

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Charakterisierung neuer Missense Mutationen
im Lipidtransporter ABCA3**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrike Theresia Schindlbeck

aus München

2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Gries

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dennis Nowak
Prof. Dr. med. Andreas Holzinger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2019

Zusammenfassung

Das Adenosintriphosphat (ATP) Binding Cassette (ABC) Protein vom Typ A3 (ABCA3) ist ein Lipidtransporter, welcher hauptsächlich in Typ II Pneumozyten der Lunge exprimiert wird und sich dort in der äußeren Membran von Lamellarkörperchen, einem Zellorganell zur Speicherung von Surfactant, befindet. Der ABCA3 Transporter nutzt Energie aus der ATP-Hydrolyse, um Surfactant-spezifische Lipide in die Lamellarkörperchen zu transportieren und ist somit essentiell für deren Biogenese und die Produktion von Surfactant.

Durch Mutationen verursachte Defekte im ABCA3 Transporter können zu einer Surfactant-Dysfunktion führen und sind trotz ihrer Seltenheit die häufigste bekannte genetische Ursache für ein Atemnotsyndrom bei Neugeborenen sowie diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind bis heute noch nicht vollständig verstanden.

In dieser Arbeit wurden die zellulären Auswirkungen einer Reihe bereits bekannter (p.Q215K, p.R288K, p.E292V, p.G964D) sowie drei neu in Patienten identifizierter ABCA3 Missense Mutationen (p.R208W, p.M760R, p.K1388N) *in vitro* untersucht und mit klinischen Daten der betroffenen Patienten korreliert. Hierfür wurden A549 Zellklone mit stabiler homozygoter Expression der zu untersuchenden ABCA3 Variationen und des Wildtypgens generiert. In jedem Zellklon wurden N-Glykosylierung und intrazelluläre Lokalisation des ABCA3 Proteins bestimmt, Größe und Morphologie der durch ABCA3 induzierten Lamellarkörperchen analysiert, intrazelluläre Surfactant-spezifische Lipidmengen gemessen und die proteolytische Spaltung des ABCA3 Proteins quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass ABCA3 Proteine mit den Variationen p.Q215K und p.M760R aufgrund eines gestörten intrazellulären Traffickings nicht korrekt lokalisierten, während ABCA3 Proteine mit den Variationen p.E292V und p.K1388N einen beeinträchtigten Lipidtransport aufwiesen. Bei den ABCA3 Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D konnten keine signifikanten zellulären Auswirkungen nachgewiesen werden, betroffene Patienten entwickelten aber dennoch klinische Symptome. Diese ABCA3 Variationen prädisponierten daher für Lungenerkrankungen, welche durch zusätzliche Faktoren ausgelöst wurden.

Die *in vitro* Charakterisierung einzelner ABCA3 Missense Mutationen ermöglicht eine Vorhersage des klinischen Verlaufs betroffener Patienten sowie eine Einteilung in Gruppen mit gleichen zugrundeliegenden Pathomechanismen. Diese wiederum liefern die wichtige Basis für eine gezielte Entwicklung und zukünftige Anwendung neuer Therapiemöglichkeiten.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie der Atmung	1
1.2 Diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter	3
1.2.1 Begriffsdefinition	3
1.2.2 Klassifikation	4
1.2.3 Epidemiologie und Ätiologie	6
1.2.4 Pathogenese	6
1.2.5 Diagnostik	7
1.2.6 Therapie und Prognose	9
1.3 Der Lipidtransporter ABCA3	10
1.3.1 Die Familie der ABC Transporter	10
1.3.2 Struktur des ABCA3 Transporters	11
1.3.3 Funktion des ABCA3 Transporters	11
1.3.4 Biosynthese und Prozessierung des ABCA3 Transporters	12
1.3.5 Mutationen im ABCA3 Transporter	14
1.4 Klassifikation von Missense Mutationen im ABCA3 Transporter	16
2 Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Chemikalien und Pufferlösungen	24

Inhaltsverzeichnis

3.1.4	Kits	27
3.1.5	Enzyme	27
3.1.6	Zelllinien und Plasmide	27
3.1.7	Primer für Site Directed Mutagenesis und qPCR	28
3.1.8	Antikörper.....	28
3.1.9	Software.....	29
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Auswahl der zu untersuchenden ABCA3 Missense Mutationen	30
3.2.2	Klonierung der ABCA3 Expressionsvektoren.....	32
3.2.3	Vervielfältigung der Plasmidvektoren	33
3.2.4	Aussaat und Kultur der A549 Zellen	34
3.2.5	Stabile Transfektion von A549 Zellen	35
3.2.6	qPCR und Auswahl der Zellklone	36
3.2.7	Western Immunoblotting	37
3.2.8	XTT-Assay.....	38
3.2.9	LDH-Assay	39
3.2.10	N-Glykosylierung	39
3.2.11	Immunfluoreszenzfärbung.....	40
3.2.12	Transmissionselektronenmikroskopie	42
3.2.13	Lipid Analysen.....	42
3.2.14	Statistik.....	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Generierung von Zelllinien mit ABCA3 Expression	45
4.1.1	Vergleichbare mRNA Expression ausgewählter Zellklone	46
4.1.2	Vergleichbare Proteinexpression ausgewählter Zellklone.....	47
4.2	Einfluss der stabilen Transfektion von ABCA3 auf die Zelle	48
4.2.1	Zellviabilität der ausgewählten ABCA3 Klone	48
4.2.2	Zytotoxizität der ausgewählten ABCA3 Variationen	49
4.3	Intrazelluläres Trafficking und Lokalisation des ABCA3 Proteins.....	50

4.3.1	Intrazelluläres Trafficking des ABCA3 Proteins.....	50
4.3.2	Intrazelluläre Lokalisation des ABCA3 Proteins.....	52
4.4	Entstehung ABCA3 induzierter Lamellarkörperchen	54
4.4.1	Volumen der Lamellarkörperchen in der Immunfluoreszenzmikroskopie	54
4.4.2	Morphologie der Lamellarkörperchen in der TEM.....	56
4.5	Lipidtransport durch das ABCA3 Protein	57
4.6	Proteolytische Spaltung des ABCA3 Proteins	58
4.7	Überblick über die Ergebnisse	60
5	Diskussion.....	61
5.1	Generierung von Zellklonen mit stabiler ABCA3 Expression.....	61
5.1.1	A549 Zelllinie als Modellsystem für Typ II Pneumozyten	61
5.1.2	ABCA3 Expressionsvektor mit CMV-Promotor und HA-Tag.....	62
5.1.3	Auswahl der A549 Zellklone mit stabiler ABCA3 Expression	63
5.2	Auswirkungen der Überexpression auf Zellviabilität und Zytotoxizität	64
5.3	ABCA3 Varianten mit gestörter intrazellulärer Lokalisation	64
5.3.1	Zellulärer Phänotyp der Varianten p.Q215K und p.M760R.....	64
5.3.2	Korrelation mit klinischen Daten betroffener Patienten.....	66
5.4	ABCA3 Varianten mit gestörtem Lipidtransport.....	67
5.4.1	Zellulärer Phänotyp der Varianten p.E292V und p.K1388N.....	67
5.4.2	PC- und DPPC-Analysen zur funktionellen Testung des ABCA3 Transporters	68
5.4.3	Korrelation mit klinischen Daten betroffener Patienten.....	69
5.5	ABCA3 Varianten mit Prädisposition für ILD	70
5.5.1	Zellulärer Phänotyp der Varianten p.R208W, p.R288K und p.G964D.....	70
5.5.2	Korrelation mit klinischen Daten betroffener Patienten.....	71
5.5.3	Mögliche krankheitsauslösende Pathomechanismen	71
5.5.4	Multiple Mittelwertvergleiche zur Ermittlung statistischer Signifikanzen.....	73
6	Ausblick	75
	Literaturverzeichnis.....	XIII

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	XX
Eidesstattliche Versicherung.....	XXI
Danksagung	XXII

Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Adenokarzinom-Typ II-Lungenepithelzelllinie
ABC	ATP-bindende Kasette (<i>ATP binding cassette</i>)
ABCA3	ABC Unterfamilie A, Gen Nummer 3
ANS	Atemnotsyndrom des Neugeborenen
Asn	Aminosäure Asparagin (Dreibuchstabencode)
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum-Albumin
CB	„ <i>composite bodies</i> “
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>Charge Coupled Device</i>)
CD63	Oberflächenprotein mit Cluster of Differentiation Nummer 63
cDNA	komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
CMV	humanes Cytomegalie-Virus
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CPI	chronische Pneumonitis des Kindesalters (<i>chronic pneumonitis of infancy</i>)
DABCO	Diazabicyclooctan
DAPI	Diamidinphenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)

Abkürzungsverzeichnis

DPLD	diffuse parenchymatöse Lungenerkrankung (<i>diffuse parenchymal lung disease</i>)
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DR	sich wiederholende DNA Abschnitte (<i>direct repeats</i>)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli, Bakterienstamm
ECD	extrazelluläre Domäne (<i>extracellular domain</i>)
ECL	verbesserte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	frühes Endosom (<i>early endosome</i>)
Endo H	Endoglycosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
FCS	fetales Kälber-Serum (<i>fetal calf serum</i>)
g	mittlere Erdbeschleunigung
GA	Golgi Apparat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRCT	hochauflösende Computer-Tomographie (<i>high resolution computed tomography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin der Klasse G, Gammaglobulin
IIP	idiopathische interstitielle Pneumonie (<i>idiopathic interstitial pneumonia</i>)
ILD	interstitielle Lungenerkrankung (<i>interstitial lung disease</i>)
IND	Iodonitrotetrazolium
IR	sich wiederholende gegenläufige DNA Sequenzen (<i>inverted repeats</i>)
K	Aminosäure Lysin (Einbuchstabencode)
kDa	Kilodalton
LB	Lamellarkörperchen (<i>lamellar body</i>)
LDH	Laktatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MVB	multivesikuläre Körperchen (<i>multivesicular bodies</i>)
N	Aminosäure Asparagin (Einbuchstabencode)
NBD	Nukleotidbindende Domäne
NEHI	neuroendokrine Zellhyperplasie des Säuglings (<i>neuroendocrine cell hyperplasia of infancy</i>)
nt	Nukleotide
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGK	Phosphoglyceratkinase
PIG	pulmonale interstitielle Glykogenose
PMS	Phenazinmethosulfat
PNGase F	Peptid N-Glycosidase F

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>real-time quantitative PCR</i>)
RDS	Atemnotsyndrom (<i>respiratory distress syndrome</i>)
RIPA	Radio Immunpräzipitation Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Surfactantprotein
SV	„ <i>sorting vesicle</i> “
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-T	TBS mit TWEEN® 20
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TM	tubuläres Myelin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTF1	thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
UIP	gewöhnliche interstitielle Pneumonie (<i>usual interstitial pneumonia</i>)
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine (<i>unfolded protein response</i>)
WT	Wildtyp
XTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
Z stacks	axiale Bildstapel-Serien

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lunge und einer Alveole.....	1
Abbildung 2: Zusammensetzung von pulmonalem Surfactant.....	3
Abbildung 3: Struktur des ABCA3 Transporters.....	12
Abbildung 4: Biosynthese, Recycling und Abbau des ABCA3 Transporters.....	13
Abbildung 5: Lokalisationen der untersuchten ABCA3 Missense Mutationen (rot).....	19
Abbildung 6: Vektorkarte des pT2/HB-Transposon-Vektors mit humanem ABCA3.....	32
Abbildung 7: Vektorkarte des Transposase-SB100-Vektors.....	35
Abbildung 8: Relative ABCA3 mRNA Expression der ausgewählten Zellklone.....	46
Abbildung 9: Relative ABCA3 Proteinexpression der ausgewählten Zellklone.....	47
Abbildung 10: Zellviabilität der ausgewählten ABCA3 Zellklone.....	48
Abbildung 11: Zytotoxizität der ausgewählten ABCA3 Variationen.....	49
Abbildung 12: Intrazelluläres Trafficking der untersuchten ABCA3 Proteine.....	51
Abbildung 13: Intrazelluläre Lokalisation der untersuchten ABCA3 Proteine.....	53
Abbildung 14: Volumen der durch ABCA3 induzierten Lamellarkörperchen.....	55
Abbildung 15: Transmissionselektronenmikroskopie der induzierten Lamellarkörperchen....	56
Abbildung 16: Phosphatidylcholingehalt der ausgewählten Zellklone.....	57
Abbildung 17: Proteolytische Spaltung der untersuchten ABCA3 Variationen.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikationsschema für diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter	5
Tabelle 2: Patientendaten zu den ausgewählten ABCA3 Variationen.	31
Tabelle 3: Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung.	41
Tabelle 4: Überblick über die Ergebnisse aller untersuchten ABCA3 Variationen.....	60

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Atmung

Die Lunge ist das zentrale Organ für den Gasaustausch des menschlichen Körpers und sichert so die für die aerobe Energiegewinnung notwendige Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff. Damit die Diffusion der Gase zwischen den Kompartimenten in ausreichendem Maße stattfinden kann, ist die Lunge mit einer großen inneren Oberfläche in Form von vielen kleinen Alveolen ausgestattet, welche über die Trachea und einen stark verzweigten Bronchialbaum belüftet werden (Abbildung 1).

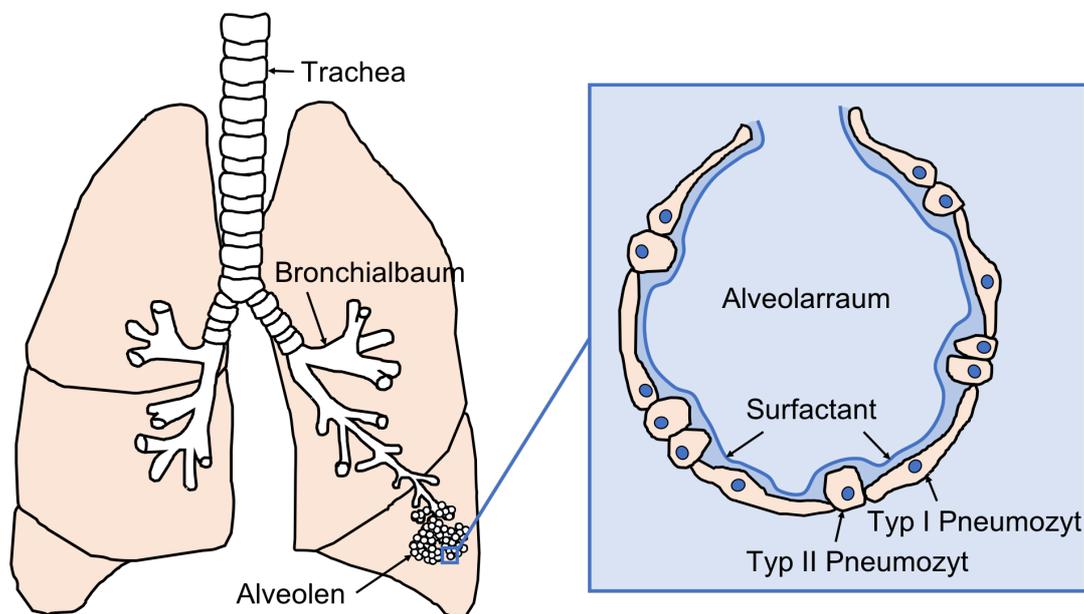


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lunge und einer Alveole.

Schematische Zeichnung einer Lunge mit Trachea, Bronchialbaum und Alveolen (links). Daraus vergrößert ist eine einzelne Alveole mit Surfactant, Typ I und Typ II Pneumozyten dargestellt (rechts).

Die Alveolen sind mit dem Alveolarepithel, bestehend aus Alveolarepithelzellen vom Typ I und II (im Folgenden Pneumozyten genannt), ausgekleidet. Ausdifferenzierte Typ I Pneumozyten machen mit ihrem flachen Zellkörper einen Großteil dieser Oberfläche aus und bilden zusammen mit den Endothelzellen der Blutkapillaren sowie einer gemeinsamen Basalmembran die Luft-Blut-Schranke. Diese nur extrem kurze Strecke, die zwischen Alveolarluft und Kapillarblut zurück gelegt werden muss, erleichtert die Diffusion und damit den Austausch der Atemgase O_2 und CO_2 enorm. Die wesentlich kleineren Typ II Pneumozyten haben eine

kuboide Form und nehmen trotz ihrer größeren Anzahl eine nur geringe Fläche ein, um den Gasaustausch nicht zu behindern. Sie sind reich an Zellorganellen und produzieren einerseits lebensnotwendiges Surfactant, andererseits bleiben sie teilungsfähig und können somit geschädigte Typ I Pneumozyten durch Vermehrung und Differenzierung ersetzen [5, 82].

Surfactant ist ein Kunstwort aus „surface active agent“ und bezeichnet ein komplexes Gemisch aus spezifischen Lipiden und spezialisierten Proteinen. Es senkt die natürlicherweise vorkommende Oberflächenspannung an der Grenzschicht zwischen Luft und Lungengewebe ab und verhindert somit einen Kollaps der Alveolen. Die Atemarbeit wird zudem deutlich erleichtert, da die Belüftung von surfactantbeschichteten Alveolen mit geringeren Druckunterschieden möglich ist [82].

Biochemisch besteht humanes Surfactant zu 10 % aus Proteinen (hauptsächlich spezialisierte Surfactantproteine A–D) und zu 90 % aus spezifischen Lipiden, wovon die Phospholipide mit Phosphatidylcholin (PC) den quantitativ größten Anteil ausmachen (Abbildung 2). Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) in seiner gesättigten Form bildet dabei die wichtigste Untergruppe der Phosphatidylcholone [3]. Durch die Kombination von hydrophiler Phosphatgruppe und hydrophobem Fettsäurerest richten sich diese amphiphilen Moleküle zwischen dem dünnen Flüssigkeitsfilm auf dem Alveolarepithel und der Luft in den Alveolen aus und verhindern so den direkten Kontakt der beiden Phasen [82]. Diese Adsorption wird zusätzlich durch die hydrophoben Surfactantproteine (SP)-B und SP-C beschleunigt, sodass die normalerweise vorhandene Oberflächenspannung an der alveolären Grenzfläche in allen Atemlagen der Lunge deutlich reduziert ist [5]. Insbesondere am Ende der Expiration und in den kleineren Alveolen wirkt eine zunehmende Dichte des Surfactants einer erhöhten Oberflächenspannung entgegen und verhindert so die Entstehung von Atelektasen [22]. Darüber hinaus verringert Surfactant auch den aufgrund von erhöhten Kapillarkräften getriebenen Einstrom interstitieller Flüssigkeit und folglich das Entstehen von Ödemen in den kleineren Alveolen [82].

Gespeist wird der oberflächliche Surfactantfilm aus einem darunter liegenden Netz an tubulärem Myelin. Dabei handelt es sich um ein aus hydrophilen SP-A und hydrophoben SP-B gebildetes Aggregat, in welchem alle von Typ II Pneumozyten produzierten und sezernierten Surfactantbestandteile gespeichert werden [3, 22]. SP-A ist zusammen mit dem ebenfalls hydrophilen SP-D an der Regulation der Surfactantsekretion sowie der Wiederaufnahme von Surfactantbestandteilen in die Typ II Pneumozyten beteiligt [3]. Sowohl SP-A als auch SP-D sind außerdem wichtige Bestandteile der nichtadaptiven Erregerabwehr in der Lunge, da sie

körperfremde Kohlenhydratstrukturen von Bakterien oder Viren binden und makrophagenabhängige Abwehrreaktionen stimulieren können [82].

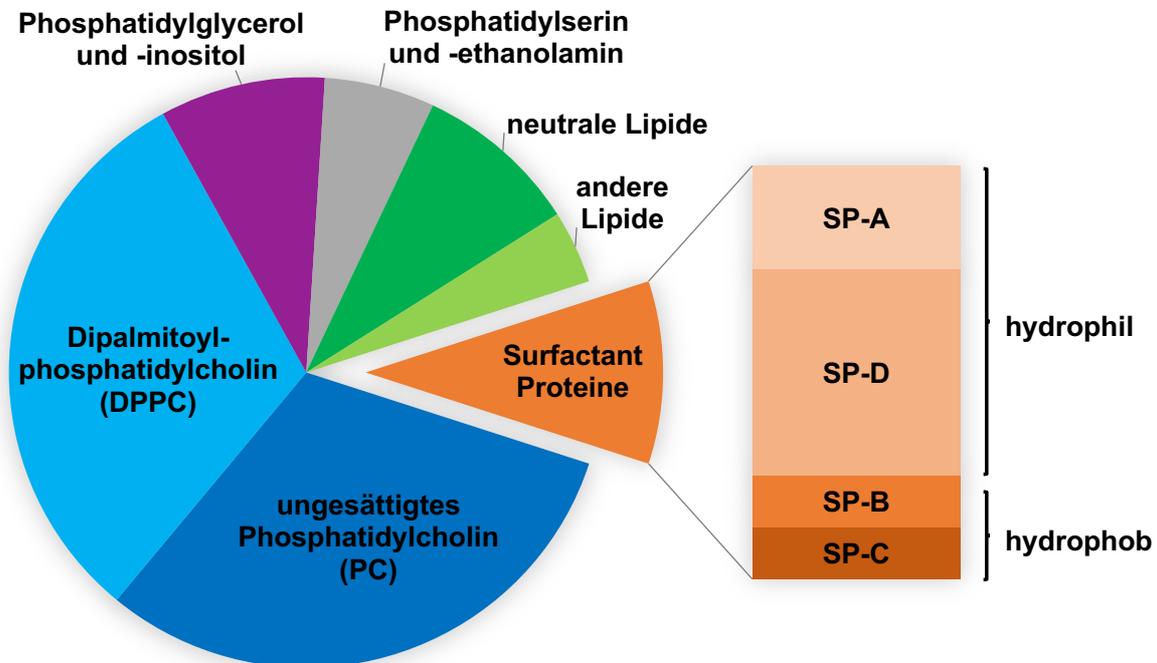


Abbildung 2: Zusammensetzung von pulmonalem Surfactant.

Humanes Surfactant besteht zu 90 % aus spezifischen Lipiden und zu etwa 10 % aus Proteinen. Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) als Untergruppe der Phosphatidylcholone (PC) bildet den größten Anteil des pulmonalen Surfactants und ist zusammen mit den Surfactantproteinen essentiell für dessen Funktion. Diagramm abgeändert nach *Han und Mallampalli* [40].

1.2 Diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter

1.2.1 Begriffsdefinition

Der Begriff „interstitielle Lungenerkrankung“ (ILD), häufig auch als „diffuse Lungparenchymerkrankung“ (DPLD) bezeichnet, umfasst eine sehr heterogene Gruppe an seltenen, chronisch respiratorischen Erkrankungen mit beträchtlicher Morbidität und Mortalität. Verschiedenste, zum Teil noch ungeklärte Ursachen führen bei diesem Krankheitsbild zu entzündlichen und fibrotischen Veränderungen im Bereich des Alveolarepithels, den Kapillarendothelien und des perivaskulären sowie perilymphatischen Lungengewebes [42]. Da teilweise auch die Alveolarräume und distalen Atemwege betroffen sind, beschränkt sich dieses

Krankheitsbild nicht immer nur auf das Interstitium. Der Überbegriff „diffuse Lungenerkrankung“ ist daher treffender formuliert und wird zunehmend häufiger in der Literatur verwendet [26, 52, 72]. Das resultierende klinische Erscheinungsbild ist sehr variabel ausgeprägt, geht aber meist mit Atemnot, diffusen alveolären Infiltraten und einer restriktiven Ventilationsstörung mit eingeschränkter Diffusionskapazität einher [20]. Diese Erkrankungsgruppe lässt sich somit gut von obstruktiven Atemwegserkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) abgrenzen.

Im Kindesalter finden sich diffuse Lungenerkrankungen deutlich seltener als im Erwachsenenalter, allerdings zeigt sich hier eine weitaus größere Variabilität in der auftretenden Symptomatik. Die klinischen Verläufe und Ausprägungsformen unterscheiden sich zum Teil wesentlich von denen bei Erwachsenen und manche Entitäten wie die pulmonale interstitielle Glykogenose (PIG) [15], die neuroendokrine Zellhyperplasie des Säuglings (NEHI) [25] oder genetisch bedingte Störungen des Surfactantmetabolismus [41] wurden bisher nur bei Kindern diagnostiziert.

1.2.2 Klassifikation

Die im Jahre 2002 in der Erwachsenenmedizin erarbeitete Klassifikation der idiopathischen interstitiellen Pneumonien im Kontext interstitieller Lungenerkrankungen basiert überwiegend auf histologischen Kriterien [1]. Insbesondere bei Kindern unter 2 Jahren differieren jedoch die beobachteten histopathologischen Befunde, ebenso wie Ursachen, Häufigkeiten und Prognosen deutlich von den Gegebenheiten bei Erwachsenen [26, 31], sodass eine Anwendung dieser Klassifikation im Kindesalter nicht sinnvoll erscheint. Eine akkurate Diagnosestellung kindlicher interstitieller Lungenerkrankungen war daher, auch aufgrund der epidemiologischen Seltenheit und der variablen Ausprägung des Krankheitsbildes, lange schwierig.

Die Arbeitsgruppe *Deutsch et al.* erarbeitete 2007 ein neues Klassifikationsschema für diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter [26], welches seit 2013 auch von der American Thoracic Society zur routinemäßigen Anwendung empfohlen wird [53]. Basierend auf einer retrospektiven Kohortenstudie mit an DPLD erkrankten Kindern unter 2 Jahren wurden neben den verschiedenen Ursachen und der klinischen Präsentation nun auch die altersbezogenen Häufigkeiten in die Einteilung integriert [26]. Dabei wurde eine Gruppe mit Häufung bei Neugeborenen und Säuglingen unter 2 Jahren von einer weiteren Gruppe ohne altersspezifische Häufung unterschieden. Unter dem verwendeten Überbegriff „diffuse Lungenerkrankungen“

konnten Störungen der Lungenentwicklung und des Lungenwachstums sowie die Surfactant-Dysfunktion ebenfalls in dieser Einteilung eingeschlossen werden.

Rice et al. führten 2013 eine erweiterte retrospektive Kohortenstudie an Kindern mit diffuser Lungenerkrankung bis einschließlich 18 Jahren durch [72]. In dieser Studie konnte zum einen das bisherige Klassifikationsschema von *Deutsch et al.* für Kinder unter 2 Jahren erfolgreich validiert werden, zum anderen wurde die bestehende Gruppe ohne altersspezifische Häufung um weitere Kategorien mit in dieser Studie beobachteten Erkrankungen ergänzt (Tabelle 1). Diese erweiterte Klassifikation diffuser Lungenerkrankungen im Kindesalter kann nun bei allen Kindern bis einschließlich 18 Jahren angewendet werden und erleichtert die Diagnosestellung im klinischen Alltag enorm.

Tabelle 1: Klassifikationsschema für diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter.

Ursprünglich nach *Deutsch et al.* [26], erweitert um die Gruppen B 5.–8. durch *Rice et al.* [72]. ABCA3: ATP Binding Cassette Transporter vom Typ A3, NEHI: neuroendokrine Zellhyperplasie des Säuglings, PIG: pulmonale interstitielle Glykogenose, SP-B / SP-C: Surfactant Protein B / C.

A	Häufung bei Neugeborenen und Säuglingen (unter 2 Jahren)
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diffuse Entwicklungsstörungen 2. Wachstumsstörungen 3. Spezifisches Erscheinungsbild mit undefinierter Ätiologie (z. B. PIG, NEHI) 4. Surfactant-Dysfunktion (z. B. Mutationen in SP-B, SP-C, ABCA3)
B	Keine altersspezifische Häufung
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Störungen bei immunkompetenten Patienten 2. Störungen aufgrund systemischer Erkrankungen 3. Störungen bei immundefizienten Patienten 4. Störungen, welche wie eine interstitielle Lungenerkrankung imponieren 5. Lymphoproliferative Erkrankungen 6. Erkrankungen der kleinen Atemwege (z. B. chronische Bronchiolitis) 7. Interstitielle Pneumonien unabhängig von Surfactantproteinstörungen 8. Sonstige Muster diffuser Lungenerkrankungen (z. B. Häm siderose)
C	Nicht klassifizierbar (z. B. inadäquates Material, terminale Erkrankungen, ...)

1.2.3 Epidemiologie und Ätiologie

Diffuse Lungenerkrankungen sind im Kindesalter um einiges seltener als im Erwachsenenalter. Aufgrund dieser epidemiologischen Seltenheit und der hinzukommenden Variabilität des Krankheitsbildes gibt es bisher nur wenige geschätzte Prävalenzen. Eine 1995–1998 durchgeführte Studie in Irland und dem Vereinigten Königreich schätzte eine Prävalenz diffuser Lungenerkrankungen von 0,36 Fällen pro 100.000 Kindern [27]. Eine in den Jahren 2005 und 2006 in Deutschland durchgeführte Studie ermittelte eine Inzidenz von 0,13 Fällen pro 100.000 Kindern [38] und eine dezente Erkrankungshäufung bei Mädchen. Dies ähnelt den Ergebnissen einer 2008 in Frankreich eingeführten, retro- sowie prospektiven nationalen Datensammlung von Kindern mit diffusen Lungenerkrankungen [65], welche zudem aufzeigt, dass der Großteil der Erkrankungen hier bereits innerhalb der ersten zwei Lebensjahre diagnostiziert wurde.

Eine retrospektive Analyse aus Nordamerika legt nahe, dass ein stärkeres Bewusstsein über das Vorhandensein diffuser Lungenerkrankungen im Kindesalter sowie verbesserte diagnostische Möglichkeiten zu einer vermehrten Erfassung der Krankheitsfälle führt und die Prävalenz dieser Erkrankung somit immer noch unterschätzt werden könnte [79].

Die diffusen Lungenerkrankungen im Kindesalter beruhen auf unterschiedlichsten Ursachen, deren Identifikation im Einzelfall nicht immer leicht ist. Die Ergebnisse der französischen Datensammlung [65] legen offen, dass bei über einem Viertel der Kinder (27,3 %) die vorliegende Erkrankung nicht einer klaren Ursache zugeordnet werden konnte. In etwa die Hälfte der in dieser Studie beobachteten Fälle beruhen entweder auf einer Surfactant-Dysfunktion (17,6 %), alveolären Proteinose (9,7 %), Häm siderose (11,2 %) oder Sarkoidose (10,2 %). Die beobachteten Surfactant-Dysfunktionen wiederum beruhen auf Mutationen in Genen, welche für die Proteine SP-B, SP-C, ABCA3 sowie den thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) kodieren, wobei Mutationen im ABCA3 Gen die häufigste Ursache für eine Surfactant-Dysfunktion innerhalb des in Deutschland erfassten Patientenkollektivs darstellte [38].

1.2.4 Pathogenese

Physiologischerweise wird nach einer akuten Schädigung des Alveolarepithels ein koordinierter Reparaturprozess ausgelöst, um die Integrität der Lungenoberfläche schnellstmöglich wieder herzustellen. Eine primär entzündliche Reaktion führt zur Freisetzung einer Vielzahl an unterschiedlichen Mediatorsubstanzen und zur Bildung einer provisorischen extrazellulären Matrix durch aktivierte Fibroblasten. Das geschädigte Alveolarepithel wird durch

proliferierende Typ II Pneumozyten ersetzt, welche im Folgenden differenzieren und die Eigenschaften von Typ I Pneumozyten annehmen. Am Ende des Reparaturprozesses wird überschüssiges Zellmaterial durch dosierte Apoptose und Fibrolyse entfernt, sodass die normalen anatomischen Verhältnisse wieder hergestellt sind [82].

Bei der diffusen Lungenerkrankung kommt es, abhängig von der ursächlichen Schädigung sowie individuellen genetischen Faktoren, zu einem aberranten Verlauf dieser physiologischen Reparaturvorgänge. Die genauen Umstände hierfür sind noch nicht abschließend geklärt, Ausmaß und Verlauf der primären entzündlichen Reaktion spielen dabei jedoch eine weitaus geringere Rolle als bisher angenommen. Vielmehr kommt es im Rahmen der diffusen Lungenerkrankung zu einer kontinuierlichen Produktion und verminderten Mobilisation von extrazellulärer Matrix [19, 90]. Aufgrund einer verzögerten Re-Epithelialisierung der Alveolen liegt die Basalmembran länger frei und verändert damit die normale Interaktion zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen [19]. Ein Teil der Pneumozyten durchläuft einen durch Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) getriggerten, epithelialen-mesenchymalen Transitionsprozess und nimmt dabei vermehrt mesenchymale Eigenschaften an [82, 90]. Aktivierte Fibroblasten zeigen sich zunehmend resistenter gegenüber den regulierenden Apoptosesignalen und produzieren überschüssige extrazelluläre Matrix [90]. Die Interaktion zwischen geschädigtem Alveolarepithel, Pneumozyten mit mesenchymalen Eigenschaften, apoptoseresistenten Fibroblasten und vielfältigen Mediatorsubstanzen führt schlussendlich zur Persistenz und Verfestigung der extrazellulären Matrix [19, 90]. Unter dem Einfluss ausgeschütteter angiogener Faktoren werden zusätzlich neue Blutgefäße gebildet [82], sodass sich in Kombination mit den bereits beschriebenen Vorgängen eine weitgehend irreversible Fibrose der Lunge ausbildet.

1.2.5 Diagnostik

Klinisch manifestieren sich diffuse Lungenerkrankungen im Kindesalter häufig mit nur unspezifischen Krankheitszeichen. Bei Säuglingen können Trinkschwäche und mangelnde Gewichtszunahme bereits erste Anzeichen für eine diffuse Lungenerkrankung darstellen, im weiteren Verlauf kommt es häufig zu respiratorischen Symptomen wie Tachy- bzw. Dyspnoe, Husten und Hypoxämie. In weit fortgeschrittenen Stadien präsentieren sich die Patienten mit einer Zyanose in Ruhe sowie Uhrglasnägeln und Trommelschlägelfingern. Bei der Auskultation der Lunge sind in der Regel knisternde Rasselgeräusche zu hören und die Untersuchung der Lungenfunktion zeigt eine restriktive Ventilationsstörung. Der Krankheits-

beginn verläuft oft schleichend und manche Kinder bleiben lange asymptomatisch [82]. Da die initiale klinische Symptomatik sehr unspezifisch ist und dem Erscheinungsbild von anderen weitaus häufigeren Lungenerkrankungen ähnelt, sollten diese in einem ersten diagnostischen Schritt ausgeschlossen werden. Dazu gehören z. B. Mukoviszidose, pulmonale Infektionen, primäre oder sekundäre Immundefizienz, angeborene Herzfehler, wiederholte Aspirationen sowie die primär ziliäre Dyskinesie [52].

Ein Röntgenbild des Thorax ist meist das primär eingesetzte diagnostische Mittel und kann bei sichtbaren diffusen alveolären Infiltraten bereits einen ersten Hinweis auf das Vorliegen einer Lungenerkrankung liefern. Zur genaueren Differenzierung diffuser Lungenerkrankungen ist die hochauflösende Computer-Tomographie (HRCT) des Thorax die bevorzugte Form der Bildgebung, in welcher sich charakteristische milchglasartige Verschattungen und verdickte Interlobärsepten zeigen [20]. Bei einigen Erkrankungen wie der Surfactant-Dysfunktion, NEHI oder Bronchiolitis obliterans sind die Befunde in der HRCT bereits so spezifisch, dass eine definitive Diagnosestellung möglich ist und den Kindern somit eine Lungenbiopsie erspart werden kann [52]. Falls zur genaueren Differenzierung der diffusen Lungenerkrankung dennoch eine zusätzliche Lungenbiopsie vonnöten ist, kann die HRCT bei der Auswahl geeigneter Entnahmestellen helfen.

Ein breit verfügbares, invasives und relativ sicheres diagnostisches Verfahren ist die flexible Bronchoskopie, bei welcher Anatomie und Physiologie der Atemwege beurteilt werden können. Eine zusätzlich im Rahmen dessen durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ermöglicht die Gewinnung von Probenmaterial für zytologische Untersuchungen, mikrobielle Kulturen und weitergehende molekulare Analysen [20].

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer Erbkrankheit ermöglicht eine gezielte genetische Analyse die nicht-invasive definitive Diagnosestellung, vorausgesetzt es handelt sich um eine bereits bekannte monogenetische Erkrankung. Als Ursache für diffuse Lungenerkrankungen wurden bisher vor allem Abnormalitäten in den Genen identifiziert, welche für SP-B (*SFTPB*), SP-C (*SFTPC*), ABCA3 (*ABCA3*), TTF1 (*NKX2-1*) sowie für die Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) Rezeptoren α und β (*CSF2RA* und *CSF2RB*) kodieren [52]. Die Identifikation einer solchen ursächlichen Abnormalität liefert wichtige Informationen für das Management und die Prognose der Erkrankung und kann unnötige zusätzliche diagnostische Untersuchungen verhindern.

Wenn sowohl die Bildgebung als auch die genetische Testung keine hinreichend sichere Diagnose liefern, bleibt die möglichst minimal-invasive Lungenbiopsie der Goldstandard für eine exakte Diagnosestellung und Klassifikation diffuser Lungenerkrankungen. Durch genaue histologische Aufarbeitung des hierbei gewonnenen Gewebes können Verteilungsmuster, Entzündungsaktivität, Art und Verteilung infiltrierender Zellen sowie Fibrosierungsgrad der diffusen Lungenerkrankung beurteilt und einer der histopathologisch definierten Untergruppen zugeordnet werden [82]. Charakteristischerweise sind prominente Alveolarmakrophagen, verdickte und fibrotisch veränderte Alveolarsepten, inflammatorische Zellen sowie granuläres Zellmaterial im Alveolarlumen zu finden [13, 20]. Bei Verdacht auf eine durch einen ABCA3 Defekt verursachte Surfactant-Dysfunktion sollte zusätzlich eine Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt werden, bei welcher das hochspezifische Fehlen bzw. die starke Verminderung von reifen Lamellarkörperchen in den Typ II Pneumozyten des entnommenen Gewebes nachgewiesen werden kann [68].

Zur Schweregradeinteilung und Verlaufsbeurteilung diffuser Lungenerkrankungen werden in der Regel Lungenfunktionsuntersuchungen sowie die Bestimmung der Sauerstoffsättigung in Ruhe und unter Belastung durchgeführt [82].

1.2.6 Therapie und Prognose

Da aufgrund der Seltenheit diffuser Lungenerkrankungen im Kindesalter bisher keine systematischen Behandlungsstudien vorliegen, erfolgt die Therapie dieser chronischen Erkrankung hauptsächlich empirisch und symptomorientiert. Neben der Gabe von Sauerstoff und falls notwendig einer supportiven Beatmung spielen auch eine hochkalorische Ernährung und die konsequente Behandlung hinzukommender Infektionen eine wichtige Rolle. Schädliche Umwelteinflüsse wie die Tabakrauchexposition sollten unbedingt gemieden und eine vollständige Immunisierung des Kindes auch gegen die jährlich auftretende Influenza angestrebt werden [19].

Die immunsuppressive und antiinflammatorische Behandlung ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Therapie von diffusen Lungenerkrankungen. Hierfür werden meist Kortikosteroide wie Prednisolon in Kombination mit Hydroxychloroquin eingesetzt, welches einen steroidsparenden Effekt ausübt und zusätzlich eine gewisse antifibrotische Wirkung hat [82]. Bei Nichtansprechen dieser Therapie stehen weitere Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid, Methotrexat oder Cyclosporin zur Verfügung.

Bei weiterhin fortschreitendem Verlauf trotz Ausschöpfung aller Therapiemöglichkeiten und einem terminalen Stadium der Erkrankung bleibt die Lungentransplantation als letzte Option. Darüber hinaus ist eine genetische Beratung sowie adäquate psychosoziale Begleitung der Patienten und ihrer Familien während dem gesamten Krankheitsverlauf essentiell.

Der individuelle Verlauf der Erkrankung lässt sich für den einzelnen Patienten nur schwer vorhersagen und die Prognose ist stark abhängig von der jeweils diagnostizierten Entität sowie dem Erkrankungsalter. Ein Ansprechen auf die medikamentöse Therapie wird generell als günstiges prognostisches Zeichen gewertet. Die Letalität der diffusen Lungenerkrankungen im Kindesalter liegt insgesamt bei etwa 15 %, im Säuglingsalter ist sie zum Teil aber wesentlich höher [82].

1.3 Der Lipidtransporter ABCA3

1.3.1 Die Familie der ABC Transporter

Transmembranproteine mit einer ATP-bindenden Einheit (ABC) sind evolutionär hoch konserviert und dienen dem Transport eines breiten Spektrums an unterschiedlichen Substraten wie Lipiden, Proteinen oder Ionen. Sie finden sich sowohl in äußeren Zellmembranen als auch in den Membranen intrazellulärer Strukturen und nutzen die freiwerdende Energie aus der ATP-Hydrolyse, um jeweils spezifische Substrate von einem Kompartiment ins andere zu transportieren.

Die funktionelle Einheit des Transporters besteht aus zwei zytoplasmatisch gelegenen Nukleotidbindenden Domänen (NBDs) und zwei Transmembrandomänen (TMDs), welche wiederum je nach Untergruppe aus fünf bis zehn membrandurchspannenden Regionen aufgebaut sind und spezifische Substrate erkennen und transportieren können [56]. Die beiden NBDs enthalten neben den hoch konservierten Walker A und B Motiven auch ein für den ABC Transporter charakteristisches C Motiv [23]. Sie können ATP binden und hydrolysieren und stellen somit die Energie für den Substrattransport durch die beiden TMDs, welche eine Art Pore in der Membran bilden, zur Verfügung. Die unterschiedlichen Domänen können auf einer oder zwei Polypeptidketten oder aber auch auf separaten Polypeptiden vorliegen und über non-kovalente Bindungen interagieren. Der ABC Transporter kann daher in Form eines einzelnen vollständigen Transporters, zwei Halbtransportern oder vier Polypeptiden vorliegen [56].

Im menschlichen Organismus wurden bisher 49 verschiedene ABC Transporter mit jeweils definierter Substratspezifität identifiziert und in sieben Gruppen (A–G) eingeteilt [70]. Sie erfüllen eine Reihe wichtiger physiologischer Funktionen, wie beispielsweise die Prozessierung und Präsentation von Antigenen (ABCB2/ABCB3) [2], den Ionentransport (ABCC7) [45] und Phospholipidtransport (ABCA3) in der Lunge oder auch die Multidrug-Resistenz von Tumorzellen (ABCB1) [54].

Die Untergruppe A der ABC Transporter besteht aus den zwölf bisher identifizierten Transportern ABCA1–ABCA12 [47]. Mutationen in diesen Proteinen resultieren häufig in vererbaren Erkrankungen, wie z. B. der Tangier-Krankheit bei einem Defekt im ABCA1 Transporter [69], dem Morbus Stargardt bei einem Defekt im ABCA4 Transporter [61] oder der Surfactant-Dysfunktion bei vorliegendem Defekt im ABCA3 Transporter.

1.3.2 Struktur des ABCA3 Transporters

Das humane ABCA3 Gen findet sich auf Chromosom 16 und besteht aus 30 Exonen, welche für ein etwa 190 kDa großes Protein mit 1704 Aminosäuren kodieren. Dieses Protein funktioniert als vollständiger ABCA3 Transporter und ist, wie für ABCA Transporter typisch, aus zwei strukturell ähnlichen Hälften mit jeweils einer zytosolischen NBD, einer TMD mit sechs membrandurchspannenden Regionen und einer sogenannten extrazellulär gelegenen Domäne (ECD) aufgebaut (Abbildung 3). Die NBDs vereinen die Energie aus der ATP-Hydrolyse für die aktive Translokation von Lipiden aus dem Zytosol durch die zusammengelagerten TMDs in das Lumen intrazellulärer Kompartimente [47]. Der ABCA3 Transporter wird ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert und findet sich unter anderem im Magen-Darm-Trakt, der Leber, den Nieren und dem Gehirn, die höchste Expression findet sich allerdings in den Typ II Pneumozyten der Lunge [62].

1.3.3 Funktion des ABCA3 Transporters

In den Typ II Pneumozyten spielt der ABCA3 Transporter eine essentielle Rolle für die Biogenese von Lamellarkörperchen (LBs). Lamellarkörperchen sind Zellorganellen lysosomalen Ursprungs und bestehen aus vielen konzentrisch angeordneten und dicht gepackten Membranen, in welchen alle Surfactantbestandteile bis zur Sekretion mittels Exozytose gespeichert werden. Der ABCA3 Transporter befindet sich in der äußeren Membran dieser Lamellarkörperchen und transportiert gezielt die für das Surfactant benötigten Lipide aus dem Zytosol in das Lumen und somit zu den inneren Membranen der Lamellarkörperchen [87].

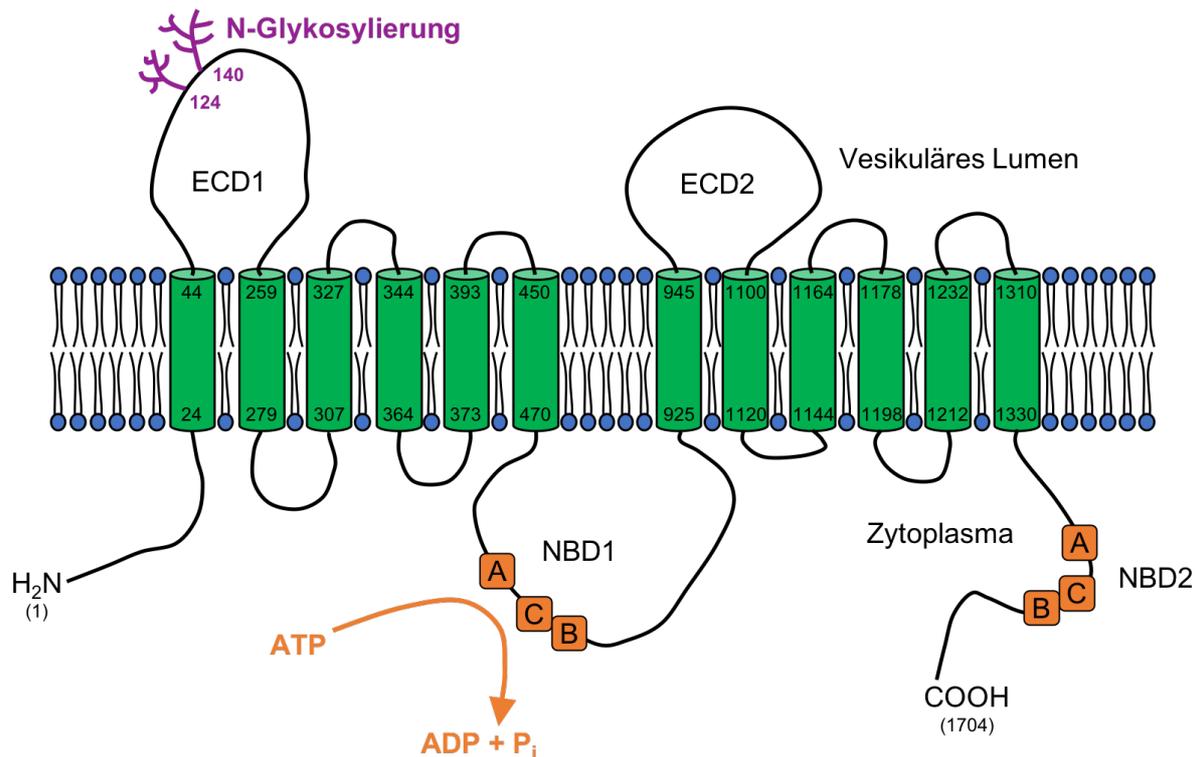


Abbildung 3: Struktur des ABCA3 Transporters.

Der ABCA3 Transporter besteht aus 12 membrandurchspannenden Regionen (TMDs, grün dargestellt), extrazellulär (im vesikulären Lumen) gelegenen Domänen (ECDs) sowie Nukleotidbindenden Domänen (NBDs, orange dargestellt). Die N-Glykosylierungsstellen Asn¹²⁴ und Asn¹⁴⁰ sind lila dargestellt. A/B/C: Walker A/B/C Motiv der NBDs, ADP: Adenosindiphosphat, Asn: Asparagin, ATP: Adenosintriphosphat, P_i: anorganisches Phosphat.

1.3.4 Biosynthese und Prozessierung des ABCA3 Transporters

Nach Transkription der ABCA3 DNA im Zellkern der Typ II Pneumozyten wird die resultierende ABCA3 mRNA durch Ribosomen in der Membran des rauhen ER abgelesen und das etwa 180 kDa große primäre Translationsprodukt wird synthetisiert. Im ER wird das Protein korrekt gefaltet und an den N-Glykosylierungsstellen Asn¹²⁴ und Asn¹⁴⁰ in der ersten ECD werden mannosereiche Oligosaccharide angehängt. Dieser erste Schritt der N-Glykosylierung ist entscheidend für die Stabilität des membranständigen ABCA3 Proteins [10], welches anschließend über vesikulären Transport zum Golgi-Apparat (GA) gelangt, in welchem die mannosereichen Oligosaccharide durch komplexe Oligosaccharide ersetzt werden. Durch die vorhandene N-Glykosylierung erreicht das ABCA3 Protein nun ein Molekulargewicht von etwa 190 kDa. Vom GA schnüren sich sogenannte „sorting vesicles“ mit dem membranständigen ABCA3 Transporter ab [8], aus welchen sich multivesikuläre Körperchen (MVBs)

bilden. Durch Fusionierung mehrerer MVBs entstehen „composite bodies“, welche zu Lamellarkörperchen reifen und in deren äußeren Membran der ABCA3 Transporter seine Funktion erfüllt (Abbildung 4).

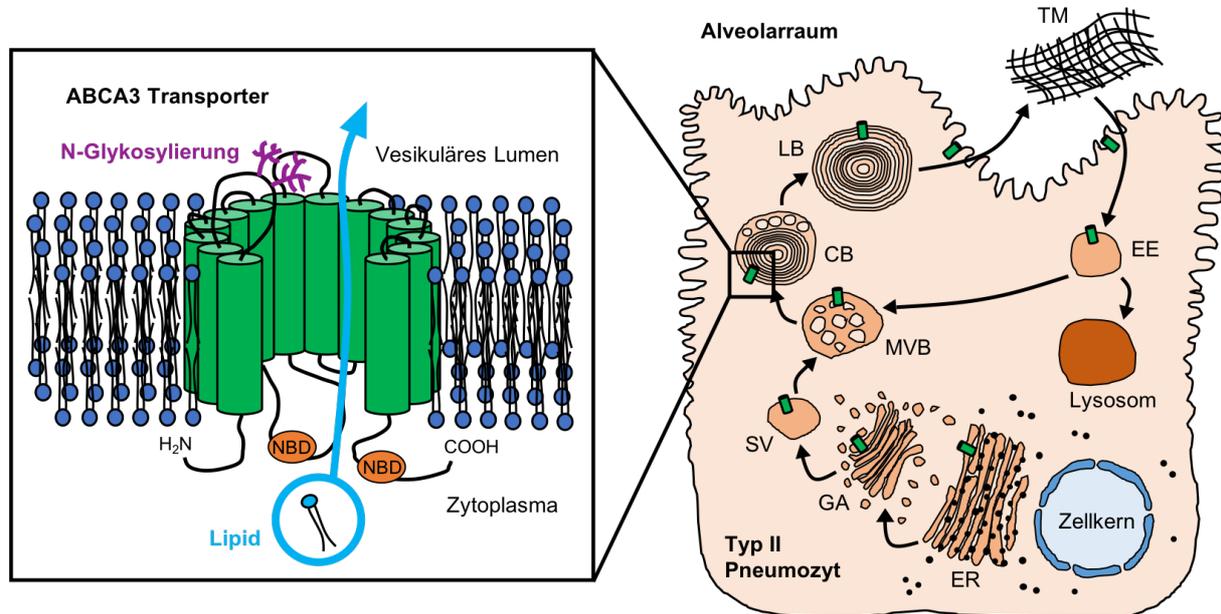


Abbildung 4: Biosynthese, Recycling und Abbau des ABCA3 Transporters.

Nach Synthese des primären ABCA3 Translationsproduktes im Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird der Transporter (grün) zum Golgi Apparat (GA) transportiert und gelangt von dort über „sorting vesicles“ (SV), multivesikuläre Körperchen (MVB) und „composite bodies“ (CB) in die äußere Membran der Lamellarkörperchen (LB). Nach Exozytose dieser verbleibt der ABCA3 Transporter in der Zellmembran und kann im Rahmen der Endozytose wieder in Typ II Pneumozyten aufgenommen sowie über frühe Endosomen (EE) entweder in MVBs recycelt oder in Lysosomen abgebaut werden. Links vergrößert ist die dreidimensionale Struktur des ABCA3 Transporters dargestellt. NBD: Nukleotidbindende Domäne, TM: Tubuläres Myelin.

Die Lamellarkörperchen können ihre gespeicherten Surfactantbestandteile durch regulierte Exozytose in den Alveolarraum freisetzen und speisen so das bestehende Netz aus tubulärem Myelin. Nach Fusion der Lamellarkörperchen mit der Plasmamembran verbleibt der ABCA3 Transporter in dieser Membran und kann, zusammen mit den zuvor freigesetzten Surfactantbestandteilen durch regulierte Endozytose wieder in die Typ II Pneumozyten aufgenommen werden. Sowohl der ABCA3 Transporter als auch die einzelnen Surfactantbestandteile können daher erneut in Lamellarkörperchen wieder verwendet [75] oder aber dem Abbau über das lysosomale System zugeführt werden. Im Lumen der Lysosomen findet eine Cathepsin L-vermittelte proteolytische Spaltung nach Lys¹⁷⁴ in der ersten ECD des ABCA3 Transporters

statt [43]. Durch diese N-terminale Abspaltung einer vollständigen membrandurchspannenden Region inklusive der beiden N-Glykosylierungsstellen Asn¹²⁴ und Asn¹⁴⁰ resultiert ein verkürztes Protein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa [43]. Bei Knockout-Mäusen mit deaktiviertem Cathepsin L-Gen konnte keine Beeinträchtigung der Lunge festgestellt werden [71]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Cathepsin L-vermittelte proteolytische Spaltung nicht, wie ursprünglich angenommen, der Aktivierung des ABCA3 Transporters dient, sondern dessem Abbau.

1.3.5 Mutationen im ABCA3 Transporter

Mutationen im ABCA3 Gen können sowohl kodierende als auch nicht-kodierende Bereiche des Gens betreffen. Sie beinhalten neben Mutationen der Spleißstellen auch Insertionen oder Deletionen mit einer möglichen Verschiebung des Leserasters sowie Substitutionen einzelner Basen, welche je nach Auswirkung auf das kodierte Protein in Missense oder Nonsense Mutationen eingeteilt werden. Bisher wurden über 200 verschiedene Mutationen im rezessiv vererbten ABCA3 Gen identifiziert [9], welche jeweils meist einzelne Individuen und ihre Familien betreffen. Bei den seltenen homozygot vorliegenden ABCA3 Defekten besteht daher höchstwahrscheinlich eine Konsanguinität beider Elternteile. Häufiger findet sich eine einzelne heterozygot vorliegende ABCA3 Variation oder die heterozygote Kombination von zwei verschiedenen ABCA3 Variationen.

Das homozygote oder kombiniert heterozygote Vorliegen von Nonsense Mutationen oder einer Verschiebung des Leserasters führt in der Regel zu einem kompletten Verlust des ABCA3 Transporters. Die Lunge betroffener Patienten ist nicht in der Lage, funktionstüchtiges Surfactant zu produzieren und es kommt bereits direkt nach der Geburt zu einem schweren Atemnotsyndrom (RDS) sowie einem frühen letalen Ausgang innerhalb der ersten Lebensmonate. In der BAL von betroffenen reifen Neugeborenen finden sich signifikant verminderte Phosphatidylcholin (PC)- sowie -glycerin (PG)-Level [34] und in der TEM des entnommenen Lungengewebes lassen sich keinerlei reife Lamellarkörperchen in den Typ II Pneumozyten nachweisen. Vielmehr finden sich hier als Ausdruck des defekten Lipidtransportes viele kleine elektronendichte Einschlusskörperchen in den Zellen [78].

In Knockout-Mäusen mit einem vollständig deaktivierten ABCA3 Gen konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. ABCA3^{-/-} Mäuse verstarben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt an schwerer Atemnot, hatten stark erniedrigte PC- sowie PG-Level im Lungen-

gewebe und in der TEM konnten ähnlich wie bei den verstorbenen Neugeborenen keine reifen Lamellarkörperchen nachgewiesen werden [7, 17, 32].

Wambach et al. konnten in einer 2012 durchgeführten Studie in den USA zeigen, dass auch einzeln vorliegende heterozygote ABCA3 Mutationen das Risiko für ein Atemnotsyndrom bei Neugeborenen signifikant erhöhen [84]. In dieser Studie wurde außerdem ermittelt, dass 3,6 % aller untersuchten Kinder mit europäischer Abstammung eine einzelne heterozygote ABCA3 Mutation vorweisen. Die Häufigkeit einer ABCA3 Defizienz wurde bei diesen Kindern somit auf 1:3.100 geschätzt, was in etwa auch der Häufigkeit der weitaus bekannteren Mukoviszidose entspricht. Trotz rezessivem Vererbungsmuster und der möglichen Kompensation durch das zweite intakte Allel können einzelne heterozygot vorliegende ABCA3 Mutationen das Risiko für die Entwicklung einer diffusen Lungenerkrankung erhöhen, wie es für die Sequenzvariation p.R288K beschrieben wurde [88]. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine durch die vorliegende ABCA3 Variation hervorgerufene erhöhte Vulnerabilität des Respirationstraktes für zusätzliche schädigende Einflüsse sein, wie z. B. interkurrente Infektionen oder respiratorischer Stress bei Frühgeburtlichkeit.

Die Auswirkungen von homozygot oder heterozygot kombiniert vorliegenden Missense Mutationen auf den ABCA3 Transporter lassen sich nur sehr schwer vorhersagen. Trotz veränderter Primärsequenz kann noch eine partielle Restfunktion des Proteins vorhanden sein. Beginn und Schwere der pulmonalen Erkrankung können daher stark variieren und von einem letalen neonatalen Atemnotsyndrom bei komplettem Funktionsverlust bis hin zu einer erst später einsetzenden, chronisch verlaufenden diffusen Lungenerkrankung bei nur partiellem Funktionsverlust reichen. Die Interpretation individueller Genotypen und eine Vorhersage des entsprechenden Phänotyps allein anhand der Lokalisation der Mutationen gestaltet sich daher schwierig und basiert momentan hauptsächlich auf den klinischen Beobachtungen von betroffenen Patienten. Leider stehen nicht immer ausreichende Mengen an klinischen Daten und vor allem auch Untersuchungsmaterial zur Verfügung, um die Auswirkungen einzelner ABCA3 Mutationen zuverlässig beurteilen zu können. Aus diesem Grund entwickelten *Wittmann et al.* eine Kombination aus *in vitro* Versuchen [89], anhand welcher der zelluläre Phänotyp sowie die vermuteten zugrundeliegenden Pathologien von in Patienten neu identifizierten ABCA3 Missense Mutationen zuverlässig beurteilt werden können.

1.4 Klassifikation von Missense Mutationen im ABCA3 Transporter

Bereits 2006 veröffentlichte *Cheong et al.* die Theorie, dass eine ABCA3 Missense Mutation entweder zu einem gestörten intrazellulären Trafficking, also zu einem gestörten Transport des ABCA3 Proteins innerhalb der Zelle oder zu einer Dysfunktion des ABCA3 Proteins führen kann [16]. *Matsumura et al.* haben daraufhin eine erste Einteilung von ABCA3 Missense Mutationen vorgenommen: Typ 1 Mutationen mit einer abnormalen intrazellulären Lokalisation und Typ 2 Mutationen mit einer verringerten ATP Hydrolyse bei korrekter intrazellulärer Lokalisation des ABCA3 Proteins [59]. Die kombinierte Heterozygotie von Typ 1 und 2 Mutationen wurden in diesem Zusammenhang auch als Typ 3 Mutation diskutiert und präsentiert sich häufig mit einem stärker beeinträchtigten Phänotyp [9].

Bisher identifizierte Typ 1 Mutationen sind beispielsweise die ABCA3 Sequenzvariationen p.L101P, p.Q215K, p.L982P, p.L1553P und p.Q1591P [30, 58, 59]. ABCA3 Transporter mit diesen Variationen zeichnen sich durch ein abnormales intrazelluläres Trafficking aus, hervorgerufen durch eine Fehlfaltung sowie initiale ER-Retention des ABCA3 Proteins. Der dadurch generierte ER-Stress kann im Folgenden einen apoptotischen Zelltod der betroffenen Typ II Pneumozyten induzieren [86].

Bei den ABCA3 Sequenzvariationen p.E292V, p.N568D, p.E690K und p.T1114M handelt es sich um Typ 2 Mutationen, welche häufig in oder nahe der beiden NBDs des ABCA3 Transporters lokalisiert sind [58, 59]. ABCA3 Transporter mit diesen Sequenzvariationen sind durch einen funktionellen Defekt gekennzeichnet, sodass der spezifische Lipidtransfer in das Lumen der Lamellarkörperchen beeinträchtigt ist.

Diese Charakterisierung und Einteilung der ABCA3 Missense Mutationen in Gruppen mit demselben zugrundeliegenden Pathomechanismus ist einerseits hilfreich, um den Phänotyp sowie den klinischen Verlauf von betroffenen Patienten einschätzen zu können, andererseits ermöglicht es auch den gezielten Ansatz zur Entwicklung therapeutischer Strategien. Bisher gibt es leider keine spezifischen Therapiemöglichkeiten für ABCA3-vermittelte Erkrankungen. Analog zu den neu entwickelten exogenen niedermolekularen Modulatoren bei Defekten im ABCC7 Transporter könnte auch der strukturell verwandte ABCA3 Transporter mit ähnlichen Substanzen moduliert werden [73]. Bereits identifizierte Korrektoren [66] könnten als chemische Chaperone eine korrekte Proteinfaltung bei Typ 1 Mutationen bewirken und somit das intrazelluläre Trafficking des ABCA3 Transporters wiederherstellen. Ebenso könnten Potentioren den Lipidtransport von ABCA3 Transportern mit Typ 2 Mutationen verbessern,

wie es bereits bei Transportdefekten in ABCB4 [24] und ABCC7 [67] Proteinen beschrieben wurde. Für zukünftige gezielte Therapieversuche bei ABCA3-vermittelten Erkrankungen ist es daher besonders wichtig, die in Patienten neu beobachteten ABCA3 Mutationen eingehend zu charakterisieren und in Gruppen mit denselben zugrundeliegenden und adressierbaren Pathomechanismen einzuteilen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Arbeitsbank Zellkultur	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Blot-Kammer Xcell SureLock™ Minicell	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Blot-Modul Xcell II™ EI9051	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Brutschrank Galaxy® 170R	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Bunsenbrenner Fireboy Plus	INTEGRA Bioscience AG (Zizers, Schweiz)
CCD Kamera DIANA III	Raytest GmbH (Straubenhardt, Deutschland)
CCD Kamera Veleta Side-Mount 2x2K	Olympus Soft Imaging (Münster, Deutschland)
Cellometer® Auto T4 Cell Counter	Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA)
Digital Ultrasonic Cell Sonifier® S-250D	Branson Ultrasonics Corporation (Danbury, USA)
Elektrophorese Power Supply PowerEase 500	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Elektroporationssystem Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Entwicklungskassette	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Entwicklungsmaschine CP 1000	AGFA (Mortsel, Belgien)
Fast Real-Time PCR System 7900HT	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Feinwaage R200D	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Fluoreszenz Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Fluoreszenz Mikroskop Olympus FV1000- IX81	Olympus (Tokio, Japan)
Flüssigstickstofftank Cryo 200	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland)
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inkubationsschüttler Excella® E24	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Kühlschrank (+8 °C)	Liebherr (Ochsenhausen, Deutschland)

Material und Methoden

Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge Rotana 460R	Andreas Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Mehrfachdispenser HandyStep®	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Mikroplatten Spektralphotometer Eon™	BioTek Instruments (Vermont, USA)
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus (Tokio, Japan)
Mini-Zentrifuge Rotilabo®	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
PCR Thermocycler T1	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Pipette Xplorer® 15–300 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipetten Research® Plus (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe Easypet® 4421	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Plattenzentrifuge PerfectSpin P	VWR International GmbH (Erlangen, Deutschland)
Potter-Elvehjem-Homogenisierer (2 ml)	B. Braun Biotech (Göttingen, Deutschland)
Schikanekolben DURAN®	DURAN Group GmbH (Mainz, Deutschland)
Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Spektralphotometer NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermo-Inkubationsmischer Thriller®	VWR International GmbH (Erlangen, Deutschland)
ThermoBlock TDB 120	BioSan (Riga, Lettland)
Transmissions-Elektronenmikroskop Morgagni 268	FEI (Eindhoven, Niederlande)
Ultrazentrifuge Optima™ TLX	Beckman Coulter (Brea, USA)
Universalzentrifuge 16R	Andreas Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Universalzentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vortex Schüttler 7-2020	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Wasserbad Zellkultur	GFL (Burgwedel, Deutschland)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cellometer® Einweg-Zählkammern	Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA)
Elektroporationskuvetten Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Entwicklungsfilm Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Gefriergefäß CryoPure (1,6 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Impfshlingen steril	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroskopiekammern (8-well, mit Poly-L-Lysin)	ibidi (Martinsried, Deutschland)
Pasteurpipetten Glas (225 mm)	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
PCR Gefäßstreifen FrameStrip® 8 Well	4titude (Wotton, United Kingdom)
PCR Platte FrameStar® 96 Well	4titude (Wotton, United Kingdom)
Pipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen Combitips advanced® (5 ml, 10 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße Safe-Lock (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Serologische Einwegpipetten Costar® Stripette® (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Life Science (Corning, USA)
Transfermembran Immobilon®-P PVDF	Merck Millipore (Burlington, USA)
Tris-Acetat Mini-Gel 3–8% NuPAGE® Novex®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkultur-Platten (96-well, 12-well, 6-well)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturflasche T75 (250 ml / 75 cm ²)	Corning Life Science (Corning, USA)
Zellschaber steril	Corning Life Science (Corning, USA)
Zentrifugenröhrchen (10 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen Falcon™ (15 ml, 50 ml)	BD (Franklin Lakes, USA)

3.1.3 Chemikalien und Pufferlösungen

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Agar-Agar	Merck Millipore (Burlington, USA)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Diamidinphenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Diazabicyclooctan (DABCO)	Merck Schuchardt (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol	Merck Millipore (Burlington, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Formaldehyd	Merck Millipore (Burlington, USA)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycerin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Magermilchpulver	Merck Millipore (Burlington, USA)
Methanol	Merck Millipore (Burlington, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Millipore (Burlington, USA)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pre-stained Protein Standard Novex® Sharp	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Protease-Inhibitor Cocktail cOmplete™	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Puromycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Reduced Serum Medium Opti-MEM™, Gibco®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RPMI 1640 Medium + GlutaMAX™, Gibco®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

RPMI 1640 Medium, no phenol red, Gibco®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Terralin® protect	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Triphenyltetrazoliumchlorid (XTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Triton® X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Wasser (nukleasefrei)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

gebrauchsfertige Puffer	Hersteller
Glyco-Buffer 2 (10 ×)	NewEngland BioLabs (Ipswich, USA)
Glyco-Buffer 3 (10 ×)	NewEngland BioLabs (Ipswich, USA)
Glycoprotein Denaturation Buffer (10 ×)	NewEngland BioLabs (Ipswich, USA)
NP-40 (10 %)	NewEngland BioLabs (Ipswich, USA)
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4 ×)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NuPAGE™ Transfer Buffer (20 ×)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NuPAGE™ Tris-Acetat SDS Running Buffer (20 ×)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Radio Immunpräzipitation Puffer (RIPA-Puffer)	
NaCl	150 mM
Tris (pH 8,0)	50 mM
EDTA (pH 8,0)	5 mM
Triton® X-100	1 %
Natriumdeoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
Protease-Inhibitor Cocktail	1 ×

Material und Methoden

Tris-gepufferte Salzlösung mit TWEEN 20 (TBS-T)

NaCl	150 mM
Tris (pH 7,5)	50 mM
TWEEN® 20	0,1 %

Homogenisationspuffer

EDTA (pH 8,0)	1 mM
Protease-Inhibitor Cocktail	1 ×

Resuspensionspuffer

HEPES (pH 7,0)	25 mM
Protease-Inhibitor Cocktail	1 ×

Immunfluoreszenz-Puffer (IF-Puffer)

FCS	10 %
BSA	3 %

Transmissionselektronenmikroskop-Fixiermittel (TEM-Fixiermittel)

HEPES (pH 7,35)	150 mM
Formaldehyd	1,5 %
Glutaraldehyd	1,5 %

Natriumdodecylsulfat-Puffer (SDS-Puffer)

Tris (pH 7,4)	100 mM
EDTA	1 mM
SDS	0,1 %

3.1.4 Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit Pierce™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega (Madison, USA)
ECL Western Blotting Substrat Pierce™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Lightrun Sanger Sequenzierservice	GATC Biotech (Konstanz, Deutschland)
Lipofektamin 3000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Plasmid DNA Midi Prep NucleoBond® Xtra	MACHEREY-NAGEL GmbH (Düren, Deutschland)
Plasmid DNA Mini Prep Kit I peqGOLD	VWR International GmbH (Erlangen, Deutschland)
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England BioLabs (Ipswich, USA)
SuperSignal™ West Femto Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tetro cDNA Synthese Kit	Bioline (London, United Kingdom)

3.1.5 Enzyme

Enzym	Artikelnummer	Hersteller
Endo H	# P0702L	NewEngland BioLabs (Ipswich, USA)
PNGase F	# P0704L	NewEngland BioLabs (Ipswich, USA)

3.1.6 Zelllinien und Plasmide

Zelllinie	Artikelnummer	Hersteller
A549	# ACC 107	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
Escherichia coli	# C 2987	New England BioLabs (Ipswich, USA)

Plasmid	Artikelnummer	Hersteller
pT2/HB Transposon Vektor	# 26557	Addgene (Cambridge, USA)
pCMV(CAT)T7-SB100 Transposase	# 34879	Addgene (Cambridge, USA)

3.1.7 Primer für Site Directed Mutagenesis und qPCR

Alle Primer wurden von metabion international AG (Planegg, Deutschland) hergestellt.

ABCA3 Mutation	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
p.R208W (c.622C>T)	TGGGTACATCTGGGAAGGCTTC	GGTTCTCCGCCATCAGGG
p.Q215K (c.643C>A)	CCTGGCCGTGAAGCATGCTGT	AAGCCTTCCCGGATGTACC
p.R288K (c.863G>A)	GAGAAGGAAAAGAGGCTGAAGGAGTAC	CTGCACGACAGCACGGGC
p.E292V (c.875A>T)	AGGCTGAAGGTGTACATGCGC	CCTTTCCTTCTCCTGCAC
p.M760R (c.2279T>G)	GGCTATCACAGGACGCTGGTG	GGCACCGTATTTCTGCTTG
p.G964D (c.2891G>A)	GGCGAGTACGACAGAACCGTC	CAAGGTCAGCCTCAGCATG
p.K1388N (c.4164G>C)	AGCTCTCCAACGTGTACGAGC	CCTTGATAATCAGAGGTGTG

Gen in der qPCR	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ABCA3	CATGGTCAGCACCTTCTTCA	TTCTGGCTCAGAGTCATCCA
HPRT	GCTGACCTGCTGGATTAC	TGCGACCTGACCATCTT

3.1.8 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-Calnexin (monoklonal, Maus)	Novus Biologicals (Littleton, USA)
Anti-CD63 (monoklonal, Maus)	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
Anti-HA (monoklonal, Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-HA (monoklonal, Ratte)	Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland)
HRP-konjugiertes Anti-β-Aktin	Santa Cruz (Dallas, USA)

Sekundärantikörper	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Alexa Fluor® 555 Anti-Maus IgG (Ziege)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HRP-konjugiertes Anti-Ratte IgG (Kaninchen)	Southern Biotech (Birmingham, USA)

3.1.9 Software

Software	Version	Entwickler
AxioVision	4.7	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Clone Manager Suite	6.0	Sci-Ed Software (Denver, USA)
GraphPad Prism	6.0	GraphPad Software (La Jolla, USA)
ImageJ	1.5	Wayne Rasband (National Institutes of Health, USA)
NEBaseChanger™	1.2	New England BioLabs (Ipswich, USA)
Olympus FluoView	4.2	Olympus (Tokio, Japan)

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der zu untersuchenden ABCA3 Missense Mutationen

Alle in dieser Arbeit untersuchten Mutationen im ABCA3 Gen wurden im Vorhinein bei Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung (ILD) entdeckt. Es wurde eine Auswahl basierend auf der variablen Ausprägung der jeweiligen ILD getroffen, sodass sowohl Mutationen von Patienten mit schwer ausgeprägter neonataler Erkrankung und Tod, als auch solche von Patienten mit einem limitierten Verlauf der Erkrankung vertreten waren. Neben den bisher noch nicht untersuchten neu identifizierten Variationen p.R208W, p.M760R und p.K1388N wurden außerdem die Variationen p.R288K und p.G964D sowie die bereits in der Literatur charakterisierten ABCA3 Variationen p.Q215K und p.E292V als interne Kontrollen ausgewählt. Eine Übersicht über den klinischen Verlauf und die Schwere der ILD von Patienten mit den jeweiligen ausgewählten ABCA3 Mutationen gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Patientendaten zu den ausgewählten ABCA3 Variationen.

Klinischer Verlauf und Schwere derILD von ausgewählten Patienten, deren detektierte ABCA3 Variationen in dieser Arbeit untersucht wurden. ANS: Atemnotsyndrom des Neugeborenen, CPI: chronische Pneumonitis des Kindesalters, IIP: idiopathische interstitielle Pneumonie, ILD: interstitielle Lungenerkrankung, UIP: gewöhnliche interstitielle Pneumonie.

ABCA3 Variation	p.E292V	p.K1388N	p.Q215K	p.M760R	p.R208W	p.R288K	p.G964D
Genetische Analyse der Patienten	homozygot c.875A>T (p.E292V)	homozygot c.4164G>C (p.K1388N)	kombiniert homozygot c.643C>A (p.Q215K) c.863G>A (p.R288K)	kombiniert heterozygot c.2279T>G (p.M760R) c.622C>T (p.R208W)	homozygot c.863G>A (p.R288K)	homozygot c.2891G>A (p.G964D)	homozygot c.2891G>A (p.G964D)
Krankheitsbeginn	ANS vs. fibrotische Lungenerkrankung im Erwachsenenalter	ANS	ANS	ANS	ANS	Nicht vorhanden	vermutlicher Beginn mit 6 Monaten
Histologie der Lunge	Nicht vorhanden	CPI, Anteil eosinophiler Granulozyten erhöht	IIP, elektronendichte Einschlüsse in Typ II Pneumozyten	im 1. Lebensmonat: IIP mit 3,5 Jahren: CPI mit 5 Jahren: diffuse ILD	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	mit 20 Jahren: UIP
Klinischer Verlauf	Tod nach 1 Monat vs. Überleben bis ins Erwachsenenalter	Tod nach 9 Wochen	Tod nach 23 Tagen	initial Kortikosteroide und Hydroxychloroquin, nach 3,5 Jahren: Verschlechterung, mit 5 Jahren: Lungentransplantation	Nicht vorhanden	mit 11 Jahren: Trommelschlägelfinger mit 13 Jahren: Belastungsdyspnoe mit 16 Jahren: UIP	
Schwere des Erscheinungsbildes (Phänotyp)	frühe Letalität mit neonatalem Tod vs. längeres Überleben	frühe Letalität mit neonatalem Tod	frühe Letalität mit neonatalem Tod	frühe Letalität mit postneonatalem Tod (bzw. Lungentransplantation)	längere Überlebensdauer, ILD im Verlauf	längere Überlebensdauer, ILD im Verlauf	
Referenz	Wambach et al., 2014 Turcu et al., 2013 Coghlan et al., 2014	Wittmann, Schindlbeck et al., 2016	Brasch et al., 2006 Kroner et al., 2017	Doan et al., 2008	Wittmann, Frixel et al., 2016	Campo et al., 2014	

3.2.2 Klonierung der ABCA3 Expressionsvektoren

Für eine ausreichend hohe zelluläre Expression von ABCA3 wurde humane ABCA3 cDNA (Referenzsequenz NM_001089) an einen Cytomegalievirus (CMV)-Promotor gekoppelt. Um das von den Zellen exprimierte ABCA3 in allen Versuchen schnell und einfach detektieren zu können, wurde es außerdem mit einem C-terminalen Hämagglutinin (HA)-Tag versehen. Die so entstandene CMV-ABCA3-HA-Sequenz wurde in einen pT2/HB-Transposon-Vektor kloniert (Abbildung 6).

Puromycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, welches die Biosynthese von Proteinen hemmt und somit einen zytotoxischen Effekt auf A549 Zellen ausübt. Ein Puromycin-Resistenzgen mit zugehörigem Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor wurde ebenfalls in den pT2/HB-Transposon-Vektor eingefügt (Abbildung 6), sodass im Folgenden erfolgreich transfizierte Zellen durch die Zugabe von Puromycin in das Zellkulturmedium selektiert werden konnten.

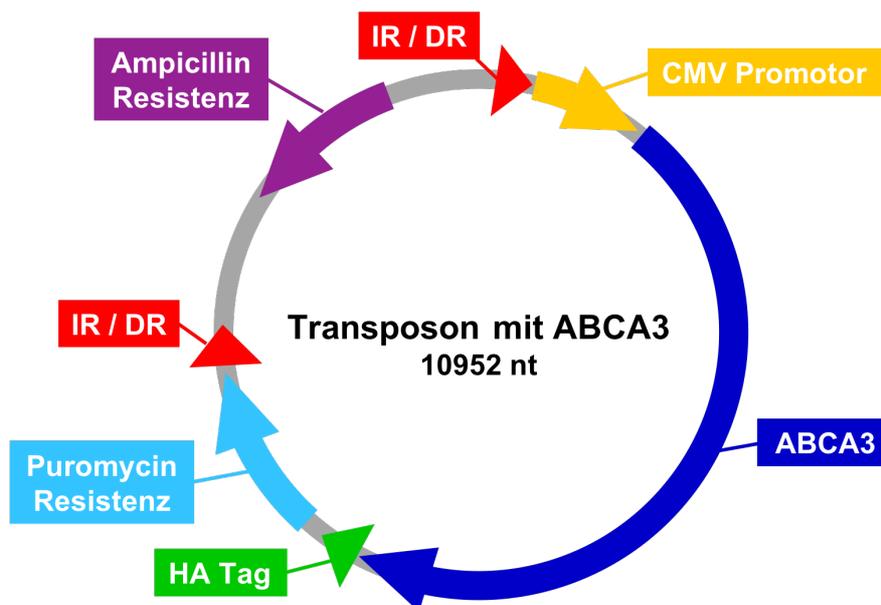


Abbildung 6: Vektorkarte des pT2/HB-Transposon-Vektors mit humanem ABCA3.

Schematische Darstellung des klonierten Expressionsvektors mit DNA Abschnitten, welche für den humanen ABCA3 Transporter (dunkelblau) mit CMV-Promotor (gelb) und HA-Tag (grün), sowie für eine Puromycinresistenz mit zugehörigem Promotor (hellblau) kodieren. Flankierende, sich gegenläufig wiederholende Endsequenzen (inverted repeats, IR mit direct repeats, DR, rot dargestellt) dienen als Schnittstellen für die zur stabilen Transfektion verwendete Sleeping Beauty Transposase SB100. Nach einem bakteriellen Replikationsursprung findet sich in umgekehrter Leserichtung eine Ampicillinresistenz mit zugehörigem Promotor (lila). nt: Nucleotide.

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte in den folgenden Versuchen nicht durch den Prozess der stabilen Transfektion an sich beeinflusst wurden, wurde bei allen Versuchen eine Mock-Kontrolle mitgeführt. Hierfür wurde zusätzlich ein sogenannter Leervektor erstellt, welcher nur aus dem pT2/HB-Transposon-Vektor und dem Puromycin-Resistenzgen mit zugehörigem PGK-Promotor bestand. Diese Klonierungen wurden im Vorfeld von Dr. rer. nat. Thomas Wittmann durchgeführt und beide resultierenden Vektoren wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

In die ABCA3 Sequenz des Expressionsvektors (Abbildung 6) wurden die jeweiligen zu untersuchenden Punktmutationen durch gezielte Mutagenese mithilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kits eingefügt. Kurze ABCA3 DNA Sequenzabschnitte mit der gewünschten Mutation wurden hierfür mit der Software NEBaseChanger™ entworfen sowie von Metabion synthetisiert und dienten in einer folgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als sogenannte „Mismatch Primer“ (aufgelistet in Abschnitt 3.1.7). Durch Anlagerung dieser „Mismatch Primer“ an die komplementäre DNA des Expressionsvektors und anschließender Elongation im Rahmen der PCR entstanden die jeweiligen gezielt mutierten Plasmidvektoren. Alle Vektoren wurden durch eine Lightrun Sanger Sequenzierung verifiziert, zur Sequenz Analyse wurde die Software Clone Manager Suite verwendet.

Insgesamt wurden somit folgende Plasmidvektoren erstellt: pT2/HB-Puro als Leervektor und pT2/HB-Puro-ABCA3-HA als ABCA3 Wildtyp sowie jeweils mit den gezielt eingebrachten Mutationen c.622C>T (p.R208W), c.643C>A (p.Q215K), c.863G>A (p.R288K), c.875A>T (p.E292V), c.2279T>G (p.M760R), c.2891G>A (p.G964D), c.4164G>C (p.K1388N). Es wurde die standardisierte Nomenklatur für die Beschreibung von Sequenzvariationen verwendet, hierbei steht der Buchstabe „c“ für die cDNA Sequenz und der Buchstabe „p“ für die entsprechende Proteinsequenz der jeweiligen ABCA3 Variation. In dieser Arbeit wurde zur besseren Übersicht nur die Schreibweise für die Proteinsequenz der ABCA3 Varianten verwendet.

3.2.3 Vervielfältigung der Plasmidvektoren

Der verwendete pT2/HB-Transposon-Vektor enthielt zusätzlich ein Ampicillin-Resistenzgen im Leseraster nach dem bakteriellen Replikationsursprung, sodass dieses von *E. coli* abgelesen werden konnte (Abbildung 6). Ampicillin ist ein β -Laktam-Antibiotikum mit bakterizider Wirkung, da es die Neusynthese einer stabilen Zellwand während der bakteriellen Zellteilung

verhindert. Zur Vervielfältigung wurden die klonierten Plasmidvektoren mit dem Ampicillin-Resistenzgen einzeln mittels Elektroporation bei 1,80 kV in *E. coli* eingebracht, unter Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien durch Ampicillin im Kulturmedium vervielfältigt und anschließend mithilfe des Plasmid DNA Prep Kits isoliert. Als Reserve wurden außerdem 0,5 ml der jeweils bereits selektierten Bakteriensuspension in 0,5 ml Glycerin (80 %) eingefroren.

3.2.4 Aussaat und Kultur der A549 Zellen

Alle beschriebenen Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt und es wurden stets sterile Materialien und Reagenzien verwendet.

Die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagerten A549 Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend zu 10 ml RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10 % fetalem Kälber-Serum (FCS) in eine T75 Zellkulturflasche gegeben. FCS enthält neben wichtigen Wachstumsfaktoren zur Kultivierung von Zellen auch Proteaseinhibitoren, welche z. B. Trypsin inaktivieren können. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert und das mit FCS ergänzte Medium wurde für eine optimale Nährstoffversorgung regelmäßig gewechselt. Alle 2–3 Tage wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % im Verhältnis 1:10 passagiert, um eine Verlangsamung der zellulären Proliferationsrate durch Kontaktinhibition zu vermeiden. Für die Passage wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt und die verbleibenden adhären Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert, um sie vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach 10 min wurde das Trypsin durch die Zugabe von 5 ml Medium mit FCS inaktiviert. 9 ml der resultierenden Zellsuspension wurden abgenommen und durch frisches Medium mit FCS ersetzt.

Alle für Versuche verwendeten Zellen wurden nicht öfter als zehnmal passagiert. Für die einzelnen Experimente wurde die Konzentration der bei der Passage entstandenen Zellsuspension mit dem Zellzähler Cellometer bestimmt, die gewünschte Zellkonzentration durch Verdünnung mit Medium und 10 % FCS hergestellt und in den jeweiligen Zellkulturplatten ausgesät.

In regelmäßigen Abständen wurden Reserven angelegt. Hierfür wurde ein Teil der Zellsuspension 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das gewonnene Zellpellet vorsichtig in 1 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 10 % DMSO gelöst.

DMSO verhindert die Eiskristallisation und damit eine Zellschädigung während des Einfrierprozesses. Um einen kontinuierlichen Temperaturabfall von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute zu gewährleisten, wurden die Zellen in dem Gefrierbehälter Mr. Frosty™ auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.5 Stabile Transfektion von A549 Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von fremder DNA in eine eukaryotische Zelle. Wird diese DNA dauerhaft in das Genom der Zelle eingebaut, handelt es sich um eine stabile Transfektion. In dieser Arbeit wurde die stabile Transfektion mithilfe des Sleeping-Beauty-Transposon-Systems umgesetzt [36, 57]. Dafür wurde die gewünschte DNA (wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben) in einen Transposon-Vektor mit flankierenden, sich gegenläufig wiederholenden Endsequenzen kloniert. Diese Endsequenzen fungierten als Schnittstellen für die zugehörige Sleeping Beauty Transposase SB100 (Abbildung 7), welche so gezielt den Abschnitt mit der zu transfizierenden DNA aus dem Vektor freisetzen und in das Genom der Zelle einfügen konnte.

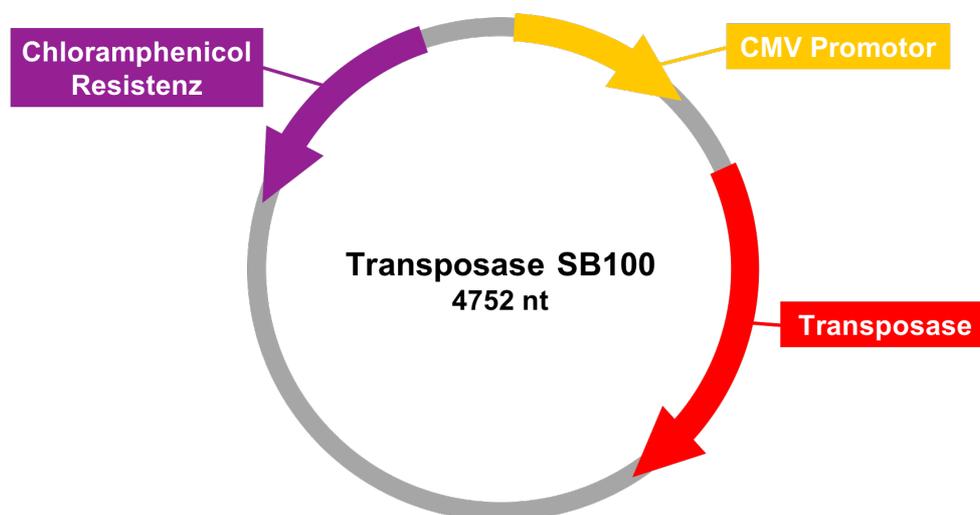


Abbildung 7: Vektorkarte des Transposase-SB100-Vektors.

Schematische Darstellung des Expressionsvektors mit DNA Abschnitten, welche für die Sleeping Beauty Transposase SB100 (rot) mit CMV-Promotor (gelb) kodieren. Nach einem bakteriellen Replikationsursprung findet sich in umgekehrter Leserichtung eine Chloramphenicolresistenz mit zugehörigem Promotor (lila). nt: Nukleotide.

Die folgenden Schritte wurden für jeden der klonierten Plasmidvektoren (Leervektor, ABCA3 Wildtyp, p.R208W, p.Q215K, p.R288K, p.E292V, p.M760R, p.G964D, p.K1388N) separat durchgeführt. A549 Zellen wurden mit einer Konzentration von 400.000 Zellen / ml in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % nach 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die stabile Transfektion durch Lipofektion mit Lipofektamin 3000. Hierfür wurden 4 µg DNA (bestehend aus dem klonierten Plasmidvektor und Transposase im Verhältnis 5:2) mit 8 µl P3000 in Opti-MEM gelöst, anschließend mit 7,5 µl Lipofektamin 3000 vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die nun in Liposomen eingeschlossene DNA wurde in die entsprechenden Wells der Zellkulturplatte pipettiert und konnte so von den ausgesäten Zellen aufgenommen werden. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank begann die Selektion transfizierter Zellen durch die Zugabe von Puromycin (1 µg / ml) in das Zellkulturmedium. 7 Tage später wurden die erfolgreich selektierten Zellen durch eine Verdünnung auf 5 Zellen / ml in 96-Well-Zellkulturplatten mit 200 µl pro Well vereinzelt und weiter kultiviert. Sobald unter dem Mikroskop ein aus einer Zelle hervorgegangener Zellherd in einem Well der Zellkulturplatte sichtbar war, wurde dieser separat gelöst, sukzessive in größere Zellkulturgefäße umgesetzt und dauerhaft mit 1 µg / ml Puromycin in RPMI 1640 Medium und 10 % FCS kultiviert.

Die erfolgreiche stabile Transfektion der einzelnen Zellklone wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung, quantitativer Echtzeit-PCR und Western Immunoblotting verifiziert (s. u.).

3.2.6 qPCR und Auswahl der Zellklone

Die Auswahl der Zellklone erfolgte anhand deren jeweiliger ABCA3 Expression in Relation zu der unabhängig exprimierten Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), welche mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ermittelt wurde. Dabei wurde aus mRNA gewonnene cDNA nach dem Prinzip der herkömmlichen PCR vervielfältigt und zusätzlich durch den fluoreszierenden DNA-Farbstoff SYBR® Green quantifiziert.

In der Zellkultur gewonnene Zellsuspensionen (1 ml) wurden 5 min bei 300 × g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde zur Reinigung vorsichtig in DBPS gelöst und erneut 5 min bei 300 × g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Isolation der totalen RNA aus dem Zellpellet gemäß Herstellerangaben des RNA Isolation Kits. Die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA wurde mithilfe des Spektralphotometers Nanodrop gemessen und jeweils 1 µg RNA nach den Herstellerangaben des cDNA

Synthese Kits durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. In der qPCR wurden 0,8 µl der synthetisierten totalen cDNA, die ABCA3- bzw. HPRT1-Primerpaare sowie der SYBR® Green PCR Mastermix verwendet. Die Spezifität der entstandenen Produkte wurde nach abgelaufener qPCR anhand einer zusätzlichen Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Die jeweilige ABCA3 Genexpression in Relation zu dem Haushaltsgen HPRT1 wurde mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet [76] und Zellklone mit vergleichbarer Überexpression des ABCA3 Gens wurden für die weiteren Versuche ausgewählt.

3.2.7 Western Immunoblotting

Die intrazellulären ABCA3 Proteinlevel sowie die proteolytische Spaltung und damit der Abbau des ABCA3 Proteins wurden mit dem Western Immunoblot untersucht. Neben dem HA-Tag des ABCA3 Proteins wurde auch das unabhängig exprimierte Haushaltprotein β -Aktin als Ladekontrolle mit spezifischen Antikörpern markiert und detektiert.

In der Zellkultur gewonnene Zellsuspensionen (8 ml) wurden 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde zur Reinigung vorsichtig in DBPS gelöst und erneut 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in RIPA-Puffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Durch die im RIPA-Puffer enthaltenen verschiedenen Tenside (Triton® X-100, Natriumdeoxycholat, SDS) wurden die Zellen aufgeschlossen, Proteine aus ihren Membranen gelöst und denaturiert. Die Aktivität von dabei freigesetzten zelleigenen Proteasen wurde durch ebenfalls im Puffer enthaltene Protease-Inhibitoren gehemmt. Die Zelllysate wurden 30 min bei $1.000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert und der Gesamtproteingehalt im postnuklearen Überstand mithilfe des BCA Protein Assay Kits und einer BSA-Verdünnungsreihe als Standard bestimmt. 20 µg Gesamtprotein aus den jeweiligen Zelllysaten wurden zur Spaltung vorhandener Disulfidbrücken mit 10 % Dithiothreitol (DTT) sowie NUPAGE® Lithiumdodecylsulfat (LDS) Puffer versetzt. Es folgte die Inkubation für 10 min bei $70^\circ C$ um letzte noch vorhandene Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Ein 3–8 % Tris-Acetat-Gradientengel wurde mit den Proteinproben sowie dem Novex® Proteinstandard beladen und die Elektrophorese mit 150 V und 100 mA bei einer Laufzeit von 80 min durchgeführt. Die im Gradientengel separierten Proteine wurden mit 100 V und 220 mA bei einer Laufzeit von 2 h auf eine vorher in Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Anschließend wurden die verbleibenden freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran 1 h mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T-

Puffer geblockt. Alle im Folgenden verwendeten Antikörper wurden ebenfalls mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer verdünnt, bevor sie auf die Membran gegeben wurden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-HA aus der Ratte, 1:1.000) sowie dem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Anti- β -Aktin (1:50.000) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach ca. 14 h wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Ratte, 1:5.000) für 1 h inkubiert. Das an die Antikörper gekoppelte Enzym HRP katalysiert die Oxidation von Substraten wie Luminol und erzeugt dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches durch zusätzliche Verstärkung im Rahmen der Enhanced Chemiluminescence (ECL) detektiert werden kann. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran in TBS-T für 10 min wurde diese in einer Entwicklungskassette vollständig mit ECL Substrat bedeckt. Die auf diese Weise detektierten spezifischen Proteinbanden wurden in einer Dunkelkammer auf Entwicklungsfilm abgebildet und anschließend entwickelt. Alle Filme wurden mit demselben Office Scanner mit stets gleichen Parametern und abgeschalteter automatischer Verstärkungsregelung eingescannt und als digitale Bilddatei zur Auswertung abgespeichert.

Die Signaldichte der ABCA3 Proteinbanden mit vergleichbarer Ladekontrolle β -Aktin wurde mithilfe der Software ImageJ quantifiziert [35] und in Relation zu dem ABCA3 Wildtyp gesetzt. Zur Quantifizierung der proteolytischen Spaltung von ABCA3 wurde jeweils die Bande mit dem gespaltenen, kleineren Protein in Relation zu der Bande mit dem noch ungespaltenen, größeren Protein gesetzt.

3.2.8 XTT-Assay

Die ausgewählten stabilen ABCA3 Zellklone wurden mit einer Konzentration von 50.000 Zellen / ml in phenolrotfreiem RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und 4, 24, 48, 72 oder 96 h inkubiert. Um die Zellviabilität der einzelnen Klone nach der jeweiligen Inkubationszeit zu bestimmen, wurde Triphenyltetrazoliumchlorid (XTT)-Salz in phenolrotfreiem RPMI 1640 Medium gelöst (1 mg / ml XTT) und mit Phenazinmethosulfat (PMS) zu den Zellen gegeben. Metabolisch aktive Zellen reduzieren das gelbliche XTT in Anwesenheit des Elektronentransporters PMS zu orangefarbenem, wasserlöslichen Formazan. Nach 30 min Inkubation im dunklen Brutschrank wurde mit einem Spektralphotometer die spezifische Absorption des jeweils entstandenen Formazans bei 450 nm gemessen und das Hintergrundsignal der Zellkulturplatte bei 650 nm von diesem Wert subtrahiert.

3.2.9 LDH-Assay

Die ausgewählten stabilen ABCA3 Zellklone wurden mit einer Konzentration von 20.000 Zellen / ml in phenolrotfreiem RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und entweder 4 oder 96 h inkubiert. Um die Konzentration der von geschädigten Zellen sezernierten Laktatdehydrogenase (LDH) zu messen, wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit das Medium von den Zellen abgenommen und 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Zu dem resultierenden Überstand wurde nach den Angaben des CytoTox96® Assay Kits ein Substrat-Mix mit Iodonitrotetrazolium (IND)-Salz hinzugegeben, welches von vorhandener LDH zu rötlichem Formazan umgesetzt wird. Nach 30 min Inkubation unter Lichtabschirmung wurde die LDH-Aktivität durch Zugabe einer Essigsäure-Lösung gehemmt und die spezifische Absorption des umgesetzten Formazans bei 490 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt.

3.2.10 N-Glykosylierung

Im Rahmen der posttranslationalen N-Glykosylierung werden im ER mannosereiche Oligosaccharidketten an die Aminogruppen von Proteinen gebunden und im GA zu komplexen Oligosaccharidketten modifiziert. Die Peptid N-Glycosidase (PNGase) F ist ein Enzym, welches sowohl die mannosereichen als auch die komplexen Oligosaccharide von diesen Aminogruppen abspalten kann. Das Enzym Endoglycosidase (Endo) H hingegen kann nur die mannosereichen, nicht aber die komplexen Oligosaccharide abspalten. Die verbleibende N-Glykosylierung nach dem Verdau mit Endo H lässt daher Rückschlüsse auf den Grad der posttranslationalen Modifikation des ABCA3 Proteins im GA zu.

In der Zellkultur gewonnene Zellsuspensionen (6 ml) wurden 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem Homogenisationspuffer resuspendiert und die Zellen in einem Potter-Elvehjem-Homogenisierer mit 30 Stößen auf Eis aufgebrochen. Die Probe wurde zusätzlich 40 s auf Eis im Puls-Modus (0,8 s Ultraschall gefolgt von 0,2 s Pause) sonifiziert. Die Zellysate wurden 20 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $700 \times g$ zentrifugiert und der resultierende postnukleare Überstand für 1 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $100.000 \times g$ in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach Absaugen des cytosolischen Überstandes wurde das Membranpellet in 100 μl eiskaltem Resuspensionspuffer gelöst und die Proteinkonzentration mithilfe des BCA Protein Assay Kits und einer BSA-Verdünnungsreihe als Standard bestimmt.

Zur Denaturierung wurden 20 µg des Gesamtmembranproteins mit Glycoprotein Denaturation Puffer versetzt und 10 min bei 100 °C im Thermoblock inkubiert. Anschließend erfolgte der Enzymverdau mit Endo H und Glyco-Buffer 3 oder PNGase F und Glyco-Buffer 2 sowie NP-40 nach den Angaben des Herstellers für 1 h bei 37 °C.

Die nun teilweise bzw. vollständig deglykosylierten Proben wurden (wie in 3.2.7 beschrieben) mit 10 % DTT und NUPAGE® LDS Puffer vervollständigt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Ein 3–8 % Tris-Acetat-Gradientengel wurde mit den Proteinproben sowie dem Novex® Proteinstandard beladen und die Elektrophorese mit 150 V und 100 mA bei einer Laufzeit von 6 h in einer Kühlkammer durchgeführt. Die im Gradientengel separierten Proteine wurden im Rahmen des Western Immunoblottings mit 100 V und 220 mA bei einer Laufzeit von 2 h auf eine vorher in Methanol aktivierte PVDF-Membran transferiert und die verbleibenden freien Bindungsstellen 1 h mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-HA aus der Ratte, 1:1.000 verdünnt mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach ca. 14 h wurde die Membran dreimal in TBS-T für 10 min gewaschen und mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Ratte, 1:10.000 verdünnt mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T-Puffer) für 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran in TBS-T für 10 min wurde diese vollständig mit SuperSignal™ Femto HRP Substrat bedeckt. Das Signal der so detektierten Proteinbanden wurde mit der CCD Kamera DIANA aufgenommen und als digitale Bilddatei zur Auswertung abgespeichert.

Die Signaldichte der aufgetrennten Proteinbanden nach Verdau mit Endo H wurde mithilfe der Software ImageJ quantifiziert [35] und die Bande mit den verbleibenden komplexen Oligosacchariden in Relation zu der Bande mit den abgespaltenen mannosereichen Oligosacchariden gesetzt.

3.2.11 Immunfluoreszenzfärbung

Die intrazelluläre Lokalisation des ABCA3 Proteins sowie das durchschnittliche Volumen der ABCA3 Vesikel wurde mit einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung ermittelt. Hierbei wurden die jeweiligen Zielstrukturen durch spezifische sowie an unterschiedlich fluoreszierendem Farbstoff gebundene Antikörper markiert.

Die ausgewählten stabilen ABCA3 Zellklone wurden mit einer Konzentration von 150.000 Zellen / ml in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS in 8-Well-Mikroskopiekammern

ausgesät und 48 h inkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % wurde das Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen vorsichtig zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend 20 min mit 3,7 % Formaldehyd in DPBS fixiert. Nach Absaugen der Formaldehydlösung und erneutem Waschen der adhärenen Zellen mit DPBS wurden noch vorhandene Formaldehydreste 10 min mit 0,1 M Glycin in DPBS inaktiviert. Die Zellen wurden erneut in DPBS gewaschen und mit 0,5 % Triton X-100 in DPBS für 10 min permeabilisiert. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min mit IF-Puffer sowie die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 3) für 60 min. Nach dreimaligem Waschen in DPBS wurden die Zellen lichtgeschützt 30 min mit den zugehörigen Alexa Fluor Sekundärantikörpern (Tabelle 3) inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal in DPBS gewaschen und die Zellkerne 15 min mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI (0,1 µg / ml, Exzitation 358 nm, Emission 461 nm) gefärbt. Nach einem letzten Waschvorgang in DPBS wurden die gefärbten Zellen mit Mounting Medium (90 % Glycerin und 2 % DABCO in DPBS) bedeckt und unter einem konfokalen Laserraster-Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung.

Zielstruktur	Primärantikörper (1:150 in IF-Puffer)	Sekundärantikörper (1:150 in IF-Puffer)	Exzitation [nm]	Emission [nm]
ABCA3-HA	Anti-HA (Kaninchen)	Anti-Kaninchen 488	495	519
CD63	Anti-CD63 (Maus)	Anti-Maus 555	555	565
Calnexin	Anti-Calnexin (Maus)	Anti-Maus 555	555	565

Zur Lokalisationsbestimmung wurden die mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern markierten Strukturen nacheinander und jeweils zusammen mit DAPI angeregt. Die jeweils an derselben Stelle aufgenommenen Bilder wurden übereinandergelegt, sodass sich im Falle einer Kolo-kalisation durch die Überlagerung der detektierten Signale eine Farbänderung ergab.

Um die jeweiligen Durchmesser der angefärbten ABCA3-HA Vesikel zu ermitteln, wurden axiale Bildstapel-Serien (Z stacks) mit einer Höhe von je 0,4 µm aufgenommen und mit der Software ImageJ ausgewertet [44]. Die Volumina von 60 verschiedenen, aus drei unabhängigen Experimenten zufällig ausgewählten ABCA3-HA Vesikeln wurden mit der folgenden Formel berechnet:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3$$

V: Volumen, d: Durchmesser der einzelnen Vesikel

Die jeweiligen Vesikelvolumina wurden von Stefanie Höppner ermittelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.12 Transmissionselektronenmikroskopie

Aus den Kulturflaschen der ausgewählten stabilen ABCA3 Zellklone wurde bei einer Konfluenz von 80 % das Medium abgenommen. Es wurden 10 ml TEM-Fixiermittel auf die adhärennten Zellen gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um sie vollständig zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber aus der Zellkulturflasche abgelöst und gekühlt an Dr. rer. nat. Jan Hegermann (Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland) geschickt, der alle folgenden Arbeitsschritte durchführte. Nach sukzessiver Dehydratation in Aceton wurden die fixierten Zellen in Epon eingebettet und 50 nm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und unter einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet, Bilder der jeweiligen zellulären Ultrastrukturen wurden mit der CCD Kamera Veleta aufgenommen und von Dr. rer. nat. Jan Hegermann analysiert.

3.2.13 Lipid Analysen

Die ausgewählten stabilen ABCA3 Zellklone wurden mit einer Konzentration von 100.000 Zellen / ml in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 48 h Inkubation wurde das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen zweimal mit DBPS gewaschen. Es folgte die Lyse der Zellen in den Wells der Zellkulturplatte durch Zugabe von insgesamt jeweils 1 ml SDS-Puffer (0,1 % SDS). Die Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde mithilfe des BCA Protein Assay Kits und einer BSA-Verdünnungsreihe als Standard bestimmt und die Proben anschließend bei -80 °C gelagert. Die in den Zelllysaten enthaltenen Lipide wurden von Dr. rer. nat. Gerhard Liebisch (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg, Deutschland) mit einer Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) durch Erzeugung positiv geladener Ionen analysiert. Die vermessenen Lipidmengen wurden dabei basierend auf dem absoluten Proteingehalt der jeweiligen Zelllysate normiert.

3.2.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung und Erstellung der Graphen wurde die Software Graph Pad Prism 6.0 verwendet.

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurde nach einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Tukey Test für multiple Mittelwertvergleiche angewendet um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zu ermitteln. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Zur besseren Übersicht wurden nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem ABCA3 Wildtyp und den jeweiligen untersuchten Zellklonen in den Graphen eingezeichnet. Sofern nicht anders angegeben, gilt:

*	=	$p < 0,05$	***	=	$p < 0,001$
**	=	$p < 0,01$	****	=	$p < 0,0001$

4 Ergebnisse

4.1 Generierung von Zelllinien mit ABCA3 Expression

Um die Effekte der ausgewählten unterschiedlichen ABCA3 Mutationen ausreichend untersuchen und beurteilen zu können, wurde ein geeignetes Zellmodell für *in vitro* Versuche benötigt. Hierfür wurden humane A549 Zelllinien generiert, welche das Protein ABCA3 mit genau der entsprechenden, jeweils im Patienten entdeckten Mutation exprimierten. Die benötigten individuell konstruierten Expressionsvektoren wurden mithilfe des Sleeping-Beauty-Transposon-Systems in das Genom der Zelle eingebracht. Dies führte zu einer dauerhaften stabilen Expression der unterschiedlichen ABCA3 Proteine in den Zellen und damit zu reproduzierbaren und untereinander vergleichbaren Ergebnissen.

Unter allen erfolgreich transfizierten und selektierten Zellklonen wurden pro ABCA3 Mutation und Wildtyp jeweils ein Klon anhand seiner ABCA3 mRNA Expression für die weiteren Versuche ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass die ausgewählten Klone ähnliche ABCA3 mRNA und Proteinlevel aufwiesen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse zu erzielen.

4.1.1 Vergleichbare mRNA Expression ausgewählter Zellklone

Die ABCA3 mRNA Expression der erfolgreich transfizierten Zellklone wurde mithilfe einer qPCR quantifiziert und in Relation zu mit dem Leervektor transfizierten Zellen gesetzt (Abbildung 8). Es konnten Zellklone mit einer jeweils etwa 200-fachen mRNA Überexpression des ABCA3 Wildtyps und der einzelnen Variationen identifiziert und für weitere Versuche ausgewählt werden. Einzige Ausnahme bildete hier die Variation p.M760R, bei welcher selbst der ausgewählte Klon mit dem höchsten gemessenen ABCA3 mRNA Level nur eine etwa 100-fache Überexpression erreichte. Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse aus 6 voneinander unabhängigen Versuchsreihen mit nachfolgendem Dunnett Test für multiple Mittelwertvergleiche mit dem Leervektor durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl für den ABCA3 Wildtyp als auch für alle ABCA3 Variationen außer p.M760R eine statistisch signifikante mRNA Überexpression erzielt werden konnte.

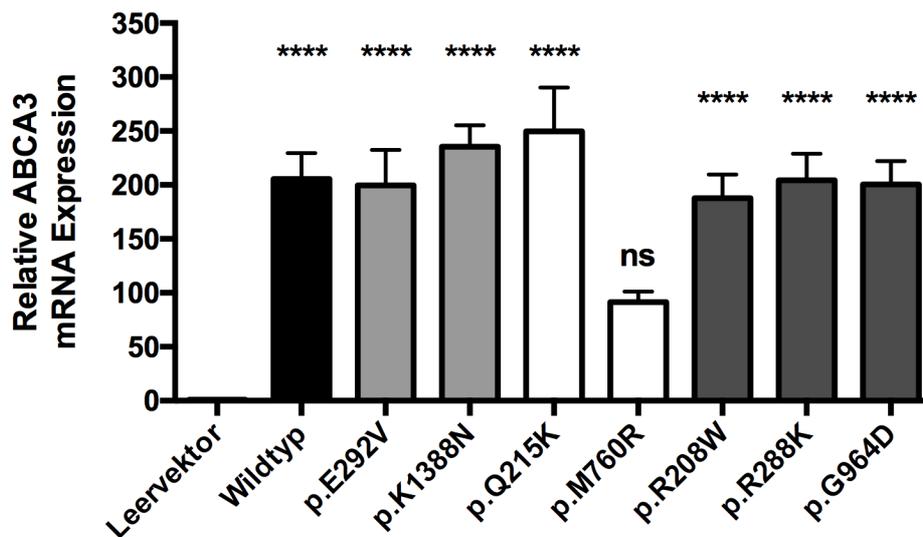


Abbildung 8: Relative ABCA3 mRNA Expression der ausgewählten Zellklone.

Relative ABCA3 mRNA Expression in A549 Zellen nach stabiler Transfektion des ABCA3 Wildtyps sowie der Variationen p.E292V, p.K1388N, p.Q215K, p.M760R, p.R208W, p.R288K und p.G964D. ABCA3 mRNA Level wurden mittels qPCR quantifiziert und in Relation zu dem ABCA3 mRNA Level von mit dem Leervektor transfizierten A549 Zellen gesetzt.

4.1.2 Vergleichbare Proteinexpression ausgewählter Zellklone

Die ABCA3 Proteinexpression der ausgewählten Zellklone wurde im Western Immunoblot mittels Densitometrie ermittelt und in Relation zu dem ABCA3 Proteingehalt von mit dem Wildtypgen transfizierten A549 Zellen gesetzt (Abbildung 9). Es zeigte sich, dass die ausgewählten Zellklone eine untereinander vergleichbar hohe Proteinexpression aufwiesen. Der mit der Variante p.M760R transfizierte Zellklon präsentierte sich hier, analog zur bereits beschriebenen niedrigeren ABCA3 mRNA Expression, mit einem im Vergleich ebenfalls verminderten ABCA3 Proteingehalt. Unter Verwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse aus 6 voneinander unabhängigen Versuchsreihen und dem Dunnett Test für multiple Mittelwertvergleiche mit dem Wildtyp konnten keine statistischen Unterschiede ermittelt werden, auch nicht für die ABCA3 Variante p.M760R.

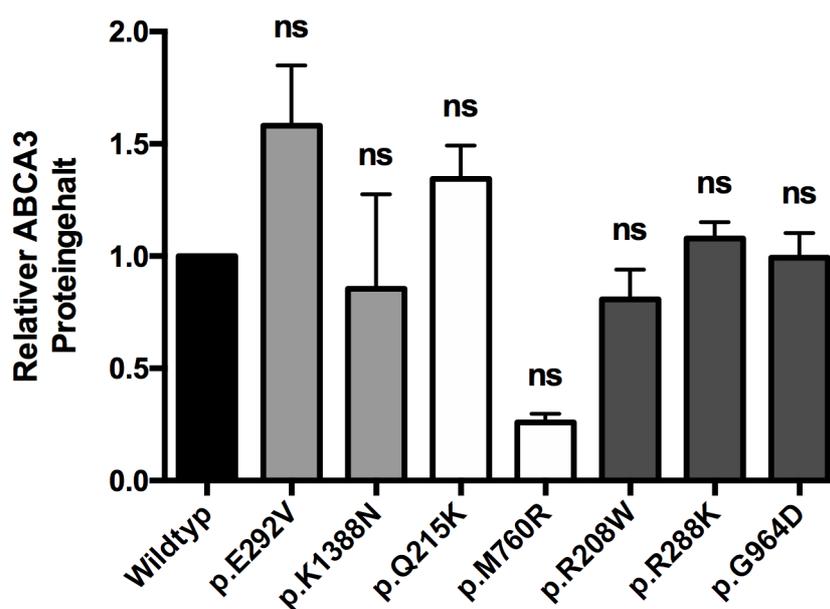


Abbildung 9: Relative ABCA3 Proteinexpression der ausgewählten Zellklone.

Relativer ABCA3 Proteingehalt in A549 Zellen nach stabiler Transfektion des ABCA3 Wildtypgens sowie der ABCA3 Variationen p.E292V, p.K1388N, p.Q215K, p.M760R, p.R208W, p.R288K und p.G964D. Der ABCA3 Proteingehalt der Zellen wurde mittels Densitometrie aus Western Immunoblots von Gesamtzelllysaten quantifiziert und in Relation zu dem ABCA3 Proteingehalt von mit dem Wildtypgen transfizierten A549 Zellen gesetzt.

4.2 Einfluss der stabilen Transfektion von ABCA3 auf die Zelle

4.2.1 Zellviabilität der ausgewählten ABCA3 Klone

Die durch die stabile Transfektion in das Genom der Zelle eingebrachten Mutationen können die Lebensfähigkeit der Zelle und damit auch alle weiteren Versuche beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurde die Viabilität der ausgewählten ABCA3 Zellklone sowie der mit dem Leervektor transfizierten A549 Zellen im XTT-Assay gemessen. Es wurde die Reduktion von gelbem XTT in oranges Formazan durch den Zellstoffwechsel viabler Zellen nach jeweils 4, 24, 48, 72 und 96 h quantifiziert (Abbildung 10).

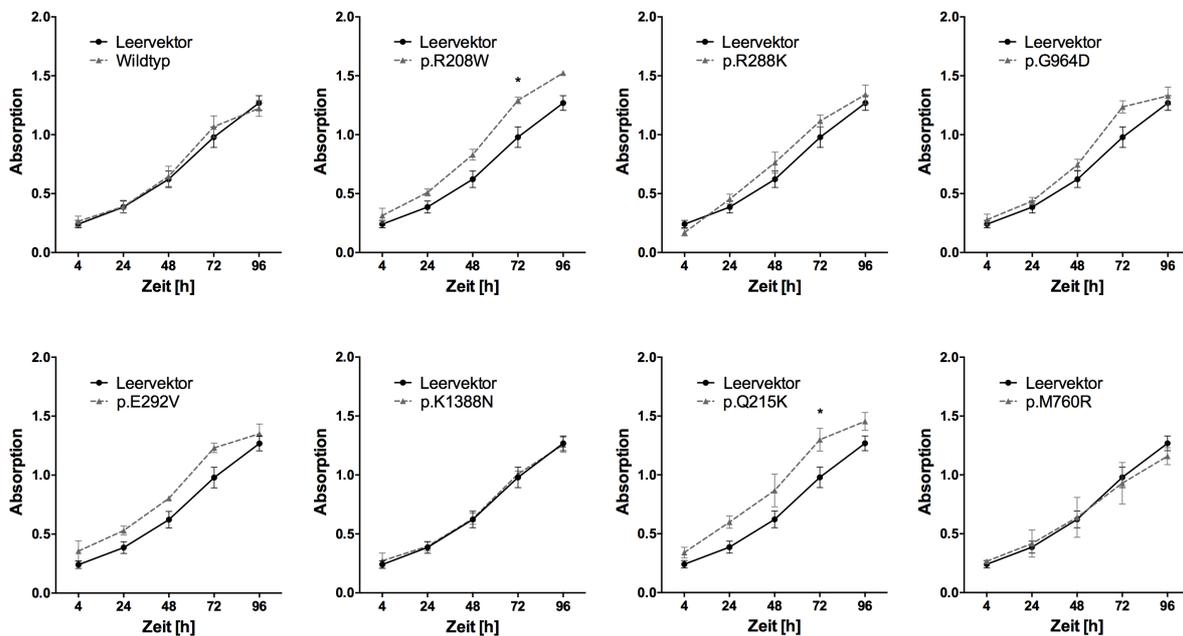


Abbildung 10: Zellviabilität der ausgewählten ABCA3 Zellklone.

Metabolische Aktivität des mit dem Leervektor transfizierten A549 Zellklons sowie der ausgewählten ABCA3 Zellklone nach jeweils 4, 24, 48, 72 und 96 h Inkubation. Die metabolische Aktivität wurde anhand der spezifischen Absorption von Formazan bei 450 nm quantifiziert, welches von viablen Zellen aus XTT umgesetzt wurde.

Die Ergebnisse aus 3 voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurden durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und anschließendem Dunnett Test für multiple Mittelwertvergleiche mit dem Leervektor analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten ABCA3 Zellklonen und dem mit dem Leervektor transfizierten Zellklon, außer einem im Vergleich leicht erhöhten Zellstoffwechsel der

Variationen p.R208W und p.Q215K nach 72 h Inkubation. Es konnte daher von keinem wesentlichen Einfluss der eingebrachten Mutationen auf die Zellviabilität sowie von gleichen Wachstumsraten aller Zellen in dem für Versuche verwendeten Zeitraum von 48 h ausgegangen werden.

4.2.2 Zytotoxizität der ausgewählten ABCA3 Variationen

Die durch die stabile Transfektion in das Genom der Zelle eingebrachten Mutationen können sich toxisch auf die Zelle auswirken und so zu einer Freisetzung von LDH führen. Um dies zu untersuchen, wurde die LDH-Aktivität im Überstand der ausgewählten Zellklone nach 4 bzw. 96 h Inkubation quantifiziert (Abbildung 11).

Die Ergebnisse aus 4 voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurden durch eine ein-faktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen und anschließendem Dunnett Test für multiple Mittelwertvergleiche mit dem Leervektor analysiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem mit dem Leervektor transfizierten Zellklon und den restlichen Zellklonen.

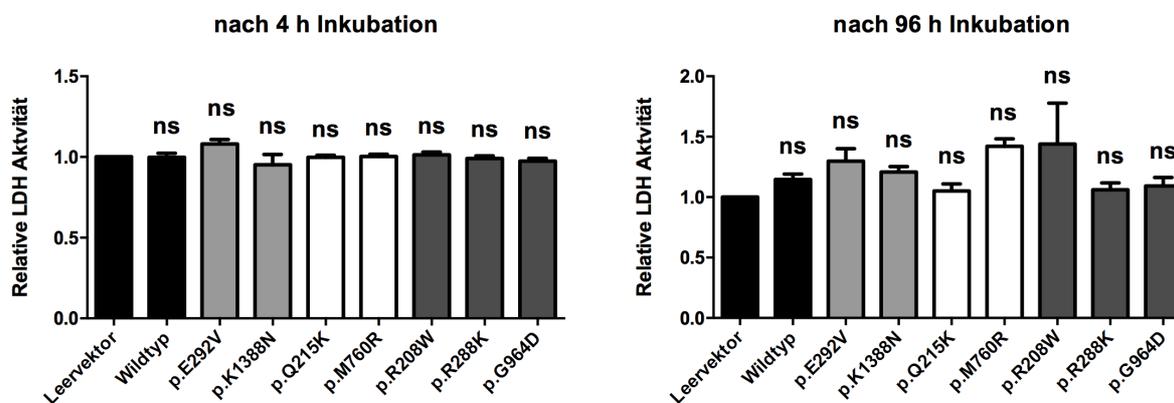


Abbildung 11: Zytotoxizität der ausgewählten ABCA3 Variationen.

Zytotoxizität der in die Zelle eingebrachten ABCA3 Variationen, gemessen anhand der relativen Aktivität von LDH im Überstand der ausgewählten Zellklone nach 4 bzw. 96 h Inkubation in Relation zu der LDH-Aktivität im Überstand des mit dem Leervektor transfizierten A549 Zellklons.

4.3 Intrazelluläres Trafficking und Lokalisation des ABCA3 Proteins

4.3.1 Intrazelluläres Trafficking des ABCA3 Proteins

Mutationen in einem Protein wie ABCA3 können dessen Primärstruktur verändern, was sich wiederum auf die höheren Strukturebenen auswirken und so zu einer Fehlfaltung und damit einhergehend zu einer Funktionsstörung des Proteins führen kann. Alle im ER synthetisierten Proteine werden einer Qualitätskontrolle unterzogen, bevor sie weiter über den GA zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Fehlgefaltete Proteine werden noch im ER erkannt und dem zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-Abbau-System zugeführt.

Um herauszufinden, ob die in dieser Arbeit untersuchten ABCA3 Mutationen auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort den GA passiert haben oder ob sie aufgrund der veränderten Proteinstruktur im ER verblieben sind, wurde die N-Glykosylierung der ABCA3 Proteine untersucht. Die N-Glykosylierung ist ein posttranslationaler Prozess, bei welchem verschiedene Oligosaccharidketten an die Aminogruppen von Proteinen gehängt werden. Dabei werden im ER direkt nach der Proteinsynthese vor allem mannosereiche Oligosaccharidketten an die Aminosäure Asparagin (Asn, N) angehängt, welche dann im GA teilweise wieder abgespalten und zu komplexen Oligosacchariden modifiziert werden. Bei Vorhandensein dieser komplexen Oligosaccharide im ABCA3 Protein kann somit der Rückschluss gezogen werden, dass das Protein nach der Translation das ER verlassen und den GA passiert hat.

Zum Nachweis der komplexen Oligosaccharide wurden Membranfraktionen mit darin enthaltenem ABCA3 aus den Zellen präpariert, durch die Enzyme PNGase F bzw. Endo H deglykosyliert und mittels Western Immunoblot dargestellt (Abbildung 12: A). PNGase F spaltet sowohl die mannosereichen als auch die komplexen Oligosaccharide von den Aminogruppen ab, während Endo H nur die mannosereichen, nicht aber die komplexen Oligosaccharide abspalten kann. Proteine, welche nur das ER passiert haben, zeigen somit nach Verdau mit den jeweiligen Enzymen das gleiche Bandenmuster im Western Immunoblot. Proteine, die hingegen zusätzlich den GA passiert haben, weisen nach dem Verdau mit Endo H und PNGase F unterschiedliche Bandenmuster auf.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten ABCA3 Proteinen zeigte sich nach dem Verdau mit PNGase F eine 180 kDa Proteinbande im Western Immunoblot, welche durch die Abspaltung sämtlicher Oligosaccharide von der ursprünglich 190 kDa ABCA3 Proteinbande entstanden ist. Nach Verdau des ABCA3 Wildtypproteins sowie der Proteine mit den Variationen p.R208W,

p.R288K, p.G964D, p.E292V und p.K1388N mit dem Enzym Endo H zeigte sich sowohl eine deglykosylierte 180 kDa als auch eine weiterhin glykosylierte 190 kDa Proteinbande. Diese auch nach dem Verdau noch vorhandene 190 kDa Bande enthielt ABCA3 Proteine mit komplexen Oligosaccharidketten, welche von Endo H nicht abgespalten werden konnten. Bei ABCA3 Proteinen mit den Variationen p.Q215K und p.M760R hingegen zeigte sich nach dem Verdau mit Endo H das gleiche Muster wie nach dem vollständigen Verdau mit PNGase F. Es wurde nur eine 180 kDa große Proteinbande sichtbar, welche durch das Abspalten aller vorhandenen mannosereichen Oligosaccharide entstanden ist. Wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben [63], stellte sich die 170 kDa große ABCA3 Proteinbande nach dem Verdau mit sowohl EndoH als auch PNGase F unverändert dar, sodass von einer nicht vorhandenen N-Glykosylierung in dieser Proteinbande ausgegangen werden kann.

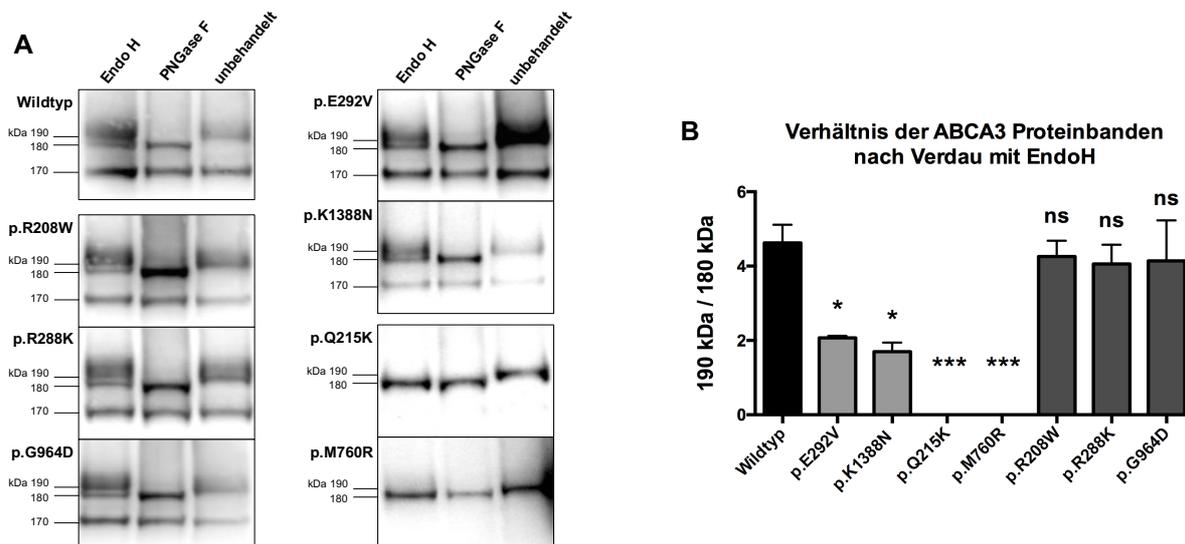


Abbildung 12: Intrazelluläres Trafficking der untersuchten ABCA3 Proteine.

A: Aufgetrennte ABCA3 Proteinbanden im Western Immunoblot nach enzymatischem Verdau von isolierten Membranfraktionen aus den ausgewählten Zellklonen mit entweder Endo H oder PNGase F. B: Verhältnis der 190 kDa zur 180 kDa Proteinbande im Western Immunoblot nach Verdau von isolierten Membranfraktionen aus den ausgewählten Zellklonen mit dem Enzym Endo H, quantifiziert durch relative Densitometrie.

Durch Gegenüberstellung der 190 kDa Proteinbande mit verbleibenden komplexen Oligosacchariden und der vollständig deglykosylierten 180 kDa Proteinbande lässt sich eine Aussage über das Ausmaß der posttranslationalen Modifikation und damit des intrazellulären Traffickings von ABCA3 treffen. Die nach dem Verdau mit dem Enzym Endo H entstandenen

ABCA3 Proteinbanden wurden daher mit der Software Image J quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt (Abbildung 12: B). Mit den Ergebnissen aus 3 voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Tukey Test für multiple Mittelwertvergleiche durchgeführt. Zur besseren Übersicht wurden nur die errechneten Signifikanzen aus dem Vergleich der einzelnen ABCA3 Variationen mit dem ABCA3 Wildtyp im Graphen dargestellt.

ABCA3 Proteine mit den Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D wiesen ein ähnliches Bandenverhältnis und somit auch intrazelluläres Trafficking auf wie das ABCA3 Wildtypprotein. ABCA3 Proteine mit den Variationen p.E292V und p.K1388N stellten sich interessanterweise mit einer kleineren 190 kDa Proteinbande und damit einem signifikant verringerten Bandenverhältnis im Vergleich zum ABCA3 Wildtypprotein dar, was einem verringerten Ausmaß an intrazellulärem ABCA3 Trafficking entspricht. Da ABCA3 Proteine mit den Variationen p.Q215K und p.M760R nach dem Verdau mit Endo H gar keine 190 kDa Proteinbande aufwiesen, wurde das errechnete Verhältnis in diesen Fällen dem Wert 0 gleichgesetzt.

4.3.2 Intrazelluläre Lokalisation des ABCA3 Proteins

Um die Lokalisation des ABCA3 Proteins innerhalb der untersuchten Zellklone zu bestimmen, wurde dessen C-terminales HA-Tag sowie verschiedene intrazelluläre Strukturen mit spezifischen primären sowie fluoreszierenden sekundären Antikörpern markiert und unter einem Immunfluoreszenz-Mikroskop betrachtet (Abbildung 13).

Hierbei wurden alle Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI und das HA-Tag der untersuchten ABCA3 Proteine mit einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper markiert. CD63 bezeichnet ein membrandurchspannendes Oberflächenprotein, welches multivesikuläre und multilamelläre Strukturen markiert [3, 50] und in dieser Arbeit als Marker für intrazelluläre Lamellarkörperchen genutzt wurde. Das Lektin Calnexin dient als Chaperon und liegt membrangebunden im ER vor [49], weswegen es hier als ER-Marker verwendet wurde. Sowohl CD63 als auch Calnexin wurden mit rot fluoreszierenden sekundären Antikörpern markiert, sodass im Falle einer Kolo-kalisation mit dem grün fluoreszierend markierten ABCA3 Protein nach Überlagerung der jeweiligen Bilder ein gelbes Farbsignal sichtbar wurde.

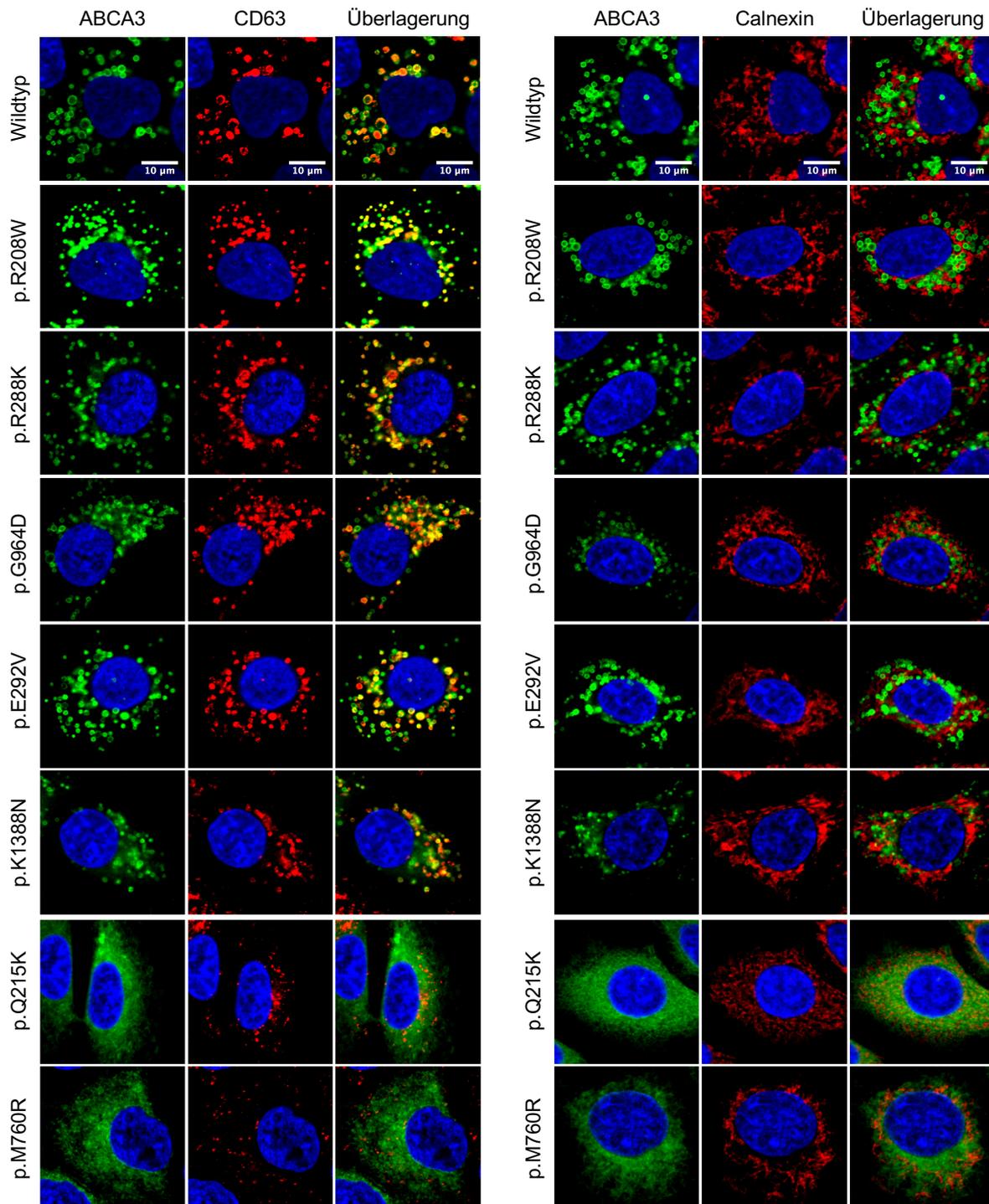


Abbildung 13: Intrazelluläre Lokalisation der untersuchten ABCA3 Proteine.

Immunfluoreszenzfärbung der ausgewählten Zellklone nach stabiler Transfektion des ABCA3 Wildtyps und der zu untersuchenden Variationen. Das HA-Tag der ABCA3 Proteine wurde mit einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper markiert. Die intrazellulären Strukturen CD63 bzw. Calnexin wurden zusätzlich mit rot fluoreszierenden sekundären Antikörpern markiert, sodass sich im Falle einer Kolo-kalisation ein gelbes Farbsignal ergab. Die Zellkerne wurden blau dargestellt. Der Messbalken entspricht 10 µm.

Über das HA-Tag fluoreszierend markierte ABCA3 Proteine mit den Variationen p.R208W, p.R288K, p.G964D, p.E292V und p.K1388N wiesen ähnlich wie das ABCA3 Wildtypprotein ein vesikuläres Verteilungsmuster innerhalb der Zelle auf. Nach Überlagerung mit dem CD63-Signal zeigte sich eine Kolokalisation dieser ABCA3 Vesikel mit den durch CD63 markierten Lamellarkörperchen. Eine Überlagerung mit dem Calnexin-Signal ergab keine erkennbare Kolokalisation der ABCA3 Proteine mit dem durch Calnexin markierten ER.

Die fluoreszierende Markierung des HA-Tags der ABCA3 Proteine mit den Variationen p.Q215K und p.M760R zeigte ein diffuses, in der ganzen Zelle verteiltes Muster ohne erkennbare vesikuläre Strukturen. Nach Überlagerung mit dem CD63-Signal ergab sich keine Kolokalisation mit multilamellären oder multivesikulären Strukturen. Auch eine Überlagerung mit dem Calnexin-Signal zeigte überraschenderweise keine Kolokalisation mit dem ER.

Interessanterweise konnte im Falle des p.K1388N exprimierenden Zellklones neben dem bereits beschriebenen vesikulären ABCA3 Verteilungsmuster ebenfalls ein leicht diffuses, grün fluoreszierendes Signal im Hintergrund der Zelle beobachtet werden, welches weder mit CD63 noch mit Calnexin eine Kolokalisation zeigte.

4.4 Entstehung ABCA3 induzierter Lamellarkörperchen

4.4.1 Volumen der Lamellarkörperchen in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Volumen der durch die stabile Transfektion mit ABCA3 induzierten Lamellarkörperchen wurde ebenfalls in einer Immunfluoreszenzfärbung gemessen (Abbildung 14).

Auch in dieser Färbung zeigte sich erneut ein vesikuläres Verteilungsmuster des über das HA-Tag grün markierten ABCA3 Wildtypproteins und der ABCA3 Proteine mit den Variationen p.R208W, p.R288K, p.G964D und p.E292V. In Zellklonen mit stabiler Expression der Variationen p.Q215K und p.M760R war nach Markierung des HA-Tags der jeweiligen ABCA3 Proteine wieder das bereits beschriebene diffuse Verteilungsmuster innerhalb der Zelle ohne eindeutig identifizierbare Vesikel zu erkennen. Ebenso stellten sich die über das HA-Tag markierten ABCA3 Proteine des p.K1388N exprimierenden Zellklones mit einem sowohl vesikulären, als auch teils diffusen intrazellulärem Verteilungsmuster dar (Abbildung 14: A).

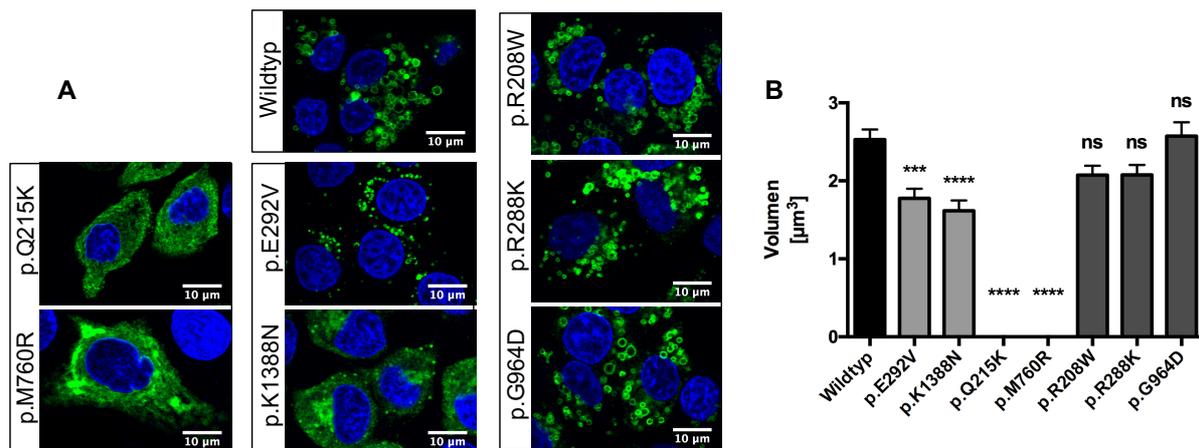


Abbildung 14: Volumen der durch ABCA3 induzierten Lamellarkörperchen.

A: Immunfluoreszenzfärbung aller ausgewählten Zellklone nach stabiler Transfektion des ABCA3 Wildtypgens und der zu untersuchenden Variationen. ABCA3 Proteine wurden über das HA-Tag grün fluoreszierend markiert, alle Zellkerne wurden blau dargestellt. Der Messbalken entspricht 10 µm.

B: Mittelwerte der ABCA3 Vesikelvolumina in allen ausgewählten Zellklonen, quantifiziert mithilfe der Software Image J. Die Werte der Zellklone mit stabiler Expression der ABCA3 Variationen p.Q215K und p.M760R wurden auf 0 µm³ gesetzt, da keine eindeutig identifizierbaren Vesikel in den Zellen zu erkennen waren.

Die Volumina der einzelnen Vesikel bzw. induzierten Lamellarkörperchen wurden in den Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung mit der Software Image J quantifiziert. Es wurden per Zufall 60 Vesikel aus drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen ausgewählt und eine einfaktorische Varianzanalyse mit dem Tukey Test für multiple Mittelwertvergleiche durchgeführt. Für eine bessere Übersicht sind im Graphen nur die errechneten Signifikanzen der einzelnen Variationen im Vergleich mit dem Wildtyp eingezeichnet (Abbildung 14: B). Während sich ABCA3 Vesikel mit den Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D annähernd gleich groß wie ABCA3 Wildtypvesikel zeigten, wiesen ABCA3 Vesikel mit den Variationen p.E292V und p.K1388N ein signifikant verringertes Volumen auf. Da innerhalb der p.Q215K und p.M760R exprimierenden Zellklone keine eindeutigen Vesikel identifizierbar waren, wurde das entsprechende Vesikelvolumen hier dem Wert 0 gleichgesetzt.

4.4.2 Morphologie der Lamellarkörperchen in der TEM

Um nicht nur die Größe der Lamellarkörperchen, sondern auch deren Morphologie beurteilen zu können, wurden alle ausgewählten Zellklone und deren Ultrastruktur unter einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet und analysiert (Abbildung 15). Mit dem Leervektor transfizierte A549 Zellen bildeten keine Lamellarkörperchen oder vergleichbare multilamelläre Strukturen aus. Die stabile Transfektion von A549 Zellen mit dem ABCA3 Wildtypgen führte dagegen zu gut ausgebildeten multilamellären Körperchen, vergleichbar mit physiologischen Lamellarkörperchen in humanen Typ II Pneumozyten. Auch die stabile Transfektion mit den ABCA3 Variationen p.R208W, p.R288W und p.G964D führte zu vergleichbar gut ausgebildeten multilamellären Strukturen. Die stabile Transfektion von A549 Zellen mit der ABCA3 Variation p.E292V konnte zwar die Bildung von multilamellären Strukturen induzieren, allerdings erschienen diese im Vergleich zu durch den ABCA3 Wildtyp induzierten Lamellarkörperchen kleiner. Nach stabiler Transfektion mit der ABCA3 Variation p.K1388N zeigten sich lediglich schlecht ausgebildete lamelläre Strukturen und eine Transfektion mit den ABCA3 Variationen p.Q215K und p.M760R induzierte gänzlich malformierte elektronendichte Körperchen in A549 Zellen.

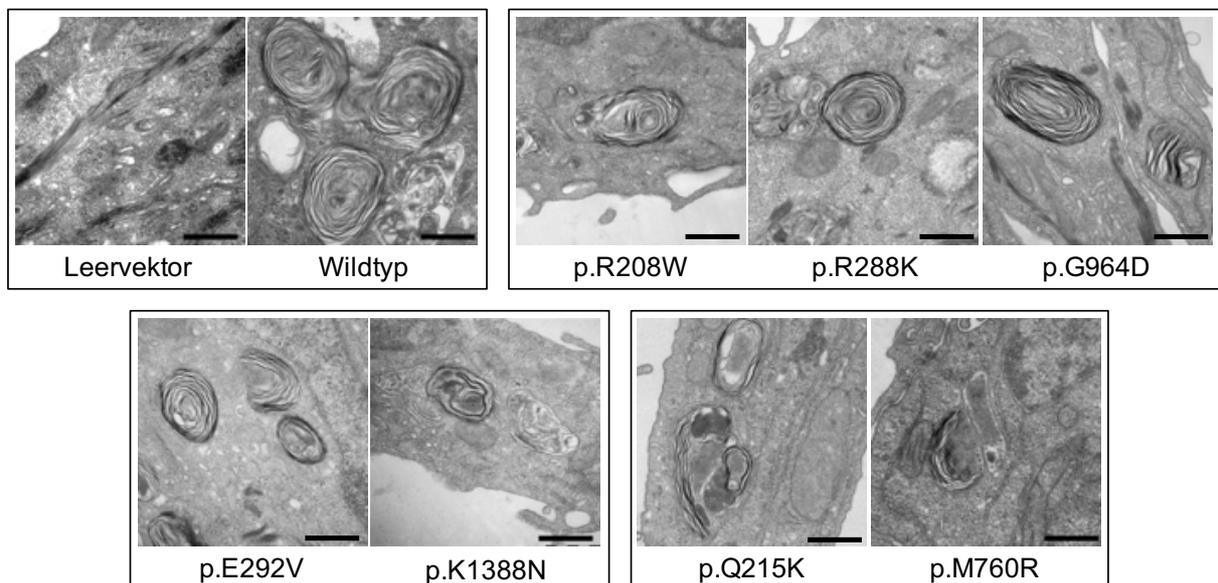


Abbildung 15: Transmissionselektronenmikroskopie der induzierten Lamellarkörperchen.

TEM von Lamellarkörperchen bzw. entsprechenden Strukturen in A549 Zellen, induziert durch die stabile Transfektion mit dem Leervektor, dem ABCA3 Wildtypgen und den zu untersuchenden Variationen. Der Messbalken entspricht 0,5 μm .

4.5 Lipidtransport durch das ABCA3 Protein

Die Hauptaufgabe des ABCA3 Proteins ist der Transport von PC und insbesondere DPPC in die Lamellarkörperchen, in welchen das benötigte Surfactant gebildet und gespeichert wird [9]. Die intrazellulären PC- und DPPC-Konzentrationen lassen somit Rückschlüsse auf die Transportfähigkeit des ABCA3 Proteins zu und wurden daher mithilfe der ESI-MS aus Zellysaten aller untersuchten Zellklone bestimmt (Abbildung 16). Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse aus den Ergebnissen von 9 voneinander unabhängigen Versuchsreihen sowie der Tukey Test für multiple Mittelwertvergleiche durchgeführt. Im Graphen wurden zur besseren Übersicht nur die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu dem ABCA3 Wildtyp eingezeichnet.

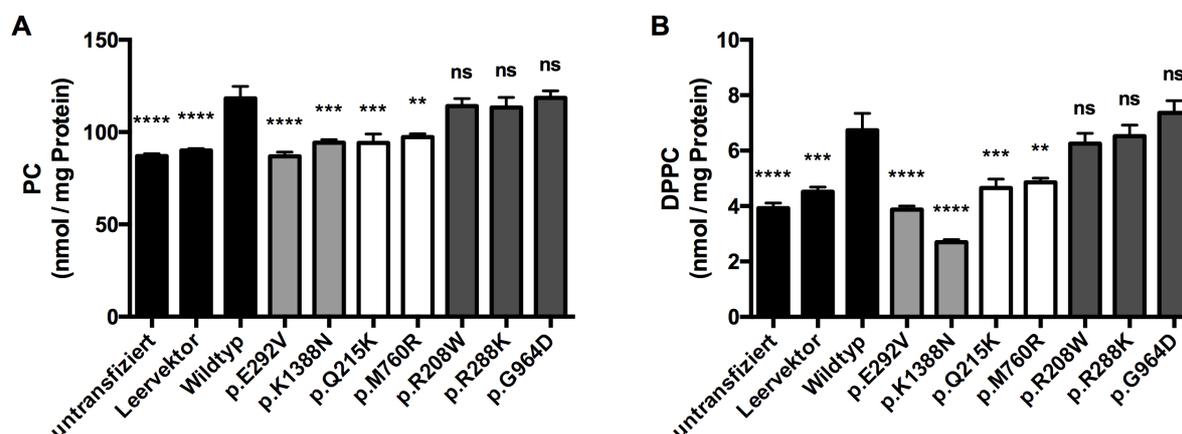


Abbildung 16: Phosphatidylcholingehalt der ausgewählten Zellklone.

Intrazellulärer Phosphatidylcholingehalt in untransfizierten A549 Zellen sowie in mit dem Leervektor, dem ABCA3 Wildtypgen und den untersuchten ABCA3 Variationen transfizierten A549 Zellen, quantifiziert durch ESI-MS aus den jeweiligen Zellysaten.

A: Intrazellulärer totaler Phosphatidylcholin (PC) Gehalt.

B: Intrazellulärer Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) Gehalt.

Untransfizierte sowie mit dem Leervektor transfizierte A549 Zellen zeigten signifikant verminderte totale PC-Konzentrationen im Vergleich zu mit dem Wildtypgen transfizierten Zellen (Abbildung 16: A). Auch A549 Zellen, welche mit den ABCA3 Variationen p.E292V, p.K1388N, p.Q215K und p.M760R transfiziert wurden, wiesen signifikant verminderte PC-Konzentrationen auf. Nur die Transfektion mit den ABCA3 Variationen p.R208W, p.R288K

und p.G964D führte zu mit dem Wildtyp vergleichbaren intrazellulären PC-Konzentrationen in den A549 Zellen.

Da es sich bei DPPC um ein für Surfactant spezifisches Phospholipid handelt, wurde diese Phospholipid-Untergruppe ebenfalls im Rahmen der ESI-MS bestimmt und ausgewertet (Abbildung 16: B). Auch hier zeigten lediglich die mit den Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D transfizierten A549 Zellen mit dem ABCA3 Wildtyp vergleichbare DPPC-Konzentrationen. Nach Transfektion mit den Variationen p.E292V und p.K1388N wiesen die Zellen ähnlich wie mit dem Leervektor transfizierte sowie untransfizierte A549 Zellen signifikant verminderte DPPC-Konzentrationen auf.

4.6 Proteolytische Spaltung des ABCA3 Proteins

Im Western Immunoblot präsentiert sich das ABCA3 Wildtypprotein typischerweise in zwei verschiedenen Banden, einer bei 190 kDa und einer bei 170 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass die kleinere 170 kDa Bande durch eine Cathepsin L-vermittelte proteolytische Spaltung des 190 kDa großen ABCA3 Proteins entsteht und dieser Prozess vermutlich dem Abbau des ABCA3 Proteins entspricht [43].

Um diese proteolytische Spaltung der in dieser Arbeit untersuchten ABCA3 Proteine zu messen, wurden die entsprechenden ABCA3 Proteinbanden aller ausgewählten Zellklone im Western Immunoblot aufgetrennt, mittels relativer Densitometrie quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt (Abbildung 17).

ABCA3 Proteine mit den Variationen p.R208W, p.R288K, p.G964D, p.E292V und p.K1388N konnten wie auch das ABCA3 Wildtypprotein in eine ungespaltene 190 kDa und eine durch Cathepsin L gespaltene 170 kDa Proteinbande aufgetrennt werden. Bei den ABCA3 Proteinen mit der Variation p.K1388N zeigte sich jedoch eine stark verminderte 170 kDa Proteinbande im Vergleich zu dem Wildtypprotein (Abbildung 17: A). In mit den ABCA3 Variationen p.Q215K und p.M760R transfizierten Zellklonen konnte lediglich das 190 kDa große ABCA3 Protein nachgewiesen werden, nach Auftrennung und Nachweis im Western Immunoblot war hier keine 170 kDa Bande erkennbar.

Um die proteolytische Spaltung der untersuchten ABCA3 Proteine zu quantifizieren, wurde die Intensität der aufgetrennten Banden im Western Immunoblot durch relative Densitometrie ermittelt und jeweils die gespaltene Bande bei 170 kDa ins Verhältnis zur ungespaltenen

Proteinbande bei 190 kDa gesetzt (Abbildung 17: B). Es wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse aus insgesamt 6 voneinander unabhängigen Versuchsreihen mit nachfolgendem Tukey Test für multiple Mittelwertvergleiche durchgeführt. Zur besseren Übersicht wurden im Graphen nur die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu dem ABCA3 Wildtyp eingezeichnet. ABCA3 Proteine mit den Variationen p.E292V, p.R208W, p.R288K und p.G964D wiesen ein mit dem ABCA3 Wildtypprotein vergleichbares Bandenverhältnis auf. Nach Auftrennung der ABCA3 Proteine mit der Variation p.K1388N zeigte sich eine stark verminderte 170 kDa Proteinbande, sodass auch das zugehörige Bandenverhältnis erheblich verkleinert war und einen signifikanten Unterschied zu dem Bandenverhältnis des ABCA3 Wildtypproteins aufwies. Da nach der Transfektion mit den Variationen p.Q215K und p.M760R kein 170 kDa großes ABCA3 Protein in den Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde das Verhältnis in diesen Fällen dem Wert 0 gleichgesetzt.

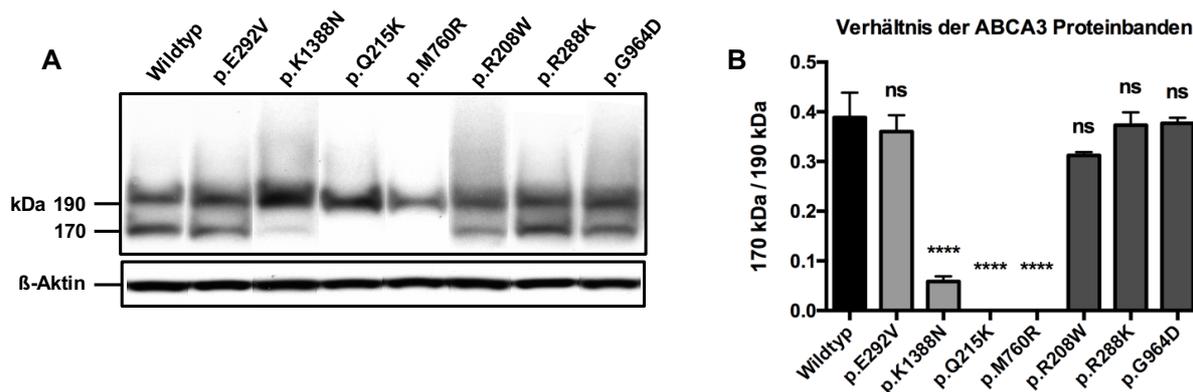


Abbildung 17: Proteolytische Spaltung der untersuchten ABCA3 Variationen.

A: Auftrennung der 170 kDa von der 190 kDa ABCA3 Proteinbande aus Zellysaten der ausgewählten Zellklone im Western Immunoblot. Das Haushaltsprotein β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

B: Verhältnis von gespaltenen (170 kDa) zu ungespaltenen (190 kDa) Proteinbanden der untersuchten ABCA3 Proteine, quantifiziert durch relative Densitometrie mithilfe von Image J aus Western Immunoblots. Die Bandenverhältnisse der ABCA3 Proteine mit den Variationen p.Q215K und p.M760R wurden dem Wert 0 gleichgesetzt, da keine 170 kDa Proteinbande erkennbar war.

4.7 Überblick über die Ergebnisse

Einen Überblick über die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse aller ausgewählten und untersuchten ABCA3 Variationen im Vergleich mit dem ABCA3 Wildtyp gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Überblick über die Ergebnisse aller untersuchten ABCA3 Variationen.

Überblick über die Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ABCA3 Variationen aus den einzelnen Versuchen, jeweils im Vergleich mit dem ABCA3 Wildtyp. Alle Beobachtungen, die sich wesentlich von den beobachteten Ergebnissen des ABCA3 Wildtyps unterscheiden, sind blau hinterlegt.

ABCA3 Variation	p.E292V	p.K1388N	p.Q215K	p.M760R	p.R208W	p.R288K	p.G964D
Intrazelluläres Trafficking	Normal	Normal	Nur ER Passage	Nur ER Passage	Normal	Normal	Normal
Intrazelluläre Lokalisation	Normal	Normal	Weder in ER noch Lamellarkörperchen	Weder in ER noch Lamellarkörperchen	Normal	Normal	Normal
Volumen der Lamellarkörperchen	Reduziert	Reduziert	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	Normal	Normal	Normal
Morphologie der Lamellarkörperchen	Verkleinert	Malformiert	Malformiert	Malformiert	Normal	Normal	Normal
Lipidtransport	Reduziert	Reduziert	Reduziert	Reduziert	Normal	Normal	Normal
Proteolytische Spaltung	Normal	Reduziert	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	Normal	Normal	Normal
Pathomechanismus	Reduzierter Lipidtransport		Abnorme intrazelluläre Lokalisation		Undefiniert		

5 Diskussion

Der ABCA3 Transporter ist essentiell für die Biogenese von Lamellarkörperchen in Typ II Pneumozyten und den Transport von Surfactant-spezifischen Phospholipiden in die Lamellarkörperchen. Mutationen im ABCA3 Transporter können, je nach Schweregrad, von einer Surfactant-Dysfunktion mit Atemnotsyndrom beim Neugeborenen bis hin zu interstitiellen Lungenerkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter führen. In den letzten Jahren wurden bereits einige wichtige Erkenntnisse über mögliche zugrundeliegende Pathomechanismen gewonnen, jedoch sind bei vielen der bereits in Patienten identifizierten Sequenzvariationen die genauen Vorgänge nach wie vor noch nicht vollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde, anhand verschiedener Verfahren wie unter anderem Western Immunoblots, Immunfluoreszenzfärbungen und Lipidanalysen, der zelluläre Phänotyp einer Reihe von ABCA3 Variationen im Vergleich mit dem ABCA3 Wildtyp untersucht. Der Fokus lag dabei auf ausgewählten Missense Mutationen, die nur eine einzige Aminosäure in der Primärsequenz betreffen. Es konnten Varianten mit einer gestörten intrazellulären Lokalisation und daraus resultierendem Prozessierungsdefekt des ABCA3 Proteins, Varianten mit beeinträchtigtem Lipidtransport des ABCA3 Proteins sowie Varianten, welche durch einen noch undefinierten Mechanismus für eine ILD prädisponieren, ausgemacht werden.

Die Einteilung einer vorliegenden ABCA3 Sequenzvariation in eine definierte Gruppe mit identifiziertem zugrundeliegenden Pathomechanismus ermöglicht einerseits die Einschätzung des weiteren klinischen Verlaufs, andererseits wird sie eine essentielle Rolle bei der Auswahl zukünftig verfügbarer kausaler Therapiemöglichkeiten spielen.

5.1 Generierung von Zellklonen mit stabiler ABCA3 Expression

5.1.1 A549 Zelllinie als Modellsystem für Typ II Pneumozyten

In dieser Arbeit wurden humane A549 Zellen für alle *in vitro* Versuche verwendet. Die A549 Zelllinie wurde erstmals 1972 aus einem humanen Adenokarzinom der Lunge isoliert [55] und seither in vielen Arbeiten beschrieben. Da gezeigt werden konnte, dass A549 Zellen in ihrer Zellmorphologie den Typ II Pneumozyten stark ähneln, hat sich diese Zelllinie bereits früh als Modellsystem für Typ II Pneumozyten etabliert [6, 64]. In früheren Arbeiten konnten sogar die für Typ II Pneumozyten spezifischen Lamellarkörperchen in A549 Zellen nachgewiesen werden [55, 77]. Diese Eigenschaft scheinen die Zellen jedoch in den vielen Jahren, in denen

sie nun kontinuierlich in Kultur gehalten wurden, verloren zu haben. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen unbehandelter A549 Zellen konnten in dieser Arbeit, wie auch zuvor schon in der Literatur beschrieben [33, 60], keine Lamellarkörperchen-ähnliche Strukturen mehr nachgewiesen werden. Diese Gegebenheit zeigte sich wiederum von Vorteil, da so sämtliche in A549 Zellen nachgewiesene Lamellarkörperchen-ähnliche Strukturen auf die vorherige stabile Transfektion mit ABCA3 zurückzuführen waren. A549 Zellen selbst weisen außerdem eine geringe endogene Expression des für Typ II Pneumozyten charakteristischen ABCA3 Transporters auf [62]. Um einzig den Effekt der durch die stabile Transfektion in die Zellen eingebrachten exogenen ABCA3 DNA zu messen, wären A549 Zellen mit einem vollständigen Knockout des endogenen ABCA3 Gens notwendig gewesen. Diese waren zu Beginn der Arbeit allerdings nicht verfügbar. In den nachfolgenden stabilen Transfektionen der A549 Zellen mit exogener ABCA3 DNA konnten aufgrund des verwendeten Promotors eine sehr hohe, etwa 200-fache Überexpression des exogenen ABCA3 Transporters erreicht werden (Abbildung 8), sodass sich diese minimale endogene ABCA3 Expression nicht mehr von Relevanz für die erhobenen Versuchsergebnisse zeigte.

Um in den folgenden Versuchen repräsentative Ergebnisse zu erzielen, sollte das verwendete Zellmodell die vorliegenden Gegebenheiten in der Lunge so gut wie möglich widerspiegeln. Am Besten hätten sich daher aus den betroffenen Patienten isolierte Typ II Pneumozyten mit homozygoter Expression der jeweiligen Mutation geeignet. Eine Alternative hierfür wären induzierte pluripotente Stammzellen mit homozygoter Expression der jeweils identifizierten Mutationen gewesen. Leider standen solche Zellen zu Beginn der Arbeit nicht zur Verfügung. In Zukunft könnten sie allerdings ein zuverlässiges Modell zur Reproduktion und gezielten therapeutischen Intervention genetischer Defekte darstellen.

5.1.2 ABCA3 Expressionsvektor mit CMV-Promotor und HA-Tag

Für eine ausreichend starke Expression der transfizierten ABCA3 DNA in den A549 Zellen wurde in Syntheserichtung vor das 5'-Ende der ABCA3 DNA ein zusätzlicher CMV-Promotor in den Expressionsvektor kloniert (Abbildung 6). Es ist nicht auszuschließen, dass die jeweiligen Zellen durch die daraus resultierende starke Überexpression des ABCA3 Proteins auf unbekannte Weise beeinträchtigt wurden. Da jedoch alle in dieser Arbeit untersuchten und miteinander verglichenen Zellklone gleichermaßen behandelt und mit diesem CMV-Promotor transfiziert wurden, eliminieren sich möglicherweise vorhandene Auswirkungen bei einer vergleichbaren Überexpression der einzelnen Zellklone.

Zur Markierung des ABCA3 Proteins innerhalb der Zelle wurde ein HA-Tag an das 3'-Ende der ABCA3 DNA in den Expressionsvektor kloniert (Abbildung 6). Dieses HA-Tag basiert auf einem kurzen Abschnitt des Hämagglutinins, einem Glykoprotein des Influenzaviruses. Das Tag besteht nur aus wenigen Aminosäuren und ist daher so klein, dass von keinen wesentlichen Auswirkungen auf das Trafficking oder die Aktivität des rekombinanten ABCA3 Proteins in der A549 Zelle ausgegangen werden kann. Trotz der geringen Größe lässt sich das HA-Tag jedoch einfach mittels spezifischen Antikörpern detektieren. Ein alternatives Tag zur Markierung des ABCA3 Proteins stellt das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) dar. Das GFP-Tag hat den Vorteil, dass es nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge selbstständig grün fluoreszieren kann und somit keine spezifischen Antikörper zur Detektion notwendig sind. Dieses Tag ist allerdings auch um einiges größer als das hier verwendete HA-Tag und kann daher mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer Beeinträchtigung des Traffickings oder der Aktivität des ABCA3 Proteins führen. Zudem bestand die Möglichkeit, dass das bei der Entstehung des grünen Fluorophors intrazellulär gebildete Peroxid bei den in dieser Arbeit erzielten hohen Expressionsraten zu vermehrtem zellulären Stress und somit einer Schädigung der A549 Zellen führt [80]. Daher wurde hier von einer Verwendung des GFP-Tags abgesehen.

5.1.3 Auswahl der A549 Zellklone mit stabiler ABCA3 Expression

Bei der Auswahl der erfolgreich stabil transfizierten A549 Zellklone für die weiteren Versuche wurde darauf geachtet, dass diese untereinander vergleichbare ABCA3 mRNA und Proteinlevel vorweisen (Abbildungen 8 und 9). Die ABCA3 Variante p.M760R bildet hier eine Ausnahme, da selbst der Zellklon mit der höchsten gemessenen ABCA3 mRNA Expression nicht an die Expressionslevel der restlichen Zellklone herankam, es resultierte eine signifikant verminderte ABCA3 mRNA Expression. Ebenso zeigte sich die ABCA3 Proteinexpression dieses Zellklones vermindert, allerdings konnte hier keine statistische Signifikanz im Vergleich mit den anderen Zellklonen errechnet werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, resultiert die Variante p.M760R in einem schweren Trafficking-Defekt des ABCA3 Proteins, welcher potentiell zu vermehrtem ER-Stress führen kann [86]. Die so beanspruchten Zellen konnten daher möglicherweise nicht dieselbe Expressionsleistung wie die restlichen ausgewählten Zellklone erbringen. Ebenso könnte ein vermehrter und schnellerer Abbau dieser defekten ABCA3 Proteine zu den beobachteten verringerten Proteinmengen in den Gesamtzelllysaten führen. Die genauen Mechanismen der zellulären Schädigung durch derartige Mutationen mit Trafficking-Defekt müssten allerdings noch genauer untersucht werden.

5.2 Auswirkungen der Überexpression auf Zellviabilität und Zytotoxizität

Die Proliferation von Zellen kann durch vielfältige Gründe beeinträchtigt sein, wie z. B. durch ein erhöhtes zelluläres Stresslevel, die Ansammlung toxischer Zellmetabolite oder durch die Einwirkung externer schädlicher Substanzen. Um in den folgenden Versuchen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, sollten alle ausgewählten Zellklone jedoch gleich schnell wachsen. Aus diesem Grund wurde die metabolische Aktivität der untersuchten Zellklone und damit ihre Zellviabilität im XTT-Assay bestimmt (Abbildung 10). In allen ausgewählten Zellklonen konnte eine mit dem Leervektor exprimierenden Zellklon vergleichbare Zellviabilität nachgewiesen werden, der Stoffwechsel der Zellklone mit den ABCA3 Variationen p.Q215K und p.R208W zeigte sich nach 72 h Inkubation sogar leicht erhöht. Da alle für die Charakterisierung benötigten Versuche in einem Zeitraum mit maximal 48 h Inkubation durchgeführt wurden, konnte somit davon ausgegangen werden, dass sämtliche gemessenen Unterschiede nicht auf unterschiedlichen Wachstumsraten der jeweiligen Zellklone beruhen.

Um herauszufinden, ob die starke Überexpression der jeweiligen ABCA3 Transporter einen toxischen Effekt auf die Zelle ausübt, wurde zusätzlich ein LDH-Assay mit allen ausgewählten Zellklonen durchgeführt (Abbildung 11). Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen allen untersuchten Zellklonen und dem mit dem Leervektor transfizierten Zellklon nachgewiesen werden. Die ABCA3 Überexpression an sich wie auch die einzelnen Sequenzvariationen üben daher keinen wesentlichen toxischen Effekt auf die transfizierten A549 Zellen aus.

5.3 ABCA3 Varianten mit gestörter intrazellulärer Lokalisation

5.3.1 Zellulärer Phänotyp der Varianten p.Q215K und p.M760R

Die ABCA3 Variation p.Q215K wurde bereits von *Engelbrecht et al.* als Trafficking-Mutation beschrieben [30], was in dieser Arbeit erneut bestätigt werden konnte. Außerdem wurde hier zusätzlich die Variation p.M760R als neue Trafficking-Mutation identifiziert. ABCA3 Proteine mit diesen beiden Sequenzvariationen wiesen keinerlei komplexe Oligosaccharidketten auf (Abbildung 12), welche normalerweise die Passage des Proteins durch den GA markieren, und konnten auch nicht in Lamellarkörperchen oder ähnlichen Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 13). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen anderer ABCA3 Trafficking-Mutationen, wie z. B. der Variante p.L101P [59], überein.

Die Annahme, dass diese mutierten ABCA3 Proteine, wie zuvor schon für derartige Trafficking-Mutationen beschrieben [16, 30], aufgrund einer fehlerhaften Faltung im ER akkumulieren, konnte jedoch nicht bestätigt werden. In der Immunfluoreszenzfärbung von Zellklonen mit stabiler Expression dieser beiden Varianten (Abbildung 13) war keine Kollokalisierung der ABCA3 Proteine mit dem ER-Marker Calnexin erkennbar. Es fiel jedoch ein starkes und diffus verteiltes Signal innerhalb der gesamten Zelle auf. Dies legt nahe, dass sich das mutierte und vermutlich fehlgefaltete ABCA3 Protein im Zytoplasma der Zelle angesammelt haben könnte, ähnlich wie es bereits für die Proteine ABCA4 [74] und ABCC7 [29] beschrieben wurde. Da zum Nachweis des ABCA3 Proteins in diesen Färbungen ein spezifisch gegen das C-terminale HA-Tag gerichteter Antikörper verwendet wurde, könnte dieses diffuse Signal auch lediglich auf HA-getaggten ABCA3 Fragmenten beruhen. Physiologischerweise werden nicht korrekt gefaltete Proteine primär im ER zurückgehalten, um durch einen längeren Kontakt mit den dort vorhandenen Chaperonen doch noch eine korrekte Faltung des Proteins zu ermöglichen. Eine Akkumulation derartig ungefalteter Proteine im Lumen des ERs führt jedoch auch zu vermehrtem ER-Stress, genannt „unfolded protein response“ (UPR) [86]. Endgültig fehlgefaltete Proteine werden daher noch im ER erkannt und über eine Retrotranslokation dem zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-Abbau-System zugeführt. Dabei werden die Proteine polyubiquitiniert und im Zytoplasma der Zelle durch das Proteasom in kurze Peptidketten gespalten, welche anschließend durch zytosolische Hydrolasen und Amino-peptidasen weiter abgebaut werden [11]. Das beobachtete diffuse Signal im Zytoplasma dieser Zellen entsprach daher vermutlich entweder mit Ubiquitin für den Abbau markierten, fehlgefalteten ABCA3 Proteinen oder bereits durch das Proteasom erzeugten, HA-haltigen ABCA3 Fragmenten. Um dies weiter zu untersuchen, käme eine zusätzliche Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen Ubiquitin in Betracht, um so eine Kollokalisierung von ABCA3 Proteinen mit Ubiquitin nachzuweisen.

Die wenigen Lamellarkörperchen-ähnlichen Strukturen, die sich in der TEM von Zellen mit stabiler Expression der ABCA3 Varianten p.Q215K und p.M760R darstellen ließen (Abbildung 15), präsentierten sich mit einer abnormen, an ein Spiegelei erinnernden Struktur (sogenannte „fried-egg-like structure“), welche eine Dysfunktion nahelegt [18]. Überraschenderweise waren sporadisch gut entwickelte Lamellarkörperchen-ähnliche Strukturen in Zellklonen mit stabiler Expression der Variante p.Q215K zu entdecken. Dies suggeriert, dass vereinzelte ABCA3 Proteine mit dieser Variation, vermutlich durch eine doch noch geglückte Proteinfaltung, korrekt funktionieren können.

Der Großteil der ABCA3 Proteine mit p.Q215K oder p.M760R Variation wies jedoch keine korrekte intrazelluläre Lokalisation auf und daher fand auch kaum der zur Bildung der Lamellarkörperchen benötigte Phospholipidtransport statt. Die intrazellulären Surfactant-spezifischen Phospholipide PC und DPPC in Zellklonen mit stabiler Expression dieser beiden Variationen zeigten sich stark vermindert und auf ähnlichem Niveau wie in untransfizierten oder mit dem Leervektor transfizierten Zellen (Abbildung 16). Ebenso fand auch keine N-terminale proteolytische Spaltung zum gezielten Abbau des ABCA3 Proteins statt (Abbildung 17). Diese mutierten ABCA3 Proteine werden daher höchstwahrscheinlich einem alternativen Abbauprozess wie dem oben beschriebenen zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-Abbau-System nach endgültiger Fehlfaltung im ER zugeführt.

5.3.2 Korrelation mit klinischen Daten betroffener Patienten

Ein reifes Neugeborenes mit der homozygoten Kombination der ABCA3 Sequenzvariationen p.Q215K und p.R288K entwickelte direkt nach der Geburt ein schweres Atemnotsyndrom und verstarb noch in der frühen Neonatalzeit [12]. Die Lungenhistologie dieses Kindes offenbarte ein kombiniertes Bild aus idiopathischen interstitiellen Pneumonien sowie elektronendichten Einschlusskörperchen, welche für eine Dysfunktion des ABCA3 Transporters stehen [51]. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Variation p.R288K nur geringe Auswirkungen auf den ABCA3 Transporter ausübt, beruht dieser im Patienten beobachtete schwere Phänotyp vermutlich allein auf dem durch die Variation p.Q215K verursachten schweren ABCA3 Trafficking-Defekt.

Ein weiteres reifes Neugeborenes mit der heterozygoten Kombination der ABCA3 Variationen p.M760R und p.R208W präsentierte sich auf ähnliche Weise mit einem frühen respiratorischen Versagen, elektronendichten Einschlusskörperchen in der Lungenhistologie und progressiven interstitiellen Pneumonien, bis es schließlich im Alter von 5 Jahren eine Lungentransplantation erhielt [28]. Obwohl aufgrund der Versuchsergebnisse in dieser Arbeit nur eine geringe Auswirkung der Variation p.R208W auf den ABCA3 Transporter zu erwarten ist, konnte dessen verbleibende Proteinfunktion scheinbar nicht für den durch die Variation p.M760R verursachten schweren Trafficking-Defekt auf dem anderen Allel kompensieren.

Diese Fälle beweisen die starke Korrelation der in dieser Arbeit erzielten *in vitro* Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf betroffener Patienten.

5.4 ABCA3 Varianten mit gestörtem Lipidtransport

5.4.1 Zellulärer Phänotyp der Varianten p.E292V und p.K1388N

ABCA3 Proteine mit der bereits beschriebenen Variation p.E292V [58] und der hier neu charakterisierten Variation p.K1388N wurden sowohl im ER als auch im GA korrekt prozessiert und wiesen daher die charakteristischen komplexen Oligosaccharidketten an ihren N-Glykosylierungsstellen auf. Es zeigte sich im Vergleich mit dem ABCA3 Wildtypprotein jedoch ein verringertes Verhältnis von komplexen zu mannosereichen Oligosacchariden (Abbildung 12), was bedeutet, dass ein gleichermaßen geringerer Anteil dieser ABCA3 Proteine tatsächlich den GA passiert hat.

In der Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 13) konnte die korrekte Lokalisation der p.E292V und p.K1388N Proteine in mit CD63 markierten Vesikeln nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesem vesikulären Verteilungsmuster war in p.K1388N exprimierenden Zellen jedoch auch noch ein sehr schwaches diffuses Signal zu beobachten, ähnlich wie in p.Q215K bzw. p.M760R exprimierenden Zellen. Es zeigte sich keine erkennbare Kolo­kalisierung dieses diffusen Signals mit den Lamellarkörperchen oder dem ER. Daher ist von einer zytoplasmatischen Lokalisation eines kleinen Anteils an fehlgefalteten p.K1388N Proteinen auszugehen, welche vermutlich dem zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-Abbau-System zugeführt wurden.

Die proteolytische Spaltung der korrekt lokalisierten ABCA3 Proteine fand sowohl in p.E292V als auch in p.K1388N exprimierenden Zellklonen statt, jedoch in geringerem Ausmaß in p.K1388N exprimierenden Zellen (Abbildung 17). Dies beruht vermutlich ebenfalls auf dem bereits beschriebenen Anteil an fehllokalisiertem p.K1388N Protein.

In der Tat könnte die durch die Mutation entstandene zusätzliche N-Glykosylierungsstelle (Austausch von Lysin K gegen Asparagin N an Stelle 1388 nahe der NBD2) zu einer Konformationsänderung und somit zu einer erhöhten Instabilität des ABCA3 Proteins führen. *Kinting et al.* konnten zeigen, dass sich die intrazelluläre Lokalisation von ABCA3 Transportern mit der Variation p.K1388N durch die Korrektoren C13 und C17 korrigieren lässt. Nach Behandlung der Zellen mit diesen Korrektoren verschwand das in der Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtete diffuse Signal innerhalb der p.K1388N exprimierenden Zellklone und auch der Anteil an regulär (durch proteolytische Spaltung) abgebautem ABCA3 Protein normalisierte sich [48]. Trotz der aufgrund der Variation p.K1388N mutmaßlich beeinträchtigten Stabilität konnte dennoch der Großteil dieser Proteine auch ohne zusätzliche

Korrektoren erfolgreich gefaltet werden und lokalisierte korrekt in Lamellarkörperchen-ähnlichen, vesikulären Strukturen.

Die Volumina der ABCA3 Vesikel in p.E292V und p.K1388N exprimierenden Zellklonen zeigten sich im Vergleich zu ABCA3 Wildtypvesikeln signifikant verringert (Abbildung 14). In der TEM von Zellen mit stabiler Expression der Variation p.K1388N (Abbildung 15) konnten außerdem deformierte Lamellarkörperchen-ähnliche Strukturen nachgewiesen werden, welche sehr wahrscheinlich eine Dysfunktion aufweisen.

Höppner et al. haben vor kurzem eine neue Methode entwickelt, mit welcher die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem PC in durch ABCA3 präformierte Vesikel gemessen werden kann. Passend zu den bereits beschriebenen Beobachtungen konnte mit Hilfe dieser neuen Methode ein reduzierter Lipidgehalt der vesikulären Strukturen in p.K1388N exprimierenden Zellen nachgewiesen werden [44]. Da sich die Variation p.K1388N in unmittelbarer Nähe zur NBD2 des ABCA3 Transporters befindet (Abbildung 5), ist eine Auswirkung auf diese Domäne und damit auch auf den insgesamten Lipidtransport des ABCA3 Proteins sehr wahrscheinlich. Zellklone mit stabiler Expression der Variante p.E292V bildeten keine deformierten Lamellarkörperchen aus (Abbildung 15). Trotz eines normalen Lipidgehalts einzelner vesikulärer Strukturen in p.E292V exprimierenden Zellen konnten *Höppner et al.* jedoch zeigen, dass prozentual weniger dieser vesikulären Strukturen überhaupt mit Lipiden gefüllt waren. Daher kann dennoch von einer Beeinträchtigung der insgesamten Transportaktivität von Proteinen mit dieser Variation ausgegangen werden [44]. Die ABCA3 Variation p.E292V ist in einer zytosolischen Schleife in direkter Nähe zur NBD1 lokalisiert (Abbildung 5) und wurde bereits in früheren Arbeiten als Typ II Mutation mit einer nur moderat erhaltenen Lipidtransportaktivität beschrieben [58].

Die hier gemessenen signifikant verminderten PC- und DPPC-Level in Zellen mit stabiler Expression der Varianten p.E292V und p.K1388N (Abbildung 16) unterstützen ebenfalls die Theorie, dass beide Varianten zu einem gestörten Lipidtransport des ABCA3 Proteins führen.

5.4.2 PC- und DPPC-Analysen zur funktionellen Testung des ABCA3 Transporters

Die essentielle Rolle des ABCA3 Proteins ist der Transport von Surfactant-spezifischen Phospholipiden in Lamellarkörperchen. Da manche Zellklone abhängig von der jeweils stabil transfizierten ABCA3 Variante gar keine oder nur teilweise formierte Lamellarkörperchen ausbilden konnten, war es nicht möglich, gezielt nur die Lamellarkörperchen anhand von

etablierten Standardmethoden für die Lipidanalysen zu isolieren. Als funktioneller Test für die Transportfähigkeit der ABCA3 Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit daher eine Analyse der intrazellulären PC- und DPPC-Mengen durchgeführt [89]. Aufgrund der starken Überexpression des ABCA3 Proteins in den stabil transfizierten Zellen kann davon ausgegangen werden, dass der entsprechend gesteigerte Transport von PC und DPPC in die Lamellarkörperchen einen deutlich erkennbaren Einfluss auf die insgesamt Lipidhomeostase der Zelle und daher auch auf deren totale intrazellulären Lipidmengen hat. Da vor allem DPPC die Hauptspezies der Surfactant-spezifischen Lipide darstellt [63], gibt dessen Analyse aus den Gesamtzelllysaten wichtige Hinweise auf das Ausmaß der intrazellulären Surfactantsynthese [39, 88, 89]. Zur weiteren funktionellen Testung des ABCA3 Transporters besteht außerdem die Möglichkeit, dessen ATP-Hydrolyse zu analysieren. Diese zeigte sich beispielsweise bei der Variation p.E292V beeinträchtigt [58] und könnte auch bei weiteren ABCA3 Varianten zusätzliche Hinweise auf einen Transportdefekt liefern.

Da das in den Lamellarkörperchen gebildete Surfactant mit seinen hohen PC- und DPPC-Anteilen physiologischerweise in den extrazellulären Alveolarraum sezerniert wird [37], wurde in Vorarbeiten bereits versucht, diese Lipide im Überstand von kultivierten, mit ABCA3 transfizierten Zellen zu bestimmen. Die Sensitivität der ESI-MS war jedoch zu gering, um die Lipide in den Zellüberständen verlässlich zu ermitteln. Außerdem gibt es in der aktuellen Literatur keinen Nachweis, dass die bereits vor über 45 Jahren isolierten und seither in Kultur gehaltenen A549 Zellen überhaupt noch die Fähigkeit besitzen, das in den Lamellarkörperchen gebildete Surfactant freizusetzen. Das dem Zellkulturmedium zugesetzte FCS enthält zudem hohe Mengen an nicht standardisierten Lipiden, welche die zu messenden Lipidmengen in den Zellüberständen stark verfälschen könnten. Die in Kultur gehaltenen A549 Zellen benötigen jedoch das FCS für ein normales Wachstum sowie für die Synthese der Surfactant-spezifischen Lipide, sodass darauf nicht verzichtet werden konnte. Zur präzisen Beurteilung der sezernierten Lipide in den Zellüberständen wäre daher ein standardisiertes Wachstumsmedium mit supplementierten Wachstumsfaktoren und markierten Lipiden notwendig, welches bisher leider noch nicht zur Verfügung steht.

5.4.3 Korrelation mit klinischen Daten betroffener Patienten

Zwei Kinder mit jeweils homozygoter Expression der ABCA3 Variation p.E292V entwickelten ein schweres Atemnotsyndrom direkt nach der Geburt und eines der beiden Kinder verstarb bereits kurz darauf [83]. Das andere Kind war im Alter von 2 Jahren noch am Leben, jedoch

sprach es kaum auf klinische Therapieversuche an [81]. Interessanterweise wurde auch bei einem Erwachsenen mit diagnostizierter idiopathischer pulmonaler Fibrose das homozygote Vorliegen der Variation p.E292V nachgewiesen [21]. Dies verdeutlicht die große Bandbreite an klinischen Outcomes dieser ABCA3 Variation und dass für eine verlässliche Beschreibung des entsprechenden Phänotyps in Zukunft noch zusätzliche klinische Daten von weiteren betroffenen Fällen gesammelt werden sollten. Eine junge Patientin mit der homozygoten Expression der neuen ABCA3 Variation p.K1388N entwickelte ebenfalls ein schweres neonatales Atemnotsyndrom, gefolgt von einer chronischen Pneumonitis des Kindesalters und einem frühen postneonatalen Tod [88]. Der letale Ausgang in diesen beschriebenen Fällen legt eine Dysfunktion des ABCA3 Proteins trotz dessen korrekter intrazellulärer Lokalisation nahe und bestätigt erneut die Validität unserer *in vitro* erarbeiteten Ergebnisse.

5.5 ABCA3 Varianten mit Prädisposition für ILD

5.5.1 Zellulärer Phänotyp der Varianten p.R208W, p.R288K und p.G964D

Die bereits beschriebenen ABCA3 Varianten p.R288K [88] und p.G964D [14], wie auch die hier neu untersuchte ABCA3 Variante p.R208W wurden korrekt gefaltet und prozessiert (Abbildung 12), sodass sie innerhalb der exprimierenden Zellen richtig in der äußeren Membran Lamellarkörperchen-ähnlicher Strukturen lokalisieren konnten (Abbildung 13). Die durch das jeweilige ABCA3 Protein induzierten Lamellarkörperchen waren in ihrer Größe vergleichbar mit den Lamellarkörperchen in ABCA3 Wildtyp exprimierenden Zellen (Abbildung 14) und stellten sich dank suffizientem Lipidtransport als gut entwickelte, konzentrisch multilamelläre Zellorganellen in der TEM dar (Abbildung 15). Die intrazellulären PC- und DPPC-Level in Zellklonen mit stabiler Expression dieser ABCA3 Variationen waren vergleichbar mit ABCA3 Wildtyp exprimierenden Zellen (Abbildung 16) und auch die proteolytische Spaltung des jeweiligen ABCA3 Transporters im Rahmen des regulierten Abbaus fand in einem mit dem ABCA3 Wildtyp vergleichbaren Ausmaß statt (Abbildung 17). Anhand dieser Versuchsergebnisse konnte für die ABCA3 Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D somit kein eindeutig klassifizierbarer, zugrundeliegender Pathomechanismus identifiziert werden. Nichtsdestotrotz zeigten betroffene Patienten mit diesen Mutationen klinische Symptome, welche auf einen Defekt des ABCA3 Transporters hinweisen.

5.5.2 Korrelation mit klinischen Daten betroffener Patienten

Ein Neugeborenes mit der heterozygoten Kombination der Varianten p.M760R und p.R208W litt bereits sehr früh an einem respiratorischen Versagen sowie progressiven interstitiellen Pneumonien, bis schließlich eine Lungentransplantation erfolgte [28]. Daher ist anzunehmen, dass die Variante p.R208W auf dem einen Allel das entsprechende ABCA3 Protein so sehr beeinträchtigt, dass der (durch die Variante p.M760R verursachte) schwere ABCA3 Trafficking-Defekt auf dem anderen Allel nicht kompensiert werden konnte.

In einer Gruppe von Kindern mit der heterozygot vorliegenden ABCA3 Mutation p.R288K wurde das Auftreten einer neonatalen respiratorischen Insuffizienz sowie im weiteren Verlauf chronischer interstitieller Lungenerkrankungen bereits im frühen Kindesalter beobachtet [88]. Das stark gehäufte Auftreten der Variante p.R288K in europäisch-stämmigen Säuglingen mit respiratorischem Atemnotsyndrom [84, 88] und die Identifikation von p.R288K in Kindern mit letalem Ausgang eines Atemnotsyndroms (kombiniert homozygot mit der Variante p.Q215K in einem Säugling sowie kombiniert heterozygot mit den Varianten p.R43L und c.4751delT in zwei Geschwistern [12]) liefern belastbare Hinweise für die Pathogenität dieser ABCA3 Variante.

Campo et al. beschrieben den Fall einer Familie mit heterozygoter Expression der ABCA3 Variante p.G964D in mehreren Generationen. Aufgrund einer vorliegenden Konsanguinität waren drei Individuen dieser Familie homozygote Träger dieser Variante: ein Mädchen, bei welchem nach einer pulmonalen Aspiration im Säuglingsalter nun eine diffuse interstitielle Lungenerkrankung im frühen Jugendalter diagnostiziert wurde, sowie zwei Brüder mit jeweils der Diagnose einer interstitiellen Lungenerkrankung im Erwachsenenalter [14].

Basierend auf diesen klinischen Beobachtungen liegt es nahe, dass die ABCA3 Varianten p.R208W, p.R288K und p.G964D für die Entwicklung einer ILD prädisponieren.

5.5.3 Mögliche krankheitsauslösende Pathomechanismen

Eine erst vor kurzem durchgeführte Studie von *Wambach et al.* bestätigt die Beobachtungen dieser Arbeit bezüglich des intrazellulären Traffickings und der Prozessierung der ABCA3 Variante p.R288K [85]. Des Weiteren zeigte die Proteinvariante p.R288K in dieser Studie eine leicht reduzierte ATPase-Aktivität verglichen mit dem ABCA3 Wildtypprotein bei dennoch normaler Biogenese von Lamellarkörperchen-ähnlichen Strukturen. Diese Erkenntnisse suggerieren, dass eine reduzierte ATP-Hydrolyse nicht unbedingt die Formation von Lamellar-

körperchen und daher auch nicht den gesamten ABCA3 Lipidtransport beeinträchtigen muss. Übereinstimmend damit konnten in der vorliegenden Arbeit vergleichbare intrazelluläre PC- und DPPC-Level in stabil mit dem ABCA3 Wildtypgen sowie p.R288K transfizierten Zellen gemessen werden (Abbildung 16). Die von *Wambach et al.* nachgewiesene reduzierte ATP-Hydrolyse scheint nur geringe zelluläre Auswirkungen zu haben, könnte aber für die klinischen Symptome betroffener Patienten verantwortlich sein.

Weitere Pathomechanismen bei diesen Variationen könnten in Verbindung mit einer erhöhten zellulären Apoptoserate stehen, welche möglicherweise durch ER-Stress aufgrund einer partiellen ER-Lokalisation von ABCA3 Proteinen ausgelöst werden kann [86]. Da in dieser Arbeit in keinem der entsprechenden Zellklone ABCA3 Proteine im ER nachgewiesen werden konnten (Abbildung 13) und auch keine erhöhte Zytotoxizität aus der stabilen Transfektion mit den entsprechenden ABCA3 Mutationen resultierte (Abbildung 11), ist dies eher unwahrscheinlich. Dennoch bleibt an dieser Stelle noch einmal zu erwähnen, dass es sich bei den für die Versuche verwendeten Zellen um Adenokarzinomzellen handelt, welche in dieser Hinsicht generell widerstandsfähiger als reguläre Pneumozyten sind.

Kaltenborn et al. konnten zeigen, dass die Auswirkungen von ABCA3 Mutationen allein bereits zu einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) führen können [46]. Im Rahmen dieser Transition verlieren Typ II Pneumozyten ihre epitheliale Differenzierung und nehmen Eigenschaften mesenchymaler Zellen an, ein Prozess der maßgeblich an der Entstehung der typischen irreversiblen Fibrose bei Patienten mit diffuser Lungenerkrankung beteiligt ist. Neben der Integrität des Alveolarepithels wird dadurch auch die pulmonale Surfactantproduktion beeinträchtigt. Die ABCA3 Sequenzvariationen p.R208W, p.R288K und p.G964D könnten eine EMT in Typ II Pneumozyten induzieren und auf diese Weise für die Entstehung einer diffusen Lungenerkrankung prädisponieren.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass in den jeweiligen Patienten zusätzlich zu den identifizierten Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D noch weitere genetisch bedingte krankheitsmodifizierende Faktoren vorlagen. Dazu gehören beispielsweise Mutationen in Cis-wirkenden Elementen, Introns oder sonstigen nicht translationierten Regionen innerhalb des ABCA3 Gens, welche sich auf die Expression und das mRNA Splicing auswirken können [4]. Im Rahmen von standardmäßig durchgeführten Sequenzierungen werden diese Bereiche allerdings nicht abgedeckt. Auch zusätzlich vorhandene Mutationen in anderen Genen, welche nicht in direktem Zusammenhang mit der Expression von ABCA3 stehen, sowie jegliche

epigenetischen Veränderungen können sich auf das ABCA3 Protein, die Typ II Pneumozyten und die Synthese von pulmonalem Surfactant auswirken.

Neben der jeweils individuellen genetischen Prädisposition der Patienten spielen auch externe umweltbedingte Faktoren eine wichtige Rolle für die Entstehung und den Verlauf von diffusen Lungenerkrankungen. Vermeidbare äußere Einflüsse, wie beispielsweise eine Exposition gegenüber Tabakrauch oder Staub und virale Infektionen, führen zu einer zusätzlichen Schädigung der epithelialen Zellen, wodurch wiederum eine EMT und somit die Progression einer bereits bestehenden Lungenerkrankung begünstigt wird. *Kaltenborn et al.* wiesen im Zellmodell nach, dass das bei Kindern häufig beobachtete Respiratory Syncytial Virus (RSV) einen potenzierenden Effekt auf die durch ABCA3 Mutationen induzierte EMT von Typ II Pneumozyten hat [46].

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen, aufgrund derer die ABCA3 Variationen p.R208W, p.R288K und p.G964D für eine Lungenerkrankung prädisponieren, konnten nicht abschließend identifiziert werden. Diese Variationen scheinen nur geringe Auswirkungen auf das ABCA3 Protein und das pulmonale Surfactantsystem zu zeigen, jedoch kann eine Kombination mit weiteren schädigenden Faktoren, einer möglicherweise bereits bestehenden Lungenerkrankung oder einer längeren Zeitspanne schlussendlich doch zu einer chronischen Lungenerkrankung führen. Daher ist die strenge Meidung externer schädlicher Umwelteinflüsse sowie die konsequente Behandlung von pulmonalen Infekten ein wichtiges therapeutisches Ziel für Patienten mit diesen ABCA3 Mutationen.

5.5.4 Multiple Mittelwertvergleiche zur Ermittlung statistischer Signifikanzen

In dieser Arbeit wurde eine ganze Reihe an verschiedenen ABCA3 Varianten untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Dabei wurde nach einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Tukey Test für multiple Mittelwertvergleiche angewendet um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen zu ermitteln. Diskrete feine Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind nur schwer messbar und könnten sich im Rahmen dieser multiplen Mittelwertvergleiche weniger signifikant zeigen. Ein direkter Vergleich zwischen dem ABCA3 Wildtyp und der Variation p.R288K beispielsweise deckt minimale Unterschiede auf, wie etwa 20 % kleinere Lamellarkörperchen in p.R288K exprimierenden Zellklonen [88], welche in den in dieser Arbeit durchgeführten multiplen Mittelwertvergleichen allerdings nicht mehr detektierbar waren. Ebenso konnten bei den hier durchgeführten Analysen keine signifikanten Unterschiede im Lipidgehalt von Zellen mit stabiler Expression der Variante p.G964D im

Vergleich zu ABCA3 Wildtypzellen gemessen werden, wie sie zuvor von *Campo et al.* beschrieben wurden [14]. Diese Diskrepanz, wie auch die stärker variabel erscheinende Organisation von Lamellarkörperchen-ähnlichen Strukturen in der TEM, liegt am ehesten an den im Verhältnis nur geringen Auswirkungen auf die insgesamt zelluläre Lipidzusammensetzung und der in der Studie von *Campo et al.* verwendeten unterschiedlichen Zelllinie HEK293.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Reihe krankheitsauslösender ABCA3 Missense Mutationen auf den zellulären Phänotyp *in vitro* untersucht. Die gezielte Anwendung von ausgewählten Versuchen im Zellmodell ermöglichte eine Einteilung dieser ABCA3 Mutationen in Gruppen mit ähnlichen molekularen Defekten und daraus resultierenden Pathomechanismen. Die Validität der *in vitro* erzielten Versuchsergebnisse konnte anhand der engen Korrelation mit bereits zuvor erhobenen klinischen Daten von betroffenen Patienten erfolgreich demonstriert werden. Die Identifikation der zugrundeliegenden Pathomechanismen ist für Patienten mit derartigen ABCA3 Mutationen von sehr großer Bedeutung. Einerseits lässt ein verbessertes Verständnis über die jeweiligen krankheitsauslösenden Vorgänge eine Prognose des weiteren klinischen Verlaufs zu, andererseits können basierend auf diesen identifizierten Pathomechanismen gezielt neue kausale Therapiestrategien entwickelt und zukünftig auch angewendet werden.

Die bereits bekannte ABCA3 Variation p.Q215K als auch die hier erstmalig untersuchte Variation p.M760R führten zu einem gestörten intrazellulären ABCA3 Trafficking, bedingt durch eine fehlerhafte Faltung des Proteins. Der Abbau dieser fehlgefalteten ABCA3 Proteine im zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-System könnte beispielsweise durch Proteasom-inhibitoren gebremst werden [10] oder bereits verfügbare kleine molekulare Korrektoren könnten als chemische Chaperone das intrazelluläre Trafficking durch eine korrekte Faltung des ABCA3 Proteins unterstützen [48].

Die neu charakterisierte ABCA3 Variante p.K1388N führte ebenso wie die bereits bekannte Variante p.E292V zu einer Beeinträchtigung des ABCA3 Lipidtransports. Dieser könnte durch die Anwendung kleiner molekularer Potentioren verbessert werden, ähnlich wie es bereits bei Transportdefekten in den strukturell verwandten ABCB4 [24] und ABCC7 [67, 73] Proteinen beschrieben wurde.

Während die genaue Identifikation der ursächlichen molekularen Defekte in diesen Fällen eine zukünftige Entwicklung mutationsspezifischer Medikamente ermöglicht, ist in anderen Fällen die Sekundärprophylaxe von größerer Bedeutung für den Erkrankungsverlauf. Die bereits beschriebenen ABCA3 Variationen p.R288K und p.G964D wie auch die hier neu untersuchte Variation p.R208W prädisponieren auf eine noch unbekannt Weise für die Entwicklung einer Lungenerkrankung, sodass eine strikte Meidung zusätzlicher externer Lungenstressoren hier

vorerst das hauptsächliche primäre Therapieziel für von diesen Mutationen betroffene Patienten darstellen könnte.

Die Entwicklung eines zuverlässigen dreidimensionalen ABCA3 Strukturmodells wie auch eine auf dieser Arbeit aufbauende weitere Optimierung der *in vitro* Charakterisierung von ABCA3 Variationen, zum Beispiel durch Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen spielen weiterhin eine sehr wichtige Rolle. Derartige Fortschritte könnten zu einer verbesserten und vor allem schneller durchführbaren Klassifikation von neu in Patienten identifizierten ABCA3 Mutationen führen und somit einen zügigen Beginn gezielter Therapieversuche und darauf aufbauend eine erfolgreiche kausale Behandlung betroffener Patienten ermöglichen.

Literaturverzeichnis

1. *American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001.* Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(2): p. 277-304.
2. Abele, R. and R. Tampe, *The TAP translocation machinery in adaptive immunity and viral escape mechanisms.* Essays Biochem, 2011. **50**(1): p. 249-64.
3. Agassandian, M. and R.K. Mallampalli, *Surfactant phospholipid metabolism.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 612-25.
4. Agrawal, A., A. Hamvas, F.S. Cole, J.A. Wambach, D. Wegner, C. Coghill, K. Harrison, and L.M. Noguee, *An intronic ABCA3 mutation that is responsible for respiratory disease.* Pediatr Res, 2012. **71**(6): p. 633-7.
5. Akella, A. and S.B. Deshpande, *Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders.* Indian J Exp Biol, 2013. **51**(1): p. 5-22.
6. Balis, J.U., S.D. Bumgarner, J.E. Paciga, J.F. Paterson, and S.A. Shelley, *Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction.* Exp Lung Res, 1984. **6**(3-4): p. 197-213.
7. Ban, N., Y. Matsumura, H. Sakai, Y. Takanezawa, M. Sasaki, H. Arai, and N. Inagaki, *ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis.* J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9628-34.
8. Beers, M.F., A. Hawkins, H. Shuman, M. Zhao, J.L. Newitt, J.A. Maguire, W. Ding, and S. Mulugeta, *A novel conserved targeting motif found in ABCA transporters mediates trafficking to early post-Golgi compartments.* J Lipid Res, 2011. **52**(8): p. 1471-82.
9. Beers, M.F. and S. Mulugeta, *The biology of the ABCA3 lipid transporter in lung health and disease.* Cell Tissue Res, 2017. **367**(3): p. 481-493.
10. Beers, M.F., M. Zhao, Y. Tomer, S.J. Russo, P. Zhang, L.W. Gonzales, S.H. Guttentag, and S. Mulugeta, *Disruption of N-linked glycosylation promotes proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCA3.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(12): p. L970-80.
11. Benyair, R., E. Ron, and G.Z. Lederkremer, *Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum.* Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **292**: p. 197-280.
12. Brasch, F., S. Schimanski, C. Muhlfield, S. Barlage, T. Langmann, C. Aslanidis, A. Boettcher, A. Dada, H. Schrotten, E. Mildenerger, E. Pruetter, M. Ballmann, M. Ochs, G. Johnen, M. Griese, and G. Schmitz, *Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(5): p. 571-80.
13. Bullard, J.E., S.E. Wert, and L.M. Noguee, *ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease.* Semin Perinatol, 2006. **30**(6): p. 327-34.

14. Campo, I., M. Zorzetto, F. Mariani, Z. Kadija, P. Morbini, R. Dore, E. Kaltenborn, S. Frixel, R. Zarbock, G. Liebisch, J. Hegermann, C. Wrede, M. Griese, and M. Luisetti, *A large kindred of pulmonary fibrosis associated with a novel ABCA3 gene variant*. *Respir Res*, 2014. **15**: p. 43.
15. Canakis, A.M., E. Cutz, D. Manson, and H. O'Brodovich, *Pulmonary interstitial glycogenosis: a new variant of neonatal interstitial lung disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(11): p. 1557-65.
16. Cheong, N., M. Madesh, L.W. Gonzales, M. Zhao, K. Yu, P.L. Ballard, and H. Shuman, *Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9791-800.
17. Cheong, N., H. Zhang, M. Madesh, M. Zhao, K. Yu, C. Dodia, A.B. Fisher, R.C. Savani, and H. Shuman, *ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(33): p. 23811-7.
18. Citti, A., D. Peca, S. Petrini, R. Cutrera, P. Biban, C. Haass, R. Boldrini, and O. Danhaive, *Ultrastructural characterization of genetic diffuse lung diseases in infants and children: a cohort study and review*. *Ultrastruct Pathol*, 2013. **37**(5): p. 356-65.
19. Clement, A. and E. Eber, *Interstitial lung diseases in infants and children*. *Eur Respir J*, 2008. **31**(3): p. 658-66.
20. Clement, A., N. Nathan, R. Epaud, B. Fauroux, and H. Corvol, *Interstitial lung diseases in children*. *Orphanet J Rare Dis*, 2010. **5**: p. 22.
21. Coghlan, M.A., A. Shifren, H.J. Huang, T.D. Russell, R.D. Mitra, Q. Zhang, D.J. Wegner, F.S. Cole, and A. Hamvas, *Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations*. *BMJ Open Respir Res*, 2014. **1**(1): p. e000057.
22. Creuwels, L.A., L.M. van Golde, and H.P. Haagsman, *The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects*. *Lung*, 1997. **175**(1): p. 1-39.
23. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
24. Delaunay, J.L., A. Bruneau, B. Hoffmann, A.M. Durand-Schneider, V. Barbu, E. Jacquemin, M. Maurice, C. Housset, I. Callebaut, and T. Ait-Slimane, *Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770)*. *Hepatology*, 2017. **65**(2): p. 560-570.
25. Deterding, R.R., L.L. Fan, R. Morton, T.C. Hay, and C. Langston, *Persistent tachypnea of infancy (PTI)--a new entity*. *Pediatr Pulmonol*, 2001. **Suppl 23**: p. 72-3.
26. Deutsch, G.H., L.R. Young, R.R. Deterding, L.L. Fan, S.D. Dell, J.A. Bean, A.S. Brody, L.M. Noguee, B.C. Trapnell, C. Langston, E.A. Albright, F.B. Askin, P. Baker, P.M. Chou, C.M. Cool, S.C. Coventry, E. Cutz, M.M. Davis, M.K. Dishop, C. Galambos, K. Patterson, W.D. Travis, S.E. Wert, and F.V. White, *Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(11): p. 1120-8.
27. Dinwiddie, R., N. Sharief, and O. Crawford, *Idiopathic interstitial pneumonitis in children: a national survey in the United Kingdom and Ireland*. *Pediatr Pulmonol*, 2002. **34**(1): p. 23-9.

28. Doan, M.L., R.P. Guillerman, M.K. Dishop, L.M. Noguee, C. Langston, G.B. Mallory, M.M. Sockrider, and L.L. Fan, *Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children*. Thorax, 2008. **63**(4): p. 366-73.
29. Du, K., P.H. Karp, C. Ackerley, J. Zabner, S. Keshavjee, E. Cutz, and H. Yeger, *Aggregates of mutant CFTR fragments in airway epithelial cells of CF lungs: new pathologic observations*. J Cyst Fibros, 2015. **14**(2): p. 182-93.
30. Engelbrecht, S., E. Kaltenborn, M. Griese, and S. Kern, *The surfactant lipid transporter ABCA3 is N-terminally cleaved inside LAMP3-positive vesicles*. FEBS Lett, 2010. **584**(20): p. 4306-12.
31. Fan, L.L. and C. Langston, *Pediatric interstitial lung disease: children are not small adults*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(11): p. 1466-7.
32. Fitzgerald, M.L., R. Xavier, K.J. Haley, R. Welti, J.L. Goss, C.E. Brown, D.Z. Zhuang, S.A. Bell, N. Lu, M. McKee, B. Seed, and M.W. Freeman, *ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol*. J Lipid Res, 2007. **48**(3): p. 621-32.
33. Flamein, F., L. Riffault, C. Muselet-Charlier, J. Pernelle, D. Feldmann, L. Jonard, A.M. Durand-Schneider, A. Coulomb, M. Maurice, L.M. Noguee, N. Inagaki, S. Amsalem, J.C. Dubus, V. Rigourd, F. Bremont, C. Marguet, J. Brouard, J. de Blic, A. Clement, R. Epaud, and L. Guillot, *Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(4): p. 765-75.
34. Garmany, T.H., M.A. Moxley, F.V. White, M. Dean, W.M. Hull, J.A. Whitsett, L.M. Noguee, and A. Hamvas, *Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations*. Pediatr Res, 2006. **59**(6): p. 801-5.
35. Gassmann, M., B. Grenacher, B. Rohde, and J. Vogel, *Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry*. Electrophoresis, 2009. **30**(11): p. 1845-55.
36. Geurts, A.M., Y. Yang, K.J. Clark, G. Liu, Z. Cui, A.J. Dupuy, J.B. Bell, D.A. Largaespada, and P.B. Hackett, *Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system*. Mol Ther, 2003. **8**(1): p. 108-17.
37. Griese, M., *Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art*. Eur Respir J, 1999. **13**(6): p. 1455-76.
38. Griese, M., M. Haug, F. Brasch, A. Freihorst, P. Lohse, R. von Kries, T. Zimmermann, and D. Hartl, *Incidence and classification of pediatric diffuse parenchymal lung diseases in Germany*. Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 26.
39. Griese, M., H.G. Kirmeier, G. Liebisch, D. Rauch, F. Stuckler, G. Schmitz, R. Zarbock, and I.-B.w.g.o.t. Kids-Lung-Register, *Surfactant lipidomics in healthy children and childhood interstitial lung disease*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117985.
40. Han, S. and R.K. Mallampalli, *The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12**(5): p. 765-74.
41. Hartl, D. and M. Griese, *Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes*. Respir Res, 2005. **6**: p. 32.
42. Herold, G., *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. 2017: Herold, Gerd.

43. Hofmann, N., D. Galetskiy, D. Rauch, T. Wittmann, A. Marquardt, M. Griese, and R. Zarbock, *Analysis of the Proteolytic Processing of ABCA3: Identification of Cleavage Site and Involved Proteases*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152594.
44. Höppner, S., S. Kinting, A.A. Torrano, U. Schindlbeck, C. Brauchle, R. Zarbock, T. Wittmann, and M. Griese, *Quantification of volume and lipid filling of intracellular vesicles carrying the ABCA3 transporter*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1864**(12): p. 2330-2335.
45. Hunt, J.F., C. Wang, and R.C. Ford, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7) structure*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(2): p. a009514.
46. Kaltenborn, E., S. Kern, S. Frixel, L. Fragnet, K.K. Conzelmann, R. Zarbock, and M. Griese, *Respiratory syncytial virus potentiates ABCA3 mutation-induced loss of lung epithelial cell differentiation*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(12): p. 2793-806.
47. Kaminski, W.E., A. Piehler, and J.J. Wenzel, *ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(5): p. 510-24.
48. Kinting, S., S. Höppner, U. Schindlbeck, M.E. Forstner, J. Harfst, T. Wittmann, and M. Griese, *Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(6): p. 943-953.
49. Kleizen, B. and I. Braakman, *Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 343-9.
50. Kobayashi, T., U.M. Vischer, C. Rosnoblet, C. Lebrand, M. Lindsay, R.G. Parton, E.K. Kruihof, and J. Gruenberg, *The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1829-43.
51. Kroner, C., T. Wittmann, S. Reu, V. Teusch, M. Klemme, D. Rauch, M. Hengst, M. Kappler, N. Cobanoglu, T. Sismanlar, A.T. Aslan, I. Campo, M. Proesmans, T. Schaible, S. Terheggen-Lagro, N. Regamey, E. Eber, J. Seidenberg, N. Schwerk, C. Aslanidis, P. Lohse, F. Brasch, R. Zarbock, and M. Griese, *Lung disease caused by ABCA3 mutations*. Thorax, 2017. **72**(3): p. 213-220.
52. Kuo, C.S. and L.R. Young, *Interstitial lung disease in children*. Curr Opin Pediatr, 2014. **26**(3): p. 320-7.
53. Kurland, G., R.R. Deterding, J.S. Hagood, L.R. Young, A.S. Brody, R.G. Castile, S. Dell, L.L. Fan, A. Hamvas, B.C. Hilman, C. Langston, L.M. Noguee, and G.J. Redding, *An official American Thoracic Society clinical practice guideline: classification, evaluation, and management of childhood interstitial lung disease in infancy*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(3): p. 376-94.
54. Lage, H., *An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(20): p. 3145-67.
55. Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro, *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. Int J Cancer, 1976. **17**(1): p. 62-70.
56. Lopez-Marques, R.L., L.R. Poulsen, A. Bailly, M. Geisler, T.G. Pomorski, and M.G. Palmgren, *Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(3): p. 461-75.

57. Mates, L., M.K. Chuah, E. Belay, B. Jerchow, N. Manoj, A. Acosta-Sanchez, D.P. Grzela, A. Schmitt, K. Becker, J. Matrai, L. Ma, E. Samara-Kuko, C. Gysemans, D. Pryputniewicz, C. Miskey, B. Fletcher, T. VandenDriessche, Z. Ivics, and Z. Izsvak, *Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates*. Nat Genet, 2009. **41**(6): p. 753-61.
58. Matsumura, Y., N. Ban, and N. Inagaki, *Aberrant catalytic cycle and impaired lipid transport into intracellular vesicles in ABCA3 mutants associated with nonfatal pediatric interstitial lung disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(4): p. L698-707.
59. Matsumura, Y., N. Ban, K. Ueda, and N. Inagaki, *Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34503-14.
60. Matsumura, Y., H. Sakai, M. Sasaki, N. Ban, and N. Inagaki, *ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(17): p. 3139-44.
61. Molday, R.S., M. Zhong, and F. Quazi, *The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(7): p. 573-83.
62. Mulugeta, S., J.M. Gray, K.L. Notarfrancesco, L.W. Gonzales, M. Koval, S.I. Feinstein, P.L. Ballard, A.B. Fisher, and H. Shuman, *Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22147-55.
63. Nagata, K., A. Yamamoto, N. Ban, A.R. Tanaka, M. Matsuo, N. Kioka, N. Inagaki, and K. Ueda, *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, 2004. **324**(1): p. 262-8.
64. Nardone, L.L. and S.B. Andrews, *Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors*. Biochim Biophys Acta, 1979. **573**(2): p. 276-95.
65. Nathan, N., R.A. Taam, R. Epaud, C. Delacourt, A. Deschildre, P. Reix, R. Chiron, U. de Pontbriand, J. Brouard, M. Fayon, J.C. Dubus, L. Giovannini-Chami, F. Bremont, K. Bessaci, C. Schweitzer, M.L. Dalphin, C. Marguet, V. Houdouin, F. Troussier, A. Sardet, E. Hullo, I. Gibertini, M. Mahloul, D. Michon, A. Priouzeau, L. Galeron, J.F. Vibert, G. Thouvenin, H. Corvol, J. Deblic, and A. Clement, *A national internet-linked based database for pediatric interstitial lung diseases: the French network*. Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 40.
66. Okiyoneda, T., G. Veit, J.F. Dekkers, M. Bagdany, N. Soya, H. Xu, A. Roldan, A.S. Verkman, M. Kurth, A. Simon, T. Hegedus, J.M. Beekman, and G.L. Lukacs, *Mechanism-based corrector combination restores DeltaF508-CFTR folding and function*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(7): p. 444-54.
67. Pasyk, S., C. Li, M. Ramjeeasingh, and C.E. Bear, *Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease*. Biochem J, 2009. **418**(1): p. 185-90.

68. Peca, D., R. Cutrera, A. Masotti, R. Boldrini, and O. Danhaive, *ABCA3, a key player in neonatal respiratory transition and genetic disorders of the surfactant system*. *Biochem Soc Trans*, 2015. **43**(5): p. 913-9.
69. Puntoni, M., F. Sbrana, F. Bigazzi, and T. Sampietro, *Tangier disease: epidemiology, pathophysiology, and management*. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2012. **12**(5): p. 303-11.
70. Quazi, F. and R.S. Molday, *Lipid transport by mammalian ABC proteins*. *Essays Biochem*, 2011. **50**(1): p. 265-90.
71. Reinheckel, T., J. Deussing, W. Roth, and C. Peters, *Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L*. *Biol Chem*, 2001. **382**(5): p. 735-41.
72. Rice, A., M.A. Tran - Dang, A. Bush, and A.G. Nicholson, *Diffuse lung disease in infancy and childhood: expanding the chILD classification*. *Histopathology*, 2013. **63**(6): p. 743-755.
73. Rowe, S.M. and A.S. Verkman, *Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(7).
74. Sabirzhanova, I., M. Lopes Pacheco, D. Rapino, R. Grover, J.T. Handa, W.B. Guggino, and L. Cebotaru, *Rescuing Trafficking Mutants of the ATP-binding Cassette Protein, ABCA4, with Small Molecule Correctors as a Treatment for Stargardt Eye Disease*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(32): p. 19743-55.
75. Schaller-Bals, S., S.R. Bates, K. Notarfrancesco, J.Q. Tao, A.B. Fisher, and H. Shuman, *Surface-expressed lamellar body membrane is recycled to lamellar bodies*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(4): p. L631-40.
76. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method*. *Nature Protocols*, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.
77. Shapiro, D.L., L.L. Nardone, S.A. Rooney, E.K. Motoyama, and J.L. Munoz, *Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1978. **530**(2): p. 197-207.
78. Shulenin, S., L.M. Noguee, T. Annilo, S.E. Wert, J.A. Whitsett, and M. Dean, *ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(13): p. 1296-303.
79. Soares, J.J., G.H. Deutsch, P.E. Moore, M.F. Fazili, E.D. Austin, R.F. Brown, A.G. Sokolow, M.A. Hilmes, and L.R. Young, *Childhood interstitial lung diseases: an 18-year retrospective analysis*. *Pediatrics*, 2013. **132**(4): p. 684-91.
80. Tsien, R.Y., *The Green Fluorescent Protein*. *Annual Review of Biochemistry*, 1998. **67**(1): p. 509-544.
81. Turcu, S., E. Ashton, L. Jenkins, A. Gupta, and Q. Mok, *Genetic testing in children with surfactant dysfunction*. *Arch Dis Child*, 2013. **98**(7): p. 490-5.
82. von Mutius, E., M. Gappa, E. Eber, and U. Frey, *Pädiatrische Pneumologie*. 3 ed. Vol. 3. 2013: Springer Medizin.
83. Wambach, J.A., A.M. Casey, M.P. Fishman, D.J. Wegner, S.E. Wert, F.S. Cole, A. Hamvas, and L.M. Noguee, *Genotype-phenotype correlations for infants and children with ABCA3 deficiency*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **189**(12): p. 1538-43.

-
84. Wambach, J.A., D.J. Wegner, K. Depass, H. Heins, T.E. Druley, R.D. Mitra, P. An, Q. Zhang, L.M. Noguee, F.S. Cole, and A. Hamvas, *Single ABCA3 mutations increase risk for neonatal respiratory distress syndrome*. *Pediatrics*, 2012. **130**(6): p. e1575-82.
 85. Wambach, J.A., P. Yang, D.J. Wegner, H.B. Heins, L.N. Kaliberova, S.A. Kaliberov, D.T. Curiel, F.V. White, A. Hamvas, B.P. Hackett, and F.S. Cole, *Functional Characterization of ATP-Binding Cassette Transporter A3 Mutations from Infants with Respiratory Distress Syndrome*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016. **55**(5): p. 716-721.
 86. Weichert, N., E. Kaltenborn, A. Hector, M. Woischnik, A. Schams, A. Holzinger, S. Kern, and M. Griese, *Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells*. *Respir Res*, 2011. **12**: p. 4.
 87. Whitsett, J.A., S.E. Wert, and T.E. Weaver, *Diseases of pulmonary surfactant homeostasis*. *Annu Rev Pathol*, 2015. **10**: p. 371-93.
 88. Wittmann, T., S. Frixel, S. Höppner, U. Schindlbeck, A. Schams, M.V. Kappler, J. Hegermann, C. Wrede, G. Liebisch, A. Vierzig, A. Zacharasiewicz, M. Kopp, C.F. Poets, W. Baden, D. Hartl, A.H. Van Kaam, P. Lohse, C. Aslanidis, R. Zarbock, and M. Griese, *Increased risk of interstitial lung disease in children with a single R288K variant of ABCA3*. *Mol Med*, 2016.
 89. Wittmann, T., U. Schindlbeck, S. Höppner, S. Kinting, S. Frixel, C. Kroner, G. Liebisch, J. Hegermann, C. Aslanidis, F. Brasch, S. Reu, P. Lasch, R. Zarbock, and M. Griese, *Tools to explore ABCA3 mutations causing interstitial lung disease*. *Pediatr Pulmonol*, 2016. **51**(12): p. 1284-1294.
 90. Wolters, P.J., H.R. Collard, and K.D. Jones, *Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2014. **9**: p. 157-179.

Publikationsliste

Erstautorenschaften

Schindlbeck, U., T. Wittmann, S. Höppner, S. Kinting, G. Liebisch, J. Hegermann, and M. Griese, *ABCA3 missense mutations causing surfactant dysfunction disorders have distinct cellular phenotypes*. Hum Mutat, 2018. 39(6): p. 841-850.

Wittmann, T., **U. Schindlbeck**, S. Höppner, S. Kinting, S. Frixel, C. Kroner, G. Liebisch, J. Hegermann, C. Aslanidis, F. Brasch, S. Reu, P. Lasch, R. Zarbock, and M. Griese, *Tools to explore ABCA3 mutations causing interstitial lung disease*. Pediatr Pulmonol, 2016. 51(12): p. 1284-1294.

Co-Autorenschaften

Kinting, S., S. Höppner, **U. Schindlbeck**, M.E. Forstner, J. Harfst, T. Wittmann, and M. Griese, *Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors*. Hum Mol Genet, 2018. 27(6): p. 943-953.

Höppner, S., S. Kinting, A.A. Torrano, **U. Schindlbeck**, C. Brauchle, R. Zarbock, T. Wittmann, and M. Griese, *Quantification of volume and lipid filling of intracellular vesicles carrying the ABCA3 transporter*. Biochim Biophys Acta, 2017. 1864(12): p. 2330-2335.

Wittmann, T., S. Frixel, S. Höppner, **U. Schindlbeck**, A. Schams, M.V. Kappler, J. Hegermann, C. Wrede, G. Liebisch, A. Vierzig, A. Zacharasiewicz, M. Kopp, C.F. Poets, W. Baden, D. Hartl, A.H. Van Kaam, P. Lohse, C. Aslanidis, R. Zarbock, and M. Griese, *Increased risk of interstitial lung disease in children with a single R288K variant of ABCA3*. Mol Med, 2016.

Kongressbeiträge

Kinting, S., S. Höppner, T. Wittmann, **U. Schindlbeck**, J. Harfst, M. Griese, and R. Zarbock, *Rescue of mutant ABCA3 by small molecular correctors*. 2017, Eur Respiratory Soc.

Wittmann, T., **U. Schindlbeck**, S. Höppner, S. Kinting, G. Liebisch, R. Zarbock, and M. Griese, *Classification of different ABCA3 mutations causing interstitial lung disease*. European Respiratory Journal, 2015. 46(suppl 59): p. PA4851.

Höppner, S., T. Wittmann, **U. Schindlbeck**, S. Kinting, A. Torrano, C. Bräuchle, R. Zarbock, and M. Griese, *Functional analysis of the ABCA3-transporter with fluorescent labeled phosphatidylcholine*. European Respiratory Journal, 2015. 46(suppl 59): p. OA3508.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Ulrike Theresia Schindlbeck, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung neuer Missense Mutationen im Lipidtransporter ABCA3“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Regensburg, 23. Oktober 2019

Ulrike Schindlbeck

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Griese für die Bereitstellung des Themas, die fachliche und sehr persönliche Betreuung sowie die engagierte Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit. Vielen Dank, dass Du jederzeit für mich erreichbar warst und mir wertvolle Hilfestellung gegeben hast.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen beiden Mitdotorandinnen Susanna Kinting und Stefanie Höppner für ihre zahlreichen fachlichen Ratschläge, ihre stetige Hilfsbereitschaft und gute Freundschaft, welche mir auch in schwierigen Phasen die nötige Motivation für diese Arbeit gegeben hat.

Außerdem möchte ich meinem Mitdotoranden Thomas Wittmann danken für die ausführliche Einarbeitung im Labor und die gute Zusammenarbeit an unserem Forschungsprojekt. Jan Hegermann, Gerhard Liebisch, Kathrin Schiffel, Waltraud Wesselak, Andrea Schams und allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Griese danke ich für die allzeit freundliche Kooperation und die schöne gemeinschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mein Medizinstudium und diese Promotion überhaupt erst ermöglicht haben. Danke für Eure unermessliche Geduld, die Ermutigung und liebevolle Unterstützung bei all meinen Plänen und Entscheidungen.