hatzfeld und Franke 1985). Keratin 14 gehört ebenso wie Keratin 17 zu den Keratinen der Gruppe I. Die bedeutend höhere Löslichkeit von Keratin 14 aus TG3-defizienten Haaren konnte im *Western blot* nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine deutlich erleichterte Proteinextraktion aus mutanten Haaren in einem Coomassie gefärbten SDS Gel beobachtet. Während im Haarextrakt des Wildtyps kaum Protein detektiert werden konnte, zeigten sich im Proteinextrakt mutanter Haare zwei definierte Banden. Die anschließende *mass fingerprint* Analyse der beiden Banden aus der SDS PAGE ergab, dass es sich um Keratin 17 und Keratin 6 hf, einen Haarfollikel spezifischen Keratin 6-Typ handelt. Sowohl Keratin 17 als auch Keratin 6 hf werden in der *companion* Schicht, der innersten Schicht der äußeren Wurzelscheide (Orwin 1971, Ito 1986,), sowie in Matrix- und Medullazellen des Haarfollikels exprimiert (Trojanovsky et al. 1989, McGowan und Coulombe 1998, 2000, Wang et al. 2003). Die Gene für Keratin 17 in Mensch und Maus, als auch die vorhergesagte Proteinsequenz enthalten hochkonservierte Bereiche (Trojanovsky et al. 1992, McGowan und Coulombe 1998). In der humanen Haut erfolgt die Induktion des Keratin 17 Gens unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei viralen Infektionen, Entzündungen und akuten Verletzungen der Haut, die eine erhöhte Proliferation und anormale Differenzierung zur Folge haben (Weiss et al. 1984, Jiang et al. 1994, Leigh et al. 1995). *Missense* Mutationen in der Primärsequenz von Keratin 17 können das Krankheitsbild der *pachyonychia congenita* (PC) vom Typ 2 hervorrufen (McLean et al. 1995). Die veränderte Keratin 17 Synthese in PC Patienten ist möglicherweise die Erklärung für die verdrillten Haare (*pili torti*) der Patienten und unter Umständen ein Hinweis auf die Rolle von Keratin 17 bei der Haarmorphogenese. Zusätzlich weisen Keratin 17 Nullmäuse eine, von der jeweiligen Mauslinie abhängige, Alopezie auf, die mit Beginn des ersten postnatalen Haarzyklus durch Keratin 16 kompensiert werden kann und nachlässt. Bevor die Kompensation einsetzt, sind Defekte sowohl in

der Histologie als auch der Ultrastruktur von Medulla, Matrix und äußerer Wurzelscheide der Mutanten zu beobachten (McGowan et al. 2002). Eine Erkrankung, die mit Keratin 6 hf in Verbindung steht, ist *pseudofollikulitis barbae*, eine durch Reizung hervorgerufene Entzündung des Haarfollikels, die durch einen natürlich vorkommenden Polymorphismus des Keratin 6 hf Gens begünstigt wird (Winter et al. 2004). Somit lässt sich abschließend festhalten, dass basierend auf unseren eigenen Ergebnissen und denen anderer Arbeitsgruppen, Keratin 17 offensichtlich bei der Entwicklung der Haare und ihrer wildtypischen Eigenschaften eine bestimmte Rolle einnimmt, die weiterer Klärung bedarf. Bis jetzt ist noch unklar, in wieweit Keratin 6 hf in den TG3 Mutanten von Bedeutung ist. Die Hypothese, dass es sich bei Keratin 6 hf um den potentiellen Polymerisationspartner von Keratin 17 handeln könnte wurde bereits von anderen Gruppen in Zweifel gezogen, da Keratin 17 zeitlich deutlich vor Keratin 6 hf exprimiert wird (Winter et al. 1998). Dennoch deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Quervernetzung von THH *in vivo* von TG3 umgesetzt und durch den Verlust von TG3 beeinträchtigt wird. Die involvierten Keratine bei der Ausbildung einer stabilen Matrix aus THH und KIF könnten, neben anderen, Keratin 17 und Keratin 6 hf sein, die durch das Fehlen von TG3 ebenfalls nicht in der üblichen Form quervernetzt werden können, was ihre erhöhte Löslichkeit erklärt. Daher lässt sich eine essentielle Rolle von TG3 bei Quervernetzungen im Haar und somit bei der Entwicklung der Haarstruktur postulieren.

2.6 Andere Mausmodelle mit ähnlichen Haaranomalien

Es existieren über 40 Gene, die mit einer gestörten Haarentwicklung in Mäusen assoziiert sind (Paus et al. 1997). Im Folgenden wird eine Auswahl von Mutationen aufgeführt, die zeitweise einen ähnlichen Phänotyp wie TG3-defiziente Tiere aufweisen. Die spontan auftretenden Mutationen *waved-1* (Crew 1933), *caracul* (Dunn 1937), *frizzy* (Falconer und Snell 1952) und *wellhaarig* (Koniukhov und Kuprianov 1990, 2004) weisen alle gekrümmte Schnurrhaare in den ersten Tagen nach der Geburt (ab P2) auf, was über die gesamte Lebensdauer beibehalten wird. Nach Auswachsen der restlichen Haare wird ein gewelltes Fell sichtbar, was in den ersten 2-4 Wochen relativ ausgeprägt ist. Mit Beginn des zweiten Haarzyklus lässt dieser Phänotyp nach und nur für *frizzy* ist beschrieben, dass alle Haartypen bei den Mutanten vorhanden sind. Die Mutation von *waved-1*, einem Allel des TGF α Gens, weist zusätzlich zu dem Haarphänotyp bei älteren Tieren eine Hornhautentzündung der Augen auf (Mann et al. 1993). Der Haarphänotyp der *waved-1* bzw. TGF α

Mutante ist eines der zahlreichen Beispiele, bei denen der Einfluß von Wachstums- bzw. Transkriptionsfaktoren auf die Haarmorphogenese nachgewiesen werden konnte (Herbert et al. 1994, Rosenquist und Martin 1996, St. Jacques et al. 1998). *Caracul*^{-/-} Mäuse besitzen überwiegend Zick-Zack- und Ahlenhaare, wobei der Durchmesser der Medulla in den Zick-Zackhaaren variiert. Ansonsten sind *Caracul*^{-/-} Mäuse, wie die anderen Mutanten lebensfähig und fertil. Es gibt Spekulationen, dass die Haaranomalie in *Caracul*^{-/-} Mäusen auf einer veränderten Keratinexpression basiert (Compton et al. 1991, Kikkawa et al. 2003). Die Mutante, welche optisch den TG3-defizienten Tieren am ähnlichsten ist, ist *wellhaarig*. Homozygote weisen ebenfalls dünnere Haare auf und der Haarphänotyp wird durch den Verlust bestimmter Haartypen und zu Beginn des zweiten Haarzyklus gemildert. Die Mutanten sind ebenfalls kleiner als ihre wildtypischen Geschwister. Interessanterweise ist das *wellhaarig* Gen, genau wie TG3, auf dem murinen Chromosom 2 lokalisiert. Die genaue chromosomale Lokalisation von *wellhaarig* (MGI 98947) ist bisher nicht bekannt, jedoch haben Datenbankrecherchen (www.ensembl.org) ergeben, dass es Teil eines Genclusters bei 130 Mb auf Chromosom 2 ist. Damit befindet es sich in unmittelbarer Nähe von TGM3 (MGI 98732) welches bei 129,5 Mb lokalisiert ist. Da bei beiden Mutationen heterozygote Tiere keinen Phänotyp aufweisen, könnte man durch Komplementationsanalysen von TG3^{+/-} und *wellhaarig*^{+/-} Tieren herausfinden, ob *wellhaarig* ein Allel von TGM3 ist, wie es auch bei *waved-1* und TGF α der Fall ist.

2.7 Ungeklärte Aspekte der bisherigen Ergebnisse

Wir konnten in der Retina adulter, wildtypischer Tiere ein Signal für TG3 in der Immunofluoreszenz detektieren, jedoch scheint das Sehvermögen TG3-defizienter Tiere intakt und die Augen wirken bei oberflächlicher Betrachtung normal. Der tatsächliche Grund für den Größenunterschied bzw. das verringerte Gewicht der Mutanten konnte bisher nicht gefunden werden. Morphologie und Histologie von Gehirn, Herz und Niere waren, wie bei den anderen untersuchten Geweben vergleichbar in Wildtyp und Mutante. Ein signifikanter transepidermaler Wasserverlust war bei den TG3-defizienten Tieren nicht vorhanden und auch Verzögerungen oder Anomalien bei der Knochenentwicklung konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die noch ausstehenden Experimente zur Wundheilung der Mutanten könnten unter Umständen mögliche Schwachstellen TG3-defizienter Haut, wie z.B. eine verlangsamte oder eingeschränkte Wundheilung

sowie starke Kelluidbildung in Folge mechanischer Verletzungen oder einer Hypersensibilität gegenüber chemischer Reizungen der Haut offen legen. Auch eine erhöhte Expression anderer TG Isoformen in Folge einer solchen Irritation der Haut könnte möglicherweise leichter zu detektieren sein. Besonders rätselhaft bleibt der verringerte Durchmesser des Ösophagus in TG3-defizienten Tieren, der in zwei verschiedenen Mutanten untersucht wurde. Eine Entzündung konnte bisher nicht nachgewiesen werden und es konnte auch nicht beobachtet werden, in wiefern dieser morphologische Unterschied die Mutanten beeinflusst. Zwar wiesen die Mutanten insgesamt eine mit dem Wildtyp vergleichbare Lebenserwartung auf, jedoch kam es auch vor, dass mutante Tiere entweder als Neugeborene oder aber erst nach einigen Wochen oder Monaten verstarben. Zum einen erschien die Anzahl an verstorbenen Tieren nicht signifikant, da es sich um fünf Tiere in einem Zeitraum von ca. 18 Monaten handelte. Zum anderen konnte keine Untersuchung *post mortem* durchgeführt werden, da die toten Mäuse umgehend von den Tierpflegern entfernt wurden. Bei Menschen mit Ösophaguskarzinom konnte festgestellt werden, dass neben anderen Veränderungen die TG3 Expression des Ösophagusgewebes stark herunterreguliert ist. Man vermutet daher, dass die Veränderung der TG3 Expression ein normaler Vorgang bei der Entstehung von Ösophaguskarzinomen ist (Chen et al. 2000). Solch eine drastische Auswirkung der TG3 Expression, wie sie bei Patienten mit Ösophaguskarzinom vorliegt, ist bei den TG3-defizienten Tieren eher unwahrscheinlich, da die Mehrzahl der Tiere gesund wirkt und lebensfähig ist. Andererseits ist der mutante Ösophagus im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden und es wäre durchaus denkbar, dass die Expression anderer Komponenten durch den Verlust von TG3 beeinflusst wird. Immerhin wird das *in vitro* TG3 Substrat Trichohyalin (THH) ebenfalls in hohem Maß im Ösophagus exprimiert (Fietz et al. 1993). THH wurde im Fall des Ösophagus nicht näher untersucht, jedoch in Haut und Haar der Mutanten zeigte es eine deutlich erhöhte Löslichkeit. In jedem Fall bedarf es weiterer Untersuchungen, um den Einfluß von TG3 auf die Morphologie des Ösophagus zu klären. Abschließend bleibt zu bemerken, dass es eher überraschend ist, dass neben den Haaren andere strukturell verwandte epidermale Anhänge, wie Zähne und Krallen der TG3 Mutanten keinen offensichtlichen Effekt aufwiesen.

3. Die Charakterisierung von TG6

3.1 Die rekombinante Expression und das Löslichkeitsverhalten von TG6

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht TG6, ein neueres Mitglied der TG Familie, welches die größte Sequenzhomologie zu TG3 besitzt, genauer zu charakterisieren. Aufgrund der Schwierigkeiten, die sich bei der Expression gezeigt haben, ließen sich einige Rückschlüsse auf die biochemischen Eigenschaften des TG6 Proteins ziehen. Es war nicht möglich eine stabile, TG6-exprimierende Zelllinie zu etablieren, da die transfizierten Zellen nicht über einen längeren Zeitraum kultiviert werden konnten. Auch wenn es möglich war, transfizierte Zellen nach 48 Stunden für die Aufreinigung zu ernten, so war die Ausbeute eher gering. Zudem war die Extraktion des Proteins aus den Zellen nur durch den Zusatz von SDS möglich und auch die Affinitätsreinigung über eine Talonmatrix war nur in Anwesenheit des Detergenz erfolgreich. Diese Eigenschaften lassen darauf schließen, dass es sich bei TG6 um ein membrangebundenes, membran-assoziiertes oder zytoskelett-assoziiertes Protein handelt. Ähnliche Probleme bei der Löslichkeit und Aufreinigung haben sich bereits für TG1, deren unlösliche Form membrangebunden ist (Steinert et al. 1996, Candi et al. 1998) und TG5 (Candi et al. 2001) gezeigt. TG5 kolokalisiert in der Immunofluoreszenz mit Aktinfilamenten und ist vermutlich mit dem Zytoskelett assoziiert. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass TG5 N-terminal acetyliert ist, was für eine Form der Verankerung spricht (Rufini et al. 2004). Sowohl für TG1 als auch für TG5 konnte die Proteinausbeute durch die Expression in einem Baculovirussystem erhöht werden. Dennoch konnte TG5 auch in diesem Expressionssystem nur mit Hilfe von SDS löslich gemacht werden. Die Tatsache, dass sich mit rekombinantem TG6 transfizierte Zellen nicht über einen längeren Zeitraum kultivieren lassen, weist auf eine mögliche toxische Wirkung von überexprimiertem TG6 hin. Ähnliches wurde bereits für TG5 beobachtet, welche bei intrazellulärer Überexpression Zelltod hervorruft (Cadot et al. 2004). Ein Hinweis darauf, dass TG6 einen ähnlichen Effekt zur Folge hat, ist die positive TUNEL Färbung der TG6 exprimierenden Zellen.

3.2 TG6 ist ein aktives Mitglied der TG Familie

TG3 ist ein Zymogen und besitzt eine Aminosäureschleife, an der noch unbekannte Proteasen eine Spaltung vornehmen, was zu einem aktiven Enzym führt (Kim et al. 1993, Ahvazi et al. 2002). Nachdem uns in der Aminosäuresequenz von TG6 eine ähnliche Struktur aufgefallen war, sollte überprüft werden, ob TG6 ebenfalls enzymatische Aktivität besitzt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese Aktivität erst in Folge von proteolytischer Spaltung auftritt. Bei der *Western blot* Analyse von Zellhomogenaten TG6 exprimierender Zellen war neben der zu erwartenden 80 kDa Bande eine weitere höhermolekulare Bande von ungefähr 160 kDa zu beobachten. Dies könnte zum einen der Hinweis auf eine Dimerbildung des TG6 Proteins sein, wobei auch ein höherer Polymerisierungsgrad nicht ausgeschlossen ist, da ein Teil der Probe nicht in das SDS Gel eingedrungen ist. Zum anderen lässt sich auf eine mögliche Fähigkeit zur Autokatalyse von TG6 schließen, was bereits für TG2 beschrieben wurde (Dieterich et al. 1997). Die Inkubation von Zellhomogenaten mit verschiedenen Enzymen wie Trypsin, Dispase und Proteinase K, welche in der Lage sind TG3 *in vitro* zu spalten, bewirkte auch bei TG6 eine Spaltung. In der *Western blot* Analyse waren mehrere Banden sichtbar, was zum Teil auch darauf zurückzuführen ist, dass die Detektion mit einem ungereinigtem Antiserum gegen TG6 erfolgte. Dennoch waren zwei prominente Banden in dem mit Dispase inkubierten Homogenat zu erkennen. Die Größe der beiden Fragmente betrug 30 und 50 kDa analog zu den Spaltungsprodukten von TG3 von 30 und 47 kDa. Somit liegt die Vermutung nahe, dass TG6 ebenfalls aus zwei Untereinheiten besteht. Die Hinweise auf eine mögliche Autokatalyse von TG6 und die Tatsache, dass die Überexpression von TG6 zu Apoptose führt, könnte durch eine konstitutive Expression von TG6, die möglicherweise keiner weiteren Aktivierung bedarf, erklärt werden. Zu diesem Zweck erfolgten Inkorporationsversuche von TG Substraten, sowohl mit als auch ohne vorheriger Inkubation von TG6 exprimierenden Zellen mit Dispase. Der durchgeführte Festphasen-Aktivitätstest zur Überprüfung der Quervernetzungseigenschaften ergab, dass TG6 offensichtlich in der Lage ist, die Inkorporation von biotinyliertem Cadaverin in Casein umzusetzen, womit nachgewiesen wäre, dass es sich bei TG6 um eine enzymatisch aktive TG handelt. Allerdings zeigte sich bei diesem Experiment auch, dass die zuvor mit Dispase inkubierten Proben eine geringere Aktivität als die unbehandelten aufwiesen. Möglicherweise hat die Spaltung von TG6 einen umgekehrten Effekt als bei TG3,

nämlich eine Inaktivierung des unter Umständen konstitutiv exprimierten Proteins zur Folge.

4. Ausblick

Einige Experimente, wie z.B. die zur Wundheilung konnten bisher noch nicht durchgeführt werden, da die Rückkreuzung der TG3-defizienten Tiere mit C57Bl/6 Mäusen noch nicht abgeschlossen war. Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich möglicherweise bei mechanischer oder chemischer Reizung der Haut Unterschiede in den Mutanten nachweisen lassen. Durch die anschließende Analyse, z.B. in der Immunofluoreszenz, kann beobachtet werden, ob die Wundreaktion in den Mutanten stärker und die Heilung beeinträchtigt oder verlangsamt ist. Hier ließe sich auch erneut die Expression anderer TGs untersuchen. Zusätzlich kann der transepidermale Wasserverlust der gereizten Haut überprüft werden. Zur weiterführenden Analysen der Haare sollte die Rolle der Keratine, speziell Keratin 17 und Keratin 6 hf und Trichohyalin genauer untersucht werden. Neben dem Nachweis mit verschiedenen Keratin Antikörpern könnten Komplementierungsexperimente mit anderen Deletionsmutanten hierbei hilfreich sein. Um die Rolle anderer TGs weiter zu klären wären sowohl zukünftige TG5^{-/-} als auch TG6^{-/-} Tiere interessante Kandidaten für diese Versuche. Eine TG6-defiziente Mauslinie wird derzeit in unserem Labor generiert. Des Weiteren wird die Charakterisierung von TG6 mit Hilfe von *in vivo* Substratanalysen, *in situ* Experimenten und der Optimierung des polyklonalen TG6 Antikörpers, zur genaueren Bestimmung des Expressionsmusters von TG6, weitergeführt.

IV. Material und Methoden

1. Material

Alle, in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme, wurden von den Firmen Biozym, Fluka bzw. Sigma, Gibco™ bzw. Invitrogen, Life Technologies, Merck und New England Biolabs bezogen. Besondere Chemikalien oder Enzyme aus anderen Quellen werden gesondert angegeben. Verwendete Lösungen und Puffer die im Folgenden nicht aufgeführt sind, wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Die Herstellung sämtlicher Lösungen wurde mit entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Millipore durchgeführt.

1.1 Klonierungsvektoren

- pBluescript KS (Stratagene)
- pCRII (Invitrogen)
- pDrive (Qiagen)
- pCep-Pu 4 (Invitrogen, modifiziert nach Kohfeld et al. 1997)

1.2 Selektionskassette

Bei der verwendeten Selektionskassette handelt es sich um das neo^r, welches einen *housekeeping gene* Promotor aus der murinen Phosphoglycerat Kinase (pgk) und ein integriertes PolyA-Signal enthält.

1.3 Oligonukleotide

Alle benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech oder Sigma Genosys bezogen.

1.3.1 Sequenzierung der Konstrukte

- T3 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA 3'
- T7 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
- M 13 5'TG TTT TTC AGT CAC CAC 3'
- M 13 reverse 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'
- TG6 Seq PrI rev 5' ACC TCG GTC ATT GTT GC 3'
- TG6 Seq PrII rev 5' CCA CAC TTA GCA GTT TCT TC 3'

- TG6 Seq PrIII rev (TG6 3' cent) **5'** CT GAC AGA AGA CAG CAT GTG GAA **3'**
- TG6 Seq PrII for **5'** GTG GTA CAA GGC CAG TGG CAG G
- TG6 Seq PrIII for (TG6 5'cent) **5'** AAG AAA CTG CTA AGT GTG G **3'**

1.3.2 Amplifikation der homologen Regionen des TG3 targeting

Konstruktes

- TGe ex6 5'arm for **5'** AAT **TCC GCG G**AT GGT GAT TGC TCC TCA ATG GCT CTT GGC **3'**
- TGe ex6 5'arm rev **5'** AAT **TGT CGA CAA** TTT **AGC TAG C** CC ACA CCA CCG GTG TAA TTA CCA CTC C **3'**
- TGe ex6 3'arm for **5'** AAT **TGT CGA CGC TAG C**AC CCA AGG ACC TGG AAT GGT AGT GTG **3'**
- TGe ex6 3'arm rev **5'** AAT **TGT CGA CTG** ACG TTC AGC AAG TCA GTT TTC TTT GTG GCA CCC **3'**

1.3.3 TG3 Sonden für die Southern blot Analyse

- Ext 5'Sonde for **5'** GGA AGA AAG AGA AAC AAG CGC **3'**
- Ext 5'Sonde rev **5'** CCA CAT AAG CCT GAG CTC ACT CC **3'**
- Ext 3'Sonde for **5'** GTG AAT TTG TGA CTA AGC TAC **3'**
- Ext 3'Sonde rev **5'** TGA CTT ATA ATG CCT AAT ACA GTG **3'**

1.3.4 TG6 RT PCR und PCR

- Oligo dT primer
- TG6 5'HindIII **5'** TTA **AAG CTT** GCC GCC ATG GCA GGG GTC AGA ATC AC
C AAG GTC GAC TGG C **3'**
- TG6 5'cent **5'** GTG GTA CAA GGC CAG TGG CAG G **3'**
- TG6 3 cent **5'** TTC CAC ATG CTG TCT TCT GTC AGG **3'**
- TG6 3 Not **5'** TTA **AGC GGC CGC** CTT GGC TGT AGC CAC GTG GAT GAT
CAC AAA GC **3'**

1.4 Enzyme

Alle Restriktions- und DNA-modifizierenden Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und mit den mitgelieferten Puffern unter den vorgegebenen Bedingungen verwendet.

1.5 Zellkultur

Kulturschalen für eukaryotische Zellen wurden in allen Größen von Falcon und Greiner bezogen. Falls nicht anders angegeben, wurden ausschließlich Medien und deren Zusätze der Firma Gibco verwendet.

1.5.1 Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (für Fibroblasten)

- 10% (v/v) FCS (Fetal Calf Serum)
- 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (einer 0,2 mg/ml Stocklösung)
- 1% (v/v) Glutamin (einer 2 mM Stocklösung)

Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (für 293 EBNA)

- 10% (v/v) FCS (Fetal Calf Serum)
- 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (einer 0,2 mg/ml Stocklösung)
- 1% (v/v) Glutamin (einer 2 mM Stocklösung)
- G418 (50mg/ml)

Knock out Medium (für ES-Zellen)

- 20% (v/v) Serum Replacement
- 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin (einer 0,2 mg/ml Stocklösung)
- 1% (v/v) Glutamin (einer 2 mM Stocklösung)
- 7 µl Mercaptoethanol (Sigma)
- 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren
- 1% (v/v) Natrium Pyruvat
- 70 µl Escro [LIF] (10⁷ U/ml) (Chemicon)

2 x Einfriermedium für ES-Zellen

- 20% (v/v) Serum Replacement
- 20% (v/v) KO-Medium
- 10% (v/v) DMSO

2 x Einfriermedium für Fibroblasten

- 20% (v/v) FCS
- 20% (v/v) DMEM-Medium
- 10% (v/v) DMSO

1.5.2 Trypsin Inhibitor

- 5 mg Trypsin Inhibitor aus Soja/ml PBS

1.5.3 ES-Zell Lysis Puffer

- 10 mM Tris, pH 7,5
- 10mM EDTA pH 8
- 10 mM NaCl
- 0,5% N-Laurylsarcosin (Sacrosyl)
- 2 mg/ml Proteinase K

1.5.3 Mausschwanz Lysis-Puffer

- 100 mM Tris pH 8,0
- 5 mM EDTA pH 8,0
- 200 mM NaCl
- 0,2% SDS
- 0,4 mg/ml Proteinase K

1.5.5 Prä- und Hybridisierungspuffer für *Southern blots*

- 500 mM NaPO₄ pH 7, 15
- 7% SDS
- 1% BSA
- 1 mM EDTA
- 500 µg/ml denaturierte Lachssperma DNA

1.5.6 Waschlösung für *Southern blots*

- 40 mM NaPO₄ pH 7,15
- 1% SDS
- 1 mM EDTA

1.5.7 Proteinextraktionspuffer

- 20mM Hepes
- 100 mM NaCl

1.5.8 RNA Probenpuffer

- 1 µl 10 x MOPS pH 7
- 3,5 µl Formaldehyd (37%)
- 10 µl Formamid

1.5.9 RNA Laufpuffer

- 10 x MOPS + 6% Formaldehyd (37%)

1.5.10 RNA Blaumarker

- 50% Glycerol
- 1 mM EDTA pH 8
- 0.4% Bromphenolblau

1.5.11 10 x MOPS

- 20 mM MOPS
- 50 mM Natriumacetat
- 1 mM EDTA

1.5.12 TG6 Extraktions/Kopplungs/Wasch- und Elutionspuffer

- 100 mM NaH₂PO₄
- 10 mM Tris/HCl
- 1 mM PMSF
- 0,1% SDS

1.5.12 HE Färbelösungen

Hämalaun

1 g Hämatoxylin

0,2 g Natriumjodat

50 g Kaliumalaun (Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat)

50 g Chloralhydrat

1 g Zitronensäure

filtrieren und in dunkler Flasche aufbewahren

Eosinlösung (0,5%)

1% Eosin

99% Ethanol

mit ddH₂O 1:1 verdünnen

1.6 Antikörper

Die im Folgenden aufgeführten Verdünnungen wurden in der Immunofluoreszenz verwendet. Alle Antikörper, die im *Western blot* verwendet worden sind, wurden in einem Verhältnis von 1:2000 benutzt.

Primärer AK	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
α TG3, polyklonal	Kaninchen	1:50	Sardy et al. 2002
α TG2, polyklonal	Kaninchen	1:100	Neomarkers
α TG6/Serum, polyklonal	Kaninchen	1:200/1:1000	S. John
α Lorikrin, polyklonal	Kaninchen	1:2500	Covance, BAbCo
α Involukrin, polyklonal	Kaninchen	1:500	Covance, BAbCo
α Keratin 1, polyklonal	Kaninchen	1:2500	Covance, BAbCo
α Keratin 10, polyklonal	Kaninchen	1:500	Covance, BAbCo

Primärer AK	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
α Keratin 14, polyklonal	Kaninchen	1:1000	Covance, BAbCo
α THH, polyklonal	Kaninchen	1:200	O’Keefe et al. 1993
α TG3, monoklonal	Maus	1:50	Hitomi et al. 2003
α TG2, monoklonal	Maus	1:100	Neomarkers
α TG1, monoklonal	Maus	1:20	Sanbio

Sekundär AK	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
α Kaninchen IgG Cy3-gekoppelt	Ziege	1:800	Jackson Immuno Lab
α Maus IgG Cy3-gekoppelt	Ziege	1:800	Jackson Immuno Lab

2. Methoden

Die angewandten Methoden wurden nach üblichen Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt und werden im Folgenden nur näher ausgeführt, wenn besondere Modifikationen des Standardprotokolls vorgenommen wurden.

2.1 Zellkultur

Die Durchführung der Experimente mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) vom Typ 129/Ola und embryonalen Fibroblasten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die verwendeten Lösungen oder Materialien, wie z.B. Pasteurpipetten und Vorratsgefäße, wurden entweder autoklaviert oder es wurden sterile Einwegwaren benutzt. Die Zellen wurden in begasten Brutschränken mit maximaler Luftfeuchtigkeit, 37°C Umgebungstemperatur und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.1.1 Isolation von Fibroblasten aus Mausembryonen

Nach der Verpaarung von Mäusen, die das neo^r Gen exprimieren, wurde das schwangere Weibchen 14,5 Tage nach der Befruchtung (14,5 dpc; *dies post coitum*) getötet. Der Bauch der Maus wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet, ohne den

Magen-Darmtrakt zu verletzen, um Kontamination zu vermeiden. Der Uterus wurde entfernt und mit den darin enthaltenen Embryonen in PBS überführt. Die Embryonen wurden entnommen und anschließend in frisches PBS überführt. Nach Entfernung der Eingeweide, Leber, Nieren und Milz, wurden die Überreste erneut mit PBS gespült und in kleine Stücke geschnitten. Danach wurden diese für zehn Minuten bei 37°C in Trypsin/EDTA inkubiert (1 ml/Embryo). Das Gewebe wurde durch auf und ab pipettieren weiter zerkleinert und für weitere zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nach nochmaligem Pipettieren wurden 5 ml DMEM Medium zugegeben. Es wurden jeweils 2.5 ml der Zellsuspension zu 20 ml DMEM Medium pipettiert und in 750 ml Kolben im Brutschrank kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie weitere drei Tage kultiviert.

2.1.2 Einfrieren von Fibroblasten

Um die Zellen einzufrieren, wurden sie zuerst mit PBS gewaschen und danach durch die Zugabe von 2,5 ml Trypsin/EDTA vom Boden des Kolbens abgelöst. Danach wurde DMEM Medium zugegeben und bei 500 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2xFibroblasten Einfriermedium resuspendiert (1 ml/Röhrchen) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37 C. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml frischem, serumhaltigen Medium aufgenommen und auf eine Gewebekulturschale überführt.

2.1.4 Passagieren von Zellen

Um die Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurde das Medium entfernt und anschließend wurden die Zellen in einer EDTA/Trypsin-Lösung (2 mM/0,25%) bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Boden gelöst hatten. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch die Zugabe von frischem, serumhaltigem Medium. Danach wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette vereinzelt, Aliquots der Zellsuspension auf mehrere Platten verteilt und mit frischem Medium versetzt.

2.1.5 Behandlung von Fibroblasten mit Mitomycin C

Fibroblasten werden als Untergrund für ES-Zellen verwendet, da sie eine Substanz absondern (leukemia inhibiting factor, LIF), die verhindern soll, dass sich die ES-Zellen differenzieren. Diese Substanz wurde auch noch zusätzlich dem ES-Zellmedium beigemischt (Escro). Damit die Fibroblasten ihre mitotische Aktivität verlieren, wurden sie mit Mitomycin C behandelt, um unnötige Passagen für Fibroblasten und damit auch für die ES-Zellen zu vermeiden. Das Mitomycin C, welches ein Spindelgift ist, wurde dem Medium beigemischt und anschließend wurden die Fibroblasten für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Danach wurden sie, wie zuvor beschrieben vom Boden abgelöst und neu ausplattiert. Da die Fibroblasten nach dieser Behandlung selbst ihre Fähigkeit auf dem Untergrund zu haften verloren haben, wurden die Platten, auf denen sie ausgesät wurden, zuvor mit einer 0,1%igen PBS/Gelatine Lösung beschichtet.

2.1.6 Kultivierung von ES-Zellen

Die unter denselben Bedingungen wie die Fibroblasten gelagerten ES-Zellen wurden in der gleichen Art und Weise aufgetaut und auf einer Schicht von Mitomycin C behandelten Fibroblasten ausplattiert. Hierfür wurde allerdings das speziell für die ES-Zellen vorgesehene KO-Medium verwendet. Die Zellen wurden expandiert, wobei darauf geachtet wurde, dass sie niemals zu konfluent waren, um zu verhindern, dass sie sich differenzieren. Das Medium wurde täglich gewechselt. Als die Zellen eine angemessene Größe und Dichte erreicht hatten, wurden sie transfiziert.

2.1.7 Transfektion von ES-Zellen via Elektroporation

Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben vom Boden der Kulturschale gelöst, in 20 ml KO-Medium aufgenommen und fünf Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Danach wurden sie in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 800 µl einer Lösung, aus 10 ml PBS und 50µl einer 5 M NaCl Lösung, resuspendiert. Dazu wurden 40 µg des linearisierten und durch Phenol/Chloroform gereinigten Konstruktes pipettiert, mit dem die Zellen transfiziert werden sollten. Dieses Gemisch wurde dann in eine Elektroporationsküvette überführt und bei 230 V und 500µF elektroporiert. In Anschluß an die Elektroporation wurden die Zellen für

einige Minuten ruhen gelassen, bevor sie in die entsprechende Menge KO-Medium, in diesem Fall 50 ml, aufgenommen und auf vier 10 cm Platten ausplattiert wurden.

2.1.8 Selektion resistenter Klone durch G418

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion durch Zugabe von Neomycinsulfat (G418) zu dem KO-Medium begonnen (400 µg/ml). Aufgrund des, im Konstrukt enthaltenen Resistenzgens für dieses Antibiotikum, sollten alle Zellen, die das Konstrukt bei der Elektroporation nicht stabil integriert haben, sterben. Das antibiotikumhaltige Medium wurde ebenfalls täglich erneuert. Ungefähr nach sechs bis acht Tagen hatten die resistenten Zellen die richtige Größe erreicht, um einzeln von der Platte isoliert und auf 24-Kammerplatten überführt zu werden.

2.1.9 Isolation resistenter Klone

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Klone einzeln auf 96-Kammerplatten überführt und mit je 60 µl Trypsin/EDTA für maximal fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop wurde kontrolliert, ob jede Kammer einen Klon enthielt. Kammern, die zu kleine, zwei oder keine Klone enthielten, wurden aussortiert. Anschließend wurden 25 µl Trypsin Inhibitor (5 mg/ml PBS, steril filtriert) und 100 µl KO-Medium in jede Kammer gegeben und mehrfach auf und ab pipettiert. Die Zellklone sollten danach vereinzelt vorliegen, was wiederum unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Der Inhalt jeder einzelnen Kammer wurde dann gleichmäßig in eine der, mindestens eine Stunde zuvor mit Mitomycin C behandelten Fibroblasten beschichteten und mit KO-Medium beschickten 24-Kammerplatten überführt und zusätzlich mit 1 ml KO-Medium überschichtet. Die 24-Kammerplatten wurden anschließend bei 37°C inkubiert. Da nicht alle Klone zum selben Zeitpunkt reif für die Isolation waren, wurden die Zellen an mehreren, aufeinander folgenden Tagen isoliert.

2.1.10 Kultivierung der isolierten Klone

Die einzelnen Klone wurden auf den 24-Kammerplatten, in G418-haltigem KO-Medium vermehrt. Bevor die Zellen miteinander in Kontakt kamen, wurde ein Teil jeder Kammer eingefroren und der andere Teil zur weiteren Vermehrung und anschließender DNA Isolation auf 48-Kammerplatten überführt.

2.1.11 Einfrieren von Klonen

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen bei 37°C in 150 µl Trypsin/EDTA inkubiert, bis sich die Klone vom Boden lösten (max. fünf Minuten). Danach wurden 30 µl Trypsin Inhibitor und 700 µl KO-Medium zugegeben und mehrfach auf und ab pipettiert. Anschließend wurden 600 µl der Zellsuspension in Einfriergefäße überführt und die restlichen 280 µl wurden auf, mit Mitomycin C behandelten Fibroblasten beschichteten 48-Kammerplatten gegeben. Zu den 600 µl Zellsuspension wurden 600 µl 2xEinfriermedium pipettiert. Die Einfriergefäße wurden leicht geschüttelt, um die Ausbildung von zwei Phasen zu verhindern. Danach wurden die Einfriergefäße für eine Stunde auf Trockeneis gestellt, um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten und danach bei -80°C eingefroren. Die auf 48-Kammerplatten übertragenen Klone wurden bei 37°C inkubiert. Von diesem Zeitpunkt an spielt es keine Rolle mehr, ob die Zellen differenzieren. Die Zellen wurden maximal expandiert, so dass ein dichter Zellrasen entstand, dessen DNA isoliert wurde.

2.1.12 Kultivierung von 293 EBNA Zellen

Die rekombinante Expression von TG6 erfolgte in humanen embryonalen Nierenzellen der Linie 293 EBNA (Invitrogen). Das DMEM F-12 Medium wurde bei untransfizierten Zellen alle zwei Tage gewechselt. Das Auftauen, Passagieren und Einfrieren wurde analog zu dem für Fibroblasten beschriebenen Ablauf durchgeführt.

2.1.13 Transfektion von 293 EBNA Zellen mit Liporeagenzien

Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers. Das Verhältnis DNA:Liporeagenz war 1:5. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für die Proteinextraktion geerntet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation

Die Transformation sowie Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien (DH5 α) erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983).

2.2.2 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Plasmid-DNA im 10 μ g Maßstab wurde nach der Methode von Birnboim (1983) isoliert. Die Gewinnung größerer Mengen DNA (100 μ g) erfolgte mit Hilfe des Midi-Prep Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 DNA Reinigung

Die Aufreinigung von DNA erfolgte entweder durch Phenol/Chloroform Extraktion oder Isolierung aus einem Agarosegel (Gelextraktionskit).

I. Phenol/Chloroform-Extraktion

Die DNA-haltige Lösung wurde mit H₂O auf 500 μ l aufgefüllt, mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gemischt. Anschließend wurde eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 μ l Chloroform wurden zugegeben. Die Probe wurde gemischt, zentrifugiert und die obere Phase abgenommen. Anschließend wurden 100 μ l Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 1 ml Ethanol (96%) dazu pipettiert und abzentrifugiert (15000 rpm, 20 min, 4°C). Bei der Fällung von genomischer DNA entfiel die Zugabe von Salzen. Die Probe wurde danach mit 70% Ethanol gewaschen und in H₂O aufgenommen.

II. Gelextraktionskit

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der *Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden mit einem Abi Prism BigDye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (mit AmpliTaq DNA Polymerase; Perkin Elmer Applied Biosystems) und dem Abi Prism 377 DNA-Sequenzer der Firma Perkin Elmer im Servicelabor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin, Köln) durchgeführt.

2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien (Laird et al. 1991)

Zur Genotypisierung von Mäusen wurden die Schwanzspitzen (ca. 1 cm) über Nacht in 0,5 ml Lysis Puffer, bei 55-60°C in einem Wasserbad inkubiert. Zum Zwecke der Aufreinigung der DNA folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion. Die isolierte genomische DNA wurde in einem angemessenen Volumen H₂O (üblicher Weise 50 µl) gelöst und zur *Southern blot* Analyse weiter verwendet.

2.2.6 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellklonen (Floss 1996)

Zur Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellklonen wurden die Zellen so dicht wie möglich kultiviert. Dann wurden sie nach Entfernen des Mediums mit Lysis Puffer über Nacht bei 55°-60°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde überprüft, ob die DNA vollständig lysiert war und anschließend folgte eine Ethanolpräzipitation. Nach der Fällung wurde ein Teil der DNA verdaut und durch *Southern blot* Analyse auf ein mögliches Integrationsereignis untersucht. Die restliche DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.2.7 Southern Blot (Southern et al. 1975)

Der *Southern blot* dient dem Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus einem Agarosegel, auf eine Nylonmembran, zum Zweck ihrer Analyse durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden. Die fragmentierte DNA wurde auf einem 8%-tigen Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das Agarosegel in Depurinierungslösung (0,25 M HCl) geschwenkt. Durch das HCl in der Lösung, kommt es zu einer partiellen Depurinierung der DNA und damit zu deren Bruch in kleinere Fragmente. Zur Neutralisation des pH Wertes wurde das Gel in Transfer Puffer (1,5 M NaCl, 0,25 M NaOH) überführt. Als Trägermembran wurde für den Transfer der genomischen DNA die Roti-Nylon Plus Membran (Roth) verwendet. Die DNA wurde während eines Zeitraums von 12-16 Stunden, durch Kapillartransfer

aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Membran eine Minute in 2 x SSC geschwenkt und an der Luft getrocknet.

2.2.8 Radioaktive Markierung von dsDNA

Die radioaktive Markierung von dsDNA (25-50 ng) wurde mit dem *dCTP Labelling beads* Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Zur Markierung einer Sonde wurden zwischen 25 und 50 μCi des radioaktiv markierten Nukleotids [α - ^{32}P]dCTP eingesetzt. Nach Denaturierung des DNA Doppelstranges, hybridisieren Zufallsoligonukleotide, mit einer Länge von neun Basen, mit komplementären Sequenzen des DNA Einzelstranges. Bei der anschließenden Synthese durch die in den *beads* enthaltene Polymerase, wurden die radioaktiv markierten dCTPs eingebaut. Die Kontrolle, wieviel Prozent der radioaktiven Nukleotide in die DNA inkorporiert wurden, fand anhand von Kapillarchromatographie auf *Whatman* Papier, mit 2%igem Ammoniumformiat als Laufmittel statt. Anschließend wurde kurz ein Film mit der Chromatographie belichtet und entwickelt. Die markierte, doppelsträngige DNA wird durch Aufkochen denaturiert und zu der Hybridisierungslösung zugegeben.

2.2.9 Hybridisierung membrangebundener DNA (modifiziert nach Church und Gilbert 1984)

Um die freien Bindungskapazitäten auf der Membran abzusättigen wurde die Membran zunächst für mindestens zwei Stunden mit 10 ml Prähybridisierungslösung inkubiert, die Lachssperma DNA (10 mg/ml, Sigma) enthielt. Danach wurde die Membran in 10 ml Hybridisierungslösung, welche die radioaktiv markierte Sonde enthielt, über Nacht bei einer Temperatur von 55°C inkubiert. Prähybridisierung und Hybridisierung fanden bei jeweils derselben Temperatur statt. In Anschluß an die Hybridisierung wurde die Membran mit der entsprechenden Waschlösung inkubiert. Zwischen den Waschschrritten wurde die Membran mit dem Geiger-Müller Zähler auf ihre Radioaktivität hin überprüft. Bei einer Radioaktivität der Membran von 10-20 gezählten Impulsen/Sekunde wurde der Waschvorgang beendet. Im letzten Schritt wurde die Membran blasenfrei in Haushaltsfolie verpackt und in einer Röntgenkassette auf einem Röntgenfilm fixiert. Der Film wurde bis zu mehreren Tagen bei -80°C exponiert. Abschließend erfolgte die Entwicklung.

2.2.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgewebe mit Trizol

Die Haut sechs Tage alter Mäuse, sowie verschiedene Organe adulter Tiere wurden zur RNA Extraktion verwendet. Das Gewebe wurde gewogen und in der entsprechenden Menge TRIZOL (Invitrogen) mit einem Polytron PT 3000 (Kinematica AG) homogenisiert (1 ml/100 mg). Anschließend wurde die RNA nach Angaben des Herstellers extrahiert. Nach Resuspension des RNA Pellets in DEPC-H₂O wurden ca. 2 µg zur Qualitätskontrolle elektro-phoretisch aufgetrennt.

2.2.11 mRNA Extraktion aus Gesamt-RNA

Die Extraktion der mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem *Oligotex mRNA Extraction Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Nach Bestimmung der Konzentration wurde die mRNA präzipitiert und bei -20°C gelagert. Für die *Northern blot* Analyse wurden 5 µg mRNA eingesetzt.

2.2.12 Denaturierende Agarosegelelektrophorese (Lehrach 1977)

Für Agarosegele mit einer Endkonzentration von 1,2% Agarose wurden 0,9 g Agarose mit 7,5 ml 10 x MOPS Puffer und 54,1 ml DEPC- H₂O aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 13,4 ml Formaldehydlösung hinzugegeben und das Gel gegossen. Nach Fällung der mRNA wurde das Pellet in 5 µl DEPC-H₂O resuspendiert, 14,5 µl RNA Probenpuffer hinzugefügt, für 15 Minuten bei 65°C und anschließend 1 Minute auf Eis inkubiert. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden je Probe 2 µl RNA Blaumarker und 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt. Die Trennung erfolgte bei 6 V/cm.

2.2.13 Northern blot Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der mRNA auf einem denaturierenden Agarosegel erfolgte der Transfer auf eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham) in einer 20 x SSC Lösung (siehe Abschnitt 2.2.6). Die Membran wurde nach dem Transfer in 2 x SSC gewaschen und im UV-Crosslinker bestrahlt. Die Hybridisierung erfolgte analog zu der in Abschnitt 2.2.8 beschriebenen Methode.

2.2.14 Reverse Transkription (RT-PCR)

Für die Herstellung von cDNA wurde das Enzym Reverse Transkriptase und ein Oligo-dT-Nukleotid verwendet. Ausgangsmaterial für die Synthese waren 1 µg

isolierte Gesamt-RNA. Diese wurde zusammen mit 25 μM Oligo-dT-Nukleotiden auf ein Volumen von 12,5 μl aufgefüllt, zur Beseitigung von Sekundärstrukturen der RNA für 2 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe der restlichen Komponenten wurde der komplette Reaktionsansatz für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünfminütige Denaturierung des Enzyms bei 94°C gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-H₂O auf 100 μl aufgefüllt und bei -20°C gelagert. Zur Zweitstrang-Synthese wurden 2 μl der cDNA als Matrize eingesetzt.

Reaktionsansatz

1 μl	Gesamt-RNA [1 μg]
1 μl	Oligo-dT Nukleotide [25 μM]
4 μl	Reaktionspuffer
1 μl	dNTP's [25 mM]
0,5 μl	RNase-Inhibitor [40 U/ μl]
1 μl	AMV-Reverse Transcriptase [20 U/ μl] (QBiogene)


2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



Die Amplifikation der Fragmente für den *knock out* Vektor wurde in einem *Tpersonal*-Thermocycler (Biometra) mit dem Temperaturprofil 1 und der *Pfu* Turbo Polymerase (Stratagen) durchgeführt. Für die Zweitstrang-Synthese mit der TG6 cDNA sowie für die Genotypisierung der TG3 Mäuse wurde Temperaturprofil 2 verwendet. Zur Genotypisierung wurde Taq Polymerase benutzt. Es wurden üblicherweise für jeden PCR Ansatz 50-100 ng DNA eingesetzt und folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

Reaktionsansatz

1 μl	DNA
5 μl	PFU Turbo bzw. AmpliTaq Puffer
0,5 μl	dNTPs [25 mM]
1 μl	sense Primer [10 pmol]
1 μl	antisense Primer [10 pmol]
0,5 μl	PFU Turbo bzw. AmpliTaq Polymerase [5U/ μl]
41 μl	dd H ₂ O

Parameter

Schritt	Temperaturprofil 1	Dauer	Zyklen
1	94°C	2 min	
2	95°C	30 sec	 x 35
3	63°C	30 sec	
4	72°C	20 min	
5	72°C	10 min	
6	4°C	Pause	

Schritt	Temperaturprofil 2	Dauer	Zyklen
1	94°C	2 min	
2	95°C	30 sec	 - 0,5°C/Zyklus x 10
3	63°C	30 sec	
4	72°C	20 min	
5	95°C	10 min	
6	58°C		 + 10 sec/Zyklus x 25
7	72°C		
8	72°C		
9	4°C	Pause	

2.3 Proteinchemische Methoden**2.3.1 Trichloressigsäure (TCA) Fällung**

Zu 1 ml Zellkultur-oder Sucroseüberstand wurden 250 µl einer 50%-tigen TCA Lösung und 100 µl Triton X 100 pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 Minuten bei 15000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet, bevor es in H₂O aufgenommen wurde.

2.3.2 Proteinextrakte aus Gewebe

Das jeweilige Gewebe wurde gewogen, in der entsprechenden Menge Extraktionspuffer aufgenommen (2,5 ml/g) und mit Proteaseinhibitor (Sigma) versetzt (50 µl/2,5 ml Puffer). Anschließend wurde das Gewebe mit einem Polytron PT 3000 (Kinematica AG) homogenisiert, mit 1% Triton und 0.1% SDS versetzt und 30 Minuten auf einem Rotor bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C und 14000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einer 8%-tigen SDS PAGE analysiert oder bei -20°C gelagert.

2.3.3 Proteinextraktion aus Haaren

Die Haare von zwei Wochen und vier Monate alten TG3^{-/-} und Kontrollmäusen wurden mit einer Pinzette aus der Haut gezogen in einem Exikator getrocknet. Danach wurden gleiche Mengen abgewogen und über Nacht auf einem Rotor bei 4°C in 1 ml einer Lösung aus 2% SDS und 5% β Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend wurden die Haare 5 Minuten aufgekocht und bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer 8%igen SDS PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt bzw. im Immunoblot analysiert.

2.3.4 Extraktion von rekombinantem TG6 aus 293 EBNA Zellen

Das Medium wurde 48 Stunden nach der Transfektion von den Zellen entfernt, welche dann in einer 0,25 M Sucrose/PBS Lösung auf Eis mit einem Schaber von den Platten abgekratzt wurden. Danach wurden die Zellen durch auf und ab pipettieren homogenisiert und 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und in Extraktionspuffer resuspendiert. Die Sonifikation erfolgte bei einer Amplitude von 70 und dauerhafter Beschallung für 10 Sekunden mit einem Ultraschallprozessor UP 200 s (Dr. Hielscher GMBH). Die Zellsuspension wurde über Nacht auf einem Rotor inkubiert und am nächsten Tag bei 14000 rpm mehrere Stunden zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde abgenommen und zur Affinitätsreinigung weiter verwendet. Die Durchführung erfolgte bei 4°C und alle Lösungen enthielten 1 mM PMSF. Es wurden Aliquots der Überstände nach jedem Schritt zurückbehalten und durch SDS PAGE analysiert.

2.3.5 Affinitätsreinigung von rekombinantem TG6

Die Affinitätsreinigung des Proteinlysates erfolgte über eine Talonmatrix (Clontech) nach Angaben des Herstellers. Die Kopplung sowie die Waschschriffe erfolgten bei pH 8. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol bei pH 7,5.

2.3.6 Affinitätsreinigung von TG6 Antiserum

Zunächst wurde wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, rekombinantes TG6 extrahiert, an eine Talonmatrix gekoppelt und gewaschen. Danach wurde das TG6 Antiserum 1:10 mit TG6 Kopplungspuffer verdünnt und drei Mal über die Säule gegeben. Nach drei Waschschriffen mit TG6 Waschpuffer wurde der affinitätsgereinigte Antikörper mit 100 mM Triethanolamin (TEA) bei pH 11,5 eluiert. Die Spezifität des Antikörpers wurde auf Gefrierschnitten von Haut und Zunge getestet.

2.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

Die diskontinuierliche SDS PAGE erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Für das Sammelgel wurde eine Acrylamidkonzentration von 5%, für das Trenngel eine Acrylamidkonzentration von 8% gewählt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit reduzierendem 6 x SDS-Probenpuffer (mit 5% β -Mercaptoethanol) versetzt, für 2 min auf 100°C erhitzt und auf dem Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 35 mA. Parallel zu den Proben wurde ein molekularer Massenstandard (Fluka) mit aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert oder mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt.

2.3.8 Western blot Analyse

Die zu untersuchenden Proben wurden in Anschluß an die SDS PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (Protran NC, Schleicher & Schüll) transferiert, die danach in einer 5%igen Milchpulver/TBS Lösung blockiert und mit dem entsprechenden polyklonalen Primärantikörper inkubiert wurde. Bei monoklonalen Antikörpern wurde die Membran in einer 3% Casein/TBS Lösung blockiert. Nach drei Waschschriffen in 0,05% TBS/Tween erfolgte die Inkubation mit dem

Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen der Membran erfolgte die Detektion der immunreaktiven Proteine mit dem ECL (*enhanced chemiluminescence*)-System.

2.3.9 Aktivitätstest (modifiziert nach Slaughter et al. 1992)

Zunächst wurden Mikrotiterplatten mit je 200 µl einer 3%igen N,N'-Dimethylcasein Lösung (Serva) (in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) pro Kammer beschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das ungebundene Casein wurde anschließend verworfen und es folgte ein Blockierungsschritt mit 1% BSA (in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0) für 30 Minuten bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 wurden die Reaktionsansätze, die als Substrat biotinyliertes Cadaverin (biotin-X cadaverin, Molecular Probes) enthielten, in den beschichteten Kammern der Mikrotiterplatte inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Homogenaten TG6 exprimierender 293 EBNA Zellen bzw. rekombinantem TG2 (Positivkontrolle, Sigma) gestartet und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Reaktionsansätze mit EDTA anstatt CaCl₂ inkubiert, sowie untransfizierte Zellhomogenate bzw. BSA anstatt TG2 zugegeben. Danach wurde die Flüssigkeit in den Kammern verworfen und die Reaktion durch fünfminütige Inkubation mit EDTA gestoppt. Es folgten zwei Waschschrte und die Detektion des inkorporierten, biotinylierten Produkts durch Avidin-HRP (*horse raddish peroxidase*, BioRad). Die Avidin-HRP wurde in einer 3%igen BSA Lösung verdünnt (1:4000) und es wurden 100 µl in jeder Kammer für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 + 0.01% Triton X 100 und vier weiteren Waschschrten ohne Triton X 100, erfolgte die Zugabe von 100 µl einer ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)) Stocklösung (1 mg/ml) und 0,03% H₂O₂. Die spektrometrische Quantifizierung des grünen Produktes wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt.

Reaktionsansatz

10 mM	DTT
10 µl	biotin-X cadaverin (Stocklösung 10 mM: 2 mg in 50 µl 0,1 N HCl+394 µl H ₂ O)
25 µl	CaCl ₂ bzw. EDTA (200 mM Stocklösung)
150-600 ng	TG bzw. BSA

Zur Überprüfung, ob TG6 durch Dispase (Sigma), Proteinase K (Sigma) oder Trypsin (Gibco) proteolytisch gespalten und aktiviert wird, wurden Homogenate von TG6 exprimierenden 293 EBNA Zellen 20 Minuten bei 37°C mit 1U/ml des jeweiligen Enzyms inkubiert. Danach folgte entweder eine 8%ige SDS PAGE mit anschließender Immunodetektion durch TG6 spezifisches Antiserum oder die wie zuvor beschriebene Verwendung für den Aktivitätstest.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Präparation von Gefrier- und Paraffinschnitten

Die zu untersuchenden Gewebe wurden zur Herstellung von Gefrierschnitten in Tissue-Tek Einbettlösung (Sakura) in Flüssig-Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Blöcke wurden bei -20°C in einem Kryostat (Leika, CM3050) mit einer Schnittdicke zwischen 5-12 µm geschnitten. Die Aufbewahrung der Schnitte bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C. Für die Paraffineinbettung wurden die Gewebe je nach Gewebestärke zwischen 30 und 60 Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert und über Nacht in 70% EtOH aufbewahrt. Anschließend wurden die Gewebe in einem Einbettautomaten (Citadell 1000, Shandon) weiter prozessiert, wobei die Länge der Inkubationszeiten dem jeweiligen Gewebetyp und dessen Durchmesser angepasst war. Die Dehydrierung erfolgte durch eine Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 96%). Es folgten je drei Inkubationen in 100% EtOH und Xylol, sowie die anschließende Infiltration des Gewebes mit Paraffin Nr. 3 und Paraffin Nr. 6. Danach wurden die Gewebe in der richtigen Orientierung mit Paraffin Nr.6 eingebettet und anschließend bei 4°C. Die zwischen 5 und 7 µm dicken Schnitte wurden mit einem Mikrotom (Micron GmbH) angefertigt, in einem Wasserbad gestreckt, bei 37°C getrocknet und anschließend bei RT gelagert.

2.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Nach der Entparaffinisierung wurden die Schnitte in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) überführt. Die Epitope wurden durch eine zehnminütige Inkubation mit einer 0,1% Trypsin/0,1% CaCl₂-Lösung bei 37°C zugänglich gemacht und die Reaktion wurde danach mit Leitungswasser abgestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in TBS überführt, 10 Minuten mit 0,25% Triton X-100/TBS permeabilisiert und 2 x 10 Minuten mit TBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte 1 Stunde in einer 5%tigen BSA/TBS Lösung

inkubiert. Der Primärantikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt, bei 4°C über Nacht oder bei RT 1 Stunde inkubiert. Nach vier Waschschritten für jeweils 10 Minuten mit TBS erfolgte der zweite Blockierungsschritt für 15 Minuten in 0,8% BSA und 5% NGS (*normal goat serum*). Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde in dieser Blockierungslösung verdünnt und 45 Minuten bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend 4 x 5 Minuten in TBS gewaschen, mit DAKO *Non fade Mountant* (Dako Cytomation) eingedeckelt und mit einem Zeiss Axiophot 165 Mikroskop untersucht.

Entparaffinisierung

Lösung	Zeit
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Isopropanol	5 min
Isopropanol	5 min
EtOH 96%	3 min
EtOH 70%	3 min
H ₂ O	kurz eintauchen

2.4.4 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Gefrierschnitte wurden in Anschluß an eine zehnminütige Postfixation mit einer 4%igen PFA/PBS Lösung bzw. Paraffinschnitte nach ihrer Entparaffinisierung (siehe Abschnitt 2.4.3) mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Danach wurden die Schnitte mit DPX überschichtet und eingedeckelt.

Lösung	Zeit
Hämatoxylin	3-5 min
H ₂ O	kurz eintauchen
HCl/ EtOH (200 ml EtOH 70% + 1 ml HCl 37%)	kurz eintauchen
H ₂ O	kurz eintauchen
Fließendes Leitungswasser	5 min
H ₂ O	kurz eintauchen
Eosin	5-7 min
EtOH 70%	kurz eintauchen
EtOH 90%	kurz eintauchen
Isopropanol	5 min
Isopropanol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

2.4.5 Isolation von Korneozyten

Die Isolation der Korneozyten erfolgte nach der Methode von Djian et al. (2000).

Ein Stück Ohr wurde von TG3^{-/-} und Kontrolltieren entfernt und in einer 2% SDS/25mM DTT Lösung aufgenommen. Anschließend wurde das Gewebe für 15 Minuten bei 100°C inkubiert und bei 5000 rpm. Das Pellet wurde zwei Mal mit PBS gewaschen bevor es in einer Lösung aus 10mM Tris/1mM EDTA (pH 8) aufgenommen wurde. Die Korneozytensuspension wurde auf einen Glasobjektträger getropft, mit einem Deckglas bedeckt und im Lichtmikroskop untersucht.

2.4.6 Nil Rot Färbung

Von einer Stocklösung Nil Rot (3 µg/ml Aceton, Sigma) wurde 1 µl zu der Korneozytensuspension gegeben und 5 Minute bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 Minuten und einem Waschschritt mit PBS wurde das Pellet in einer Lösung aus 10mM Tris/1mM EDTA (pH 8) aufgenommen. Anschließend wurden die Korneozyten im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.4.7 TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte mit dem DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) nach Angaben des Herstellers. Diese Methode beruht auf der enzymatisch katalysierten Inkorporation von Fluorescein-12-dUTP an die 3' OH-Enden der fragmentierten DNA durch terminale Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) (Gavrieli et al. 1992).

2.4.8 Knochen- und Knorpelfärbung

Zur Färbung von Knochen und Knorpelgewebe wurden die kompletten Skelette neugeborener TG3-/- und Kontrolltiere, sowie die Köpfe von 8 und 14 Tage alten Mäusen in 95% EtOH eingelegt, um anschließend die Haut entfernen zu können. Die Färbung mit Alcian Blau 8GX (Sigma) und Alizarin Rot (Sigma) sowie die anschließende Klärung des Gewebes erfolgte nach einem Protokoll von Jegalian und De Robertis (1992).

2.4.9 Farbausschlußtests

I. Luzifer Gelb

Neugeborene Mäuse wurden nach der Methode von Matsuki et al. (1998) für eine Stunde mit dem Rücken in einer 1 mM Luzifer Gelb (Sigma) Lösung fixiert. Anschließend wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff schockgefroren und Schnitte der Rückenhaut angefertigt. Die Diffusion des Farbstoffes wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

II. Toluidin Blau

Neugeborene Mäuse, sowie Embryonen zu den Zeitpunkten E16,5-18,5 wurden nach der Methode von Hardman et al. (1998) mit Toluidin Blau gefärbt. Nach Dehydrierung des Gewebes für je 1 Minute in einer aufsteigenden Methanol/PBS Reihe (25%, 50%, 75%, 100%), und der anschließenden Rehydrierung mit einer absteigenden Methanol/PBS Reihe (100%, 75%, 50%, 25%) wurde das Gewebe für 1 Minute in einer 0.0125%-tigen Toluidin Blau (Fluka) /PBS Lösung inkubiert. Danach wurde das Gewebe 1 Minute mit PBS gewaschen.

2.4.10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Prozessierung der Proben für TEM und REM wurde von Anton Page, Biomedical Imaging Unit, Southampton General Hospital, UK durchgeführt. Die Haut von Mäusen zwischen P4 und P14 mit Anhängen wurde in 1 mm³ Blöcke geschnitten und in 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) fixiert und prozessiert. Es wurden 0,2 µm Semidünnschnitte mit einem Glasmesser angefertigt und für die Analyse im Lichtmikroskop mit Toluidin Blau gefärbt. Die Dünnschnitte (50 nm) wurden mit einem Diamantenmesser angefertigt und zur Analyse der Ultrastruktur in einem Transmissionselektronenmikroskop (Hitachi H7000) mit Bleicitrat/Uranylacetat behandelt.

2.4.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Einzelne Haare wurden auf einem Aluminiumhalter befestigt und unbeschichtet in einem FEI Quanta 200 Rasterelektronenmikroskop unter variablem Druck (VP-Modus) analysiert.

2.4.12 Messung des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)

Die TEWL Messung der dorsalen und ventralen Haut adulter Mäuse wurde mit einem Tewameter (CK Electronic Multi Probe Adapter MPA) nach der Methode von Barrel und Clarys (1995) durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1. Aeschlimann, D., O. Kaupp, and M. Paulsson, *Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate*. J Cell Biol, 1995. **129**(3): p. 881-92.
2. Aeschlimann, D., et al., *Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. Detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3452-60.
3. Aeschlimann, D. and M. Paulsson, *Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization*. J Biol Chem, 1991. **266**(23): p. 15308-17.
4. Aeschlimann, D. and M. Paulsson, *Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids*. Thromb Haemost, 1994. **71**(4): p. 402-15.
5. Aeschlimann, D. and V. Thomazy, *Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases*. Connect Tissue Res, 2000. **41**(1): p. 1-27.
6. Aeschlimann, D., et al., *Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes*. J Cell Biol, 1993. **120**(6): p. 1461-70.
7. Ahvazi, B., et al., *Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23834-41.
8. Ahvazi, B., et al., *Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7180-92.
9. Ahvazi, B., et al., *Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation*. Embo J, 2002. **21**(9): p. 2055-67.
10. Ahvazi, B. and P.M. Steinert, *A model for the reaction mechanism of the transglutaminase 3 enzyme*. Exp Mol Med, 2003. **35**(4): p. 228-42.
11. Akimov, S.S. and A.M. Belkin, *Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGFbeta-dependent matrix deposition*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 16): p. 2989-3000.
12. Akimov, S.S., et al., *Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 825-38.
13. Akiyama, M., I. Matsuo, and H. Shimizu, *Formation of cornified cell envelope in human hair follicle development*. Br J Dermatol, 2002. **146**(6): p. 968-76.

14. Akiyama, M., et al., *Transglutaminase and major cornified cell envelope precursor proteins, loricrin, small proline-rich proteins 1 and 2, and involucrin are coordinately expressed in the sites defined to form hair canal in developing human hair follicle*. Exp Dermatol, 1999. **8**(4): p. 313-4.
15. Ariens, R.A., et al., *Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms*. Blood, 2002. **100**(3): p. 743-54.
16. Aszterbaum, M., et al., *Ontogeny of the epidermal barrier to water loss in the rat: correlation of function with stratum corneum structure and lipid content*. Pediatr Res, 1992. **31**(4 Pt 1): p. 308-17.
17. Balklava, Z., et al., *Analysis of tissue transglutaminase function in the migration of Swiss 3T3 fibroblasts: the active-state conformation of the enzyme does not affect cell motility but is important for its secretion*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16567-75.
18. Barel, A.O. and P. Clarys, *Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: Evaporimeter and Tewameter*. Skin Pharmacol, 1995. **8**(4): p. 186-95.
19. Barry, E.L. and D.F. Mosher, *Binding and degradation of blood coagulation factor XIII by cultured fibroblasts*. J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9302-7.
20. Berbers, G.A., et al., *Lens transglutaminase selects specific beta-crystallin sequences as substrate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(22): p. 7017-20.
21. Bernassola, F., et al., *Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient*. Faseb J, 2002. **16**(11): p. 1371-8.
22. Bowness, J.M., J.E. Folk, and R. Timpl, *Identification of a substrate site for liver transglutaminase on the aminopeptide of type III collagen*. J Biol Chem, 1987. **262**(3): p. 1022-4.
23. Breathnach, R. and P. Chambon, *Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 349-83.
24. Cadot, B., et al., *Overexpressed transglutaminase 5 triggers cell death*. Amino Acids, 2004. **26**(4): p. 405-8.
25. Candi, E., et al., *Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13693-702.
26. Candi, E., et al., *Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(44): p. 26382-90.
27. Candi, E., et al., *Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(3): p. 670-7.

28. Candi, E., et al., *Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 35014-23.
29. Candi, E., et al., *Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 1): p. 313-9.
30. Chakravarty, R. and R.H. Rice, *Acylation of keratinocyte transglutaminase by palmitic and myristic acids in the membrane Anchorage region*. J Biol Chem, 1989. **264**(1): p. 625-9.
31. Chakravarty, R., X.H. Rong, and R.H. Rice, *Phorbol ester-stimulated phosphorylation of keratinocyte transglutaminase in the membrane anchorage region*. Biochem J, 1990. **271**(1): p. 25-30.
32. Chavanas, S., et al., *Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 141-2.
33. Chen, B.S., et al., *Transglutaminase-3, an esophageal cancer-related gene*. Int J Cancer, 2000. **88**(6): p. 862-5.
34. Choi, Y.C., et al., *Sporadic inclusion body myositis correlates with increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8703-10.
35. Chung, S.I. and J.E. Folk, *Kinetic studies with transglutaminases. The human blood enzymes (activated coagulation factor 13 and the guinea pig hair follicle enzyme)*. J Biol Chem, 1972. **247**(9): p. 2798-807.
36. Chung, S.I. and J.E. Folk, *Transglutaminase from hair follicle of guinea pig (crosslinking-fibrin-glutamyllysine-isoenzymes-purified enzyme)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(2): p. 303-7.
37. Church, G.M. and W. Gilbert, *Genomic sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(7): p. 1991-5.
38. Citron, B.A., et al., *Intron-exon swapping of transglutaminase mRNA and neuronal Tau aggregation in Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3295-301.
39. Clarke, R.M. and G.E. Rogers, *Protein synthesis in the hair follicle. I. Extraction and partial characterization of follicle proteins*. J Invest Dermatol, 1970. **55**(6): p. 419-24.
40. Compton, J.G., et al., *Chromosomal localization of mouse hair keratin genes*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **642**: p. 32-43.
41. Cooper, A.J., et al., *Cross linking of polyglutamine domains catalyzed by tissue transglutaminase is greatly favored with pathological-length repeats: does transglutaminase activity play a role in (CAG)(n)/Q(n)-expansion diseases?* Neurochem Int, 2002. **40**(1): p. 53-67.

42. Coulombe, P.A., *The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era.* Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(1): p. 17-29.
43. Coulombe, P.A. and M.B. Omary, *'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments.* Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(1): p. 110-22.
44. Coussons, P.J., et al., *Factors that govern the specificity of transglutaminase-catalysed modification of proteins and peptides.* Biochem J, 1992. **282 (Pt 3)**: p. 929-30.
45. Coussons, P.J., et al., *Transglutaminase catalyses the modification of glutamine side chains in the C-terminal region of bovine beta-lactoglobulin.* Biochem J, 1992. **283 (Pt 3)**: p. 803-6.
46. Crew, F.A., *Waved: an autosomal recessive coatform character in the mouse.* J Genet, 1933. **27**, 95.
47. De Laurenzi, V. and G. Melino, *Gene disruption of tissue transglutaminase.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(1): p. 148-55.
48. Del Duca, S., S. Beninati, and D. Serafini-Fracassini, *Polyamines in chloroplasts: identification of their glutamyl and acetyl derivatives.* Biochem J, 1995. **305 (Pt 1)**: p. 233-7.
49. Deng, C. and M.R. Capecchi, *Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(8): p. 3365-71.
50. Descargues, P., et al., *Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity.* Nat Genet, 2005. **37**(1): p. 56-65.
51. Dieterich, W., et al., *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.* Nat Med, 1997. **3**(7): p. 797-801.
52. Djian, P., K. Easley, and H. Green, *Targeted ablation of the murine involucrin gene.* J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 381-8.
53. Doetschman, T., et al., *Introduction of genes into mouse embryonic stem cells.* Prog Clin Biol Res, 1986. **217A**: p. 47-50.
54. Doetschman, T., et al., *Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells.* Nature, 1987. **330**(6148): p. 576-8.
55. Dunn, L.C., *Caracul a dominant mutation.* J Hered, 1937. **28**, 334.
56. Elias, P.M., et al., *Basis for the permeability barrier abnormality in lamellar ichthyosis.* Exp Dermatol, 2002. **11**(3): p. 248-56.

57. Eckert, R.L., et al., *Transglutaminase function in epidermis*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(3): p. 481-92.
57. Esposito, C. and I. Caputo, *Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance*. Febs J, 2005. **272**(3): p. 615-31.
58. Esposito, C., et al., *Transglutaminase from rat coagulating gland secretion. Post-translational modifications and activation by phosphatidic acids*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27416-23.
59. Fesus, L., V. Thomazy, and A. Falus, *Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death*. FEBS Lett, 1987. **224**(1): p. 104-8.
60. Falconer, D.S. and Snell G.D., *Two new hair mutants, rough and frizzy*. J Hered, 1952. **43**, 53.
61. Fietz, M.J., et al., *Analysis of the sheep trichohyalin gene: potential structural and calcium-binding roles of trichohyalin in the hair follicle*. J Cell Biol, 1993. **121**(4): p. 855-65.
62. Fleckenstein, B., et al., *Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation process*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34109-16.
63. Floss, T., H.H. Arnold, and T. Braun, *Myf-5(m1)/Myf-6(m1) compound heterozygous mouse mutants down-regulate Myf-5 expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on Myf-5 transcription*. Dev Biol, 1996. **174**(1): p. 140-7.
64. Folk, J.E. and J.S. Finlayson, *The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases*. Adv Protein Chem, 1977. **31**: p. 1-133.
65. Forslind, B., A.M. Ros, and S. Werner, *[The hair and hair growth--what is normal and what is pathological?]*. Lakartidningen, 1985. **82**(42): p. 3603-9.
66. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 493-501.
67. Greenberg, C.S., P.J. Birckbichler, and R.H. Rice, *Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues*. Faseb J, 1991. **5**(15): p. 3071-7.
68. Greenberg, D.A., S.E. Hodge, and J.I. Rotter, *Evidence for recessive and against dominant inheritance at the HLA-"linked" locus in coeliac disease*. Am J Hum Genet, 1982. **34**(2): p. 263-77.

69. Grenard, P., M.K. Bates, and D. Aeschlimann, *Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z.* J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 33066-78.
70. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
71. Harding, H.W. and G.E. Rogers, *Formation of the -(-glutamyl) lysine cross-link in hair proteins. Investigation of transamidases in hair follicles.* Biochemistry, 1972. **11**(15): p. 2858-63.
72. Harding, H.W. and G.E. Rogers, *The occurrence of the -(-glutamyl)lysine cross-link in the medulla of hair and quill.* Biochim Biophys Acta, 1972. **257**(1): p. 37-9.
73. Hardman, M.J., et al., *Patterned acquisition of skin barrier function during development.* Development, 1998. **125**(8): p. 1541-52.
74. Haroon, Z.A., et al., *Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis.* Faseb J, 1999. **13**(13): p. 1787-95.
75. Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley, *The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5586-91.
76. Hasty, P., et al., *Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4509-17.
77. Hatzfeld, M. and W.W. Franke, *Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides.* J Cell Biol, 1985. **101**(5 Pt 1): p. 1826-41.
78. Hebert, J.M., et al., *FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations.* Cell, 1994. **78**(6): p. 1017-25.
79. Hitomi, K., et al., *Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines.* Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(5): p. 491-8.
80. Hitomi, K., et al., *Characterization of recombinant mouse epidermal-type transglutaminase (TGase 3): regulation of its activity by proteolysis and guanine nucleotides.* J Biochem (Tokyo), 1999. **125**(6): p. 1048-54.
81. Hitomi, K., et al., *Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies.* J Dermatol Sci, 2003. **32**(2): p. 95-103.

82. Hohenadl, C., et al., *Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification.* J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23415-20.
83. Hooper, M., et al., *HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells.* Nature, 1987. **326**(6110): p. 292-5.
84. Howdle, P.D., et al., *Are all gliadins toxic in coeliac disease? An in vitro study of alpha, beta, gamma, and w gliadins.* Scand J Gastroenterol, 1984. **19**(1): p. 41-7.
85. Huber, M., et al., *Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis.* Science, 1995. **267**(5197): p. 525-8.
86. Iismaa, S.E., et al., *The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP.* Biochemistry, 1997. **36**(39): p. 11655-64.
87. Iismaa, S.E., et al., *GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket.* J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18259-65.
88. Ikura, K., et al., *Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence.* Biochemistry, 1988. **27**(8): p. 2898-905.
89. Ikura, K., et al., *Determination of amino- and carboxyl-terminal sequences of guinea pig liver transglutaminase: evidence for amino-terminal processing.* Biochemistry, 1989. **28**(5): p. 2344-8.
90. Inada, R., et al., *Facilitated wound healing by activation of the Transglutaminase 1 gene.* Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1875-82.
91. Ishida-Yamamoto, A. and H. Iizuka, *Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders.* Exp Dermatol, 1998. **7**(1): p. 1-10.
92. Ito, M., *The innermost cell layer of the outer root sheath in anagen hair follicle: light and electron microscopic study.* Arch Dermatol Res, 1986. **279**(2): p. 112-9.
93. Jegalian, B.G. and E.M. De Robertis, *Homeotic transformations in the mouse induced by overexpression of a human Hox3.3 transgene.* Cell, 1992. **71**(6): p. 901-10.
94. Jiang, C.K., et al., *Disease-activated transcription factor: allergic reactions in human skin cause nuclear translocation of STAT-91 and induce synthesis of keratin K17.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4759-69.
95. Jones, R.A., et al., *Reduced expression of tissue transglutaminase in a human endothelial cell line leads to changes in cell spreading, cell adhesion and reduced polymerisation of fibronectin.* J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 19)**: p. 2461-72.

96. Kalinin, A.E., A.V. Kajava, and P.M. Steinert, *Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope*. Bioessays, 2002. **24**(9): p. 789-800.
97. Kanaji, T., et al., *Primary structure of microbial transglutaminase from Streptovorticillium sp. strain s-8112*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11565-72.
98. Karpati, S., et al., *Immunoglobulin A deposition in jejunal mucosa of children with dermatitis herpetiformis*. J Invest Dermatol, 1988. **91**(4): p. 336-9.
99. Karpuj, M.V., M.W. Becher, and L. Steinman, *Evidence for a role for transglutaminase in Huntington's disease and the potential therapeutic implications*. Neurochem Int, 2002. **40**(1): p. 31-6.
100. Kikkawa, Y., et al., *A small deletion hotspot in the type II keratin gene mK6irs1/Krt2-6g on mouse chromosome 15, a candidate for causing the wavy hair of the caracul (Ca) mutation*. Genetics, 2003. **165**(2): p. 721-33.
101. Kim, H.C., et al., *Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization*. J Biol Chem, 1990. **265**(35): p. 21971-8.
102. Kim, H.C., et al., *Crystallization and preliminary X-ray analysis of human transglutaminase 3 from zymogen to active form*. J Struct Biol, 2001. **135**(1): p. 73-7.
103. Kim, I.G., et al., *The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12682-90.
104. Kim, S.Y., et al., *Transglutaminase in disease*. Neurochem Int, 2002. **40**(1): p. 85-103.
105. Kim, S.Y. and C.D. Bae, *Calpain inhibitors reduce the cornified cell envelope formation by inhibiting proteolytic processing of transglutaminase 1*. Exp Mol Med, 1998. **30**(4): p. 257-62.
106. Kim, S.Y., et al., *Expression of transglutaminase 1 in human epidermis*. J Invest Dermatol, 1995. **104**(2): p. 211-7.
107. Kim, S.Y., et al., *Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30715-21.
108. Knight, C.R., R.C. Rees, and M. Griffin, *Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutaminase and its importance in tumour progression*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1096**(4): p. 312-8.
109. Koch, P.J., et al., *Lessons from lorycin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 389-400.
110. Kohfeldt, E., et al., *Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican*. FEBS Lett, 1997. **414**(3): p. 557-61.

111. Kojima, S., K. Nara, and D.B. Rifkin, *Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells*. J Cell Biol, 1993. **121**(2): p. 439-48.
112. Koniukhov, B.V. and S.D. Kupriianov, *The mutant gene wellhaarig disturbs the differentiation of hair follicle cells in the mouse*. Ontogenez, 1990. **21**(1): p. 56-62.
113. Koniukhov, B.V., N.A. Malinina, and M. Martynov, *[The we gene is a modifier of the wal gene in mice]*. Genetika, 2004. **40**(7): p. 968-74.
114. Kuramoto, N., et al., *Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 243-50.
115. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4293.
116. Langbein, L., et al., *K6irs1, K6irs2, K6irs3, and K6irs4 represent the inner-root-sheath-specific type II epithelial keratins of the human hair follicle*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(4): p. 512-22.
117. Lee, S.C., et al., *In vitro and in vivo regulation of transglutaminase activity of mouse epidermal cells by various vitamin A compounds*. J Dermatol, 1988. **15**(5): p. 386-92.
118. Lee, S.C., et al., *The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 12164-76.
119. Lee, S.C., et al., *Expression of differentiation markers during fetal skin development in humans: immunohistochemical studies on the precursor proteins forming the cornified cell envelope*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(6): p. 882-6.
120. Lee, S.C., et al., *Expression of trichohyalin in dermatological disorders: a comparative study with involucrin and filaggrin by immunohistochemical staining*. Acta Derm Venereol, 1999. **79**(2): p. 122-6.
121. Lee, S.C., et al., *Human trichohyalin gene is clustered with the genes for other epidermal structural proteins and calcium-binding proteins at chromosomal locus 1q21*. J Invest Dermatol, 1993. **100**(1): p. 65-8.
122. Lee, Y.J., R.H. Rice, and Y.M. Lee, *Proteome analysis of human hair shaft: From protein identification to posttranslational modification*. Mol Cell Proteomics, 2006.
123. Lehrach, H., et al., *RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination*. Biochemistry, 1977. **16**(21): p. 4743-51.

124. Leigh, I.M., et al., *Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro*. Br J Dermatol, 1995. **133**(4): p. 501-11.
125. Lesort, M., et al., *Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases*. Prog Neurobiol, 2000. **61**(5): p. 439-63.
126. Lorand, J.B., T. Urayama, and L. Lorand, *Transglutaminase as a blood clotting enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **23**(6): p. 828-34.
127. Lorand, L., *Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 291-311.
128. Lorand, L. and S.M. Conrad, *Transglutaminases*. Mol Cell Biochem, 1984. **58**(1-2): p. 9-35.
129. Lorand, L., et al., *Identification of transglutaminase substrates in inside-out vesicles from human erythrocytes: immunoblotting with anti-dansyl antibody*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **134**(2): p. 685-9.
130. Lorand, L., et al., *Isolation of transglutaminase-reactive sequences from complex biological systems: a prominent lysine donor sequence in bovine lens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(23): p. 11161-3.
131. Maatta, A., et al., *Gene targeting of envoplakin, a cytoskeletal linker protein and precursor of the epidermal cornified envelope*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(20): p. 7047-53.
132. Makarova, K.S., L. Aravind, and E.V. Koonin, *A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases*. Protein Sci, 1999. **8**(8): p. 1714-9.
133. Mann, G.B., et al., *Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation*. Cell, 1993. **73**(2): p. 249-61.
134. Marenholz, I., et al., *Genetic analysis of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21: chromosomal orientation, new markers, and a 6-Mb YAC contig*. Genomics, 1996. **37**(3): p. 295-302.
135. Martinet, N., et al., *Epidermal and hair follicle transglutaminases. Partial characterization of soluble enzymes in newborn mouse skin*. J Biol Chem, 1988. **263**(9): p. 4236-41.
136. Matsuki, M., et al., *Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1044-9.
137. McGowan, K.M. and P.A. Coulombe, *Onset of keratin 17 expression coincides with the definition of major epithelial lineages during skin development*. J Cell Biol, 1998. **143**(2): p. 469-86.

138. McGowan, K.M. and P.A. Coulombe, *Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(6): p. 1101-7.
139. McGowan, K.M., et al., *Keratin 17 null mice exhibit age- and strain-dependent alopecia*. Genes Dev, 2002. **16**(11): p. 1412-22.
140. McLean, W.H., et al., *Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita*. Nat Genet, 1995. **9**(3): p. 273-8.
141. Melino, G., et al., *Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6584-96.
142. Mirza, A., et al., *A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 1): p. G281-8.
143. Mortensen, S.B., et al., *Sequence location of a putative transglutaminase crosslinking site in human alpha 2-macroglobulin*. FEBS Lett, 1981. **129**(2): p. 314-7.
144. Muesch, A., et al., *A novel pathway for secretory proteins?* Trends Biochem Sci, 1990. **15**(3): p. 86-8.
145. Murthy, S.N., et al., *Residue Gln-30 of human erythrocyte anion transporter is a prime site for reaction with intrinsic transglutaminase*. J Biol Chem, 1994. **269**(36): p. 22907-11.
146. Nakamura, M., J.P. Sundberg, and R. Paus, *Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables*. Exp Dermatol, 2001. **10**(6): p. 369-90.
147. Nakaoka, H., et al., *Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function*. Science, 1994. **264**(5165): p. 1593-6.
148. Nanda, N., et al., *Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20673-8.
149. Nemes, Z., Jr., et al., *Identification of cytoplasmic actin as an abundant glutaminyl substrate for tissue transglutaminase in HL-60 and U937 cells undergoing apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20577-83.
150. Nemes, Z., et al., *A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8402-7.
151. Nemes, Z. and P.M. Steinert, *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. Exp Mol Med, 1999. **31**(1): p. 5-19.
152. Netherton, E.W., *A unique case of trichorrhexis nodosa; bamboo hairs*. AMA Arch Derm, 1958. **78**(4): p. 483-7.

153. O'Guin, W.M., T.T. Sun, and M. Manabe, *Interaction of trichohyalin with intermediate filaments: three immunologically defined stages of trichohyalin maturation*. J Invest Dermatol, 1992. **98**(1): p. 24-32.
154. O'Keefe, E.J., et al., *Trichohyalin: a structural protein of hair, tongue, nail, and epidermis*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(1 Suppl): p. 65S-71S.
155. Orwin, D.F., *Cell differentiation in the lower outer sheath of the Romney wool follicle: a companion cell layer*. Aust J Biol Sci, 1971. **24**(5): p. 989-99.
156. Parakkal, P.F., *Morphogenesis of the hair follicle during catagen*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1970. **107**(2): p. 174-86.
157. Pastor, M.T., et al., *Addressing substrate glutamine requirements for tissue transglutaminase using substance P analogues*. FEBS Lett, 1999. **451**(3): p. 231-4.
158. Paus, R., *Principles of hair cycle control*. J Dermatol, 1998. **25**(12): p. 793-802.
159. Paus, R., et al., *Neural mechanisms of hair growth control*. J Investig Dermatol Symp Proc, 1997. **2**(1): p. 61-8.
160. Piacentini, M., et al., *"Tissue" transglutaminase in animal development*. Int J Dev Biol, 2000. **44**(6): p. 655-62.
161. Polakowska, R.R., et al., *Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells*. Dev Dyn, 1994. **199**(3): p. 176-88.
162. Raghunath, M., et al., *Cross-linking of the dermo-epidermal junction of skin regenerating from keratinocyte autografts. Anchoring fibrils are a target for tissue transglutaminase*. J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1174-84.
163. Randall, P. and I.M. Dushoff, *Skin cycles and other physiological variables of rodent skin; the effect of the skin cycle on skin homograft survival in the mouse*. Plast Reconstr Surg, 1958. **21**(1): p. 24-41.
164. Rice, R.H., X.H. Rong, and R. Chakravarty, *Proteolytic release of keratinocyte transglutaminase*. Biochem J, 1990. **265**(2): p. 351-7.
165. Rice, R.H., et al., *Cross-linked features of mouse pelage hair resistant to detergent extraction*. Anat Rec, 1999. **254**(2): p. 231-7.
166. Robertson, E., et al., *Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 445-8.
167. Rosenquist, T.A. and G.R. Martin, *Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle*. Dev Dyn, 1996. **205**(4): p. 379-86.

168. Rufini, A., et al., *Transglutaminase 5 is acetylated at the N-terminal end*. Amino Acids, 2004. **26**(4): p. 425-30.
169. Russell, L.J., et al., *Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis*. Nat Genet, 1995. **9**(3): p. 279-83.
170. Sardy, M., et al., *Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 747-57.
171. Sarkar, N.K., D.D. Clarke, and H. Waelsch, *An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins*. Biochim Biophys Acta, 1957. **25**(2): p. 451-2.
172. Segre, J.A., C. Bauer, and E. Fuchs, *Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 356-60.
173. Simon, M. and H. Green, *Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte*. Cell, 1984. **36**(4): p. 827-34.
174. Slaughter, T.F., et al., *A microtiter plate transglutaminase assay utilizing 5-(biotinamido)pentylamine as substrate*. Anal Biochem, 1992. **205**(1): p. 166-71.
175. Slee, J., *Developmental morphology of the skin and hair follicles in normal and in 'ragged' mice*. J Embryol Exp Morphol, 1962. **10**: p. 507-29.
176. Small, K., et al., *Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21291-6.
177. Smyth, N., et al., *Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation*. J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 151-60.
178. Sollid, L.M., *Molecular basis of celiac disease*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 53-81.
179. Sollid, L.M., *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 647-55.
180. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
181. Steinert, P.M., et al., *Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein*. Cell Death Differ, 1999. **6**(9): p. 916-30.
182. Steinert, P.M., et al., *The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26242-50.

183. Steinert, P.M., D.A. Parry, and L.N. Marekov, *Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41409-19.
184. Stenberg, P., et al., *Transamidase kinetics. Amide formation in the enzymic reactions of thiol esters with amines*. Biochem J, 1975. **147**(1): p. 155-63.
185. Stenn, K.S. and R. Paus, *What controls hair follicle cycling?* Exp Dermatol, 1999. **8**(4): p. 229-33; discussion 233-6.
186. Stenn, K.S. and R. Paus, *Controls of hair follicle cycling*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 449-494.
187. St-Jacques, B., et al., *Sonic hedgehog signaling is essential for hair development*. Curr Biol, 1998. **8**(19): p. 1058-68.
188. Sulkanen, S., et al., *Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1322-8.
189. Sundberg, J.P. and L.E. King, Jr., *Mouse models for the study of human hair loss*. Dermatol Clin, 1996. **14**(4): p. 619-32.
190. Tamada, Y., et al., *Expression of transglutaminase I in human anagen hair follicles*. Acta Derm Venereol, 1995. **75**(3): p. 190-2.
191. Tarcsa, E., et al., *Structural and transglutaminase substrate properties of the small proline-rich 2 family of cornified cell envelope proteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23297-303.
192. Tarcsa, E., et al., *The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27893-901.
193. Thibaut, S., et al., *Transglutaminase 5 expression in human hair follicle*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(3): p. 581-5.
194. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell, 1987. **51**(3): p. 503-12.
195. Thomazy, V. and L. Fesus, *Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study*. Cell Tissue Res, 1989. **255**(1): p. 215-24.
196. Troyanovsky, S.M., et al., *Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position*. J Cell Sci, 1989. **93** (Pt 3): p. 419-26.
197. Troyanovsky, S.M., R.E. Leube, and W.W. Franke, *Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern*. Eur J Cell Biol, 1992. **59**(1): p. 127-37.

198. Valenzuela, R., et al., *Immunoelectrophoretic and immunohistochemical characterizations of fibrinogen derivatives in atherosclerotic aortic intimas and vascular prosthesis pseudo-intimas.* Am J Pathol, 1992. **141**(4): p. 861-80.
199. Verderio, E., et al., *Regulation of cell surface tissue transglutaminase: effects on matrix storage of latent transforming growth factor-beta binding protein-1.* J Histochem Cytochem, 1999. **47**(11): p. 1417-32.
200. Verderio, E., et al., *Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death.* Exp Cell Res, 1998. **239**(1): p. 119-38.
201. Wang, Z., et al., *Type II epithelial keratin 6hf (Keratin 6 hf) is expressed in the companion layer, matrix, and medulla in anagen-stage hair follicles.* J Invest Dermatol, 2003. **121**(6): p. 1276-82.
202. Weiss, R.A., R. Eichner, and T.T. Sun, *Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes.* J Cell Biol, 1984. **98**(4): p. 1397-406.
203. Williams-Ashman, H.G., et al., *Transglutaminase reactions associated with the rat semen clotting system: modulation by macromolecular polyanions.* Biochem Biophys Res Commun, 1977. **79**(4): p. 1192-8.
204. Winter, H., et al., *A novel human type II cytokeratin, Keratin 6 hf, specifically expressed in the companion layer of the hair follicle.* J Invest Dermatol, 1998. **111**(6): p. 955-62.
205. Winter, H., et al., *An unusual Ala12Thr polymorphism in the 1A alpha-helical segment of the companion layer-specific keratin Keratin 6 hf: evidence for a risk factor in the etiology of the common hair disorder pseudofolliculitis barbae.* J Invest Dermatol, 2004. **122**(3): p. 652-7.
206. Yamada, K., et al., *Activation of the human transglutaminase 1 promoter in transgenic mice: terminal differentiation-specific expression of the TGM1-lacZ transgene in keratinized stratified squamous epithelia.* Hum Mol Genet, 1997. **6**(13): p. 2223-31.
207. Yasueda, H., Y. Kumazawa, and M. Motoki, *Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (Pagrus major).* Biosci Biotechnol Biochem, 1994. **58**(11): p. 2041-5.
208. Zhang, J., et al., *Transglutaminase 3 expression in C57BL/6J mouse embryo epidermis and the correlation with its differentiation.* Cell Res, 2005. **15**(2): p. 105-10.

Abkürzungsverzeichnis

α - anti

ABTS 2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-) sulfonsäure

Abb. Abbildung

bp Basenpaare

BL Basallamina

BSA *bovine serum albumin*

CE *cornified envelope*

Ca²⁺ Calcium

CNBr Cyanbromid

cDNA *copy* DNA

DEPC Diethylpyrocarbonat

DH *dermatitis herpetiformis*

DMSO Dimethylsulfoxid

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA Desoxyribonukleinsäure

dpc days post conceptum, Tage nach der Befruchtung

DTT Dithiothreitol

E Embryonalstadium (entspricht *dpc*)

ECL *enhanced chemiluminescence*

EDC *epidermal differentiation complex*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

ECM Extrazelluläre Matrix

EGF Epidermal Growth Factor

ES-Zellen Embryonale Stammzellen

EST *expressed sequence tag*

FCS *Fetal Calf Serum*, fötales Kälberserum

FGF Fibroblast Growth Factor

FXIII Factor XIII

G418 Neomycinsulfat (Geneticin)

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

GDP Guanindiphosphat

GTP Guanintriphosphat

GSD *gluten sensitive disease*

HRP *horse raddish peroxidase*
HE Hämatoxylin und Eosin
IgA/G Immunglobulin A/G
IL Interleukin
IRS inneren Wurzelscheide
K Keratin
KIF Keratin Intermediär Filamenten
KO *knock out*
LI Lamellare Ichtiose
LIF *leukemia inhibiting factor*
kb Kilobasen
kDa KiloDalton
mA Milliampere
Mut Mutante
MMPs Matrix Metalloproteasen
M Molar
Mb Megabasen
MODY *maturity-onset diabetes of young*
MOPS Morpholinopropansulfonsäure
mRNA messenger RNA
NGS *normal goat serum*
neo^r Neomycin-Resistenz-Gen
µl Mikroliter
µm Mikrometer
ORS äußere Wurzelscheide
P Postnatahtag
PAGE Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS *phosphate buffered saline*
PCR *Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA Paraformaldehyd
pgk Phosphoglycerat Kinase
PMSF Phenylmethylsulphonylfluorid
PKC Proteinkinase C
REM Rasterelektronenmikroskopie
RNA Ribonukleinsäure

rpm *rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute

RT Raumtemperatur

RT Reverse Transkriptase

Ser Serin

sc *stratum corneum*

sg *stratum granulosum*

SRP *small proline rich protein*

SDS Sodiumdodecylsulfat

TBS *Tris buffered saline*

TCA Trichloressigsäure

TG Transglutaminase

TEM Transmissionselektronenmikroskopie

TEA Triethanolamin

TGF Transforming Growth Factor

TNF Tumor Necrosis Factor

TF Transkriptionsfaktor

Trichohyalin THH

TEWL *trans epidermal water loss*

TUNEL TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling

U *units*, Einheit der Enzymaktivität

WT Wildtyp

ZMMK Zentrum für Molekulare Medizin Köln

Danksagung

Vorab erst einmal ein kollektives Dankeschön an alle, die auf irgendeine berufliche oder private Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich auf jede erdenkliche Weise unterstützt und die es überhaupt möglich gemacht hat, dass ich es hierher geschafft habe.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Mats Paulsson für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit, trotz vollem Terminkalender, bedanken.

While I am thinking about how to thank Neil, I immediately have to smile although working with you was not always funny. But you taught me a lot and I am glad that I have met you. Thank you for giving me this project which really turned out nicely.

Ein dickes Dankeschön an meine Arbeitsgruppe! Ganz besonders an Kerstin für das Lesen dieser Arbeit und die äußerst „pfiffigen“ Beiträge. Christian danke ich sehr für seine Hilfe bei kniffligen Präparationen und sonstigen unliebsamen Aufgaben. Lars danke ich fürs Lesen und schon mal im Voraus dafür, dass er hoffentlich meine Mäuse weiterhin pflegt und noch viele interessante Dinge herausfindet. Sebastian danke ich für die Rettung des Notebooks. Wir wollen an dieser Stelle nicht darauf eingehen, weshalb es gerettet werden musste ☺

Wieslaw danke ich für die nützlichen Tipps, wie man aus Mäusen Luftballons macht und für seine Hilfe im Tierstall.

Bei Silke bedanke ich mich für ihre nette Gesellschaft bei Konferenzzreisen und dafür dass sie einfach so herzerfrischend ehrlich ist.

Jessica, Mille, Sandra, Anju, Uwe und Beeker danke ich für gute Gespräche und einfach dafür, dass es sie gibt.

Vielen Dank an Gerda dafür, dass sie sich immer um alles kümmert und für jeden da ist. Ohne Dich würde der Laden wohl zusammenfallen.

Danke an Ole, Jörg und Susanne für das nette Angebot diese Arbeit fachmännisch zu formatieren. ICH HÄTTE ES ANNEHMEN SOLLEN!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Mats Paulsson betreut worden.

Köln, 30. März 2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Susan John
Anschrift Münstereifelerplatz 5, 50937 Köln
Geburtsdatum/-ort 08.10.1975 in Köln
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1982-1986 Kath. Grundschule Lindenburger Allee, Köln
1986-1992 Liebfrauen Gymnasium, Köln
1992-1996 Hansa Gymnasium, Köln

Hochschulbildung

08.10.1996-31.03.1998 Grundstudium Biologie, Universität zu Köln
07.04.1998-15.01.2002 Hauptstudium Biologie, Universität zu Köln
16.01.2002-03.12.2002 Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: Klonierung eines „*targeting vector*“ zur Inaktivierung des TGM3 Gens in der Maus und Charakterisierung der genomischen Organisation der Transglutaminasen Gene

Auslandsaufenthalt

01.09.2000-30.02.2001 Austauschsemester an der Universität Complutense, Madrid

Doktorarbeit

04.12.2002-dato Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln im Fach Physiologische Chemie am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät bei Prof. Dr. Mats Paulsson