

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik

Generierung einer *Abca3*-defizienten Mauslinie zur Charakterisierung von ABCA3

Markus Hammel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis
2. Priv.-Doz. Dr. A. Holzinger,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 26.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.07.2008 angenommen.

"Raffiniert ist der Herr Gott,
aber boshaft ist Er nicht."

(Albert Einstein, 1879-1955)

Meinen Eltern

Zusammenfassung

ABC-Transporter stellen eine der größten bekannten Proteinfamilien dar, mit Mitgliedern in fast jedem Organismus. Alle ABC-Transporter besitzen ein gemeinsames Strukturelement, eine ATP-bindende Kasette (**A**TP **b**inding **c**assette, ABC), mittels derer ein energieabhängiger Transport verschiedenster Substrate ermöglicht wird. Bei einer Vielzahl von Krankheiten konnten Mutationen in den ABC-Transportergenen nachgewiesen werden. ABCA3 ist ein Transporter, der vorwiegend in der Membran der Lamellarkörperchen von Pneumozyten Typ II lokalisiert ist. Mutationen im ABCA3-Gen sind mit respiratorischem Versagen des Neugeborenen und parenchymatösen Lungenerkrankungen bei Kindern assoziiert. ABCA3 zeigt eine hohe Sequenzhomologie zu Lipidtransportern, sodass ihm eine bedeutende Rolle in der Surfactant-Homöostase zugeschrieben wird. Um molekulare Pathomechanismen dieser Erkrankungen aufzudecken, wurde durch Manipulation embryonaler F1 (C57BL/6 × 129S6) Stammzellen ein transgenes Mausmodell generiert. Hierbei wurde das *Abca3*-Gen zerstört und es sollte das fluoreszierende Protein hrGFP unter dem *Abca3*-Promotor exprimiert werden. Hierfür wurden Teile des Exons 5, das komplette Exon 6 und ebenso Teile des Exons 7 des *Abca3*-Gens zerstört. Die nach Rückkreuzung resultierende transgene Mauslinie hat einen nahezu C57BL/6 genetischen Hintergrund. Die morphologische Untersuchung der Lunge homozygoter Tiere zeigt schwerste Atelektasen und das Fehlen von Lamellarkörperchen. Der klinische Phänotyp entspricht der menschlichen Erkrankung des postpartalen Lungenversagens bei ABCA3-Mangel. Homozygotie ist mit dem Leben nicht vereinbar. Mithilfe dieser *Abca3*-defizienten Mauslinie sollte das natürliche Substrat von ABCA3 identifiziert werden. Bei Analysen der Phospholipide in Lungengewebe mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektroskopie, ließ sich bei homozygoten, aber auch heterozygoten Tieren ein eindeutiger biochemischer Phänotyp nachweisen. Hierbei waren die Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Glycerin bei heterozygoten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren drastisch erniedrigt. Die Heterozygotie und der damit einhergehende biochemische Phänotyp haben aber scheinbar keinen Einfluss auf die Lungenfunktion. Auch in anderen Geweben, z. B. in der Mamma wird ABCA3 exprimiert. Die Funktion dort ist aber noch nahezu ungeklärt. *Lipidomics* Analysen in der Milch zeigten eine Verminderung der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin und Phosphatidyl-Cholin bei heterozygoten Tieren im Vergleich mit Wildtyp-Tieren. Welche Bedeutung ABCA3 für die Milchsekretion hat, steht noch zur Klärung aus.

Abstract

ABC-transporters comprise a large group of known protein families in various organisms characterized by a common structural component, the ATP-binding cassette which enables ATP-hydrolysis in order to drive energy-dependent transport of multiple substrates. Mutations in ABC-transporter genes could be identified as causative for a variety of diseases. ABCA3 is a transporter predominantly located in the limiting membrane of lamellar bodies of type II pneumocytes. Mutations in the *ABCA3*-gene are associated with respiratory failure in newborns as well as pediatric parenchymal lung disease. A major role in surfactant homeostasis has been assigned to ABCA3 since it shows a great sequence homology to other lipid transporters. To investigate molecular pathomechanisms of ABCA3 deficiency, a transgenic mouse model was generated by manipulation of embryonic F1 (C57BL/6 × 129S6) stem cells. The *Abca3*-gene was disrupted and a fluorescent protein hrGFP was intended to be driven by the *Abca3*-promotor. To that end parts of exons 5 and 7 as well as the complete exon 6 were disrupted. The genetic background after backcrossing of the resulting transgenic mouse model is very close to C57BL/6. Lung morphology of homozygous animals shows a high degree atelectasis and a lack of lamellar bodies. The clinical phenotype corresponds to the human disease of post partum lung failure due to a complete lack of ABCA3 function. Homozygosity is not compatible with life. This *Abca3* deficient mouse model should lead to the identification of the natural substrate of ABCA3. Analysis of phospholipids in lung tissue using electrospray ionization tandem mass spectrometry clearly showed a biochemical phenotype in heterozygous animals. The concentrations of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in heterozygous animals were dramatically reduced compared to wildtype animals. Thus, heterozygosity and its corresponding biochemical phenotype do not seem to have an influence on lung function. ABCA3 is also expressed in non-lung tissues, for example in mammary glands. So far little is known about the function of ABCA3 in these tissues. Lipidomics analysis of mouse milk showed a lower concentration of phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine in heterozygous animals compared to wildtype. The precise role of ABCA3 for milk secretion has yet to be determined.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG 5

ABSTRACT..... 6

INHALTSVERZEICHNIS 7

1 EINLEITUNG.....13

1.1 Allgemeines zu ABC-Transportern und im Speziellen zu ABCA3..... 13

1.1.1 ABC-Transporter und Ihre Bedeutung 15

1.1.2 Die ABCA-Subfamilie 17

1.1.3 Aufbau der Lunge und Lokalisation von ABCA3 in der Lunge 18

1.1.4 Surfactant-Homöostase und Ihre biologische Bedeutung 19

1.1.5 Korrelation zwischen ABCA3-Defekten und respiratorischem Versagen bei
Neugeborenen 20

1.1.6 Medizinische Bedeutung von ABCA3 22

1.1.7 ABCA3 von Mensch und Maus im Vergleich 23

1.2 Mögliche Verfahren zur Erstellung einer *knockout*-Maus 24

1.2.1 *Knockout* durch homologe Rekombination..... 26

1.2.2 Von manipulierten embryonalen Mausstammzellen zur *knockout*-Maus 27

1.3 Zielsetzung der Arbeit und Erwartungen..... 29

2 ERGEBNISSE.....30

2.1 Protein-Alignments 30

2.1.1 Protein-Alignments von humanem ABCA3 mit anderen Lipidtransportern 30

2.1.2 Protein-Alignments von humanem mit murinem ABCA3 31

2.1.3 Strukturvorhersage des humanen ABCA3 31

2.2 Generierung einer *Abca3*-defizienten Mauslinie 32

2.2.1 Gewinnung einer *Abca3*-spezifischen DNA-Sonde mittels *Expressed Sequence Tag's*
(*EST's*) 32

2.2.2 Restriktionsanalysen der Cosmide 33

2.2.3 Allgemeine Strategie zur Erstellung des *Abca3-Targeting* Konstruktes 33

2.2.4 Erstellung des *Abca3-Targeting*-Vektors..... 34

2.2.5 Transfektion embryonaler Mausstammzellen 37

2.2.6 Genotypisierung der embryonalen Mausstammzellen 37

2.2.7 Blastozysteninjektion und Embryotransfer 38

2.2.8 Genotypisierung der Mäusepopulation 38

2.2.9 Rückkreuzen der transgenen Mauslinie in C57BL/6 und deren Haltung 39

2.3 Ergebnisse der *Abca3*-defizienten Mauslinie 39

2.3.1 Verpaarung heterozygoter Tiere untereinander..... 39

2.3.2 Homozygote versterben unmittelbar nach der Geburt am respiratorischen Versagen... 40

2.3.3 Die Schreyer-Schwimmprobe 43

2.3.4 Immunhistochemische Analyse in der Lunge von Wildtyp versus Homozygot 44

2.3.5 Elektronenmikroskopische Analysen der Mauslunge im Vergleich: Wildtyp,
heterozygoten und homozygoten Neugeborene 47

2.3.6 Nachweis des ABCA3-Proteins mittels *Western Blot* 48

2.3.7 hrGFP Analyse verschiedener Organe von Wildtyp versus homozygoten Neugeborenen	49
2.4 Antikörpergenerierung gegen ABCA3.....	51
2.4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide	51
2.4.2 Expression der rekombinanten Epitope	52
2.4.3 Reinigung der Fusionsproteine mittels Maltose bindendem Protein (MBP).....	52
2.5 Lipidomics Analysen.....	54
2.5.1 Lipidomics Analyse von Lungen Neugeborener	54
2.5.2 Analyse der Subspezies von Phosphatidyl-Cholin der Lungen Neugeborener	56
2.5.3 Analyse der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin der Lungen Neugeborener	58
2.5.4 Lipidomics Analyse von Milch.....	59
2.5.5 Analyse der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin in Milch.....	61
2.6 Lungenfunktion bei Wildtyp-Tieren und heterozygoten adulten Tieren	63
2.6.1 Ganzkörperplethysmografische Untersuchungen.....	63
2.6.2 Lungenfunktionsuntersuchungen von narkotisierten Tieren.....	65
2.7 SUMO (small ubiquitin-related modifier)	66
2.7.1 Identifikation von SUMOylierungs-Motiven in ABCA3	66
2.7.2 Erstellung von Plasmiden für <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Analysen.....	66
2.7.3 ABCA3 interagiert mit allen SUMO-Isoformen	67
3 DISKUSSION.....	69
3.1 Protein-Alignments	69
3.1.1 Homologie zu anderen Lipidtransportern	69
3.1.2 Speziesübergreifende Konservierung von ABCA3	70
3.2. Targeting-Experimente.....	70
3.2.1 Embryonale Stammzellen.....	70
3.2.2 Rekombinationsereignisse in ES-Zellen.....	70
3.3 Die Abca3-defiziente Mauslinie.....	71
3.3.1 Klinischer Phänotyp	71
3.3.2 Morphologische Befunde.....	72
3.3.3 Veränderung von Phospholipidkonzentrationen in Lungengewebe.....	72
3.3.4 Phospholipidzusammensetzung der Milch	73
3.3.5 ABCA3 beeinflusst nicht das pränatale Überleben	74
3.3.6 Heterozygotie scheint keinen Einfluss auf die Lungenfunktion zu haben	74
3.3.7 SUMOylierung von ABCA3.....	75
3.3.8 Die Regulation der Expression von ABCA3	76
3.3.9 Expression von ABCA3 in anderen Geweben	76
3.3.10 hrGFP Expression.....	77
3.3.11 Antikörpergenerierung.....	78
3.3.12 Problematik der Mausmodelle	78
4 METHODEN.....	80
4.1 Umgang mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	80
4.1.1 Isolierung von DNA	80
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA	80
4.1.3 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR).....	81
4.1.4 Reinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion	82
4.1.5 Subklonierung von PCR-Produkten	82

4.1.6 Nachweis einer Insertion in rekombinante Plasmide mittels PCR.....	83
4.1.7 DNA-Sequenzierung durch <i>Cycle Sequencing</i>	83
4.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	84
4.1.9 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	84
4.1.10 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	85
4.2 Präparation von Ribonukleinsäure (RNA)	86
4.2.1 Gewinnung von RNA aus Gewebe	86
4.2.2 cDNA-Synthese	86
4.2.3 <i>PCR-Screening</i> zum Nachweis von mRNA/cDNA.....	86
4.3 Arbeiten mit Bakterien	87
4.3.1 Nährmedien	87
4.3.2 Zellanzucht	87
4.3.3 Lagerung von Bakterien	88
4.3.4 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> (DH5α) Zellen	88
4.3.5 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	89
4.4 Arbeiten mit Säugetierzellen.....	89
4.4.1 Nährmedien	90
4.4.2 Kultivierung von A549-Zellen.....	90
4.4.3 Kultivierung von MLE15- und MLE12-Zellen	91
4.4.4 Auftauen von Säugetierzellen.....	91
4.4.5 Splitten konfluenter Säugetierzellen	91
4.4.6 Einfrieren von Säugetierzellen.....	91
4.4.7 Transfektion mittels Magnetofection	92
4.5 Arbeiten mit Hefen.....	92
4.5.1 Nährmedien	92
4.5.2 Lagerung und Kultivierung von Hefezellen.....	93
4.5.3 Transformation von Hefezellen.....	94
4.5.4 <i>Yeast-Two-Hybrid</i>	94
4.6. Spezielle Methoden zur Kultivierung von embryonalen Mausstammzellen.....	95
4.6.1. Allgemeines zu embryonalen Mausstammzellen.....	95
4.6.2 Zellkultur embryonaler Mausstammzellen	95
4.6.3 Kultivierung von <i>Feeder Cells</i>	96
4.6.4 Kultivierung und Splitten embryonalen Mausstammzellen.....	96
4.6.5 Elektroporation von embryonalen Mausstammzellen	97
4.6.6 Selektion der embryonalen Mausstammzellen	97
4.6.7 Picken embryonalen Mausstammzellkolonien.....	97
4.6.8 Einfrieren und Lagerung von embryonalen Mausstammzellen	98
4.6.9 Lyse von embryonalen Mausstammzellen	99
4.6.10 Screening der embryonalen Mausstammzellen.....	99
4.6.11 Kultivierung embryonaler Mausstammzellen für die Blastozysteninjektion.....	99
4.6.12 Implantation der embryonalen Mausstammzelle in Blastozysten	100
4.6.13 Genotypisierung von Mäusen mittels Schwanzspitzenbiopsie	100
4.6.14 Embryotransfer	100
4.6.15 Maushaltung und Mauszucht.....	101
4.7 Organentnahme bei der Maus.....	101
4.7.1 Kaiserschnitt (<i>Caesarean Section</i>)	101
4.7.2 Entnahme der Organe.....	102
4.7.3 Durchführen der Schreyer-Schwimmprobe	102
4.7.4 Milchentnahme bei Mäusen.....	103

4.8 Elektronenmikroskopie	103
4.8.1 Fixierung der Organe in Glutaraldehyd	104
4.8.2 Anfertigung der Epoxidharz-Schnitte	104
4.8.3 Bilddarstellung der Elektronenmikroskopie	104
4.9 Immunhistochemie.....	104
4.9.1 Fixierung der Organe in Formaldehydlösung (Formalin)	105
4.9.2 Anfertigung von Paraffinschnitten	105
4.9.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (nach Mayer)	105
4.9.4 ABCA3-Antikörperfärbung	106
4.9.5 TTF-1-Antikörperfärbung	106
4.9.6 ABCA3-/TTF1-Cofärbung.....	106
4.9.7 hrGFP-Mikroskopie	107
4.10 Antikörpergenerierung gegen ABCA3.....	108
4.10.1 Epitopsuche	108
4.10.2 Expression der rekombinanten Epitope	108
4.10.3 Reinigung mittels Maltose bindendem Protein (MBP).....	109
4.11 Analytik von Proteinen.....	110
4.11.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach <i>Bradford</i>	110
4.11.2 Organhomogenisierung und Isolierung von Membranproteinen	110
4.11.3 Ankonzentrieren von Proteinlösungen	110
4.11.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen.....	110
4.11.5 <i>Western Blot</i> und Immundetektion von Proteinen.....	111
4.12 Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektroskopie	113
4.12.1 <i>Lipidomics</i> Analysen der Phospholipide in Lunge und Milch.....	114
4.12.2 Statistische Datenanalyse der <i>Lipidomics</i> Analysen.....	115
4.13 Lungenfunktion von Wildtyp versus heterozygoten Tieren	115
4.13.1 Ganzkörperplethysmografie.....	115
4.13.2 Lungenfunktion von narkotisierten Tieren	117
4.13.3 Statistische Datenanalyse der Lungenfunktion.....	119
4.14 Strukturvorhersage	119
4.14.1 Vorhersagesoftware	119
4.14.2 Clone Manager Professional Suite	119
5 MATERIAL.....	121
5.1 Chemikalien.....	121
5.2 Enzyme	121
5.3 Allgemeine Puffer und Lösungen	122
5.4 Synthese- und Nachweis-Kits.....	123
5.5 Längen- und Molekulargewichtsstandards	123
5.6 Verwendete Organismen.....	124
5.7 Oligonukleotide	124
5.8 Vektoren und Plasmide	126

5.9 Antikörper, sekundäre Antikörper, Nachweisreagenzien	126
5.10 Spezielle Geräte und Materialien	126
ABKÜRZUNGEN	128
LITERATURVERZEICHNIS	132
ANHANG	143
VERÖFFENTLICHUNGEN	149
DANKSAGUNG	150



1 Einleitung

Lebende Zellen sind von einer Membran umgeben, welche das im Inneren gelegene Zytoplasma von dem sie umgebenden Milieu abgrenzt. Transportvorgänge über diese Zellmembranen spielen eine wesentliche Rolle bei der Interaktion lebender Zellen mit ihrer Umwelt. Intrazelluläre Organellen wie Lysosomen oder Lamellarkörperchen werden ebenfalls von Membranen umgeben, die sie von dem umgrenzenden Zytoplasma trennen. Der Transport verschiedenster Substrate in und aus diesen Kompartimenten ist für die Zelle lebensnotwendig. Für diese Transportvorgänge stehen spezielle in die Membran integrierte Proteine zur Verfügung. Eine Untergruppe solcher Membranproteine werden in der Familie der ABC-Transporter zusammengefasst [Fath, M. J. et al.; 1993]. ABC-Transporter (**A**TP-**b**inding **c**assette **t**ransporters) zeichnen sich durch einen ähnlichen Aufbau und die Verwendung von Adenosinriphosphat (ATP) als Energiequelle aus. Sie sind in allen Organismen einschließlich dem des Menschen anzutreffen. ABC-Transporter sind an einer Vielzahl von Prozessen, wie z. B. der Aufnahme von Nährstoffen oder der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Signalsubstanzen oder toxischen Verbindungen, beteiligt. Einige dieser Proteine besitzen medizinische Relevanz z. B. bei der Pathogenese der Mukoviszidose oder bei der Vermittlung von Multiresistenz bei Krebszellen [Haimeur, A. et al.; 2004; Kanai, Y. et al.; 2003].

1.1 Allgemeines zu ABC-Transportern und im Speziellen zu ABCA3

ABC-Transporter gehören zu der Familie von Membranproteinen, die als gemeinsames Strukturelement eine ATP-bindende Kasette besitzen und spezifische Substrate aktiv über eine Membran von Zellen in den unterschiedlichsten Geweben transportieren können [Higgins, C. F.1992]. Membranpumpen wie die ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportproteinen. Sie koppeln die freiwerdende Energie aus der exergonisch verlaufenden ATP-Hydrolyse (-30.5 kJ/mol), welche an der ATP-bindenden Kasette stattfindet, mit der endergonischen Translokation diverser Substrate durch Membranen.

ABC-Transporter zeichnen sich durch eine gemeinsame molekulare Architektur aus und bestehen aus zwei verschiedenen Domänen; einer hydrophoben **T**rans**m**embran-**D**omäne (TMD) und einer **n**ukleotid**b**indenden **D**omäne (NBD), die die ATP-bindende Kasette enthält. Die Aminosäuresequenz der ca. 200 Aminosäurereste großen ATP-bindenden Domäne zeigt fünf konservierte Motive (Abb. 1). Diese bestehen aus dem so genannten Walker A-Motiv und Walker B-Motiv. Beide sind ca. 6 bis 8 Aminosäuren lang und liegen

etwa 90 bis 120 Aminosäuren auseinander [Hyde, S. C. et al.; 1990; Walker, J. E. et al.; 1982]. Des Weiteren bestehen sie aus einem Signaturmotiv, dem so genannten C-Motiv, das die Konsensussequenz LSGGQ enthält und ca. 25 Aminosäuren stromaufwärts des Walker B-Motivs liegt. Etwa in der Mitte zwischen dem Walker A-Motiv und Walker B-Motiv liegt eine weniger stark konservierte Zentralregion (helikale Domäne). Stromabwärts des Walker B-Motivs liegt eine weniger stark konservierte Region, die als Switch bezeichnet wird. Diese Region beinhaltet einen Histidin-Loop, welcher angeblich für die Polarisation des Wassers bei der Hydrolyse verantwortlich ist [Higgins, C. F. et al.; 2004; Linton, K. J. et al.; 2007]. Die TMD enthält 6 bis 11 hydrophobe Segmente, welche in α -helikaler Struktur die Membran durchziehen.

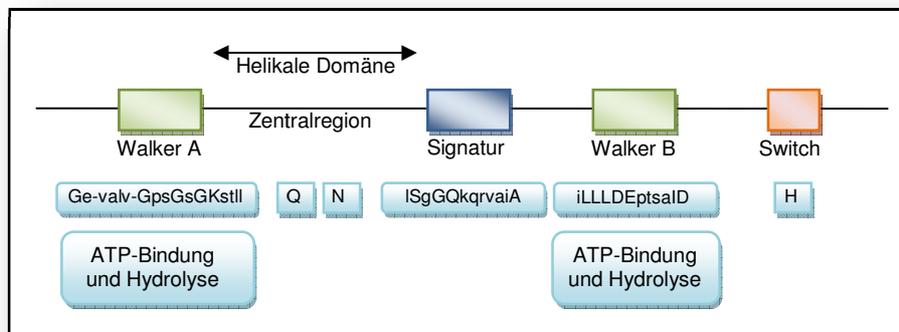


Abbildung 1: **Die fünf konservierten Motive der ABC-Transporter;**
 Kleinbuchstaben: stark konservierte Aminosäurereste
 Großbuchstaben: variante Aminosäurereste

Ein funktionell aktives ABC-Protein benötigt zwei NBD und zwei TMD, die in verschiedenen Anordnungen vorkommen können [Dassa, E. et al.; 2001]. Eukaryotische ABC-Transportergene werden entweder als so genannte Halb- oder Volltransporter exprimiert (Abb. 2). Halbtransporter bestehen aus nur einer TMD und einer NBD. Diese homo- oder heterodimerisieren mit anderen Halbtransportern und bilden so funktionelle Einheiten. Bei Volltransportern werden zwei TMD und zwei NBD von einem Gen als ein Protein gebildet. Entweder ist dieses Gen durch interne Genduplikation (z. B. *ABCA3*) oder durch Fusion zweier unterschiedlicher hemistrukturierter Vorläufergene hervorgegangen (z. B. *ABCC1*).

Beim Menschen liegen die meisten der heute 49 bekannten ABC-Transporter als Volltransporter vor. Bei Bakterien hingegen wird eine funktionelle Einheit für den Transport durch die Vereinigung von separat exprimierten essenziellen Proteindomänen erreicht (quarternäre Struktur). Dort können sie den Import lebenswichtiger Verbindungen, die die Membran nicht mittels Diffusion überwinden können, wie z. B. Vitamine, Metallionen oder Kohlenhydrate, bewerkstelligen. Darüber hinaus sind sie auch am Efflux diverser

Substrate, wie z. B. Antibiotika, verantwortlich. Im Gegensatz dazu sind die ABC-Transporter der Eukaryonten nach heutigem Wissensstand ausschließlich am Efflux von meist hydrophoben Molekülen aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum oder in intrazelluläre Kompartimente wie z. B. endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen, Lamellarkörperchen oder Mitochondrien beteiligt.

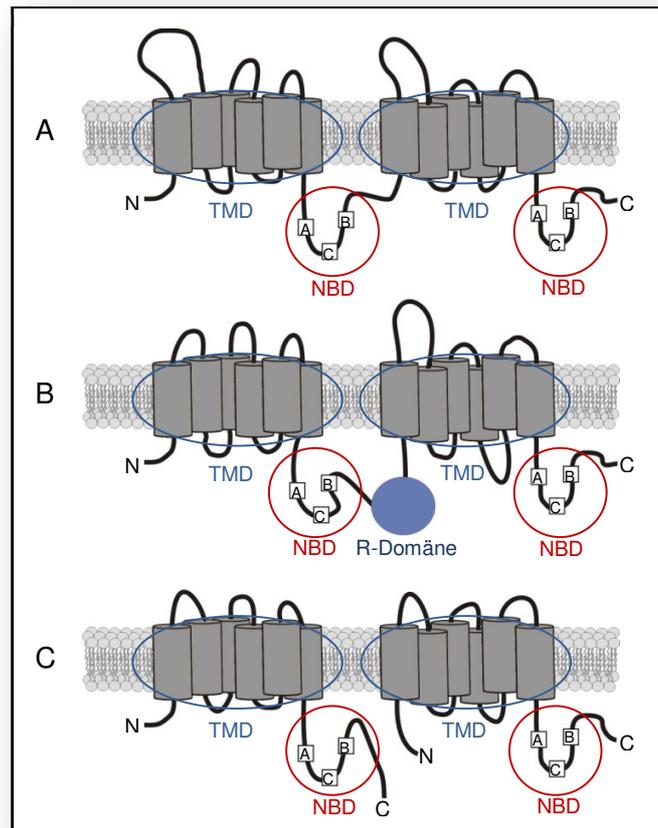


Abbildung 2: **Beispiele für Halb- und Volltransporter;**
A: Volltransporter (ABCA3): Ein Protein enthält alle Domänen
B: Volltransporter mit Regulations-Domäne (ABCC7)
C: Halbtransporter (ABCD1): Zwei getrennt exprimierte Proteine bilden eine funktionelle Einheit.

Insgesamt gibt es 7 Unterfamilien (A bis G) der ABC-Transporter, wobei die Einteilung aufgrund von Ähnlichkeiten in der Genstruktur, Homologie der Aminosäuresequenz und der Anordnung der Domänen erfolgt.

1.1.1 ABC-Transporter und Ihre Bedeutung

ABC-Transporter rückten in den letzten Jahren immer mehr in das Licht des Interesses, als erkannt wurde, dass sie eine erhebliche medizinische und industrielle Bedeutung haben. So spielen sie eine große Rolle bei der Vermittlung von Resistenzen potenziell

pathogener Bakterien gegen Antibiotika und potenziell pathogener Pilze gegen Antimykotika. Darüber hinaus sterben viele Menschen an den Folgen von Tumoren, da die Chemotherapie nicht wirkt. Diese *Multidrug Resistance* wird meist durch eine vermehrte Expression von ABC-Transportern im Tumorgewebe, die die Chemotherapeutika wieder aus den Tumorzellen transportieren (*Efflux*), hervorgerufen [Dean, M. et al.; 2001a; Pauwels, E. K. et al.; 2007]. Beim Menschen können Mutationen in ABC-Transportergenen zu verschiedenen, teils schweren oder lebensbedrohenden Krankheiten führen [Stefkova, J. et al.; 2004] (Tab. 1).

Nomenklatur	Synonym	Korrelierender Phänotyp / Krankheit
ABCA1	ABC1	Morbus Tangier (Hypo- α -Lipoproteinämie)
ABCA2	ABC2	Alzheimer-Krankheit (Demenz vom Alzheimer Typ)
ABCA3	ABC3	Surfactantmangel-Syndrom
ABCA4	ABCR	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
ABCA7	ABC7	Sjögren Syndrom
ABCA12	ABC12	Lamelläre Ichthyose Typ II (Harlekin-Ichthyose)
ABCB1	MDR1	Colitis ulcerosa
ABCB2	TAP1	Immundefizienz
ABCB3	TAP2	Mb. Wegener-ähnliche Granulomatose
ABCB4	MDR3	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3 (PFIC-3), Intrahepatische Schwangerschaftscholestase
ABCB7	ABC7	X-chromosomale Sideroblastose und Anämie
ABCB11	BSEP	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC-2)
ABCC1	MRP1	Neoplasien / <i>Multidrug Resistance</i> assoziiertes Protein 1
ABCC2	MRP2	Dubin-Johnson Syndrom
ABCC6	MRP6	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
ABCC7	CFTR	Zystische Fibrose (Mukoviszidose)
ABCC8	SUR1	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämien (in der Kindheit)
ABCC9	SUR2	Dilatative Cardiomyopathie mit ventrikulärer Tachykardie
ABCD1	ALD	Adrenoleukodystrophie
ABCD3	PXMP1	Zellweger Syndrom Typ II
ABCG2	MXR, BCRP	Protoporphyrin IX
ABCG5	White3	Beta-Sitosterolämie (Phytosterolämie)
ABCG8	White4	Beta-Sitosterolämie (Phytosterolämie)

Tabelle 1: Humane ABC-Transporter-Gene und ihre korrespondierenden Krankheiten und Phänotypen.

Einige dieser ABC-Transporter sind sehr substratspezifisch, andere sind dagegen multispezifisch. Die meisten ABC-Transporter sind aktive Transporter, es gibt jedoch einige bekannte Ausnahmen. Eine dieser Ausnahmen ist der

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Hierbei handelt es sich um einen Chloridionen-Kanal, der zwei NBD enthält, die über eine Regulator-Domäne miteinander verbunden sind (siehe Abb. 2). Mithilfe dieser Regulator-Domäne kann dieser Ionenkanal reguliert werden. Mutationen im *ABCC7*-Gen führen zur so genannten zystischen Fibrose (Mukoviszidose). Hierbei entsteht ein zäher Schleim in der Lunge und im Verdauungstrakt, welcher Infektionskrankheiten begünstigt. Die Mukoviszidose ist die häufigste zum Tode führende Erbkrankheit der kaukasischen Rasse.

1.1.2 Die ABCA-Subfamilie

Zum heutigen Zeitpunkt enthält die ABCA-Subfamilie 13 vollständig charakterisierte Gene. Die Mitglieder dieser Subfamilie werden mit ABCA1 bis ABCA13 bezeichnet. In der ABCA-Subfamilie des Menschen gibt es ausschließlich Volltransportergene, die anhand ihrer phylogenetischen Analyse in zwei Subgruppen unterteilt wurden [Albrecht, C. et al.; 2007; Broccardo, C. et al.; 1999]. Die erste Subgruppe beinhaltet einen Gencluster mit fünf auf dem Chromosom 17 liegenden Transportergenen ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 und ABCA10 [Annilo, T. et al.; 2003]. Die zweite Subgruppe umfasst acht im Genom verteilte Transportergene: ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCA11, ABCA12 und ABCA13, wobei sich herausstellte, dass ABCA11 ein Pseudogen ist. In der ABCA-Subfamilie findet sich als einzige keine strukturelle Entsprechung im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster*. Darüber hinaus konnte sie bisher nur in multizellulären Organismen nachgewiesen werden. Weiterführende evolutionsgenetische Untersuchungen lassen die Vermutung aufkommen, dass der Ursprung der ABCA-Gene in Halbtransportern liegt. Hierbei sollen sich die Volltransportergene durch Duplikation aus Halbtransportern nach der Trennung der Entwicklungsstränge von Wirbeltieren, Insekten und Würmern entwickelt haben [Anjard, C. et al.; 2002].

ABCA3 gehört zu den ATP-bindenden Transportern der Unterfamilie A Mitglied Nummer 3 (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3*) [Dean, M. et al.; 2001b]. ABCA3 sitzt in der Membran von Lamellarkörperchen, welche in den Pneumozyten des Typs II lokalisiert sind. Diese Lamellarkörperchen sind intrazelluläre Speicher- und Prozessierungsorganellen für Surfactant (surface active agent). Surfactant wird mittels Exozytose in den Alveolarraum sezerniert und kann dort die Oberflächenspannung reduzieren. Lamellarkörperchen sind vermutlich lysosomalen Ursprungs [Bullard, J. E. et al.; 2006; Chi, E. Y. et al.; 1976].

1.1.3 Aufbau der Lunge und Lokalisation von ABCA3 in der Lunge

Die menschliche Lunge besteht aus einem rechten und einem linken Lungenflügel. Der linke, etwas kleinere Lungenflügel besteht aus zwei Lungenlappen, und der rechte Lungenflügel aus drei Lungenlappen. Diese sind vollständig voneinander getrennt. Die Gesamtheit des Lungengewebes kann in einen luftführenden Teil und in einen Teil, in dem der Gasaustausch stattfindet, unterteilt werden (Abb. 3).

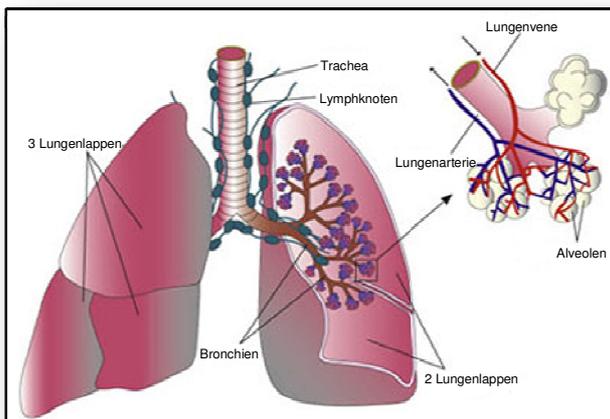


Abbildung 3: **Aufbau der Lunge**; <http://www.krebshilfe.net>

Die Luft gelangt über die Trachea, die sich am Hilus in den rechten und linken Hauptbronchus aufteilt, in die beiden Lungenflügel. Die Hauptbronchien verzweigen sich in immer kleinere Bronchien und Bronchiolen, welche schließlich in den Alveolen (Lungenbläschen) enden. In diesen findet der Gasaustausch statt. Die Trachea

und die Bronchien sind mit einem mehrreihigen hochprismatischen Flimmerepithel ausgekleidet. Je näher man den Alveolen kommt, desto mehr überwiegt die vereinfachte Struktur der Bronchiolen mit einschichtigem hochprismatischem bis kubischem Flimmerepithel. In der unter dem Epithel liegenden *Lamina propria* findet sich glatte Muskulatur, eine Vielzahl elastischer Fasern sowie muköse und seröse Drüsen, deren Ausführungsgänge in das Lumen der Bronchien münden und die Schleimhautoberfläche mit einem Schutzfilm überziehen. Die Trachea sowie die großen Bronchien sind von hyalinem Knorpel umgeben. Dieser gewährleistet, dass die Luftwege offen gehalten werden. Die kleinen Bronchiolen sowie die Alveolen sind nicht von solchen Knorpelspangen umgeben.

Den Großteil des Lungengewebes machen die Alveolen aus. Dabei handelt es sich um sackartige Erweiterungen mit einem Durchmesser von ca. 200 μm und einer beim erwachsenen Menschen geschätzten Anzahl von 300 Millionen. Die respiratorische Fläche umfasst ca. 140 m^2 und besteht zum einen aus den Pneumozyten Typ I, die weniger als 0,1 μm dick sind und das Epithel der Alveolen bilden. Zum anderen besteht die respiratorische Fläche aus den Pneumozyten Typ II, die für die Surfactant-Produktion verantwortlich sind. Dieses Surfactant wird in Lamellarkörperchen, intrazellulären Speicher- und Prozessierungs-Organellen, über Exozytose in den Alveolarraum

sezerniert. ABCA3 sitzt dabei in der limitierenden Membran dieser Lamellarkörperchen. Das Surfactant reduziert die Oberflächenspannung und dient als Antiatelektasefaktor. Darüber hinaus finden sich in den Alveolen Alveolarmakrophagen, die eine Vielzahl an Verunreinigungen phagozytieren und am Recycling von Surfactant beteiligt sind.

Die Bronchiolen werden von Ästen der Pulmonalarterie begleitet, die venöses Blut zum Respirationsgewebe führen. Die Pulmonalarterien der Maus entsprechen in ihrer Funktion denen des Menschen. Im Unterschied zur menschlichen Anatomie fehlen der Maus allerdings die so genannten *Vasa privata*. Über diese wird das menschliche Lungengewebe selbst mit Sauerstoff versorgt. Ein weiterer Unterschied von Mensch und Maus findet sich im anatomischen Aufbau der Lungenvenen. Die Lungenvenen der Maus sind mit quergestreifter Muskulatur umgeben. Diese Muskelbündel finden sich bis in die Wände der kleinen Venen und bilden dort die Hauptsubstanz der Wandstruktur. Vermutlich fördern diese muskulären Strukturen die Abführung des Blutes aus der Lunge. Anders als beim Menschen ist der linke Lungenflügel der Maus nicht unterteilt. Der rechte Flügel des Organs besteht aus insgesamt vier Lappen: dem Oberlappen mit einem dahinter liegenden Mittellappen, Herzlappen und Zwerchfelllappen.

1.1.4 Surfactant-Homöostase und Ihre biologische Bedeutung

Das Surfactant ist eine oberflächenaktive Substanz, die die gesamte alveoläre Oberfläche der Lunge als hauchdünner Film bedeckt. Lungensurfactant setzt sich aus annähernd 90 % Phospholipiden und 10 % Surfactant-Proteinen zusammen. Diese auch Surfactant-Faktor genannte oberflächenaktive Substanz reduziert die Oberflächenspannung um etwa den Faktor 10 [Artus, J. C. et al.; 1975]. Somit wird ein Kollaps der Alveolen, insbesondere bei niedrigem transpulmonalen Druck am Ende der Ausatmung, verhindert.

Der Einfluss der Oberflächenspannung auf die mechanischen Eigenschaften der Lunge wurde erstmals 1929 durch Kurt von Neergard beschrieben [Neergard, K. von 1929]. Bei seinen Experimenten verglich er Druck-Volumen-Kurven luftgefüllter Lungen mit Druck-Volumen-Kurven flüssigkeitsgefüllter Lungen. Dabei stellte er fest, dass die Oberflächenspannung die dominierende Rückstellkraft ist. Die Gewebeelastizität hingegen beträgt nur 25 bis 33 % der gesamten elastischen Rückstellkraft. Anhand dieser Ergebnisse postulierte er die Existenz eines natürlichen oberflächenaktiven Detergens, das Einfluss auf die Oberflächenspannung nimmt. Clemens et al. bewiesen 1957, dass die Lunge selbst die Oberflächenspannung reguliert, indem sie einen Antiatelektasefaktor

produziert [Clemens, E. T. et al.; 1975]. Biochemische Analysen aus dem Jahre 1961 zeigten, dass das Surfactant aus Phospholipiden und Proteinen zusammengesetzt ist [Klaus M.H. et al.; 1961]. Als wichtigstes Surfactant-Phospholipid wurde Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) identifiziert. Die surfactant-unspezifischen, plasmaassoziierten Proteine wie Albumin, Lysozym und Immunglobuline ergänzen einen Surfactant-spezifischen Proteinanteil. Die Lipidzusammensetzung der ultrastrukturell intra- und extrazellulären Erscheinungsformen des pulmonalen Surfactants zeigt zum Teil erhebliche Unterschiede [Adachi, H. et al.; 1989]. Auch der Proteingehalt der verschiedenen Surfactant-Subfraktionen scheint variabel zu sein [Haagsman, H. P. et al.; 1991; Wright, J. R. et al.; 1984]. Auf der Seite der Proteine werden zurzeit vier verschiedene Surfactant-assoziierte Proteine SP-A, -B, -C und -D, die alphabetisch nach dem Jahr ihrer Entdeckung geordnet sind, benannt [Possmayer, F.1988]. Dabei sind die Surfactant-assoziierten Proteine SP-B und SP-C ebenfalls für die Reduzierung der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze verantwortlich sind [Weaver, T. E. et al.; 2001]. SP-A und SP-B, die zu den mannosebindenden Proteinen gehören, fungieren als Kollektine, indem sie als Opsonine wirken. Alle Bestandteile des Surfactants werden in der Lunge durch die Pneumozyten Typ II synthetisiert.

1.1.5 Korrelation zwischen ABCA3-Defekten und respiratorischem Versagen bei Neugeborenen

Das Atemnotsyndrom ist ein typisches Krankheitsbild Frühgeborener (hyalines Membran-Syndrom / *respiratory distress syndrome* (RDS)). Ungefähr 1 % aller Lebendgeborenen erkranken daran. Diese Patienten müssen mittels einer hyperbaren Oxygenierung beatmet werden. Dieses Syndrom ist die häufigste Todesursache in der Neonatalperiode [Koletzko, B. et al.; 2004]. Die Inzidenz steigt mit abnehmendem Gestationsalter. 60 % der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von weniger als 30 Wochen entwickeln aufgrund der Unreife des Surfactantsystems ein Atemnotsyndrom. Die Surfactantbildung beginnt typischerweise ab der 28. Schwangerschaftswoche. Erst in der 34. bis 35. Schwangerschaftswoche wird es sicher in ausreichenden Mengen produziert um die Atmung zu ermöglichen. Eine in der Schwangerschaft bestehende diabetische Stoffwechsellage (z. B. beim Schwangerschaftsdiabetes) kann allerdings die Bildung von Surfactant in der Fetalzeit stören, sodass auch reife Neugeborene über zu wenig Surfactant verfügen können. In einem solchen Fall spricht man auch von einem Atemnotsyndrom des Reifgeborenen. Im Rahmen verschiedener Erkrankungen des Neugeborenen (z. B. bei einer schweren Infektion) ist der Verbrauch bereits produzierten

Surfactants erhöht, sodass als Folge ein sekundäres Atemnotsyndrom entstehen kann. Dieser Surfactant-Mangel führt zu einer Atelektase von Teilen des Lungengewebes. Die Gasaustauschfläche der Lunge verkleinert sich, es entsteht ein Atemnotsyndrom. Die Belüftung der Lunge ist nur noch durch hohe pulmonale Beatmungsdrücke möglich. Die hieraus resultierenden Schäden im Bereich der primitiven Alveolen und der terminalen Atemwege führen zu einer intraalveolären Akkumulation von Plasmaproteinen. Diese Komplikation führt zu dem charakteristischen histologischen Bild der hyalinen Membranen im Bereich der Alveolen. Radiologisch wird dies mit einer homogenen Verschattung der Lunge beschrieben und lässt sich mittels Röntgenthoraxaufnahmen in vier Grade einteilen [Couchard, M. et al.; 1974] (Tab. 2). Die Atmung der Betroffenen ist massiv gestört. Ein Gasaustausch ist kaum möglich. Der an einem Atemnotsyndrom leidende Patient hat eine Zyanose, die Atemanstrengung nimmt zu und äußert sich mit "Nasenflügeln" und einer stöhnenden Atmung. Rippen und Brustbein treten bei jedem Atemzug deutlich sichtbar hervor. Unbehandelt entwickelt sich ein lebensgefährliches Krankheitsbild.

Stadium	Radiologische Zeichen
Stadium 1	Fein granuläre Zeichnung der gesamten Lunge
Stadium 2	Zusätzlich positives Luftbronchogramm jenseits des Herzschattens
Stadium 3	Zusätzliche Unschärfe des Herzschattens und der Zwerchfellkonturen
Stadium 4	Weißer Lunge

Tabelle 2: Radiologische Einteilung des hyalinen Membranen-Syndroms in 4 Stadien; [Couchard, M. et al.; 1974].

Vor Einführung der Surfactant-Substitutionstherapie verstarben 50 % der Kinder im Verlauf des Atemnotsyndroms. In der heutigen Zeit stellt sich nach der intratrachealen Surfactant-Substitution in der Regel eine schnelle Besserung der Atemleistung und beim Frühgeborenen eine Ausreifung der Lunge ein (*surfactant responder*) [Milligan, D. W. et al.; 2001]. In einigen Fällen jedoch beobachtet man trotz Surfactant-Substitution nur eine kurzzeitige Besserung. Nach einer anfänglichen Verbesserung der Atemleistung kommt es dann wieder zu einer lebensbedrohlichen Verschlechterung (*surfactant nonresponder*) (Abb. 4). Etliche dieser Patienten, egal ob frühgeboren oder reifgeboren können, trotz Intensivbetreuung nicht überleben. Eine mögliche Ursache für ein irreversibles Atemnotsyndrom kann eine Mutation im Surfactant-assoziierten Protein SP-B sein [Clark, J. C. et al.; 1995]. Diese Mutation konnte aber nicht in allen Fällen nachgewiesen werden. Dies führte zur Vermutung, dass andere genetische Faktoren ebenfalls an einer gestörten Surfactant-Homöostase beteiligt sein könnten. Im Jahre 2004 konnte gezeigt werden, dass homozygoter ABCA3-Mangel zu einem solchen Phänomen führen kann [Shulenin, S. et al.; 2004].

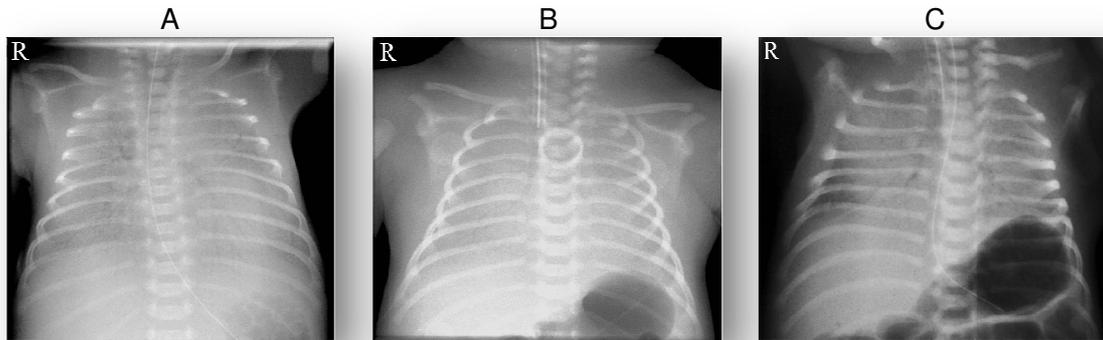


Abbildung 4: **Röntgenthoraxaufnahmen von drei Patienten mit RDS;**
A: Frühgeborenes, 26. Schwangerschaftswoche (SSW), Grad III (*surfactant responder*)
B: Frühgeborenes, 35. SSW, Grad III-IV (*surfactant responder*)
C: Irreversibles Atemnotsyndrom beim reifen Neugeborenen mit ABCA3-Defekt, Grad III-IV (*surfactant nonresponder*).

1.1.6 Medizinische Bedeutung von ABCA3

Auf der Suche nach einem Kalzium-Transporter klonierten 1996 Norbert Klugbauer und seine Arbeitsgruppe aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom cDNA, welche für einen ABC-Transporter mit unbekannter Funktion kodierte [Klugbauer, N. et al.; 1996]. Diesen 1704 Aminosäuren umfassenden Transporter mit einem Molekulargewicht von 190 kDa benannte er ABC-C. Das entsprechende Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 16 lokalisiert [Connors, T. D. et al.; 1997]. In den folgenden Jahren wurde ein Antikörper gegen ein 180 kDa großes Protein LBM180 generiert, welches bei Ratten in der Membran von Lamellarkörperchen von Pneumozyten Typ II lokalisiert war [Zen, K. et al.; 1998]. Einige Zeit später wurde ein 190 kDa großes Protein in Rohextrakt menschlicher Lunge nachgewiesen und mit der Bezeichnung ABCA3 der ABCA-Subfamilie zugeordnet [Yamano, G. et al.; 2001]. Es stellte sich heraus, dass ABCA3 und das von Klugbauer beschriebene ABC-C das gleiche Protein darstellten. Die Wesenseinheit zwischen den Proteinen LBM180 und ABCA3 wurde dann kurze Zeit später hergestellt [Mulugeta, S. et al.; 2002]. Bei Beginn dieser Dissertation im Jahre 2003 war die Funktion von ABCA3 noch völlig ungeklärt. Die Hypothese, dass ABCA3 am Transport von Phospholipiden und somit an der Surfactant-Homöostase beteiligt sein könnte, wurde 2004 postuliert [Nagata, K. et al.; 2004]. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden im Rahmen einer Studie die 30 kodierenden Exons des *ABCA3*-Gens von 21 Reifgeborenen sequenziert, die anhand hoher Wahrscheinlichkeit für eine genetisch bedingte respiratorische Erkrankung (mehrere Betroffene in der Familie und oder Konsanguinität der Eltern) ausgewählt wurden [Shulenin, S. et al.; 2004]. Hierbei konnten bei 16 Kindern homozygote *Nonsense* Mutationen, Rasterschub (*frameshift*) Mutationen sowie Mutationen in hoch konservierten

Nukleotiden als auch Spleißstellen (*splice-site*) im *ABCA3*-Gen identifiziert werden. Diese Mutationen in der untersuchten Gruppe unterstreichen die Vermutung einer zentralen Rolle von *ABCA3* in der Surfactant-Homöostase. Im Jahre 2005 erschien eine Studie, die Neugeborene untersuchte, die einen angeborenen Surfactant-Mangel aufwiesen und in den ersten Monaten verstorben waren [Edwards, V. et al.; 2005]. In den meisten Fällen konnte ein SP-B Mangel für das Versterben der Neugeborenen verantwortlich gemacht werden. Doch bei der Biopsie von vier Lungen wurden abnormale Lamellarkörperchen gefunden. Bei zwei dieser Neugeborenen wurde eine Mutation im *ABCA3*-Gen nachgewiesen. Eine weitere Studie untersuchte 195 Neugeborene mit chronischen Lungenerkrankungen. Hierbei wurden vier Kindern mit histologisch diagnostizierter desquamativer interstitieller Pneumonie (*desquamative interstitial pneumonia*, DIP) im *ABCA3*-Gen sequenziert. Bei drei dieser Patienten wurde eine Punktmutation auf einem Allel gefunden (E292V). Zur Kontrolle wurden 200 Probanden, die keine chronischen Lungenerkrankungen aufwiesen, auf diese Mutation hin untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass diese Mutation (E292V) kein häufiger Polymorphismus ist [Bullard, J. E. et al.; 2005]. Im Jahre 2006 erschienen einige Arbeiten, die die Korrelation zwischen Mutationen im *ABCA3*-Gen und schwerem Surfactant-Mangel und dem hieraus resultierenden irreversiblen Atemnotsyndrom, sowie einer gestörten Surfactant-Homöostase herstellen konnten [Garmany, T. H. et al.; 2006; Matsumura, Y. et al.; 2006; Whitsett, J. A.2006].

1.1.7 *ABCA3* von Mensch und Maus im Vergleich

Das humane *ABCA3*-Gen liegt auf Chromosom 16p13.3. Die kodierende Region erstreckt sich über 33 Exons, welche eine Transkriptlänge von 6466 Basenpaaren hervorbringt. Das daraus resultierende Genprodukt besteht aus 1704 Aminosäuren. Bei der Maus hingegen liegt das *Abca3*-Gen auf Chromosom 17b2. Es besitzt ebenfalls 33 Exons, welche ein Transkript von 5778 Basenpaaren erzeugen. In Homologie zum humanen *ABCA3* ist auch hier das Genprodukt 1704 Aminosäuren lang.

1.2 Mögliche Verfahren zur Erstellung einer *knockout*-Maus

Um die Funktion eines Genproduktes *in vivo* zu untersuchen und zu charakterisieren gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Methoden. Viele dieser Methoden haben als generelle Herangehensweise gemein, dass sie ausgehend vom normalen Protein oder dem sequenzierten Genom zu einer Mutante führen (Abb. 5).

Eines der elegantesten Verfahren, um mittels einer genetischen Manipulation gezielt ein oder mehrere Gene zu deaktivieren, ist die gezielte homologe Rekombination. Hierbei wird das Gen von Interesse mutiert oder zerstört. Die Erstellung von *knockout*-Mäusen ist von unschätzbarem Wert für die Untersuchung und Charakterisierung

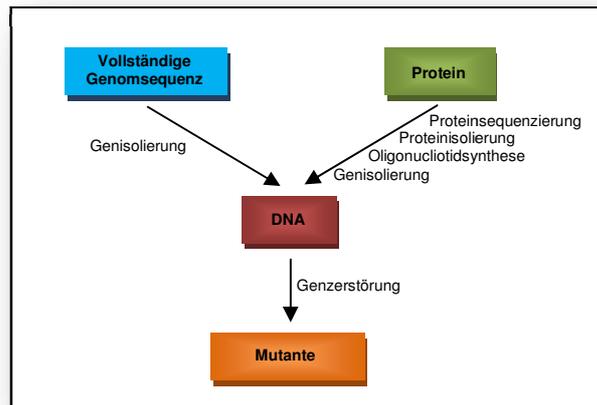


Abbildung 5: Vorgehensweise zur Erstellung eines Gen-knockouts.

von Genfunktionen, die Herstellung solcher Tiere ist jedoch mühsam und teuer. Die verschiedenen Methoden zur Generierung von *knockout*-Mäusen wurden während der 1980er Jahre von Mario Capecchi von der University of Utha, Oliver Smithies von der University of Wisconsin und Martin Evans an der Cambridge University entwickelt. Ende 2007 wurde Ihnen der Nobelpreis für Medizin verliehen. In der Begründung heißt es, der Preis werde ihnen für ihre "Entdeckung von Prinzipien für die Einführung spezifischer Veränderung bei Mäusen unter Verwendung von embryonalen Stammzellen" verliehen.

Das *Gen-Targeting* in embryonalen Stammzellen beruht auf der Zuhilfenahme eines natürlichen Prozesses, der homologen Rekombination, und erlaubt so das Ausschalten eines bestimmten Gens [Capecchi, M. R.1989; Joyner, A. L.2000]. Andere Verfahren erlauben die Übertragung von Fremdgenen oder veränderten Formen endogener Gene in einen Organismus. Derartige in einen anderen Organismus übertragene Gene bezeichnet man als Transgene; die Organismen, die daraus resultieren, als transgene Organismen. Bei einigen Genen ist es aber nicht möglich, das Gen einfach auszuschalten, da dies eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Organismus spielt. Um dies zu umgehen, wurden konditionale Mutanten entwickelt. Diese Methode wird als konditionaler *knockout* bezeichnet [Lewandoski, M.2001]. Das zu inaktivierende Gen wird dazu in einem *Gen-Targetingvektor* durch Schnittstellen für erkenntungsspezifische Rekombinasen

(z. B. *Cre/loxP*; *Cre* = cyclization recombination, *loxP* = locus of X-over P1 des Bakteriophagen P1 oder flp; **F**lippase bei Hefe) flankiert. Somit kann dann das Gen durch Expression der entsprechenden Rekombinase zu einem spezifischen Zeitpunkt oder in einem speziellen Organ mittels gewebespezifischer Promotoren gewebes- oder zeitspezifisch deletiert werden.

Mithilfe des *Cre/loxP*-Systems können nicht nur einzelne Gene inaktiviert werden, sondern auch chromosomale Veränderungen wie z. B. Deletionen, Inversionen, Translokationen und Duplikationen ermöglicht werden [Yu, Y. et al.; 2001]. Diese Methode bezeichnet man als *Chromosomen-Engineering*. Hierbei werden sequenziell zwei *loxP*-Erkennungssequenzen in zwei Genlocis integriert. Durch transiente Expression von *Cre*-Rekombinase kann nun ein chromosomales *Rearrangement* stattfinden.

Eine weitere Methode, um Gene gewebsspezifisch oder zeitspezifisch zu induzieren, ist die induzierbare Transgenexpression. Das bekannteste Verfahren ist hier die TetR bzw. das *Tet-on-Tet-off*-System [Baron, U. et al.; 2000]. Hierbei wird die Expression des Gens von Interesse von der Expression eines weiteren Gens und der Gabe von Tetrazyklin abhängig gemacht.

Eine ältere, aber heute noch genutzte Methode macht sich die Mutationsanfälligkeit der Erbinformation zu Nutze. Die spontane Mutationsrate bei Mäusen liegt etwa bei 1×10^{-6} . Diese Mutationsraten lassen sich durch chemische oder physikalische Methoden (z. B. durch Ethylnitrosoharnstoff, Bestrahlung) drastisch steigern. Diese Methode erlaubt es aber nicht, ein Gen gezielt auszuschalten. In der Vergangenheit wurden weltweit Mausmutagenese-*Screens* durchgeführt, um systematisch neue Mausmutationen mit spezifischen Phänotypen zu produzieren [Balling, R.2001].

Die Mutation eines Gens kann auch mittels der so genannten Genfallentechnologie (*Gene Trap Technology*) bewerkstelligt werden, bei der ein Genfallenvektor in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht wird [Stanford, W. L. et al.; 2001]. Hierbei integriert der Vektor in ein beliebiges Gen der Maus und dieses wird hierdurch deaktiviert. Der Promotor des mutierten Gens veranlasst nun eine Expression des auf dem Vektor enthaltenen Reportergens, dessen Protein in einer Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Anschließend ermittelt man durch Sequenzierung, um welches Gen es sich handelt. Welches Gen inaktiviert wird, ist nicht ganz zufällig, da die verschiedenen *Gene-Trap*-Vektoren spezifische Vorlieben hinsichtlich des Ortes ihrer Integration haben [Austin, C. P. et al.; 2004].

Seit der Geburt des Klonschafs Dolly am 5. Juli 1996 ist die somatische Klonierung, oder umgangssprachlich das Klonen, auch in der breiten Öffentlichkeit bekannt [Campbell, K. H. et al.; 1996]. Hierbei wird der Kern einer somatischen Zelle in eine embryonale Stammzelle transplantiert. Aus diesem Klon kann nun wieder ein, nun aber genetisch dem Spendertier entsprechendes Individuum entstehen.

In den letzten Jahren hat eine neue Methode für Furore gesorgt. Die RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht den spezifischen Abbau von mRNA und damit das effektive Abschalten genetischer Aktivität. Hierzu wird meist eine ca. 21 Nukleotide lange einzelsträngige RNA in die Zelle eingebracht. RNAi führt zur Translationsblockade der Ziel-mRNA oder zur Methylierung und dem Abschalten des entsprechenden Gens [Fire, A. et al.; 1998]. Als zielerkennende RNA kann miRNA (*micro*RNA) oder siRNA (*s*mall *i*nterfering RNA) wirken. Der entscheidende Unterschied liegt in der Herkunft der beiden kleinen RNAs. So wird miRNA in der Zelle auf eigenen pri-miRNA-Genen kodiert, die siRNA hingegen entsteht aus längerer freier dsRNA, die z. B. von Transposons oder von Viren stammen.

1.2.1 *Knockout* durch homologe Rekombination

Die homologe Rekombination nutzt einen natürlichen Vorgang, der z. B. während der Meiose vorkommt, den Austausch von Allelen und die Neuordnung und Verteilung von genetischem Material. Hierbei werden homologe Bereiche der Chromatiden gegeneinander ausgetauscht. Eine der wichtigsten Methoden in der experimentellen Mausgenetik ist die Herstellung von Mausmutanten mittels *Gen-Targeting* in embryonalen Stammzellen.

Während normalerweise nach Elektroporation oder Transfektion DNA in Säugetierzellen mehr oder weniger zufällig im Genom integriert, kann in einigen Fällen eine Integration in den Genlocus mit homologer DNA-Sequenz beobachtet werden. Das endogene Gen wird praktisch durch das eingebrachte und mutierte Gen ersetzt oder durch Integration des Fremdgens inaktiviert. Trotz des hohen Zeitaufwands ist diese Methode noch immer ein Standardverfahren um eine Genfunktion aufzuklären. Für diese Art der genetischen Manipulation benötigt man einen so genannten *Targeting*-Vektor. Dieser Vektor beinhaltet eine Antibiotika-Resistenz-Kassette, meist eine Neomycin-Resistenz-Kassette, die die Positivselektion ermöglicht, und wird von zwei Gensequenzen (5'-Arm und 3'-Arm) flankiert. Diese entsprechen den nativen Gensequenzen von Interesse und ermöglichen so die homologe Rekombination. Zur Unterscheidung eines *Single-Crossover*-Ereignisses und dem gewünschten *Double-Crossover*-Ereignisses enthält der *Targeting*-Vektor vor

dem 5'-Arm noch eine Diphtherie-A-Kassette. Diese Kassette kodiert für das Diphtherie Toxin-A, welches eine Negativselektion ermöglicht. Findet nur ein *Single-Crossover*-Ereignis statt, wird das Diphtherie Toxin-A exprimiert und die Zelle stirbt ab.

1.2.2 Von manipulierten embryonalen Mausstammzellen zur *knockout*-Maus

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) findet man in einem frühen Stadium der Blastozyste von Säugetieren, welche der Blastula in anderen Tierarten entspricht. Diese embryonalen Stammzellen sind noch pluripotent, es ist also noch nicht festgelegt, zu welchem Zelltyp sie einmal ausdifferenzieren [Beddington, R. S. et al.; 1989]. In Ihnen findet eine hohe Anzahl von homologen Rekombinationen statt. Die Blastozyste besteht aus zwei Teilen. Die äußere Schicht bildet das Trophoektoderm, aus dem die meisten extraembryonalen Gewebe entstehen. Die innere Oberfläche des Trophoektoderms enthält einen Zellhaufen, die innere Zellmasse, die in den Innenraum (Blastozöl) hineinragt. Aus einer kleinen Anzahl dieser inneren Zellmasse entwickelt sich der eigentliche Embryo. Die innere Zellmasse wird auch Embryoblast genannt und enthält die embryonalen Stammzellen. Diese embryonalen Stammzellen dienen als Ausgangspunkt für die Erstellung einer genmanipulierten Maus (siehe Abb. 6).

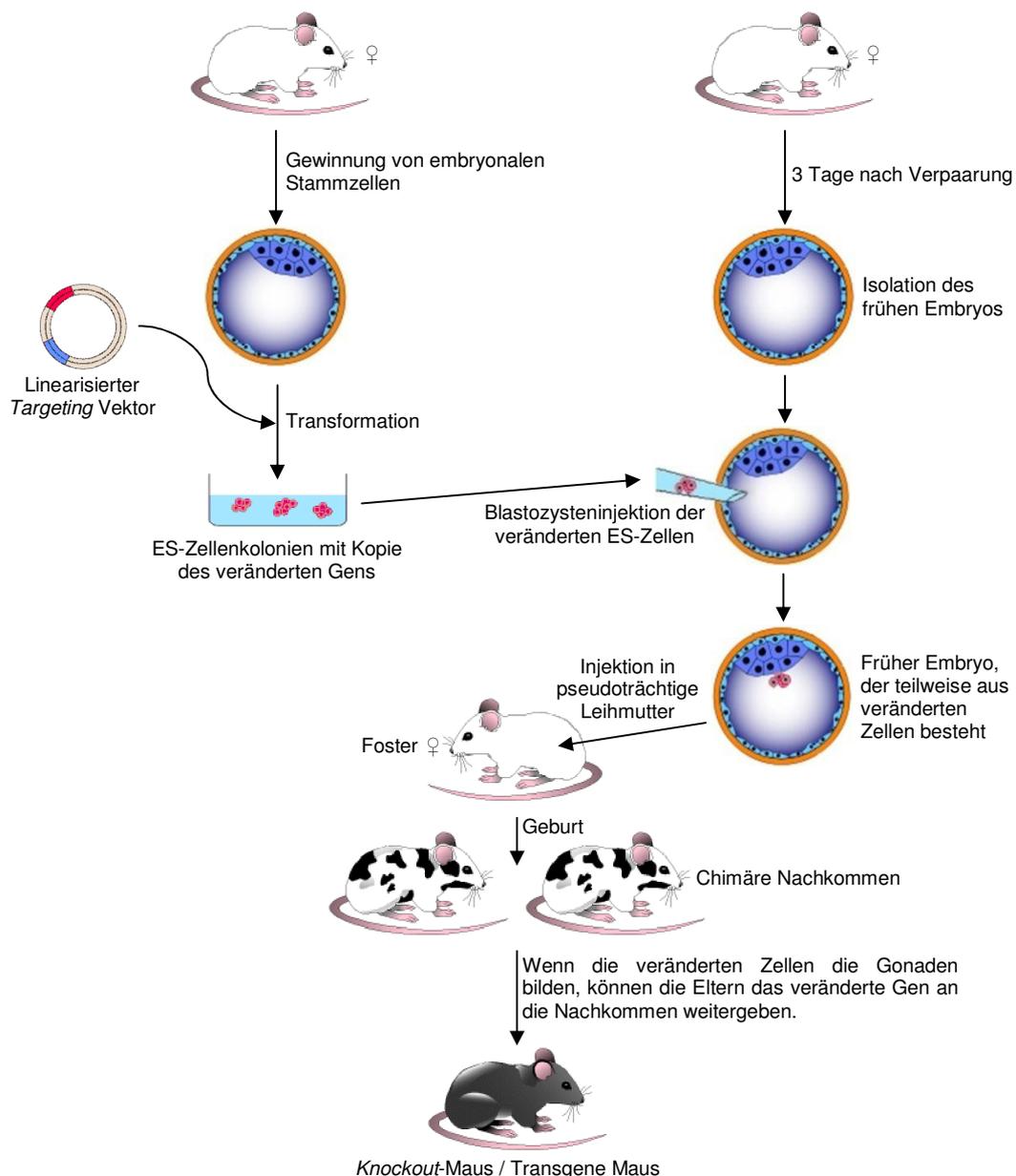


Abbildung 6: **Strategie zur Generierung einer *knockout*-Maus;** Injektion von manipulierten ES-Zellen in Blastozysten und deren Implantation in pseudoträchtige Mäuse. Es entstehen *chimäre* Nachkommen. Bei Tieren, bei denen sich die manipulierten ES-Zellen zu Keimzellen entwickelt haben, können diese nun *Founder* genannten Tiere die Manipulation an ihre Nachkommen weitergeben.

Nach Überprüfung der erfolgten homologen Rekombination werden diese embryonalen Stammzellen in Blastozysten injiziert. Im Anschluss werden diese modifizierten Blastozysten in zyklussynchronisierte pseudoträchtige Mäuse mittels Embryotransfer transferiert. Diese pseudoträchtigen Weibchen erhält man durch die Verpaarung mit vasktomierten Männchen. Da die embryonalen Stammzellen üblicherweise aus *Agouti*-Mausstämmen gewonnen werden (*Agouti* steht für eine dominante Fellfarbe), die Blastozysten hingegen aus *Non-Agouti*-Mausstämmen, ist es möglich die durch den

Embryotransfer entstandenen Nachkommen auf diese Weise anhand der Fellfärbung auf das Vorhandensein der Mutation hin zu unterscheiden. Nachkommen mit *Agouti*-Anteil werden als *Chimäre* bezeichnet. Diese hieraus resultierenden *Chimären* tragen jedoch nicht in allen Zellen die gewünschte Manipulation und werden deshalb mit Wildtyp-Tieren verpaart. Erst wenn bei einem *chimären* Tier die in die Blastozyste eingebrachten manipulierten embryonalen Stammzellen in die Keimbahn gelangen, kann dieses dann *Founder* genannte Tier die gewünschte Manipulation an seine Nachkommen weitergeben.

1.3 Zielsetzung der Arbeit und Erwartungen

Ein zentraler Antrieb dieser Arbeit war die unbefriedigende Tatsache, dass einige reifgeborene Kinder mit RDS trotz Surfactant-Substitutionstherapie verstarben. Die Vermutung lag nahe, dass ABCA3, welches eine hohe Homologie zu anderen Lipidtransportern hat und in der Membran von Lamellarkörperchen liegt, die für die Surfactant-Homöostase von zentraler Bedeutung sind, eine wichtige Lipid-Transportfunktion besitzt. Somit wurde die Hypothese entwickelt, dass Mutationen im ABCA3-Gen und somit die fehlerhafte Expression von ABCA3 zum Versagen der Surfactant-Homöostase führen würde. Zur Bestätigung dieser Hypothese sollte mithilfe der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen eine *Abca3*-defiziente transgene Mauslinie erstellt werden, welche eine genaue und umfassende Charakterisierung von ABCA3 zulässt. Hierbei sollte ein *Abca3*-Null-Allel generiert werden und hrGFP (*humanized renilla green fluorescent protein*) unter dem nativen Promotor des *Abca3*-Gens exprimiert werden. Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge auf Proteinebene sind wenig untersucht, daher weitestgehend unverstanden und sollten auf diesem Wege weiter aufgeklärt werden. Insgesamt ergaben sich daraus folgende Aufgabenstellungen:

1. Charakterisierung des *Abca3*-Locus in der Maus
2. Erstellung eines *Targeting*-Konstruktes für die homologe Rekombination
3. Manipulation embryonaler Stammzellen
4. Erstellung einer transgenen *Abca3*-defizienten Mauslinie
5. Untersuchung der Pathomechanismen des ABCA3-Mangels durch Charakterisierung der Mauslinie
6. Identifizierung des Substrats von ABCA3

2 Ergebnisse

2.1 Protein-Alignments

Die Funktion eines Proteins liegt letztlich in seiner Struktur begründet [Branden, C. et al.; 1991]. Daher ist die Kenntnis der Proteinstruktur hilfreich und in vielen Fällen wesentlich für die Aufklärung der Funktion des Proteins. Die strukturelle Klassifikation findet hierbei mit einer in den letzten Jahren entwickelten Methode, dem Protein-*Threading* statt. Das Protein-*Threading* ist eine computergestützte Vorhersage der Proteinstruktur anhand der Aminosäuresequenz [Lemer, C. M. et al.; 1995]. Die Strukturvorhersagen bergen das Potenzial der Funktionsvorhersage für Proteine und darüber hinaus sogar die Möglichkeit, die Zuverlässigkeit solcher Aussagen zu steigern. Auf der Basis strukturgenauer Alignments, die mittels *Threading*-Verfahren berechnet werden, kann man bei hinreichender Genauigkeit des Alignments sogar eine strukturelle Modellierung des möglichen Zielproteins versuchen [Zimmer, R. et al.; 1997]. Ebenso ist es möglich, verschiedene Proteine in einem solchen Alignment auf ihre Homologie zueinander hin zu untersuchen und diese Proteine miteinander zu vergleichen.

2.1.1 Protein-Alignments von humanem ABCA3 mit anderen Lipidtransportern

Alle ABC-Transporter der Subfamilie A, für die funktionelle Daten vorliegen, transportieren Lipide. Das für die Protein-Alignments verwendete Programm war Align Plus 5.11 - Clone Manager Professional Suite 7 der Firma Sci Ed Central; USA. Hierbei wurde als *Scoring Matrix* BLOSUM62 verwendet. Es wurden als charakteristische Vertreter dieser Subfamilie zwei weitere ausgewählt. Hierbei handelte es sich um ABCA1 sowie um ABCA4. ABCA1 (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1*) transportiert für die Synthese von HDL (*high density lipoprotein*) erforderliches Cholesterin und Phospholipide aus den Zellen. Dieses HDL entsteht, wenn Apolipoprotein A1 (apoA1) im Blut mit Cholesterin und Phospholipiden zusammenkommt. Bei Mutationen im *ABCA1*-Gen entsteht eine Anhäufung von Cholesterin in den Zellen verschiedenster Organe. Dies führt in einigen Fällen zur Reduktion des im Blut vorhandenen HDL und wird als *Morbus Tangier* oder Hypo- α -Lipoproteinämie beschrieben [Oram, J. F. et al.; 2001; Rust, S. et al.; 1999]. Das *ABCA4*-Gen (*ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4*) wird in Sehzellen exprimiert. Unter Lichteinfluss wird Sehpurpur (11-*cis*-Retinal) in Sehgelb (all-*trans*-Retinal) umgewandelt und danach mit Phosphatidyl-Ethanolamin (PE) konjugiert. ABCA4 transportiert dieses konjugierte Abbauprodukt aus den Sehzellen. Mutationen in

dem ABCA4-Gen führen zur Ansammlung von giftigen Abbauprodukten von Sehgelb in den Sehzellen, die häufigste Ursache von *Morbus Stargardt* und der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie [Molday, R. S.2007; Sun, H. et al.; 2001]. ABCA1 besitzt eine Größe von 2261 Aminosäuren, wohingegen ABCA4 2273 Aminosäurenreste groß ist. Als Referenzsequenz wurde für dieses Alignment die Sequenz von ABCA4 benutzt. Die genauen Daten zu diesem Alignment wurden unter Anhang 1.1 angehängt. Die ABCA-Transporter zeigen eine 45 bis 66 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der gesamten Sequenz. Hierbei finden sich gerade in der NBD hochkonservierte Bereiche, die Spezies übergreifend kaum variieren [Broccardo, C. et al.; 1999]. Hierfür wurden die für die ABC-Transporter charakteristischen Elemente der ATP-bindenden Domäne wie Walker A, Walker B und das Signaturelement eingezeichnet. Darüber hinaus wurde die Switchsignatur gelb dargestellt.

2.1.2 Protein-Alignments von humanem mit murinem ABCA3

Das für die Protein-Alignments verwendete Programm war Align Plus 5.11 - Clone Manager Professional Suite 7 der Firma Sci Ed Central; USA. Hierbei wurde als *Scoring Matrix* BLOSUM62 verwendet. Es ergab sich eine 88-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von ABCA3 von Mensch und Maus (siehe Anhang 1.2). Darüber hinaus besteht ein sehr hoher Konservierungsgrad in den zwei NBD. In den Alignments wurden hierfür die Walker A, Walker B und das Signaturelement eingezeichnet. Auch hier wurde die Switchsignatur gelb hervorgehoben.

2.1.3 Strukturvorhersage des humanen ABCA3

Zur Strukturvorhersage (siehe 4.14.1) des humanen ABCA3 wurde das auf der Homepage des Institut Pasteur <http://bioweb.pasteur.fr> bereitgestellte Programm *TopPred* verwendet [von Heijne, G.1992].

Für ABCA3 wurden insgesamt 12 Transmembrandomänen mittels des oben beschriebenen Programms vorhergesagt (siehe Abb. 7). Hierbei erkennt man gut die zwei in das Zytoplasma ragenden NBD. Die genauen mathematischen Ergebnisse wurden im Anhang unter Punkt 1.3 angehängt.

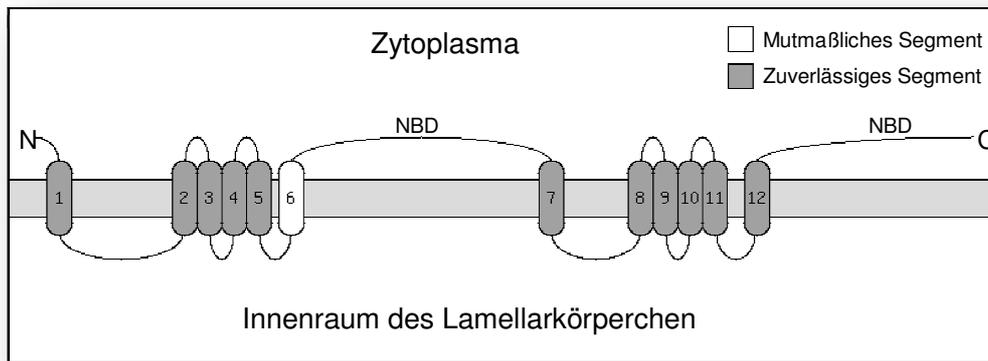


Abbildung 7: Die 12 Transmembrandomänen von ABCA3; Sie durchspannen die äußere Membran des Lamellarkörperchens. Die NBD ragt ins Zytoplasma; <http://bioweb.pasteur.fr>.

2.2 Generierung einer *Abca3*-defizienten Mauslinie

Mithilfe einer N-terminalen Sonde des humanen *ABCA3* wurde die Maus *Expressed Sequence Tag* Datenbank gescreent. Die für die Erstellung des Vektors nötigen Bereiche konnten in der SV129 Maus Genom-DNA identifiziert werden. Somit war es möglich, embryonale Stammzellen mittels homologer Rekombination so zu manipulieren, dass kein funktionelles *ABCA3*-Protein mehr exprimiert wird. Außerdem sollte der Promotor des *Abca3*-Gens intakt belassen werden, um unter diesem hrGFP zu exprimieren.

2.2.1 Gewinnung einer *Abca3*-spezifischen DNA-Sonde mittels *Expressed Sequence Tag's (EST's)*

Die Sequenzinformation des murinen *Abca3*-Gens wurde der NCBI Datenbank (**N**ational **C**enter of **B**io**t**echnology **I**nformation, USA) und der *Celera Genomics* Datenbank (Rockvill, USA) entnommen. Der Translationsstart des murinen *ABCA3* ist im Exon 4 determiniert. Die öffentliche *Expressed Sequence Tag* Datenbank (NCBI) wurde mit einer N-terminalen Sonde des humanen *ABCA3* durchsucht. Es wurde ein 579 bp großes cDNA Fragment der Maus identifiziert (*Accession No.* AW05861), welches den Translationsstart enthält. Dieses Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und für den Hybridisierungsscreen mit einer SV129 Maus Genom-DNA Cosmid Datenbank (*library 121; Geman Resource Center for Genome Research*) verwendet. Hierbei wurden 6 positive Clone identifiziert und bestellt.

2.2.2 Restriktionsanalysen der Cosmide

Um aus den zuvor unter 2.2.1 beschriebenen 6 positiven Klonen der SV129 Maus Genom-DNA Cosmid Datenbank den Klon zu identifizieren, der die für die homologe Rekombination infrage kommenden, notwendigen homologen Bereiche beinhaltet, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierfür wurden die Klone mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Xho*I verdaut. Der Klon MPMGC121J02568Q2 enthielt dabei das gesuchte 13576 bp große Fragment (siehe Abb. 8). Dieses Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion, wie unter 4.1.4 beschrieben, gereinigt (siehe Abb. 9).

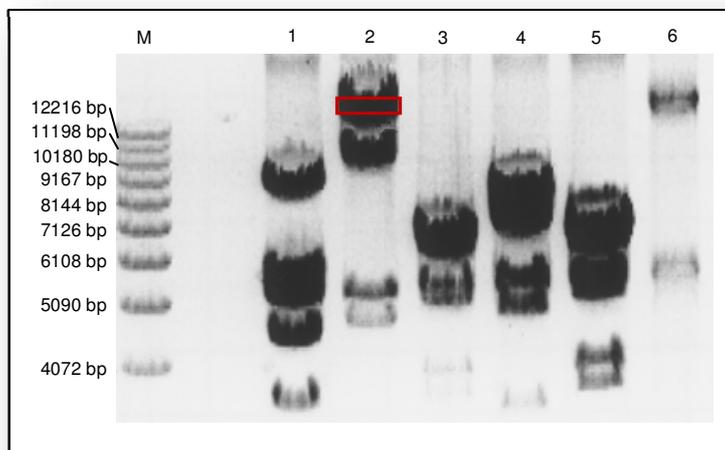


Abbildung 8: Restriktionsverdau der Cosmide mittels *Xba*I und *Xho*I; 0,7-prozentiges Agarosegel, M: 1kb Marker, 1 bis 6: Restriktionsverdaue der 6 positiven Klone mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Xho*I. Klon zwei zeigt das 13576 bp Fragment, welches aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gereinigt wurde.

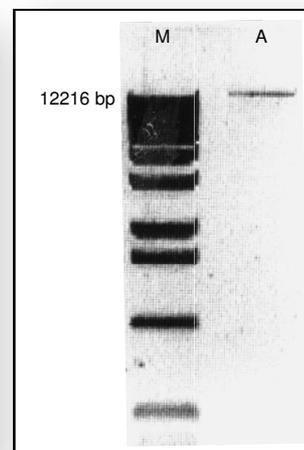


Abbildung 9: Kontrollgel der Gelextraktion von Klon zwei aus Abb. 8; 0,7-prozentiges Agarosegel, M: 1kb Marker, A: Gereinigtes 13576 bp Fragment.

2.2.3 Allgemeine Strategie zur Erstellung des *Abca3*-Targeting Konstruktes

Die Strategie zur Erstellung des *Targeting*-Konstruktes war hierbei, den Translationsstart, welcher sich, wie unter 2.2.1 beschrieben, im Exon 4 befindet, intakt zu belassen. Hierbei werden Teile des Exons 5, das gesamte Exon 6 und Teile des Exons 7 ausgetauscht und somit auf chromosomaler Ebene zerstört (siehe Abb. 10). Der native Promotor des *Abca3*-Gens soll hierbei intakt bleiben. Daraus resultiert, dass ein kleiner Rest von 24 Aminosäuren exprimiert wird. Um diesen *Abca3*-spezifischen Promotor nutzen zu können, wird das Konstrukt so geplant, dass der *Targeting*-Vektor eine IRES-Region (*i*nternal *r*ibosomal *e*ntry *s*ite) enthält, gefolgt von einer hrGFP-Kassette (*h*umanized *r*enilla *g*reen *f*luorescent *p*rotein). Dabei dient die vor das hrGFP geschaltete IRES-Region als Translationsvermittler, da es normalerweise nicht möglich ist

bicistronische mRNA in eukaryotischen Zellen zu translatieren. Diese IRES bildet eine Sekundärstruktur auf mRNA-Ebene aus, welche ohne weitere Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermitteln kann und wodurch somit ein darauffolgendes ATG als Start der Translation erkannt wird. Somit ist es möglich, hrGFP unter dem nativen *Abca3*-Promotor zu exprimieren. Zur späteren Positivselektion wird zusätzlich eine mit *loxP-sites* flankierte Neomycin-Kassette in den Austauschbereich integriert. Dieser Austauschbereich wird am 5'-Ende von einem 5'-Arm flankiert und am 3'-Ende von einem 3'-Arm. Diese dem chromosomalen Matrizenstrang (*Template*) homologen Nukleotidsequenzen dienen der homologen Rekombination. Zusätzlich ist am äußeren 5'-Ende eine DT-A-Kassette untergebracht, welche zur Negativselektion dient.

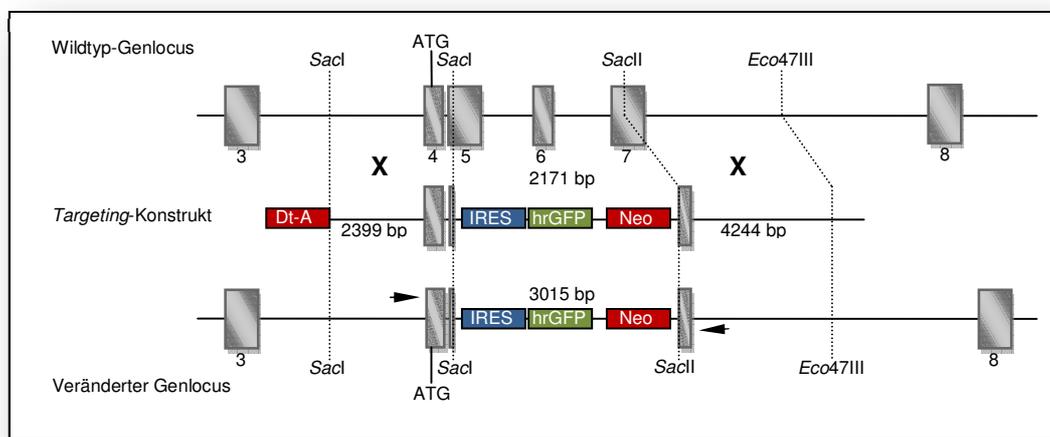


Abbildung 10: **Abca3-Targetingstrategie**; Exons sind grau unterlegt; Dt-A: Diphtherie-Toxin A Kassette, IRES: *i*nternal *r*ibosomal *e*ntry *s*ite, hrGFP: *h*umanized *r*enilla *g*reen *f*luorescent *p*rotein, Neo: Neomycin-Resistenz-Kassette; **X**: Orte der homologen Rekombination; Die Pfeile geben Oligonukleotid-Primer zum Screening an (siehe 2.2.6). Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

2.2.4 Erstellung des *Abca3*-Targeting-Vektors

Mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Xba*I (siehe 4.1.9) wurde aus dem Klon MPMGC121J02568Q2 ein 13576 bp großes Fragment herausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion aufgereinigt (siehe 4.1.4). Dieses Fragment wurde in zwei getrennten Ansätzen verdaut. Hierbei wurde im ersten Ansatz das 13576 bp große Fragment mit *Sac*I verdaut, um den 5'-Arm zu erhalten. Die dabei entstandenen Fragmente waren 4878 bp, 4202 bp, 2399 bp, 1944 bp und 153 bp groß. Das 2399 bp große Fragment (5'-Arm) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion aufgereinigt (siehe Abb. 11). Im zweiten Ansatz wurde das 13576 bp große Fragment mit *Sac*II und *Eco*47III verdaut, um den 3'-Arm zu erhalten. Dabei entstehen Fragmente mit 4244 bp, 2817 bp, 2242 bp, 2213 bp und 2060 bp. Das hierbei entstandene 4244 bp große Fragment (3'-Arm) wurde

aus dem Gel ausgeschnitten und ebenfalls mittels Gel-Extraktion aufgereinigt (siehe Abb. 11).

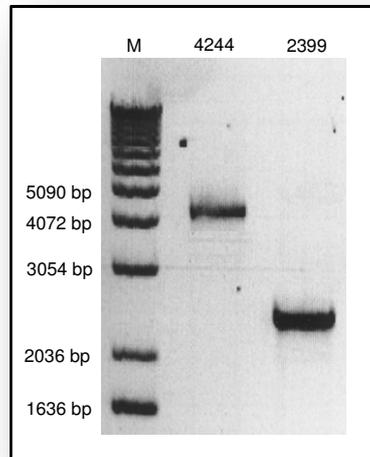


Abbildung 11: **DNA-Elektrophorese der zur homologen Rekombination verwendeten 3'- und 5'-Arme**; 0,9-prozentiges Agarosegel: M: 1kb Marker; 4244: Gereinigtes 4244 bp Fragment (3'-Arm); 2399: Gereinigtes 2399 bp Fragment (5'-Arm).

Der Vektor pIRES-hrGFP-2a (Stratagene, USA) wurde mit *SacI* verdaut. Der mittels PCR-Aufreinigung (siehe 4.1.4) gereinigte Vektor wurde mit dem 5'-Arm (2399 bp) ligiert (siehe 4.1.10). Da *SacI* *blunt-ends* erzeugt, muss nach der Ligation ein Orientierungsscreen durchgeführt werden. Der entstehende Vektor wurde pIRES-hrGFP-2a-5'Arm genannt. Die Dt-A-Kassette wurde mittels Primern (siehe 5.7: pBlue_Dt-A_f / pBlue_Dt-A_r) aus dem Vektor pBluescript II SK(+)/DT-A1 (Stratagene) amplifiziert. Die Primer enthalten *NheI*-Schnittstellen am 3'- und am 5'-Ende. Dieses PCR-Produkt wurde mit *NheI* verdaut und mittels PCR-Aufreinigung gereinigt. Der Vektor pIRES-hrGFP-2a-5'Arm wurde ebenfalls mit *NheI* verdaut und per PCR-Aufreinigung gereinigt. Die Dt-A-Kassette (incl. Promotor und SV40poly A kodierender Sequenz) wurde mit dem geschnittenen Vektor pIRES-hrGFP-2a-5'Arm ligiert. Auch nach diesem Klonierungsschritt erfolgte ein Orientierungsscreen, um die richtige Integration des Inserts zu kontrollieren. Der hieraus resultierende Vektor wurde pIRES-hrGFP-2a-5'Arm-Dt-A genannt. Mithilfe geeigneter Primer (siehe 5.7: pcDNA3.1+Exo_f / pcDNA3.1+Exo_r), wurden in den Vektor pcDNA3.1zeo⁺ die Schnittstellen *BclI*, *NruI* und *BclI* eingeführt. Hierzu wurde ein Primer erstellt, der folgende Schnittstellen enthält: *NheI*, *BclI*, *KpnI*, *NotI*, *NruI*, *BclI* und *XhoI*. Das entstehende PCR-Produkt wurde mittels PCR-Aufreinigung gereinigt und durch den Verdau mit *NheI* und *XhoI* in den Vektor pNeoflox8 [Hennet, T. et al.; 1995] kloniert. Anschließend wurde die mit *loxP-Sites* flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette (PGKneo) aus dem Vektor

pNeoflox8 mittels *KpnI* und *NotI* herausgeschnitten und in den manipulierten Vektor pcDNA3.1zeo⁺ kloniert. Somit flankiert die PGKNeo-Kassette am 3'-Ende eine *BclI*-Schnittstelle, am 5'-Ende eine *NruI* gefolgt von einer *BclI*-Schnittstelle. Dieser Vektor wurde als pcDNA3.1zeo⁺Neo/loxP geführt. Der anschließende Verdau des modifizierten Vektors (pcDNA3.1zeo⁺Neo/loxP) mit *BclI* schneidet die PGKNeo-Kassette heraus, dieses gereinigte Fragment wurde in den zuvor mit *BclI* verdauten und gereinigten Vektor pIRES-hrGFP-2a-5'Arm-Dt-A kloniert. Nach der Ligation wurde erneut ein Orientierungsscreen durchgeführt. Der erhaltene Vektor wurde pIRES-hrGFP-2a-5'Arm-Dt-A-Neo/loxP genannt. Anschließend wurde der Vektor pIRES-hrGFP-2a-5'Arm-Dt-A-Neo/loxP mit *NruI* verdaut und mittels PCR-Aufreinigung gereinigt. In diesen geschnittenen Vektor wurde der 3'-Arm (4244 bp) kloniert. Der folgende Orientierungsscreen stellte sicher, dass das Insert in der richtigen Orientierung integriert wurde. Der erhaltene Vektor wurde als *Abca3*-KO-Vektor bezeichnet (siehe Abb. 12). Im Anschluss wurde das erhaltene Konstrukt sequenziert und auf seine Richtigkeit überprüft.

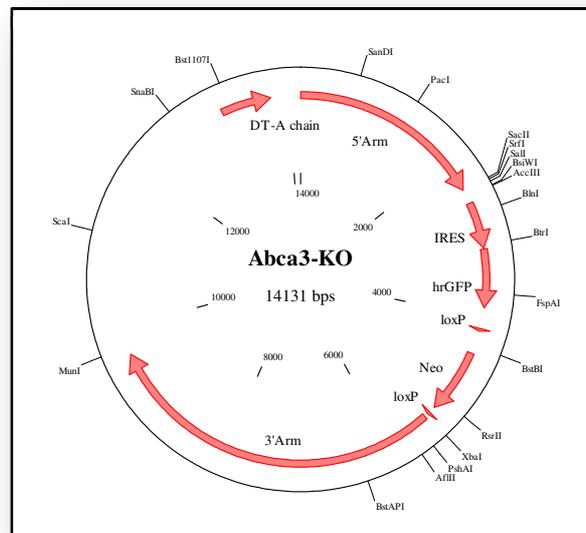


Abbildung 12: ***Abca3*-Targeting-Vektor mit detaillierter Anordnung der einzelnen Elemente**; Clone Manager 7.11 Professional Suite der Firma Sci Ed Central, USA.

Dieser Vektor wurde in *E. coli* DH5 α wie unter 4.3.5 beschrieben transformiert. Die anschließende Plasmidpräparation (siehe 4.1.4) ergab genug saubere DNA für die folgende Transfektion embryonaler Mausstammzellen und wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5 Transfektion embryonaler Mausstammzellen

Der zuvor erstellte und unter 2.2.4 beschriebene Vektor *Abca3*-KO wurde mit *MunI* linearisiert. Im Institut für Entwicklungsgenetik am Helmholtz-Zentrum München wurde wie unter 4.6.5 angegeben der linearisierte Vektor *Abca3*-KO mit ES-Zellen F1 IDG3.2 (siehe 4.6.2) elektroporiert. Die Selektion der embryonalen Mausstammzellen fand wie unter 4.6.6 angegeben statt. Anschließend wurden die übriggebliebenen anhaftenden und morphologisch unauffälligen Kolonien wie unter 4.6.7 erklärt gepickt und auf vier 96-*well* Platten verteilt. Hierfür wurden je zwei gleiche Schwesterplatten angelegt. Eine dieser Schwesterplatten wurde zur Konservierung wie unter 4.6.8 eingefroren, die andere zum *Screening* verwendet. Hierfür wurden die Zellen wie unter 4.6.9 lysiert und anschließend genotypisiert. Leider stellte sich bei der anschließenden Genotypisierung (siehe 4.6.10), mittels einer Hochdurchsatzmethode und anschließender Validierung dieser Klone mittels PCR heraus, dass kein Klon den *Abca3*-KO Vektor an der gewünschten Stelle im Genom trug. Daher wurde die Elektroporation der ES-Zellen mit dem *Abca3*-KO Vektor wiederholt. Hierfür wurden erneut vier 96-*well* Platten beimpft und wie oben beschrieben behandelt. Von diesen gepickten ES-Zellklonen konnte bei einem erneuten *Screening* eine korrekte homologe Rekombination nachgewiesen werden (siehe 2.2.6). Dieser Klon wurde mit der Nummer #736 versehen. Er wurde für die spätere Blastozysteninjektion kultiviert und wie unter 4.6.11 beschrieben eingefroren. Zur Sicherheit wurden erneut vier 96-*well* Platten beimpft und wie oben beschrieben behandelt. Hierbei konnten zwei neue korrekte homologe Rekombination nachgewiesen werden (siehe 2.2.6). Diese Klone wurden mit den Nummern #966 und #978 versehen und wie unter 4.6.11 beschrieben eingefroren. Insgesamt wurden knapp 1100 Klone gescreent.

2.2.6 Genotypisierung der embryonalen Mausstammzellen

Die aus 2.2.5 gepickten ES-Zellen wurden mittels einer Hochdurchsatzmethode im Institut für Entwicklungsgenetik am Helmholtz-Zentrum München auf richtige Integration des *Targeting*-Konstruktes getestet. Da sich diese Hochdurchsatzmethode gerade in der Patentierung befindet kann sie hier nicht offengelegt werden. Hierbei konnte über das normale *Screening* hinaus eine eventuelle Mehrfachintegration des *Targeting*-Konstruktes analysiert werden. Die mittels dieser Methode identifizierten positiven Kandidaten wurden dann per PCR validiert. Hierzu wurden die Zellen wie unter 4.6.9 beschrieben lysiert und die gewonnene DNA mittels PCR untersucht. Hierbei wurden die Primer (siehe 4.9: M10f / 29r) außerhalb der Rekombinationsarme gelegt (siehe Abb. 10). Aus

dieser PCR (siehe 4.6.10) ergibt sich für den Wildtyp-Genlocus eine Fragmentgröße von 9407 bp. Bei einer erfolgreichen Integration ergibt sich für den veränderten Genlocus ein 10644 bp großes PCR-Fragment (Abb. 13).

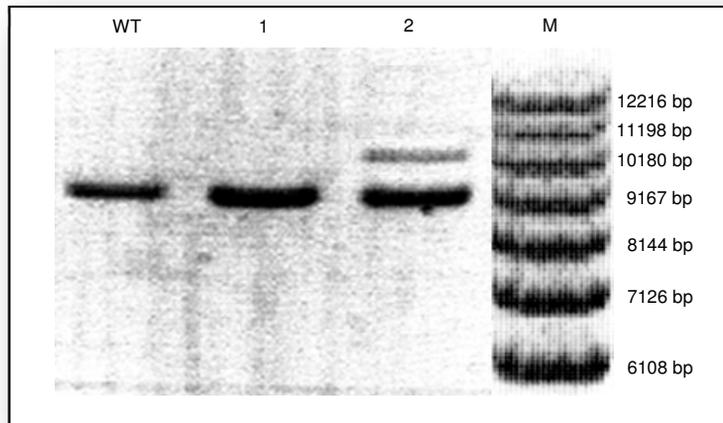


Abbildung 13: **DNA-Elektrophorese von PCR-Amplifikons der ES-Zellen;** 0,7-prozentiges Agarosegel; M: 1 kb Marker, WT: WT-DNA, 1: negativer Klon, 2: positiver Klon #736, bei diesem zeigt sich die 10644 bp große Bande, welche vom veränderten Genlocus stammt.

2.2.7 Blastozysteninjektion und Embryotransfer

Der positive Klon #736 wurde wie unter 4.6.12 beschrieben für die Blastozysteninjektion vorbereitet und in die Obhut der Abteilung für Vergleichende Medizin am Helmholtz-Zentrum München übergeben. Hier wurden die manipulierten ES-Zellen in Blastozysten von CD-1 Mäusen injiziert. Diese nun veränderten Blastozysten wurden in pseudoträchtige CD-1 Mäuse mittels Embryotransfer transferiert.

2.2.8 Genotypisierung der Mäusepopulation

Zur Genotypisierung der entstehenden Mauspopulation wurden Schwanzbiopsien der Tiere nach 3 Wochen entnommen und wie unter 4.6.13 aufbereitet. Mithilfe der erstellten Restriktionskarte war es möglich, eine spezifische Genotypisierungsstrategie zu entwickeln. Hierbei wurde sich zu Nutze gemacht, dass das Insert bei der homologen Rekombination den Wildtyp-Locus um 844 bp expandiert. Somit ergeben sich zwei mögliche Bandenverteilungsmuster: Bei vorliegendem Wildtyp-Genlocus entsteht ein 2727 bp großes PCR-Fragment. Bei Heterozygotie erhält man zwei PCR-Produkte. Das erste ist 2727 bp groß und entspricht dem Wildtyp-Genlocus. Das zweite ist 3571 bp groß und entspricht dem veränderten Genlocus (siehe Abb. 14).

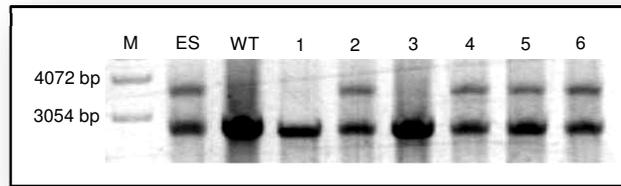


Abbildung 14: **DNA-Elektrophorese zur Genotypisierung der Mauspopulation**; 1-prozentiges Agarosegel; Die größere Bande markiert das veränderte Allel. M: 1kb Marker; ES: ES-Zellklon #736 als positiv Kontrolle; WT: Wildtyp als negativ Kontrolle; 1: Fötus 1 (*Abca3*^{+/+}); 2: Fötus 2 (*Abca3*^{+/+}); 3: Fötus 3 (*Abca3*^{+/+}); 4: Fötus 4 (*Abca3*^{+/+}); 5: Fötus 5 (*Abca3*^{+/+}); 6: Fötus 6 (*Abca3*^{+/+}).

2.2.9 Rückkreuzen der transgenen Mauslinie in C57BL/6 und deren Haltung

Als Standardtiere für physiologische Untersuchungen werden Mäuse des Stammes C57Bl/6 verwendet, die sich in ihrem genetischen Hintergrund von den SV129 Mäusen unterscheiden. Um eine *Abca3*-defiziente Mauslinie mit möglichst reinem C57Bl/6-Hintergrund zu erhalten, müssten die *Abca3*-defizienten Tiere über 5 bis 10 Generationen mit C57Bl/6-Mäusen rückgekreuzt werden.

Die untersuchten und nun gehaltenen transgenen Mäuse sind in der 11. Generation und somit sehr nahe am C57Bl/6-Hintergrund. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen in der ZVH gehalten (siehe 4.6.15) und hatten zur Zeit der Untersuchungen keinerlei Erkrankungen.

2.3 Ergebnisse der *Abca3*-defizienten Mauslinie

Mithilfe von Heterozygotenverpaarungen war es möglich, homozygote Nachkommen zu erzeugen. Diese Nachkommen wurden am Tag E18,5 per Kaiserschnitt zur Welt gebracht. An Lungengewebe wurden elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

2.3.1 Verpaarung heterozygoter Tiere untereinander

Um homozygote Tiere zu erzeugen, ist es notwendig, heterozygote Tiere untereinander zu verpaaren. Da die Mutation homozygot zur Letalität der Tiere nach der Geburt führt (siehe unten), müssen diese Heterozygotenverpaarungen immer wieder vorgenommen werden. Zur Analyse der Tiere wurde das trächtige Weibchen am Tag E18,5 einem Kaiserschnitt unterzogen um die Föten und somit die potenziellen homozygoten Nachkommen zu gewinnen. Der Kaiserschnitt war die Methode der Wahl, da die meisten

Nager, so auch Mäuse, nachtaktiv sind und nachts gebären. Mäuse neigen dazu totgeborene oder versterbende Nachkommen zu fressen. Somit würden die am respiratorischen Versagen versterbenden homozygoten *Abca3*-defizienten Tiere nicht mehr für die Analyse zur Verfügung stehen. Der Kaiserschnitt gewährleistet zudem die unmittelbare vergleichende Beobachtung der respiratorischen Anpassung nach der Geburt sowie den Erhalt frischen Gewebematerials für die nachfolgenden Analysen.

2.3.2 Homozygote versterben unmittelbar nach der Geburt am respiratorischen Versagen

Da zu erwarten war, dass die neugeborenen homozygoten Tiere an respiratorischem Versagen versterben würden, wurden die Föten am Tag E18,5 nach Plug wie unter 4.7.1 beschrieben mittels Kaiserschnitt zur Welt gebracht. Die so zur Welt gebrachten Tiere nahmen mit zunehmender Zeit eine klare rosa Färbung an und die Lunge war gut als helle, fast weiße durch den Thorax schimmernde Struktur zu erkennen (Abb. 15: Tiere Nummer 1 bis 7 und Tier Nummer 9). Die Atmung stabilisierte sich und die Tiere wurden agiler. Allerdings konnte bei einigen Tieren beobachtet werden, dass sie Schnappatmung zeigten. Deren Lungen waren nicht durch den Thorax zu erkennen und die Tiere wurden nach kurzer Zeit zyanotisch (Abb. 15: Tier Nummer 8). Diese Tiere waren unbeweglich und verstarben binnen einer Stunde an respiratorischem Versagen.



Abbildung 15: **Föten einer Heterozygotenverpaarung nach Kaiserschnitt:** 1 & 7: (*Abca3*^{+/+}); 2, 3, 4, 5, 6, & 9: (*Abca3*^{+/+}); 8: (*Abca3*^{-/-}); **Blauer Pfeil** zeigt helle, durch den Thorax schimmernde entfaltete und luftgefüllte Lunge; **Roter Kreis** markiert den Thorax. Bei dem *Abca3*^{-/-} Tier ist keine weiß erkennbare, entfaltete Lunge zu erkennen.

Alle Tiere wurden nach 60 min dekapitiert und eine Lungenentnahme wie unter 4.7.2 beschrieben durchgeführt. Ebenso wurde bei allen Tieren eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt, um sie eindeutig zu genotypisieren. Hierfür wurden die Schwanzspitzenbiopsien wie unter 4.6.9 angegeben lysiert und genotypisiert. Die zwei hierfür verwendeten PCR's wurden GFP und WT-KO genannt. Die verwendeten Primer sind unter 5.7 (GFP-f / GFP-r; WT-KO-1f / WT-KO-1f) angegeben. Bei der GFP-PCR entsteht bei Vorhandensein des veränderten Genlocus ein 169 bp großes Fragment. Fehlt dieses Insert, entsteht kein PCR-Produkt. Bei der WT-KO-PCR kann nur ein 217 bp

großes Produkt entstehen, wenn der Wildtyp-Genlocus präsent ist. Hiermit konnten die unter Abb. 15 zu sehenden Föten eindeutig genotypisiert werden.

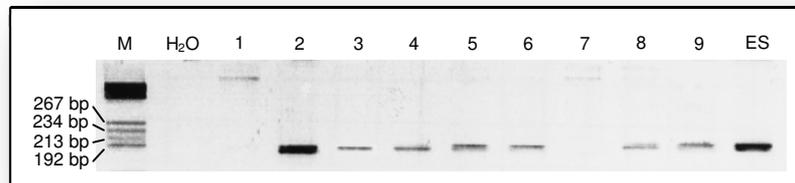


Abbildung 16: **DNA-Elektrophorese der Genotypisierungs-PCR von GFP (GFP-PCR)**; 3-prozentiges Agarosegel; M: Marker V; ES: ES-Zellklon #736 als positiv Kontrolle; WT: Wildtyp als Negativkontrolle; 1 & 7: (*Abca3^{+/+}*); 2, 3, 4, 5, 6, & 9: (*Abca3^{+/+}*); 8: (*Abca3^{-/-}*). Bei Heterozygoten und Homozygoten können GFP-spezifische Sequenzen nachgewiesen werden.

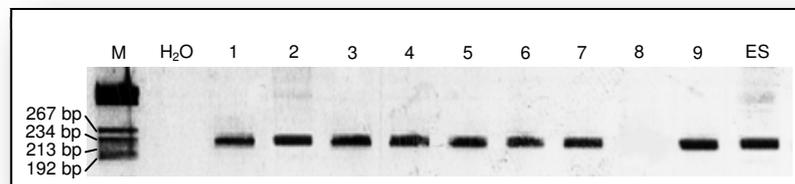


Abbildung 17: **DNA-Elektrophorese der Genotypisierungs-PCR des Wildtyp-Allels (WT-KO)**; 3-prozentiges Agarosegel; M: Marker V; ES: ES-Zellklon #736 als positiv Kontrolle; WT: Wildtyp als Negativkontrolle; 1 & 7: (*Abca3^{+/+}*); 2, 3, 4, 5, 6, & 9: (*Abca3^{+/+}*); 8: (*Abca3^{-/-}*). Bei Wildtyp und Heterozygoten können Wildtyp-spezifische Sequenzen nachgewiesen werden.

Um auch auf mRNA-Ebene zu zeigen, dass das *Abca3*-Gen erfolgreich zerstört wurde, wurde eine RT-PCR generiert. Hierbei wurde RNA aus Lunge wie unter 4.2.1 beschrieben gewonnen und mittels reverser Transkriptase in cDNA (siehe 4.2.2) umgeschrieben. Die anschließende PCR sollte zeigen, ob mRNA vorhanden war oder nicht. Die für dieses PCR-Screening (siehe 4.2.3) verwendeten Primer (siehe 5.7: GAPDH-f / GAPDH-r; ABCA3-E6/E7-f / ABCA3-E6/E7-r; ABCA3-E7/E8-f / ABCA3-E7/E8-r) wurden so ausgewählt, dass sie Exon übergreifend liegen, um nicht genomische DNA zu amplifizieren. Die PCR-Bedingungen wurden so gewählt, dass nur dann ein PCR-Produkt gebildet werden kann, wenn *Abca3* mRNA vorgelegen hat. Hierfür wurden zwei Regionen genauer untersucht: Exon 6-7 und Exon 7-8.

Als Kontrolle und zum Nachweis, dass PCR-amplifizierbare cDNA vorhanden ist, wurde das *Housekeeping-Gene* GAPDH (**G**lycerinaldehyd-3-**p**hosphat-**D**ehydrogenase) gewählt, was ein PCR-Produkt von 151 bp hervorbringt. Das PCR-Produkt von Exon 6-7 ist 128 bp groß. Das PCR-Produkt von Exon 7-8 ist 220 bp groß.

Für die Exon 6-7 PCR lässt sich bei Wildtyp und heterozygoten Tieren eine 128 bp große Bande detektieren, was bei homozygoten Tieren nicht mehr möglich ist (siehe Abb. 18 A). In Abb. 18 B lässt sich ebenfalls erkennen, dass bei Wildtyp und heterozygoten Tieren

eine 220 bp große Bande detektierbar ist. Da sie vom Wildtyp-Allel stammt, ist sie in homozygoten Tieren nicht mehr nachweisbar.

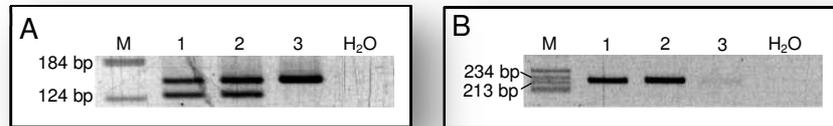


Abbildung 18: **mRNA Analysen von *Abca3***; 3-prozentiges Agarosegele; **A:** RT-PCR Exon 6-7 incl. GAPDH; **B:** RT-PCR Exon 7-8; M=Marker V; 1: *Abca3*^{+/+}; 2: *Abca3*^{-/-}; 3: *Abca3*^{-/-}; Aus Abb. A und B ist klar erkennbar, dass keine mRNA von *Abca3* im *Abca3*-defizienten Tier (Probe 3) gebildet wurde.

Da die Geschlechtsbestimmung bei sehr jungen Tieren oder Föten durch Inspektion der primären Geschlechtsorgane noch nicht möglich ist, wurde hierfür eine Geschlechtsbestimmungs-PCR verwendet. Hierbei wurde eine duplex-PCR generiert (siehe Abb. 19). Die unter 5.7 (mSry_f / mSry_r; mL3_f / mL3_r) beschriebenen Primer entsprechen den Primern, die von Lambert et al. verwendet wurden [Lambert, J. F. et al.; 2000]. Bei dieser duplex-PCR sind die Primer für Sry (***Sex determining region of Y***) Y-Chromosom-spezifisch. Somit kann nur ein PCR-Produkt gebildet werden, wenn ein Y-Chromosom vorliegt. Als Kontrolle wurden Primer für das IL3-Gen, das auf Chromosom 11 liegt, verwendet.

Mit dieser Geschlechtsbestimmung mittels PCR war es auch möglich, Aussagen über die geschlechtliche Verteilung der Föten zu machen. Hierbei zeigte sich eine gleiche Verteilung zwischen Weibchen und Männchen unabhängig vom *Abca3*-Genotyp.

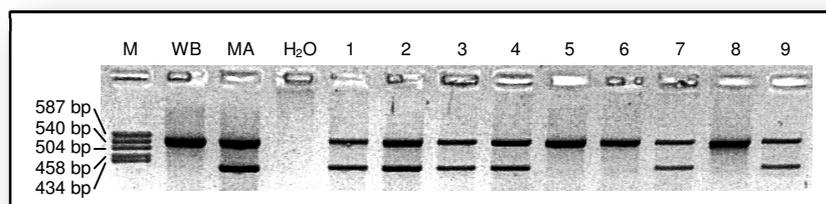


Abbildung 19: **Geschlechtsbestimmung mittels duplex PCR mit SRY und IL3**; 3-prozentiges Agarosegele; M=Marker V; WB= Kontrolle Weibchen; MA: Kontrolle Männchen; 1, 2, 3, 4, 7, 9: Männchen; 5, 6, 8: Weibchen.

Bis jetzt wurden die Nachkommen von 15 Heterozygotenverpaarungen genotypisiert. Die Verteilung der 91 Nachkommen zwischen Wildtyp, heterozygot und homozygot ist in Tabelle 3 angegeben. Um zu überprüfen, ob die Heterozygotie einen Einfluss auf das pränatale Überleben hat, wurde ausgehend von der Gesamtzahl der Föten die Mendelsche Verteilung berechnet und in Tabelle 3 angegeben. Für Nachkommen aus einer Heterozygotenverpaarung, ausgehend von einer autosomal-rezessiven Krankheit,

beträgt das Erkrankungsrisiko 1:4. Genotypisch ergibt sich dabei (nach dem 2. Mendelschen Gesetz: Segregationsregel für einen intermediären Erbgang) ein Aufspaltungsverhältnis von 1:2:1, dass sich phänotypisch als 3:1 manifestiert da heterozygote und Wildtyp-Tiere gesund sind.

	Genotypisierung	nach Mendel
Wildtyp	17	~23
Heterozygot	56	~46
Homozygot	18	~23
Gesamt	91	

Tabelle 3: **Genotypverteilung der Nachkommen aus Heterozygotenverpaarungen**; Beobachtete Verteilung sowie die sich rechnerisch nach Mendel ergebenden Verteilungen. Diese sind rechnerisch mit dem 2. Mendelschen Gesetz vereinbar.

2.3.3 Die Schreyer-Schwimmprobe

Mit einigen der entnommenen Lungen wurde zur Prüfung der Gasfüllung die Schreyer-Schwimmprobe durchgeführt. Die im 17. Jahrhundert von J. Schreyer beschriebene Methode (siehe 4.7.4) stellt ein Verfahren dar, um die Gasfüllung der Lunge zu untersuchen. Hierbei werden die entnommenen Lungen kurz in isotoner NaCl-Lösung von Blut gereinigt und in ein neues ebenso mit NaCl-Lösung-gefülltes Gefäß gegeben. Die entfaltete, mit Gas gefüllte Lunge schwimmt oben, wogegen die atelektatische Lunge, die nicht mit Luft gefüllt ist zu Boden sinkt (Abb. 20 A und B).

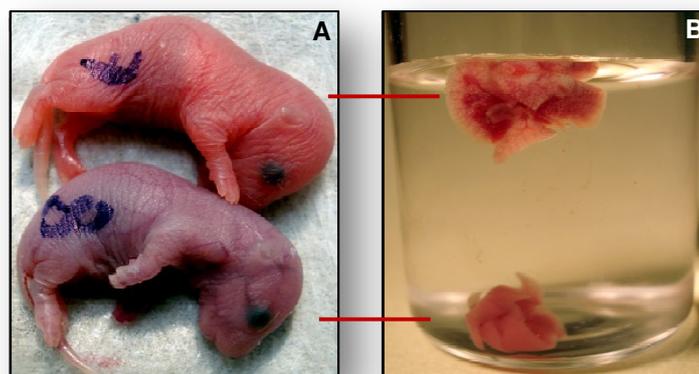


Abbildung 20: **Wurfgeschwister und Schreyer-Schwimmprobe ihrer Lungen**; **A**: 2 per Kaiserschnitt gewonnene Neugeborene, wobei Nummer 7 eine schöne rosige Färbung aufweist (*Abca3^{+/+}*). Nummer 8 zeigte Schnappatmung, wurde cyanotisch und verstarb (*Abca3^{-/-}*). **B**: Schwimmprobe der entnommenen Lungen der beiden unter A gezeigten Tiere. Die Lunge des Tiers 7 ist luftgefüllt und schwimmt, wohingegen die Lunge des Tiers 8 atelektatisch ist und zu Boden sinkt.

2.3.4 Immunhistochemische Analyse in der Lunge von Wildtyp versus Homozygot

Die immunhistochemischen Präparate der Lunge zum Vergleich von Wildtyp- und homozygoten Föten wurden im Pathologischen Institut des Klinikums der Universität München wie unter 4.9ff beschrieben erstellt.

In der Immunhistochemie der Lunge von Wurfgeschwistern konnte gezeigt werden, dass das ABCA3-Protein in Wildtyp- sowie in heterozygoten Tieren mit einem für ABCA3 spezifischen Antikörper (siehe 4.9.4) nachweisbar ist. Dagegen konnte kein ABCA3 Protein in homozygoten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 21; C und D). Um zu untersuchen, ob typische Marker einer Pneumozyten Typ II Differenzierung nachweisbar sind, wurde ein spezifischer Antikörper gegen TTF1 [Holzinger, A. et al.; 1996] verwendet. TTF1 ist ein maßgeblich für die Pneumozyten Typ II Differenzierung verantwortlicher Transkriptionsfaktor. Bei der durchgeführten Cofärbung von TTF1/ABCA3 konnte in Lungen homozygoter Tiere nur das TTF1-Signal detektiert werden, nicht aber das ABCA3-Signal (Abb. 21; E, F und G). Mittels einer Standard Hämatoxylin-Eosin Färbung (H & E), wie unter 4.9.3 beschrieben, konnte in der Lunge der Wildtyp-Tiere ein normaler Gasgehalt und die Entfaltung der Lunge eindeutig nachgewiesen werden, wohingegen bei den homozygoten Tieren die nicht entfaltete, atelektatische Lunge gut zu erkennen ist (Abb. 21 A und B).

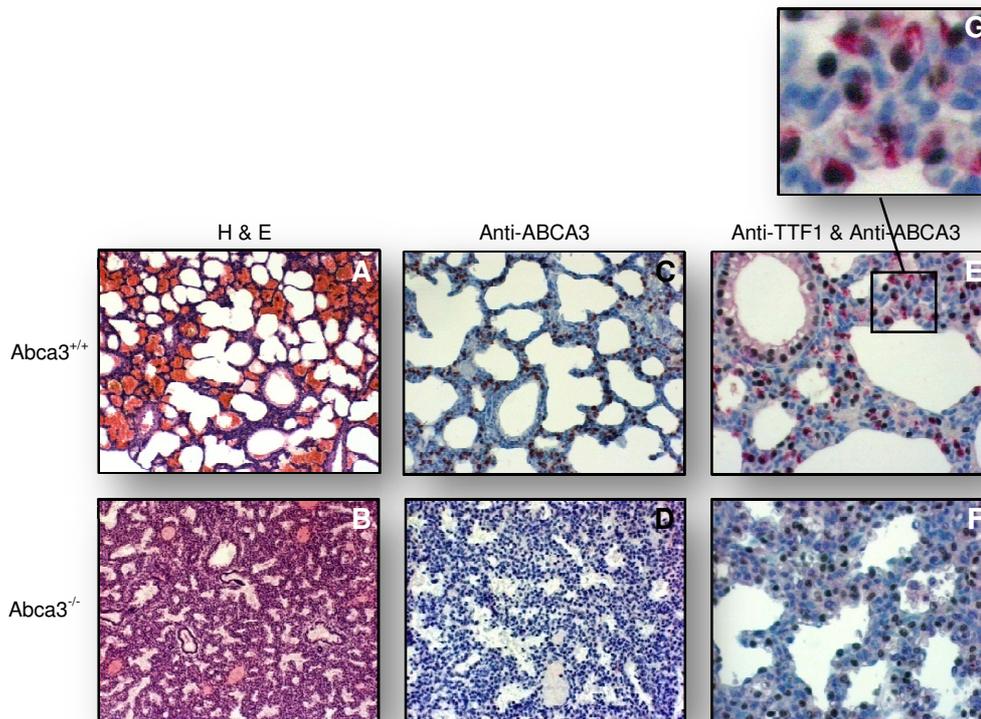


Abbildung 21: **Lichtmikroskopische Untersuchungen an Paraffinschnitten von neugeborenen Mauslungen**; **A und B**: Hämatoxylin-Eosin Färbung von Wildtyp-Tieren (*Abca3*^{+/+}) und homozygoten Tieren (*Abca3*^{-/-}); *Abca3*^{-/-} Tiere zeigen fehlende Lungenentfaltung; **C und D**: Immunhistochemische Färbung mit einem für ABCA3 spezifische Antikörper; *Abca3*^{-/-} Tieren zeigen kein ABCA3-Signal; **E, F und G**: Immunhistochemische Cofärbung mit TTF1- / ABCA3-spezifischen Antikörpern von (*Abca3*^{+/+}) und (*Abca3*^{-/-}); *Abca3*^{-/-} Tiere zeigen das TTF1-Signal aber kein ABCA3-Signal.

Zusätzlich zur Einzeluntersuchung der Lunge in der Immunhistologie wurden Komplettschnitte von Wildtyp- und homozygoten Neugeborenen angefertigt. Diese Schnitte wurden ebenfalls wie unter 4.9.4 angegeben mit einem ABCA3-spezifischen Antikörper behandelt und mit Hämalan gegengefärbt. Hierbei wurden sämtliche identifizierbare Organe und Gewebe lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 22).

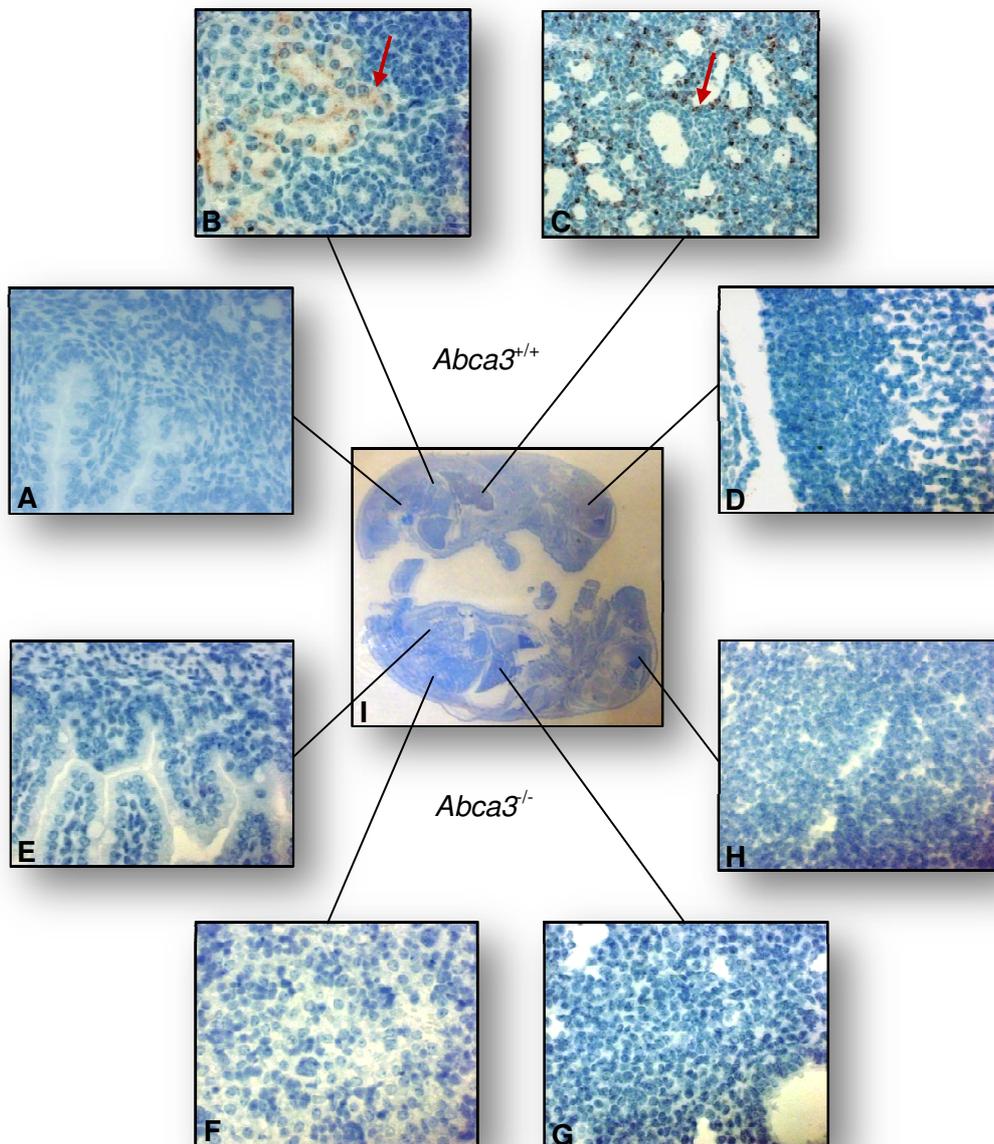


Abbildung 22: **Ganzkörper-Immunhistochemie für ABCA3 von 2 neugeborenen Wurfgeschwistern (Wildtyp versus homozygot)**; I: Auf Objektträger fixierte Längsschnitte; Spezifische Signale zeigen einen braun-rote Färbung; Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalaun; **Oben:** *Abca3*^{+/+}; **Unten:** *Abca3*^{-/-}; **A und E:** Darm; **B und F:** Niere; **C und G:** Lunge; **D und H:** Gehirn; **Rote Pfeile** zeigen spezifische Signale; Nur in Lunge und vereinzelt in Niere konnte ein ABCA3-Signal im Wildtyp nachgewiesen werden, dies war im *Abca3*-defizienten Tier nicht mehr detektierbar.

In der Lunge des Wildtyps fand sich das ABCA3-Signal. Die Niere scheint ebenfalls ABCA3 zu exprimieren, das Signal entsprach am ehesten dem Tubulusepithel. Die anderen Organe des Wildtyps zeigten kein Signal für ABCA3. Im Schnitt des homozygoten Tiers konnte sowohl in der Lunge als auch in den restlichen Organen kein ABCA3-Signal detektiert werden.

2.3.5 Elektronenmikroskopische Analysen der Mauslunge im Vergleich: Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Neugeborene

Die elektronenmikroskopische Analyse der Mauslunge im Vergleich von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Neugeborenen wurden im Pathologischen Institut des Klinikums der Universität München wie unter 4.8ff beschrieben vorgenommen. Sowohl bei den Wildtyp als auch bei den heterozygoten Tieren konnten Lamellarkörperchen eindeutig in den Pneumozyten Typ II nachgewiesen werden (Abb. 23: Rote Pfeile). Ebenso war extrazelluläres Surfactantmaterial im Alveolarraum eindeutig zu erkennen (Abb. 23: Blaue Pfeile). Bei den homozygoten Tieren hingegen waren keine Lamellarkörperchen in den Pneumozyten Typ II zu sehen. Im Alveolarraum findet sich kein Surfactantmaterial.

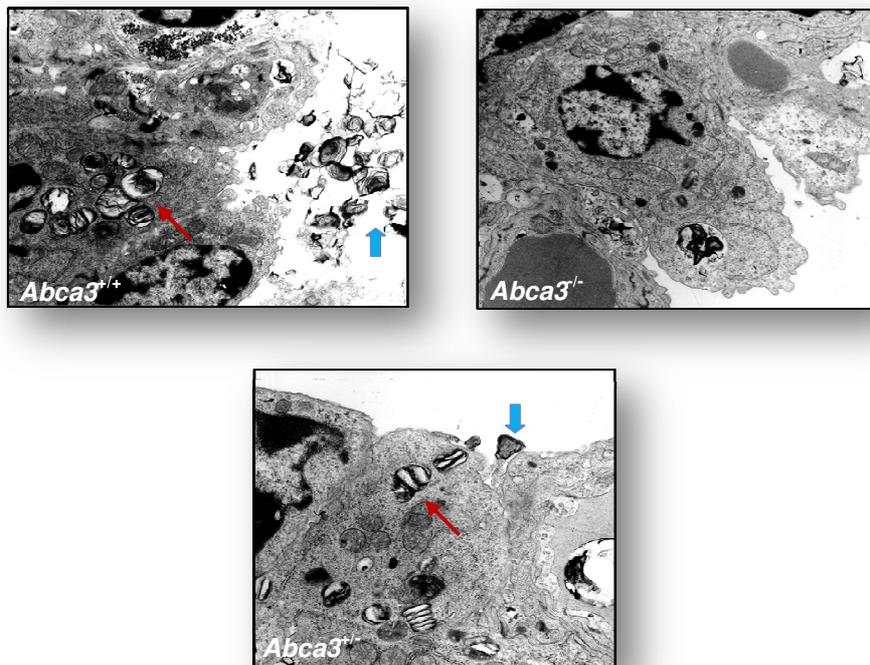


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mauslunge von *Abca3*^{+/+}, *Abca3*^{+/-} und *Abca3*^{-/-} Tieren; Rote Pfeile zeigen normale Lamellarkörperchen. Blaue Pfeile zeigen extrazelluläres Surfactantmaterial; In *Abca3*^{+/+} und *Abca3*^{+/-} Tieren waren sowohl normale Lamellarkörperchen, als auch extrazelluläres Surfactantmaterial zu finden, beides war nicht mehr im *Abca3*^{-/-} Tier detektierbar; Anstelle der normalen Lamellarkörperchen wurden beim *Abca3*^{-/-} Tier nur rudimentäre, lysosomenähnliche Strukturen gefunden.

2.3.6 Nachweis des ABCA3-Proteins mittels *Western Blot*

Im *Western Blot* sollte das ABCA3-Protein nur im Wildtyp und bei den heterozygoten Tieren nachweisbar sein. Im homozygoten Tier sollte ABCA3 nicht mehr nachzuweisen sein. Zu Beginn dieser Arbeit war noch kein kommerzieller Anti-ABCA3-Antikörper verfügbar. Der hier verwendete humane Anti-ABCA3-Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe um Gerd Schmitz generiert [Brasch, F. et al.; 2006]. Um zu überprüfen, ob eine Kreuzreaktion mit Maus besteht, wurden humane Lungenbiopsien als auch murine Lungenbiopsien im *Western Blot* (siehe 4.11.4) analysiert. Die Lungenbiopsien wurden wie unter 4.11.2 beschrieben homogenisiert und die Membranproteine angereichert (siehe Abb. 24).

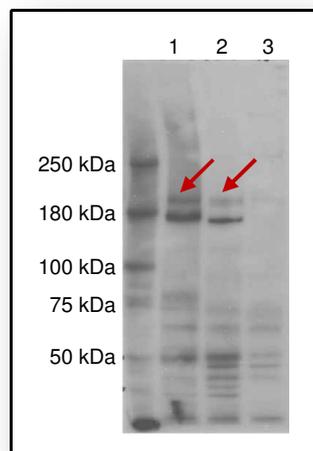


Abbildung 24: **Western Blot Analyse von humanem ABCA3 und murinem ABCA3**; 1: humane Probe 10 µg; 2: humane Probe 5 µg; 3: murine Probe 10 µg; **Rote Pfeile** markieren ABCA3 mit 190kDa; polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von ABCA3; Dieser Antikörper reagierte nicht mit murinen Proben.

Es konnte keine Kreuzreaktion mit Lungenproben der Maus gezeigt werden. Das Plasmid pcDNA2-hABCA3fl [Klugbauer, N. et al.; 1996] wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI verdaut und die humane cDNA in den pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Mit diesem entstandenen Plasmid pcDNA3-hABCA3fl wurden die Zelllinien MLE15, MLE12 und A549 transfiziert (siehe 4.4.7) und anschließend im *Western Blot* analysiert. Auch dort war es nicht möglich, ABCA3 zu detektieren. Aufgrund dieser unbefriedigenden Tatsache, keinen funktionellen Antikörper gegen ABCA3 zur Hand zu haben, sollte ein eigener generiert werden (siehe 2.4).

2.3.7 hrGFP Analyse verschiedener Organe von Wildtyp versus homozygoten Neugeborenen

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der verschiedenen Organe von Wildtyp versus homozygoten Neugeborenen wurde am Helmholtz-Zentrum München im Institut für Pathologie durchgeführt. Zum Nachweis der hrGFP-Expression wurden Kryoschnitte von verschiedenen Organen (Gehirn, Leber, Lunge und Milz) von Wildtyp und homozygoten Tieren erstellt. Diese wurden im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss) untersucht. Die Schnitte von Gehirn, Leber und Lunge zeigten in den Präparaten der homozygoten Tiere vereinzelt granuläre fluoreszierende Strukturen im Zytoplasma von vereinzelt Zellen (siehe Abb. 24 B). Die Emission dieser fluoreszierenden Strukturen war sowohl in der Grün- (BP500-550) als auch in der Rotfluoreszenz (BP565-615) zu sehen und erschien deswegen unspezifisch. Durch spektrale Analysen (Untersuchung des Signals über den gesamten Wellenlängenbereich der Emission) konnte eindeutig festgestellt werden, dass dieses Signal nicht von hrGFP stammt und somit einer Hintergrundfluoreszenz der Organe entspricht.

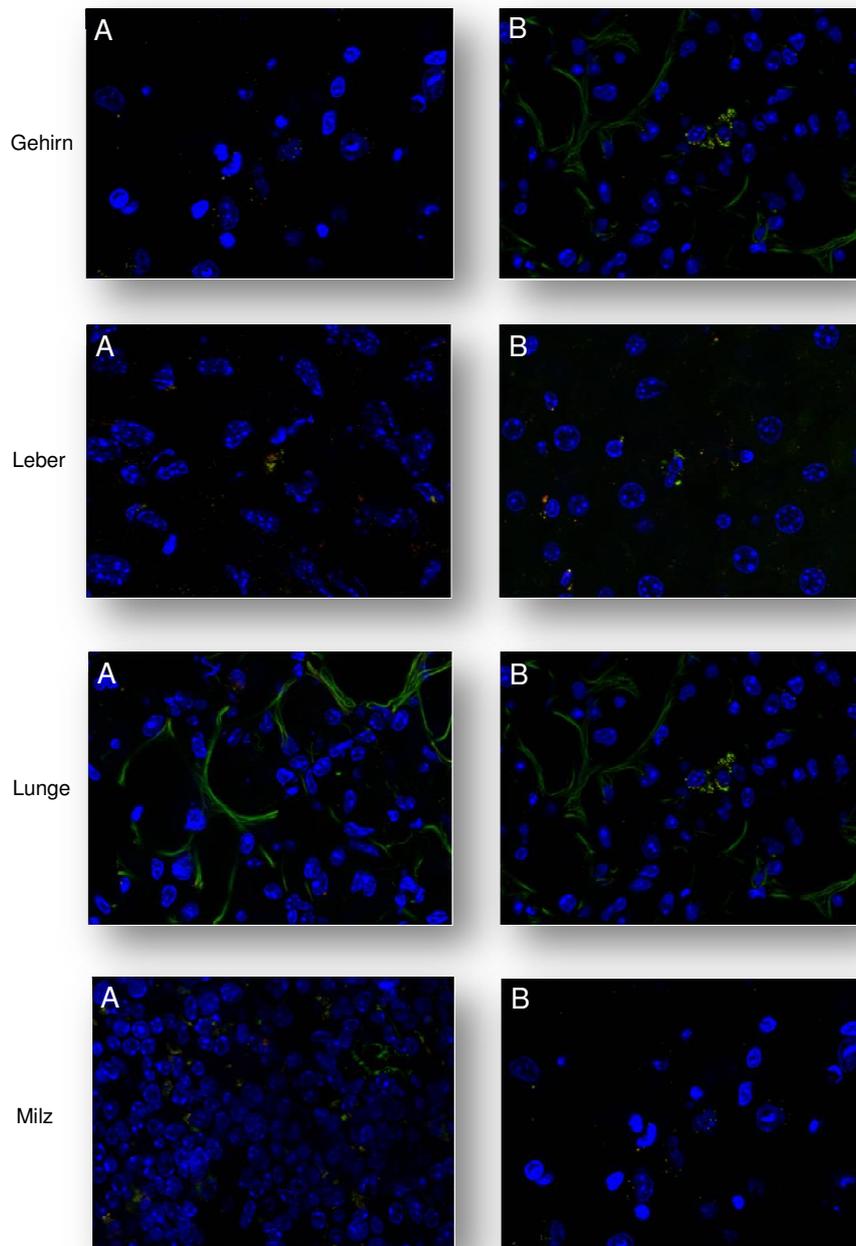


Abbildung 25: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Organen für die hrGFP Analyse; A: Wildtyp (*Abca3^{+/+}*); B: homozygot (*Abca3^{-/-}*);** Die vereinzelt beobachteten Fluoreszenzsignale stellten sich als unspezifisch heraus. Offenbar wird hrGFP vom transgenen Tier nicht exprimiert.

2.4 Antikörpergenerierung gegen ABCA3

Als technologische Alternative zu den synthetischen Peptiden wurden drei Expressionsplasmide hergestellt von denen in *E. coli* die gewünschten Fusionsproteine hergestellt werden sollten. Mittels Maltose-bindendem Protein wurden die Fusionsproteine gereinigt. Die relevanten Antigene sollten mittels Faktor Xa abgespalten und anschließend aufgereinigt werden. Diese Antigene sollten dann dazu benutzt werden Kaninchen zu beimpfen, sodass diese einen Antikörper gegen ABCA3 generieren.

2.4.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Es wurden drei Epitope in ABCA3 gesucht, welche zytoplasmatisch orientiert sind (siehe 4.10.1). Die unter 5.7 (Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionskonstrukte) beschriebenen Primer wurden so abgeleitet, dass der *Forward* Primer eine *EcoRI* Schnittstelle am 5'-Ende enthält und der *Reverse* Primer eine *XbaI* Schnittstelle gefolgt von einem Stop-Codon. Mittels dieser Primer wurden PCR-Produkte amplifiziert (als *Template* diente der unter 2.3.6 beschriebene Vektor pcDNA3-hABCA3fl) und wie unter 4.1.4 beschrieben gereinigt. Diese PCR-Produkte wurden dann mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* in den Vektor pMAL-c2X (New England Biolabs) kloniert. Die Fusionskonstrukte sollten nach der Expression in *E. coli* mittels Faktor Xa geschnitten werden. Dies ermöglicht die Abspaltung des Maltose bindenden Proteins von den Epitopen. Hierbei war darauf zu achten, dass die Epitope nicht die Erkennungssequenz auf Aminosäureebene für den Faktor Xa tragen (IEGR). Die Größe der Proteine wurde mittels DNAsis-Mac (Hitachi Software, Japan) errechnet. Die Größe des Maltose bindenden Proteins beträgt 42,7 kDa.

Die errechneten Größen für die drei Fusionsproteine sind wie folgt:

Bezeichnung Konstrukt	Bezeichnung Fusionsprotein	ABCA3 PCR-Produkt Größe (bp)	Fusionsprotein Größe (kDa)
pM-A40-240	FP1	600	66,16
pM-A740-920	FP2	540	62,65
pM-A1597-1704	FP3	321	55,19

Tabelle 4: Fusionskonstrukte von ABCA3-Epitopen mit pMAL zur Expression in *E. coli*.

Diese drei Konstrukte wurden in *E. coli* DH5 α transformiert und mittels einer Midi-Plasmidpräparation (siehe 4.1.4) vermehrt und gereinigt. Die Vektoren wurden in ausreichender Menge gewonnen und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.2 Expression der rekombinanten Epitope

Die drei erstellten Konstrukte wurden in *E.coli* M15[pRep4] transformiert und die Expression mittels IPTG, wie unter 4.10.2 beschrieben, induziert. Zur Ermittlung der besten Induktionszeit wurde eine Testexpression durchgeführt. Hierbei wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Als Referenz zur Kontrolle der Expression wurde zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG eine Leerprobe (0 h) entnommen (siehe 4.10.2). Diese Proben wurden später auf einem SDS-Page (siehe 4.11.4) aufgetragen und anschließend mittels *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt (siehe Abb. 26). Bei dieser Testexpression stellte sich heraus, dass nach drei Stunden ausreichend rekombinantes Protein exprimiert wurde.

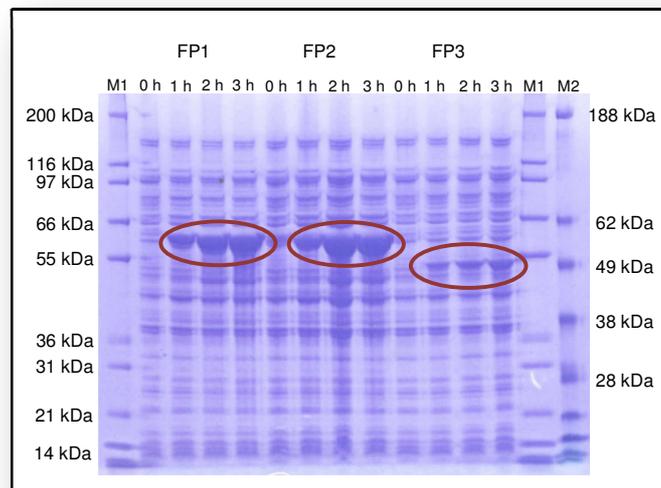


Abbildung 26: **Coomassie Färbung zum Nachweis der Expression der pMAL-ABCA3 Fusionsproteine**; M1: Mark12; M2: SeeBlue; FP1: Konstrukt Fusionsprotein 1; FP2: Konstrukt Fusionsprotein 2; FP3: Konstrukt Fusionsprotein 3; **Die rote Umrandung** markiert die überexprimierten Proteine. 0 h: Probe vor IPTG Zugabe; 1 h, 2, 3 h: Proben 1, 2, 3 Stunden nach der IPTG Zugabe; Alle Fusionsproteine ließen sich stark exprimieren.

2.4.3 Reinigung der Fusionsproteine mittels Maltose bindendem Protein (MBP)

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels der Affinitätschromatografie, wie unter 4.10.3 beschrieben. Hierbei wurden sowohl das Aufspritzen der Lysate, die Waschschritte, als auch die Elution der Fusionsproteine mittels einer FLPC (*fast protein liquid chromatography*) ÄKTaprime® (GE Healthcare) vorgenommen. Durch ein Chromatogramm (siehe Abb. 27) war es möglich, den Zeitpunkt der Elution zu bestimmen. Anhand dessen konnten die Fraktionen mit den gewünschten Eluaten identifiziert und diese weiter analysiert werden.

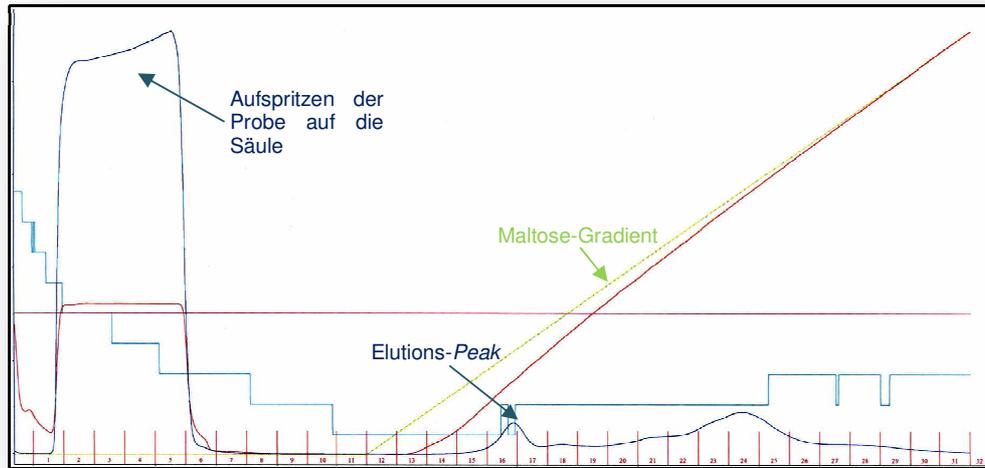


Abbildung 27: **Affinitätschromatogramm eines pMAL-ABCA3 Fusionsproteins**; ÄKTAprime® (GE Healthcare, GB); Nach dem aufspritzen der Probe auf die Säule und den folgenden Waschschritten ist nach Anlage des Maltose-Gradienten gut der *Elutions-Peak* zu erkennen. Die dort kollektierten Proben wurden durch *SDS-PAGE* analysiert.

Um die Bindung der Fusionsproteine auf der Säule zu kontrollieren, wurde der Durchlauf sowie das Eluat mittels *SDS-PAGE* wie unter 4.11.4 angegeben analysiert (siehe Abb. 28). Hierbei zeigten die Fusionsproteine die errechneten Größen (siehe Tabelle 4).

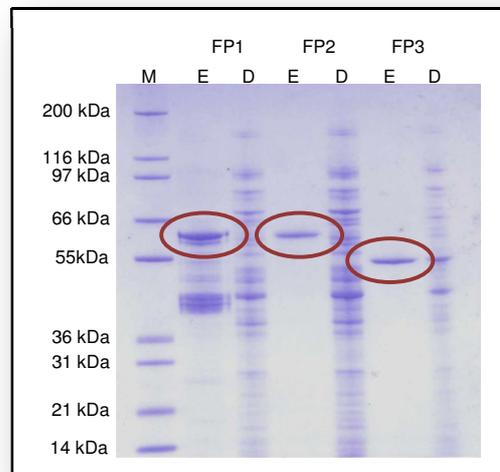


Abbildung 28: **Coomassie Färbung nach SDS-PAGE zum Nachweis der gereinigten Fusionsproteine**; M: Größenmarker; FP1: Fusionsprotein 1; FP2: Fusionsprotein 2; FP3: Fusionsprotein 3; D: Durchlauf; E: Eluat; Es war möglich alle drei Fusionsproteine aufzureinigen.

Bei der Elution der Fusionsproteine von der Säule wurde das Volumen der Proteinlösung vergrößert. Da der MBP-Tag mittels Faktor Xa von den Epitopen getrennt werden soll, wurden diese Lösungen mittels Konzentratoren, wie unter 4.11.3 beschrieben, ankonzentriert. Das Subprojekt zur Generierung eines selbst hergestellten Antikörpers gegen ABCA3 wurde an dieser Stelle eingestellt, da ein kommerzieller Antikörper gegen ABCA3 auf den Markt gebracht wurde.

2.5 Lipidomics Analysen

Bei der *Lipidomics* Analyse der Lunge wurden die Lipidkonzentrationen mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren untersucht. Diese Analysen wurden ebenfalls in der Milch von Wildtyp und heterozygoten Tieren durchgeführt. Hierbei wurden die Subspezies von Phosphatidyl-Cholin, Sphingomyelin, Phosphatidyl-Ethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidyl-Glycerin, Ceramide, Sphingosin, Cholesterinester und Cholesterin untersucht. Im Folgenden wird nur auf Phosphatidyl-Cholin, Phosphatidyl-Glycerin und Gesamtcholesterin eingegangen.

2.5.1 Lipidomics Analyse von Lungen Neugeborener

Für die *Lipidomics* Analysen wurden 6 Heterozygotenverpaarungen angesetzt. Die Föten wurden am Tag E18,5 per Kaiserschnitt, wie unter 4.7.1 angegeben, zur Welt gebracht. Nach Dekapitation der Tiere erfolgte die Entnahme der Lunge, wie unter 4.7.3 beschrieben. Diese Lungen wurden bei -20°C eingefroren und wie unter 4.12.1 beschrieben analysiert. Die Aufbereitung der erhaltenen Daten erfolgte wie unter 4.12.2 angegeben. Die Ergebnisse dieser Daten sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt. Des Weiteren wurde bei den Föten eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt, um sie wie unter 4.6.13 angegeben zu genotypisieren. Es zeigte sich folgende Verteilung: Wildtyp n=3; heterozygot n=14; homozygot n=5.

Mittelwerte:

	Phosphatidyl-Cholin	Cholesterin	Phosphatidyl-Glycerin
Wildtyp	12,5289	6,2316	0,2061
Heterozygot	9,8923	6,2177	0,1028
Homozygot	8,4675	6,2494	0,0778

Tabelle 5: **Mittelwerte der Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin, Cholesterin und Phosphatidyl-Glycerin bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren;** Angaben in nmol/mg Lungengewebe.

Standardabweichungen:

	Phosphatidyl-Cholin	Cholesterin	Phosphatidyl-Glycerin
Wildtyp	1,4658	0,4968	0,0961
Heterozygot	1,3950	1,6189	0,0474
Homozygot	1,5387	1,2649	0,0300

Tabelle 6: **Standardabweichungen der Phosphatidyl-Cholin-, Cholesterin- und Phosphatidyl-Glycerin-Konzentrationen bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren.**

p-Werte:

WT versus	Phosphatidyl-Cholin	Cholesterin	Phosphatidyl-Glycerin
Heterozygot	0,0695	0,9791	0,1986
Homozygot	0,0163	0,9786	0,1399

Tabelle 7: **p-Werte im Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin, Cholesterin und Phosphatidyl-Glycerin**; Es wurde jeweils Wildtyp mit heterozygoten und homozygoten Tieren verglichen; Heterozygote und homozygote Tiere zeigen eine Verringerung des Phosphatidyl-Cholingehaltes der Lunge; Bei Phosphatidyl-Glycerin zeigt sich ein Trend; orange: $p < 0,05$; gelb: $p < 0,07$.

Die grafische Darstellung (siehe Abb. 29) der Werte aus Tabelle 5 und Tabelle 6 zeigt sowohl bei Phosphatidyl-Cholin als auch bei Phosphatidyl-Glycerin einen eindeutigen Trend. Die Konzentrationen bei heterozygoten Tieren sind geringer als bei Wildtyp-Tieren und die von homozygoten Tieren geringer als bei Heterozygoten. Bei Phosphatidyl-Cholin zeigt sich darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Werte (siehe Tab. 7) von Wildtyp versus homozygot. Bei der Cholesterinkonzentration ließ sich dagegen kein Unterschied bei den verschiedenen Genotypen feststellen.

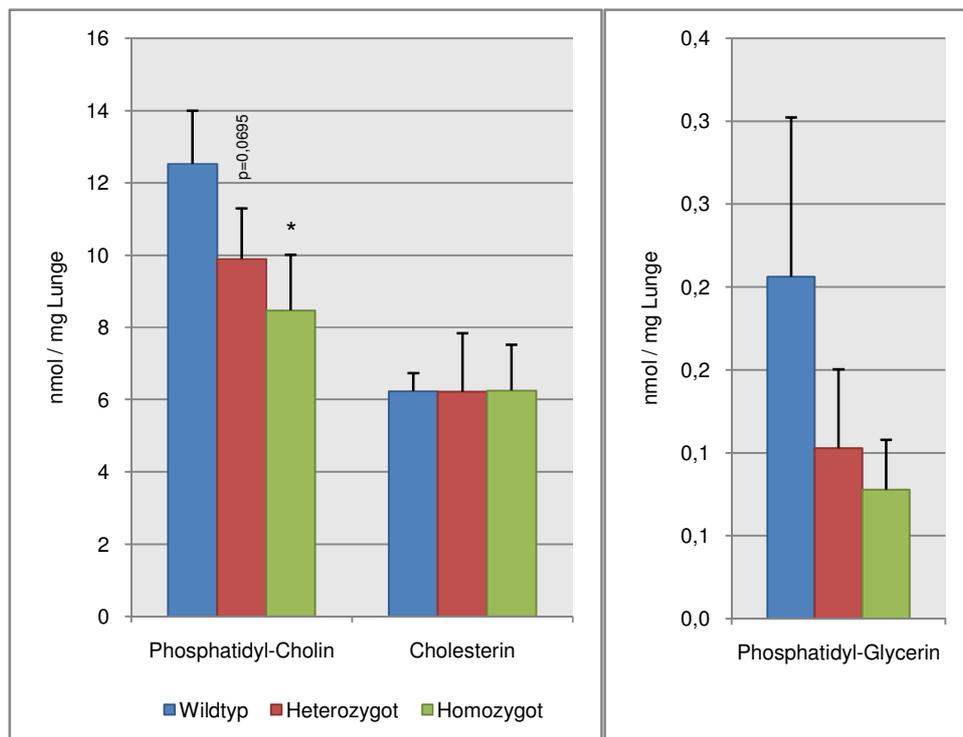


Abbildung 29: **Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin, Cholesterin und Phosphatidyl-Glycerin der Lungen von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten neugeborenen Mäusen**; Die Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Glycerin werden geringer, wohingegen die Konzentration von Cholesterin gleich bleiben; * : $p < 0,05$.

Wenn man nun die Zusammensetzung des Surfactant (siehe Abb. 30) betrachtet, erkennt man, dass Phosphatidyl-Glycerin nur einen Anteil von ca. 5 % des Gesamtsurfactant

ausmacht. Zum größten Anteil von fast 75 % besteht Surfactant aus Phosphatidyl-Cholin. Die restlichen 20 % werden durch andere Lipide und die Surfactant-assoziierten Proteine SP-A, -B, -C und -D gebildet.

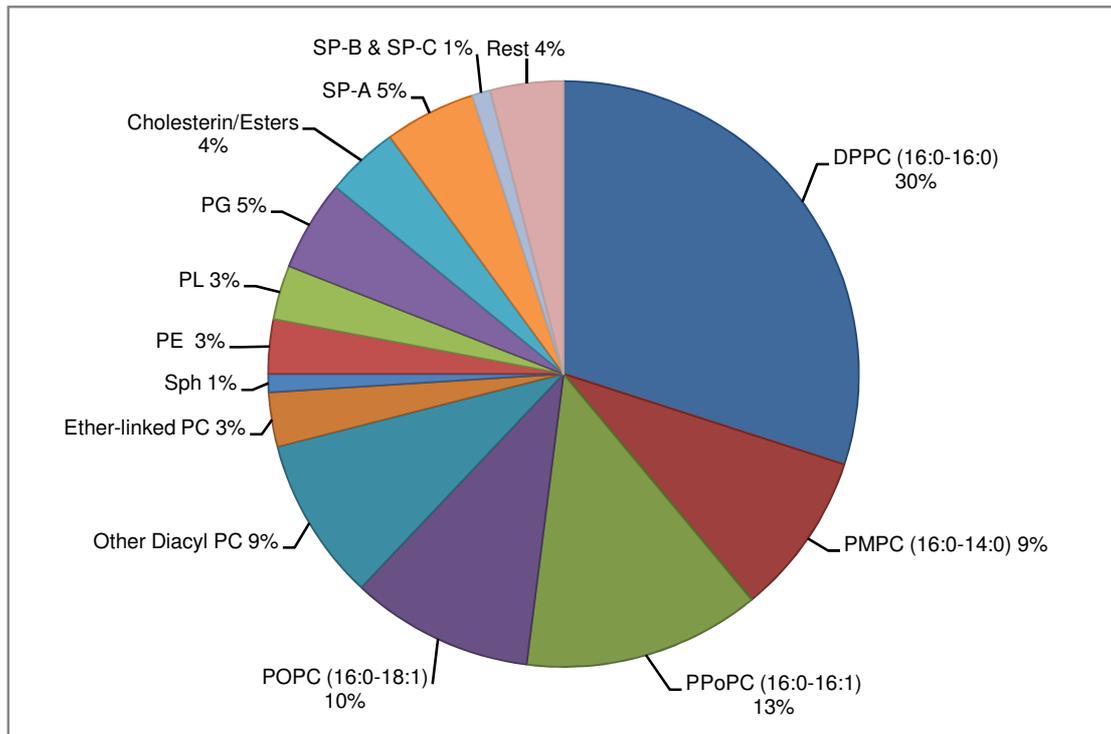


Abbildung 30: **Zusammensetzung von Lungen-Surfactant**; DPPC: Dipalmitoyl-Phosphatidyl-Cholin; PMPC: Palmitoyl-Myristyl-Phosphatidyl-Cholin; PPOPC: Palmitoyl-Palmitoleyl-Phosphatidyl-Cholin; POPC: Palmitoyl-Oleyl-Phosphatidyl-Cholin; Other Diacyl PC: andere Phosphatidyl-Cholin; Modifiziert nach <http://www.ohus.edu>.

2.5.2 Analyse der Subspezies von Phosphatidyl-Cholin der Lungen Neugeborener

Die genauere Untersuchung der Subspezies von Phosphatidyl-Cholin zeigt ebenfalls einen eindeutigen Trend. Hierbei sind die Konzentrationen der einzelnen Subspezies bei heterozygoten Tieren geringer, als bei Wildtyp-Tieren. Des Weiteren sind bei homozygoten Tieren die Konzentrationen der Subspezies ebenfalls geringer, als bei den heterozygoten Tieren. Bei einigen Subspezies von Phosphatidyl-Cholin zeigt sich darüber hinaus eine signifikante Reduktion der Konzentrationen (siehe Tab. 10). Diese Daten sind in Abbildung 31 anschaulich grafisch dargestellt. Bei den Subspezies von Phosphatidyl-Cholin lässt sich also ein ähnliches Bild wie bei den Konzentrationen des gesamten Phosphatidyl-Cholin erkennen.

Mittelwerte:

	PC 30:1	PC 30:0	PC 32:3	PC 32:2	PC 32:1	PC 32:0	PC 34:4	PC 34:3	PC 34:2	PC 34:1	PC 34:0	PC 36:5	PC 36:4	PC 36:3	PC 36:2	PC 36:1	PC 36:0
Wildtyp	0,1382	0,8412	0,0128	0,1810	2,2625	2,7873	0,0128	0,0516	0,5970	2,7366	0,1448	0,0337	0,3877	0,1437	0,3865	0,3947	0,0323
Heterozygot	0,0585	0,5405	0,0049	0,0676	1,1997	2,0888	0,0099	0,0380	0,5137	2,5969	0,1852	0,0252	0,3597	0,1270	0,3639	0,4176	0,0308
Homozygot	0,0424	0,4211	0,0024	0,0442	0,9204	1,7661	0,0072	0,0304	0,4304	2,3582	0,1678	0,0192	0,3224	0,1114	0,3098	0,3663	0,0268

Tabelle 8: Mittelwerte für die Konzentrationen der einzelnen Phosphatidyl-Cholin Subspezies bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren; (Angaben in nmol/mg Lungengewebe).

Standardabweichungen:

	PC 30:1	PC 30:0	PC 32:3	PC 32:2	PC 32:1	PC 32:0	PC 34:4	PC 34:3	PC 34:2	PC 34:1	PC 34:0	PC 36:5	PC 36:4	PC 36:3	PC 36:2	PC 36:1	PC 36:0
Wildtyp	0,0634	0,1990	0,0071	0,0975	0,7473	0,3309	0,0035	0,0122	0,0236	0,0884	0,0125	0,0079	0,0397	0,0088	0,0213	0,0378	0,0126
Heterozygot	0,0174	0,1509	0,0033	0,0158	0,2583	0,4389	0,0029	0,0084	0,0705	0,5182	0,0509	0,0065	0,0739	0,0216	0,0442	0,0887	0,0081
Homozygot	0,0181	0,0856	0,0011	0,0101	0,2072	0,4082	0,0014	0,0046	0,0322	0,4983	0,0476	0,0034	0,0352	0,0087	0,0291	0,0746	0,0087

Tabelle 9: Standardabweichungen der Konzentrationen der einzelnen Phosphatidyl-Cholin Subspezies neugeborener Lungen.

p-Werte:

WT versus	PC 30:1	PC 30:0	PC 32:3	PC 32:2	PC 32:1	PC 32:0	PC 34:4	PC 34:3	PC 34:2	PC 34:1	PC 34:0	PC 36:5	PC 36:4	PC 36:3	PC 36:2	PC 36:1	PC 36:0
Heterozygot	0,1595	0,1063	0,1888	0,1809	0,1294	0,0395	0,2918	0,1843	0,0044	0,3588	0,0201	0,1921	0,3934	0,0596	0,2285	0,4979	0,8619
Homozygot	0,1141	0,0549	0,1250	0,1348	0,0835	0,0111	0,1016	0,0847	0,0002	0,1666	0,3550	0,0720	0,0802	0,0059	0,0062	0,5042	0,5482

Tabelle 10: p-Werte im Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen von einzelnen Phosphatidyl-Cholin Subspezies aus Lungen Neugeborener; Es wurde Wildtyp jeweils mit heterozygoten und homozygoten Tieren verglichen; Bestimmte Subspezies zeigen bei heterozygoten und homozygoten eine Erniedrigung der Phosphatidyl-Cholin-Konzentrationen; orange: $p < 0,05$; gelb: $p < 0,09$.

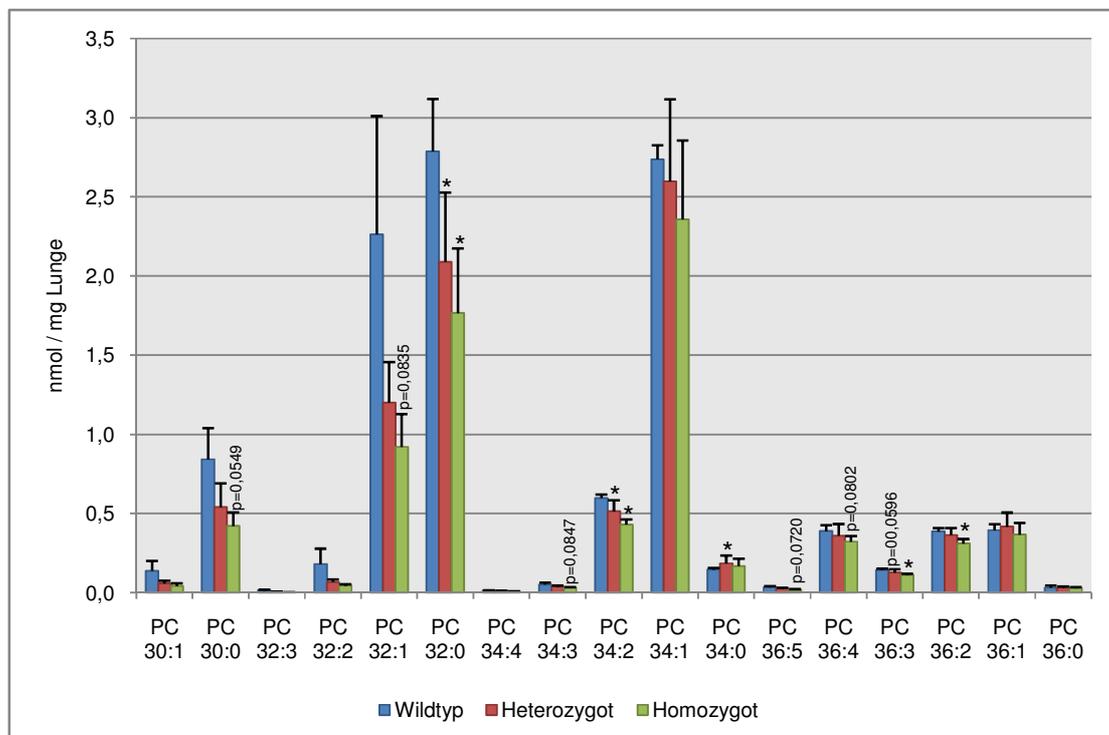


Abbildung 31: Konzentrationen der einzelnen Phosphatidyl-Cholin Subspezies von Lungen Neugeborener bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren; Bestimmte Subspezies zeigen bei heterozygoten und homozygoten eine Erniedrigung der Phosphatidyl-Cholin-Konzentrationen; * : $p < 0,05$.

2.5.3 Analyse der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin der Lungen Neugeborener

Bei den genaueren Untersuchungen der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin zeigt sich der selbe Trend wie bei der Analyse von Phosphatidyl-Cholin. Die Konzentrationen der einzelnen Subspezies sind bei heterozygoten Tieren geringer als bei Wildtyp-Tieren. Gleichfalls sind bei homozygoten Tieren die Konzentrationen der Subspezies geringer als bei heterozygoten Tieren. Bei wenigen Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin zeigt sich eine signifikante Reduktion der Konzentrationen (siehe Tab. 13). Diese Daten sind in Abbildung 32 grafisch dargestellt.

Mittelwerte:

	PG 30:1	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:3	PG 34:2	PG 34:1	PG 34:0	PG 36:4	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1	PG 38:6	PG 38:5	PG 38:4
Wildtyp	0,0008	0,0035	0,0029	0,0261	0,0203	0,0017	0,0193	0,0702	0,0008	0,0114	0,0061	0,0174	0,0052	0,0070	0,0060	0,0072
Heterozygot	0,0016	0,0041	0,0016	0,0074	0,0062	0,0010	0,0082	0,0370	0,0004	0,0061	0,0040	0,0084	0,0044	0,0031	0,0039	0,0054
Homozygot	0,0014	0,0036	0,0014	0,0049	0,0028	0,0009	0,0059	0,0284	0,0002	0,0053	0,0030	0,0062	0,0036	0,0019	0,0033	0,0052

Tabelle 11: Mittelwerte für die Konzentrationen der einzelnen Phosphatidyl-Glycerin Subspezies bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren; (Angaben in nmol/mg Lungewebe).

Standardabweichungen:

	PG 30:1	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:3	PG 34:2	PG 34:1	PG 34:0	PG 36:4	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1	PG 38:6	PG 38:5	PG 38:4
Wildtyp	0,0004	0,0025	0,0016	0,0188	0,0140	0,0008	0,0099	0,0276	0,0002	0,0047	0,0019	0,0062	0,0007	0,0037	0,0020	0,0016
Heterozygot	0,0004	0,0025	0,0016	0,0188	0,0140	0,0008	0,0099	0,0276	0,0002	0,0047	0,0019	0,0062	0,0007	0,0037	0,0020	0,0016
Homozygot	0,0028	0,0067	0,0015	0,0030	0,0038	0,0003	0,0024	0,0094	0,0004	0,0028	0,0008	0,0026	0,0011	0,0010	0,0014	0,0028

Tabelle 12: Standardabweichungen der Mittelwerte der Konzentrationen der einzelnen Phosphatidyl-Glycerin Subspezies bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren.

p-Werte:

WT versus	PG 30:1	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:3	PG 34:2	PG 34:1	PG 34:0	PG 36:4	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1	PG 38:6	PG 38:5	PG 38:4
Heterozygot	0,4230	0,8166	0,2987	0,2263	0,2199	0,2589	0,1874	0,1648	0,0648	0,1818	0,1738	0,1158	0,3189	0,2066	0,1914	0,1707
Homozygot	0,6860	0,9956	0,2805	0,1879	0,1570	0,2155	0,1392	0,1107	0,0349	0,1377	0,0861	0,0764	0,0483	0,1365	0,1159	0,2435

Tabelle 13: p-Werte im Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen einzelner Phosphatidyl-Glycerin Subspezies bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren; Es wurde Wildtyp jeweils mit heterozygoten und homozygoten Tieren verglichen; Bestimmte Subspezies zeigen bei heterozygoten und homozygoten eine Erniedrigung der Phosphatidyl-Cholin-Konzentrationen; orange: p<0,05; gelb: p<0,09.

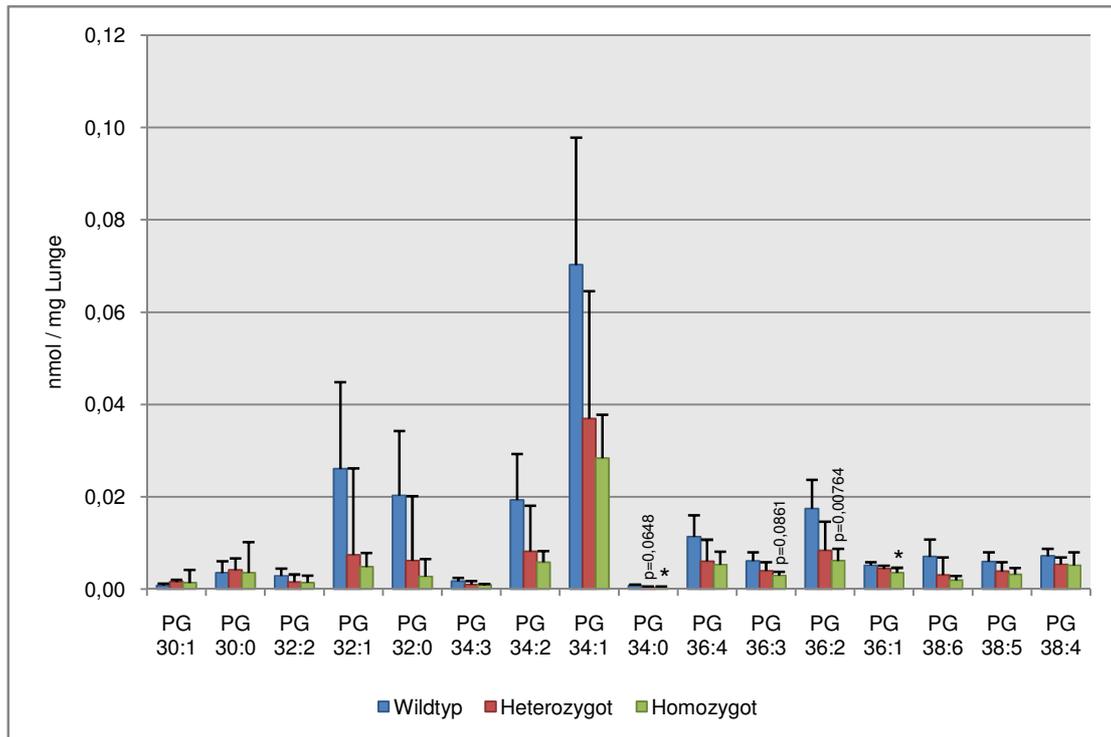


Abbildung 32: **Konzentrationen der einzelnen Phosphatidyl-Glycerin Subspezies von Lungen Neugeborener bei Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren;** Bestimmte Subspezies zeigen bei heterozygoten und homozygoten eine Erniedrigung der Phosphatidyl-Glycerin-Konzentrationen; * : $p < 0,05$.

2.5.4 Lipidomics Analyse von Milch

Für die *Lipidomics* Analysen in der Milch wurden je 6 trächtige Wildtyp-Tiere und heterozygote Tiere verwendet, die zuvor, wie unter 4.6.13 beschrieben, genotypisiert worden waren. Die Milchabnahme erfolgte wie im Abschnitt 4.7.5 erklärt. Hierbei wurde den Tieren am Tag 10 und 15 nach dem Wurf Milch entnommen. Diese Milchproben wurden bei -20°C eingefroren und wie unter 4.12.1 beschrieben analysiert. Die erhaltenen Daten wurden wie unter 4.12.2 angegeben aufbereitet.

Mittelwerte:

	Phosphatidyl-Glycerin	Phosphatidyl-Cholin	Cholesterin
Wildtyp T10	3914	596	1111
Heterozygot T10	2790	360	951
Wildtyp T15	4916	480	1128
Heterozygot T15	3712	440	884

Tabelle 14: **Mittelwerte der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin, Phosphatidyl-Cholin und Cholesterin in der Milch bei Wildtyp und heterozygoten Tieren;** T10: Tag 10; T15: Tag 15 nach dem Wurf; (Angaben in nmol/ μl Milch).

Standardabweichungen:

	Phosphatidyl-Glycerin	Phosphatidyl-Cholin	Cholesterin
Wildtyp T10	578	122	236
Heterozygot T10	1189	187	647
Wildtyp T15	939	110	314
Heterozygot T15	915	174	329

Tabelle 15: **Standardabweichungen der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin, Phosphatidyl-Cholin und Cholesterin bei Wildtyp und heterozygoten Tieren in der Milch zu zwei Zeitpunkten der Milchentnahme; T10:Tag 10; T15: Tag 15 nach dem Wurf.**

p-Werte

WT versus Heterozygot	Phosphatidyl-Glycerin	Phosphatidyl-Cholin	Cholesterin
T10	0,0745	0,0302	0,3800
T15	0,0481	0,6480	0,3266

Tabelle 16: **p-Werte im Vergleich der Mittelwerte der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin, Phosphatidyl-Cholin und Cholesterin;** Zu beiden Zeitpunkten wurde Wildtyp mit Heterozygoten verglichen; T10:Tag 10 und T15: Tag 15 nach dem Wurf; orange: $p < 0,05$; gelb: $p < 0,09$.

In der grafischen Darstellung (siehe Abb. 33) der Werte aus Tabelle 14 und Tabelle 15 zeigt sich sowohl bei Phosphatidyl-Glycerin als auch bei Phosphatidyl-Cholin ein eindeutiger Trend. Die Konzentrationen zu beiden Zeitpunkten der Milchentnahme sind bei heterozygoten Tieren geringer als bei Wildtyp-Tieren. Eine signifikante Abnahme der Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin ist am Tag 10 zu beobachten. Darüber hinaus lässt sich eine signifikante Abnahme der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin am Tag 15 erkennen (siehe Tab. 16). Ebenso ist deutlich zu erkennen, dass in der Milch Phosphatidyl-Glycerin das mengenmäßig führende Phospholipid ist. Zudem zeigt sich unabhängig von Genotyp eine Zunahme der Konzentration von 10. bis zum 15. Tag der Laktation. Erneut ließen sich bei der Cholesterinkonzentration kaum Unterschiede im Vergleich von Wildtyp zu heterozygoten Tieren erkennen.

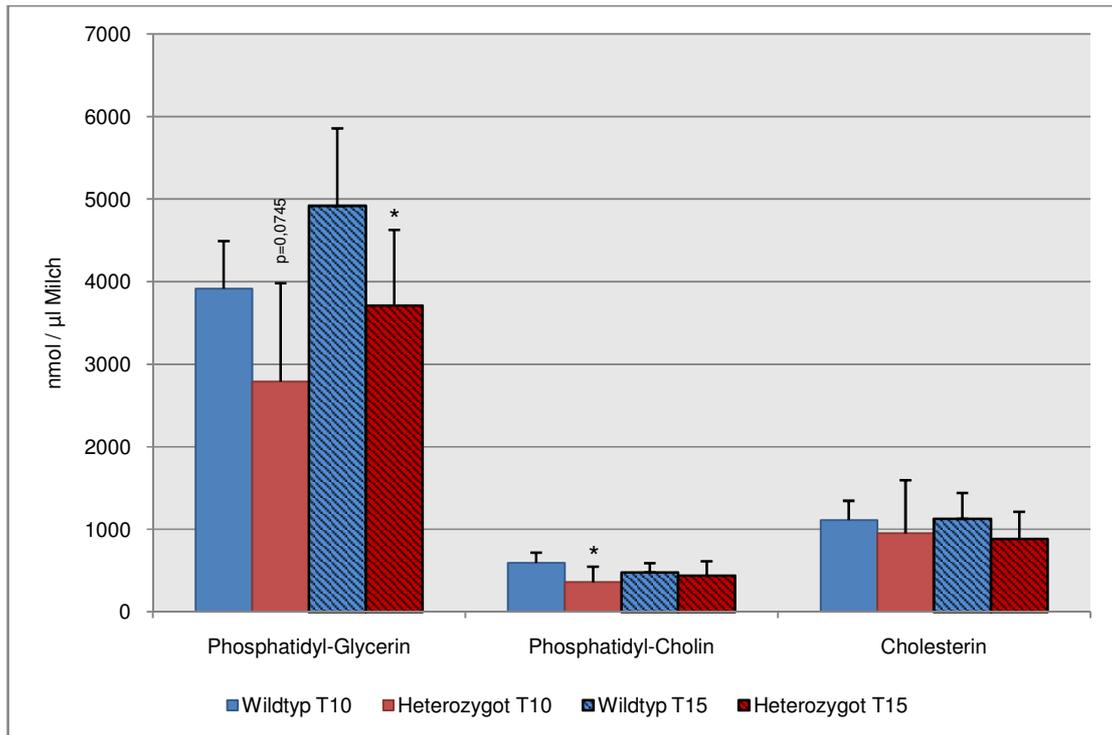


Abbildung 33: **Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin, Phosphatidyl-Cholin und Cholesterin in der Milch**; Vergleich zwischen Wildtyp und heterozygoten Tieren zu zwei Zeitpunkten der Milchentnahme; T10: Tag 10; T15: Tag 15 nach dem Wurf; Heterozygote zeigen eine Erniedrigung von Phosphatidyl-Glycerin und Phosphatidyl-Cholin; *: $p < 0,05$.

2.5.5 Analyse der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin in Milch

Bei den genaueren Untersuchungen der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin in Milch zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Milchentnahme, zeigt sich ein eindeutiger Trend. Die Konzentrationen der einzelnen Subspezies sind bei heterozygoten Tieren geringer als bei Wildtyp-Tieren. Sie ist am Tag 10 der Milchentnahme geringer als am Tag 15. Bei den kurzkettigen Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin zeigt sich eine signifikante Reduktion (siehe Tab. 16). Diese Daten sind in Abbildung 34 grafisch dargestellt.

Mittelwerte:

	PG 30:1	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:3	PG 34:2	PG 34:1	PG 34:0	PG 36:4	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1
Wildtyp T10	430,6	722,4	281,8	456,1	481,1	72,2	466,1	636,6	63,6	51,3	118,9	94,4	18,3
Heterozygot T10	245,2	429,3	176,4	323,5	392,6	64,8	381,3	500,1	43,3	41,8	94,0	72,5	11,9
Wildtyp T15	542,9	1010,5	372,7	572,2	661,4	80,8	557,5	733,6	82,6	52,0	118,0	92,6	22,0
Heterozygot T15	377,0	624,4	240,2	428,1	479,6	66,4	449,1	675,6	64,2	47,2	117,3	102,3	22,5

Tabelle 17: **Mittelwerte der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin-Subspezies bei Wildtyp und heterozygoten Tieren in der Milch zu zwei Zeitpunkten der Milchentnahme**; T10: Tag 10 und T15: Tag 15 nach dem Wurf; (Angaben in nmol/µl Milch).

Standardabweichungen:

	PG 30:1	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:3	PG 34:2	PG 34:1	PG 34:0	PG 36:4	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1
Wildtyp T10	68,94	249,25	74,13	58,09	130,05	14,34	81,80	38,96	16,72	17,36	29,06	15,21	2,30
Heterozygot T10	116,55	231,20	91,27	138,17	188,64	29,29	159,67	165,83	16,91	18,31	35,87	24,52	3,64
Wildtyp T15	124,23	197,28	91,80	108,46	110,60	20,77	114,67	123,85	14,43	16,05	30,07	19,69	3,09
Heterozygot T15	103,17	193,94	83,65	95,54	125,41	17,34	125,55	143,71	18,78	15,67	33,61	27,19	7,87

Tabelle 18: Standardabweichungen der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin-Subspezies bei Wildtyp und heterozygoten Tieren in der Milch zu zwei Zeitpunkten der Milchentnahme; T10:Tag 10 und T15: Tag 15 nach dem Wurf.

p-Werte:

WT versus Heterozygot	PG 30:1	PG 30:0	PG 32:2	PG 32:1	PG 32:0	PG 34:3	PG 34:2	PG 34:1	PG 34:0	PG 36:4	PG 36:3	PG 36:2	PG 36:1
T10	0,0098	0,0609	0,0539	0,0685	0,3693	0,5967	0,2829	0,1012	0,0633	0,3776	0,2166	0,0996	0,0061
T15	0,0313	0,0066	0,0260	0,0351	0,0241	0,2209	0,1498	0,4711	0,0888	0,6157	0,9673	0,4970	0,8773

Tabelle 16: p-Werte im Vergleich der Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin-Subspezies bei Wildtyp und heterozygoten Tieren in der Milch zu zwei Zeitpunkten der Milchentnahme; T10:Tag 10 und T15: Tag 15 nach dem Wurf; orange: p<0,05; gelb: p<0,09.

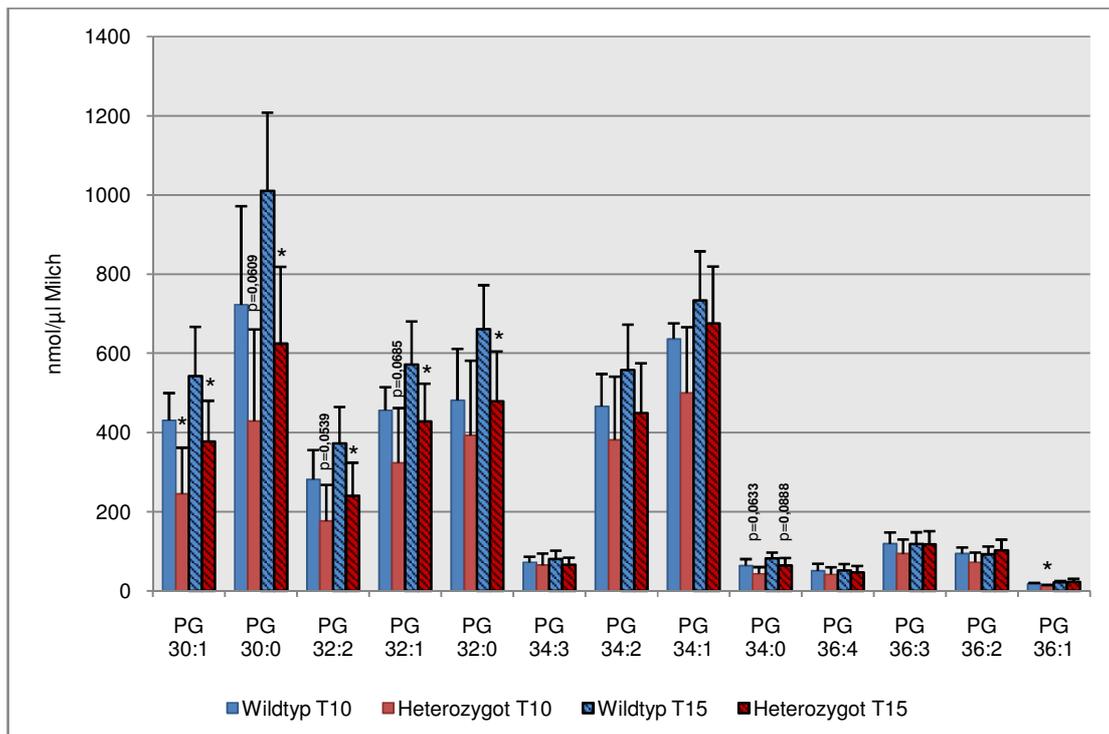


Abbildung 34: Konzentrationen von Phosphatidyl-Glycerin in der Milch. Vergleich zwischen Wildtyp und heterozygoten Tieren zu zwei Zeitpunkten der Milchentnahme; Bei Heterozygoten ist die Konzentration an Phosphatidyl-Glycerin in der Milch geringer; T10:Tag 10 und T15: Tag 15 nach dem Wurf; * : p<0,05.

2.6 Lungenfunktion bei Wildtyp-Tieren und heterozygoten adulten Tieren

Um die Lungenfunktion nach der Expertise von Prof. Dr. med. Holger Schulz, Institut für Inhalationsbiologie, Helmholtz-Zentrum München, wie unter 4.13 beschrieben bei Wildtyp und heterozygoten Tieren zu untersuchen, wurden zwei *in vivo* Studien durchgeführt. Zunächst wurden sich frei bewegende Tiere im Ganzkörperplethysmografen (siehe 2.6.1) untersucht. Anschließend wurden die selben Tiere der lungenmechanischen Untersuchung durch Intubation und maschinelle Beatmung unterworfen (siehe 2.6.2). Hierfür wurden 8 weibliche heterozygote Tiere (weibliche $Abca3^{+/-}$), sowie 8 weibliche Wildtyp-Tiere (weibliche Kontrolltiere) verwendet. Um eventuelle Geschlechtsunterschiede zu ermitteln, wurden zusätzlich je 4 männliche heterozygote Tiere (männliche $Abca3^{+/-}$) als auch Wildtyp-Tiere (männliche Kontrolltiere) verwendet. Dabei wurden immer ein Wildtyp-Tier mit einem dem selben Wurf entstammenden heterozygoten Tier verglichen.

2.6.1 Ganzkörperplethysmografische Untersuchungen

Die ganzkörperplethysmografischen Untersuchungen wurden wie unter 4.13.1 beschrieben durchgeführt. Dabei konnten bei allen gemessenen Parametern keine signifikanten Unterschiede der Lungenfunktion im Vergleich von Wildtyp zu heterozygoten Tieren gefunden werden.

Parameter	Weibliche Kontrolltiere (n=8)	Weibliche Abca3 ^{+/-} (n=8)	p - Wert	Männliche Kontrolltiere (n=4)	Männliche Abca3 ^{+/-} (n=4)	p - Wert
ABCA3	MW ± SE	MW ± SE		MW ± SE	MW ± SE	
Gewicht [g]	19.6 ± 0.4	19.4 ± 0.4	n.s.	24.3 ± 1.1	23.8 ± 0.6	n.s.
Alter [d]	86.1 ± 1.5	86.7 ± 1.2		90.0 ± 1.3	90.0 ± 1.3	
Mean_f [1/min]	452.7 ± 19.1	465.9 ± 26.1	n.s.	437.8 ± 17.9	448.5 ± 18.8	n.s.
Ruhend						
f [1/min]	349.6 ± 9.7	356.1 ± 11.0	n.s.	343.9 ± 8.8	340.4 ± 11.3	n.s.
TV [ml]	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.02	n.s.	0.19 ± 0.01	0.22 ± 0.01	n.s.
sTV [µl/g]	9.4 ± 0.4	10.2 ± 0.7	n.s.	7.8 ± 0.1	9.4 ± 0.5	n.s.
MV [ml/min]	62.5 ± 3.3	69.2 ± 6.3	n.s.	62.6 ± 3.2	72.9 ± 1.5	n.s.
sMV [ml/min/g]	3.2 ± 0.1	3.5 ± 0.3	n.s.	2.6 ± 0.1	3.1 ± 0.1	n.s.
Ti [ms]	50.0 ± 0.8	53.8 ± 3.1	n.s.	55.0 ± 1.9	51.9 ± 1.8	n.s.
Te [ms]	122.4 ± 3.6	116.4 ± 4.4	n.s.	119.8 ± 3.7	125.0 ± 4.4	n.s.
Ti/TT	0.29 ± 0.00	0.32 ± 0.01	n.s.	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.01	n.s.
PIF [ml/s]	6.5 ± 0.3	6.3 ± 0.2	n.s.	6.2 ± 0.4	7.3 ± 0.3	n.s.
PEF [ml/s]	3.3 ± 0.2	3.7 ± 0.5	n.s.	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.0	n.s.
MIF [ml/s]	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	n.s.	3.5 ± 0.2	4.3 ± 0.2	n.s.
MEF [ml/s]	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.2	n.s.	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.0	n.s.
Aktiv						
f [1/min]	512.4 ± 7.1	525.8 ± 6.4	n.s.	508.6 ± 4.5	508.5 ± 4.2	n.s.
TV [ml]	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	n.s.	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.00	n.s.
sTV [µl/g]	10.2 ± 0.3	10.4 ± 0.4	n.s.	8.2 ± 0.2	9.0 ± 0.4	n.s.
MV [ml/min]	102.1 ± 4.2	105.9 ± 4.6	n.s.	99.7 ± 3.5	106.3 ± 2.3	n.s.
sMV [ml/min/g]	5.2 ± 0.2	5.5 ± 0.2	n.s.	4.1 ± 0.1	4.5 ± 0.2	n.s.
Ti [ms]	39.3 ± 0.3	40.3 ± 1.2	n.s.	39.7 ± 0.5	40.0 ± 0.6	n.s.
Te [ms]	78.0 ± 1.6	73.9 ± 1.4	n.s.	78.3 ± 0.6	78.0 ± 1.1	n.s.
Ti/TT	0.34 ± 0.00	0.35 ± 0.01	n.s.	0.34 ± 0.00	0.34 ± 0.01	n.s.
PIF [ml/s]	8.5 ± 0.4	8.3 ± 0.2	n.s.	8.6 ± 0.3	9.0 ± 0.4	n.s.
PEF [ml/s]	5.1 ± 0.2	5.3 ± 0.3	n.s.	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.1	n.s.
MIF [ml/s]	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.1	n.s.	5.0 ± 0.2	5.3 ± 0.2	n.s.
MEF [ml/s]	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2	n.s.	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.0	n.s.

Tabelle 21: **Ergebnisse der ganzkörperplethysmografischen Untersuchung von heterozygoten Tieren im Vergleich zu Wildtyp:** Es finden sich keine Unterschiede; Gewicht: Körpergewicht (g); Mean_f: Mittelwert der Atemfrequenzen (1/min); f: Atemfrequenz (1/min); TV: Ruheatemzugvolumen (ml); sTV: spezifisches Ruheatemzugvolumen (µl/g); MV: Minutenvolumen (ml/min); sMV: spezifisches Minutenvolumen (ml/min/g); Ti: Inspirationszeit (ms); Te: Expirationszeit (ms); Ti/TT: relative Dauer der Inspiration; PIF: Inspiratorischer Spitzenfluss (ml/s); PEF: Expiratorischer Spitzenfluss (ml/s); MIF: Mittlerer inspiratorischer Fluss (ml/s); MEF: Mittlerer expiratorischer Fluss (ml/s).

2.6.2 Lungenfunktionsuntersuchungen von narkotisierten Tieren

Die Lungenfunktionsuntersuchungen von narkotisierten und tracheal intubierten Tieren wurden wie unter 4.13.2 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich auch hier bei keinem der gemessenen Parameter ein signifikanter Unterschied im Vergleich von Wildtyp und heterozygoten Tieren.

Parameter	Weibliche Kontrolltiere (n=8)		Weibliche Abca3 ^{+/-} (n=8)		p - Wert	Männliche Kontrolltiere (n=3)		Männliche Abca3 ^{+/-} (n=4)		p - Wert
	MW	±SD	MW	±SD		MW	±SD	MW	±SD	
ABCA3	MW	±SD	MW	±SD		MW	±SD	MW	±SD	
Gewicht [g]	20	1,1	19	1,6	n.s.	25	1,8	24	1,2	n.s.
TLC (µl)	1132	61	1161	68	n.s.	1292	29	1261	57	n.s.
TLC/BW (µl/g)	58,0	2,6	59,7	2,2	n.s.	51,8	3,4	53,1	3,3	n.s.
IRC	826	58	852	66	n.s.	976	33	935	36	n.s.
IRC/BW	42,3	2,1	43,8	0,9	n.s.	39,2	3,9	39,4	2,7	n.s.
IRC/TLC	0,73	0,02	0,73	0,03	n.s.	0,76	0,03	0,74	0,01	n.s.
FRC	306	24	309	28	n.s.	316	42	326	27	n.s.
FRC/TLC	0,27	0,02	0,27	0,03	n.s.	0,24	0,03	0,26	0,01	n.s.
FRC/BW	15,7	1,5	16,0	2,0	n.s.	12,6	0,9	13,7	0,9	n.s.
ERV	139	10	143	11	n.s.	152	13	152	21	n.s.
ERV/BW	7,1	0,4	7,4	0,8	n.s.	6,1	0,8	6,4	0,9	n.s.
ERV/IRC	0,17	0,01	0,17	0,02	n.s.	0,16	0,01	0,16	0,02	n.s.
VD (µl)	261	8	265	6	n.s.	272	11	276	10	n.s.
VD/TLC	0,23	0,01	0,23	0,01	n.s.	0,21	0,01	0,22	0,004	n.s.
VD/IRC	0,32	0,02	0,31	0,02	n.s.	0,28	0,02	0,30	0,01	n.s.
Phase 1	138	4	136	6	n.s.	152	2	148	6	n.s.
Cdyn	34,2	2,7	36,9	3,9	n.s.	41,8	2,7	40,0	2,4	n.s.
CLdyn	40,6	3,8	42,7	5,0	n.s.	48,5	4,7	51,8	6,5	n.s.
C	47,8	3,3	50,7	6,0	n.s.	57,9	4,7	55,5	5,0	n.s.
C/Tlc	42,2	1,6	43,6	3,8	n.s.	46,0	3,8	44,1	4,3	n.s.
CL	61,9	4,4	62,9	9,5	n.s.	77,3	14,1	70,2	10,2	n.s.
CL/TLC	54,6	2,5	54,0	5,7	n.s.	62,7	11,0	55,8	8,2	n.s.
Res	0,88	0,16	0,86	0,13	n.s.	0,80	0,10	0,70	0,07	n.s.
s Res (RxTLC)	0,99	0,19	1,00	0,12	n.s.	1,04	0,13	0,89	0,09	n.s.
slope	0,64	0,10	0,51	0,12	n.s.	0,70	0,17	0,63	0,07	n.s.
DCO	11,3	1,2	11,3	1,4	n.s.	14,1	0,7	13,9	0,9	n.s.
DCO/TLC	9,9	0,6	9,7	0,8	n.s.	10,9	0,4	11,0	0,5	n.s.

Tabelle 20: **Ergebnisse der Lungenfunktionsuntersuchungen von heterozygoten Tieren im Vergleich mit Wildtyp-Tieren:** Es finden sich keine Unterschiede; Gewicht: Körpergewicht (g); TLC: totale Lungkapazität (µl); IRC: inspiratorische Residualkapazität (µl); FRC: funktionelle Residualkapazität (µl); ERV: expiratorisches Atemreservevolumen (µl); VD: seriell Totraumvolumen des Heliumexpirogramms (µl); Phase I: Phase I des Heliumexpirogramms; C: statische Compliance des Atemsystems (µl/cm H₂O); Cdyn: dynamische Compliance des Atemsystems (µl/cm H₂O); CL: statische Compliance der Lunge (µl/cm H₂O); CLdyn: dynamische Compliance der Lunge (µl/cm H₂O); R: Widerstand des respiratorischen Systems (cm H₂O/ml/s); sR: spezifischer Widerstand des respiratorischen Systems (R x TLC) (cm H₂O/s); sHe: Steigung der Phase III des Heliumexpirogramms (mm Hg/ml); DCO: CO-Diffusionskapazität (mol/min/hPa).

2.7 SUMO (*s*mall *u*biquitin-related *m*odifier)

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist ein wichtiger Schritt in der Genregulation. Es gibt eine ganze Reihe posttranslativeller Modifikationen von Proteinen wie die Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Ubiquitierung und die SUMOylierung. Hierbei werden kleine Proteine (SUMO-Proteine) an bestimmte Lysinreste anderer Proteine kovalent gebunden. Diese SUMOylierung kann strukturelle Veränderungen in Proteine einführen und letztlich ihre Funktion beeinflussen. Des Weiteren spielt sie eine fundamentale Rolle in der Genregulation [Mahajan, R. et al.; 1997; Matunis, M. J. et al.; 1996]. In den Säugetieren existieren vier verschiedene SUMO-Isoformen, die als SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 und SUMO-4 bezeichnet werden [Dohmen, R. J. 2004]. Bei der SUMOylierung wird das Protein covalent modifiziert. Hierbei spielt eine aus vier Aminosäuren bestehende konservierte Konsensussequenz Ψ -K-X-E eine zentrale Rolle. Ψ ist ein aliphatischer Rest, K steht für Lysin, X kann eine beliebige Aminosäure sein und E steht für Glutaminsäure. Lysin ist die bedeutsamste Aminosäure in dieser Konsensussequenz. Mutationen im Lysin verhindern die Interaktion von SUMO mit seinem Zielprotein. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass das SUMO-Konsensmotiv in direkten Interaktionen mit dem SUMO konjugierenden Enzym Ubc9 (*ubiquitin-conjugating enzyme 9*) vermittelt und dieses essenziell für SUMO-vermittelte Modifikation ist [Sampson, D. A. et al.; 2001].

2.7.1 Identifikation von SUMOylierungs-Motiven in ABCA3

Die Analysen von ABCA3 in Hinblick auf die Identifikation von SUMO-Motiven wurde mittels des Programms *fuzzpro* aus der *EMBOSS Suite* (<http://emboss.sourceforge.net>) durchgeführt. Für die Konsensussequenzanalyse von Ψ -K-X-E wurde folgender Pattern gewählt: [LVIFA]-K-X-[ED]. Hiermit ist es möglich auch Varianten der Konsensussequenz zu finden. Hierbei konnten drei SUMO-*sites* in ABCA3 identifiziert werden. Diese liegen an Position 737 bis 740 (AKGE), 764 bis 767 (VKEP) und 811 bis 814 (AKLE).

2.7.2 Erstellung von Plasmiden für *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen

Der *Yeast-Two-Hybrid*-Assay dient der Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen. Das hier verwendete Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid-System bedient sich des Transkriptionsfaktors GAL4 in Hefe [Fields, S. et al.; 1989]. Dieser besitzt zwei verschiedene Domänen, eine zum Binden an der DNA (GAL4-BD, Bindedomäne) und

eine, welche die Transkription aktiviert (GAL4-AD, Aktivierungsdomäne). Die beiden Domänen befinden sich normalerweise auf derselben Polypeptidkette, sind aber auch dann wirksam, wenn sie von zwei unterschiedlichen Proteinen über nichtkovalente Protein-Protein-Interaktionen zusammengebracht werden [Ma, J. et al.; 1988]. Hierzu bedient man sich zweier Hefe-Expressionsvektoren. Jedes der beiden Plasmide trägt jeweils ein für das entsprechende Experiment konstruiertes Fusionsgen. Dieses kodiert im ersten Fall für ein Hybridprotein, das aus der GAL4-BD besteht und an der sich die Aminosäuresequenz anschließt. Für dieses soll ein potentieller Bindungspartner gefunden werden (Köderprotein, *bait*-Protein). Das zweite Plasmid kodiert ein Hybridprotein, das sich aus der GAL4-AD und im Anschluss aus einem möglichen Bindepartner für das *bait*-Protein zusammensetzt (Beuteprotein, *fish*-Protein). Für die *fish*-Plasmide standen die in den Vektor pGADT7 klonierten SUMO-Isoformen SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 und SUMO-4 sowie Ubc9 zur Verfügung (Dr. Judith Glöckner-Pagel, Dr. von Haunersches Kinderspital, München). Für die Erstellung der *bait*-Plasmide für die ABCA3 SUMO-*sites* wurden die in 2.7.1 analysierten Bereiche in den Vektor pGBKT7 kloniert. Die Bereiche wurden mittels PCR aus dem Vektor pcDNA3-ABCA3fl amplifiziert. Mittels dieser Primer (siehe 5.7: Oligonukleotide für die Herstellung der SUMO-Konstrukte) wurde am 5'-Ende die Schnittstelle *NdeI* und am 3'-Ende die Schnittstelle *Bam*HI eingeführt. Hierbei wurden bei Konstrukt A-I alle drei SUMO-*sites* kloniert. A-II enthält die erste mögliche SUMOylierungsstelle AKGE, A-III die zweite VKEP und A-IV die dritte AKLE. A-III konnte leider bisher nicht kloniert werden.

2.7.3 ABCA3 interagiert mit allen SUMO-Isoformen

Die für den *Yeast-Two-Hybrid* eingesetzte Hefe wurde wie unter 4.5.2 beschrieben behandelt und kultiviert. Anschließend wurde die Cotransfektion wie unter 4.5.3 angegeben für die jeweiligen *bait*- bzw. *fish*-Vektoren durchgeführt. Im Anschluss wurde der *Yeast-Two-Hybrid* wie unter 4.5.4 beschrieben angesetzt. Die Ergebnisse des Filterabzuges der Hefezellen ist in Abbildung 35 zu sehen. Gut zu erkennen ist, dass die beiden getesteten ABCA3 SUMO-*sites* mit allen SUMO-Isoformen interagieren.

Für die Negativkontrolle (-) wurde das N-terminale Ende des *CFTR*-Gens ohne SUMO-*sites* benutzt. Als Positivkontrolle (+) wurde NFAT (nuclear factor of activated I cells) verwendet. Es ist bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor sumoyliert wird [Terui, Y. et al.; 2004]. Für beide Kontrollen wurde die Interaktion mit SUMO-2 experimentell mitausgeführt.

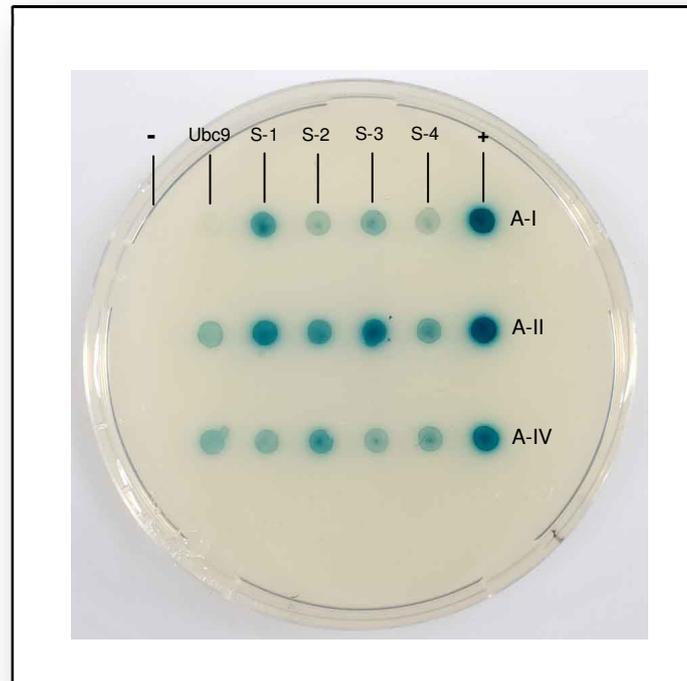


Abbildung 35: **Yeast-Two-Hybrid-Analyse; Agarplatte mit Filterabzug der Hefezellen;** Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid-System; - : Negativkontrolle (Interaktion des CFTR-N-Terminus mit SUMO-2); + : Positivkontrolle (Interaktion von NFAT mit SUMO-2); Ubc9, S-1, S-2, S-3 und S-4: Testung von jeweils drei ABCA3-Konstrukten (A-I, A-II und A-IV) auf Interaktion mit *ubiquitin-conjugating enzyme 9* und den vier SUMO-Isoformen. Alle getesteten ABCA3-Konstrukte zeigen eine Interaktion mit jedem der vier SUMO-Isoformen wie auch mit Ubc9, während Negativ- und Positivkontrolle sich wie erwartet verhalten. Die Interaktion mit Ubc9 deutet auf eine tatsächliche SUMOylierung der getesteten ABCA3-Konsensussequenzen hin.

3 Diskussion

Die genaue Funktion von ABCA3 war zu Beginn dieser Arbeit vollkommen ungeklärt. Aufgrund der Lokalisation wurde die Hypothese aufgestellt, dass ABCA3 eine Rolle in der Surfactant-Homöostase spielen könnte. Seitdem wurden bereits über 70 Mutationen im *ABCA3*-Gen beschrieben, die zu akuten und chronischen parenchymatösen Lungenerkrankungen im Neugeborenen- und Kindesalter führen. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine *Abca3*-defiziente Mauslinie generiert und anhand dieser die Hypothese untermauert werden, dass ABCA3 eine Schlüsselrolle in der Surfactant-Homöostase spielt. Darüber hinaus konnte zur weiteren Aufklärung des Substrats von ABCA3 beigetragen werden.

3.1 Protein-Alignments

Durch die Kenntnis, dass die Struktur eines Proteins letztlich dessen Funktion begründet, ist es in vielen Fällen hilfreich die Proteinstruktur zu kennen [Branden, C. et al.; 1991]. Eine sehr verbreitete und hier eingesetzte Methode ist das so genannte Protein-*Threading*, womit es möglich ist, anhand der Aminosäuresequenz eine Strukturvorhersage zu treffen [Lemer, C. M. et al.; 1995]. Für die Strukturvorhersage des humanen ABCA3 wurde das auf der Homepage des Institut Pasteur <http://bioweb.pasteur.fr> bereitgestellte Programm *TopPred* verwendet [von Heijne, G. 1992]. Es war möglich anhand der Aminosäuresequenz sowie dem Hydrophobizitäts-Index der Peptide ein Hydrophobizitäts-Profil zu generieren. Hieraus ergab sich, dass ABCA3 insgesamt 12 Transmembrandomänen hat (siehe Abb. 7).

3.1.1 Homologie zu anderen Lipidtransportern

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz innerhalb der ABCA-Subfamilie liegt bei 45 bis 66 %. Hierbei finden sich gerade in der NBD hochkonservierte Bereiche, die spezieübergreifend kaum variieren [Broccardo, C. et al.; 1999]. In der ABCA-Subfamilie des Menschen gibt es ausschließlich Volltransportergene. Noch nicht alle ABCA-Transporter sind funktionell aufgeklärt und ihr genaues Substrat ist noch nicht bekannt. Die ABCA-Subfamilie wird anhand phylogenetischer Analysen heute in zwei Subgruppen unterteilt [Albrecht, C. et al.; 2007; Broccardo, C. et al.; 1999]. Dies lässt die Hypothese plausibel erscheinen, dass ABCA3 eine Schlüsselrolle in der Surfactant-Homöostase spielen könnte.

3.1.2 Speziesübergreifende Konservierung von ABCA3

Bei Alignments ergab sich eine 88-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von ABCA3 von Mensch und Maus, wobei in den NBDs ein noch höherer Konservierungsgrad besteht. Alignments mit verschiedenen Säugetieren und sogar von Fischen zeigen, dass das *ABCA3*-Gen speziesübergreifend stark konserviert ist [Wood, P. G. et al.; 2000]. Dies könnte ein wichtiger Hinweis darauf sein, dass ABCA3 Orthologe übergreifend das gleiche Substrat transportieren könnten und somit eine einheitliche Aufgabe im Organismus erfüllen. Die Vermutung war daher naheliegend, dass die *Abca3*-defiziente Maus ein gutes Modell für die menschliche Erkrankung des ABCA3-Mangels darstellen könnte.

3.2. Targeting-Experimente

3.2.1 Embryonale Stammzellen

Die verwendete embryonale Stammzelllinie F1 IDG3.2 (Dr. Ralf Kühn, Institut für Entwicklungsgenetik am Helmholtz-Zentrum München) war bereits zuvor erfolgreich für die Inaktivierung verschiedener Gene in Mäusen verwendet worden.

Schwierigkeiten bei der Manipulation von embryonalen Stammzellen sind vielfältig [Ulloa-Montoya, F. et al.; 2005]. Bestimmte Genomregionen scheinen besser für die homologe Rekombination zugänglich zu sein, als andere. Ebenso besteht immer die Gefahr einer Kontamination mit Bakterien und / oder Pilzen. Deshalb müssen die embryonalen Stammzelllinien unter ständiger Verwendung von Antibiotika kultiviert werden. Dies stellt allerdings einen zusätzlichen Selektionsstress dar, der die Qualität der Zellen weiter mindert. Darüber hinaus ist bekannt, dass kultivierte Zellen oft mit Mycoplasmen kontaminiert sind. Dies reduziert die Effizienz bei der Erzeugung chimärer Tiere aus ES-Zellklonen [Joyner, A. L.2000]. Trotz dieser möglichen Probleme war es am Ende möglich, eine *Abca3*-defiziente Mauslinie erfolgreich zu generieren.

3.2.2 Rekombinationsereignisse in ES-Zellen

Für den hier erstellten und verwendeten *Targeting*-Vektor *Abca3*-KO wurde ein homologer Sequenzanteil von insgesamt 7543 bp verwendet, der einen 3015 bp großen heterologen Bereich flankiert. Es wurden ca. 1100 Klone untersucht und drei dieser Klone zeigten die richtige homologe Rekombination, dies entspricht einer Rekombinationsfrequenz von

ca. 0,27 %. Trotz dieser geringen Rekombinationsfrequenz war es möglich, eine *Abca3*-defiziente Mauslinie zu etablieren. Für die Frequenz der homologen Rekombination eines *Targeting*-Vektors mit dem Ziellocus sind eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich. Auf der Seite des Integrationsortes ist die vorherrschende Chromatinstruktur und die daraus resultierende Empfänglichkeit des Gens für eine homologe Rekombination von entscheidender Bedeutung [Wilder, P. J. et al.; 1993]. Bei der Erstellung des Vektors ist ein möglichst hoher Anteil an zum Genlocus homologen und isogenen Sequenzen ausschlaggebend. Die Literatur empfiehlt hier einen Anteil zwischen 8 bis 15 kb [Deng, C. et al.; 1992; Hasty, P. et al.; 1991; Hasty, P. et al.; 1992]. Hierbei hat weder die asymmetrische Verteilung der homologen Sequenzbereiche um die heterologe Sequenz, noch die Größe des heterologen Bereiches einen nennenswerten Einfluss auf die Rekombinationsfrequenz. Der kürzere homologe Arm sollte nicht kleiner als 1 kb sein.

3.3 Die *Abca3*-defiziente Mauslinie

Die Manipulation des *Abca3*-Gens der Maus wurde in einer Art und Weise vorgenommen, welche einen völligen Funktionsverlust mit sich bringt. Der bei der homozygot *Abca3*-defizienten Mauslinie beobachtete klinische Phänotyp lässt sich gut mit der menschlichen Erkrankung des ABCA3-Mangels vergleichen. Diese Tiere versterben kurz nach der Geburt an respiratorischem Versagen. Eine Atelektase der Lunge ist bei diesen Tieren eindeutig nachzuweisen. Diese ist bedingt durch das Fehlen von Surfactant, welches beim Gesunden mittels Exocytose von Lamellarkörperchen, in deren äußerer Membran ABCA3 zu finden ist, in den Alveolarraum sezerniert wird.

3.3.1 Klinischer Phänotyp

Homozygote Tiere werden kurz nach der Geburt trotz deutlicher Atembewegungen zyanotisch. Außerdem ist keine durch den Thorax scheinende Lunge zu erkennen (siehe Abb. 15). Die Lunge kann also nicht entfaltet und ventiliert werden und die Tiere versterben nach kurzer Zeit. Dieser klinische Phänotyp entspricht dem Bild der menschlichen Erkrankung des unmittelbar postpartalen Lungenversagens.

3.3.2 Morphologische Befunde

Auch die morphologischen Veränderungen der *Abca3*-defizienten Mauslinie spiegeln die menschliche Erkrankung des ABCA3-Mangels gut wieder. Auch in der Immunhistochemie ist die Atelektase der Lunge infolge des Surfactant-Mangels zu erkennen. In der Elektronenmikroskopie konnte das Fehlen von normalen Lamellarkörperchen eindrucksvoll beobachtet werden. Es wurde also gezeigt, dass ABCA3 eine bedeutende Rolle in der Ausformung normaler Lamellarkörperchen hat und somit für die Organellenogenese der Lamellarkörperchen verantwortlich ist. Hieraus lässt sich schließen, dass ABCA3 für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Surfactant-Homöostase von essenzieller Bedeutung ist.

3.3.3 Veränderung von Phospholipidkonzentrationen in Lungengewebe

Lipidanalysen zeigten anschaulich, dass Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Glycerin in der Lunge von Homozygoten reduziert ist. Interessanter Weise ist dies auch bei Heterozygoten erkennbar. Homozygote zeigen keine Bildung von funktionellen Lamellarkörperchen, somit wird kein Surfactant in den Alveolarraum sezerniert. Da Lamellarkörperchen einen großen Anteil der gesamten Lungenphospholipide enthalten, wirkt sich ein offenbar fehlender Import in dieses Organell als eine Verminderung des Gesamtphospholipidgehalts der Lunge aus. Eine mögliche Erklärung könnte die Hemmung der Phospholipidsynthese sein, wenn das Syntheseprodukt nicht korrekt weitergeleitet werden kann (im Sinne einer Produkthemmung). Da Surfactant die Oberflächenspannung um den Faktor 10 reduziert kann der Kollaps der Alveolen, insbesondere bei niedrigem transpulmonalen Druck, nicht verhindert werden. Hieraus resultiert die Atelektase und das Versterben der Tiere am Atemnotsyndrom kurz nach der Geburt. Hieraus lässt sich schließen, dass ABCA3 eine große Rolle beim Transport der oben genannten Substrate spielt. Dies untermauert die zu Beginn dieser Dissertation aufgestellte Hypothese, dass ABCA3 eine entscheidende Rolle in der Surfactant-Homöostase einnimmt. Bei der Konzentration von Cholesterin ließ sich im Gegensatz zu Surfactant-Phospholipiden kein Unterschied bei den verschiedenen Genotypen feststellen. Dies lässt darauf schließen, dass Cholesterin nicht als Substrat für ABCA3 dient. Diese Tatsache unterstreicht die Hypothese, dass ABCA3 ein selektiver Transporter für Surfactant-relevante Phospholipide aus dem Zytoplasma in das Lamellarkörperchen ist. Diese Ergebnisse korrelieren mit kürzlich erschienen Veröffentlichungen. Fitzgerald et. al. verglichen hierbei die Phospholipidzusammensetzung

der Lungen von Wildtyp und homozygoten Tieren [Fitzgerald, M. L. et al.; 2007]. Auch hier konnten nur bei Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Glycerin signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Eine zeitgleich erschienene Arbeit von Ban et al. wählte einen etwas anderen Ansatz [Ban, N. et al.; 2007]. Hierbei wurden Lungen von Wildtyp und homozygoten Tieren (*Abca3*^{-/-}) kurz nach Geburt homogenisiert und mittels ESI-MS analysiert. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Glycerin signifikant reduziert sind. Zudem konnte kein reifes SP-C in der Lungenlavage nachgewiesen werden. Cheong et al. injizierten Wildtyp und heterozygoten Tieren Methyl-³H-Cholin und 1-¹⁴C Palmitat in die Schwanzvene [Cheong, N. et al.; 2007]. Die anschließende Analyse der Lungenlavage zeigte einen geringeren Einbau der radioaktiv markierten Substanzen in die Phospholipide der Lamellarkörperchen und das Surfactant heterozygoter Tieren.

3.3.4 Phospholipidzusammensetzung der Milch

Auch in der Phospholipidzusammensetzung der Milch zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und heterozygoten Tieren. Man erkennt, dass die Konzentrationen von Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Glycerin, unabhängig vom Zeitpunkt der Milchentnahme, bei Wildtyp größer als bei heterozygoten Tieren sind. Mengenmäßig ist Phosphatidyl-Glycerin das häufigste Phospholipid in der Mausmilch. Genauere Untersuchungen der Subspezies von Phosphatidyl-Glycerin zeigten, dass gerade kurzkettiges Phosphatidyl-Glycerin bei Heterozygoten im Vergleich mit Wildtyp-Tieren signifikant reduziert ist. Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Substrat von ABCA3. Der Anteil der Phospholipide an den Gesamtlipiden der Milch liegt bei ca. 0,5 bis 1 % [Lund, A. P. et al.; 2004]. Die genaue Funktion der Phospholipide in der Milch ist noch ungeklärt, aber es ist bekannt, dass sie wichtig zur Stabilisierung der Fett-in-Wasser-Emulsion sind. Phospholipide bilden hierbei eine Art Membran um die Triglyceridtröpfchen (*milk fat globules*) [Jensen, R. G. et al.; 1991]. Durch den hohen Triglyceridgehalt der Mausmilch (ca. 40 g/dL) kommt möglicherweise den Phospholipiden in Mausmilch eine besondere Rolle zu. Außerdem wird die Vermutung angestellt, dass diese Phospholipide eine Schutzfunktion des gastrointestinalen Epithels haben [Armand, M. et al.; 1996; Hamosh, M. et al.; 1999]. Es ist bekannt, dass Cholin ein essenzieller Nahrungsbestandteil ist. Sein Bedarf ist während der Schwangerschaft und vor allem während der Stillzeit erhöht. Ein Cholinmangel während der Stillzeit kann zu

Leberschäden führen [Buchman, A. L. et al.; 2001]. Demnach könnte ABCA3 in der Brustdrüse die spezifische Funktion der Phospholipidsekretion zukommen.

3.3.5 ABCA3 beeinflusst nicht das pränatale Überleben

Nach Analyse von 91 genotypisierten Föten, der bis jetzt betrachteten 15 Heterozygotenverpaarungen zeigte sich eine mathematische Verteilung von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Tieren, die mit den Mendelschen Regeln der Vererbung (nach dem 2. Mendelschen Gesetz: Segregationsregel für einen intermediären Erbgang) vereinbar ist. Hierbei zeigt sich ein Aufspaltungsverhältnis von 1:2:1, dass sich phänotypisch als 3:1 manifestiert, da heterozygote und Wildtyp-Tiere gesund sind. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ABCA3-Mangel keinen Einfluss auf das pränatale Überleben hat. Wäre dies der Fall, so würden aus Heterozygotenverpaarungen weniger homozygote als Wildtyp-Nachkommen hervorgehen.

3.3.6 Heterozygotie scheint keinen Einfluss auf die Lungenfunktion zu haben

Trotz des zuvor beschriebenen eindeutigen biochemischen Phänotyps einer Depletion der Lunge an Phospholipiden auch bei Heterozygoten ließen sich keine messbaren Auswirkungen auf die Lungenfunktion unter Normalbedingungen finden. Dies war unabhängig vom Geschlecht der untersuchten Tiere. Offenbar ist die um 50 % reduzierte Gendosis für die Funktion der adulten Lunge ohne besondere Provokation ausreichend.

Die Tatsache, dass Heterozygotie keinen Einfluss auf den Phänotyp hat, ist in der Natur durchaus verbreitet. Hierbei spricht man von einer rezessiven Erkrankung. Bei heterozygoten Individuen ist dabei nur etwa 50 % der normalen Menge bzw. Aktivität eines Proteins zu finden, was jedoch in der Regel zur Aufrechterhaltung eines normalen Phänotyps ausreichend ist. Eine solche rezessive Erkrankung stellt beispielsweise auch der Surfactant-Protein B (SP-B)-Mangel dar. Die Surfactant-assoziierten Proteine SP-B und SP-C sind für die Reduzierung der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze mitverantwortlich. Allerdings ist nur der homozygote SP-B *knockout* letal. Bei heterozygoten SP-B *knockout*-Mäusen ist die Lungenmorphologie unverändert. Gleiches gilt für die intra- und extrazellulären Phospholipidkonzentrationen. Diese Tiere überleben und scheinen keinen erkennbaren Phänotyp zu haben. In Lungenfunktionsanalysen dieser Tiere zeigt sich aber eine Reduktion ihrer spezifischen Lungen-Compliance [Clark, J. C. et al.; 1997; Tokieda, K. et al.; 1997]. In einer Studie von

Lin et al. vom Jahre 2000 wurden ARDS-Patienten (*acute respiratory distress syndrome*) mit Patienten, die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko an ARDS haben, sowie mit gesunden Kontrollen verglichen. Die ARDS-Patienten wurden in zwei Subgruppen eingeteilt: Die erste Gruppe umfasst Patienten mit einem idiopathischen ARDS (meist einhergehend mit einer Pneumonie). Die zweite beinhaltet Patienten mit einem exogenen ARDS. In dieser Studie wurden verschiedenen Polymorphismen in den Surfactant-assoziierten Proteinen auf ihre Häufigkeit in den einzelnen Gruppen und Subgruppen verglichen. Hierbei konnte eine signifikant erhöhte Frequenz für einen Polymorphismus (C/T1580) im SP-B Gen bei idiopathischem ARDS in Bezug auf die Kontrollgruppe festgestellt werden [Lin, Z. et al.; 2000]. Daraus könnte sich schließen lassen, dass auch Individuen mit Heterozygotie für ein SP-B Null-Allel unter Belastung ein erhöhtes Risiko haben zu erkranken, obwohl diese unter Normalbedingungen eine normale Lungenfunktion aufweisen [Yusen, R. D. et al.; 1999]. Es wurden bereits Fälle beschrieben, bei denen Heterozygotie für ABCA3-Mangel einen klinischen Phänotyp zeigen. Allerdings waren diese Fälle mit einer Mutation im SP-C Gen vergesellschaftet [Bullard, J. E. et al.; 2007]. Eine jüngst veröffentlichte Studie zeigte, dass die Mutation E292V im ABCA3-Gen mit 3,8 % in Neugeborenen mit RDS zu finden ist. In der Kontrollgruppe ist diese Mutation mit einer Prävalenz von < 0,4 % vertreten. Bei Frühgeburtlichkeit und Heterozygotie für diese Mutation zeigt sich eine erhöhte Inzidenz von RDS [Garmany, T. H. et al.; 2008]. Die Prävalenz dieser Mutation wird in der obigen Studie mit ca. 1:200 angegeben. In einer finnischen Studie wurden 267 Frühgeborene mit RDS auf die neun häufigstens SNP's (*single nucleotide polymorphism*) hin untersucht. Der vierthäufigste Haplotyp war in Patienten mit RDS überrepräsentiert, was mit einer erhöhten Allelfrequenz von F353F einherging [Karjalainen, M. K. et al.; 2008].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnte die Heterozygotie von *Abca3*-defizienten Mäusen unter bestimmten Stressbedingungen durchaus Auswirkungen haben. Untersuchungen unter solchen Stressbedingungen stehen für diese *Abca3*-defiziente Mauslinie noch aus.

3.3.7 SUMOylierung von ABCA3

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist ein wichtiger Schritt in der Genregulation. Eine dieser posttranslationalen Modifikation ist die SUMOylierung. Bei der SUMOylierung werden kleine Proteine (SUMO-Isoformen) kovalent an bestimmte Lysinreste anderer Proteine gebunden. Mit dieser SUMOylierung gehen strukturelle

Veränderungen in Proteinen einher, die letztlich ihre Funktion beeinflussen. Sie spielt eine fundamentale Rolle in der Genregulation [Mahajan, R. et al.; 1997; Matunis, M. J. et al.; 1996].

Alle hier identifizierten und klonierten ABCA3 SUMO-*sites* zeigten eine Interaktion mit den SUMO-Isoformen und Ubc9. Da das SUMO konjugierenden Enzym Ubc9 in direkter Interaktion mit den SUMO-Konsensmotiven steht, zeigt dies, dass die hier untersuchten ABCA3 SUMO-*sites* tatsächlich von den SUMO-Isoformen modifiziert werden. Dies lässt den ersten Schluss zu, dass ABCA3 tatsächlich sumoyliert wird. Weitere Analysen, um diese Daten zu validieren und zu interpretieren stehen noch aus.

3.3.8 Die Regulation der Expression von ABCA3

Die Regulation der Expression von ABCA3 ist noch nicht vollkommen geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass das *ABCA3*-Gen über den *Calcineurin/NFAT*-Signalweg pränatal aktiviert werden kann [Dave, V. et al.; 2006]. Des Weiteren spielen wohl *STAT3* und *TTF-1* in der Regulation von ABCA3 eine entscheidende Rolle [Besnard, V. et al.; 2007; Matsuzaki, Y. et al.; 2007; Stahlman, M. T. et al.; 2007]. Die Mechanismen der Genregulation von ABCA3 sind aber noch nicht endgültig geklärt.

3.3.9 Expression von ABCA3 in anderen Geweben

Wie sich an der Expression und Milchanalyse von ABCA3 in der Mamma zeigen ließ, scheint ABCA3 auch in Geweben außerhalb der Lunge den Transport von bestimmten Phospholipiden zu übernehmen. Es ist bekannt, dass ABCA3 auch in Darm, Leber, Niere und Pankreas exprimiert wird [Stahlman, M. T. et al.; 2007], wobei dies mit Antikörpern nicht immer belegbar ist.

Bekannt ist, dass die Entwicklung der menschlichen Lunge ca. am 30. Tag, mit der Ausbildung der Lungenknospe aus dem ventralen Teil des Vorderdarms beginnt. Deswegen ist das Epithel, welches Kehlkopf, Luftröhre, Bronchien und Lunge auskleidet, entodermalen Ursprungs. Im Gegensatz dazu entstammt das Knorpel- und Muskelgewebe dem Mesoderm, das das Darmrohr umgibt. Im Darmepithel werden Surfactant-ähnliche Proteine exprimiert [Eliakim, R. et al.; 1997; Mahmood, A. et al.; 1993]. Deren Funktion ist bis heute ungeklärt.

3.3.10 hrGFP Expression

Das intendierte Ziel der hrGFP Expression war die genauere Untersuchung der Expression von ABCA3 in den verschiedensten Geweben und Zelltypen. Leider zeigen die unter 2.3.7 zusammengetragenen Ergebnisse, dass ein Nachweis des hrGFP in verschiedenen Geweben von homozygoten Tieren nicht möglich ist.

Mögliche Ursache hierfür ist, dass bei der Erstellung des *Targeting*-Konstruktes durch einen „*in silico*“ Klonierungsfehler die für die Polyadenylierung notwendige Sequenz AATAAA-Signal am 3'-Ende abgeschnitten wurde (siehe Abb. 36). Der Poly(A)-Schwanz wird nicht auf DNA-Ebene kodiert, sondern von der Poly(A)-Polymerase während der Prozessierung der prä-mRNA (hnRNA) im Zellkern an das 3'-Ende der prä-mRNA angeknüpft. Der erste Reaktionsschritt der 3'-Prozessierung in der Großzahl der mRNAs von Eukaryonten ist eine endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA an der *cleavage site*. Das 3'-Spaltprodukt wird degradiert. An das 5'-Spaltprodukt der mRNA wird der Poly(A)-Schwanz addiert. Da die zwei Reaktionsschritte *in vivo* sehr eng gekoppelt sind, können keine Zwischenprodukte detektiert werden. Die Funktionen des Poly(A)-Schwanzes sind noch nicht vollständig erforscht, sicher sind aber eine Erhöhung der Stabilität durch Schutz vor Abbau sowie eine Erhöhung der Translatierbarkeit. Des Weiteren ist bekannt, dass der Poly(A)-Schwanz sich mit fortschreitendem Alter des mRNA-Moleküls verkürzt und dessen Halbwertszeit somit reguliert wird. Dadurch wird es auf prä-mRNA-Ebene durch das Fehlen des AAUAAA-Signals nicht zur Anlagerung der Poly(A)-Polymerase und CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) kommen und die Adenylierung der prä-mRNA ausbleiben [Barabino, S. M. et al.; 1999; Wahle, E. et al.; 1997]. Diese wird wahrscheinlich degradiert und kann das hrGFP nicht in ausreichender Menge zur Expression bringen. Hieraus resultiert, dass kein hrGFP-Signal zu detektieren ist.

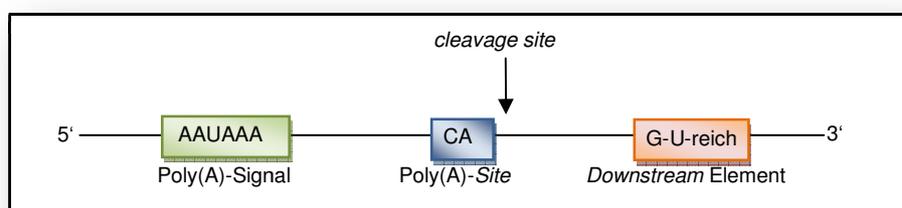


Abbildung 36: Darstellung der für die Polyadenylierung notwendigen Elemente auf mRNA-Ebene.

3.3.11 Antikörpergenerierung

Es wurden drei Expressionsplasmide hergestellt und die gewünschten Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Mittels Maltose bindendem Protein wurden die Fusionsproteine aufgereinigt. Die relevanten Antigene sollten mittels Faktor Xa abgespaltet und anschließend aufgereinigt werden. Das Subprojekt zur Generierung eines selbst hergestellten Antikörpers gegen ABCA3 wurde vor der Beimpfung der Kaninchen eingestellt, da ein kommerzieller Antikörper gegen ABCA3 auf dem Markt verfügbar wurde. Dies stellte eine preiswertere und schneller verfügbare Alternative für einen Antikörper gegen ABCA3 dar.

3.3.12 Problematik der Mausmodelle

Mausmodelle resultierend aus einer Geninaktivierung bieten die große Möglichkeit den Zusammenhang komplexer Mechanismen bei Verlust eines Proteins zu untersuchen. Dies geht weit über die Möglichkeiten, die *in vitro* Modelle bieten, hinaus. Da aber biologische Prozesse *in vivo* auf einer Vielzahl von redundanten Mechanismen basieren, ist die Evaluierung solcher *in vivo* erhaltener Daten schwierig. Des Weiteren gründet sich die Phänotypisierung einer solchen Inaktivierung eines Gens auf einen weitestgehend definierten genetischen Hintergrund und auf gleich bleibende Umgebungsbedingungen. Die Einflüsse des genetischen Hintergrunds auf die Ausprägung eines Phänotyps wurden schon mehrfach gezeigt. So führt die Inaktivierung des Keratin-8-Gens in Mäusen mit einem C57Bl/6-Hintergrund zu inneren Blutungen und die Tiere versterben, wohingegen die Inaktivierung des Keratin-8 in Tieren mit FVB/N-Hintergrund nur zu einer kolorektalen Hyperplasie sowie einer Kolitis führen [Baribault, H. et al.; 1994]. Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Inaktivierung des Gens für den EGF-Rezeptor. Wird dieser Rezeptor bei Tieren mit CF-1-Hintergrund inaktiviert, führt dies zum embryonalen Absterben, zum Zeitpunkt der Implantation. Andererseits führt die Inaktivierung des EGF-Rezeptors in Mäusen mit einem CD-1-Hintergrund dazu, dass die Tiere erst in der dritten postnatalen Woche versterben [Threadgill, D. W. et al.; 1995].

Da die Auswirkung der Geninaktivierung in der Maus bereits von vielen Randbedingungen beeinflusst wird, ist eine Übertragung der Ergebnisse auf eine andere Spezies, z. B. den Menschen, normalerweise nur unter Vorbehalt möglich. Es ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass bei dieser *Abca3*-defizienten Mauslinie eine Korrelation zwischen dem menschlichen respiratorischem Versagen und dem Lungenversagen der Maus feststellbar ist. Gleiche strukturelle Veränderungen lassen sich in der Lungenmorphologie, z. B. ist bei

beiden Fällen das Fehlen normaler Lamellarkörperchen beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass der morphologische Phänotyp der Maus, der menschlichen Erkrankung mit ABCA3-Mangel entspricht.

4 Methoden

4.1 Umgang mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

Vorbemerkung: Alle nicht aufgeführten Methoden wurden nach Standardprotokollen [Sambrook, J. et al.; 2001] oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA und BAC-DNA (***b****a****c****t****e****r****i****a****l****a****r****t****i****c****i****a****l****c****h****r****o****s****o****m****e****s*) erfolgte nach Angaben des Herstellers mit folgendem Isolierungssystem: *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen)

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen (DNA-Lösungen) wurde im Labor UV-fotospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Aus der Extinktion der Lösung kann die Konzentration anhand des folgenden Verhältnisses berechnet werden: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/mL}$ doppelsträngiger (***d****o****u****b****l****e****-******s****t****r****a****n****d****e****d*, ds) DNA, 33 $\mu\text{g/mL}$ einzelsträngiger (***s****i****n****g****l****e****-******s****t****r****a****n****d****e****d*, ss) DNA und etwa 20 $\mu\text{g/mL}$ bei Oligonukleotiden. Dieses gilt für Nukleinsäuren bei pH 7,0; die Messung sollte daher in einem Puffer mit geringer Salzkonzentration (z. B. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer mit pH 7,0) durchgeführt werden. Je nach verwendeter DNA-Isolierungsmethode können Nukleinsäure-Lösungen mit RNA, Proteinen oder auch Resten von Phenol kontaminiert sein. Während sich eine Kontamination mit RNA oder Phenol (Absorptionsmaximum bei 270 bis 275 nm) spektrometrisch nicht nachweisen lässt, gibt das Verhältnis der Nukleinsäureabsorption zur Proteinabsorption Auskunft über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280} zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Alkohol und Reste von Proteinen verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Oft wird auch der Quotient OD_{230} zu OD_{260} bestimmt, der im Idealfall bei 0,45 liegen sollte und ein Indikator für weitere Verunreinigungen, z. B. mit Polysacchariden, ist.

4.1.3 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um die Erbsubstanz DNA *in vitro* zu vervielfältigen [Mullis, K. et al.; 1986]. 1993 erhielt Kary Mullis für dieses Verfahren den Nobelpreis.

Die Standard PCR-Reaktionen wurden mit dem *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Dieses PCR-Kit enthält eine einheitliche Enzymmischung aus einer thermostabilen *Taq* DNA-Polymerase und einer thermostabilen *Tgo* DNA-Polymerase, die eine „*proofreading*“ Aktivität besitzt. Das System wurde speziell für längere DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu 5 kb optimiert. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Taq DNA-Polymerase Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	10 min	1x
2	94 °C	40 sec	25x
3	52 °C	40 sec	
4	72 °C	40 sec	
5	72 °C	5 min	1x
6	4 °C	Hold	∞

Die Amplifikate wurden auf einem 1-prozentigem Agarosegel überprüft. Als Molekulargewichtsstandard diente der 1 kb Marker (Invitrogen, Karlsruhe).

Für die Amplifikation großer und vor allem GC-reicher Regionen wurde das *Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix* (Finnzymes, Finnland) verwendet. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.

High-Fidelity Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	98 °C	1 min	1x
2	98 °C	10 sec	30x
3	55 °C	30 sec	
4	72 °C	30 sec/kb	
5	72 °C	10 min	1x
6	4 °C	Hold	∞

Für die PCR-Screens wurde die *Taq* DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.

PCR-Screen Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	95 °C	5 min	1x
2	95 °C	30 sec	25x
3	50 °C	30 sec	
4	72 °C	30 sec	
5	72 °C	5 min	1x
6	4 °C	Hold	∞

Die Amplifikate wurden auf einem 3-prozentigem Agarosegel überprüft. Als Molekulargewichtsstandard diente der Marker V (Roche Diagnostics, Mannheim).

4.1.4 Reinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie die mit Restriktionsendonukleasen verdauten Vektor-DNA erfolgte mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Für die Aufreinigung von Plasmiden zur Transfektion wurde das *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Für die Isolierung von Fragment aus einem Agarosegel wurden diese auf einem UV-Tisch TCP-26.M (Kodak, Japan) möglichst präzise ausgeschnitten und mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Konzentration wurde durch Auftrag eines Aliquots auf ein Agarosegel und Vergleich mit dem Größenstandard bzw. fotometrisch bestimmt.

4.1.5 Subklonierung von PCR-Produkten

Der Vektor pGEM-T Easy verfügt über eine Insertionsstelle mit überhängenden Thymidinen, die eine einfache Insertion des cDNA-Fragments erlauben, welches bei der Amplifikation mit einer thermostabilen Polymerase mit überzähligen Adenosinen an den 5'- und 3'-Enden versehen wurde. Mittels Ligation (siehe 4.1.10) war es möglich, die PCR-Produkte ohne weitere Manipulation in diesen Vektor zu klonieren.

4.1.6 Nachweis einer Insertion in rekombinante Plasmide mittels PCR

Bakterien wurden mithilfe eines so genannten *Clone-Screens* auf die Aufnahme eines Plasmids mit dem korrekten Insert überprüft. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von der Agarplatte gepickt und in 20 µl bidestilliertem H₂O gelöst. 5 µl dieser Suspension wurden in eine Standard-PCR eingesetzt. Bei dieser PCR wurde die Anfangsdenaturierung bei 94 °C auf 10 min verlängert, um die Lyse der Bakterienzellwand zu gewährleisten. Die *Clone-Screen*-Primer wurden je nach kloniertem Insert ausgewählt.

Clone-Screen PCR-Standard-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	10 min	1x
2	94 °C	30 sec	25x
3	52 °C	30 sec	
4	72 °C	30 sec	
5	72 °C	4 min	1x
6	4 °C	Hold	∞

4.1.7 DNA-Sequenzierung durch *Cycle Sequencing*

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden mittels *Cycle Sequencing* beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger [Sanger, F. et al.; 1977]. Bei dieser Methode werden vier mit Fluoresceinfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Terminatoren) verwendet. Der Einbau der markierten Nukleotide erfolgt in einer Amplifikation mit nur einem Primer. Da jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist, wird nur ein Sequenzieransatz benötigt. Für die Sequenzierreaktionen wurde das *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet.

Sequenzieransatz:

Zusammensetzung	Menge
Gereinigtes PCR-Produkt	0,5-2 µl
Sequenzierprimer	1 µl (10 pmol/µl)
BigDye v3.1 Sequencing Mix	2 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 5 µl

Cycle Sequencing-Programm BigDye v3.1

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	96 °C	2 min	1x
2	95 °C	15 sec	← 29x
3	55 °C	30 sec	
4	60 °C	40 sec	
5	60 °C	5 min	1x
6	4 °C	Hold	∞

Die Proben wurden von der Firma Medigenomix, Martinsried präzipitiert, gereinigt und auf einem ABI 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mithilfe des Computerprogramms *Chromas Lite* der Firma Technelysium Pty Ltd., Australien.

4.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Analyse von DNA-Fragmenten fand in horizontalen, nicht denaturierenden Agarosegelen statt, wobei die eingesetzte Agarosekonzentration (0,7 bis 3 %) nach den aufzutrennenden Fragmentgrößen gewählt wurde. Die Agarose wurde in 100 ml 1x TBE-Puffer, welcher auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit zwei Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,625 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden mit Auftragspuffer gemischt. Als Längenstandard wurden 200 ng einer 1 kb DNA-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 bis 120 V, wobei sich die Dauer nach dem erwünschten Trennungseffekt richtete. Die Gele wurden bei 312 nm UV-Durchlicht auf einem UVT-20M (HeroLAB, Deutschland) fotografiert. Danach wurden die Gelbilder mit einem Video Copy Processor P66DE (Mitsubishi, Japan) ausgedruckt und dokumentiert.

4.1.9 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Diese Klasse bakterieller Enzyme erkennt meist eine palindromische Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenz und spaltet innerhalb dieser Sequenz die DNA hydrolytisch [McClarin, J. A. et al.; 1986]. Je nach Enzym entstehen glatte (*blunt*) oder 3' bzw. 5'-überhängende (*sticky*) Enden. Die Phosphatgruppe des so unterbrochenen DNA-Strangs befindet sich danach am 5'-Ende, die Hydroxylgruppe am 3'-Ende.

Enzymspezifische Puffer wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Es wurden Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt a.M). und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) mit den entsprechenden Puffern verwendet.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

Zusammensetzung	Menge
DNA	0,2-1,0 µg
10fach Reaktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym #1	1 µl (10 Units/µl)
Restriktionsenzym #2*	1 µl (10 Units/µl)
H ₂ O _{bide} st.	ad 50µl

*: optional bei Doppelverdau (*double digest*)

Die Ansätze wurden für 3 bis 5 h bei 37°C inkubiert und anschließend mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden) gereinigt.

4.1.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

Geschnittene Vektor-DNA musste durch Dephosphorylierung der 5'-Phosphatgruppe an der einfachen Religation gehindert werden. Da die T4 DNA-Ligase die Verknüpfung nur von 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen katalysiert, wird die Wahrscheinlichkeit für die Insertierung eines Fragmentes und damit die Ausbeute an rekombinanten Plasmiden erhöht. Diese Reaktion wird durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm katalysiert (New England Biolabs, Frankfurt a.M.). 1 µl des Enzyms (10 Units/µl) wurden 20 min vor Ablauf der Inkubationszeit eines Restriktionsansatzes hinzupipettiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch Erhitzen (70°C für 10 min) deaktiviert.

Für die Insertion von Genfragmenten in einen geschnittenen Vektor müssen die Enden der DNA-Doppelstränge wieder kovalent über Phosphodiesterbindungen verknüpft werden. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert diese endergonische Reaktion mittels ATP-Hydrolyse.

Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Zusammensetzung	Menge
5fach Ligasepuffer (inkl. ATP)	4 µl
geschnittener Vektor	4-8 µl (0,25-0,4 µg/µl)
Fragment (Insert)	4-8 µl (0,25-0,4 µg/µl)
T4 DNA-Ligase	1 µl (1 U/µl)
H ₂ O _{bide} st	ad 20 µl

Für die Ligation wurde ein fünffacher molarer Überschuss des Insertfragments gegenüber dem Vektor eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Kryostat über Nacht bei 16°C.

4.2 Präparation von Ribonukleinsäure (RNA)

Vorbemerkung: Die verwendeten Kits und Methoden wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

4.2.1 Gewinnung von RNA aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus Maus Lungengewebe wurden 100 mg frisch entnommene Mauslunge mittels eines *Dounce* Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Die weitere Aufbereitung der RNA erfolgte mit *RNAeasy Mini Kit* (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers.

Konzentrationsbestimmung: $OD_{260} = 1$ entspricht 40 µg/mL RNA

4.2.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkriptase (RT) wurde erstmals 1970 unabhängig von Howard Temin und David Baltimore beschrieben [Baltimore, D. et al.; 1970; Temin, H. M. et al.; 1970]. Im Jahr 1975 erhielten sie für diese Entdeckung zusammen mit Renato Dulbecco den Nobelpreis für Medizin. Die reverse Transkriptase schreibt einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA um.

Für die cDNA-Synthese wurden je 1 µg Gesamt-RNA und 200 ng pd(N)6 Primer eingesetzt. Die reverse Transkription wurde mit dem *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.2.3 PCR-Screening zum Nachweis von mRNA/cDNA

Für das mRNA-Screening wurde cDNA amplifiziert, welche zuvor durch RT-PCR mit dem *First-Strand cDNA Synthesis Kit* generiert worden war (siehe 4.4.2). Die PCR wurden mit den unter 5.7 (GAPDH-f / GAPDH-r; ABCA3-E6/E7-f / ABCA3-E6/E7-r; ABCA3-E7/E8-f / ABCA3-E7/E8-r) aufgeführten Primerpaaren durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 1-prozentigem Agarosegel aufgetragen und analysiert.

4.3 Arbeiten mit Bakterien

Alle Bakterien wurden unter einer sterilen Arbeitsbank FASTER BHA48 (Kendro, Langenselbold) bearbeitet, wobei die eingesetzten Medien, Lösungen und Geräte steril waren. Die Bakterienlösungen und beimpften Agarplatten wurden im Brutschrank Functional Line UT12P (Heraeus Instruments, Osterode) bei 37 °C inkubiert.

4.3.1 Nährmedien

LB-Medium (*Lysogeny broth*) ist ein Komplexmedium mit folgenden Inhaltsstoffen:

LB-Medium:

Zusammensetzung	Menge
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

pH 7,4 einstellen, autoklavieren

Selektive LB-Agarplatten:

Zusammensetzung	Menge
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurde das entsprechende Antibiotikum (50 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) zugegeben und die Petrischalen unter einer sterilen Arbeitsbank mit je 1 cm LB-Agarlösung beschickt.

4.3.2 Zellanzucht

Das Überimpfen der verschiedenen *E. coli*-Stämme auf Festmedien und die Inokulation von Flüssigkulturen wurde mit einer ausgeglühten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze, ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatte oder von Glyzerinkulturen, durchgeführt. Flüssigkulturen mit größerem Volumen als 30 ml wurden aus über Nacht gewachsenen Vorkulturen (5 ml) in Verdünnung 1:100 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei

37°C in einem Rundschtüttler Excella E24 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) bei mind. 200 Upm.

4.3.3 Lagerung von Bakterien

Bakterien in LB-Medien oder auf Agarplatten, welche mit Parafilm (American National Can, Chicago, USA) umwickelt werden, können für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung wurden gleiche Volumina Bakterien-Übernachtskultur und Glycerin 85 % (Apotheke, Klinikum Großhadern) gemischt und in Nunc Cryo Tube™ Vials (Merck) bei 80°C eingefroren (Glycerinstock).

4.3.4 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* (DH5α) Zellen

Hierzu wurden 100 ml auf 37°C vorgewärmtes *Psi-Broth* mit 1 ml einer DH5α-Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden solange bei 37°C auf dem Schüttler Excella E24 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert, bis sie $OD_{600} = 0,5$ bis 0,6 erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt und ab diesem Zeitpunkt stets auf Eis weiterverarbeitet. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 4000×g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 90 min auf Eis. Die Zellen wurden erneut bei 4000×g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden jetzt in 4 ml TFB2 Puffer gelöst. In der Zwischenzeit wurden sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße in einem Ethanol/Trockeneisbad vorgekühlt. Je 100 µl der Bakteriensuspension wurden nun in den Reaktionsgefäßen schockgefroren (1 min Stickstofftank) und anschließend bei –80°C gelagert.

Puffer TFB1:

Zusammensetzung	Menge
RbCl ₂	100 mM
MnCl ₂	50 mM
Kaliumacetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerinlösung	15 %
H ₂ O	ad 1 l

pH 5,8; eisgekühlt einsetzen

Puffer TFB 2:

Zusammensetzung	Menge
MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerinlösung	15 %
H ₂ O	ad 1 l

pH 6,8; eisgekühlt einsetzen

Psi- Broth:

Zusammensetzung	Menge
MgSO ₄	4 mM
KCl	10 mM

in 1 l LB-Medium lösen

4.3.5 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Die kompetenten tiefgefrorenen *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 5 ng ungeschnittenem Plasmid oder 5 bis 7 µl des Ligationsgemisches versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 60 sec, anschließend wurde der Ligationsansatz sofort für 2 min auf Eis gekühlt, mit 200 bis 400 µl LB-Medium vermischt und dann für 45 min bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. 150 bis 350 µl des Transformationsansatzes konnten schließlich auf LB Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert werden.

4.4 Arbeiten mit Säugetierzellen

Alle Zellkulturen wurden in einer sterilen Arbeitsbank UniFLOW KR-130 von UniEquip, München bearbeitet, wobei die eingesetzten Medien, Lösungen und Geräte steril waren. Die Zelllinien wurden im Brutschrank Model 3507-2 (UniEquip, Germany) bei 37°C, 5 % CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im entsprechenden Medium inkubiert.

4.4.1 Nährmedien

Alle hier verwendeten Nährmedien wurden von PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Kulturmedium A549:

Zusammensetzung	Menge
<i>F12 Ham Nutrient Mixture + GulutaMAXTMI</i>	500 ml
<i>Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum</i>	5 ml
Pen/Strep	2 ml

Kulturmedium MLE-15 / MLE-12:

Zusammensetzung	Menge
Dulbeccos modified Eagle's medium	500 ml
Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum	5 ml
Pen/Strep	2 ml

Einfrriermedium A549:

Zusammensetzung	Menge
Kulturmedium	3 ml
Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum	5 ml
DMSO	2 ml

Einfrriermedium MLE-15 / MLE-12:

Zusammensetzung	Menge
Kulturmedium	3 ml
Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum	5 ml
DMSO	2 ml

4.4.2 Kultivierung von A549-Zellen

Bei dieser permanenten Zelllinie handelte es sich um eine humane Alveolarkarzinomlinie mit Pneumozyten Typ II Zellmorphologie [Lieber, M. et al.; 1976]. Diese A549-Lungenzellen wurden in Kulturflaschen mit „*F12 Ham Nutrient Mixture + GulutaMAXTMI*“ (Ham's; 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen wie unter 4.4.5 beschrieben gesplittet.

4.4.3 Kultivierung von MLE15- und MLE12-Zellen

Bei diesen zwei permanenten Zelllinien handelt es sich um murine Lungenepithelzelllinien, die mittels Papovavirus (SV40) immortalisiert wurden. In beiden Zelllinien kann Surfactant Protein B und C detektiert werden. Sowohl die MLE15-Zellen, als auch die MLE12-Zellen wurden mit „Dulbeccos modified Eagle´s medium“ (DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen wie unter 4.4.5 beschrieben gesplittet.

4.4.4 Auftauen von Säugetierzellen

Zum Auftauen einer neuen *Charge* von Säugetierzellen wurde das Kryogefäß aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem 37°C Wasserbad schnell aufgetaut, dann in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen mit 9 ml Kulturmedium überführt und für 3 min bei 1000×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 25 ml Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt. Diese Prozedur wurde möglichst zügig durchgeführt werden, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO für aufgetaute Zellen schädlich ist.

4.4.5 Splitten konfluenter Säugetierzellen

Zur Passagierung der adhärennten Zellen wurden diese zunächst mit 5 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mittels 2 ml Trypsin vom Kulturboden gelöst und für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 ml Nährmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 300×g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen in PBS gelöst und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 300×g wurde das Zellpellet in 10 ml Nährmedium aufgenommen und mit einer Konzentration von ca. 5000 Zellen/ml auf Kulturschalen beziehungsweise auf 12-*well* Zellkulturplatten ausgesät. Nach 3 bis 4 Tagen konnten die Zellen für die Versuche eingesetzt werden.

4.4.6 Einfrieren von Säugetierzellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen einer dicht bewachsenen 75 cm²-Kulturflasche abzentrifugiert (300×g, 5 min), in 7 ml Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

4.4.7 Transfektion mittels Magnetofektion

Die Magnetofektion beruht auf dem Prinzip der elektrostatischen Bindung von DNA an super-paramagnetische Nanopartikel. Diese sind an einen nicht-viralen Transfektionsvektor PEI (**P**oly**e**thyl**e**n**i**min) gekoppelt (transMAG-PEI). Nach Anlegen eines magnetischen Feldes wird die komplexierte DNA in den Zielzellen angereichert [Scherer, F. et al.; 2002]. Bei der Transfektion hat sich eine DNA-Konzentration von 2 µg/ml im Allgemeinen als ausreichend effizient erwiesen, ohne gleichzeitig allzu toxisch zu sein. PolyMAG *BL 16/1* ist eine gebrauchsfertige Mischung aus transMAG-PEI und freiem PEI. Vorbereitend für die Magnetofektion wurden die Zellen in so genannten *12-well* Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zuvor wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Eine Zellzahl von 100.000 bis 120.000/*well* hat sich als optimal erwiesen. Für die Transfektion wurden PolyMAG und die zu transfizierende DNA in jeweils gleichen Volumina Medium (ohne FCS, ohne AB) verdünnt. Der PolyMAG-Ansatz wurde mit dem DNA-Ansatz versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Transfektionsansatz überschichtet (500 µl/Vertiefung). Die Kulturplatte wurde nun auf dem Magneten platziert und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und die Zellen mit Nährmedium (inklusive FCS und AB) versorgt (1,5 ml/Vertiefung). Die Transfektion wurde nach maximal 24 h abgebrochen, indem die Zellen aufgeschlossen oder fixiert wurden. Die Zellen, welche später einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen werden sollten, wurden auf runden Deckgläschen, die sich in den Vertiefungen befanden, ausgesät.

4.5 Arbeiten mit Hefen

Hefen lassen sich wie Bakterien sowohl in flüssigem Medium als auch auf Agarplatten kultivieren. Die optimale Inkubationstemperatur liegt bei 30°C. Bei Kultivierung im Vollmedium teilen sich Hefezellen während der logarithmischen Wachstumsphase, ca. alle 90 min. Über die Messung der Absorption bei 600 nm kann in Flüssigkultur die Zelldichte bestimmt werden.

4.5.1 Nährmedien

Alle hier verwendeten Nährmedien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Festmedien wurde vor dem Autoklavieren Agar mit einer Konzentration von 2 % (w/v) zugesetzt.

Temperaturrempfindliche Zusätze wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugesetzt.

YPDA-Vollmedium:

Zusammensetzung	Menge
Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
Glukose	2 % (w/v)
Adeninhemisulfat	40 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

SD-Medium (minus Alanin, Leucin Tryptophan und Histidin):

Zusammensetzung	Menge
<i>Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren</i>	6,7 g
D-Sorbitol	182,2 g
Dextrose	20 g
DO Supplement (ohne Ade, His, Leu, Trp)	0,6 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

Zur Vermehrung nicht transformierter Hefen wurde ein YPDA-Vollmedium verwendet. Durch diese optimalen Wachstumsbedingungen wurden hohe Zelldichten erreicht. Plasmidtransformierte Hefen wurden zur Selektion in SD-Medium kultiviert. Hier wurde den Zellen Glukose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt, außerdem bestimmte Aminosäuren, Salze, Stickstoff, Phosphor und Spurenelemente. Minimalmedien eignen sich zur Selektion auf spezielle auxotrophe Eigenschaften der Hefezellen. Der hier verwendete Stamm AH109 ist defizient für die Synthese von Alanin, Leucin Tryptophan und Histidin. Die Hefen können auf Minimalmedium nur dann wachsen, wenn diese Aminosäuren und dieses Nukleotid zugesetzt werden.

4.5.2 Lagerung und Kultivierung von Hefezellen

Der Hefestamm AH109 wurde dauerhaft als Glycerinstock (in YPDA-Medium, 25 % Glycerin (v/v), -80°C) bzw. für bis zu drei Wochen auf YPDA- oder SD-Platten ausgestrichen und bei 4°C gelagert. Der verwendete Hefestamm AH109 wurde bei 30°C kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden 50 ml YPDA-Medium mit mehreren, 2 bis 3 mm großen Kolonien inokuliert und die Vorkultur bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt ($OD_{600} > 1,5$; 250 Upm; über Nacht). Für die Hauptkultur wurden 300 ml YPDA durch Zugabe einer entsprechenden Menge Vorkultur auf eine $OD_{600} = 0,2$ bis 0,3

gebracht und 4 bis 5 Stunden bei 250 Upm bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$ geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei RT und $1000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit jeweils 50 ml $H_2O_{bidest.}$ und einmal mit LiSorb gewaschen (Zentrifugation unter denselben Bedingungen wie zuvor). Das Pellet wurde in 1,5 ml LiSorb aufgenommen und bis zur Transformation bei RT gelagert.

LiSorb:

Zusammensetzung	Menge
Lithiumacetat	100 mM
EDTA, pH 7,5	1 mM
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
Sorbitol	0,8 M
$H_2O_{bidest.}$	ad 1 l

eingestellt auf pH 7,5

4.5.3 Transformation von Hefezellen

Für die Transformation der Plasmide in die Hefezellen wurden 100 μ l der kompetenten Hefezellen mit 1 μ g der jeweiligen Plasmide und 10 μ l Träger-DNS gemischt und gevortext. Nach Zugabe von 900 μ l PEG/LiAc wurde für 30 min bei 30 °C geschüttelt, anschließend 100 μ l DMSO zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Transformation erfolgte darauf per Hitzeschock bei 42 °C für 15 min, wobei alle 5 min durch vorsichtiges Schnippen gemischt wurde. Der Ansatz wurde 3 min auf Eis inkubiert und dann bei RT 1 min bei $6.000 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μ l TE-Puffer resuspendiert, Selektionsplatten ausgestrichen und für 4 bis 6 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.5.4 Yeast-Two-Hybrid

Die Entwicklung des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems [Fields, S. et al.; 1989] basiert auf der Entdeckung des modularen Aufbaus eukaryontischer Transkriptionsfaktoren [Sadowski, I. et al.; 1988].

Das hier verwendete Matchmaker™ GAL4 *Two-Hybrid*-System (Clontech, USA) basiert darauf, dass die Interaktion zweier Proteine anhand der β -Galaktosidase-Aktivität überprüft wird. Hierzu wurde ein Filterabzug der Hefezellen erstellt. Die am Filter haftenden Zellen wurden durch mehrfaches Eintauchen in flüssigen Stickstoff lysiert. Der Filterabzug wurde in einer vorbereiteten Petrischale auf einem mit frisch hergestellter Färbelösung (X-Gal) befeuchteten Filterpapier positioniert und anschließend in der

verschlossenen Petrischale bei 30°C inkubiert. Im Anschluss daran konnte die tiefblaue Färbung der Positivkontrollen, aufgrund der Expression des Gal4-Transkriptionsfaktors beobachtet werden. Hierbei wurde das von Matchmaker™ GAL4 *Two-Hybrid*-System vorgegeben Protokoll eingehalten.

4.6. Spezielle Methoden zur Kultivierung von embryonalen Mausstammzellen

4.6.1. Allgemeines zu embryonalen Mausstammzellen

Beim Umgang mit ES-Zellen ist besondere Vorsicht geboten. Damit diese Zellen zur Herstellung einer *knockout*-Maus verwendet werden können (d. h. keimbahnfähig bleiben), ist eine Ausdifferenzierung der Zellen unbedingt zu vermeiden. Dies setzt die Kultivierung dieser ES-Zellen in speziell beschichteten 6 cm und 10 cm Petrischalen bzw. 96-, 48-, 24-, 12- und 6-*well* Platten (NUNC) voraus. Ebenso müssen zusätzliche *Feeder Cells* mit kultiviert werden.

4.6.2 Zellkultur embryonaler Mausstammzellen

Die hier verwendete noch unveröffentlichte F1-Zelllinie IDG3.2 (zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Kühn; Helmholtz-Zentrum München) hat den Vorteil einer erhöhten Keimbahnfähigkeit im Vergleich mit anderen ES-Zelllinien.

Hierbei ist zu beachten, dass die F1-Zellen aus einer F1-Blastozyste (C57BL6 x 129S6) hergestellt wurden und als solche diploid sind. Für die Fellfarbe *Agouti* sind sie somit heterozygot und haben ein A (braun) und ein a (schwarz) Allel. Daher ist die Hälfte der Nachkommen in der Verpaarung mit C57BL6: (a/a) braun (A/a), die andere Hälfte schwarz (a/a). Somit kann anhand der Fellfarbe kein Rückschluss auf die Mutation, geschlossen und die Tiere müssen genotypisiert werden.

F1 ES Anzuchtmedium:

Zusammensetzung	Menge
Dulbecco's Modified Eagles Medium, high Glucose	500 ml
Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum	75 ml
β-Merkaptoethanol (50 mM)	1,2 ml
L-Glutamin (200 mM)	9 ml
MEM Nonessential amino acids (100x)	6 ml
LIF (10 ⁷ U/ml)	90 µl

F1 ES Waschmedium:

Zusammensetzung	Menge
Dulbecco's Modified Eagles Medium, high Glucose	500 ml
Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum	50 ml
β -Merkaptoethanol (50 mM)	1,2 ml
L-Glutamin (200 mM)	9 ml
MEM Nonessential amino acids (100x)	6 ml

F1 ES Einfriermedium:

Zusammensetzung	Menge
Anzuchtmedium	3 ml
<i>Gibco-ES FCS Fetal Calf Serum</i>	5 ml
DMSO	2 ml

4.6.3 Kultivierung von *Feeder Cells*

Die hier verwendeten EMFI (*primary **embryo fibroblasts***) *Feeder Cells* wurden freundlicherweise von der Abteilung für Vergleichende Medizin am Helmholtz-Zentrum München zur Verfügung gestellt.

4.6.4 Kultivierung und Splitten embryonalen Mausstammzellen

Die im Stickstofftank tiefgefrorenen embryonalen F1-Zellen IDG3.2 (Aliquot) werden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein *Falcon Tube* (50 ml) überführt. Hierzu wurden die aufgetauten ES-Zellen in 10 ml Waschmedium resuspendiert und bei 1200×g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, verworfen und das Zellpellet in 5 ml Anzuchtmedium resuspendiert und auf eine 6 cm Petrischale mit *Feeder Cells* gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml neues Anzuchtmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden sollten die Zellen eine homogene Form angenommen haben, kompakt sein und keine differenzierten Klone zeigen. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in der Petrischale mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und die Zellen mit 1,5 ml Trypsin/EDTA versetzt. Die Petrischale wurde dann für ca. 10 min zurück in den Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) gegeben, bis die Zellen abgelöst sind. Die abgelösten Zellen wurden dann mittels einer Pipette mehrmals auf- und abpipettiert, um eventuelle Zellklumpen aufzulösen und die Zellen zu vereinzeln. Nach Zugabe von 10 ml

Waschmedium werden die Zellen bei 1200×g für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Anzuchtmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Petrischale mit *Feeder Cells* gegeben. Hierbei wurden ca. 2×10^6 ES-Zellen ausplattiert.

4.6.5 Elektroporation von embryonalen Mausstammzellen

Die ES-Zellen wurden mit 3 ml Trypsin/EDTA versetzt und für 10 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Waschmedium wurden die Zellen mittels einer Pipette mehrmals auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde in ein *Falcon Tube* überführt und die Zellen bei 1200×g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PBS gewaschen. Aus dieser Zellsuspension wurden ein Aliquot entnommen, 1:10 verdünnt und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 7×10^6 Zellen in 800 µl PBS aufgenommen, mit 20 µg linearisiertem Vektor *Abca3-KO* versetzt, in eine Elektroporationsküvette gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser der Firma Biorad (0.30 kV, 500 µF). Die transformierten ES-Zellen wurden für 10 min bei RT belassen und dann auf mehrere 10 cm Petrischalen mit *Feeder Cells Monolayern* ausgesät. Hierbei wurden 10 ml Anzuchtmedium zugegeben und die Petrischalen anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag beginnt die Selektion der angewachsenen ES-Zellen.

4.6.6 Selektion der embryonalen Mausstammzellen

Einen Tag nach der Elektroporation wurde das Anzuchtmedium abgesaugt und gegen 10 ml Selektionsmedium ausgetauscht. Alle 2 Tage wurde das Selektionsmedium erneuert, um abgestorbene Zellen zu entfernen und für eine gleich bleibende Versorgung der verbleibenden Zellen zu sorgen. Nach 7 bis 9 Tagen hatten nur die Geneticin (G418) resistenten Klone überlebt und konnten gepickt werden.

4.6.7 Picken embryonalen Mausstammzellkolonien

Das Selektionsmedium wurde abgesaugt und gegen 10 ml PBS je 10 cm Petrischale ersetzt. Übrig gebliebene morphologisch unauffällige und nicht ausdifferenzierte ES-Zellkolonien wurden mittels einer gelben Pipettenspitze unter einem Binokular abgelöst

und in 96-*well* Platten überführt. In die Vertiefungen war bereits 30 µl Trypsin/EDTA vorgelegt worden. Anschließend wurden die 96-*well* Platten insgesamt für maximal 10 min inkubiert und die Zellen in den einzelnen Vertiefungen mittels einer Pipette auf- und abpipettiert, um sie zu vereinzeln. Diese vereinzelteten Zellen wurden dann auf neue, bereits mit *Feeder Cells Monolayern* beschickte 96-*well* Platten überführt, mit 100 µl Selektionsmedium überschichtet und im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach ca. 2 Tagen wurden die Zellen in einem angemessenen Verhältnis auf 2 frische 96-*well* Platten mit *Feeder Cells Monolayern* überführt. Hierbei war sorgfältigst darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu dicht wachsen und somit möglicherweise ausdifferenzieren. Des Weiteren sollte die Zellzahl in den einzelnen *wells* möglichst einheitlich sein, um die Handhabung zu erleichtern. Weitere 48 Stunden später wurde aus dieser Platte durch Splitten zwei gleiche Schwesterplatten angelegt. Eine dieser Platten wurden nach 2 tägiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung (z. B. Blastozysteninjektion) wie unter 4.6.8 beschrieben tiefgefroren. Die andere Platte wurde zum Zwecke der Genotypisierung auf gelatinisierte 96-*well* Platten ohne *Feeder Cells* gesplittet. Hierzu wurden 100 µl einer 0,1-prozentigen Gelatinelösung pro *well* aufgetragen und 10 min inkubiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und verworfen. Um eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen, wurden die gelatinisierten 96-*well* Platten für mindestens 72 bis 96 Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels einer Hochdurchsatzmethode (befindet sich im Patentierungsverfahren und wird daher nicht detailliert beschrieben) genotypisiert. Um diese Ergebnisse zu validieren, wurden die Klone zusätzlich mittels PCR überprüft.

4.6.8 Einfrieren und Lagerung von embryonalen Mausstammzellen

Zum Einfrieren werden je *well* 30 µl Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 10 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Nach dem Vereinzeln der Zellen werden 70 µl Anzuchtmedium zu jedem *well* gegeben und die Zellen resuspendiert. Anschließend werden 100 µl Einfriermedium, welches zuvor auf Eis gelagert wurde, zugegeben und gemischt. Im Anschluss wurde die 96-*well* Platte mit einem Deckel verschlossen und mit Parafilm umwickelt und sofort bei -20°C gelagert. Nach ca. 6 Stunden wurden die gefrorenen Platten bei -80°C gelagert. Die Zellen können so bis zu 3 Monaten bei -80°C gelagert werden.

4.6.9 Lyse von embryonalen Mausstammzellen

Lysepuffer:

Zusammensetzung	Menge
Tris-HCl	10 mM
EDTA	10 mM
NaCl	10 mM
N-Lauroyl-Sarcosin	0,5 %

Vor Gebrauch mussten 10 µl Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) zugeben werden.

4.6.10 Screening der embryonalen Mausstammzellen

Diese lysierten embryonalen Mausstammzellen wurden mit dem *peqGold Tissue DNA Mini Kit* (peqLAB) nach Angaben des Herstellers aufbereitet. Die DNA wurde in 20 µl bidestilliertem H₂O gelöst. Für die *Screen-PCR* wurden 1 µl dieser gereinigten DNA eingesetzt. Die PCR wurden mit dem Primerpaar M10f / 29r durchgeführt, welches unter 5.7 genau aufgeführt ist. Die PCR-Produkte wurden auf ein 0,7-prozentiges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

4.6.11 Kultivierung embryonaler Mausstammzellen für die Blastozysteninjektion

Um den gewünschten positiv genotypisierten ES-Zell-Klon für die Blastozysteninjektion einsetzen zu können, wurden zunächst die bei -80°C in 96-*well* Platten gelagerten Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die 96-*well* Platten bei 1000×g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und so das Einfriermedium und das darin enthaltende DMSO entfernt. Das entstandene Pellet wurde in 150 µl ES Anzuchtmedium resuspendiert und jeweils in ein *well* einer 48-*well* Platte mit *Feeder Cells Monolayern* überführt. Nach je etwa 48 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) wurden die Zellen schrittweise auf 24-, 12-, 6-*well* Platten und schließlich auf 6 cm Petrischalen mit *Feeder Cells Monolayern* expandiert. Nach der Expansion der Zellen wurden sie mit 3 ml Trypsin/EDTA versetzt und für 10 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) belassen. Anschließend wurden 3 ml Waschmedium zugegeben und die Zellsuspension in *Falcon Tube* überführt und die Zellen bei 1200×g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Anzuchtmedium resuspendiert und mit 2 ml auf Eis gekühltem Einfriermedium versetzt

und gemischt. Diese Suspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

48 Stunden vor dem Injektionstermin wurde ein Aliquot der positiven ES-Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und auf 10 cm Petrischalen mit *Feeder Cells Monolayern* überführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein *Falcon Tube* überführt und die Zellen bei $1200\times g$ für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 10 ml ES Anzuchtmedium resuspendiert und auf zwei gelatinisierten 10 cm Petrischalen gesplittet. Nach erneuten 24 Stunden wurden die Zellen 30 min vor der Blastozysteninjektion mit 3 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Diese Zellsuspension wurde in ein *Falcon Tube* überführt und bei $1200\times g$ für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS gewaschen und erneut bei $1200\times g$ für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml eisgekühltem PBS resuspendiert und bis zur Blastozysteninjektion auf Eis gelagert.

4.6.12 Implantation der embryonalen Mausstammzelle in Blastozysten

Die Blastozysteninjektion und der anschließende Transfer in zyklussynchronisierte pseudoträchtige CD-1 Weibchen wurde freundlicherweise von erfahrenen Spezialisten am Institut für Vergleichende Medizin am Helmholtz-Zentrum München durchgeführt.

4.6.13 Genotypisierung von Mäusen mittels Schwanzspitzenbiopsie

Bei der Mausschwanzspitzenbiopsie wurden ca. 5 mm der Schwanzspitze bei den Tieren entfernt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Diese Mausschwanzspitzen-Biopsie wurden mit dem *peqGold Tissue DNA Mini Kit* (peqLAB) nach Angaben des Herstellers aufbereitet. Die DNA wurde in $100\mu\text{l}$ bidestilliertem H_2O gelöst. Für die *Screen-PCR* wurden $1\mu\text{l}$ dieser gereinigten DNA eingesetzt. Die PCR wurde mit den Primerpaaren M24f / M20r durchgeführt, welche unter 5.7 genau aufgeführt sind. Die PCR-Produkte wurden auf 1-prozentigem Agarosegel aufgetragen und analysiert.

4.6.14 Embryotransfer

Nach erfolgreicher Etablierung der transgenen und *Abca3*-defizienten Mauslinie wurden die Tiere vom Helmholtz-Zentrum München in die Zentrale Versuchstierhaltung (ZVH) der

Innenstadt-Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Dr. med. vet. Scheuber per Embryotransfer transferiert. Dieser Embryotransfer wurde freundlicherweise am Institut für Vergleichende Medizin am Helmholtz-Zentrum München durchgeführt (siehe 4.6.14).

4.6.15 Maushaltung und Mauszucht

Die Haltung der Mäuse erfolgte den Kriterien der FELASA entsprechend. Die Organisation und die Überprüfung des Hygienestatus wurde von der Abteilung für vergleichende Medizin am Helmholtz-Zentrum München durchgeführt.

In den Tierställen der ZVH, welche unter der Leitung von Dr. med. vet. Scheuber stehen, wurden die Tiere ebenfalls entsprechend der Kriterien der FELASA gehalten und der Hygienestatus regelmäßig überprüft.

Die Nachkommen der erstellten *Abca3*-defizienten Mauslinie wurde weiter mit C57BL/6-Tieren verpaart.

4.7 Organentnahme bei der Maus

Töten zu wissenschaftlichen Zwecken ist anzeigepflichtig nach § 10 und § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TSchG). Des Weiteren gelten §§ 8b, 9 Abs. 2 Satz 2 Tierschutzgesetz (TSchG). Diese Anzeigen erfolgten über das Helmholtz-Zentrum München und später über die ZVH.

4.7.1 Kaiserschnitt (*Caesarean Section*)

Schon im Römischen Reich gab es die Methode des Kaiserschnittes (*Caesarean Section*), welcher an einer im Sterben liegenden oder soeben verstorbenen Schwangeren vorgenommen wurde, um möglicherweise das Kind zu retten oder es zumindest getrennt beerdigen zu können. Bei einem Kaiserschnitt wird der Fötus auf operativem Wege aus dem Bauch der Mutter geholt.

Das trächtige Muttertier wurde nach 18,5 Tagen Tragezeit durch eine mechanisch herbeigeführte Fraktur des *Dens axis* (Genickbruch) und einer Streckbewegung, welche eine Durchtrennung des Rückenmarks (*Medulla oblongata*) zur Folge hat, schmerzlos und schnell getötet. Im Anschluss wurde das Muttertier fixiert, der Bauchraum vorsichtig eröffnet und die Föten aus dem Uterus (Gebärmutter) entnommen. Die Tiere wurden so

schnell wie möglich vom Amnion (Schafshaut) befreit und die Amnionflüssigkeit (Fruchtwasser) abgetupft. Der an dem Fötus über die Nabelschnur verbundene Dottersack wurde an der Nabelschnur möglichst nahe am Fötus durchtrennt und entfernt. Die so gewonnenen Tiere wurden vorsichtig auf eine Wärmeplatte gelegt, um ein Auskühlen zu verhindern. Sogleich nach der Entfernung des Amnions machten die Tiere erste Atembewegungen.

4.7.2 Entnahme der Organe

Bei der Entnahme der Organe und im Speziellen bei der Entnahme der Lunge ist die Unversehrtheit der Organe wichtig. Die Föten wurden ca. 45 min nach Geburt durch Dekapitierung getötet. Sofort danach wurde der Thorax und das Abdomen eröffnet. Die Lunge wurde vorsichtig aus dem Thorax entfernt und durch Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung von groben losen Partikeln und Blut befreit. Ebenso wurden Leber, Milz und Gehirn entnommen. Für die Elektronenmikroskopie wurden die Organe in 6,25-prozentiger Glutaraldehydlösung gelagert und wie unter 4.8 beschrieben weiter behandelt. Für die Immunhistochemie wurden die Organe in einer 4-prozentiger Formalinlösung gegeben und wie unter 4.9 beschrieben weiter bearbeitet. Für die *Lipidomics* Analysen wurden die Lungen direkt nach der Entnahme bei -20 °C eingefroren. Diese Proben wurden, an das unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Schmitz stehende Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin im Universitätsklinikum Regensburg verschickt.

4.7.3 Durchführen der Schreyer-Schwimmprobe

Bei der Schreyer-Schwimmprobe handelt es sich um eine von Johannes Schreyer im Jahre 1681 [Schreyer, J.1690] beschriebene Methode, bei der ein Teil der Lunge entnommen wird und in ein mit Wasser gefülltes Gefäß gegeben wird. Hat der hierbei obduzierte Säugling vor seinem Tod geatmet, schwimmt die gasgefüllte Lunge bzw. Probe oben. Eine atelektatische Lunge oder Proben derselben, resultierend aus einer Totgeburt, sinken dagegen zu Boden. Diese Methode wurde verwendet um zu prüfen, ob die Mauslunge mit Luft gefüllt war. Hierbei wurden die entnommenen Lungen kurz in isotonischer NaCl-Lösung von Blut gereinigt und in ein neues, ebenfalls mit isotonischer NaCl-Lösung gefülltes Gefäß, gegeben.

4.7.4 Milchentnahme bei Mäusen

Für die Milchgewinnung bei Mäusen wurden laktierende Tiere zu den Zeitpunkten Tag 10 nach dem Wurf und Tag 15 nach dem Wurf benutzt. Hierbei wurden die Mütter 3 Stunden vor Milchentnahme von ihren Jungtieren getrennt. Kurz vor der Milchentnahme wurde die Milchejektion mit 200 µl 10 IE/ml Oxytozin 10 (Hexal, Holzkirchen) stimuliert. Oxytocin bewirkt eine Kontraktion der Gebärmuttermuskulatur (*Myometrium*) und löst damit die Wehen während der Geburt aus. Darüber hinaus verursacht es die Milchejektion durch Stimulation der so genannten myoepithelialen Zellen der Milchdrüse.

Die Milch wurde dann mittels eines Verlängerungsstücks mit Luer-Loc und einem PE-Schlauch, der mit einer Vakuum Gas Pumpe PM20 (VWR International GmbH, Darmstadt) verbunden ist von den einzelnen Zitzen abgenommen. Diese so gewonnene Milch wurde sofort in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei -20°C gelagert.

Diese Proben wurden zum Universitätsklinikum Regensburg, an das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Schmitz, verschickt. Dort fand die *Lipidomics* Analyse der Milch mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektroskopie (siehe 4.12), wie unter 4.12.1 beschrieben statt.

4.8 Elektronenmikroskopie

Im Jahre 1931 wurde das erste Transmissionselektronenmikroskop von Ernst Ruska und Max Knoll entwickelt [Knoll, M. et al.; 1931]. Ein Elektronenmikroskop ist ein Mikroskop, das das Innere oder die Oberfläche einer Probe mit Elektronen abbilden kann.

Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben und die Auflösung eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (derzeit etwa 0,1 nm) erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop (etwa 200 nm). Während bei optischen Mikroskopen die Auflösung tatsächlich nahezu die von der Lichtwellenlänge gesetzte physikalische Grenze erreicht, verschlechtern bei einem Elektronenmikroskop die Aberrationen der elektronenoptischen Bauteile die nutzbare Auflösung um etwa zwei Größenordnungen gegenüber der Elektronenwellenlänge, die für 100 keV Elektronenenergie etwa 0,0037 nm beträgt.

4.8.1 Fixierung der Organe in Glutaraldehyd

Die Proben wurden in 6,25-prozentiger Glutaraldehydlösung fixiert und anschließend in Sörensen-Phosphatpuffer für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Saccharose-Puffer gewaschen und mittels Osmiumanfärbung fixiert. Die Gewebeproben wurden danach in Aceton dehydriert und in Epon® Epoxidharz eingebettet.

Sörensen-Phosphatpuffer:

Zusammensetzung	Menge
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	9,08 g
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	11,88 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

pH 6,8 einstellen

Saccharose-Puffer:

Zusammensetzung	Menge
Saccharose	109,5 g
Tris-HCl	10 ml (1 M, pH 7,4)
Triton X-100	10 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

4.8.2 Anfertigung der Epoxidharz-Schnitte

Die Mikrotomschnitte wurden mit einem Mikrotom CM1510-1 (Leica, Wetzlar) hergestellt. Die dünnen Schnitte wurden mittels Azur Methylenblau gefärbt und ultradünne Schnitte wurden zusätzlich mit Uranylacetat und Bleicitrat.

4.8.3 Bilddarstellung der Elektronenmikroskopie

Die Übersichtsbilder wurden mit einem Philips420-Elektronenmikroskop (Philips) im Pathologischem Institut der LMU in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr Müller-Höcker aufgenommen.

4.9 Immunhistochemie

Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Damit kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und auch, in welchem

Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Beispielsweise färben Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern lokalisiert sind, nur den Zellkern an, membranständige Proteine Teile der Zellmembran usw. Für Antikörperfärbungen wird fixiertes Gewebe verwendet, das entweder aus vollständigen Tieren oder aus Gewebeschnitten bestehen kann (z. B. Mikrotomschnitte von Organen der Maus oder des Menschen).

4.9.1 Fixierung der Organe in Formaldehydlösung (Formalin)

Die Proben wurden in eine 4-prozentige Formaldehydlösung gegeben. Nach der Fixierung wurden die Proben in warmem Paraffin eingebettet. Nach dem Abkühlen können die Proben geschnitten werden.

4.9.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Mittels eines Mikrotom CM1510-1 (Leica) wurden die dünnen Paraffinschnitte angefertigt und konnten dann gefärbt werden.

4.9.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (nach Mayer)

Die H&E-Färbung ist die meist genutzte Färbemethode für histologisches Material. Die H&E-Färbung ist eine Übersichtsfärbung. Die Hämatoxylin-Farbstoffe werden mit dreiwertigen Metallsalzen gemischt und bilden die so genannten Hämatoxylinlacke, die selektiv zur Anfärbung der Kerne (DNA) genutzt werden. Hämatoxylin oder besser Hämatein bildet mit den jeweiligen Metallionen der Alaune (Aluminium, Eisen oder Chrom) Komplexverbindungen, also Chelatverbindungen, die im sauren Milieu verwendet werden und die die charakteristische blaue Farbe durch Spülen in Leitungswasser, dem so genannten Bläuen, annehmen. Dieser Schritt fixiert zugleich die Farbe an den Zielstrukturen. Die heute verwendete kombinierte Anwendung von Hämatoxylin und einem Metallsalz geht auf eine Arbeit von Böhmer im Jahre 1865 zurück. Mayer führte seine Formulierung 1903 ein [Mayer, P.1903].

Die Paraffinschnitte wurden zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 min in 100 % Isopropanol (zwei Mal), 90 %, 70 %, 50 % Isopropanol) und dann mit bidestilliertem Wasser hydratisiert. Die eigentliche Färbung der Zellkerne erfolgte mit *Mayer's hemalum solution* (Merck) für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte zweimal kurz in bidestilliertes Wasser gestellt. Die Färbung des Zytoplasmas erfolgte mit Eosin in einer aufsteigenden Alkoholreihe

(50 % Ethanol, 70 % Ethanol + NH₄OH (8 Tropfen auf 200 ml), 70 % Ethanol und 95 % Ethanol, 0,3 % Eosin in 95 % Ethanol, 95 % Ethanol). Die Gewebeschnitte wurden für das Einbetten mit dem Roti[®]-Histokit (Roth) durch zweimalige 5 minütige Behandlung mit Rotihistol-Lösung vorbereitet. Im Hellfeld eines Axiovert 200 Mikroskops (Carl Zeiss) wurden die Schnitte untersucht und die Bilder mit der Digitalkamera AxioCam HRc (Carl Zeiss) dokumentiert.

4.9.4 ABCA3-Antikörperfärbung

Die Schnitte wurden je zwei Mal für 15 min in der Mikrowelle (750W) mit *Antigen Retrieval Solution High pH* (DakoCytomation) gekocht. Anschließend wurden die Proben zwei Mal für je 5 min mit Tris-Puffer pH 7,5 gespült. Um endogene Peroxidase und andere störende Proteine zu blocken wurden *Non-serum Blocker* (DakoCytomation) verwendet. Danach wurde der primäre Antikörper WRAB-ABCA3 (SevenHills Bioreagents) in einer Verdünnung von 1:1500 für 60 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Nach einem sich anschließenden Waschschrift mit Tris-Puffer pH 7,5 wurden die Schnitte mit *Super Picture HRP-Conjugate* (Zymed) zur Detektion überschichtet, wobei 3-Aminoethylcarbazol als Chromogen benutzt wurde.

4.9.5 TTF-1-Antikörperfärbung

Die Schnitte wurden je zwei Mal für 15 min in der Mikrowelle (750 W) mit *Target Retrieval Solution* (DakoCytomation) gekocht. Anschließend wurden die Proben zwei Mal für je 5 min mit Tris-Puffer pH 7,5 gespült. Um endogene Peroxidase und andere störende Proteine zu blocken wurden *Non-serum Blocker* (DakoCytomation) verwendet. Danach wurde der primäre Antikörper TTF1 (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:100 für 60 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Nach dem folgenden Waschschrift mit Tris-Puffer pH 7,5 wurden die Schnitte mit *M.O.M. Peroxidase Kit* (Vector) zur Detektion überschichtet, wobei *DAB⁺* (Dako Cytomation) als Chromogen benutzt wurde. Zur Gegenfärbung *Hämatoxylin Gill's Formula* (Vector) verwendet.

4.9.6 ABCA3-/TTF1-Cofärbung

Die Schnitte wurden je zwei Mal für 15 min in der Mikrowelle (750W) mit Target Retrieval Solution (DakoCytomation) gekocht. Anschließend wurden die Proben zwei Mal für je 5 min mit Tris-Puffer pH 7,5 gespült. Um endogene Peroxidase und andere störende

Proteine zu blocken wurden *Non-serum Blocker* (DakoCytomation) verwendet. Danach wurde der primäre Antikörper TTF1 (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:100 für 60 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Nach dem folgenden Waschschrift mit Tris-Puffer pH 7,5 wurden die Schnitte mit *M.O.M. Peroxidase Kit* (Vector) zur Detektion überschichtet, wobei *DAB⁺* (DakoCytomation) als Chromogen benutzt wurde.

Danach wurde der zweite primäre Antikörper WRAB-ABCA3 (SevenHills Bioreagents) in einer Verdünnung von 1:1500 für 60 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Erneut wurde dann mit Tris-Puffer pH 7,5 gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper *ZyMax Goat Anti-rabbit IgG AP-Conjugate* (Fa. Zymed Cat 81-6122) für 30 min bei RT inkubiert. Als Chromogen wurde *New Fuchsin* (DakoCytomation) und zur Gegenfärbung wurde *Hämatoxylin Gill's Formula* (Vector) verwendet.

4.9.7 hrGFP-Mikroskopie

Die hrGFP Untersuchungen fanden am Institut für Pathologie im Helmholtz-Zentrum München an einem Axiovert 200 (Carl Zeiss) statt. Das grundlegende Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, durch die unterschiedlichen Wellenlängen des Anregungs- und Emissionslichts eine Trennung des Lichts zu erreichen. Ein Anregungsfilter reduziert das von einer Quecksilberdampfampe erzeugte Licht auf eine geringe Spektrumsbreite. Der dichromatische Strahlteiler (*Beamsplitter*) ist ein spezieller Filter, welcher das vom Objekt zurückgestrahlte längerwelligere Licht passieren lässt, die Anregungswellenlängen jedoch spiegelt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronenanordnungen hat jedes Fluorochrom ein charakteristisches Spektrum seiner Anregung und Emission. Durch den Emissionsfilter gelangen nur ausgewählte Emissionswellenlängen zum Auge oder zur CCD-Kamera. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzpräparate wurden durch die Bildarstellungssoftware AxioVision der Firma Zeiss optimiert. Die verwendeten Filter und die CCD-Kamera sind im Materialteil unter 5.10 aufgeführt. Die Beurteilung der Proben übernahm freundlicherweise PD Dr. Leticia Quintanilla-Martinez-Fend (Institut für Pathologie im Helmholtz-Zentrum München).

4.10 Antikörpergenerierung gegen ABCA3

4.10.1 Epitopsuche

Die Basis für die Epitopsuche bot die unter 2.1.3 beschriebene Strukturvorhersage von ABCA3. Es wurden drei Bereiche, so genannte Epitope (Antigene Determinante) ausgesucht, die ins Zytoplasma ragen und somit später als Antigen gut zu erkennen sind. Hierbei wurde ein Bereich 40 bis 240 Aminosäuren, sowie ein Bereich von 740 bis 920 und 1597 bis 1704 Aminosäuren nach dem Start ausgewählt. Auf DNA-Ebene wurde zu diesen Epitopen Primer abgeleitet, welche unter 5.7 (Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionskonstrukte) beschrieben sind. Der *Forward* Primer hat zusätzlich eine *EcoRI*-Schnittstelle am 5'-Ende und der *Reverse*-Primer hat zusätzlich eine *XbaI*-Schnittstelle gefolgt von einem Stop-Codon.

4.10.2 Expression der rekombinanten Epitope

Nach den positiven Kontrollverdauen wurden die Plasmide in *E. coli* M15[pRep4] transformiert (siehe 4.3.5) und auf Agarplatten ausgestrichen (Antibiotikum). Es wurden je 5 Klone gepickt und ein Testexpressionen durchgeführt, um für jedes der drei Konstrukte einen für die Überexpression der Proteine geeigneten Klon auszusuchen. Für die Überexpression wurde je 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C, 250 Upm auf einem Schüttler Excella E24 (New Brunswick Scientific) für ca. 3 Stunden inkubiert. Zum Selektionsdruck wurde dem Medium Ampicillin beigegeben. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Überexpression mittels Zugabe von 0,25 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abgeerntet, indem sie mit 6000×g bei 4°C für 15 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in Auftragspuffer resuspendiert. Die Zellen in dieser Zellsuspension wurden mittels eines Ultraschallstabes (Sonifier W-2500) aufgeschlossen.

Um die Expressionsstärke abschätzen zu können, wurden Proben vor der Induktion (0 h), sowie 1 h, 2 h und 3 h nach der Induktion der Kultur abgenommen. Hierbei wurde die Zellmenge mittels OD₆₀₀-Messung entsprechend angepasst. Als Referenz diente die 0 h-Probe, von der 1 ml entnommen wurde. Diese Proben wurden vor der Aufreinigung der Fusionsproteine als Kontrolle der Expression auf ein SDS-Gel wie unter 4.11.6 beschrieben aufgetragen. Hierzu wurde die Gesamtproteinmenge mittels *Bradford* wie unter 4.11.1 beschrieben bestimmt und 10 µg Gesamtprotein eingesetzt.

4.10.3 Reinigung mittels Maltose bindendem Protein (MBP)

Die Affinitätschromatografie (*immobilized metal chelate affinity chromatography*, IMAC) ist ein chromatografisches Trennverfahren, um verschiedene Stoffe aus einer Lösung zu separieren. Voraussetzung dafür ist, dass ein geeigneter Ligand (Bindungspartner) zu dem interessierenden Protein zur Verfügung steht [Porath, J. et al.; 1975]. Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Affinitäts-*Tags*, die an das Zielprotein angehängt werden können und mittels derer es möglich ist, diese Proteine zu reinigen.

Der größte Affinitäts-*Tag* ist das Maltose bindene Protein (MBP) mit ca. 40 kDa. Es wurde erstmals 1988 beschrieben [di, Guan C. et al.; 1988; Maina, C. V. et al.; 1988]. Die MBP-Fusionsproteine binden an eine Amylose-Matrix und werden anschließend mit 10 mM Maltose-Lösung eluiert. Der MBP-*Tag* erhöht zusätzlich die Löslichkeit des Zielproteins. Die Reinigung sollte mittels einer FPLC-Anlage (*fast protein liquid chromatography*) ÄKTAprime® (GE Healthcare) durchgeführt werden. [Terpe, K.2003]. Die Anlage ermöglicht die automatisierte, programmgesteuerte Chromatografie. Die Proteinprobe wurde auf eine Auftragsschleife gegeben und mittels einer Pumpe, der ein Programmierer zur Einstellung der gewünschten Pufferverhältnisse am Mischer vorgeschaltet ist, mit konstanter Flussrate (Probenauftrag 0,75 bis 1 ml/min, Elution 0,75 ml/min) über die Säule geführt. Die Anwesenheit von Proteinen wird durch einen UV-Licht-Detektor am hinteren Auslass nachgewiesen. Diese Informationen werden mit Hilfe eines Programms auf dem Computer grafisch als Chromatogramm ausgegeben. Die fraktionierten Proben werden in einem automatischen Fraktionssammler aufgefangen. Es wurde eine 25 ml Amylose Säule (XK16/20, Amersham Bioscience) verwendet, die mit etwa 20 ml Bettvolumen Amylose (New England Biolabs) luftblasenfrei gefüllt wurde. Nach Äquilibrierung der Säule mit Auftragspuffer wurde diese mit den Proteinextrakten beladen. Nachdem der Großteil der zellulären Proteine die Gelmatrix passiert hatte, wurden unspezifisch gebundene Proteine mittels eines Waschschriffs entfernt. Anschließend wurden die gebundenen Fusionsproteine mit Elutionspuffer eluiert und im Fraktionssammler aufgefangen. Die Abspaltung des MBP-*Tags* sollte mittels Faktor Xa an einer zwischen Zielprotein und MBP eingebrachten spezifischen Schnittstelle durchgeführt werden.

4.11 Analytik von Proteinen

4.11.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford

Das Prinzip der Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford [Bradford, M. M. 1976] beruht auf der Komplexbildung von *Coomassie Brilliant Blue G-250* mit den hauptsächlich basischen und aromatischen Aminosäureresten von Proteinen. Die Proteinbestimmung erfolgte mithilfe des Protein Assay der Firma Bio-Rad, der nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Bei jeder Bestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA als Standardprotein (0,125 mg/ml bis 2,0 mg/ml) erstellt. Aliquots der Proteinproben wurden 1:5 und 1:10 verdünnt (je ein Doppelansatz), mit 5 µl Protein Assay Reagent versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im FLUOstar Optima Multi4 Plattenreader (BMG Labtech) bei 595 nm gemessen. Als Referenzwert diente das Reagenz ohne Probe.

4.11.2 Organhomogenisierung und Isolierung von Membranproteinen

Die Organhomogenisierung und Isolierung von Membranproteinen erfolgt nach Angaben des Herstellers mit folgendem Isolierungssystem: *Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem)

4.11.3 Ankonzentrieren von Proteinlösungen

Zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration wurden, abhängig vom Ausgangsvolumen, die im Folgenden aufgelisteten Konzentratoren der Firma Millipore oder Vivascience verwendet. Die Wahl der Membran war abhängig von der gewünschten Ausschlussgrenze. Die Zentrifugationsbedingungen wurden nach Empfehlungen der Hersteller gewählt.

Konzentrator	Max. Probenvol.	Ausschlussgrenze	Hersteller
Amicon Centriplus RC/YM	15 ml	10.000 MWCO	Millipore Corporation, Bedford, USA
VIVASPIN	20 ml	30.000 MWCO	Vivascience AG, Hannover
VIVASPIN	20 ml	3.000 MWCO	Vivascience AG, Hannover

4.11.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Geleelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das SDS-PAGE System der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

Laufpuffer:

Zusammensetzung	Menge
NuPAGE® 20x <i>MOPS SDS Running Buffer</i>	50 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

Probenansatz für NuPAGE® BisTris Gel 4-12 %, 10-well Gel mit 20 µl Geltaschenvolumen:

Zusammensetzung	Menge
Probe (bis zu 10 µg Gesamtproteinmenge)	13 µl
NuPAGE® 4x <i>LDS Sample Buffer</i>	5 µl
NuPAGE® 10x <i>Reducing Agent</i>	2 µl

Nach Zugabe des *Reducing Agents* wurden die Proben für 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer befüllt und in die innere Kammer zusätzlich 500 µl NuPAGE® *Antioxidant Reagent* zugegeben. Als Protein-Molekulargewichtsstandard wurde der Marker SeeBlue oder PAGERuler™ verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200 V konstant und 60 bis 120 mA pro Gel für 55 bis 90 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die getrennten Proteine entweder im Gel nach Angaben des Herstellers (BIO-RAD, München) mit *Coomassie Brilliant Blue* (BIO-RAD, München) für 30 min gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 4.11.5).

4.11.5 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Für die *Western Blot*-Analysen wurde ebenfalls das NuPAGE® System der Firma Invitrogen, Karlsruhe, verwendet.

Transferpuffer:

Zusammensetzung	Menge
NuPAGE® 20x <i>Transfer Buffer</i>	50 ml
Methanol	200 ml
NuPAGE® <i>Antioxidant Reagent</i>	500 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

TBS-Puffer:

Zusammensetzung	Menge
Tris	20 mM
NaCl	140 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

pH 7,5 einstellen

TBS-T-Puffer:

Zusammensetzung	Menge
Tris	20 mM
NaCl	140 mM
Tween20	5 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

pH 7,5 einstellen

Blockpuffer (10 %):

Zusammensetzung	Menge
Milchpulver	10 g
TBS-Puffer	ad 100 ml

Inkubationspuffer (5 %):

Zusammensetzung	Menge
Milchpulver	5 g
TBS-T-Puffer	ad 100 ml

AP-Detektionspuffer:

Zusammensetzung	Menge
TrisHCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml

pH 9,5 einstellen

CDP-Star:

Zusammensetzung	Menge
CDP-Star™ 25 mM (1:100 verdünnt)	50 µl
AP-Detektionspuffer	ad 5 ml

Nach der Auftrennung der Proteine in der PAGE wurden diese elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Proteintransfer wurde für 90 min bei konstanten 30 V und 90 bis 125 mA pro Gel in einem *X Cell II Blot Modul* (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die beladene Membran kurz mit TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für mindestens 1 h oder auch über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal je 5 min mit TBS Puffer gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in wenigen ml Inkubationspuffer, benetzt. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T Puffer entfernt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären, ebenfalls in wenigen ml Inkubationspuffer verdünnten Antikörper. Nach erneuten Waschschritten mit TBS-T Puffer wurde die Membran für 5 min in den AP-Detektionspuffer gegeben, um die Membran in ein alkalisches Milieu zu überführen. Der alkalische pH-Wert ist für die Substratumsetzung durch die AP notwendig. Die chemilumineszente Verbindung CDP-StarTM (Roche) wird durch die Anwesenheit von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und zerfällt. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 466 nm emittiert. Diese Reaktion wurde ausgenutzt, um Röntgenfilme (WICORex®B+, Typon Medical Systems AG), die mit der Membran in einer Röntgenkassette (HypercassetteTM, Amersham) inkubiert wurden, zu belichten. Die Filme wurden anschließend entwickelt und fixiert. Die verwendeten Antikörper und Nachweisreagenzien sind unter 5.9 aufgeführt.

4.12 Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektroskopie

Sir Joseph John Thomson, der Entdecker des Elektrons, war der Erste, der ein Massenspektrometer baute (Parabolspektrograph). Das erste für kernphysikalische Untersuchungen brauchbare Massenspektrometer wurde von Francis William Aston mit Unterstützung von J. J. Thomson gebaut [Aston, F. W. et al.; 1919]. Um 1920 entwickelte Arthur Jeffrey Dempster ein verbessertes Massenspektrometer und verwendete zur Ionisierung beschleunigte Elektronen aus einem Glühdraht. Diese Methode findet noch heute in vielen Massenspektrometern ihre Anwendung [Mattauch, J. et al.; 1934].

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um ein Verfahren zum Messen des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses m/q (Einheit: $[m/q]=Th$ (Thomson)) von Teilchen. Bei diesem Verfahren macht man sich zu Nutze, dass man aus bekannter Ladung q die Masse m der Teilchen ermitteln kann. Darüber hinaus können Aussagen über das Vorhandensein und die Menge von Teilchen mit bekanntem Masse-zu-Ladung-Verhältnis

gemacht werden. Dieses Masse-zu-Ladung-Verhältnis wird auch oft als m/z angegeben. Typischerweise besteht ein Massenspektrometer (MS) aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird das zu analysierende Material ionisiert und im angeschlossenen Analysator nach ihrer Masse, genauer: nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z getrennt. Als Detektor dient meistens ein Fotomultiplier, ein Faraday-Auffänger oder ein Sekundärelektronenvervielfacher. Um die Fragmentierungen zu untersuchen bzw. die Selektivität und Sensitivität einer Quantifizierungsmethode entscheidend zu verbessern, ist es möglich, mehrere Analysatoren hintereinander zu koppeln, wobei viele Kombinationen der Analysatoren denkbar sind, allgemein spricht man von Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS). Weit verbreitet sind so genannte Triplequads (QqQ). Hierfür wird zwischen zwei Analysatoren (erster und dritter Quadrupol) eine so genannte Kollisionszelle - am zweiten Quadrupol - eingebaut. Das Nachweisverfahren erfolgt nun in drei Schritten: Durch Elektrospray-Ionisation (ESI) [Fenn, J. B. et al.; 1989] wird ein Pseudomolekül-Ion produziert, dieses wird im ersten Analysatorquadrupol isoliert und gelangt in den zweiten Analysatorquadrupol. In diesen kann ein Stoßgas, in der Regel ist dies Stickstoff oder Argon eingespeist werden, wobei der Druck so gewählt ist, dass im Mittel ein erzeugtes Ion maximal einmal mit einem Gasmolekül kollidiert. Durch die Kollision zerfallen die Ionen sehr spezifisch zu anderen leichteren Ionen. Diese wiederum können im dritten Quadrupol „gescannt“ werden; d. h. alle Produktionen des im ersten Quadrupol isolierten Ions können ermittelt werden bzw. es kann nur ein bekanntes Fragmention beobachtet werden. Scannt man, ermittelt man die Spektralinformation und kann auf die Struktur rückschließen. Beobachtet man hingegen nur ein oder zwei Fragmentionen, ist es möglich, sehr empfindlich und selektiv zu quantifizieren (MRM: *multiple reaction monitoring*).

4.12.1 Lipidomics Analysen der Phospholipide in Lunge und Milch

Die *Lipidomics* Analysen wurden freundlicherweise von dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Schmitz am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

Die Phospholipide werden mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) quantifiziert (siehe 4.12). Hierzu wurde ein *Triple Quadrupol* Massenspektrometer (Quattro Ultima, Micromass) verwendet. Die Elektrospray-Ionisationsquelle wurde für alle Messungen im so genannten *positive ion mode* betrieben [Brugger, B. et al.; 1997; Liebisch, G. et al.; 2004; Liebisch, G. et al.; 2006].

Für die Vermessung von Phosphatidyl-Cholin werden die Proben in einem Gemisch aus Methanol/Chloroform 3:1 (v/v) und 10 mM Ammoniumacetat gelöst. Anschließend wurden diese Proben mit einem HTS PAL Autosampler (Zwingen) und einer Zweiwegepumpe Agilent 1100 (Agilent Technologies) direkt in das Tandem-Massenspektrometer eingespritzt. Die Messung erfolgt in einem so genannten *precursor ion scan* mit m/z 184. Phosphatidyl-Glycerin wurde mittels eines *neutral loss scan* mit m/z 189 von Adukt-Ionen $[M+NH_4]^+$ gemessen [Schwudke, D. et al.; 2007]. Freies Cholesterin (FC) und Cholesterinester (CE) wurden mit einem so genannten *fragment ion scan* mit m/z 369 gemessen, zuvor wurde Cholesterin mittels Acetylchlorid selektiv derivatisiert [Liebisch, G. et al.; 2006]. Die Korrektur der Isotopenüberlappung der einzelnen Lipid-Spezies erfolgte mittels zuvor erstellter Excel-Makros [Liebisch, G. et al.; 2004].

4.12.2 Statistische Datenanalyse der *Lipidomics* Analysen

Die statistische Datenanalyse wurde mithilfe von Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft®) durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Linien wurden durch den *Students t-test* evaluiert. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4.13 Lungenfunktion von Wildtyp versus heterozygoten Tieren

Die Lungenfunktion sowie die Spontanatmung wurden freundlicherweise von erfahrenen Spezialisten am Helmholtz-Zentrum München im Institut für Inhalationsbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Holger Schulz durchgeführt.

4.13.1 Ganzkörperplethysmografie

Um die Spontanatmung zu untersuchen, wurde ein handelsübliches System von Buxco® Electronics (Sharon, Connecticut, USA) eingesetzt. Hierbei erfolgte die Beurteilung der Atmungsmuster in sich frei bewegenden Tieren nach dem Prinzip von Drorbaugh und Fenn vorgenommen [Drorbaugh, J. E. et al.; 1955]. (Hierbei wird mit einem Fluss-Sensor der Luftstrom beim Atmen gemessen.) Dieses System misst die Druckänderungen, die sich durch Ein- und Ausatmung, Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen während der Atmung ergeben (siehe Abb. 37). Durch die Kalibrierung des Systems lassen sich Druckschwankungen in Fluß- und Volumensignale umwandeln, sodass die automatische Datenanalyse die Messwerte Tidalvolumen (TV), Atemfrequenz (f),

Atemminutenvolumen (MV) und Ein- und Ausatmungszeiten (T_i , T_e) sowie maximale inspiratorische und expiratorische Flussraten (PIF, PEF) liefert. Diese generierten Daten werden alle 10 sec als Durchschnittswerte gespeichert. Um tageszeitliche Schwankungen bei der Atmung zu vermeiden, wurden die Messungen immer zwischen 8 und 11 Uhr durchgeführt. Die Messungen wurden in einem ruhigen Raum, bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Vor jeder Messung wurde das System kalibriert. Hierbei wurden Luftdruck, Temperatur und Luftfeuchtigkeit berücksichtigt, um eine genaue Berechnung der Flussraten und des Volumens zu garantieren.

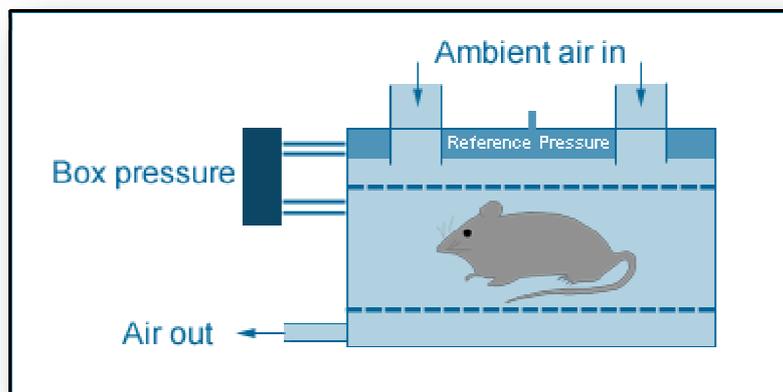


Abbildung 37: Darstellung des Ganzkörperplethysmografen; <http://www.mouseclinic.de>

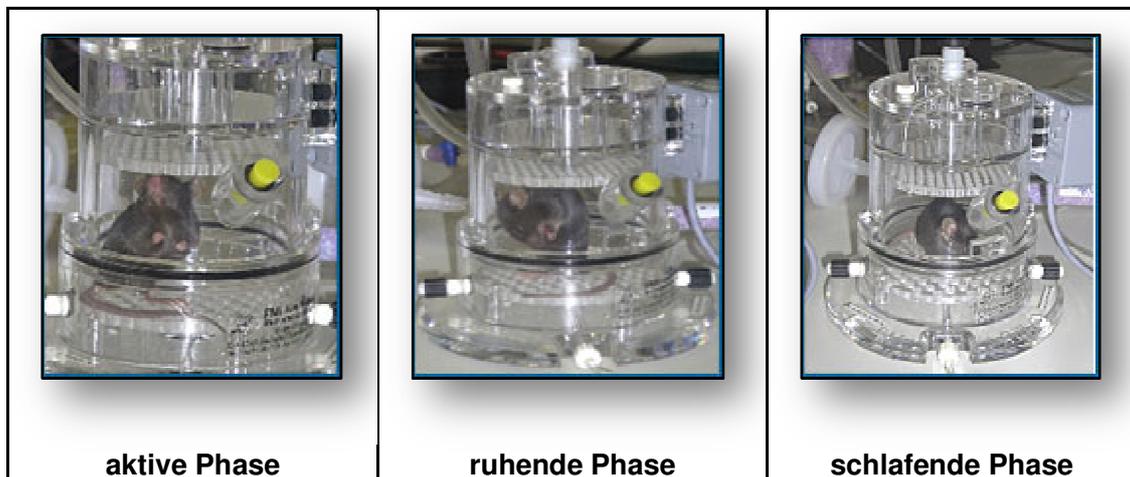


Abbildung 38: Mäuse im Ganzkörperplethysmografen in den typischen Verhaltensphasen; <http://www.mouseclinic.de>

Die vierzigminütige Datenaufzeichnung wurde direkt nach dem Einsetzen der Tiere in die Kammer, begonnen. Während der Messung durchliefen die Mäuse die typischen Verhaltensphasen (siehe Abb. 39). Zu Beginn des Versuchs waren die Tiere gestresst,

somit war die Atemfrequenz zu Beginn maximal. Normalerweise beruhigten sich die Tiere nach 5 min, ihre Atemfrequenz reduzierte sich leicht und die Tiere begannen die Kammer zu erkunden. Teilweise begannen die Tiere sich zu putzen – aktive Phase (siehe Abb. 38). Später wurde die Aktivität mehr und mehr durch ruhende Phasen (siehe Abb. 38) unterbrochen. Einige der Tiere schliefen sogar ein – schlafende Phase (siehe Abb. 38). Hieraus resultierte eine weitere Absenkung der Atemfrequenz. Für jedes Individuum wurde ein eigenes Atemwegs-Histogramm erstellt. In diesem Histogramm wurde die Atmung bezüglich der oben erwähnten Parameter während der aktiven, ruhenden und schlafenden Phase analysiert. Zusätzlich zu den direkt abgegriffen Parametern wurden die mittlere inspiratorische und expiratorische Flussrate (MEF, MIF) berechnet. Die Berechnung dieser Parameter erfolgte unabhängig von den Quotienten des Ruheatemzugvolumens und des entsprechenden Zeitintervalls. Die relative Dauer der Inspiration (T_i/TT) entspricht dem Quotienten aus Inspirationszeit und Gesamtdauer eines Atemzyklus. Das spezifische Ruheatemzugvolumen und spezifische Minutenvolumen (sTV , sMV) wurden berechnet, indem die absoluten Werte auf das Körpergewicht der Tiere bezogen wurden. Darüber hinaus wurde der Mittelwert der Atemfrequenz ($mean_f$) aus den Werten, die während der vierzigminütigen Messperiode gesammelt wurden, bestimmt. Dieser wurde provisorisch berechnet, um zu beurteilen, ob die Dauer der Ruhephasen und die Dauer der aktiven Phasen bei allen Mausstämmen ähnlich ist.

4.13.2 Lungenfunktion von narkotisierten Tieren

Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist in Abbildung 39 dargestellt. Die narkotisierte und intubierte Maus wurde hierbei an ein speziell angefertigtes computergesteuertes Kolben-Servo-Beatmungsgerät angeschlossen. Dem Prinzip nach ist dieses Beatmungsgerät eine miniaturisierte Version des Beatmungsgerätes, welches für die Lungenfunktionsstudien bei Hunden eingesetzt wird [Schulz, H. et al.; 1992; Schulz, H. et al.; 1999].

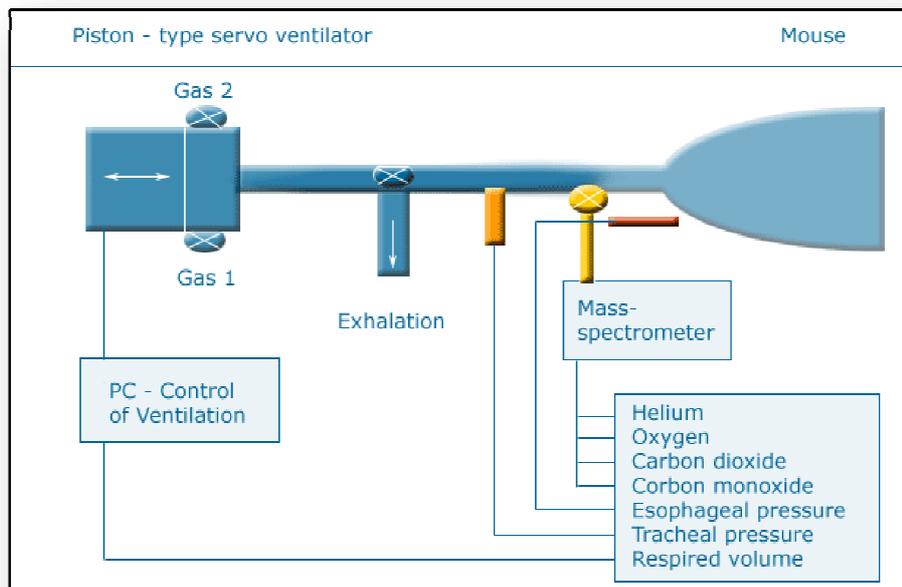


Abbildung 39: Darstellung des Versuchsaufbaus für die in vivo Lungenfunktionsanalyse; <http://www.mouseclinic.de>

Die Beatmungsmaschine ermöglicht eine Positivdruckbeatmung mit vorgegebenen Atemzugvolumina und Flussraten, um reproduzierbare Atemmanöver für eine Lungenfunktionstestung auszuführen. Um die Testbedingungen der individuellen Lungengröße anzupassen, kann man mit diesem System unabhängig Änderungen in den Einstellungen des Maximalvolumens, des in- und expiratorischen Flusses, sowie der endinspiratorischen und endexpiratorischen Pausen vornehmen. Darüber hinaus hat der Benutzer bei diesem Gerät die Wahl zwischen freiem oder konstantem Atemfluss. Um zwischen verschiedenen Gaszusammensetzungen schnell wechseln zu können, z. B. für Eigenatmungsmanöver, sind vier Ventile an den Kolben angeschlossen. Das apparative Totraumvolumen wurde hierbei minimal gehalten (70 μ l einschließlich der Trachealkanüle). An das System sind zwei Druckwandler (EPE-L21, Entran Sensoren GmbH) angeschlossen: Einer befindet sich in der Nähe der Öffnung der Trachealkanüle und ermöglicht eine durchgehende Messung des Atemwegsöffnungsdrucks (P_{ao}). Der zweite Druckwandler befindet sich am Ende eines dünnen, mit Wasser gefüllten Schlauches, der an die ösophageale Kanüle angeschlossen ist. Hiermit lässt sich der ösophageale Druck messen. Die Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, markiertem Kohlenstoffmonoxid ($C^{18}O$) und Helium werden mit einem modifizierten Massenspektrometer M3 (Varian MAT) vermessen. Die Gasproben werden hierbei nahe am Ende des trachealen Tubus gemessen. Hierfür werden sie nah am Ende des trachealen Schlauches durch eine 1 m lange Einlasskapillare mit einem inneren Durchmesser von 165 μ m und mit einer Rate von 0,1 ml pro Sekunde abgenommen. Die

Probenrate, als auch die Zeitverzögerung und die 5-95 % Reaktionszeit des Massenspektrometers wurden jeweils vor und nach jeder Lungenfunktionsmessung kontrolliert. Die Werte für die Zeitverzögerung lagen an den verschiedenen Tagen zwischen 230 ms und 250 ms. Die Zeitverzögerung für die 5-95 % Reaktionszeit des Massenspektrometers lag bei 35 bis 40 ms. Volumen-, Druck- und Gaskonzentrations-signale wurden verstärkt und mit einem Mehrkanal-Rekorder (RS 3800) aufgenommen. Während der Lungenfunktionsmessungen wurden die gewünschten Signale außerdem digitalisiert und auf einem PC gespeichert. Um Echtzeit und korrigierte Volumendaten zu erhalten, wurden vor der Datenanalyse die vom Massenspektrometer generierten Signale bezüglich der Zeitverzögerung korrigiert. Darüber hinaus wurde das Volumensignal des Ventilators bezüglich der Saugrate des Massenspektrometers korrigiert.

4.13.3 Statistische Datenanalyse der Lungenfunktion

Die statistische Datenanalyse wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen Statistik Paket (Statgraphics®, Statistical Graphics Corporation) durchgeführt. Unterschiede zwischen den Linien wurden durch den *Students t-test* evaluiert. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

4.14 Strukturvorhersage

4.14.1 Vorhersagesoftware

Bei der Strukturvorhersage für den humanen ABCA3 wurde das auf der Homepage des Institut Pasteur <http://bioweb.pasteur.fr> bereitgestellten Programm *TopPred* verwendet [von Heijne, G.1992]. Dieses Programm generiert aus der Proteinsequenz ein Hydrophobizitäts-Profil anhand der Aminosäuresequenz sowie dem Hydrophobizitäts-Index der Peptide.

4.14.2 Clone Manager Professional Suite

Die Erstellung der Vektoren sowie die Planung der Konstrukte erfolgte an einem PC mit Hilfe des des Programms *Clone Manager 7.11 Professional Suite* der Firma Sci Ed Central, USA. Die Primer wurden mit dem im *Clone Manager* integrierten Programm

Primer Designer 5.11 abgeleitet. Die Protein-Alignments wurden mittels des ebenfalls im *Clone Manager* integrierten Programms *Align Plus 5.11* durchgeführt und beruhen auf der BLOSUM-Matrix (**BLO**cks **SU**bstitution-**M**atrix).

	A	C	D	E	F	G	H
A	4	0	2	1	2	0	2
C	0	9	-3	-4	-2	-3	-3
D	-2	-3	6	2	-1	-1	-1
E	-1	-4	2	5	-3	-2	0
F	-2	-2	-3	-3	6	-3	-1
G	0	-3	-1	-2	-3	3	-1
H	-2	-3	-1	0	-3	-1	4

BLOSUM 62

Abbildung 40: **Back-up-Tabelle zur Bewertung der Blosum-Matrix.**

Für die hier verwendete Blosum62-Matrix werden 62 % homologe identische Sequenzen verglichen. Aus diesem Vergleich geht eine Back-up-Tabelle (Abb. 40) hervor, die die Übergangswahrscheinlichkeit der Aminosäuren in andere Aminosäuren (z. B. Alanin zu Tyrosin) dieser Sequenzen darstellt. Diese Tabelle liegt der Bewertung aller Blosum62-Matrixen zu Grunde und wird einmal erstellt. Sie muss vor dem Ausfüllen der eigentlichen Blosum-Matrix bekannt sein. In der Blosum-Matrix können verschiedene Proteine verglichen werden. Hierbei werden die Übergangswahrscheinlichkeiten der Back-up-Tabelle verwendet, um die Matrix zu füllen. Anhand des Scores, den die Matrix ausgibt, kann die evolutionäre Entfernung der eingesetzten Sequenzen abgeschätzt werden.

5 Material

5.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *p.a.*-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Bio-Rad (München), Biozym Diagnostik (Oldendorf), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Oxoid LTD. (Basingstoke, England), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Taufkirchen), Pharmacia (Freiburg).

Sonstige Chemikalien:

- SeaKem LE Agarose Cambex BioScience, Rockland, ME, USA
- Ethidiumbromid Dropper Bottle 0,625 mg/ml Olerup SSP AB, Stockholm, Schweden
- Gel Loading Solution Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
- Roti[®]-Histokitt, Roth, Karlsruhe

5.2 Enzyme

Sämtliche Restriktionsenzyme sowie dazugehörige Puffer wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen. Weitere Enzyme und Nukleotide wie nachfolgend aufgelistet:

- Phusion High-Fidelity DNA polymerase (GC Buffer) Finnzymes, Finnland
- DNA Polymerization Mix (20 mM/dNTP) Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
- T4 DNA Ligase Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- CIP New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
- DNase 1 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
- Lysozym Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

5.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) bezogen. Weitere Puffer und Lösungen wie nachfolgend aufgelistet:

TBE-Puffer:

Zusammensetzung	Menge
Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

pH 8,0 einstellen

TBS-Puffer:

Zusammensetzung	Menge
Tris	20 mM
NaCl	140 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

pH 7,5 einstellen

TE-Puffer:

Zusammensetzung	Menge
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

pH 8,0 einstellen

Die allgemein gebräuchlichen Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{bidest.}, welches von der Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU bezogen wurde, hergestellt. Anwendungsspezifische Puffer werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

Medien für Zellkultur:

- *F12 Ham Nutrient Mixture + GlutaMAXTMI*, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Taufkirchen
- *Dulbeccos modified Eagle's medium*, Gibco BRL Div. of Invitrogen, USA
- *Dulbeccos modified Eagles Medium, high Glucose*, Gibco BRL Div. of Invitrogen, USA
- *Yeast Nitrogen Base without amino acids*, Biocompare, USA

5.4 Synthese- und Nachweis-Kits

- Kits zur Synthese von Nukleinsäuren, Sequenzier-Kits
- First Strand cDNA Synthesis Kit Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
- Expand High Fidelity PCR System Roche GmbH, Mannheim
- Expand Long Template PCR System Roche GmbH, Mannheim
- Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems, Warrington, USA
- BIO-RAD Protein Assay BIO-RAD, München
- Nachweis-Kit für Mycoplasmen in kultivierten Zellen: Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit Minerva Biolabs GmbH, Berlin

5.5 Längen- und Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards:

- 1 kb DNA Längenstandard Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- DNA Molecular Weight Marker V Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- FastRuler™ Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Protein-Molekulargewichtsstandards:

- SeeBlue Standard Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- MultiMark Standard (1x) Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- PageRuler™ Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

5.6 Verwendete Organismen

Bakterien:

- *E. coli* DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15). (Stratagene, La Jolla, USA)
- *E. coli* M15 [pREP4]: *nal^s*, *str^s*, *rif^s*, *thi⁻*, *lac⁻*, *ara⁺*, *gal⁺*, *mtl⁻*, *f⁻*, *recA⁺*, *uvr⁺*, *lon⁺*. (Qiagen, Hilden)
- *E. coli* XL1blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]. (Stratagene, La Jolla, USA)

Hefen:

- *Saccharomyces cerevisiae* AH109: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*, *MEL1*. (Clontech, USA)

Eukaryontische Zellen und Zelllinien:

- A549: ATCC[®] Nummer: CCL-185[™]
- MLE15: ATCC[®] Nummer: CRL-1428[™]
- MLE12: ATCC[®] Nummer: CRL-2110[™]

5.7 Oligonukleotide

T_m gibt die in der jeweiligen PCR verwendete *Annealing*-Temperatur an.

Oligonukleotide zur Erstellung des KO:

Primernamen	Sequenz 5' – 3'	T_m
pBlue_Dt-A_f	TA GCTAGCT TAGAACTACGATCCAGACATG	73,7 °C
pBlue_Dt-A_r	TAG GCTAGCCGCGACCGAACA ACTCCGCCG	73,2 °C
pcDNA3.1+Exo_f	GCTAGCTGATCAGGTACCGCGG CCTGCT	71,6 °C
pcDNA3.1+Exo_r	CTCGAGTGATCATCGCGA GCGGCCGCG	70,9 °C

Rot kennzeichnet, die eingeführte Schnittstelle im Primer.

Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionskonstrukte:

Primername	Sequenz 5' – 3'	T _m
pM-A40-240-f	ATGAATTCATCTGGCTCCGCTTGAAG	70,1 °C
pM-A40-240-r	TATCTAGATCACACCGTCAGTCTCTGGAA	69,0 °C
pM-A740-920-f	ATGAATTCGAGCTGCAGTGCTGCGGG	71,2 °C
pM-A740-920-r	TATCTAGATCACACCGCTGTATGCGGCCTT	70,4 °C
pM-A1597-1704-f	ATGAATTCAGCCCCAGCACCTCAGG	69,4 °C
pM-A1597-1704-r	TATCTAGATCATCGCCCTCCTCTGCGGT	73,2 °C

Rot kennzeichnet, die eingeführte Schnittstelle im Primer; Grün kennzeichnet, ein eingeführtes Stop-Codon.

Oligonukleotide für die Herstellung der SUMO-Konstrukte:

Primername	Sequenz 5' – 3'	T _m
S-I f	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	69,4 °C
S-I r	TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	71,0 °C
S-II r	TAGGATCCAGCGTCATGTGATAGCCGG	69,5 °C
S-III f	ATCATATGCTGCAGTGCTGCGGGTCTCTC	69,5 °C
S-III r	TAGGATCCGCAAAGAGACCTTCAAACCTG	66,7 °C
S-IV f	ATCATATGCACTGCAACCCGGAAGACATC	66,8 °C

Rot kennzeichnet die eingeführte Schnittstelle im Primer; hierbei ist zu beachten, dass für den Primer S-II f der Primer S-I f und für den Primer S-I r der Primer S-IV r verwendet wurde.

Oligonukleotide für Screening:

Primername	Sequenz 5' – 3'	T _m
M10f	TACCTGCCTCTGTCTCCACCTCTCAAG	70,9 °C
M20r	CTGGTTGACACGGCAACTGTTGTGAC	69,4 °C
M24f	CTCTAAGGGCGTGTTTCAGGTTTCAGGG	71,3 °C
M29r	TGTCCTGTGCCCTTGGAAAGTCAGTAG	70,6 °C
GFP-f	GCAAGCAGATCCTGAAGAAC	59,4 °C
GFP-r	TCCTCCACGTAGGTCTTCTC	61,4 °C
WT-KO-1f	TCTGTTTCGCAGCAGCCTAAGTC	62,1 °C
WT-KO-2r	GCAGGATCAATGGAAGGCTACC	62,7 °C
GAPDH-f	CTCACTGGCATGGCCTCC	56,1 °C
GAPDH-r	CAGTGTAGCCCAAGATGCCCT	57,8 °C
ABCA3-E6/E7-f	CGAGGACTACATTTCGCTATGAC	56,3 °C
ABCA3-E6/E7-r	TGTAAGTGAAGCGCAGGTG	55,2 °C
ABCA3-E7/E8-f	TCATCACCTGATGGCGGTGAAC	58,5 °C
ABCA3-E7/E8-r	TCAGCATGAGCAGCAGAGGAAG	59,1 °C
mSry_f	TGGGACTGGTGACAATTGTC	57,3 °C
mSry_r	GAGTACAGGTGTGCAGCTCT	59,4 °C
mIL3_f	GGGACTCCAAGCTTCAATCA	57,3 °C
mIL3_r	TGGAGGAGGAAGAAAAGCAA	55,3 °C

5.8 Vektoren und Plasmide

- pIRES-hrGFP-2a (Stratagene, La Jolla, USA)
- pBluescript II SK(+) DT-A1 (Stratagene, La Jolla, USA)
- pMAL-c2X (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)
- pcDNA2 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- pcDNA3 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- pGADT7 (Clontech, USA)
- pGBKT7 (Clontech, USA)

5.9 Antikörper, sekundäre Antikörper, Nachweisreagenzien

Primäre Antikörper:

- WRAB-ABCA3 IgG; *Polyclonal Antibody, Rabbit* (SevenHills Bioreagents, USA)

Sekundäre Antikörper und Nachweisreagenzien:

- Anti-Mouse IgG AP-Conjugate (1:7500) Promega Corporation, Madison, USA
- Anti-Rabbit IgG AP-Conjugate (1:7500) Promega Corporation Madison, USA
- CDP-*Star*TM Boehringer Mannheim

5.10 Spezielle Geräte und Materialien

- Thermocycler Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg
- PAGE-Apparatur XCell SureLockTM Mini Cell, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena
- Objektive Plan NEOFLUAR 100x / 1,3 Oil; Carl Zeiss, Jena
- LD ACHROPLAN 63x / 0,75 Korr P2; Carl Zeiss, Jena
- LD A-Plan 40x / 0,50 Ph2; Carl Zeiss, Jena
- Kamera / Bildarstellungssoftware AxioCam MRm / Axiovision Software, Carl Zeiss, Jena

- F31-005, D 548/10, 565 DCLP, D 630/60, Carl Zeiss, Jena
- F41-028, HQ 500/20, Q 515 LP, HQ 535/30, Carl Zeiss, Jena
- Ultraschallstab Sonifier W-2500, Branson, Danbury, USA
- FLUOstar Optima Platten-Multifunktionsreader, BMG Labtech, Offenburg
- Spektrophotometer Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
- Mikrotom CM1510-1, Leica, Wetzlar
- Rundschüttler Excella E24, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
- Vakuum Gas Pumpe PM20, VWR International GmbH, Darmstadt
- *Triple Quadrupole* Massenspektrometer, Quattro Ultima, Micromass, Manchester, UK

Membranen und Blottingpapier:

Die Nitrocellulosemembran Optitran BA-S85 für den Proteintransfer und das Blot-Filterpapier wurden von der Firma Schleicher & Schuell GmbH (Dassel) bezogen.

Affinitäts-Säulen und Matrices:

Reinigung von Plasmiden und PCR-Produkten

- QIAGEN Plasmid Mini Kit QIAGEN, Hilden
- QIAGEN Plasmid Midi Kit QIAGEN, Hilden
- QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN, Hilden
- RNeasy Kit QIAGEN, Hilden
- Blood & Tissue Kit QIAGEN, Hilden
- ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit Calbiochem, Darmstadt
- Amicon Centriplus RC/YM, Millipore Corporation, Bedford, USA
- Vivaspin, Vivascience AG, Hannover

Abkürzungen

ABC-Transporter	ATP-bindende Kasette Transporter (<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette transporter)
AB	Antibiotikum
AS	Aminosäure
Amp ⁿ	Ampicillin (n=μg/mL Endkonzentration)
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATCC	Stammsammlung (<u>a</u> merican <u>t</u> ype <u>c</u> ulture <u>c</u> ollection)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AP	alkalische Phosphatase
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
bp	Basenpaare
CIP	alkalische Phosphatase (<u>c</u> alf <u>i</u> ntestine <u>p</u> hosphatase)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanidin-5'-triphosphat
dITP	2'-Desoxyinosidin-5'-triphosphat
dNTP's	2'-Desoxynukleoside-5'-triphosphate
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
Da	Dalton (Masseneinheit: 1 u ≈ 1,660 538 782 10 ⁻²⁷ kg)
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DNase	Desoxyribonuklease

dsDNA	Doppelsträngige DNA (<u>d</u> ouble <u>s</u> trand)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (<u>s</u> ingle <u>s</u> trand)
E18,5	Tag 18,5 der Embryonalentwicklung
<i>E.-coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylend <u>d</u> iamin <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>T</u> ags
FCS	Fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alve <u>s</u> erum)
h	Stunde(n) (<u>h</u> our)
HEPES	N-2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl <u>p</u> iperazin-N'-2- <u>e</u> thansulfon <u>s</u> äure
IPTG	<u>I</u> sopropyl-1- <u>t</u> hio-(β)-D- <u>G</u> alactopyranosid
Kan ⁿ	Kanamycin (n= μ g/mL Endkonzentration)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton (siehe Da)
L	Liter
LB-Medium	<u>L</u> ysogeny <u>b</u> roth ist eine komplexe Nährlösung
LIF	<u>L</u> eukaemia <u>I</u> nhibitory <u>F</u> actor

M	molar ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
MCS	Multipler Klonierungsbereich (<u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
miRNA	Mikro-RNA
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<u>m</u> olecular <u>w</u> eight)
NBD	<u>n</u> ukleotid <u>b</u> indenden <u>D</u> omäne
OD _v	optische Dichte bei v (nm)
ORF	offener Leserahmen (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
ori	Replikationsursprung (<u>o</u> ri <u>g</u> in of replication)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PEI	Polyethylenimin
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
sec	Sekunde(n)
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering RNA

ssDNA	einzelsträngige (<u>s</u> ingle- <u>s</u> tranded) DNA
T _{Hyb}	Hybridisierungstemperatur
T _m	Schmelztemperatur (<i>annealing temperature</i>)
TMD	T rans m embran- D omäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Ocetylphenolpoly(etylenglykolether) _n
U	Enzymeinheit (<u>u</u> nit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
ZVH	Zentraler Versuchstierhaltung

Literaturverzeichnis

1. **Adachi, H.; Hayashi, H.; Sato, H.; Dempo, K.; and Akino, T.** Characterization of phospholipids accumulated in pulmonary-surfactant compartments of rats intratracheally exposed to silica. *Biochem.J.* 262[3], 781-786. 15-9-1989.
2. **Albrecht, C. and Viturro, E.** The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch.* 453[5], 581-589. 2007.
3. **Anjard, C. and Loomis, W. F.** Evolutionary analyses of ABC transporters of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot.Cell* 1[4], 643-652. 2002.
4. **Annilo, T.; Chen, Z. Q.; Shulenin, S.; and Dean, M.** Evolutionary analysis of a cluster of ATP-binding cassette (ABC) genes. *Mamm.Genome* 14[1], 7-20. 2003.
5. **Armand, M.; Hamosh, M.; Mehta, N. R.; Angelus, P. A.; Philpott, J. R.; Henderson, T. R.; Dwyer, N. K.; Lairon, D.; and Hamosh, P.** Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant. *Pediatr.Res.* 40[3], 429-437. 1996.
6. **Artus, J. C.; Llory, J.; Bonnet, H.; and Lesbros, D.** [Pulmonary surfactants. Generalities]. *Ann.Anesthesiol.Fr.* 16 Spec No 2-3, 5-10. 1975.
7. **Aston, F. W. and Fowler, R. H.** *Phil.Mag.* 38, p. 709. 1919.
8. **Austin, C. P.; Battey, J. F.; Bradley, A.; Bucan, M.; Capecchi, M.; Collins, F. S.; Dove, W. F.; Duyk, G.; Dymecki, S.; Eppig, J. T.; Grieder, F. B.; Heintz, N.; Hicks, G.; Insel, T. R.; Joyner, A.; Koller, B. H.; Lloyd, K. C.; Magnuson, T.; Moore, M. W.; Nagy, A.; Pollock, J. D.; Roses, A. D.; Sands, A. T.; Seed, B.; Skarnes, W. C.; Snoddy, J.; Soriano, P.; Stewart, D. J.; Stewart, F.; Stillman, B.; Varmus, H.; Varticovski, L.; Verma, I. M.; Vogt, T. F.; von, Melchner H.; Witkowski, J.; Woychik, R. P.; Wurst, W.; Yancopoulos, G. D.; Young, S. G.; and Zambrowicz, B.** The knockout mouse project. *Nat.Genet.* 36[9], 921-924. 2004.
9. **Balling, R.** ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 2, 463-492. 2001.
10. **Baltimore, D.; Huang, A. S.; and Stampfer, M.** Ribonucleic Acid Synthesis of Vesicular Stomatitis Virus, II. An RNA Polymerase in the Virion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2[66], 572-576. 1970.
11. **Ban, N.; Matsumura, Y.; Sakai, H.; Takanezawa, Y.; Sasaki, M.; Arai, H.; and Inagaki, N.** ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J.Biol.Chem.* 282[13], 9628-9634. 30-3-2007.
12. **Barabino, S. M. and Keller, W.** Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell* 99[1], 9-11. 1-10-1999.

13. **Baribault, H.; Penner, J.; Iozzo, R. V.; and Wilson-Heiner, M.** Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev.* 8[24], 2964-2973. 15-12-1994.
14. **Baron, U. and Bujard, H.** Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 327, 401-421. 2000.
15. **Beddington, R. S. and Robertson, E. J.** An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105[4], 733-737. 1989.
16. **Besnard, V.; Xu, Y.; and Whitsett, J. A.** Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293[6], L1395-L1405. 2007.
17. **Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254. 7-5-1976.
18. **Branden, C. and Tooze, J.** Introduction to Protein Structure. *Garland Publishing Inc.* 1991.
19. **Brasch, F.; Schimanski, S.; Muhlfeld, C.; Barlage, S.; Langmann, T.; Aslanidis, C.; Boettcher, A.; Dada, A.; Schroten, H.; Mildenerger, E.; Prueter, E.; Ballmann, M.; Ochs, M.; Johnen, G.; Griese, M.; and Schmitz, G.** Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 174[5], 571-580. 1-9-2006.
20. **Broccardo, C.; Luciani, M.; and Chimini, G.** The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim.Biophys.Acta* 1461[2], 395-404. 6-12-1999.
21. **Brugger, B.; Erben, G.; Sandhoff, R.; Wieland, F. T.; and Lehmann, W. D.** Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94[6], 2339-2344. 18-3-1997.
22. **Buchman, A. L.; Ament, M. E.; Sohel, M.; Dubin, M.; Jenden, D. J.; Roch, M.; Pownall, H.; Farley, W.; Awal, M.; and Ahn, C.** Choline deficiency causes reversible hepatic abnormalities in patients receiving parenteral nutrition: proof of a human choline requirement: a placebo-controlled trial. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 25[5], 260-268. 2001.
23. **Bullard, J. E. and Noguee, L. M.** Heterozygosity for ABCA3 mutations modifies the severity of lung disease associated with a surfactant protein C gene (SFTPC) mutation. *Pediatr.Res.* 62[2], 176-179. 2007.
24. **Bullard, J. E.; Wert, S. E.; and Noguee, L. M.** ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease. *Semin.Perinatol.* 30[6], 327-334. 2006.

25. **Bullard, J. E.; Wert, S. E.; Whitsett, J. A.; Dean, M.; and Noguee, L. M.** ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172[8], 1026-1031. 15-10-2005.
26. **Campbell, K. H.; McWhir, J.; Ritchie, W. A.; and Wilmut, I.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380[6569], 64-66. 7-3-1996.
27. **Capecchi, M. R.** The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5[3], 70-76. 1989.
28. **Cheong, N.; Zhang, H.; Muniswamy, M.; Zhao, M.; Yu, K.; Dodia, C.; Fisher, A. B.; Savani, R. C.; and Shuman, H.** ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. *J.Biol.Chem.* 31-5-2007.
29. **Chi, E. Y.; Lagunoff, D.; and Koehler, J. K.** Abnormally large lamellar bodies in type II pneumocytes in Chediak-Higashi syndrome in beige mice. *Lab Invest* 34[2], 166-173. 1976.
30. **Clark, J. C.; Weaver, T. E.; Iwamoto, H. S.; Ikegami, M.; Jobe, A. H.; Hull, W. M.; and Whitsett, J. A.** Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B-deficient mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 16[1], 46-52. 1997.
31. **Clark, J. C.; Wert, S. E.; Bachurski, C. J.; Stahlman, M. T.; Stripp, B. R.; Weaver, T. E.; and Whitsett, J. A.** Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92[17], 7794-7798. 15-8-1995.
32. **Clemens, E. T.; Stevens, C. E.; and Southworth, M.** Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of swine. *J.Nutr.* 105[6], 759-768. 1975.
33. **Connors, T. D.; Van Raay, T. J.; Petry, L. R.; Klinger, K. W.; Landes, G. M.; and Burn, T. C.** The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3. *Genomics* 39[2], 231-234. 15-1-1997.
34. **Couchard, M.; Polge, J.; and Bomsel, F.** [Hyaline membrane disease: diagnosis, radiologic surveillance, treatment and complications]. *Ann.Radiol.(Paris)* 17[7], 669-683. 1974.
35. **Dassa, E. and Bouige, P.** The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res.Microbiol.* 152[3-4], 211-229. 2001.
36. **Dave, V.; Childs, T.; Xu, Y.; Ikegami, M.; Besnard, V.; Maeda, Y.; Wert, S. E.; Neilson, J. R.; Crabtree, G. R.; and Whitsett, J. A.** Calcineurin/Nfat signaling is required for perinatal lung maturation and function. *J.Clin.Invest* 116[10], 2597-2609. 2006.
37. **Dean, M. and Allikmets, R.** Complete characterization of the human ABC gene family. *J.Bioenerg.Biomembr.* 33[6], 475-479. 2001a.

38. **Dean, M.; Rzhetsky, A.; and Allikmets, R.** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11[7], 1156-1166. 2001b.
39. **Deng, C. and Capecchi, M. R.** Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol.Cell Biol.* 12[8], 3365-3371. 1992.
40. **di, Guan C.; Li, P.; Riggs, P. D.; and Inouye, H.** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67[1], 21-30. 15-7-1988.
41. **Dohmen, R. J.** SUMO protein modification. *Biochim.Biophys.Acta* 1695[1-3], 113-131. 29-11-2004.
42. **Drorbaugh, J. E. and FENN, W. O.** A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16[1], 81-87. 1955.
43. **Edwards, V.; Cutz, E.; Viero, S.; Moore, A. M.; and Nogee, L.** Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency. *Ultrastruct.Pathol.* 29[6], 503-509. 2005.
44. **Eliakim, R.; Goetz, G. S.; Rubio, S.; Chailley-Heu, B.; Shao, J. S.; Ducroc, R.; and Alpers, D. H.** Isolation and characterization of surfactant-like particles in rat and human colon. *Am.J.Physiol* 272[3 Pt 1], G425-G434. 1997.
45. **Fath, M. J. and Kolter, R.** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol.Rev.* 57[4], 995-1017. 1993.
46. **Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; and Whitehouse, C. M.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246[4926], 64-71. 6-10-1989.
47. **Fields, S. and Song, O.** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340[6230], 245-246. 20-7-1989.
48. **Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; and Mello, C. C.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391[6669], 806-811. 19-2-1998.
49. **Fitzgerald, M. L.; Xavier, R.; Haley, K. J.; Welti, R.; Goss, J. L.; Brown, C. E.; Zhuang, D. Z.; Bell, S. A.; Lu, N.; McKee, M.; Seed, B.; and Freeman, M. W.** ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. *J.Lipid Res.* 48[3], 621-632. 2007.
50. **Garmany, T. H.; Moxley, M. A.; White, F. V.; Dean, M.; Hull, W. M.; Whitsett, J. A.; Nogee, L. M.; and Hamvas, A.** Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatr.Res.* 59[6], 801-805. 2006.

51. **Garmany, T. H.; Wambach, J. A.; Heins, H. B.; Watkins-Torry, J. M.; Wegner, D. J.; Bennet, K.; An, P.; Land, G.; Saugstad, O. D.; Henderson, H.; Noguee, L. M.; Cole, F. S.; and Hamvas, A.** Population and Disease-based Prevalence of the Common Mutations Associated with Surfactant Deficiency. *Pediatr.Res.* 27-2-2008.
52. **Haagsman, H. P. and van Golde, L. M.** Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu.Rev.Physiol* 53, 441-464. 1991.
53. **Haimeur, A.; Conseil, G.; Deeley, R. G.; and Cole, S. P.** The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr.Drug Metab* 5[1], 21-53. 2004.
54. **Hamosh, M.; Peterson, J. A.; Henderson, T. R.; Scallan, C. D.; Kiwan, R.; Ceriani, R. L.; Armand, M.; Mehta, N. R.; and Hamosh, P.** Protective function of human milk: the milk fat globule. *Semin.Perinatol.* 23[3], 242-249. 1999.
55. **Hasty, P.; Rivera-Perez, J.; and Bradley, A.** The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol.Cell Biol.* 12[6], 2464-2474. 1992.
56. **Hasty, P.; Rivera-Perez, J.; Chang, C.; and Bradley, A.** Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol.Cell Biol.* 11[9], 4509-4517. 1991.
57. **Hennet, T.; Hagen, F. K.; Tabak, L. A.; and Marth, J. D.** T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92[26], 12070-12074. 19-12-1995.
58. **Higgins, C. F.** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu.Rev.Cell Biol.* 8, 67-113. 1992.
59. **Higgins, C. F. and Linton, K. J.** The ATP switch model for ABC transporters. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11[10], 918-926. 2004.
60. **Holzinger, A.; Dingle, S.; Bejarano, P. A.; Miller, M. A.; Weaver, T. E.; DiLauro, R.; and Whitsett, J. A.** Monoclonal antibody to thyroid transcription factor-1: production, characterization, and usefulness in tumor diagnosis. *Hybridoma* 15[1], 49-53. 1996.
61. **Hyde, S. C.; Hartshorn, M. J.; Mimmack, M. M.; Gileadi, U.; Pearce, S. R.; Gallagher, M. P.; Gill, D. R.; Hubbard, R. E.; and Higgins, C. F.** Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-365. 1990.
62. **Jensen, R. G.; Ferris, A. M.; and Lammi-Keefe, C. J.** The composition of milk fat. *J.Dairy Sci* 74[9], 3228-3243. 1991.
63. **Joyner, A. L.** Gene Targeting: A practical approach 2nd ed. *Oxford University PressInc.* 2000.

64. **Kanai, Y. and Endou, H.** Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J.Toxicol.Sci.* 28[1], 1-17. 2003.
65. **Karjalainen, M. K.; Haataja, R.; and Hallman, M.** Haplotype analysis of ABCA3: association with respiratory distress in very premature infants. *Ann.Med.* 40[1], 56-65. 2008.
66. **Klaus M.H.; Clements J.A.; and Havel R.J.** Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 47, 1858-1859. 1961.
67. **Klugbauer, N. and Hofmann, F.** Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* 391[1-2], 61-65. 5-8-1996.
68. **Knoll, M. and Ruska, E.** Das Elektronenmikroskop. *Z.Physik* 78, 318-339. 1931.
69. **Koletzko, B. and von Harnack, G. H.** Kinderheilkunde und Jugendmedizin. *Springer Verlag* . 2004.
70. **Lambert, J. F.; Benoit, B. O.; Colvin, G. A.; Carlson, J.; Delville, Y.; and Quesenberry, P. J.** Quick sex determination of mouse fetuses. *J.Neurosci.Methods* 95[2], 127-132. 15-2-2000.
71. **Lemer, C. M.; Rooman, M. J.; and Wodak, S. J.** Protein structure prediction by threading methods: evaluation of current techniques. *Proteins* 23[3], 337-355. 1995.
72. **Lewandoski, M.** Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat.Rev.Genet.* 2[10], 743-755. 2001.
73. **Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.; and Todaro, G.** A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int.J.Cancer* 17[1], 62-70. 15-1-1976.
74. **Liebisch, G.; Binder, M.; Schifferer, R.; Langmann, T.; Schulz, B.; and Schmitz, G.** High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim.Biophys.Acta* 1761[1], 121-128. 2006.
75. **Liebisch, G.; Lieser, B.; Rathenberg, J.; Drobnik, W.; and Schmitz, G.** High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochim.Biophys.Acta* 1686[1-2], 108-117. 8-11-2004.
76. **Lin, Z.; Pearson, C.; Chinchilli, V.; Pietschmann, S. M.; Luo, J.; Pison, U.; and Floros, J.** Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS. *Clin.Genet.* 58[3], 181-191. 2000.

77. **Linton, K. J. and Higgins, C. F.** Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.* 453[5], 555-567. 2007.
78. **Lund, A. P. and Tholstrup, T.** The nutritional importance of milk phospholipids. *Mælkeritidende* 117[1], 11-16. 2004.
79. **Ma, J. and Ptashne, M.** Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55[3], 443-446. 4-11-1988.
80. **Mahajan, R.; Delphin, C.; Guan, T.; Gerace, L.; and Melchior, F.** A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88[1], 97-107. 10-1-1997.
81. **Mahmood, A.; Mahmood, S.; Schryver-Kecskemeti, K.; and Alpers, D. H.** Characterization of proteins in rat and human intestinal surfactant-like particles. *Arch.Biochem.Biophys.* 300[1], 280-286. 1993.
82. **Maina, C. V.; Riggs, P. D.; Grandea, A. G., III; Slatko, B. E.; Moran, L. S.; Tagliamonte, J. A.; McReynolds, L. A.; and Guan, C. D.** An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74[2], 365-373. 30-12-1988.
83. **Matsumura, Y.; Ban, N.; Ueda, K.; and Inagaki, N.** Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency. *J.Biol.Chem.* 281[45], 34503-34514. 10-11-2006.
84. **Matsuzaki, Y.; Besnard, V.; Clark, J. C.; Xu, Y.; Wert, S. E.; Ikegami, M.; and Whitsett, J. A.** STAT3 Regulates ABCA3 Expression and Influences Lamellar Body Formation in Alveolar Type II Cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20-12-2007.
85. **Mattauch, J. and Herzog, R.** Über einen neuen Massenspektrographen. *Z.f.Physik* 89, 786. 1934.
86. **Matunis, M. J.; Coutavas, E.; and Blobel, G.** A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J.Cell Biol.* 135[6 Pt 1], 1457-1470. 1996.
87. **Mayer, P.** Notiz über Hämatein und Hämalaun. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik* 20[409]. 1903.
88. **McClarín, J. A.; Frederick, C. A.; Wang, B. C.; Greene, P.; Boyer, H. W.; Grable, J.; and Rosenberg, J. M.** Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* 234[4783], 1526-1541. 19-12-1986.
89. **Milligan, D. W. and Ainsworth, S. B.** Animal-derived or synthetic surfactant for the treatment of neonatal respiratory distress syndrome: a review. *Acta Paediatr.Suppl* 90[436], 25-27. 2001.

90. **Molday, R. S.** ATP-binding cassette transporter ABCA4: Molecular properties and role in vision and macular degeneration. *J.Bioenerg.Biomembr.* 39[5-6], 507-517. 2007.
91. **Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; and Erlich, H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1, 263-273. 1986.
92. **Mulugeta, S.; Gray, J. M.; Notarfrancesco, K. L.; Gonzales, L. W.; Koval, M.; Feinstein, S. I.; Ballard, P. L.; Fisher, A. B.; and Shuman, H.** Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. *J.Biol.Chem.* 277[25], 22147-22155. 21-6-2002.
93. **Nagata, K.; Yamamoto, A.; Ban, N.; Tanaka, A. R.; Matsuo, M.; Kioka, N.; Inagaki, N.; and Ueda, K.** Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 324[1], 262-268. 5-11-2004.
94. **Neergard, K. von.** Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik: die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z.Gesamte.Exp.Med.* 66, 373-394. 1929.
95. **Oram, J. F. and Lawn, R. M.** ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J.Lipid Res.* 42[8], 1173-1179. 2001.
96. **Pauwels, E. K.; Erba, P.; Mariani, G.; and Gomes, C. M.** Multidrug resistance in cancer: Its mechanism and its modulation. *Drug News Perspect.* 20[6], 371-377. 2007.
97. **Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; and Belfrage, G.** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258[5536], 598-599. 18-12-1975.
98. **Possmayer, F.** A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am.Rev.Respir.Dis.* 138[4], 990-998. 1988.
99. **Rust, S.; Rosier, M.; Funke, H.; Real, J.; Amoura, Z.; Piette, J. C.; Deleuze, J. F.; Brewer, H. B.; Duverger, N.; Deneffe, P.; and Assmann, G.** Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* 22[4], 352-355. 1999.
100. **Sadowski, I.; Ma, J.; Triezenberg, S.; and Ptashne, M.** GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335[6190], 563-564. 6-10-1988.
101. **Sambrook, J. and Russell, D. W.** Molecular Cloning; A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* . 2001.

102. **Sampson, D. A.; Wang, M.; and Matunis, M. J.** The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J.Biol.Chem.* 276[24], 21664-21669. 15-6-2001.
103. **Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74[12], 5463-5467. 1977.
104. **Scherer, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Kruger, A.; Gansbacher, B.; and Plank, C.** Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 9[2], 102-109. 2002.
105. **Schreyer, J.** Erörterung und Erläuterung der Frage/ Ob es ein gewiß Zeichen/ wenn eines todten Kindes Lunge im Wasser untersincket/ daß solches in Mutter-Leibe gestorben sey? *Zeitz : Ammersbach* . 1690.
106. **Schulz, H.; Eder, G.; Heilmann, P.; Karg, E.; Meyer, T.; Schulz, A.; Ziesenis, A.; and Heyder, J.** Health effects of sulfur-related environmental air pollution. IV. Respiratory lung function. *Inhal.Toxicol.* 11[5], 423-438. 1999.
107. **Schulz, H.; Heilmann, P.; Hillebrecht, A.; Gebhart, J.; Meyer, M.; Piiper, J.; and Heyder, J.** Convective and diffusive gas transport in canine intrapulmonary airways. *J.Appl.Physiol* 72[4], 1557-1562. 1992.
108. **Schwudke, D.; Liebisch, G.; Herzog, R.; Schmitz, G.; and Shevchenko, A.** Shotgun lipidomics by tandem mass spectrometry under data-dependent acquisition control. *Methods Enzymol.* 433, 175-191. 2007.
109. **Shulenin, S.; Noguee, L. M.; Annilo, T.; Wert, S. E.; Whitsett, J. A.; and Dean, M.** ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N.Engl.J.Med.* 350[13], 1296-1303. 25-3-2004.
110. **Stahlman, M. T.; Besnard, V.; Wert, S. E.; Weaver, T. E.; Dingle, S.; Xu, Y.; von, Zychlin K.; Olson, S. J.; and Whitsett, J. A.** Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. *J.Histochem.Cytochem.* 55[1], 71-83. 2007.
111. **Stanford, W. L.; Cohn, J. B.; and Cordes, S. P.** Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat.Rev.Genet.* 2[10], 756-768. 2001.
112. **Stefkova, J.; Poledne, R.; and Hubacek, J. A.** ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res.* 53[3], 235-243. 2004.
113. **Sun, H. and Nathans, J.** Mechanistic studies of ABCR, the ABC transporter in photoreceptor outer segments responsible for autosomal recessive Stargardt disease. *J.Bioenerg.Biomembr.* 33[6], 523-530. 2001.
114. **Temin, H. M. and Mizutani, S.** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226[5252], 1211-1213. 27-6-1970.

115. **Terpe, K.** Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 60[5], 523-533. 2003.
116. **Terui, Y.; Saad, N.; Jia, S.; McKeon, F.; and Yuan, J.** Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J.Biol.Chem.* 279[27], 28257-28265. 2-7-2004.
117. **Threadgill, D. W.; Dlugosz, A. A.; Hansen, L. A.; Tennenbaum, T.; Lichti, U.; Yee, D.; LaMantia, C.; Mourton, T.; Herrup, K.; Harris, R. C.; and .** Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269[5221], 230-234. 14-7-1995.
118. **Tokieda, K.; Whitsett, J. A.; Clark, J. C.; Weaver, T. E.; Ikeda, K.; McConnell, K. B.; Jobe, A. H.; Ikegami, M.; and Iwamoto, H. S.** Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am.J.Physiol* 273[4 Pt 1], L875-L882. 1997.
119. **Ulloa-Montoya, F.; Verfaillie, C. M.; and Hu, W. S.** Culture systems for pluripotent stem cells. *J.Biosci.Bioeng.* 100[1], 12-27. 2005.
120. **von Heijne, G.** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J.Mol.Biol.* 225[2], 487-494. 20-5-1992.
121. **Wahle, E. and Kuhn, U.** The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 57, 41-71. 1997.
122. **Walker, J. E.; Runswick, M. J.; and Gay, N. J.** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1[8], 945-951. 1982.
123. **Weaver, T. E. and Conkright, J. J.** Function of surfactant proteins B and C. *Annu.Rev.Physiol* 63, 555-578. 2001.
124. **Whitsett, J. A.** Genetic disorders of surfactant homeostasis. *Paediatr.Respir.Rev.* 7 Suppl 1, S240-S242. 2006.
125. **Wilder, P. J. and Rizzino, A.** Mouse genetics in the 21st century: using gene targeting to create a cornucopia of mouse mutants possessing precise genetic modifications. *Cytotechnology* 11[2], 79-99. 1993.
126. **Wood, P. G.; Lopatko, O. V.; Orgeig, S.; Joss, J. M.; Smits, A. W.; and Daniels, C. B.** Control of pulmonary surfactant secretion: an evolutionary perspective. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 278[3], R611-R619. 2000.
127. **Wright, J. R.; Benson, B. J.; Williams, M. C.; Goerke, J.; and CLEMENTS, J. A.** Protein composition of rabbit alveolar surfactant subfractions. *Biochim.Biophys.Acta* 791[3], 320-332. 21-12-1984.

128. **Yamano, G.; Funahashi, H.; Kawanami, O.; Zhao, L. X.; Ban, N.; Uchida, Y.; Morohoshi, T.; Ogawa, J.; Shioda, S.; and Inagaki, N.** ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 508[2], 221-225. 16-11-2001.
129. **Yu, Y. and Bradley, A.** Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat.Rev.Genet.* 2[10], 780-790. 2001.
130. **Yusen, R. D.; Cohen, A. H.; and Hamvas, A.** Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159[2], 411-414. 1999.
131. **Zen, K.; Notarfrancesco, K.; Oorschot, V.; Slot, J. W.; Fisher, A. B.; and Shuman, H.** Generation and characterization of monoclonal antibodies to alveolar type II cell lamellar body membrane. *Am.J.Physiol* 275[1 Pt 1], L172-L183. 1998.
132. **Zimmer, R. and Thiele, R.** Fast protein fold recognition and accurate sequence-structure alignment. *Lecture Notes in Computer Science* [1278], 137-148. 1997.

Anhang

1.1 Alignments mit humanem ABCA3 und anderen Lipidtransportern:

ABCA4 [hs] mgfvrqigllllwknwtlrkrqkirfvvelvwplslflvliwlrnanplyshhechfpnkamps
 ABCA1 [hs] macwpqlrllllwknltfrrrqtcllleavwplfiflililsvrlsyppyeqhechfpnkamps
 ABCA3 [hs] mavlrqlallllwknvtlqkrkvlvtvlelflplllfsgiliwlr-----lkiqsenvpna

ABCA4 [hs] gmlpwlqggifcnvnnpcfqspptgespgivsnynnsilarvyrdfqellmnapesqhlgriwte
 ABCA1 [hs] gtlpwvqgiicnannpcfryptpgeapgvvgnfnksivarlfsdarrlllysqkdtsmkdmrkv
 ABCA3 [hs] tiyp---ggsiqelplfftfpppgdt-----we

ABCA4 [hs] lhilsqfmdtlrthperiagrgirirdilkdeetltlflkniglsdsvvyllinsqvrpeq-f
 ABCA1 [hs] lrtlqqi-----kksssnklqdfldvnetfsgflyhnlslpkstvdkmlradvilhkvf
 ABCA3 [hs] layipshsdaaktvtetvrrea-----lvinmrvr-----

ABCA4 [hs] ahgvpdlalkdiacseallerfiifsqrrgaktvryalcslsqgtlqwiedtlyanvdfk-lf
 ABCA1 [hs] lqgy-qlhltsl-cngskseemiqlgdqevse-----lcglpreklaaaervlrnmdilkpil
 ABCA3 [hs] --gfp-----sekdfedyi-----rydncsss-----

ABCA4 [hs] rvlptlldsrsqginlrswggilsdmspriqefihrpsmqdllwvtrplmqnggpetftklmgi
 ABCA1 [hs] rtlnstspfpskel-aeatkllhslgtagelfsmrswsdmrgevmltnvnsssstqiyqa
 ABCA3 [hs] -----v

ABCA4 [hs] lsdllcgypegggsrvlsfnwyednykaflgidstrkdpisydrtrttsfcnaliqslesnpl
 ABCA1 [hs] vsrivcghpeggglkikslnwyednykalfggngteedaetfydnsttpycndlmknlesspl
 ABCA3 [hs] laavvfehpf-----fn-----hskeplpl

ABCA4 [hs] tkiawraakpllmgkilytpdspaarilknanstfeelehvrklvkaweevgpgiwyffdnst
 ABCA1 [hs] sriiwalkpllvkgilytpdtpatrqvmaevnktfqlavfhdlegmweelspkiwtfmensq
 ABCA3 [hs] a-----vky-----hhr-----

ABCA4 [hs] qnmnirdtlgntpvkdflnrqldgeegitaeaailnflykppresqaddmanfdwrdfnirdrtl
 ABCA1 [hs] emdlvrmlldsrndhfwegqldgldwtaqdivaflakhpdevqssngsvytwreafnetnqai
 ABCA3 [hs] -----fsy-----trnymw-----

ABCA4 [hs] rlvnqyleclvldkfesyndetqltqralslleenmfwagvvpdmpwtsslpphvkykirmd
 ABCA1 [hs] rtisrfmecvnlkklepiatevwl linksmellderkfwagivftgitpgsielphhvkykirmd
 ABCA3 [hs] -----tqtgsfflketegw-----httslfp-----

ABCA4 [hs] idvvektnkikdrywdsqpradpvedfr---yiwggfaylqdmveggitrsvqaeap-----
 ABCA1 [hs] idnvertnkikdgywdpgradpvedmr---yvwggfaylqdvveqaiirvltgtekk-----
 ABCA3 [hs] -----lfpnpgpreptspdggepgyiregflavqhavdraimeyhadaatrqlfqr

ABCA4 [hs] vgiylqmpypcfvddsfmiiinrcfpifmvlawiysvsmtvksivlekelrlketlknqgvsn
 ABCA1 [hs] tgvymqmpypcyvddiflrvmsrsmplfmtlawiysvaviikgivyekearlketmrimgldn
 ABCA3 [hs] ltvtkrfpyppfiadpflvaiqyqlplllllsftyaltiaravvqekerrlkeymrmmgls

ABCA4 [hs] aviwctwflsfsimsmsiflltifim-----hgrilhysdpfilflflafstatimlcflls
 ABCA1 [hs] silwfswfisllipllvsagllvilk-----lgnllpysdpsvfvflsvfavvtilqcflis
 ABCA3 [hs] wlhwsawflflflillaasfmlllfcvkvkpnvavlsrsdpslvlafllcfaistisfsfmvs

ABCA4 [hs] tffskaslaaacsqviyftlylphilcfawqdrmtaelkkavslsppvafgfgteylvrfeegg
 ABCA1 [hs] tlfsranaaacggiiyftlylpyvlcvawqdyvgftlkifasllsppvafgfgceyfalfeegg
 ABCA3 [hs] tffskanmaafggflyfftyipyffvaprynwmtlsqklcscllsnvamamgaqligkfeakg

ABCA4 [hs] lglqwsnignsptegdefsfllsmqmmlldaavygllawylldqvfpdgygtplpwyfllqesyw
ABCA1 [hs] igvqwdnlfesvpeedgfnltsvsmmlfdtfllygvmtwyieavfpgqygiiprpyfpcpktsyw
ABCA3 [hs] mgiqwrldllspvnvdddfcfqgvlgmllldsvlyglvtwymeavfpgqfgvppqpyffimpisyw

ABCA4 [hs] lggcgstreeeralekteplteetedpehp----egihdsfferehpgwvpgvcvknlvkifep
ABCA1 [hs] fg-----esdekshpgsnqkri seicmeeepthklgvsiqnlvkvyrd
ABCA3 [hs] cg-----kpravagke----eedspe-----kalrneyfeaepedlvagikikhlskvfrv

ABCA4 [hs] cg--rpavdrlnitfyenqitaf lghngagktttl siltgllppts gtvlggrdietsldavr
ABCA1 [hs] gm--kvavdglalnfyegqitsf lghngagktttl siltglfppts gta yilgkdirsemstir
ABCA3 [hs] gnkdraavrdlnlnlyegqitvl lghngagktttl smltglfppts grayisgyeisqdmvqir

Walker A

ABCA4 [hs] qslgmcqpqhnilfhhltvaehmlfyaqlkqksqeeaqlemeamledtgl-hhkrneeaqdlsgg
ABCA1 [hs] qnlgvcpqhnlfdmltveehiwfyarlkglsekhvkaemeqmaldvglpssklksktsqslsgg
ABCA3 [hs] kslglcpqhdilfdnl tvaehlyfyaqlkgl srqkcpcevqkmlhiigl-edkwnsrsrflsgg

Signatur

ABCA4 [hs] mqrklsvaiafvgdakvvlildeptsgvdpyrrsiwdlllkyrsgrtiimsthmdeadllgdr
ABCA1 [hs] mqrklsvalafvvggskvvlildeptagvdpysrrgiwelllkyrqgrtiilsthmdeadvlgdr
ABCA3 [hs] mrrklsigiall agskvvlildeptsgmdaisrraiwdllqrqksdrtivltthfmddeadllgdr

Signatur

Walker B

ABCA4 [hs] iaiaiaqgrlycs gtpflfkn cftg glyltlvrk-mkniqsqrkgsegtcscsskgfsttcpahv
ABCA1 [hs] iaaiishgklccvgsslflknqlgtgyyltlvkkdvesslsscrnsstvsylkkedsvsqssd
ABCA3 [hs] iaimakgelqccgsslflkqkygagyhmtlvk-----ephcn-----

ABCA4 [hs] ddtltp eqvldg---dvne lmdvvlh hvpeaklve cigqelifllpnknfkh rayaslfreleat
ABCA1 [hs] aglgsdhesdtl tidvsaisnlirkhvsear lvedigheltyvlp yeaakegafvel fheidr
ABCA3 [hs] ----pe-----disql---vhhhvpnat lessagaels filpres-thr-feglfaklekk

ABCA4 [hs] ladlglssfgisdtpleeiflkvtedsdsg---plfagg---aqqkrenvnprhpc lgp-rek
ABCA1 [hs] lsdlgissygisettleeiflkvaeesgvd---aetsdgtlparrnr rafgdkqsc lrpfted
ABCA3 [hs] qkelgiasfgasittmeevflrvgklvds smdiqaiqlpa---lqyqhe-----rr

ABCA4 [hs] agqtpqdsnvcspgapaahpegqppp-epecppq lntgtqlvlqhvqallvkrfghtirshkd
ABCA1 [hs] daadpnds didpesretdlsgm-----dgkgsyqvk gwkl tqqqfvallwkrlliar srkg
ABCA3 [hs] asdwavdsnlcgamdp s---dgigalieertavklntglalhcqqfwamflkkaayswrewkm

ABCA4 [hs] fla qivlp atfvflalm lsivippfgeypaltlhpwi ygqytf fmsdep gseqftvladvlln
ABCA1 [hs] ffa qivlp avfvci alvfslivppfgkypsl elqppwmyneqytfvsn dapedtglellnaltk
ABCA3 [hs] vaaqvlvpltcvtl alainysselfd pmlrltlgeygrtvvpfsv--pgt sql-----

ABCA4 [hs] kpgfgnrclkegwlp eypc-gnstpwktpsvspnitqlf qkqkw tqvnp spscrcstrekltml
ABCA1 [hs] dpgfgtrcmegnpipdt pcqageeewttapvpqt imdlfqngnwtmqnpspacqc ssdkikkml
ABCA3 [hs] -----gqqlsehlkdalq-----

ABCA4 [hs] pe cpegagglpppqrtrst eilqldt drnisdf lvktypalirsslkskfwvneqryggisig
ABCA1 [hs] pvcppgagglpppqrkqnt adilqldtgrnisdy lvktyvqii akslknkiwvne fryggfslg
ABCA3 [hs] ---aeg-----qprevlgd l-----eefli-----frasvegggf-herclvaasfr

ABCA4 [hs] gklpvvpitgealvgflsdlgrimnvsggpitreaskeipdf lkhletednikvwfn nkgwhal
ABCA1 [hs] vsntqalpps qevndaikqmkkhklakdssadrflnslgrfmtgldtknnvkvwfn nkgwhai
ABCA3 [hs] d-----vgertv-----vnalfnqayhsp

ABCA4 [hs] vsflnvahnailraslpkdrspeeygitvisqplnltkeqlseitvlttsvdavvaicvifms
ABCA1 [hs] ssflnvinnailranlqkgenpshygitafnhplnltkqqlsevalmttsvdvlsicvifams
ABCA3 [hs] atalavvdnllfkllcgphasivvsnfpqrsalqaakdqfne-----grkgfdialnllfama

ABCA4 [hs] fvpasfvlyliqervnkskhlfqisgvspttywvtnflwdimnysvsaglvvgifigfqqkayt
ABCA1 [hs] fvpasfvvfl iqervskakhlqf isgvkpv iywlsnfvwdmcyvvpatlviififcqqksyv
ABCA3 [hs] flastfsilavseravqakhvqfvsgvhvasfwlsallwldlisflipslllllvfkafdvraft

ABCA4 [hs] spenlpalvallllygwavipmmpasflfdvpstayvalscanlfiginsaitfilelfenn
 ABCA1 [hs] sstnlplvallllygwsitplmmpasfvfkipstayvvltsvnlfigingsvatfvlftdn
 ABCA3 [hs] rdghmadtlllllygwaiiplmymnffflgaaataytrltifnilsgi----atflmv-----

 ABCA4 [hs] rttlrfnav-----lrkllivfphfclgrglidl-----alsqavtdvyarfgeeh
 ABCA1 [hs] k-lnnindi-----lksvflifphfclgrglidm-----vknqamadalerfgenr
 ABCA3 [hs] -timripavkleelsktldhvflvlpnhclgmavssfnyetryctssesaahyckkyniqy

 ABCA4 [hs] sanpfhwdl--igknlfamvvegvyflltllvqrhffls-----qwiaep-tkepiw
 ABCA1 [hs] fvsplswdl--vgrnlfamavegvvfflitvliqyrffir-----prpvna-klspnl
 ABCA3 [hs] qenfyawsapgvgrfvasmaasgcaylillflletnllqrlrgilcalrrrrtltelytrmpvl

 ABCA4 [hs] dedddvaeerqriitggnktdi---lrlheltekiyppg-tsspavdrclcvgrpgecfcglgvgng
 ABCA1 [hs] dededvrrerqriildgggqndi---leikeltekiyrr-krkpavdrclcvgippgecfcglgvgng
 ABCA3 [hs] pedqdvadertrilapspdsllhtpllikeliskvyeqrvpllavdrslavqkgecfcglgfgng
Walker A
 ABCA4 [hs] agktttfkmltgdtvtsgdatvagksiltnisevhqnmgycpqfdaidelitgrehlylarl
 ABCA1 [hs] agkssstfkmltgdtvttrgdaflnksilsnihevqnmgycpqfdaidelitgrehveffall
 ABCA3 [hs] agktttfkmltgeesltsgdafvgghrissdvqkvrqrigycpqfdalldhmtgremlvmyarl
Walker A
 ABCA4 [hs] rgvpaeeiekvanwsikslgltvyadclagtysggknkrklstaialigcplvllddepttgmddp
 ABCA1 [hs] rgvpekevgkvgewairklglvkygekyagnysggknkrklstamaliggppvvllddepttgmddp
 ABCA3 [hs] rgiperhigacventlrglllephanklvrtysggknkrklstgialigepavifldepstgmddp
Signatur Walker B
 ABCA4 [hs] qarrmlwnviviiregravvltshsmeecealctrlainvkgafrcmgtiqhlskfkfdgyiv
 ABCA1 [hs] karrflwncalsvkegrsvvltshsmeecealctrlainvngfrclgsvqhlknrfgdgyti
 ABCA3 [hs] varrlwdtvararesgkaiiitshsmeecealctrlainvqgqfklgspqhlkskfgsgyisl

 ABCA4 [hs] tmkikspkddllpdlnpveqffqgnfpgsvqrerhynmlqfqvsss--sl--arifqlllshkd
 ABCA1 [hs] vvriagsn----pdlkpvqdfqglafpgsvlkekhrnmlqyqlpsslssl--arifsilsqskk
 ABCA3 [hs] rakvqs--egqqaaleefkafvdltfpgsvledehqgmvhylpgr--dlswakvfgilekake

 ABCA4 [hs] sllieeysvtqttldqvfnfakdqtesh---dlplhpr-----aagasraqad-----
 ABCA1 [hs] rlhiedysvsqttldqvfnfakdqsdhdhklslhknqtvdvavltstflgdekvesyv
 ABCA3 [hs] kygvddysvsqislegvflsfah-----lqpp-----taegr-----

1.2 Alignments mit humanem ABCA3 und murinem ABCA3:

ABCA3 [hs] mavlrqlalllwknytlqkrkvlvtvlelflplllfsgiliwlrlkiqsenvpnatiyppggsiqe
 Abca3 [mm] mavlrqltlllwknytlkkrkvlvtvlelflplllfsgiliwlrlkiqsenvpnatvypdgsiqe

 ABCA3 [hs] lplfftfpppgdtwelayipshsdaaktvtetvrralvinmrvrvgfpsekdfedyirydnccss
 Abca3 [mm] lplffsfpppggtwelayvpshsdaartitetvkrrefmikmrvhgfssekdfedyirydnhsss

 ABCA3 [hs] vlaavvfehpfnhskepllavkyhlrfsytrrnymwtqtgsfflketegwhttslfplfpnpg
 Abca3 [mm] vlaavvfehsfnhsqdppllavkyhlrfsytrrnymwtqtgniflketegwhttslfplfpnpg

 ABCA3 [hs] preptspdggepyiregflavqhavdraimeyhadaatrqlfqrllvtikrfpyppfiadpfl
 Abca3 [mm] prepspdggepyiregflamqhavdkaimryhantsaqqflqklmvitkrfpfpyisdpfl

 ABCA3 [hs] iaikyqlplllmsftytsltiiravvqekerrlkeymrmnglsswlhwsawflffflfliaa
 Abca3 [mm] vaiqyqlpllllmsftytalrtiaravvqekerrlkeymrmnglnswlhwsawflmffflfliv

 ABCA3 [hs] sfmtllfcvkvkpnvavlsrdspslvlafllcfaistisfsfmvstffskanmaaafggflyff
 Abca3 [mm] sfmtllfcvkvkdiavlsnsdpslvlafllcfaissisfsfmvstffskaniaaavggflyff

ABCA3 [hs] tyipyffvaprynwmtlsqklcscllsnvamamgaqligkfeakgmgigwrldllspvnvdddffc
 Abca3 [mm] tytpyffvaprynwmtlsqklcscllsnvamamgaqligkfeakgtgigwrldllnspvnvddnffc

ABCA3 [hs] fgqvlgmllldslyglvtwymavfpgqfgvppqwyffimpsywgcgpravagkeeedsdpek
 Abca3 [mm] fgqvlgmllldsalyglvtwyvavfpgqfgvppqwhfflmpsywgcgnprtvggkeeedgsdpek

ABCA3 [hs] alrneyfeaepedlvagikikhlskvfrvgnkdraavrldlnlnlyegqitvlghngagktttl
 Abca3 [mm] alrneyfeaepedlvagikikhlskvfvgnkdkmgirdltnlnlyegqitvlghngagktttm
 Walker A

ABCA3 [hs] smltglfpptsgrayisgyeisqdmvqirkslglcpqhdlfdnltvaehlyfyaqlkglsrqk
 Abca3 [mm] sltglfpptsghayihgyeisqdmaqirkslglcpqhdvfdnltvaehlyfyaqlkglsrlqk

ABCA3 [hs] cpeevkqmlhiigledkwnsrfrflsggmrrklsigiallignskvlildeptsgmdaisrraiw
 Abca3 [mm] cpeevkqmlhilsledkrdrskfflsggmrrklsigiallignskvlildeptsgmdavsrriaw
 Signatur Walker B

ABCA3 [hs] dllqrqksdrtivltthfmdadllgdriaaimakgelqccgssflfkqkygagyhmtlvkephc
 Abca3 [mm] dllqqqksdrtvltthfmdadllgdriaailakgelqccgssflfkqkygagyhmtlvkephc

ABCA3 [hs] npedisqlvhhvnpnatlessagaelsfilprestrfeglfaklekkqkelgiasfgasittm
 Abca3 [mm] npegisqlvhhvnpnamleshagaelsfilpkestrhfeslfaklekkqkelgiasfgasvttm

ABCA3 [hs] eevflrvgklvdsmdiqaiqlpalqyqherrasdwavdsnlcgamdpsdgigalieeertavk
 Abca3 [mm] eevflrvgklvdtmdiqaiqlpalqyqherrasdwaldsnlcgvmcptngigalieeeevlvk

ABCA3 [hs] lntglalhccqfwamflkkaayswrekwmaaavlvplctvtlallainysselfddpmlrltl
 Abca3 [mm] lntglalhccqfwamflkkaayswrekwmaaavlvplctvtlallaihytseifddpmlkls

ABCA3 [hs] geygrtvvpfsvpqtsqlgqqlsehkdalqaegqeprevlgeleeflifrasvegggfnercl
 Abca3 [mm] neygrtvvpfsvpqtsrllaqqlsenlrmdlqaerqeprevlgeleeflvfrasvegggfnercl

ABCA3 [hs] vaasfrdvgrtvvnalfnnqayhspatalavvdnllfkllcgphasivvsnfpqprsalqaak
 Abca3 [mm] vatsfkdrgetlvvtalfnnqayhspatalaivdnllfkllcgphasieisnypqprntlqvak

ABCA3 [hs] dqfnegrkgfdialnllfamaflastfsilavseravqakhvqfvsgvhvasfwlsallwdlis
 Abca3 [mm] dhfnegrkgfdialnlliamafastfsilavseravqakhvqfvsgvhvatfwfsallwdlis

ABCA3 [hs] flipsl111lvfkafdvrafrtrdghmadt11111lygwaiiplmylmnffflgaaataytrltif
 Abca3 [mm] flvpsl111lvfqafnvhaftrdghmadt11111lygwaiiplmylmsfffsaastaytrltif

ABCA3 [hs] nilsgiatflmvtimripavkleelsktldhvflvlpnhclgmavssfyenyetryctsseva
 Abca3 [mm] nilsgiatfimvtimripavkleelsrtldhvflvlpnhclgmavsnfyenyetryctssela

ABCA3 [hs] ahyckkyniqyqenfyawsapgvgrfvasmaasgcaylillflietnllqrlrgilcalrrrrt
 Abca3 [mm] ahyckkyniqyqesfyawstpgvgkfvtsmaasggiyltllflietnllwrlrtficafrrrt

ABCA3 [hs] ltelytrmpvlpedqdvadertrilapspsdlhtpliikelskvyegrppllavdrslavqk
 Abca3 [mm] laelqrntsvlpedqdvadersrillvpsldsmldtpliinelkvydqrappllavdrislavqk

ABCA3 [hs] gecfglgfnagktttfkmltgeesltsgdafvgghrissdvqkvrqrigycpqfda1ldhmt
 Abca3 [mm] gecfglgfnagktttfkmltgeetitsgdafvggysissdigkvrqrmgycpqfda1ldhmt
 Walker A

ABCA3 [hs] gremlvmyarlrigerhigacventlrglllephanklvrtysgggnkrklstgialigepavi
 Abca3 [mm] gremlvmyarlrigerlinacventlrglllephanklvktysggnkrklstgialigepavi
 Signatur

ABCA3 [hs] fldepstgmdpvarrllwdtvararesgkaiiitshsmeecealctrilaimvqqgfklcspqh
 Abca3 [mm] fldepstgmdpvarrllwdtvararesgkaiivitshsmeecealctrilaimvqqgfklcspqh
 Walker B

ABCA3 [hs] lkskfgsgyslrakvqsegqdealeefkafvdltpfgsvledehqgmvyhlpgrdlswakvfg
 Abca3 [mm] lkskfgsgyslrakvrsegkqdaleefkafvdltpfgsiledehqdmvyhlpgcdlswakvfg

ABCA3 [hs] ilekakekygvddysvsqisleqvflsfahlqpptaeeegr
 Abca3 [mm] ilekakekygvddysvsqisleqvflsfahlqppttedgr

1.3 Strukturvorhersage des humanen ABCA3:

Igorithm specific parameters:

Full window size	21
Core window size	11
Wedge window size	5
Using hydrophobicity file	GES-scale
Cutoff for certain transmembrane segments	1.30
Cutoff for putative transmembrane segments	1.15
Critical distance between 2 transmembrane segments	2
Critical loop length	60
Kingdom	procaryote
Using cyt/ext file	CYTEXT-scale

Candidate membrane-spanning segments:

Helix	Begin	End	Score	Certainty
1	22	42	1.708	Certain
2	261	281	1.484	Certain
3	307	327	2.727	Certain
4	345	365	2.357	Certain
5	373	393	1.845	Certain
6	450	470	1.172	Putative
7	925	945	1.695	Certain
8	1101	1121	2.107	Certain
9	1147	1167	1.671	Certain
10	1181	1201	1.896	Certain
11	1213	1233	1.748	Certain
12	1306	1326	1.793	Certain

Hydrophobizitäts-Profil:

HEADER	PROB	DARGLYS	DCYTEXT	DNCHARGE	DNNEGPOS		
TOPOLOGY	0.15	5.00 N-in	-2.76 N-out	3.00 N-in	-1.00		
HEADER	START	STOP	LEN	PROB	HP	DARGLYS	DCYTEXT
CYT_LOOP	1	21	21			5.00	(-0.26)
TRANSMEM	22	42	21	1.00	1.71		
LB_LOOP	43	260	218			(22.00)	0.87
TRANSMEM	261	281	21	1.00	1.48		
CYT_LOOP	282	306	25			6.00	(0.28)
TRANSMEM	307	327	21	1.00	2.73		
LB_LOOP	328	344	17			3.00	(1.30)
TRANSMEM	345	365	21	1.00	2.36		
CYT_LOOP	366	372	7			1.00	(0.49)
TRANSMEM	373	393	21	1.00	1.84		
LB_LOOP	394	449	56			5.00	(-0.08)
TRANSMEM	450	470	21	0.15	1.17		
CYT_LOOP	471	924	454			(53.00)	(-0.07)
TRANSMEM	925	945	21	1.00	1.69		
LB_LOOP	946	1100	155			13.00	(0.60)
TRANSMEM	1101	1121	21	1.00	2.11		
CYT_LOOP	1122	1146	25			2.00	(1.35)
TRANSMEM	1147	1167	21	1.00	1.67		
LB_LOOP	1168	1180	13			3.00	(-0.49)
TRANSMEM	1181	1201	21	1.00	1.90		
CYT_LOOP	1202	1212	11			(1.00)	(-0.01)
TRANSMEM	1213	1233	21	1.00	1.75		
LB_LOOP	1327	11305	72			(8.00)	1.01
TRANSMEM	1306	1326	21	1.00	1.79		
CYT_LOOP	1327	1704	378			(48.00)	-0.21

Veröffentlichungen

Hammel, M.; Michel, G.; Hofer, C.; Klafien, M.; Müller-Höcker, J.; de Angelis, M. H.; and Holzinger, A. Targeted inactivation of the murine *Abca3* gene leads to respiratory failure in newborns with defective lamellar bodies. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 359[4], 947-951. 10-8-2007.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis für die Betreuung meiner Arbeit und für die reibungslose Realisierung unserer gemeinsamen Kooperation. Des Weiteren möchte ich ganz besonders PD OA Dr. med. Andreas Holzinger für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein überaus großes Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit danken. Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl danke ich recht herzlich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes in meiner Disputation.

Für die initiative Planung des Projektes möchte ich im Speziellen Dr. Geert Michel danken. Darüber hinaus danke ich Christina Hofer sowie Matthias Klaffen für die hilfreiche Unterstützung in der embryonalen Stammzellkultur, sowie für das *Screening* mit einer Hochdurchsatzmethode. Ebenso möchte ich Dr. Ralf Kühn für die Überlassung der F1-Zelllinie IDG 3.2 danken. Weiterhin möchte ich Susanne Bourier danken, die mir stets hilfreich in der Zellkultur zur Seite stand.

Im Weiteren gilt mein Dank Adrienne Tasdemir, Susanne Weidemann sowie Adelheid Krause für die kompetenten Blastozysteninjektionen, als auch für den Embryotransfer und die Betreuung meiner Tiere am Helmholtz-Zentrum München. Darüber hinaus gilt mein Dank Dr. med. vet. H.-P. Scheuber und Ira Mordhorst, sowie Kathrin Freygangt für die perfekte Betreuung meiner Tiere an der ZVH.

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Josef Müller-Höcker, Anja Heier, Andrea Sendelhofert, und Sabine Schäfer für die immunhistochemische und elektronenmikroskopische Aufarbeitung meiner Proben bedanken. Ausserdem, PD Dr. Leticia Quintanilla-Martinez-Fend für die hrGFP Analysen, sowie Dr. med. Judith Glöckner-Pagel und Ihrem Arbeitskreis für die gemeinsame Kooperation am SUMO-Projekt.

Des Weiteren gilt mein ganz besonderer Dank dem gesamten Labor K0.21, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die herzliche Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Als letztes möchte ich meinen Eltern Manfred und Gerlinde Hammel sowie meinem Bruder Mathias Hammel recht herzlich danken. Sie haben mich nicht nur finanziell unterstützt sondern standen mir auch in allen andern Lagen meines Lebens hilfreich zur Seite. Ohne sie wäre nicht nur mein Studium, sondern auch diese Dissertation nicht möglich gewesen!