

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

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

Charakterisierung der Funktion des Lipidtransporters ABCA3 im Milchdrüsen- und
Lebergewebe am heterozygoten Mausmodell



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

Lu Heiden
aus Peking

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. univ. Andreas Holzinger

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Anette Pohl-Koppe

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Markus Hammel
Dr. med. Rashmi Mittal

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2020

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
1 Einleitung.....	8
1.1 ABC-Transporter	8
1.1.1 Struktureller Aufbau	8
1.1.2 Funktion.....	12
1.2 ABCA3 in der Lunge.....	14
1.2.1 Surfactant.....	15
1.2.2 Phospholipide	15
1.2.3 Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen	16
1.2.4 Mutation von ABCA3 beim Menschen.....	18
1.3 Die <i>Abca3-knock-out</i> -Maus.....	20
1.4 ABCA3/ <i>Abca3</i> in anderen Organen.....	21
1.4.1 Milchdrüsengewebe und Milch	22
1.4.2 Phospholipide in der Milch.....	24
1.4.3 Leber.....	25
1.4.4 Gallenflüssigkeit.....	26
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	28
2 Material und Methoden	28
2.1 Mauslinie	28
2.2 Haltung	29
2.3 Zucht.....	30
2.4 Markierung mittels Ohrlochstanze	31
2.5 Entnahme und Aufbereitung der Tailclips.....	31
2.6 Genotypisierung.....	32
2.7 Milchstudie	35
2.7.1 Gewinnung der Milch.....	36
2.7.2 Massenspektrometrische Analyse der Milch.....	40
2.7.3 Empirische Durchführung der Milchstudie	40
2.8 Aufbau zur Untersuchung der Leber	41

2.8.1	Gewinnung von Lebergewebe	41
2.8.2	Massenspektrometrische Analyse des Lebergewebes	45
2.8.3	Empirische Durchführung der Analyse der Leber.....	45
3	Ergebnisse der Milchstudie	46
3.1	Zusammensetzung der Phospholipide der Milch.....	46
3.2	Cholesterinester in der Milch	47
3.3	Phospholipide in der Milch.....	48
3.3.1	Phosphatidylcholin	49
3.3.2	Phosphatidylethanolamin.....	55
3.3.3	Phosphatidylinositol	56
3.3.4	Phosphatidylserin.....	57
3.3.5	Plasminogen.....	58
3.3.6	Sphingomylin, Ceramid und Lyso-Phosphatidylcholin.....	59
4	Ergebnisse der Untersuchung der Leber.....	59
4.1	Zusammensetzung der Phospholipide im Lebergewebe	59
4.2	Cholesterinester im Lebergewebe	60
4.3	Phospholipide im Lebergewebe.....	60
4.3.1	Phosphatidylcholin	62
4.3.2	Phosphatidylglycerin	67
4.3.3	Phosphatidylethanolamin.....	71
4.3.4	Phosphatidylinositol	72
4.3.5	Phosphatidylserin.....	73
4.3.6	Plasminogen, Sphingomyelin und Ceramid	74
5	Diskussion	74
5.1	Cholesterinester	74
5.2	Analyse der Milchstudie.....	74
5.2.1	Phosphatidylcholin ohne Aufteilung nach Melktag	74
5.2.2	Phosphatidylcholin nach Aufteilung der Melktage	75
5.2.2.1	Zeitliche Veränderung der Lipidzusammensetzung.....	75
5.2.2.2	Kompensation durch andere ABC-Transporter	76
5.2.3	Weitere Phospholipide in der Mausmilch	77
5.3	Analyse des Lebergewebes.....	77

5.3.1	Phosphatidylcholin in der Leber.....	77
5.3.2	Phosphatidylcholin in der Leber im Vergleich zur Lunge	78
5.3.3	Phosphatidylglycerine in der Leber ohne Trennung nach Geschlecht	78
5.3.4	Phosphatidylglycerine in der Leber nach Trennung nach Geschlecht	78
5.3.4.1	Cardiolipin.....	79
5.3.4.2	Geschlechtsspezifischer Dimorphismus.....	79
5.4	Weitere Phospholipide in der Leber	80
6	Schlussfolgerung	80
6.1	Schlussfolgerung und Ausblick der Milchstudie.....	80
6.2	Schlussfolgerung und Ausblick der Analyse der Leber	81
	Abkürzungsverzeichnis	84
	Abbildungsverzeichnis	86
	Tabellenverzeichnis.....	88
	Literaturverzeichnis.....	91

Zusammenfassung

ABCA3 (= *ATP binding cassette subfamily A member 3*) ist ein Membranprotein der Familie der ABC-Transporter. Es besitzt eine hochgradige Sequenzkonservierung und ist beim Menschen und bei der Maus nachweisbar (ABCA3 = Gen des Menschen / Abca3 = Gen der Maus / ABCA3p = Genprodukt, Protein).

ABCA3 wird am stärksten in Pneumozyten Typ II der Lunge exprimiert und ist an der Synthese von Surfactant beteiligt, einer phospholipidreichen Substanz zur Verminderung der Oberflächenspannung. Das Surfactant-Mangel-Syndrom im Falle einer homozygoten oder compound-heterozygoten ABCA3-Defizienz führt beim Neugeborenen zum *infant respiratory distress syndrome* (IRDS) mit letaler Lungendysfunktion. Eine heterozygote ABCA3-Defizienz ist zumeist asymptomatisch, kann aber vergesellschaftet sein mit dem Auftreten von interstitiellen Lungenerkrankungen.

Neben der Lunge ist ABCA3p auch in weiteren Organen nachzuweisen und es wurde das laktierende Milchdrüsenepithel und die Leber untersucht. Das humane und murine Brustdrüsenepithel exprimiert ABCA3/Abca3. Immunhistochemische Färbungen zeigen ABCA3p in der *milk fat globule membrane* (MFGM) humaner und muriner Milch. Im Lebergewebe ist die Expression von Abca3 auf mRNA-Ebene und ABCA3p darstellbar. Phospholipide sind für die produzierten Sekrete, Milch und Gallenflüssigkeit, funktionell von Bedeutung. Es stellt sich die Frage, inwieweit eine heterozygote Abca3-Defizienz den Phospholipidtransport im Milchdrüsenepithel und in der Leber beeinträchtigt. Homozygot Abca3-defiziente Mäuse versterben postpartal rasch an respiratorischem Versagen, so dass die Proben von heterozygot Abca3-defizienten Tieren gewonnen wurden.

Die Milchproben von heterozygot Abca3-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen (WT) wurden an drei Zeitpunkten bis zum 15. Tag post partum gesammelt und verglichen. Die Daten zeigen eine Verminderung der kurzkettigen Phosphatidylcholine (PC) PC 30:0 und PC 32:0 am Tag 5 (jeweils $p = 0.02$) und PC 34:2 am Tag 10 ($p = 0.03$). Am Tag 15 besteht kein Unterschied.

Lebergewebe von heterozygot Abca3-defizienten Mäusen und WT wurde verglichen und nach Geschlecht getrennt untersucht. Anhand der Ergebnisse beeinflusst die heterozygote Abca3-Defizienz die Konzentration von PC und Phosphatidylglycerin (PG) im Lebergewebe. Im Vergleich sind PC 34:0, PC 36:0 und PC 40:4 erniedrigt ($p < 0.01$ bis $p = 0.03$). PG 36:2 ist bei den männlichen Mäusen erniedrigt ($p = 0.02$), im Gegensatz dazu aber bei den weiblichen Mäusen erhöht ($p < 0.01$) vorhanden.

Die Verminderung kurzkettiger PCs in der Milch von heterozygot Abca3-defizienten Mäuse deutet auf eine Funktion von ABCA3p bei der Milchsekretion hin. In der Lunge führt eine homozygote Abca3-Defizienz vor allem zu einer Reduktion der kurzkettigen PCs. Im Verlauf der Laktation kommt es in der untersuchten Milch zu einer Abnahme der kurzkettigen PCs mit Anstieg der langkettigen PCs. Am Tag 15 können die verminderte Konzentration der kurzkettigen PCs oder eine physiologischen Herabregulation von ABCA3p Gründe sein weshalb keine signifikante Veränderung mehr messbar ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die kompensatorische Hochregulation eines strukturell ähnlichen ABC-Transporters (zum Beispiel ABCA1p). Bei ABCC2p und ABCD1p existieren kompensatorische Mechanismen.

Auch die Analyse des Lebergewebes weist auf eine Beteiligung von ABCA3p beim Phospholipidtransport hin. Die Konzentrationen der betroffenen PCs sind sehr gering, so dass eine pathologische Auswirkung fraglich ist.

Hinsichtlich der PGs sind allerdings große Untergruppen betroffen. Je nach Geschlecht führt die heterozygote Abca3-Defizienz zu einer signifikanten Zunahme oder Abnahme von PG 36:2. Dies könnte auf einen geschlechtsspezifischen Dimorphismus hinweisen, wie er für ABCG2p in der Leber beschrieben ist.

ABCA3p ist auch am Phospholipidtransport im Milchdrüsengewebe und im Lebergewebe beteiligt. Da aber nur Gewebeproben von heterozygot Abca3-defizienten Tieren untersucht worden sind und somit 50 % der Aktivität von ABCA3p erhalten ist, können die bisherigen Ergebnisse nur als Hinweise dienen.

Ob weiterhin ein kompensatorischer ABC-Transporter für ABCA3p existiert oder ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus besteht, sind zusätzliche Fragen, die im Rahmen dieser Dissertation hypothetisch bleiben.

1 Einleitung

Biomembranen sind semipermeable Trennschichten und dienen dem Erhalt der Homöostase von Zellen. Zum einen begrenzen Biomembranen das Innere einer Zelle von der Umwelt, zum anderen sind intrazelluläre Kompartimente ebenfalls durch Biomembranen von der restlichen Zellmatrix abgetrennt. Proteine in diesen Biomembranen gewährleisten den geregelten Austausch von Substraten, Produkten und Botenstoffen.

1.1 ABC-Transporter

Eine der größten bekannten Untergruppen dieser Proteine stellt die Familie der *ATP binding cassette* (ABC) Transporter dar. Die meisten ABC-Transporterproteine formen tunnelartige Passagen für den transmembranen Austausch [Dean and Annilo 2005; Davidson et al. 2008]. Sie sind in allen Organismen nachweisbar und besitzen eine hochgradige Sequenzkonservierung. Allen Mitgliedern dieser Gruppe liegt eine homologe Grundstruktur und die Energieumsetzung durch Bindung und Hydrolyse von ATP zugrunde [Higgins 1992; Jones and George 2004].

Die Mukoviszidose, der Morbus Stargardt und die X-Adrenoleukodystrophie sind einige Beispiele von Krankheitsbildern, bei denen eine Mutation in einem ABC-Transporter zugrunde liegt [Hyde et al. 1990; Allikmets et al. 1997].

1.1.1 Struktureller Aufbau

Beim Menschen sind bisher 49 Vertreter von ABC-Transportern mit ihrer genetischen Lokalisation auf den Chromosomen bekannt. Diese werden in sieben Unterfamilien, ABCA bis ABCG, eingeteilt.

<u>ABC- Untergruppe</u>	<u>dazu zugehören</u>	<u>Merkmale</u>
ABCA	12 Volltransporter	<ul style="list-style-type: none"> • Beinhaltet die größten kodierenden Gene mit Proteinen über 2100 Aminosäuren • Existieren nicht in Hefezellen • <u>Funktion:</u> u. a. Lipidtransport, Gewährleistung der Sehfähigkeit
ABCB	4 Volltransporter und 7 Halbtransporter	<ul style="list-style-type: none"> • ABCB1 (MDR1) war der erste beschriebene ABC-Transporter • <u>Funktion:</u> u. a. Ausbildung von Medikamentenresistenzen, Gallensekretion
ABCC	12 Volltransporter	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Funktion:</u> u. a. Regulation der Insulin-Sekretion, Ionentransport, Abbau von Toxinen
ABCD	3 Halbtransporter	<ul style="list-style-type: none"> • Alle Transporter sind nur in den Peroxisomen vorhanden • <u>Funktion:</u> Transport der überlangkettigen Fettsäuren (<i>very long chain fatty acid</i>, VLCFA)
ABCE und ABCF	1 Molekül (ABCE) und 3 Moleküle (ABCF)	<ul style="list-style-type: none"> • Besitzen eine ATP-Bindungsstelle • Beinhalten keine Transportfunktion, da sie nicht membranständig und keine TMDs vorhanden sind • <u>Funktion:</u> Regulationsproteine, z. B. Immunsystem
ABCG	6 "reverse" Halbtransporter	<ul style="list-style-type: none"> • Aufbau: NBF am N- und TMD am C-Terminus • <u>Funktion:</u> Cholesterin- und Lipidtransport, Ausbildung von Medikamentenresistenzen • ABCG3: Nur bei Nagetieren vorhanden • ABCG4: Nur in der Leber vorhanden

Tab. 1: Untergruppen der humanen ABC-Transporter [Dean 2001; Dean and Annilo 2005]

Ein funktionsfähiger ABC-Transporter wird aus vier Domänen gebildet, bestehend aus zwei vorwiegend hydrophoben Transmembran-Domänen (TMD) und zwei hydrophilen Nucleotide-binding-fold-Domänen (NBD) [Higgins 1992]. Vom N-Terminus ausgehend setzt sich die Anordnung meist in der Reihenfolge „TMD-NBD-TMD-NBD“ zusammen. Andere Konstellationen, wie „NBD-TMD-NBD-TMD“, „NBD-TMD“ oder „TMD-NBD“ treten ebenfalls auf, sind aber wesentlich seltener [Dean 2001].

Im Bereich der beiden TMDs liegen die Substratbindungsstellen. Jede TMD besteht aus sechs bis elf membrandurchspannenden Segmenten in α -Helix-Konformation. Die jeweilige Aminosäuresequenz legt die Spezifität für das zu transportierende Molekül fest [Loo and Clarke 2001; Holland and Blight 1999; Stride et al. 1999]. In Folge sind die Aminosäuresequenzen der TMDs im Vergleich zu denen der NBDs deutlich variabler und weniger konserviert.

Die weiteren zwei Domänen eines vollständigen Transporters, zwei NBDs, beinhalten jeweils eine der charakteristischen ATP-Bindungsstellen, eine Sequenz von etwa 200 Aminosäuren. Diese befinden sich auf der zytosolischen Seite der Membran [Hyde et al. 1990]. Sie liefern durch Bindung und Hydrolyse von einem Adenosintriphosphat (ATP) eine Energie von etwa -30,5 kJ/mol, so dass ein aktiver Transport gegen den Gradienten möglich ist [Higgins 1992; Roerig et al. 2001]. Durch die Hydrolyse von zwei ATPs wird soviel Energie frei, um die Konformationsänderung zum Transport eines Substratmoleküls zu gewährleisten [Linton 2007].

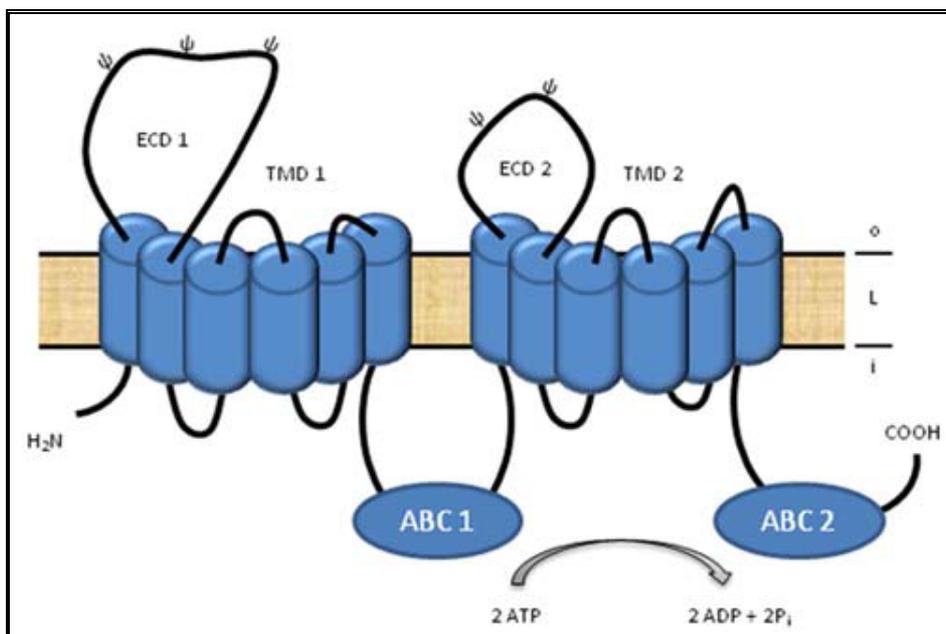


Abb. 1: Schematische Darstellung eines ABC-Transporters der Klasse A. Ein Volltransporter bestehend aus zwei Transmembran-Domänen (TMD), die in der Lipidmembran verankert sind und zwei *ATP-binding cassettes* (ABC) für die Hydrolyse von ATP zur Energiegewinnung [Piehler et al. 2012].

Die ATP-Bindungsstellen der NBDs enthalten jeweils fünf Motive. Zwei dieser Motive repräsentieren die stark konservierten Regionen Walker A (Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser/Thr) und Walker B (Φ - Φ - Φ - Φ -Asp-Glu), wobei X eine beliebige Aminosäure und Φ einen aliphatischen Rest darstellt. Sie liegen 90 bis 120 Aminosäuren von einander entfernt und spielen eine zentrale Rolle bei der Bindung des ATP-Moleküls [Walker et al. 1982; Jones et al. 2009]. Ein weiteres Motiv stellt die Zentralregion zwischen den beiden Walker-Motiven dar, sie enthält den Q-Loop mit einem charakteristischen Glutamin. Die Zentralregion koppelt die Energiegewinnung der ATP-Hydrolyse mit

dem Transport des Moleküls, indem sie die Konformationsänderungen der TMDs und NBDs koordiniert [Jones and George 2002; Hopfner and Tainer 2003].

Zwischen den beiden Walker Motiven, n-terminal der Walker B-Sequenz, befindet sich das hochgradig konservierte Signaturmotiv oder auch C-Motiv genannt. Dieses Motiv beinhaltet die Aminosäuresequenz Leu-Ser-Gly-Gly-Glu und ist einzigartig für die Familie der ABC-ATPasen. Es interagiert mit der Walker A-Region der zweiten NBD, ist damit wesentlich für die Dimerisierung der beiden NBDs und direkt an der Hydrolyse von ATP beteiligt [Higgins and Linton 2004]. Das letzte, weniger stark konservierte Motiv ist der His-Loop mit dem charakteristischen Histidin und ist ebenfalls an der Bindung von ATP beteiligt [Linton 2007].

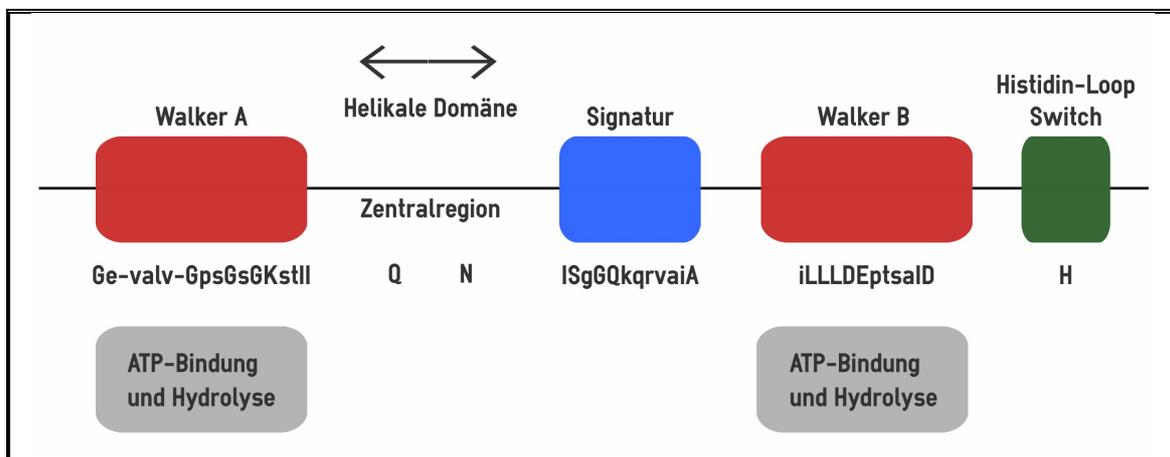


Abb. 2: Schematische Darstellung der fünf Motive des ABC-Transporters [Davidson et al. 2008; Linton 2007]. Kleinbuchstaben bedeuten stark konservierte Aminosäurereste, Großbuchstaben bedeuten variable Aminosäurereste

Diese fünf Motive sind charakteristisch für ABC-Transporter. ABC-ATPasen besitzen kein C-Motiv, ebenfalls fehlt die Zentralregion. Die Walker A- und Walker B-Motive sind zwar vorhanden, doch liegt der Abstand nicht bei 90 bis 120 Aminosäuren [Walker et al. 1982; Higgins 2001].

Die Gene der ABC-Transporter können entweder einen Voll- oder einen Halbtransporter kodieren, wobei ein Halbtransporter nur aus einer TMD und einer NBD-Domäne besteht. Zwei Halbtransporter bilden zusammen wieder ein funktionsfähiges Transportprotein, so dass dieses entweder als Homodimer oder als Heterodimer vorliegen kann [Dean 2001].

Bei Prokaryonten sind die Transporter überwiegend als Heterodimere aus zwei unterschiedlichen Halbtransportern zusammengesetzt. Es werden die einzelnen Polypeptidketten exprimiert, die dann zu funktionellen Einheiten fusionieren. Auf der Genebene kann ein bakterieller ABC-Transporter von einem bis vier eigenständigen Gensequenzen kodiert werden [Davidson et al. 2008].

Die meisten ABC-Transporter bei Eukaryonten bestehen aus ein bis zwei Polypeptidketten. Mehr als die Hälfte der 49 humanen ABC-Transporter liegen als Volltransporter vor. Diese bestehen aus einer durchgehenden Polypeptidkette, die von einer einzigen Gensequenz kodiert wird [Annilo et al. 2003].

1.1.2 Funktion

In ihrer Funktion sind ABC-Transporter meist unidirektionale Transporter. Sie sorgen für den Transport von Molekülen, die die Membranen nicht durch Diffusion passieren können. Bei Prokaryonten sind sowohl Import-, wie auch Exportfunktionen vorhanden [Saurin et al. 1999].

Bei Eukaryonten, damit auch beim Menschen, fungieren ABC-Transporter nur als Exporter. Sie schleusen Moleküle aus dem Zytoplasma der Zelle in den Extrazellularraum oder in Zellkompartimente, wie Peroxisomen oder Mitochondrien [Dean 2001]. Transportiert wird eine Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Größe, angefangen bei Ionen bis hin zu Lipiden, Polypeptiden und hydrophobe Substanzen. Meist erfolgt ein aktiver Transport gegen einen Gradienten. Ausnahmen bestehen wie bei CFTR (= ABCC7p, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), das einen Chloridkanal entlang des Konzentrationsgradienten bildet und dessen Fehlfunktion im Krankheitsbild der Mukoviszidose resultiert [Sheppard and Welsh 1999].

Weiterhin verfügen nicht alle ABC-„Transporter“ über TMDs, so dass nicht immer eine Transportfunktion vorliegt. SUR1 (= ABCC8p) und SUR2 (= ABCC9p) sind in ihrer Funktion am ehesten ATP-Sensoren für die Regulation von Kaliumkanälen [Klein et al. 1999].

Tabelle 2 listet ABC-Transporter und das Krankheitsbild bei entsprechender Fehlfunktion auf.

<u>Nomenklatur</u>	<u>Synonym</u>	<u>Erkrankung(en)</u>
ABCA1	ABC1	Morbus Tangier
ABCA2	ABC2	Demenz vom Alzheimer-Typ
ABCA3	ABC3	Surfactant-Mangel-Syndrom
ABCA4	ABCR	Morbus Stargardt, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, Retinitis pigmentosa, Altersabhängige Makuladegeneration
ABCA7	ABC7	Sjögren-Syndrom
ABCA12	ABC12	Harlequin-Ichthyose, Lamelläre Ichthyose
ABCB1	MDR1	Colitis ulcerosa
ABCB2	TAP1	Immundefizienz; vermutliche Assoziation: Spondylitis ankylosans, insulinpflichtigem Diabetes mellitus und Zöliakie
ABCB3	TAP2	Morbus Wegener-ähnliche Granulomatose
ABCB4	MDR3	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ III, intrahepatische Schwangerschaftscholestase
ABCB7	ABC7	X-chromosomale Sideroblastose und Anämie
ABCB11	BSEP	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ II
ABCC1	MRP1	Neoplasien / Multidrug Resistance assoziiertes Protein 1
ABCC2	MRP2	Dubin-Johnson-Syndrom
ABCC6	MRP6	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC7	CFTR	Mukoviszidose (= Cystische Fibrose)
ABCC8	SUR1	Familiäre persistente insulinabhängige Hypoglykämie des Kindes
ABCC9	SUR2	Dilatative Kardiomyopathie, Cantú-Syndrom, Regulation der Schlafdauer
ABCD1	ALD	Adrenoleukodystrophie (= X-ALD, Addison-Schilder-Syndrom)
ABCD3	PXMP1	Assoziiert mit Gallensäuresynthesedefekt [Ferdinandusse et al. 2015]
ABCD4		Assoziiert mit Störung des Vitamin B ₁₂ -Stoffwechsels [Coelho et al. 2012]
ABCG2	MXR, BCRP	Protoporphyrin IX
ABCG5	White3	Beta-Sitosterolämie
ABCG8	White4	Beta-Sitosterolämie

Tab. 2: Humane ABC-Transporter und assoziierte Erkrankungen [Stefková et al. 2004; Vasiliou et al. 2008]

ABC-Transporter haben in den letzten Jahren in der Forschung deutlich an Bedeutung gewonnen.

MDR1 (*multidrug resistance protein 1*), auch als ABCB1p klassifiziert, ist ein 170 kDa großes Glykoprotein und war der erste humane ABC-Transporter der charakterisiert wurde. Besondere Beachtung fand er, da er bei Tumorzellen für die Entwicklung von Multiresistenzen in Bezug auf die Chemotherapie verantwortlich ist [Gottesman 2002]. Es wird angenommen, dass MDR1 ursprünglich an der Entgiftung im Organismus beteiligt war [Annilo et al. 2003]. *Knock-out* Mäuse, bei denen die Expression von Mdr1 ausgeschaltet wurde, belegen diese Hypothese, da sie deutlich sensitiver auf Medikamente reagieren [Schinkel et al. 1997].

Der Einfluss der ABC-Transporter ist sehr unterschiedlich. Sie können auch wesentlich subtilere, phänotypische Folgen nach sich führen. Es besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen Variationen von ABCC9 und der benötigten Schlafdauer des jeweiligen Menschen [Allebrandt et al. 2013].

1.2 ABCA3 in der Lunge

ABCA3p ist ein ABC-Transporter der Subfamilie A, Nummer 3. Das komplette, kodierende Gen des humanen ABCA3p befindet sich auf Chromosom 16p13.3 [Connors et al. 1997]. Es besteht aus mehr als 80.000 Nucleotid-Basenpaaren und enthält 33 Exons. Nach der Transkription umfasst die mRNA 6466 Basenpaare. Das endgültige Protein besteht aus 1704 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa.

In seiner Aminosäuresequenz ist ABCA3p dem ABCA1p am ähnlichsten [Klugbauer and Hofmann 1996]. Verschiedene Studien weisen auf eine Substratgruppenspezifität der ABCA-Transporter für Lipide hin [Sun et al. 1999; Wang et al. 2003; Agassandian et al. 2004; Akiyama et al. 2005; Garmany et al. 2006].

ABCA3 wird am stärksten im Lungengewebe und dort speziell in der Membran der Lamellarkörperchen von Pneumozyten Typ II exprimiert. Es wird im engen Zusammenhang mit dem Mangel an *Surface active agent* (Surfactant) gesehen, das von den Pneumozyten Typ II synthetisiert wird [Yamano et al. 2001].

1.2.1 Surfactant

Kurt von Neergaard sagte bereits 1929 die Existenz einer oberflächenaktiven Substanz in der Lunge voraus, nachdem er Versuche über die Oberflächenspannung der Lunge durchführte. Etwa 25 Jahre später konnte die physiologische Funktion von Surfactant weiter aufgeklärt werden [Halliday 2008].

Surfactant dient der Verminderung der Oberflächenspannung an der Schnittstelle zwischen Flüssigkeit und Luft in der Lunge. Dort verhindert es vor allem das Kollabieren der Alveolen und ermöglicht die Ventilation des Organs [Goerke 1998]. Es besteht zu einem Großteil aus Lipiden, vor allem Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerin. Unter der Fraktion der Phosphatidylcholine wiederum, dominiert das Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) [Creuwels et al. 1997].

Proteine bilden die restlichen Komponenten des Surfactants. Diese werden in die hydrophoben Apoproteine SP-B und -C (Surfactant-Protein B und C) und die hydrophilen Apoproteine SP-A und -D unterteilt. Die Proteinbestandteile SP-B und -C stehen in engem Zusammenhang miteinander und tragen zur Ventilation der Lunge bei. SP-A und -D spielen dagegen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort der Lunge auf ein breites Erregerspektrum von Bakterien, Viren und Pilzen [Crouch and Wright 2001].

1.2.2 Phospholipide

In In-vitro-Studien muss mindestens 1 mg Phospholipide pro 1 ml Surfactant vorhanden sein, um funktionell eine sehr gute Reduktion der Oberflächenspannung zu ermöglichen [Goerke 1998]. Phospholipide sind phosphathaltige, polare Lipide, bestehend aus einem hydrophilen Kopf und lipophilen Fettsäuren. Aufgrund ihrer Struktur besitzen sie amphiphile Eigenschaften und formen im wässrigen Milieu Lipiddoppelschichten (*lipid bilayer*). Diese Lipiddoppelschichten sind Hauptbestandteile von biologischen Membranen und ubiquitär vorzufinden [Robertson 1960].

Phospholipide können in zwei Gruppen unterteilt werden: Glycerophospholipide und Sphingophospholipide. Glycerophospholipide besitzen als tragendes Element ein Glyceringerüst, das an der sn-1 und sn-2 Position jeweils mit einem Fettsäure-Rest verestert ist. An der sn-3 Position befindet sich die hydrophile Phosphatgruppe.

Sphingolipide enthalten eine Sphingoidbase, an dessen Aminogruppe eine Fettsäure und am Hydroxylende die Phosphatgruppe gebunden ist.

<u>Glycerophospholipide</u>	<u>Sphingophospholipide</u>
Phosphatidylcholine Phosphatidylglycerine Phosphatidylethanolamine Phosphatidylserine Phosphatidylinositole	Sphingomyeline Ceramide Glycosphingolipide

Tab. 3: Einteilung der Phospholipide

1.2.3 Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen

Im Jahre 1959 wurde der Zusammenhang zwischen dem Surfactantmangel und dem Atemnotsyndrom des Neugeborenen hergestellt. Dieses Krankheitsbild beschreibt ein respiratorisches Versagen kurz nach der Geburt [Avery and Mead 1959]. Im englischen Sprachgebrauch wird dieses Syndrom auch *infant respiratory distress syndrome* genannt und als IRDS abgekürzt. Besonders betroffen sind Frühgeborene mit einem Gestationsalter weniger als 34 Schwangerschaftswochen. Auch bei 1 % aller reifen Neugeborenen kann ein IRDS auftreten. Eine Sectio caesarea ohne Geburtswehen erhöht zusätzlich das Risiko [Fedrick and Butler 1972; Gerten et al. 2005].

Ursache für das IRDS beim Frühgeborenen ist ein Surfactantmangel aufgrund der funktionellen und morphologischen Unreife der Lunge. Pathophysiologisch führt dies zu einem Kollaps der Alveolen mit Bildung von Atelektasen in der Lunge [Avery and Mead 1959]. Zur Ventilation werden hohe Beatmungsdrücke benötigt und führen im Verlauf zur weiteren Schädigung der Lunge. Plasmaproteine werden eingelagert und bewirken in Folge die Bildung von hyalinen Membranen mit Verminderung der Lungenelastizität. Das IRDS wird daher deskriptiv als „hyalines Membransyndrom“ bezeichnet.

Eine Einteilung erfolgt nach Bomsel in vier Stadien. Im Stadium IV ergibt sich das Vollbild der „white lung“.

<u>Stadium I</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr feine, granuläre Zeichnung der Lunge • Angedeutetes Pneumobronchogramm
<u>Stadium II</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Homogene, granuläre Zeichnung über der gesamten Lunge • Deutliches Pneumobronchogramm
<u>Stadium III</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Kollabierte Alveolen sind als knötchenartige Verschattungen sichtbar • Ausgeprägtes Pneumobronchogramm • Transparenzminderung der gesamten Lunge und Verschwimmen der Herzkontur
<u>Stadium IV</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Verschattung der gesamten Lunge, die Herzkontur ist nicht mehr auszumachen • Sehr ausgeprägtes Pneumobronchogramm • „white lung“

Tab. 4: Klassifikation der IRDS nach Bomsel [Bomsel 1970; Slama et al. 1999]

Die Therapie des IRDS hängt vom Schweregrad der Erkrankung ab und erfordert eine intensivmedizinische Behandlung in einem Perinatalzentrum. Die endotracheale Applikation von synthetischem Surfactant ist wesentlicher Bestandteil der Therapie. Die erste Applikation beim Menschen zur Verbesserung der respiratorischen Situation im Rahmen des IRDS wurde erstmalig im Jahre 1980 im Lancet publiziert [Fujiwara et al. 1980]. Viele weitere Studien sind in den Jahren gefolgt. Die heutigen Empfehlungen sehen eine frühzeitige, endotracheale Gabe von tierischem oder rekombinantem Surfactant vor. Ziel ist die Reduktion der Mortalität und Vermeidung späterer pulmonaler Erkrankungen [Bahadue and Soll 2012].

Bei drohender Frühgeburt ist die intramuskuläre, antenatale Gabe von Glucocorticoiden bei der Schwangeren indiziert [Ballard and Ballard 1995]. Glucocorticoide induzieren die Lungenreife des Kindes [Liggins and Howie 1972]. Das Risiko für ein IRDS nach der Geburt ist signifikant niedriger, wenn nach Lungenreifeinduktion die Geburt mittels Tokolyse um möglichst 24 bis 48 Stunden verzögert werden kann [Crowley et al. 1990].

Beim reifen Neugeborenen ist das Erkrankungsbild am häufigsten durch eine Fehl- oder Minderfunktion von Surfactant verursacht. Diese kann unter anderem durch Infektionen, Hypoxie oder Durchblutungsstörungen, aber auch durch chemische Reizung, wie eine Mekoniumaspiration, hervorgerufen werden [Moses et al. 1991; Wirbelauer and Speer 2009].

Hereditäre Erkrankungen mit Störung der Surfactantbildung oder -funktion sind wesentlich seltener. Sie führen ebenfalls zum IRDS des reifen Neugeborenen. Am häufigsten handelt es sich hierbei um Genmutationen, die den ABCA3-Transporter der Pneumozyten Typ II oder die Synthese von SP-B betreffen [Edwards et al. 2005; Cheong et al. 2007]. Genmutationen des *surfactant protein B*- (SFTPB-) oder *surfactant protein C*-Gens (SFTPC-Gens) bewirken eine quantitative Verminderung oder den Funktionsverlust des SP-B oder SP-C [Nogee et al. 1993; Hartl and Griese 2005].

Weitere Fälle von IRDS bei früh- und neugeborenen Kindern sind bisher pathophysiologisch noch nicht vollständig ergründet und daher Gegenstand der Forschung.

1.2.4 Mutation von ABCA3 beim Menschen

Mutationen von ABCA3 können mit letaler Lungendysfunktion einhergehen. Bei 16 von 21 reifgeborenen Säuglingen, die an einem ausgeprägten Surfactant-Mangel-Syndrom und IRDS verstarben, ergab die Gensequenzierung eine Mutation von ABCA3. Es lagen *nonsense*-, *frameshift*- oder *splice-site*-Mutationen vor. Hinzu zeigte die elektronenmikroskopische Untersuchung in vier Fällen deutliche Fehlbildungen der Lamellarkörperchen der Pneumozyten Typ II [Shulenin et al. 2004].

ABCA3p ist in der Lunge hauptsächlich in den Außenmembranen der Lamellarkörperchen lokalisiert und quantitativ am höchsten zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden [Mulugeta et al. 2002]. Lamellarkörperchen sind Zellorganellen aus der Familie der Lysosomen, die durch die Fusion verschiedener Multivesikularkörper gebildet werden und durch Exozytose die Sekretion von Surfactant bewirken [Schmitz and Müller 1991; Weaver et al. 2002]. Es wird vermutet, dass ABCA3p die Aufnahme von Lipiden, vor allem Phospholipide, in die intrazelluläre Vesikel bewirkt [Nagata et al. 2004; Cheong et al. 2007].

Der ABCA3-Gendefekt wird rezessiv vererbt. Erst bei Mutation beider Allele tritt die Erkrankung zu Tage. Sie geht mit einem IRDS mit schwerem Verlauf einher und hat häufig einen letalen Ausgang zur Folge. Die meisten Kinder versterben ohne Lungentransplantation zwischen dem dritten und sechsten Lebensmonat [Hayes et al. 2012]. Mildere Verläufe sind beschrieben bei homozygoten, ABCA3-defizienten

Kindern, die die Neonatalperiode überleben. Im weiteren Leben kommt es zum Auftreten von chronischen Lungenerkrankungen [Shulenin et al. 2004].

Eine heterozygote ABCA3-Defizienz ist zumeist asymptomatisch. Über das Kindesalter hinaus kann sie allerdings mit dem Auftreten von interstitiellen Lungenerkrankungen vergesellschaftet sein [Bullard et al. 2005]. Homo- und heterozygote Mutationen von ABCA3 weisen eine sehr weite phänotypische Bandbreite auf.

Bis heute sind mehr als 150 Mutationsvarianten im ABCA3-Gen bekannt [Gower et al. 2010; Park et al. 2010; Whitsett et al. 2010]. Diese werden in zwei Kategorien eingeteilt. Typ I äußert sich durch den inkompletten Transport von ABCA3p in die Multivesikularkörper. Als Folge verbleiben die Proteine im Endoplasmatischem Retikulum der Zelle. Bei Typ II hat die Mutation eine Verminderung der ATP-Hydrolyseaktivität des Transporters zur Folge [Matsumura et al. 2006].

In der Elektronenmikroskopie kommt es letztendlich zu einem Mangel an reifen Lamellarkörperchen in den Pneumozyten Typ II und gleichzeitig zur nachweislichen Reduktion von Phosphatidylcholin und -glycerin in der bronchoalveolären Lavage [Garmany et al. 2006].

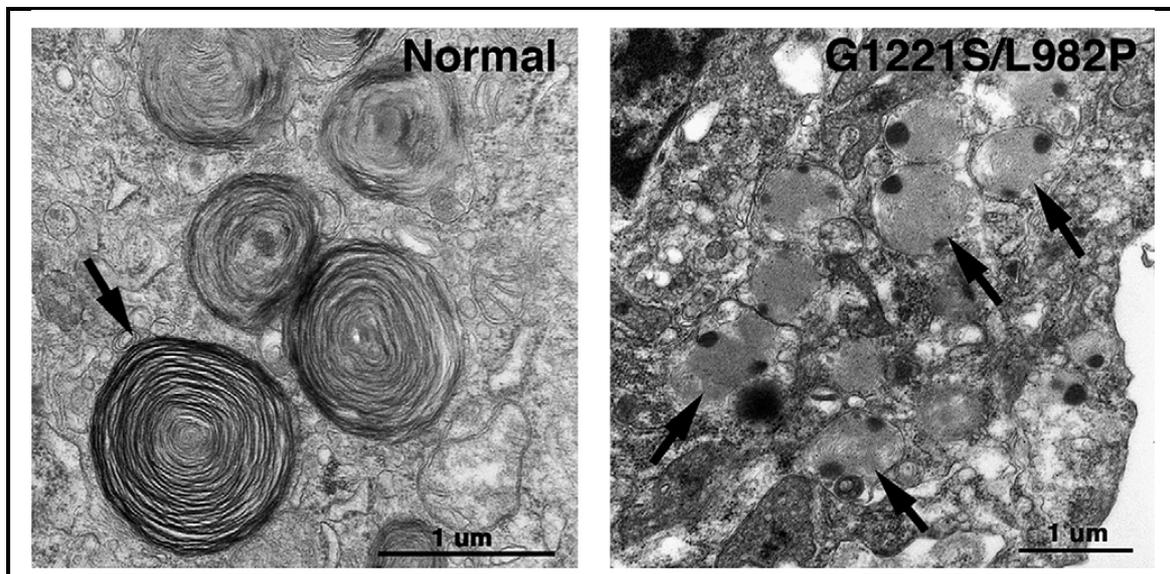


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Analyse von Lamellarkörperchen in Pneumozyten Typ II des Menschen. Links der Vergleich von Lamellarkörperchen mit einer regelrechten Morphologie zu denen eines Individuums mit zwei mutierten ABCA3-Allelen [Gower et al. 2010].

1.3 Die *Abca3*-knock-out-Maus

Im Vergleich zum Menschen existieren Untersuchungen an *Abca3*-defizienten Mausstämmen (*Mus musculus*).

Das murine *Abca3*-Gen befindet sich im Gegensatz zu dem des Menschen auf Chromosom 17b2 und beinhaltet ebenfalls 33 Exons. Das Transkript besteht hierbei aus 5778 Basenpaaren. Gleich dem humanen ABCA3p umfasst das Genprodukt 1704 Aminosäuren.

Heterozygot *Abca3*-defiziente Mäuse unserer Arbeitsgruppe zeigen keinen phänotypischen Unterschied zu Wildtyp-Tieren. Sie entwickeln sich normal und sind fertil. Ebenfalls unterscheidet sich das Lungengewebe in der Licht- und Elektronenmikroskopie nicht.

Dagegen sind homozygot *Abca3*-defiziente Jungtiere postpartal deutlich zyanotisch und verstarben rasch. Die entnommenen Lungen der Tiere weisen Atelektasen ohne suffiziente Inflation auf. Elektronenmikroskopisch besteht ein Mangel an reifen Lamellarkörperchen in den Pneumozyten Typ II [Hammel et al. 2007].

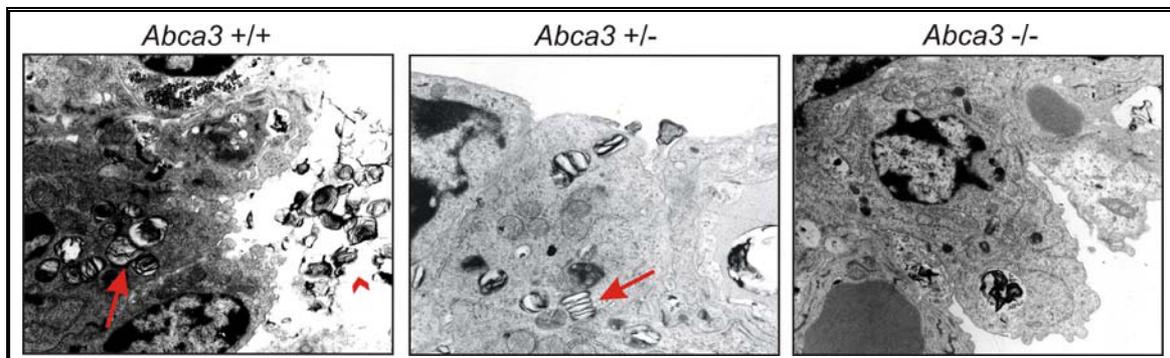


Abb. 4: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von Pneumozyten Typ II der Maus. Wildtyp- und heterozygote Tiere weisen Lamellarkörperchen auf und sind morphologisch nicht zu unterscheiden. Bei dem Genotyp *Abca3*^{-/-} sind keine Lamellarkörperchen vorhanden [Hammel et al. 2007].

Weitere, publizierte *Abca3*-defiziente Mauslinien zeigen ähnliche, respiratorische Symptome bei homozygoter Inaktivierung. Phosphatidylcholin und -glycerin sind in der Konzentration in der Lunge erniedrigt. Besonders Phosphatidylcholine mit kurzkettigen Acylresten waren in der Massenspektrometrie reduziert [Fitzgerald et al. 2007; Ban et al. 2007].

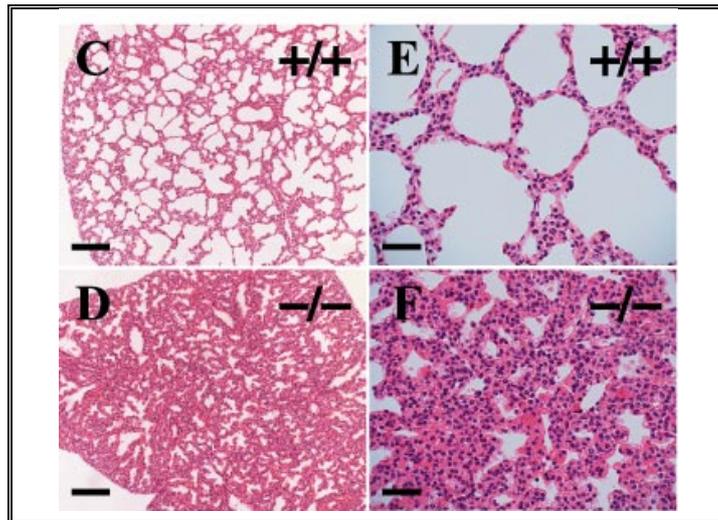


Abb. 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Lungengewebe vom Wildtyp (C und E) und *Abca3*^{-/-} (D und F) eines Wurfes. Im Lungengewebe der *Abca3*^{-/-} Mäuse sind schwere Atelektasen, Lungenstauung, reduzierte Septierung und eine Verdickung sowohl des Mesenchyms, wie auch des Epithelsaumes der Alveoli zu beobachten [Ban et al. 2007].

In einer Studie von Besnard et al. überlebten zwar circa 30 % der Tiere mit einem konditionellen *knock-out* von *Abca3* im Lungenepithel, entwickelten aber im Verlauf ein Lungenemphysem ohne das Vorliegen eines inflammatorischen Geschehens [Besnard et al. 2010].

1.4 ABCA3/Abca3 in anderen Organen

Die Expression von *Abca3* in weiteren Organen wurde an Gewebeproben einer Linie von Albino Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*) untersucht. Im partiellen Vergleich der Aminosäuresequenz der *Abca3*-cDNA sind die Sequenzen von Ratten und Mäuse nahezu identisch und im Vergleich zum Menschen sehr ähnlich [Mulugeta et al. 2002].

h	-EDYIRYDNCSSSVLAAVVFEHFFNHSKEPLPLAVKYHLRFSYTRRNYMWTQTGSFFLKETEGWHTTSLFPLFPNPGPREPT
r	-EDYVRYDNHSSNVLAAVVFEHTFNHSDPLPLAVRYHLRFSYTRRNYMWTQTGNLFLKETEGWHTASLFPPLFPSPGPREPS
m	-EDYIRYDNHSSSVLAAVVFEHFFNHSQDPLPLAVKYHLRFSYTRRNYMWTQTGNIFLKETEGWHTTSLFPLFPSPGPREPS

Abb. 6: Aminosäuresequenz des 310-bp-*Abca3* Nukleotidtranskripts von Ratte (r) und Maus (m) im Vergleich zum Menschen (h). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde untersucht, die graue Schattierung markiert die übereinstimmenden Sequenzen [Mulugeta et al. 2002].

Die höchste Expression von Abca3 wurde in der Lunge einige Tage pränatal nachgewiesen. Aber auch andere Organsysteme exprimieren Abca3-RNA, vor allem Niere, Magen und Darm [Mulugeta et al. 2002].

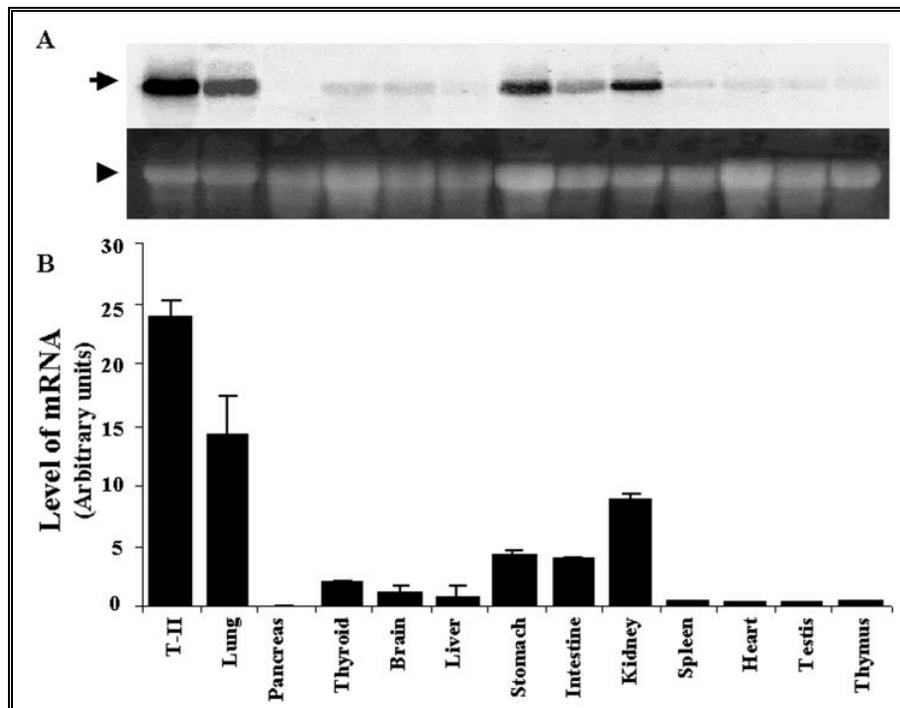


Abb. 7: Expression von Abca3-RNA in Pneumozyten Typ II (T-II) und weiteren Organgewebe der Ratte [Mulugeta et al. 2002].

1.4.1 Milchdrüsengewebe und Milch

Im Milchdrüsengewebe von Mäusen und in den Epithelzellen des Euters bei Kühen (*Bos taurus*) sind ABCA1p, ABCA7p und ABCG1p nachweisbar. Diese Proteine sind zugleich in der *milk fat globule membrane* (MFGM, Milchfetttröpfchen-Membran) der Milch lokalisiert und die jeweilige Konzentration variiert anhängig vom Zeitpunkt der Laktation [Mani et al. 2010; Mani et al. 2011]. ABCA1p und ABCG1p sind am Cholesterin- und Phospholipidtransport verschiedener Zelltypen beteiligt [Oram and Lawn 2001; Kobayashi et al. 2006]. Es wird eine Funktion im Lipidstoffwechsel im Rahmen der Laktation vermutet [Mani et al. 2011].

Neben ABCA1 belegen immunohistochemische Untersuchungen mittels Tissue-Microarrays auch die Expression von ABCA3 im humanen Brustdrüsenepithel. Eine reduzierte Expression von ABCA3 ist als ungünstiger Prognosefaktor für die

Rezidivrate beim duktalem Mamma-Karzinom zu werten [Schimanski et al. 2010]. In der murinen Milchdrüse ist die Abca3-Expression auf mRNA-Ebene nachweisbar [Hammel et al. 2007].

Das Brustdrüsenepithel besteht aus apokrinen Drüsen und sezerniert die *milk fat globules* (MFGs) durch Vesikelabschnürung der apikalen Membranwand [Heid and Keenan 2005]. Es ist anzunehmen, dass ABCA3p durch diesen Mechanismus in die MFGMs gelangt [Mani et al. 2010].

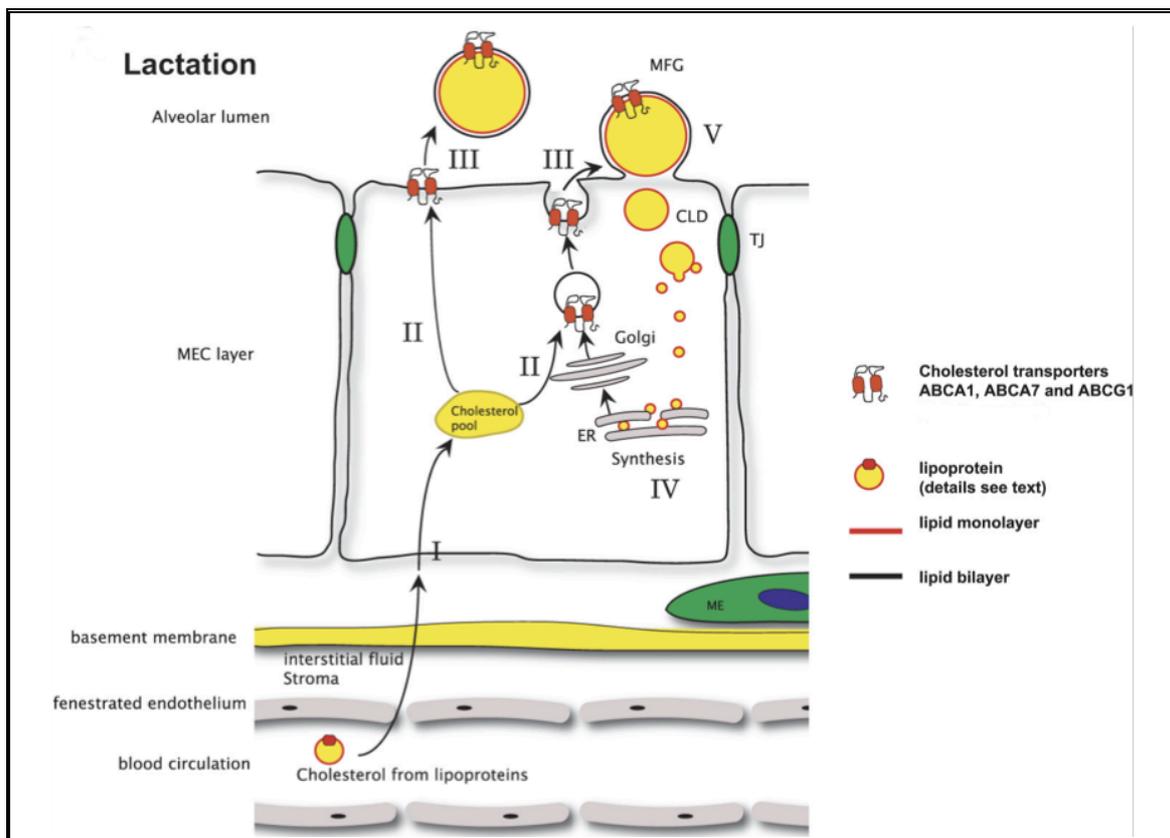


Abb. 8: Schematische Darstellung einer apokrinen Brustdrüsenepithelzelle (*mammary epithelial cell*, MEC) mit Lokalisation der dort beteiligten ABC-Transporter [Mani et al. 2010].

In der Immunfluoreszenzfärbung der eigenen Arbeitsgruppe lässt sich ABCA3p in der Wand der MFGs nachweisen. Als Marker der MFGMs wurde Adipophilin (*Adipose differentiation-related protein*) verwendet, ein Protein, das in der MFGM lokalisiert ist [Heid et al. 1996; Russell et al. 2007].

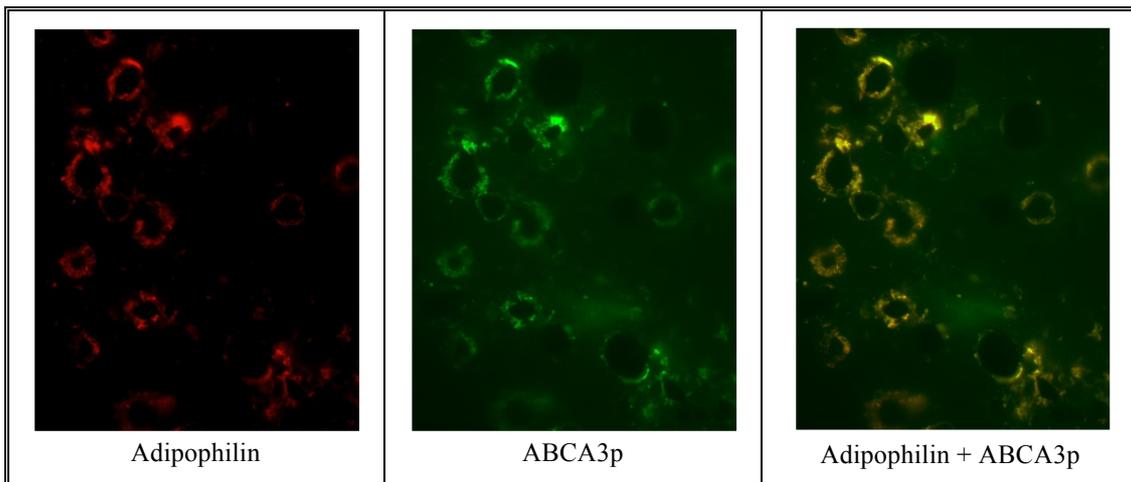


Abb. 9: Nachweis von ABCA3p in der Membran der MFG (Mausmilch) durch Immunfluoreszenzfärbung. Im linken Bild ist Adipophilin (rot), im mittleren Bild ist ABCA3p (grün) angefärbt. Im rechten Bild sind sowohl Adipophilin wie auch ABCA3p angefärbt (gelb, *merged*) und zeigen eine übereinstimmende Lokalisation.

1.4.2 Phospholipide in der Milch

Milch wird im Rahmen der Laktation im Milchdrüsengewebe von Säugetieren synthetisiert und ist ein wichtiger Nahrungsbestandteil. Neben dem Hauptbestandteil Wasser enthält sie Kohlenhydrate, Proteine, Lipide, Vitamine und Spurenelemente. Im Vergleich zur Kuhmilch besitzt humane Milch einen geringeren Proteinanteil bei einem höheren Kohlenhydratanteil. Der Fettgehalt von beiden liegt bei etwa 4 %. Mausmilch hat im Gegensatz dazu einen höheren Fettgehalt [Görs et al. 2009]. Der Hauptfettbestandteil der Milch besteht aus Triglyceriden (circa 98 %). Neben Triglyceriden sind Cholesterin und Phospholipide in geringeren Mengen vorhanden [Mani et al. 2010]. Im Idealfall ist Muttermilch für das Neugeborene die Hauptnahrungsquelle und die Inhaltsstoffe sind daher von großer Bedeutung. Sie hat sich den Bedürfnissen des Neugeborenen optimal angepasst und eine Veränderung der Zusammensetzung kann zu Mangel- oder Fehlernährung führen.

Im Tierversuch an Mäusen bewirkte eine zusätzliche Supplementierung von Phospholipiden bei sonst fettreicher Diät eine Senkung der Triglyceride und des Cholesterins im Serum. Dies führte letztendlich zu einem hepatoprotektiven und kardioprotektiven Effekt [Wat et al. 2009]. Weiterhin existieren Studien über Supplementierung mit Phospholipiden hinsichtlich des antikanzerogenen Effektes [Parodi 1997] oder als mögliche Prävention verschiedener Formen von Demenz

[McDaniel et al. 2003; Scholey et al. 2013]. Die Phospholipide in der Milch sind vor allem in der MFGM lokalisiert [Fong et al. 2007].

1.4.3 Leber

Das Parenchym der Leber besteht zu etwa 78 % aus Hepatozyten, die für die metabolischen Funktionen zuständig sind. Nicht-parenchymale Zellen, darunter Endothelzellen, Kupffer'sche Zellen oder Sternzellen, bilden 6.3 % des Lebervolumens. Die restlichen 16 % stellt der Extrazellularraum dar [Ishibashi et al. 2009]. Neben der metabolischen Funktion ist die Leber auch ein Speicherorgan.

Folgende ABC-Transporter sind in der Leber nachgewiesen und in der Tabelle aufgelistet.

Name	Synonym	Parenchymale Zelle			Nicht-Parenchymale Zelle		
		Ratte	Maus	Mensch	Ratte	Maus	Mensch
ABCA1				+	+		
ABCB1	MDR1, P-gp			+	+		+
ABCB4	MDR3			+			
ABCB11	BSEP			+	+ / - [*]		-
ABCC1	MRP1	+		+	+		+
ABCC2	MRP2			+	-		-
ABCC3	MRP3			+	+		+
ABCC4	MRP4			+	+		+
ABCC6	MRP6		+	+	-	+	- [**]
ABCC7	CFTR	-	-	-	-	-	+
ABCD1	ALDP			+			+
ABCG2	BCRP			+			+
ABCG5	Sterolin 1			+	+		
ABCG8	Sterolin 2			+	+		

Tab. 5: ABC-Transporter in der Leber [Wlcek and Stieger 2013]

[*] = Ito-Zellen (= *hepatic stellate cells*) [**] = Cholangiozyten

ABCA3p ist im Lebergewebe vorhanden [Stahlman et al. 2007]. In unserer Versuchsgruppe lässt sich in der Leber ebenfalls die Expression von Abca3 mittels RT-PCR und immunhistochemischen Methoden zeigen. Die relative RNA-Menge ist allerdings deutlich geringer als im Lungengewebe. Im Gegensatz zu ABCB4p, das an der apikalen Zellmembran zum Gallengang hin lokalisiert ist, befindet sich ABCA3p in den zytoplasmatischen Kompartimenten [Hammel, *unpublished data*].

1.4.4 Gallenflüssigkeit

Die Produktion von Gallenflüssigkeit findet in der Leber statt. Ihre Speicherung erfolgt in der Gallenblase, wo Flüssigkeit entzogen wird und die Blasengalle entsteht. Nach Stimulus, beispielsweise fettreicher Kost, gelangt die Blasengalle in das Duodenum.

Gallenflüssigkeit hat viele unterschiedliche Funktionen. Sie dient der Ausscheidung von lipophilen Substanzen. Sie ist essentiell für die Emulgation und Resorption von Nahrungsfetten und fettlöslichen Vitaminen [Boyer 2013]. Über die Gallenflüssigkeit erfolgt zum einen die Ausscheidung von Cholesterinester, aber auch die Rückresorption im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes [Hofmann and Hagey 2008].

Gallenflüssigkeit enthält neben Elektrolyten und organischen Anionen eine Vielzahl von Hormonen, Proteinen und Lipiden, immunologischen Substanzen und Peptiden [Boyer 2013]. Die Hauptkomponente der Gallenflüssigkeit sind Wasser und Elektrolyte. Seine physiologische Wirksamkeit erhält es aber durch Bestandteile wie Gallensäure, Phospholipide und Cholesterin. Die jeweiligen Mengen unterscheiden sich je nach Stadium der Umwandlung von Lebergalle zu Blasengalle. Gallensäuren (~ 67 %) bilden die Hauptkomponenten, gefolgt von Phospholipiden (~ 22 %), Proteinen (~ 4.5 %), Cholesterin (~ 4 %) und Bilirubin (~ 0.3 %) [Hay and Carey 1990; Reshetnyak 2013]. Unter den Phospholipiden der Gallensäure dominiert das Phosphatidylcholin [Hofmann and Hagey 2008].

In den Hepatozyten entsteht nur ein Bruchteil der Gallensäuren durch *de novo*-Synthese aus Cholesterin. Der Großteil (~ 95 %) unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf und wird im terminalen Ileum rückresorbiert [Hofmann and Hagey 2008].

Gallensäure wird durch ABCB11p in die Gallengänge sezerniert [Nishida et al. 1991]. Mutationen von ABCB11 resultieren in der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ II (= PFIC2) [Jansen and Müller 2000].

Die Dysfunktion von ABCB4p führt zur progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ III (= PFIC3) [Oude Elferink and Paulusma 2007]. ABCB4p ist an der apikalen Membran von Hepatozyten lokalisiert und sezerniert Phospholipide als Vesikel in das Lumen [Smit et al. 1994; Crawford et al. 1997]. Phospholipide bilden mit Cholesterin und Gallensäure Mizellen aus. Diese schützen das Gallengangsepithel, indem die zytotoxische Wirkung der Gallensäure erheblich reduziert wird [Moschetta et al. 2000]. Vor allem Sphingomyelin und DPPC sind hierbei als besonders effektiv beschrieben [Amigo et al. 1999; Moschetta et al. 2000].

PFIC2 und PFIC3 äußern sich klinisch durch Pruritus, Ikterus und Malnutrition, gefolgt von Leberversagen bereits im Kindesalter [Knisely et al. 2006; Sundaram and Sokol 2007]. Als kausale Therapie existiert bis dato nur die Lebertransplantation.

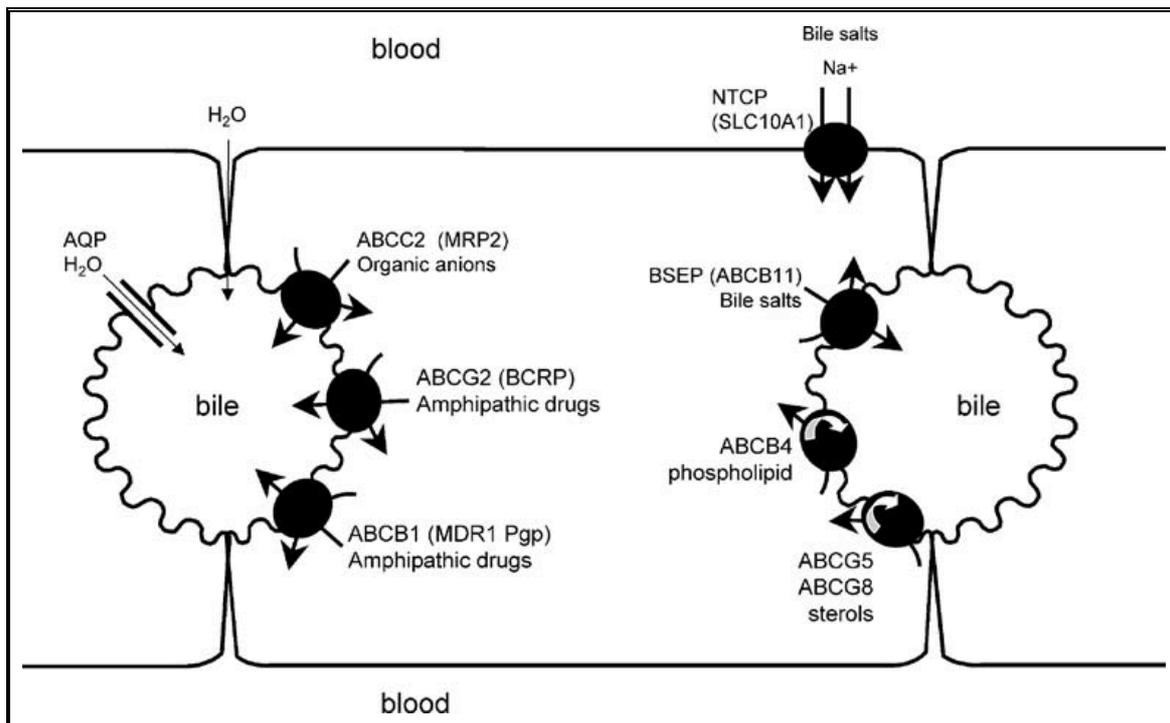


Abb. 10: Schematische Darstellung der wichtigsten Transporter in Hepatozyten [Elferink und Paulusma 2006]

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Eine Fehlfunktion von ABCA3p im Lungengewebe vermindert die Konzentration von Phospholipiden [Fitzgerald et al. 2007], daher wurden in Analogie das laktierende Milchdrüsen- und die Leber bei der Maus untersucht. Auch in diesen beiden Organsystemen sind Phospholipide für die produzierten Sekrete, Milch und Gallenflüssigkeit, funktionell von Bedeutung. Homozygot Abca3-defiziente Mäuse versterben kurz nach der Geburt, so wurden die untersuchten Proben von heterozygot Abca3-defizienten Tieren gewonnen.

Im Lungengewebe ist ABCA3p für den Transport der Phospholipide in die Lamellarkörperchen zuständig. Ähnlich den Lamellarkörperchen der Pneumozyten Typ II der Lunge sezerniert sowohl das Milchdrüsen- wie auch das Lebergewebe mittels Vesikelabschnürung.

Es stellt sich die Frage, ob eine heterozygote Abca3-Defizienz den Phospholipidtransport im Milchdrüsen- und Lebergewebe beeinflusst und somit eine Veränderung der Phospholipid-Konzentration zur Folge hat.

2 Material und Methoden

2.1 Mauslinie

Die Tiere der heterozygot Abca3-defizienten Mauslinie (= [Abca3+/-]-Mäuse) wurden von Dr. rer. nat. Markus Hammel im Rahmen seiner Dissertation auf Basis des Wildtyp-Mausstammes C57Bl/6 (= WT) generiert und im Biochemical and Biophysical Research Communications publiziert [Hammel et al. 2007]. Im Abca3-Gen wurden das Exon 5 und 7 teilweise und das Exon 6 komplett inaktiviert.

Die Mauslinie gehört zu 50 % jeweils der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Technischen Universität München.

Die Kryokonservierung der generierten [Abca3+/-]-Mauslinie wurde bei der European Mouse Mutant Archive (EMMA) durchgeführt. Nach Evaluation durch ein externes Komitee von EMMA und deren Zusage erfolgte im Februar 2010 der Versand von sechs männlichen [Abca3+/-]-Tieren zur Spermienasservation. Die Linie wurde unter der Identifikationsnummer EM:04425 registriert.

Information from provider	
Provider	Andreas Holzinger
Additional owner	Strain owned (50% each) by Andreas Holzinger, LMU München and Martin Hrabé de Angelis, Helmholtz-zentrum München
Strain type	Targeted Mutant Strains : Knock-out
Genetic description	Exons 5 (partially) to 7 (partially) of the Abca3 gene are deleted and replaced by (5'-3') an IRES, hrGFP cDNA and a neomycin expression cassette. The neo cassette is flanked by loxP sites but still retained in this mouse line.
Phenotype description	Homozygosity is associated with neonatal respiratory failure due to a disturbance in pulmonary surfactant homeostasis. Heterozygous mice are apparently healthy but do display abnormalities in biochemical analyses and challenge tests.
References	<ul style="list-style-type: none"> Targeted inactivation of the murine Abca3 gene leads to respiratory failure in newborns with defective lamellar bodies.; Hammel M; Michel G, Hoefer C, Klafien M, Muller-Hocker J, de Angelis MH, Holzinger A; 2007; Biochem. Biophys. Res. Commun.; 359(4); 947-51; 17577581
Breeding history	Backcrossed to C57BL/6 over at least 10 generations.
Homozygous viable?	No
Homozygous fertile?	Yes
Homozygous matings required?	No
Immunocompromised?	No

Abb. 11: Kryokonservierung im European Mouse Mutant Archive (EMMA)

2.2 Haltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH), Standort Innenstadt des Klinikum der Universität München. Die Haltung und die einzelnen Versuchsaufbauten in dieser Dissertation wurden nach §§7-9 TierSchG durchgeführt.

Die Tiere waren in den Bereichen SPF (*specific pathogen free*) und OHB (optimierter Hygiene-Bereich) untergebracht. Der SPF-Bereich entsprach den FELASA-Kriterien [Guillen 2012], mit zusätzlichem Ausschluss von Noroviren. Die Tiere befanden sich in einzelbelüfteten Käfigen (IVC, *individual ventilated cages*; TECNIPLAST GmbH, Hohenpeißenberg) mit Überdruck und HEPA-Filtern in der Ventilation. Der gesamte SPF-Bereich war mit einem *laminar air flow*-System ausgestattet. Zwei Sentinel-Tiere wurden pro IVC-Zu- und Ablufteinheit gehalten. Viermal jährlich wurde eine Testung auf potentiell pathogene Mikroorganismen durchgeführt.

Spezielle autoklavierte Kleidung, Mundschutz und Haube, sowie Schutzkleidung (Tyvek Classic Plus; DuPont de Nemours GmbH, Neu-Isenburg), Handschuhe

(Dermatril; KCL GmbH, Eichenzell) und Bereichsschuhe waren verpflichtend und vor Betreten der jeweiligen Räumlichkeiten anzulegen. Im Unterschied zum Zugang zum SPF-Bereich, wurde im OHB-Bereich keine zusätzliche Schutzkleidung angelegt. Die übrigen Hygieneregeln, die Bereichsaustattung und die Haltung der Tiere, einschließlich des Gesundheitsscreening, blieben identisch.

Die Fütterung erfolgte durch autoklavierte, standardisierte Futtermittel mit hoher Energiedichte für Mäuse und transgene Mäuse in der Zucht (M-Z autoklavierbar; sniff GmbH, Soest). Futter und Trinkwasser war *ad libitum* frei verfügbar. Ein Standardeinstreu für Labornagetiere wurde verwendet; im wöchentlichen Intervall wurden die Tiere unter *laminar air flow*-Abzugshauben in frische Käfige umgesetzt. In beiden Bereichen bestand ein zwölfstündig-wechselnder Tag-Nacht-Rhythmus. Temperatur wie auch Luftfeuchtigkeit wurden reguliert.

2.3 Zucht

Die [Abca3+/-]-Mauslinie wurde zum Erhalt mit WT verpaart. Für diverse weitere Projekte erfolgte die Durchführung mehrerer Zuchtansätze. Bei Verpaarung einer [Abca3+/-]-Maus mit WT teilt sich die Folgegeneration nach der Mendel'schen Regel in [Abca3+/-]-Mäusen und WT im Verhältnis 1:1 auf. Aufgrund der Letalität der Homozygotie wurde eine Kreuzung von zwei [Abca3+/-]-Elterntieren vermieden.

Die Tragzeit des Weibchens beträgt (20-)21 Tage, die Wurfgröße rangierte dabei von 1-12 Jungtieren. Die Verpaarung erfolgte entweder durch Zusammenführung zweier Elterntiere oder als Haremsverpaarung von einem Männchen mit zwei Weibchen.

Spätestens am 18. Tag nach dem Verpaarungstermin wurde das Männchen separiert, so dass eine erneute Trächtigkeit durch den Oestrus post partum vermieden wurde. Diese Besonderheit bei einigen Nagetieren und Hasenartigen bewirkt, dass Weibchen einige Stunden nach der Geburt wieder in der Lage sind, trächtig zu werden. Bei zwei direkt aufeinanderfolgenden Würfen mit Abstand von etwa 21 Tagen hätte dies eine vermehrte Belastung des Muttertieres und des zweiten Wurfes zur Folge. Ebenfalls ist eine Vermischung beider Würfe im Verlauf kaum zu vermeiden und es kommt zu einer ungenauen Bestimmung des Wurfdatums. Bei Haaremsverpaarungen wurden auch

beide Weibchen voneinander getrennt, damit jeder Wurf jeweils einem Muttertier zugeordnet werden kann.

Drei bis vier Wochen nach Wurftermin wurden die Jungtiere von der Mutter getrennt und nach Geschlecht separiert.

2.4 Markierung mittels Ohrlochstanze

Im Alter von etwa vier Wochen wurde die Ohrlochmarkierung der Tiere durchgeführt. Nach Festlegung der Nummerierung konnten mehrere Würfe übergreifend markiert werden.

Es wurde das Schema zur Platzierung der Ohrlochstanzen, das bereits an der German Mouse Clinic (GMC) des Helmholtz Zentrums und an der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Hohenheim etabliert ist, übernommen (Abb. 12).

In Stichproben erwies es sich als ungünstig die Ohrlochmarkierung früher durchzuführen, da das Mausohr zu dem Zeitpunkt noch sehr klein ist im Verhältnis zum Stanzgerät (Lochstanze 2 mm; BIOSCAPE GmbH, Castrop-Rauxel). Dies führte zu einer ungenauen Platzierung der Ohrlochmarkierung und zu einem leichteren Ausreißen.

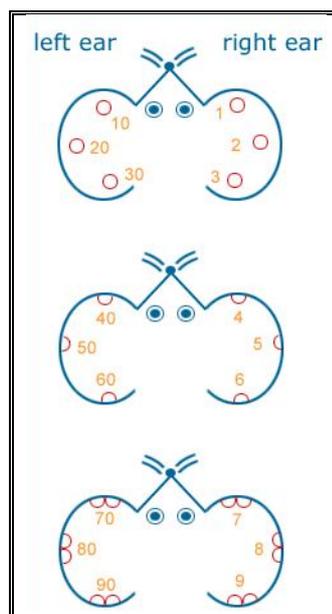


Abb. 12: Schematische Darstellung der Platzierung der Ohrlochstanze

2.5 Entnahme und Aufbereitung der Tailclips

Die Tailclip-Entnahme erfolgte nach oder zeitgleich mit der Ohrlochmarkierung. An der Schwanzspitze der Maus wurde eine Gewebeprobe entnommen. Die Kombination der beiden Vorgänge, somit eine Verwendung des gestanzten Ohrgewebes, ist eine weitere Möglichkeit zur Stressreduktion der Tiere.

Direkt nach Entnahme wurden die Gewebeproben mittels DirectPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech Inc., Los Angeles/USA) lysiert und aufbereitet.

Es erfolgte die Zugabe von 180 µl DirectPCR Lysis Reagent, mit einer Konzentration von 0.2 - 0.3 mg/ml Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden). Das Gemisch wurde im Rüttler für mindestens drei Stunden auf 55 °C erwärmt. Danach wurden die Lysate bei 85 °C für 45 min im Wasserbad inkubiert um eine Inaktivierung der Proteinase K zu erreichen.

Die Lysate wurden bei -20 °C aufbewahrt und für ein Jahr zur weiteren Verwendung konserviert.

2.6 Genotypisierung

Auf Basis der Gensequenz von *Abca3* wurden drei Primer erstellt. Guanin- und Cytosin-reiche Regionen, bereits bestehende Primerregionen und stark kodierende Regionen wurden vermieden.

<i>Scr-If</i>	CGG AAG GTT CTA GTG ACA GTC C
<i>neo-forw</i>	GTC GTA TTA CAA TTC ACT CGA TCG
<i>neo-rev</i>	TCC AGA TGT GAA AGC CCA TCC

Tab. 6: Gensequenz der Primer

Zur weiteren Verwendung wurden die Primer mit doppelt-destilliertem Wasser (H₂O_{bide}st.) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Je nach Genotyp zeigt sich bei Kombination der Primer *Scr-If* und *neo-rev* eine von drei verschiedenen Banden-Konstellationen durch Produkte unterschiedlicher Länge.

Abca3 ^{+/+} [C56Bl/6]	Bande bei 2281 Basenpaare
Abca3 ^{+/-} (Neomycin-Kassette positiv)	Erste Bande bei 2281 Basenpaare Zweite Bande bei 3125 Basenpaare
Abca3 ^{+/-} (Neomycin-Kassette negativ)	Erste Bande bei 1923 Basenpaare Zweite Bande bei 2281 Basenpaare

Tab. 7: Bandenlänge der Produkte nach Durchführung der PCR

Verwendet wurde das Expand Long Template System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dieses System enthält neben der Taq DNA Polymerase die Tgo DNA Polymerase.

Die Tgo DNA Polymerase ist eine thermostabile Polymerase mit erhöhter *proofreading*-Aktivität [Hopfner et al. 1999]. Sie ist für Genprodukte mit höherer Anzahl an Basenpaaren geeignet. Magnesium wurde zur Stabilisierung der Primer an die DNA hinzugegeben.

Ansetzen der Reaktionslösung als Master Mix 1 und 2. Das Endvolumen betrug 50 µl pro PCR-Reaktionsgefäß.

Master Mix 1		Master Mix 2	
20,5 µl	H ₂ O _{bidest.}	5 µl	Pufferlösung
1,5 µl	dNTP's	1 µl	MgCl ₂
1 µl	Scr-1f (Primer 1)	0,75 µl	Expand Long Template Polymerase
1 µl	neo-rev (Primer 2)	18,25 µl	H ₂ O _{bidest}
+ 1µl Template			

Tab. 8: Reaktionslösung

Es erfolgte die Einstellung der PCR-Maschine auf folgendes Programm:

	Temperatur	Dauer	
1.	94 °C	2 Minuten	
2.	94 °C	30 Sekunden	× 10 Zyklen: Wiederholung der Schritte 2. – 4.
3.	52 °C	30 Sekunden	
4.	68 °C	2 Minuten 20 Sekunden	
5.	94 °C	30 Sekunden	× 25 Zyklen: Wiederholung der Schritte 5. – 7.
6.	56 °C	30 Sekunden	
7.	68 °C	2 Minuten 10 Sekunden + 20 Sekunden zusätzlich pro wiederholtem Zyklus	
8.	72 °C	7 Minuten	
9.	4 °C	Hold	

Tab. 9: PCR-Programm

Die einzelnen, geladenen Bestandteile wurden in der Gelelektrophorese mit 1 %-Agarose-Gel anhand ihrer Größe aufgeteilt. Agarose-Gele bilden Netze und behindern dadurch die Moleküle bei ihrer Wanderung durch das elektrische Feld. Je höher die Konzentration der Agarose, desto engmaschiger wird das Gel.

Gießen des Gels mit 1 g Agarose-Pulver (Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf) auf 100 ml TBE-Puffer (Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch) und Erhitzen der Flüssigkeit bis eine homogene Flüssigkeit ohne Rückstände sich gebildet hat. Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml; Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch) und Gießen der Flüssigkeit in den Gelträger zum Aushärten.

Zur PCR-Lösung wurde pro Reaktionsgefäß 14 µl Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich Produktions GmbH, Steinheim am Albuch) zugegeben. Von der fertigen Lösung wurden 4 µl auf das Gel aufgetragen.

Als Längenstandart wurden 7 µl einer 1 kb-Markerbande (Invitrogen AG, Karlsruhe) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für zwei Stunden mit TBE-Puffer als Laufpuffer in einer Gelkammer bei 120 Volt (PS 1006; Aplex, Evry Cedex).

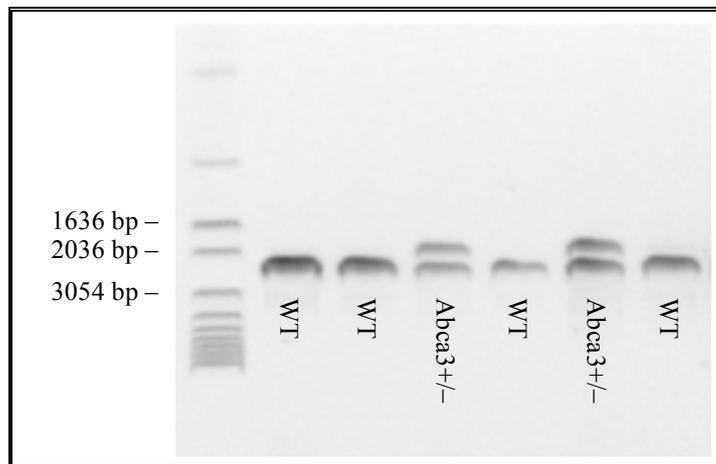


Abb. 13: Ergebnis der PCR

2.7 Milchstudie

Insgesamt wurde die Milch von 19 WT und 19 [Abca3+/-]-Mäusen gewonnen und verglichen. Zum Zeitpunkt der Verpaarung betrug das Alter der weiblichen Tiere zwischen 4-9 Monate, das der männlichen Tiere zwischen 5-10 Monate. Littermaids wurden bei beiden Geschlechtern in drei Durchgängen verpaart. Die unter Kapitel 2.3 aufgeführten Regeln und Durchführungsweisen wurden eingehalten.

Die Normierung der Würfe erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Geburt auf fünf Jungtiere. Bei weniger als fünf Tieren wurde der Wurf mit Jungtieren anderer Weibchen aufgestockt. Die zu adoptierenden Jungtiere wurden zunächst mit dem Urin des neuen Muttertieres benetzt und unter die anderen Jungtiere gemischt. So haftete den hinzugefügten Jungtieren wenig Fremdgeruch an. Dadurch konnte eine sehr hohe Rate an Akzeptanz beim neuen Muttertier erreicht werden.

Es wurde angestrebt die Normierung bis zum letzten Melktag beizubehalten. Dies war bei fünf Würfen nicht möglich, wo nachträglich Jungtiere verstarben. In allen fünf Fällen handelte es sich um Würfe von [Abca3+/-]-Muttertieren.

<u>Genotyp</u> [Muttertier]	<u>Anzahl</u> [Pups]	<u>Geburtsdatum</u> [Pups]	<u>Melken</u> [Tag 5]	<u>Melken</u> [Tag 10]	<u>Melken</u> [Tag 15]
C57Bl/6	5	08.04.2008	12.04.2008	17.04.2008	22.04.2008
C57Bl/6	5	08.04.2008	12.04.2008	17.04.2008	22.04.2008
Abca3+/-	5	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	5	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	4	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	5	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	4	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	5	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	4	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	2	09.04.2008	13.04.2008	18.04.2008	23.04.2008
Abca3+/-	5	05.05.2008	09.05.2008	14.05.2008	19.05.2008
Abca3+/-	5	05.05.2008	09.05.2008	14.05.2008	19.05.2008
Abca3+/-	5	05.05.2008	09.05.2008	14.05.2008	19.05.2008
C57Bl/6	5	05.05.2008	09.05.2008	14.05.2008	19.05.2008

Genotyp [Muttertier]	Anzahl [Pups]	Geburtsdatum [Pups]	Melken [Tag 5]	Melken [Tag 10]	Melken [Tag 15]
C57Bl/6	5	10.12.2008	14.12.2008	19.12.2008	24.12.2008
Abca3+/-	5	12.12.2008	16.12.2008	21.12.2008	26.12.2008
Abca3+/-	5	12.12.2008	16.12.2008	21.12.2008	26.12.2008
Abca3+/-	2	19.12.2008	23.12.2008	28.12.2008	02.01.2009
Abca3+/-	5	12.12.2008	16.12.2008	21.12.2008	26.12.2008
Abca3+/-	5	11.12.2008	15.12.2008	20.12.2008	25.12.2008
C57Bl/6	5	14.12.2008	18.12.2008	23.12.2008	28.12.2008
C57Bl/6	5	11.12.2008	15.12.2008	20.12.2008	25.12.2008
C57Bl/6	5	12.12.2008	16.12.2008	21.12.2008	26.12.2008
C57Bl/6	5	14.12.2008	18.12.2008	23.12.2008	28.12.2008
C57Bl/6	5	14.12.2008	18.12.2008	23.12.2008	28.12.2008
C57Bl/6	5	11.12.2008	15.12.2008	20.12.2008	25.12.2008
C57Bl/6	5	12.12.2008	16.12.2008	21.12.2008	26.12.2008
C57Bl/6	5	14.12.2008	18.12.2008	23.12.2008	28.12.2008
C57Bl/6	5	11.12.2008	15.12.2008	20.12.2008	25.12.2008
C57Bl/6	5	24.12.2008	28.12.2008	02.01.2009	07.01.2009
C57Bl/6	5	11.02.2009	15.02.2009	20.02.2009	25.02.2009
C57Bl/6	5	12.02.2009	16.02.2009	21.02.2009	26.02.2009
C57Bl/6	5	11.02.2009	15.02.2009	20.02.2009	25.02.2009
C57Bl/6	5	12.02.2009	16.02.2009	21.02.2009	26.02.2009
C57Bl/6	5	11.02.2009	15.02.2009	20.02.2009	25.02.2009
Abca3+/-	5	20.02.2009	24.02.2009	01.03.2009	26.03.2009
Abca3+/-	5	11.02.2009	15.02.2009	20.02.2009	25.02.2009
Abca3+/-	5	12.02.2009	16.02.2009	21.12.2009	26.02.2009
Gesamt:	19 x C57Bl/6 19 x Abca3+/-				

Tab. 10: Aufbau der Milchstudie mit Genotyp des Muttertieres, Wurfdatum und -größe, Melktage. Die Verpaarung erfolgte immer mit einem Männchen des jeweils anderen Genotyps.

2.7.1 Gewinnung der Milch

Die Mäuse wurden am Tag 5, Tag 10 und Tag 15 post partum gemolken (Milch der [Abca3+/-]-Maus am Tag 5 = [Abca3+/-]^{Tag5}-Milch, etc.). Vor Milchgewinnung wurde das Muttertier von den Jungtieren für zwei Stunden getrennt, so dass die Milchmenge ausreichend war.

Es besteht eine Korrelation zwischen dem Gewicht aller Jungtiere des Wurfes und der Menge der produzierten Milch, so dass erfahrungsgemäß am Tag 5 das Muttertier länger von den Jungtieren getrennt werden musste als bei Melkungen am Tag 10 oder Tag 15. In beiden letzteren Fällen zeigten sich bereits Trennungszeiten von unter zwei Stunden als ausreichend ergiebig.

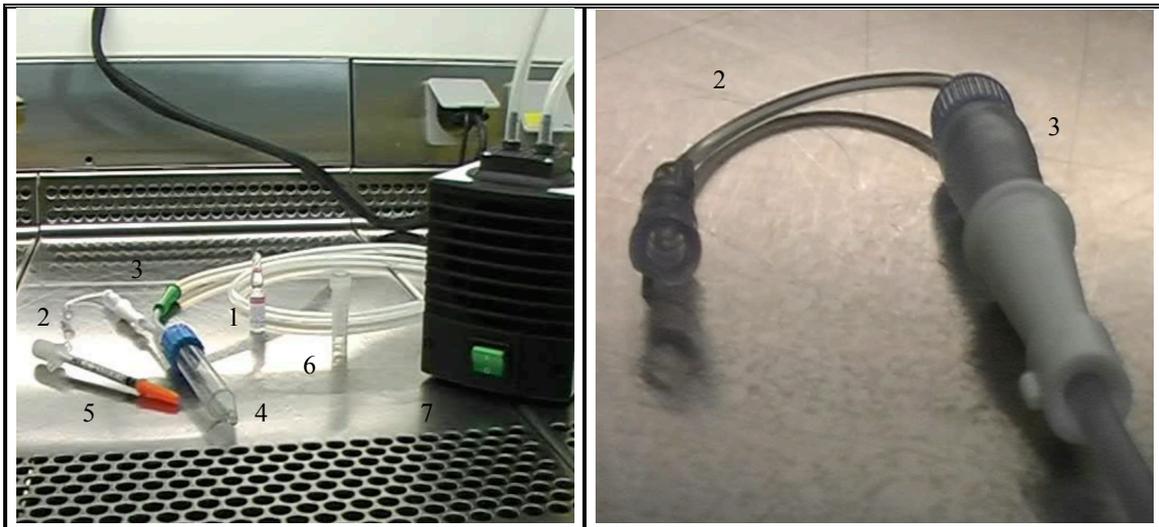


Abb. 14: Materialien für die Milchgewinnung

1.	Oxytocin 10 IE auf 1 ml (Hexal AG, Holzkirchen)
2.	Saugaufsatz: Druckstabile Verlängerung für arterielle Zugänge; Luer lock neg-pos (Medex Medical GmbH & Co. KG, Klein-Winternheim)
3.	Adapter (für Pumpe): Luer, weiblich-Stufenansatz (Vygon GmbH & Co. KG, Aachen)
4.	Zwischenbehältnis zum Schutz der Pumpe vor Verunreinigung
5.	Spritzen: Micro-Fine Insulinspritzen U-100 (BD GmbH, Heidelberg)
6.	Eppendorf Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg)
7.	Pumpe: Vakuum Gas Pumpe PM20 (VWR International GmbH, Darmstadt)

Tab. 11: Materialien für die Milchgewinnung

Zunächst erfolgt beim Muttertier eine intraperitoneale Injektion von Oxytocin 3 IE oder 5 IE. Bei Melkungen am Tag 5 wurde Oxytocin 5 IE, bei Melkungen am Tag 10 und Tag 15 wurden Oxytocin 3 IE injiziert. Oxytocin bewirkt die Sekretion von Milch ohne die Produktion zu beeinflussen [Nishimori et al. 1996]. Die Maus wird für 30 Sekunden bis zum Wirkungseintritt des Medikamentes wieder in den Käfig gesetzt.

Danach wird das Tier erneut in Rückenlage gedreht. Bei eingeschalteter Saugpumpe wird der Aufsatz auf eine Zitze gesetzt bis sich ein deutlicher Milchtropfen entwickelt. Der Milchtropfen wird an der Wand des Aufsatzes abgestreift.

Die Pumpe wird abgeschaltet und die Maus wieder in den Käfig gesetzt. Der wandständige Tropfen wird möglichst komplett mit einer Insulinspritze abgezogen, in ein Eppendorfer-Gefäß injiziert und dort gesammelt. Danach wurde der Melkvorgang wiederholt bis eine ausreichende Menge Milch gewonnen wurde (siehe Abb. 15).

Sobald eine Zitze des Tieres weniger oder keine Milch mehr förderte, wurde diese gewechselt. Eine weibliche Maus besitzt bis zu acht Milchzitzen, wobei bei fünf Jungtieren meist nicht alle Zitzen fördern.

In wenigen Fällen war vor Erreichen der gewünschten Milchmenge keine weitere Gewinnung mehr möglich, so dass eine Nachinjektion von Oxytocin 2 IE nötig war. Dieser Fall trat meist bei Melkungen am Tag 5 auf.

Für die Analyse wurden definierte Mengen Mausmilch je Probe gewonnen. Die ersten Proben von April bis Mai 2008 beinhalteten 15 μ l. Die restlichen Proben beinhalteten 20 μ l. Der Überschuss wurde abpipettiert und in einem separaten Eppendorfer-Gefäß aufbewahrt. Die Portionierung wurde vor dem Einfrieren durchgeführt. Vorversuche zeigten, dass der Prozess des Einfrierens und des erneuten Auftauens die unterschiedlichen Bestandteile der Milch schichtweise auftrennt. Danach war eine homogene Portionierung kaum noch möglich. Die Milchproben wurden bei -20 °C aufbewahrt und erst zur Lipidomics-Analyse aller Proben wieder aufgetaut.

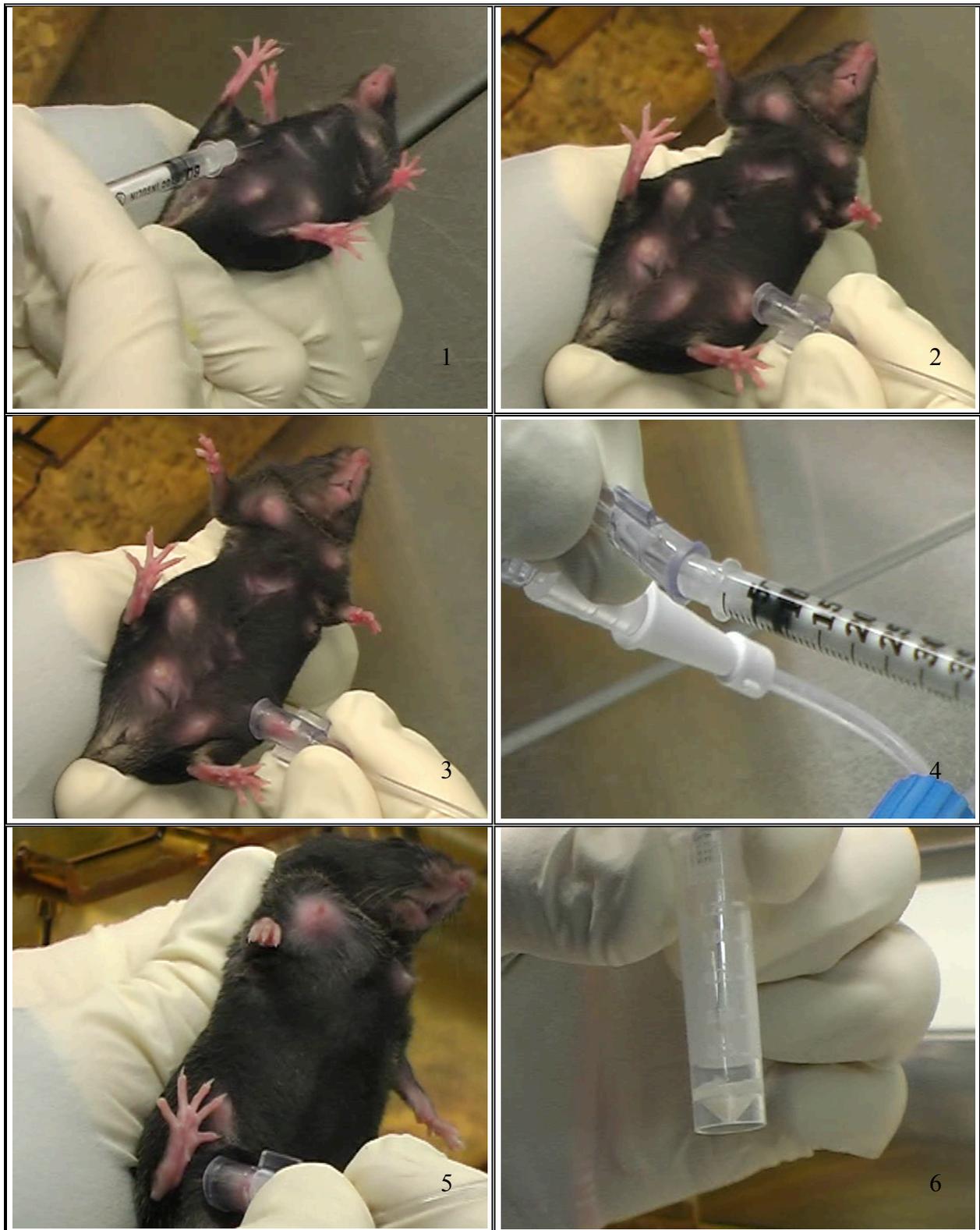


Abb. 15: Ablauf der Milchgewinnung:

1. Intraperitoneale Injektion von Oxytocin; 2. und 3. Absaugen der Milch durch Ansetzen des Melkaufsatzes;
4. Abziehen der Milch aus dem Melkaufsatz; 5. Absaugen einer weiteren Milchzitze; 6. Sammelbehältnis mit
Mausmilch

2.7.2 Massenspektrometrische Analyse der Milch

Die Massenspektrometrie wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Schmitz und Dr. rer. nat. Gerhard Liebisch durchgeführt. In der Lipidomics Analyse wurden die Lipidkonzentrationen der Mausmilch von WT und [Abca3+/-]-Mäusen mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie vermessen. Untersucht wurden die Untergruppen Phosphatidylcholin (PC), -ethanolamin (PE), -inositol (PI) und -serin (PS). Ebenfalls wurden Plasminogen (Plasm), Sphingomyelin (SPM), Ceramid (Cer) und Lyso-Phosphatidylcholin (LPC) untersucht. In einer zweiten Messung wurde Cholesterinester (Chol) als Referenzwert zur Normierung des Lipidgehaltes verwendet.

2.7.3 Empirische Durchführung der Milchstudie

Die WT und [Abca3+/-]-Mäuse wurden anhand der Melkzeitpunkte in drei Gruppen je 19 Individuen unterteilt.

Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den Phospholipidkonzentrationen der Milch wurde zunächst für jede der Phospholipide der Zweistichproben-t-Tests durchgeführt. Dabei ergab sich, ob sich die Mittelwerte der absoluten Konzentrationen der jeweiligen Gruppen zum gleichen Melktag signifikant voneinander unterscheiden. Diese Analyse wurde paarweise für jeden der drei Melktage (Tag x; x = 5, 10 oder 15) durchgeführt und der entsprechende p-Wert notiert, bei dem die Nullhypothese (H₀) abgelehnt werden kann. Die Nullhypothese lautete dabei „Es besteht im Mittel kein Unterschied bezüglich des Merkmals zwischen den beiden Gruppen am Tag x“.

Die Analyse wurde sowohl für die nicht-standardisierten Phospholipide, als auch die mittels Cholesterinester standardisierten Phospholipide angewendet.

Analog wurden jeweils Zweistichproben-t-Tests für die jeweiligen Untergruppen der Phospholipide durchgeführt.

2.8 Aufbau zur Untersuchung der Leber

Lebergewebe wurde bei 30 WT ausgewertet, darunter 13 Männchen und 17 Weibchen. Bei den [Abca3+/-]-Tieren waren es 36 Proben, darunter 18 Männchen und 18 Weibchen (Leber der männlichen [Abca3+/-]-Maus = [Abca3+/-][♂]-Leber / Leber der weiblichen [Abca3+/-]-Maus = [Abca3+/-][♀]-Leber).

Das Alter der Tiere für die Untersuchung des Lebergewebes lag zwischen 18 und 26 Monaten. Bei allen Tieren handelte es sich um Littermaids, die im Zeitraum vom Mai bis August 2007 geboren waren.

	C57Bl/6		Abca3+/-	
	♂	♀	♂	♀
<u>Lebergewebe</u>	13	17	18	18
<u>Gallenflüssigkeit</u>	8	15	17	16

Tab. 12: Übersicht der vorhandenen Gallenflüssigkeit- und Leberproben

Die Lebergewebe von zwei Tieren (WT, männlich und WT, weiblich) waren nekrotisch zerfallend und eine dritte Probe (WT, weiblich) konnte nach Lagerung nicht weiter zur Analyse verwertet werden.

Gallenflüssigkeit ließ sich bei 23 WT- und 33 [Abca3+/-]-Tieren gewinnen, wobei die resultierende Menge variierte. Bei zwölf Tieren konnte aufgrund entleerten Gallenblasen keine Probe entnommen werden, bei vier Tieren war die Gallenflüssigkeit mit Blut kontaminiert. Eine genaue Beschreibung der Qualität und Menge der Gallenflüssigkeit ist in Tab. 46 „Organentnahme“ (siehe S. 83) einsehbar.

2.8.1 Gewinnung von Lebergewebe

Die Leber der Maus ist im Vergleich zu der des Menschen deutlich gelappter. Für die anatomische Vergleichbarkeit ist sie unterteilt in den Lobus sinister lateralis und medialis, den Lobus dexter, den Lobus quadratus und den Lobus caudatus mit dem Processus caudatus und dem Processus papillares [5. Auflage der Nomina Anatomica Veterinaria 2012].

Das Gewicht der murinen Leber variiert anhand des Geschlechts des Tieres. Bei einem weiblichen Tier beträgt diese 1,64 g, beim männlichen 2,18 g [Krinke 2004].

Eine Nahrungskarenz von sechs Stunden wurde vor der Sektion durchgeführt, um die Ausbeute der Gallenflüssigkeit zu erhöhen.

Die Tiere wurden durch eine mechanisch herbeigeführte Fraktur des Dens axis (Genickbruch) und einer Streckbewegung zur Durchtrennung des Rückenmarkes schmerzlos und schnell getötet. Der Bauchraum wurde unter Vermeidung von Organverletzungen eröffnet und zunächst das Blut durch Punktion eines Herzenventikels konserviert. Das Blut wurde kurz zentrifugiert um eine Separation des Serums von den korpuskulären Bestandteilen zu erreichen. Das Serum wurde abpipettiert und separat gelagert. Der Grad der Hämolyse wurde notiert.

Danach wurde die Gallenflüssigkeit aus der Gallenblase abpunktiert. Um den Substanzverlust möglichst gering zu halten, erfolgte die Verwendung von Insulinspritzen (Micro-Fine Insulinspritzen U-100; BD GmbH, Heidelberg) mit integrierter Kanüle. Die Menge und Qualität der Gallenflüssigkeit wurde vermerkt. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt und erst zur Lipidomics-Analyse aller Proben wieder aufgetaut.

Bei weiteren Organen und Geweben wurden möglichst immer zwei Proben entnommen und diese einzeln in verschraubten Eppendorfer-Gefäßen (Eppendorf AG, Hamburg) gelagert (siehe Tab. 46: Organentnahme, S. 83). Bei der Sektion konnte aufgrund Tumoren, Verwachsungen oder Entzündungen bei manchen Tieren keine Entnahme einzelner Gewebe vorgenommen werden.

Material und Methoden

Ziffer	Geburtsdatum	♂ / ♀	Genotyp	Lebergewebe	Gallenflüssigkeit [*]
1	17.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+++
2	17.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
3	22.04.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	++
4	22.04.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	∅
5	20.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
6	20.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	[Blut]+++
7	20.09.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	++
8	22.04.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	++
9	22.04.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	+
10	10.06.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	∅
11	09.03.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	+
12	22.04.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	∅
13	03.09.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	++
14	03.09.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	∅
15	03.09.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	∅
16	02.04.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+++
17	22.04.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	++
18	20.05.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	∅
19	20.05.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	∅
20	20.05.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	++
21	20.05.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	+
22	20.05.2007	♀	C57Bl/6	∅	∅
23	20.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+++
24	28.04.2007	♂	C57Bl/6	∅	∅
25	03.09.2007	♂	C57Bl/6	vorhanden	++
26	28.04.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
27	28.04.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+++
28	28.04.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
29	15.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
30	15.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
31	15.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+
32	22.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
33	22.04.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
34	22.04.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
35	22.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
36	22.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	+

Ziffer	Geburtsdatum	♂ / ♀	Genotyp	Lebergewebe	Gallenflüssigkeit [*]
37	11.03.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
38	11.03.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
39	11.03.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+
40	17.05.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+
41	17.05.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
42	19.08.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	∅
43	09.03.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	∅
44	08.04.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
45	17.05.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	+
46	17.05.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	[Blut] +
47	17.05.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	[Blut] +++
48	08.03.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	[Blut] ++
49	28.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
50	28.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
51	28.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	∅
52	28.04.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
53	17.05.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	+++
54	08.03.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
55	08.03.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
56	25.08.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
57	28.04.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
58	28.04.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
59	19.08.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
60	19.08.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
61	19.08.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
62	19.08.2007	♂	Abca3+/-	vorhanden	++
63	13.05.2007	♀	C57Bl/6	vorhanden	+++
64	15.05.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	++
65	15.05.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
66	15.05.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++
67	23.08.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	++
68	23.08.2007	♀	Abca3+/-	vorhanden	+++

Tab. 13: Aufbau der Leberstudie mit Genotyp, Geburtsdatum und Proben

[*] Die Anzahl der Kreuze deutet auf die Menge der vorhandenen Galle hin:

∅ = nicht vorhanden / + = wenig / ++ = mittel / +++ = viel

2.8.2 Massenspektrometrische Analyse des Lebergewebes

Die Massenspektrometrie wurde wie im Falle der Milch am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Regensburg durchgeführt. Die Lipidkonzentrationen des Lebergewebes wurden in der Lipidomics Analyse mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie vermessen. Untersucht wurden die Untergruppen Phosphatidylcholin (PC), -ethanolamin (PE), -inositol (PI) und -serin (PS). Ebenfalls untersucht wurden Plasminogen (Plasm), Sphingomyelin (SPM) und Ceramid (Cer). Zusätzlich ist in der Leber die Analyse von Phosphatidylglycerin (PG) möglich, diese war bei der Milch aus technischen Gründen nicht durchführbar. Cholesterinester (Chol) wurde auch in der Leber als Referenzwert in einer zweiten Messung zur Normierung des Lipidgehaltes verwendet.

2.8.3 Empirische Durchführung der Analyse der Leber

Die Tiere wurden anhand des Geschlechts und des Genotyps in vier Gruppen unterteilt. Zur Beurteilung einer unterschiedlichen Konzentration im Lebergewebe wurde zunächst für jedes Phospholipid der Zweistichproben-t-Tests durchgeführt. Die erste Analyse erfolgte bei Aufteilung der Tiere nur nach Genotyp. In einem zweiten Schritt wurde ebenfalls nach Geschlecht separat untersucht. Dabei zeigte sich, ob sich die Mittelwerte der absoluten Konzentrationen der jeweiligen Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Der entsprechende p-Wert wurde notiert, bei dem die Nullhypothese (H₀) abgelehnt werden kann. Die Nullhypothese lautete dabei „Es besteht im Mittel kein Unterschied bezüglich des Merkmals zwischen den untersuchten Gruppen im Lebergewebe“. Die Analyse wurde sowohl für die Gesamtkonzentration der Phospholipide, als auch die mittels Cholesterinester standardisierten Phospholipide angewendet.

Analog dazu wurde der Zweistichproben-t-Test für die jeweiligen Untergruppen der Phospholipide durchgeführt.

3 Ergebnisse der Milchstudie

3.1 Zusammensetzung der Phospholipide der Milch

Phosphatidylcholine bilden mit 36.3 % den größten Anteil der Phospholipide der Milch der untersuchten Mäuse. Folgendes Diagramm zeigt die durchschnittliche, prozentuale Zusammensetzung der Milch aller Mäuse ohne Differenzierung nach Genotyp.

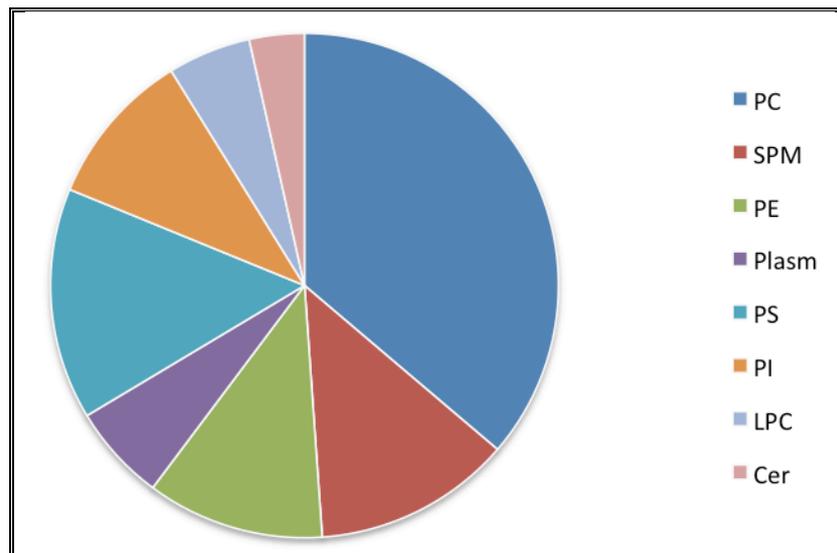


Abb. 16: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Milch]

PC	SPM	PE	Plasm	PS	PI	LPC	Cer
36.3 %	12.6 %	11.3 %	6.2 %	14.8 %	10.0 %	5.3 %	3.5 %

Tab. 14: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Milch]

3.2 Cholesterinester in der Milch

In der Milch der [Abca3+/-]-Mäuse (= [Abca3+/-]-Milch) ist Cholesterinester an keinem Melktag signifikant verändert.

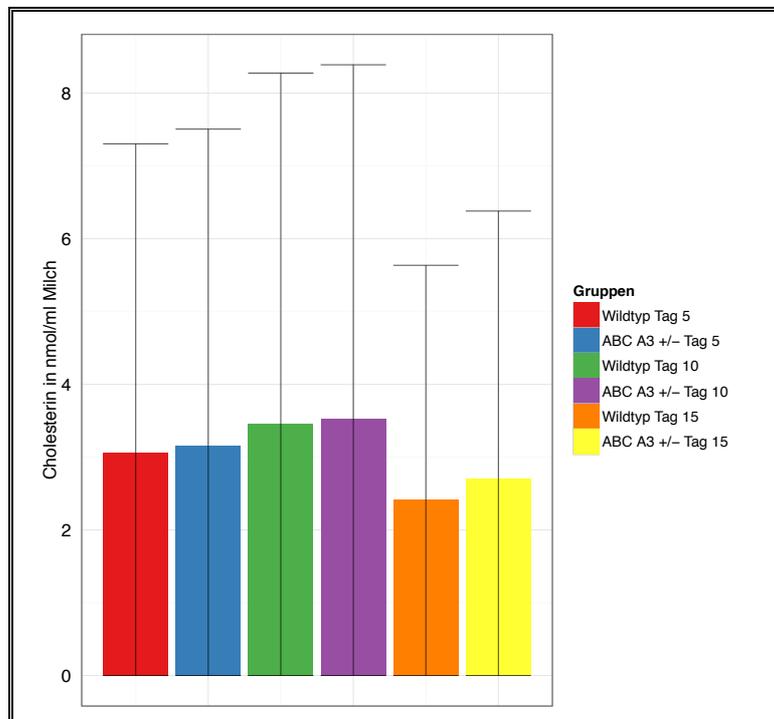


Abb. 17: Vergleich von Cholesterinester [Milch]

	Wildtyp [Tag 5]	Abca3+/- [Tag 5]	Wildtyp [Tag 10]	Abca3+/- [Tag 10]	Wildtyp [Tag 15]	Abca3+/- [Tag 15]
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	3.06 ± 4.25	3.16 ± 4.34	3.45 ± 4.82	3.53 ± 4.86	2.42 ± 3.22	2.70 ± 3.68
p-value	0.75		0.84		0.30	

Tab. 15: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Cholesterinester [Milch]

3.3 Phospholipide in der Milch

In der Gesamtanalyse der Milch aller drei Melktage zeigt sich zunächst Phosphatidylethanolamin ($p = 0.03$) und Lyso-Phosphatidylcholin ($p = 0.01$) in der [Abca3+/-]-Milch erhöht.

Nach Bezug auf Cholesterinester ist kein signifikanter Unterschied vorhanden.

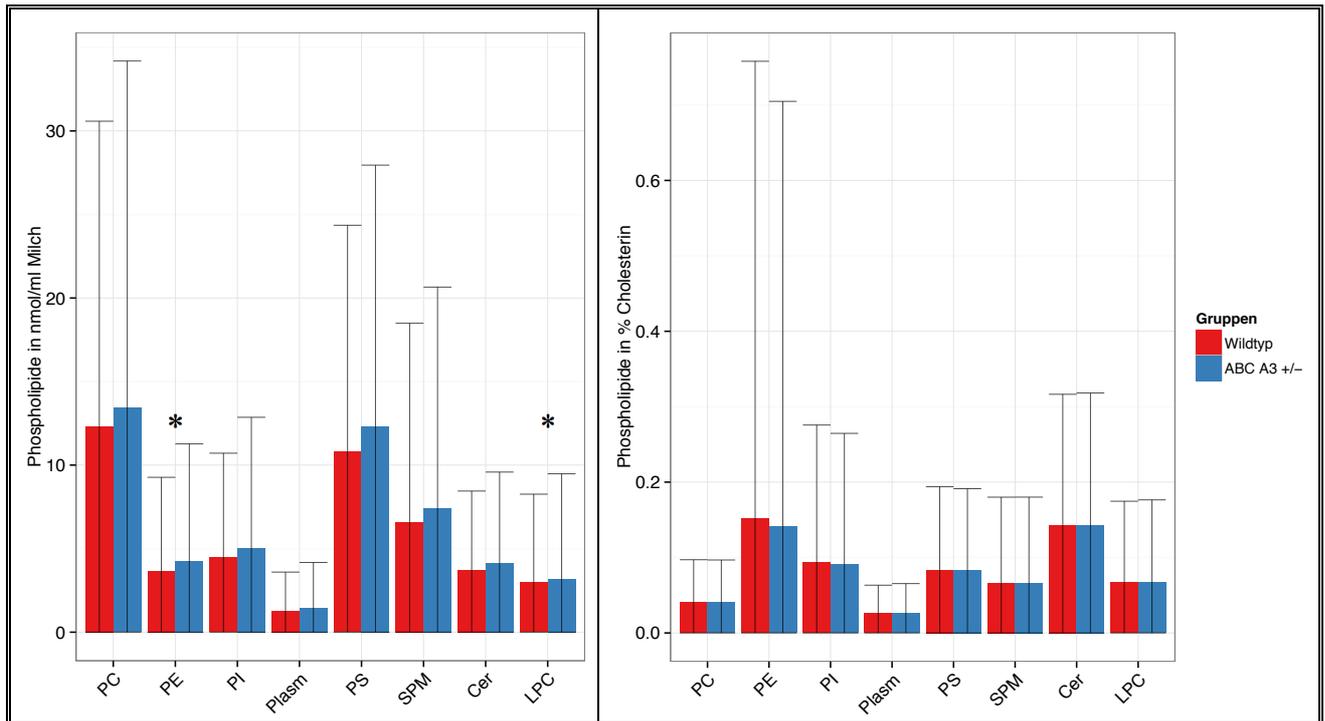


Abb. 18: Vergleich der Phospholipide [Milch]

		Mittelwert \pm SD [nmol/ml Milch]	p-value	Mittelwert \pm SD [in % Cholesterin]	p-value
PC	Wildtyp	12.33 \pm 18.25	0.07	0.04 \pm 0.06	0.98
	Abca3+/-	13.42 \pm 20.77		0.04 \pm 0.06	
PE	Wildtyp	3.67 \pm 5.60	0.03	0.15 \pm 0.61	0.62
	Abca3+/-	4.27 \pm 7.00		0.14 \pm 0.56	
PI	Wildtyp	4.46 \pm 6.25	0.06	0.09 \pm 0.18	0.70
	Abca3+/-	5.06 \pm 7.81		0.09 \pm 0.17	
Plasm	Wildtyp	1.29 \pm 2.30	0.18	0.03 \pm 0.04	1.00
	Abca3+/-	1.46 \pm 2.71		0.03 \pm 0.04	

		Mittelwert \pm SD [nmol/ml Milch]	p-value	Mittelwert \pm SD [in % Cholesterin]	p-value
PS	Wildtyp	10.79 \pm 13.56	0.25	0.08 \pm 0.11	1.00
	Abca3+/-	12.33 \pm 15.62		0.08 \pm 0.11	
SPM	Wildtyp	6.61 \pm 11.88	0.46	0.07 \pm 0.11	1.00
	Abca3+/-	7.43 \pm 13.22		0.07 \pm 0.11	
Cer	Wildtyp	3.72 \pm 4.72	0.15	0.14 \pm 0.17	1.00
	Abca3+/-	4.13 \pm 5.45		0.14 \pm 0.18	
LPC	Wildtyp	2.98 \pm 5.28	0.01	0.07 \pm 0.11	1.00
	Abca3+/-	3.19 \pm 6.29		0.07 \pm 0.11	

Tab. 16: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phospholipide [Milch]

3.3.1 Phosphatidylcholin

In der Gesamtübersicht ist Phosphatidylcholin an den einzelnen Melktagen nicht signifikant verändert.

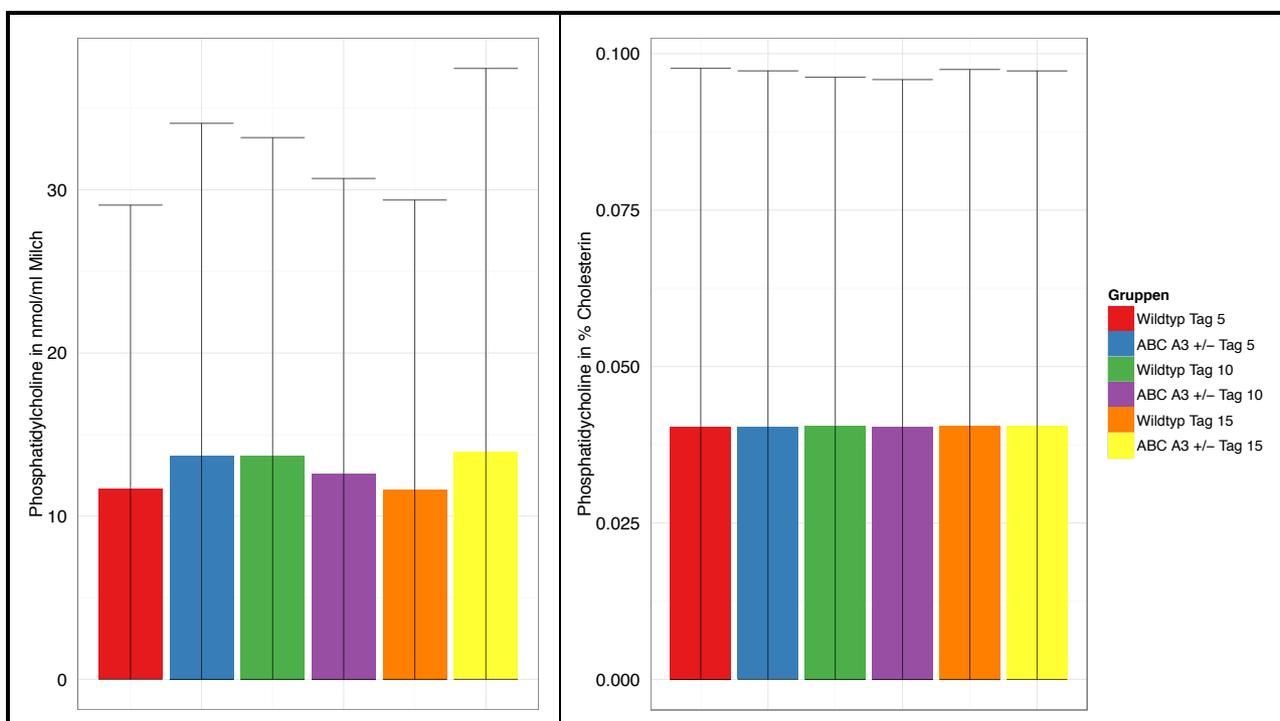


Abb. 19: Vergleich von Phosphatidylcholin [Milch]

	Wildtyp [Tag 5]	Abca3+/- [Tag 5]	Wildtyp [Tag 10]	Abca3+/- [Tag 10]	Wildtyp [Tag 15]	Abca3+/- [Tag 15]
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	11.67 ± 17.40	13.70 ± 20.38	13.70 ± 19.50	12.62 ± 18.07	11.61 ± 17.76	13.93 ± 23.51
p-value	0.11		0.39		0.09	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.04 ± 0.06	0.04 ± 0.06	0.04 ± 0.06	0.04 ± 0.06	0.04 ± 0.06	0.04 ± 0.06
p-value	0.99		0.97		1.00	

Tab. 17: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylcholin [Milch]

Bei Betrachtung der einzelnen Phosphatidylcholone in der Milch aller Melkzeitpunkte ist keine signifikante Reduktion in der [Abca3+/-]-Milch gegeben.

Langkettige Phosphatidylcholone (PC 36:0, PC 36:5, PC 38:5, PC 38:6 und PC 40:6) sind in der [Abca3+/-]-Milch erhöht (p < 0.01 bis p = 0.03).

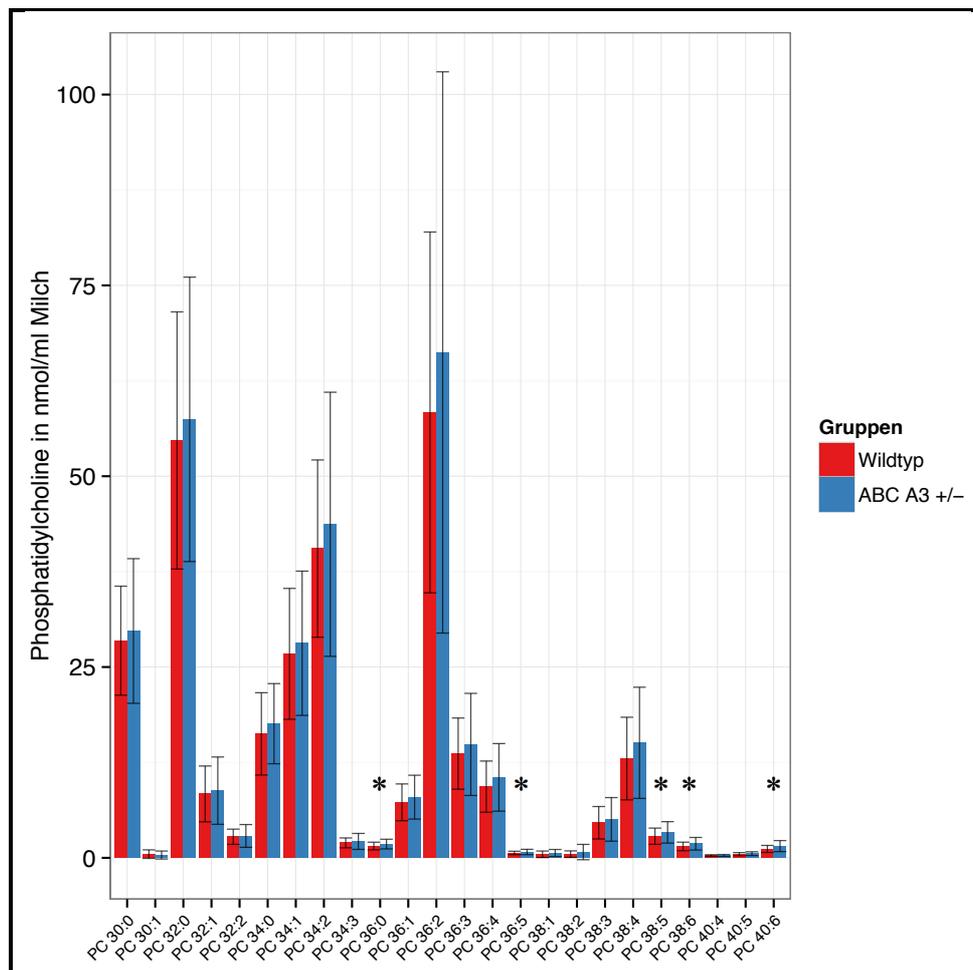


Abb. 20: Vergleich der absoluten Konzentration der Phosphatidylcholone [Milch]

Ergebnisse der Milchstudie

		PC 30:0	PC 30:1	PC 32:0	PC 32:1	PC 32:2	PC 34:0	PC 34:1	PC 34:2
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	Wildtyp	28.45 ± 7.81	0.49 ± 0.70	54.68 ± 18.16	8.38 ± 4.94	2.76 ± 0.83	16.24 ± 4.54	26.73 ± 8.74	40.52 ± 10.26
	Abca3 +/-	29.72 ± 9.21	0.37 ± 0.57	57.45 ± 17.25	8.80 ± 3.91	2.87 ± 2.00	17.58 ± 6.00	28.11 ± 9.62	43.70 ± 20.36
p-value		0.42	0.24	0.41	0.57	0.64	0.18	0.41	0.25

		PC 34:3	PC 36:0	PC 36:1	PC 36:2	PC 36:3	PC 36:4	PC 36:5	PC 38:1
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	Wildtyp	1.96 ± 0.68	1.55 ± 0.39	7.27 ± 2.02	58.36 ± 19.87	13.65 ± 4.35	9.33 ± 3.44	0.64 ± 0.22	0.47 ± 0.42
	Abca3 +/-	2.15 ± 1.22	1.81 ± 0.65	7.95 ± 3.67	66.21 ± 50.15	14.86 ± 8.43	10.54 ± 4.92	0.77 ± 0.42	0.63 ± 0.46
p-value		0.25	0.02	0.18	0.18	0.27	0.10	0.02	0.05

		PC 38:2	PC 38:3	PC 38:4	PC 38:5	PC 38:6	PC 40:4	PC 40:5	PC 40:6
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	Wildtyp	0.49 ± 0.33	4.60 ± 1.76	13.01 ± 5.01	2.83 ± 1.05	1.49 ± 0.62	0.30 ± 0.10	0.48 ± 0.16	1.17 ± 0.46
	Abca3 +/-	0.76 ± 1.43	5.04 ± 4.14	15.07 ± 8.97	3.34 ± 1.57	1.85 ± 0.80	0.31 ± 0.17	0.55 ± 0.27	1.54 ± 0.82
p-value		0.06	0.35	0.09	0.03	0.01	0.56	0.12	< 0.01

Tab. 18: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phosphatidylcholine [Milch]

Nach Normierung sind weiterhin PC 36:0, PC 36:5, PC 38:5, PC 38:6 und PC 40:6 in der [Abca3+/-]-Milch erhöht (p < 0.01 bis p = 0.03).

Zusätzlich ist PC 32:2 nach Normierung in der [Abca3+/-]-Milch grenzwertig erniedrigt (p = 0.05).

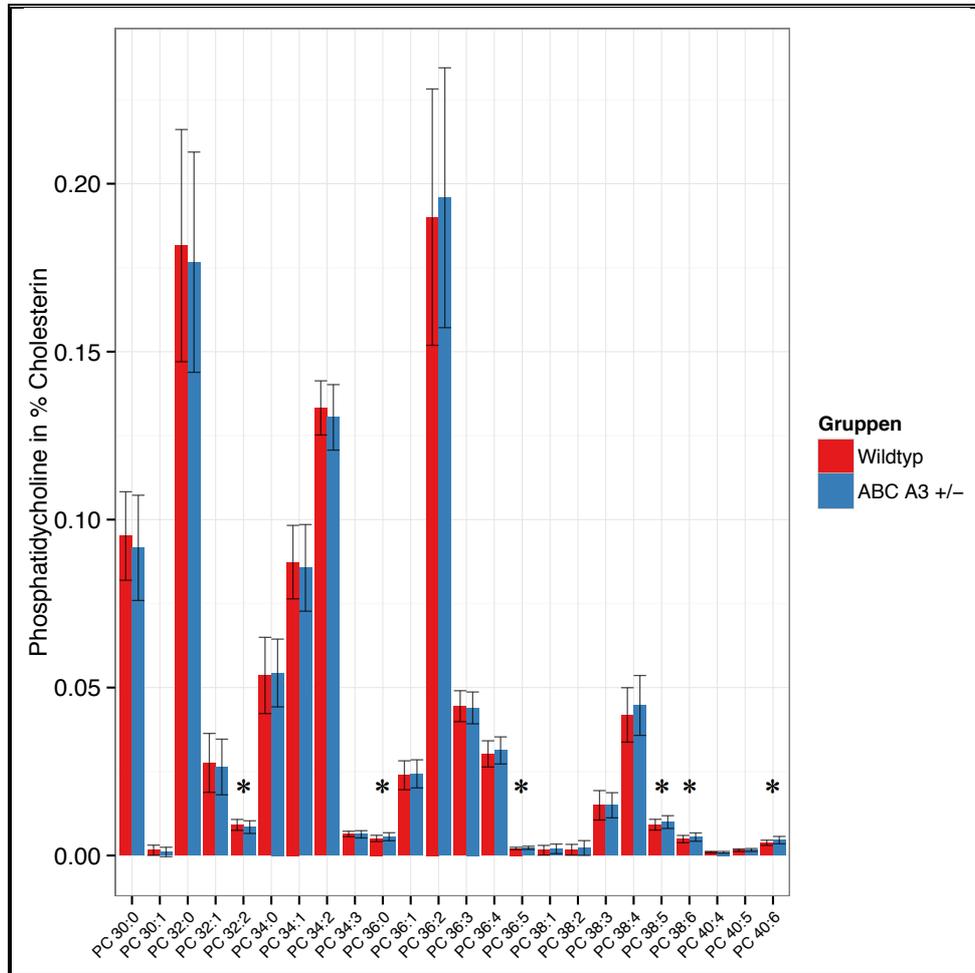


Abb. 21: Vergleich der Phosphatidylcholine in Bezug auf Cholesterinester [Milch]

		PC 32:2	PC 36:0	PC 36:5	PC 38:5	PC 38:6	PC 40:6
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	Wildtyp	0.0091 ± 0.002	0.0051 ± 0.001	0.0021 ± 0.000	0.0092 ± 0.002	0.0049 ± 0.001	0.0038 ± 0.001
	Abca3 +/-	0.0085 ± 0.002	0.0056 ± 0.001	0.0023 ± 0.001	0.0100 ± 0.002	0.0055 ± 0.001	0.0046 ± 0.001
p-value		0.05	0.02	0.03	0.02	0.01	< 0.01

Tab. 19: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phosphatidylcholine in Bezug auf Cholesterinester [Milch]

PC 32:0, PC 32:2 und weitere kurzkettige Untergruppen wurden aufgeschlüsselt auf die Melktage einzeln untersucht. Zunächst besteht nur bei PC 34:0 eine signifikante Zunahme in der [Abca3+/-]^{Tag5}-Milch (p = 0.01).

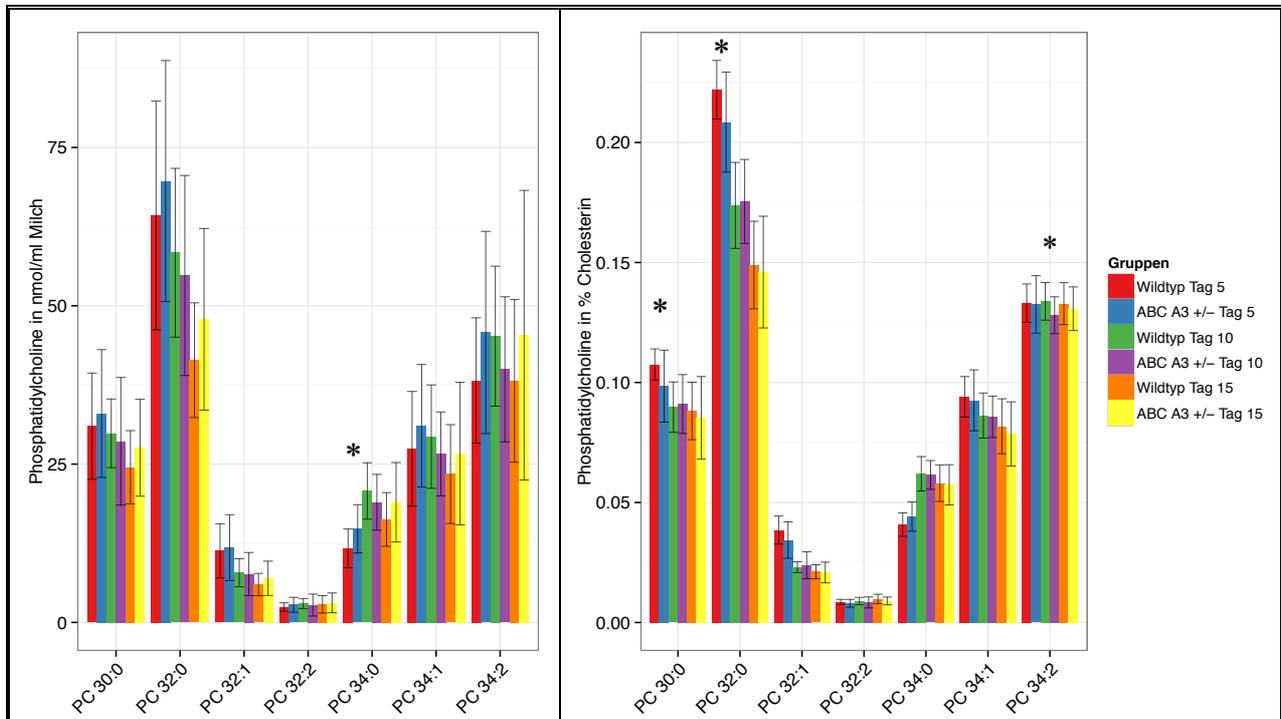


Abb. 22: Vergleich einzelner, kurzkettiger Phosphatidylcholine [Milch]

		PC 30:0			PC 32:0			PC 32:1		
		Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 5	Tag 10	Tag 15
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	Wildtyp	30.99 ± 8.38	29.86 ± 5.42	24.50 ± 5.79	64.26 ± 18.06	58.38 ± 13.32	41.41 ± 9.06	11.30 ± 4.27	7.85 ± 2.21	5.98 ± 1.77
	Abca3 +/-	32.98 ± 10.10	28.60 ± 10.08	27.58 ± 7.65	69.70 ± 19.03	54.79 ± 15.79	47.86 ± 14.34	11.81 ± 5.2	7.64 ± 3.40	6.96 ± 2.71
p-value		0.51	0.63	0.17	0.37	0.45	0.11	0.74	0.82	0.19

		PC 32:2			PC 34:0		
		Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 5	Tag 10	Tag 15
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	Wildtyp	2.44 ± 0.65	2.99 ± 0.79	2.85 ± 1.37	11.70 ± 3.05	20.76 ± 4.45	16.26 ± 4.24
	Abca3 +/-	2.78 ± 1.18	2.74 ± 1.73	3.09 ± 1.56	14.78 ± 3.81	18.97 ± 4.41	18.98 ± 6.27
p-value		0.28	0.57	0.62	0.01	0.22	0.13

		PC 34:1			PC 34:2		
		Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 5	Tag 10	Tag 15
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	Wildtyp	27.42 ± 9.06	29.34 ± 8.71	23.42 ± 7.80	38.31 ± 9.98	45.20 ± 11.05	38.14 ± 12.84
	Abca3 +/-	31.07 ± 9.67	26.62 ± 6.62	26.65 ± 11.26	45.79 ± 15.97	39.96 ± 11.46	45.36 ± 22.86
p-value		0.24	0.27	0.31	0.09	0.16	0.24

Tab. 20: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner, kurzkettiger Phosphatidylcholine [Milch]

Nach Bezug auf Cholesterin wird eine Reduktion von PC 30:0 und PC 32:0 in der [Abca3+/-]^{Tag5}-Milch (jeweils p = 0.02) und von PC 34:2 in der [Abca3+/-]^{Tag10}-Milch (p = 0.03) sichtbar (Abb. 21 rechte Grafik).

		PC 30:0			PC 32:0		
		Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 5	Tag 10	Tag 15
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	Wildtyp	0.1075 ± 0.007	0.0897 ± 0.011	0.0882 ± 0.012	0.2220 ± 0.012	0.1785 ± 0.018	0.1489 ± 0.018
	Abca3 +/-	0.0985 ± 0.015	0.0910 ± 0.012	0.0853 ± 0.017	0.2085 ± 0.021	0.1754 ± 0.018	0.1460 ± 0.023
p-value		0.02	0.73	0.55	0.02	0.77	0.67

		PC 32:2			PC 34:2		
		Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 5	Tag 10	Tag 15
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	Wildtyp	0.0086 ± 0.001	0.0089 ± 0.002	0.0098 ± 0.002	0.1331 ± 0.008	0.1338 ± 0.008	0.1329 ± 0.009
	Abca3 +/-	0.0080 ± 0.002	0.0084 ± 0.002	0.0090 ± 0.002	0.1325 ± 0.012	0.1280 ± 0.008	0.1308 ± 0.009
p-value		0.21	0.37	0.16	0.88	0.03	0.47

Tab. 21: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner, kurzkettiger Phosphatidylcholinen in Bezug auf Cholesterinester [Milch]

3.3.2 Phosphatidylethanolamin

Phosphatidylethanolamin ist in der [Abca3+/-]^{Tag15}-Milch erhöht (p = 0.02). Nach Normierung durch Cholesterinester ist keine Signifikanz mehr vorhanden.

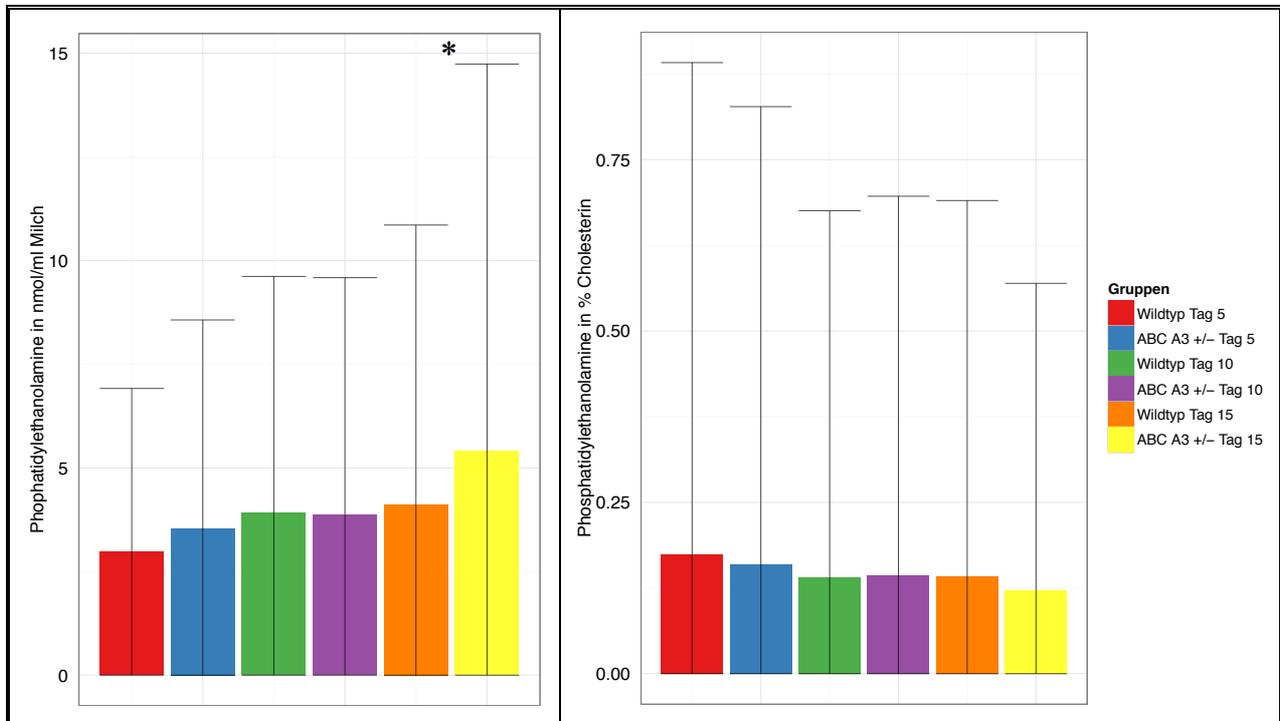


Abb. 23: Vergleich von Phosphatidylethanolamin [Milch]

	Wildtyp [Tag 5]	Abca3+/- [Tag 5]	Wildtyp [Tag 10]	Abca3+/- [Tag 10]	Wildtyp [Tag 15]	Abca3+/- [Tag 15]
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	2.98 ± 3.94	3.54 ± 5.02	3.91 ± 5.71	3.87 ± 5.72	4.12 ± 6.74	5.40 ± 9.34
p-value	0.05		0.92		0.02	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.17 ± 0.72	0.16 ± 0.67	0.14 ± 0.53	0.14 ± 0.55	0.14 ± 0.55	0.12 ± 0.45
p-value	0.75		0.93		0.52	

Tab. 22: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylethanolamin [Milch]

3.3.3 Phosphatidylinositol

Phosphatidylinositol ist zunächst in der [Abca3+/-]^{Tag15}-Milch vermehrt vorhanden (p = 0.03). Nach Normierung ist dieser Wert nicht mehr signifikant.

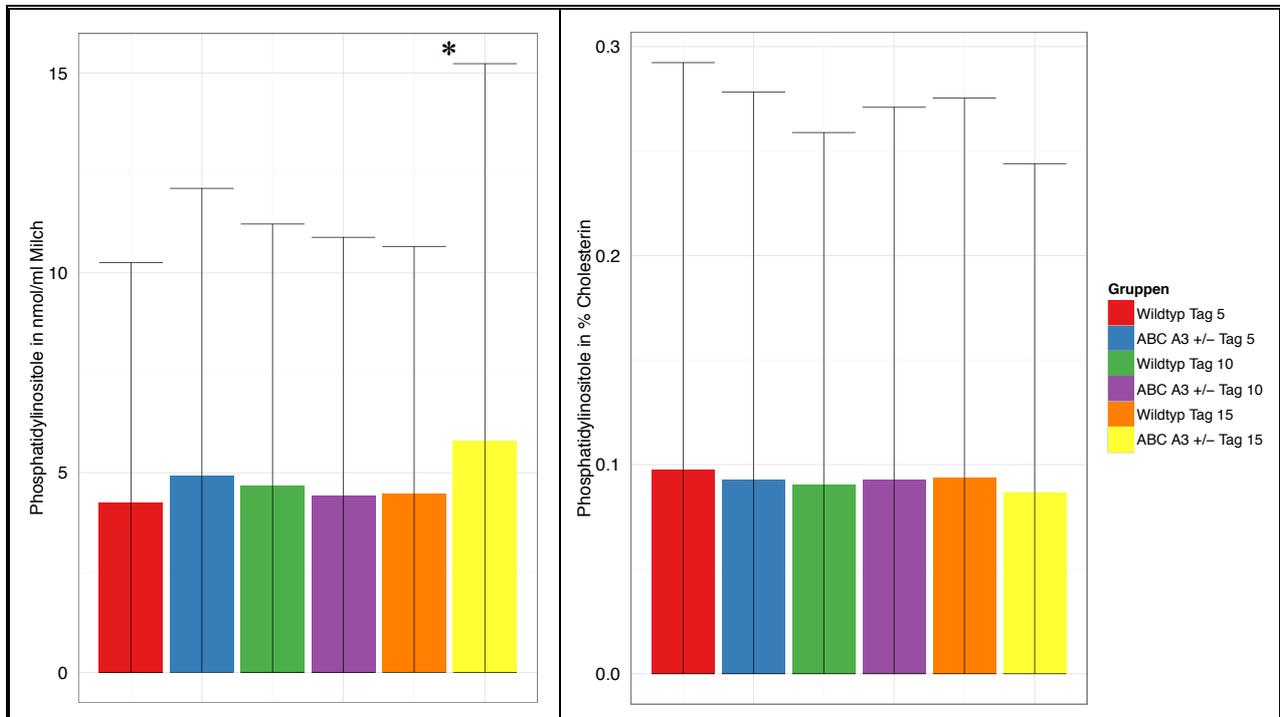


Abb. 24: Vergleich von Phosphatidylinositol [Milch]

	Wildtyp [Tag 5]	Abca3+/- [Tag 5]	Wildtyp [Tag 10]	Abca3+/- [Tag 10]	Wildtyp [Tag 15]	Abca3+/- [Tag 15]
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	4.26 ± 6.00	4.92 ± 7.20	4.67 ± 6.55	4.44 ± 6.45	4.47 ± 6.19	5.81 ± 9.42
p-value	0.21		0.65		0.03	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.10 ± 0.19	0.09 ± 0.19	0.09 ± 0.17	0.09 ± 0.18	0.09 ± 0.18	0.09 ± 0.16
p-value	0.75		0.85		0.59	

Tab. 23: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylinositol [Milch]

3.3.4 Phosphatidylserin

Bei Phosphatidylserin ist eine Erhöhung in der [Abca3+/-]^{Tag15}-Milch nachweisbar (p = 0.04). Nach Normierung ist der Wert nicht mehr signifikant.

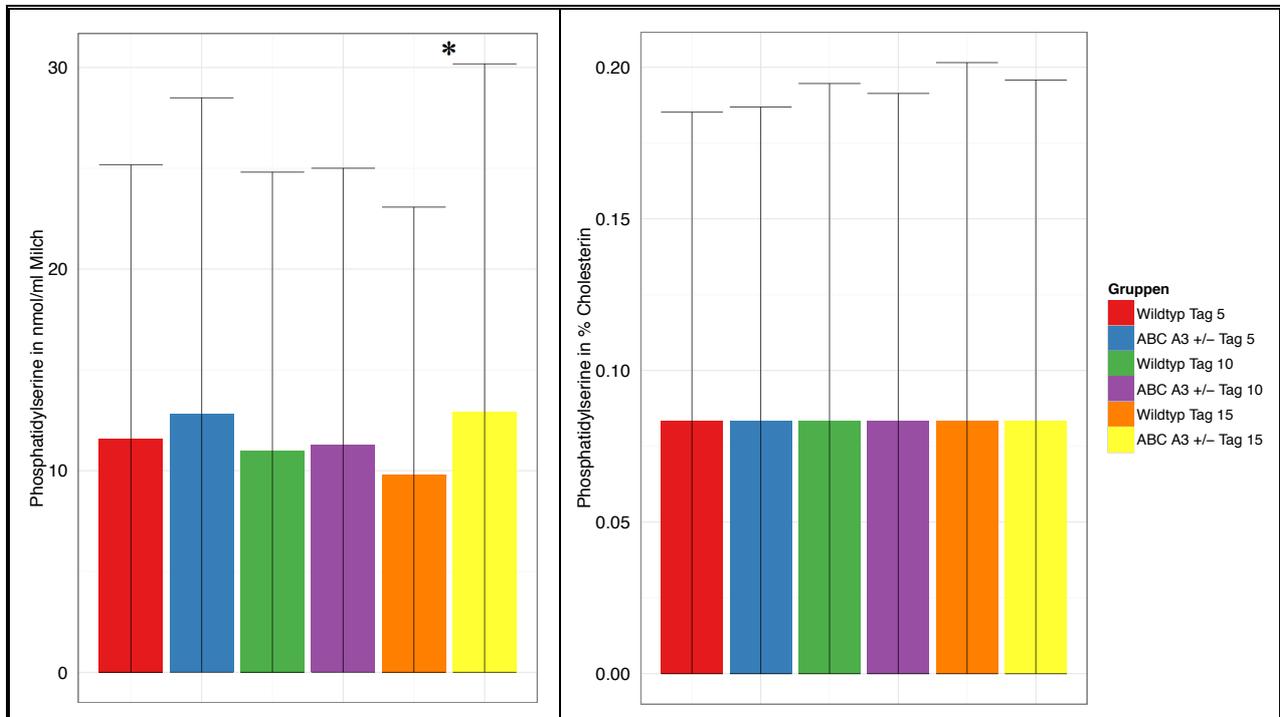


Abb. 25: Vergleich von Phosphatidylserin [Milch]

	Wildtyp [Tag 5]	Abca3+/- [Tag 5]	Wildtyp [Tag 10]	Abca3+/- [Tag 10]	Wildtyp [Tag 15]	Abca3+/- [Tag 15]
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	11.58 ± 13.60	12.80 ± 15.69	10.99 ± 13.82	11.27 ± 13.73	9.81 ± 13.27	12.93 ± 17.25
p-value	0.40		0.83		0.04	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.08 ± 0.10	0.08 ± 0.10	0.08 ± 0.11	0.08 ± 0.11	0.08 ± 0.12	0.08 ± 0.11
p-value	1.00		1.00		1.00	

Tab. 24: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylserin [Milch]

3.3.5 Plasminogen

Plasminogen ist in der [Abca3+/-]^{Tag15}-Milch vermehrt vorhanden ($p < 0.01$). Bei Normierung durch Cholesterinester zeigt sich keine Signifikanz.

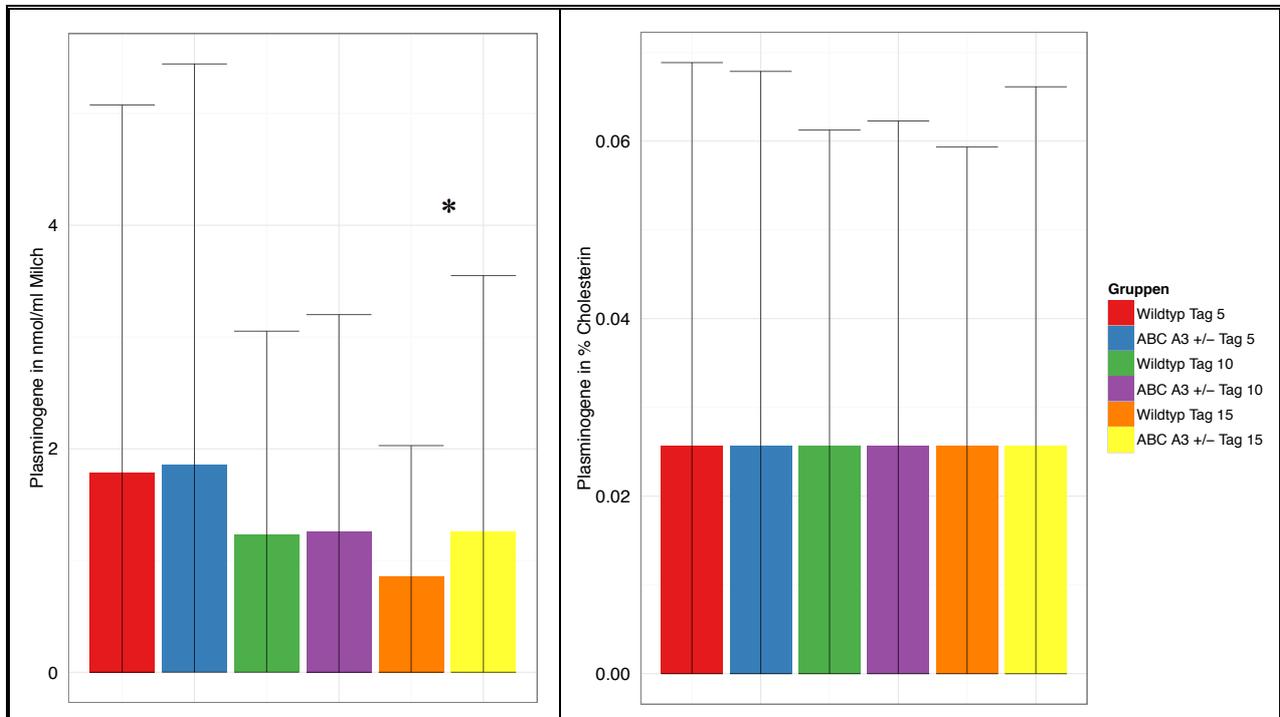


Abb. 26: Vergleich von Plasminogen [Milch]

	Wildtyp [Tag 5]	Abca3+/- [Tag 5]	Wildtyp [Tag 10]	Abca3+/- [Tag 10]	Wildtyp [Tag 15]	Abca3+/- [Tag 15]
Mittelwert ± SD [nmol/ml Milch]	1.79 ± 3.29	1.86 ± 3.59	1.23 ± 1.82	1.26 ± 1.94	0.86 ± 1.17	1.26 ± 2.29
p-value	0.71		0.75		< 0.01	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.04
p-value	1.00		0.99		0.98	

Tab. 25: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Plasminogen [Milch]

3.3.6 Sphingomyelin, Ceramid und Lyso-Phosphatidylcholin

Bei Sphingomyelin und Ceramid besteht in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den Milchproben.

Lyso-Phosphatidylcholin ist, sowohl in der absoluten Konzentration, wie auch nach Normierung, nicht signifikant verändert.

4 Ergebnisse der Untersuchung der Leber

4.1 Zusammensetzung der Phospholipide im Lebergewebe

Im Lebergewebe der untersuchten Mäuse stellt Phosphatidylcholin mit 45.2 % die größte Untergruppe dar, gefolgt von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol. Folgendes Diagramm zeigt die durchschnittliche, prozentuale Zusammensetzung des Lebergewebes bei allen Mäusen ohne Differenzierung nach Genotyp.

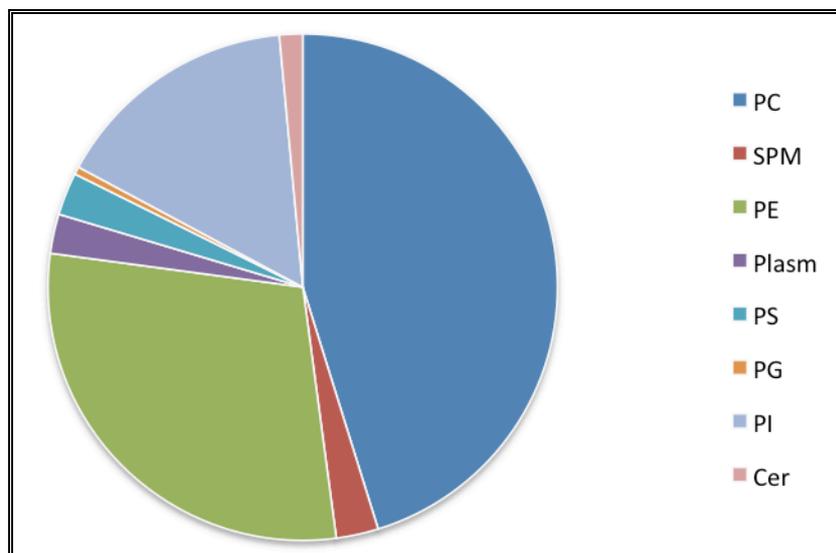


Abb. 27: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Leber]

PC	SPM	PE	Plasm	PS	PG	PI	Cer
45.2 %	2.7 %	29.2 %	2.5 %	2.7 %	0.5 %	15.7 %	1.5 %

Tab. 26: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Leber]

4.2 Cholesterinester im Lebergewebe

Cholesterinester ist nicht signifikant verändert in der [Abca3+/-]-Leber.

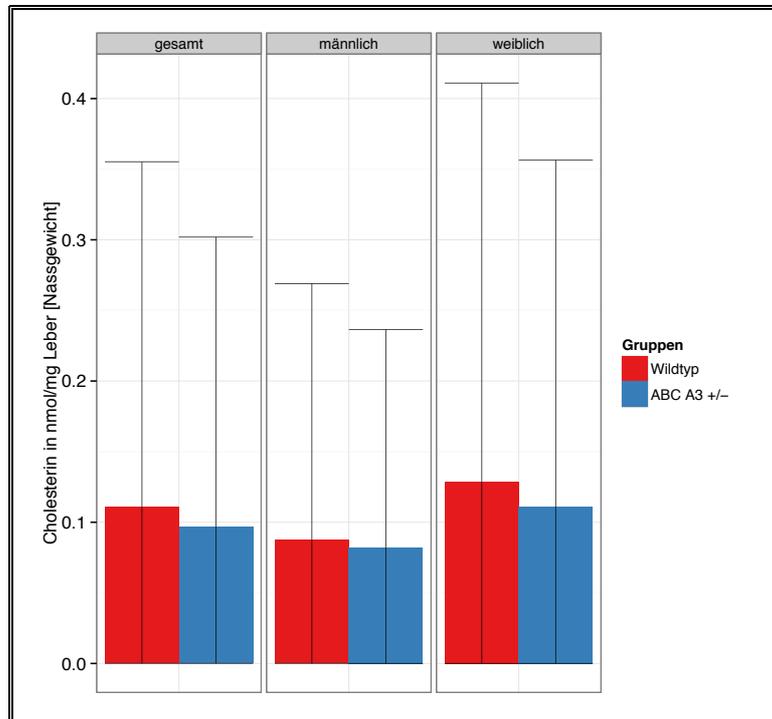


Abb. 28: Vergleich von Cholesterinester, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

	Wildtyp [gesamt]	Abca3+/- [gesamt]	Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.11 ± 0.24	0.10 ± 0.21	0.09 ± 0.18	0.08 ± 0.15	0.13 ± 0.28	0.11 ± 0.25
p-value	0.28		0.72		0.40	

Tab. 27: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Cholesterinester, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

4.3 Phospholipide im Lebergewebe

Bei der Untersuchung der Phospholipide besteht nur bei Ceramide der Trend zu einer geringeren Konzentration in der [Abca3+/-]-Leber. Nach Normierung ist in keiner Probe ein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

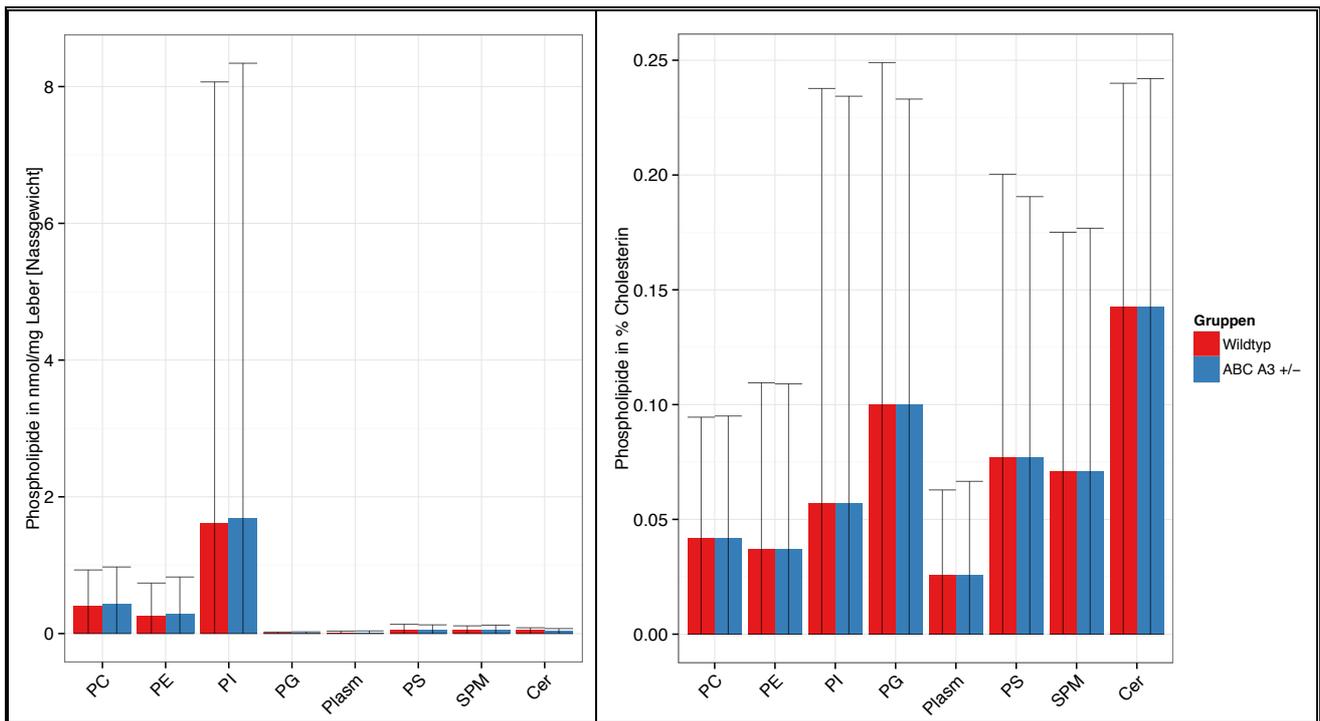


Abb. 29: Vergleich der Phospholipide in allen Tieren [Leber]

		Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	p-value	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	p-value
PC	Wildtyp	0.41 ± 0.52	0.55	0.04 ± 0.05	0.98
	Abca3+/-	0.42 ± 0.55		0.04 ± 0.05	
PE	Wildtyp	0.25 ± 0.49	0.18	0.04 ± 0.07	0.95
	Abca3+/-	0.29 ± 0.54		0.04 ± 0.07	
PI	Wildtyp	1.61 ± 6.45	0.86	0.06 ± 0.18	0.99
	Abca3+/-	1.68 ± 6.66		0.06 ± 0.18	
PG	Wildtyp	0.01 ± 0.01	0.10	0.10 ± 0.15	1.00
	Abca3+/-	0.01 ± 0.02		0.10 ± 0.13	
Plasm	Wildtyp	0.01 ± 0.02	0.47	0.03 ± 0.04	0.99
	Abca3+/-	0.01 ± 0.02		0.03 ± 0.04	

		Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	p-value	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	p-value
PS	Wildtyp	0.05 ± 0.09	0.82	0.08 ± 0.12	1.00
	Abca3+/-	0.05 ± 0.08		0.08 ± 0.11	
SPM	Wildtyp	0.05 ± 0.06	0.45	0.07 ± 0.10	1.00
	Abca3+/-	0.05 ± 0.07		0.07 ± 0.11	
Cer	Wildtyp	0.05 ± 0.04	0.06	0.14 ± 0.10	1.00
	Abca3+/-	0.04 ± 0.03		0.14 ± 0.10	

Tab. 28: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phospholipide in allen Tieren [Leber]

4.3.1 Phosphatidylcholin

Vor und nach Trennung nach Geschlecht ist keine Signifikanz zwischen beiden Proben vorhanden.

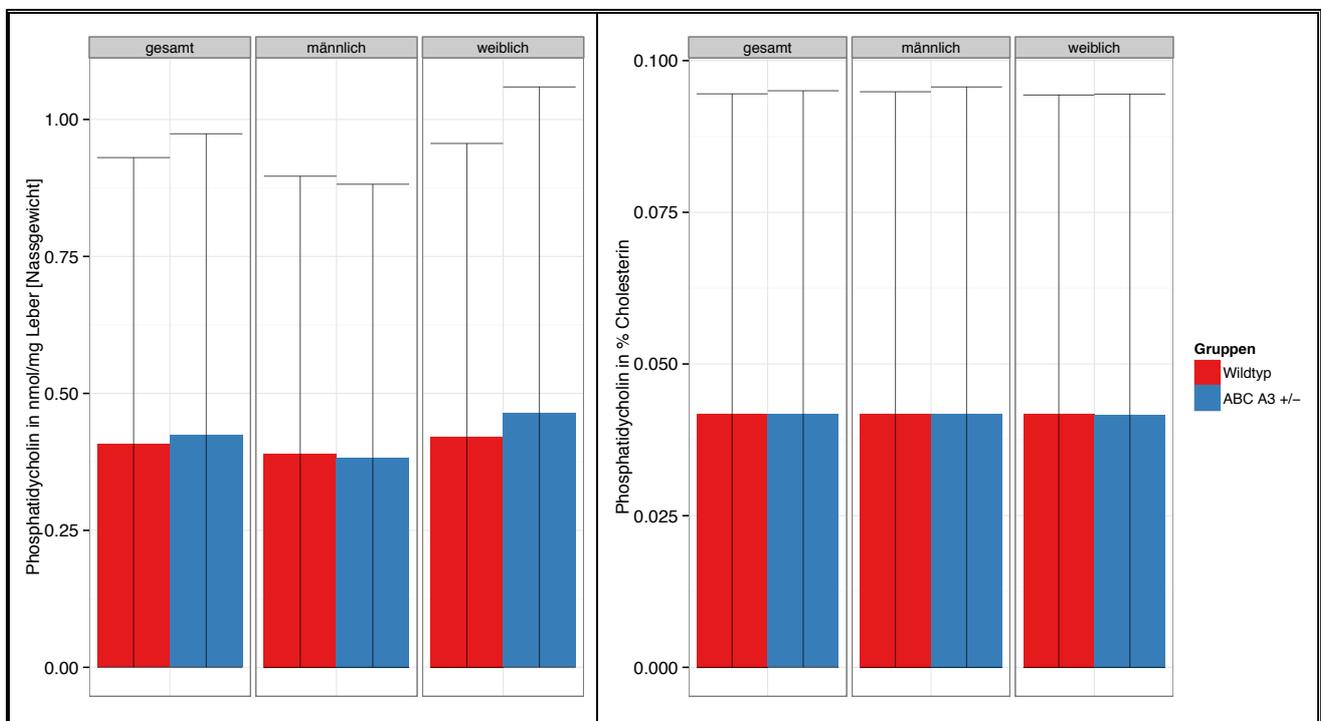


Abb. 30: Vergleich von Phosphatidylcholin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

	Wildtyp [gesamt]	Abca3+/- [gesamt]	Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.41 ± 0.52	0.42 ± 0.55	0.39 ± 0.51	0.38 ± 0.50	0.42 ± 0.54	0.46 ± 0.60
p-value	0.55		0.85		0.27	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.05
p-value	0.98		0.99		0.98	

Tab. 29: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylcholin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

Nach Auftrennung der Phosphatidylcholine in die Untergruppen, ist hinsichtlich der absoluten Konzentration bei PC 32:2, PC 34:0 und PC 36:0 eine Erniedrigung in der [Abca3+/-]-Leber zu sehen ($p < 0.01$ bis $p = 0.01$).

PC 32:1, PC 34:3 und PC 36:5 sind in der [Abca3+/-]-Leber signifikant erhöht ($p < 0.01$ bis $p = 0.01$).

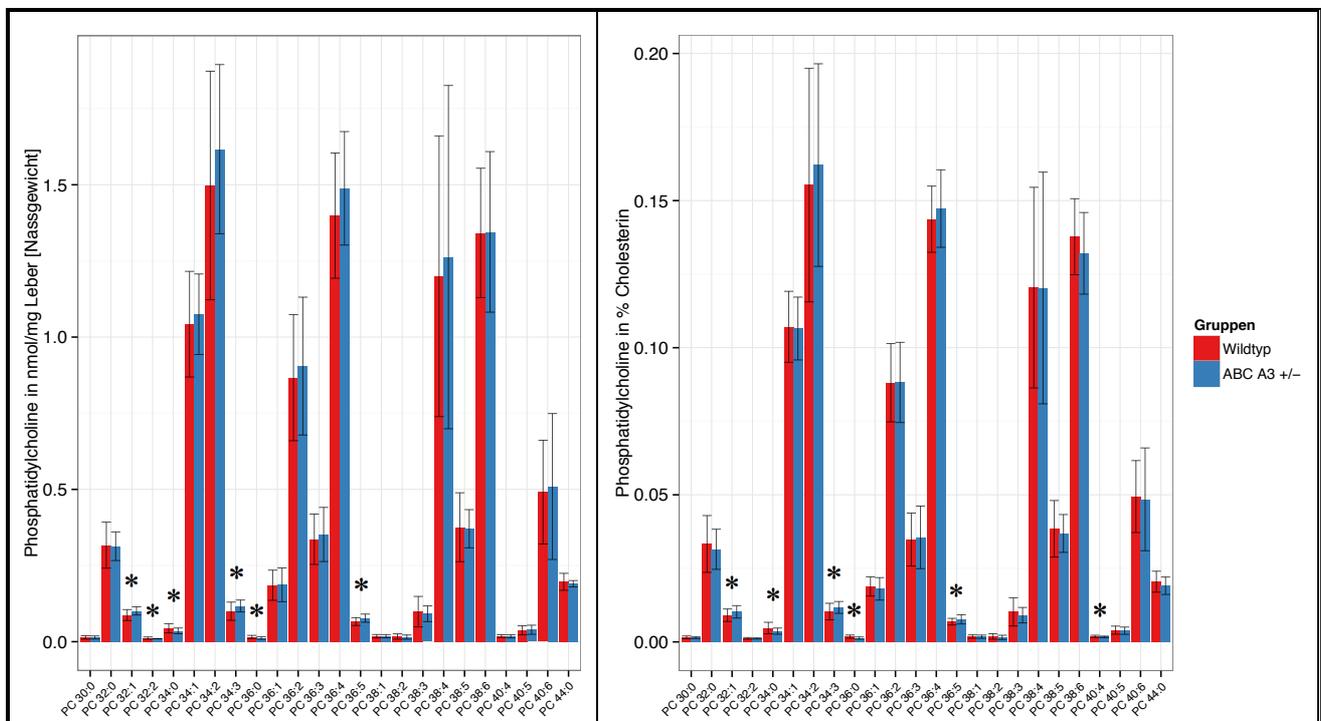


Abb. 31: Vergleich der einzelnen Phosphatidylcholine in allen Tieren [Leber]

Ergebnisse der Untersuchung der Leber

		PC 30:0	PC 32:0	PC 32:1	PC 32:2	PC 34:0	PC 34:1	PC 34:2	PC 34:3
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	Wildtyp	0.0140 ± 0.006	0.3170 ± 0.076	0.0873 ± 0.018	0.0117 ± 0.004	0.0440 ± 0.015	1.0423 ± 0.173	1.4977 ± 0.375	0.1000 ± 0.030
	Abca3 +/-	0.0139 ± 0.005	0.3133 ± 0.047	0.1011 ± 0.013	0.0100 ± 0.000	0.0356 ± 0.009	1.0750 ± 0.132	1.6169 ± 0.278	0.1172 ± 0.020
p-value		0.93	0.81	< 0.01	0.01	0.01	0.39	0.14	0.01

		PC 36:0	PC 36:1	PC 36:2	PC 36:3	PC 36:4	PC 36:5	PC 38:1	PC 38:2
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	Wildtyp	0.0157 ± 0.005	0.1853 ± 0.050	0.8667 ± 0.207	0.3363 ± 0.083	1.3987 ± 0.205	0.0660 ± 0.013	0.0180 ± 0.006	0.0170 ± 0.009
	Abca3 +/-	0.0119 ± 0.004	0.1867 ± 0.055	0.9047 ± 0.226	0.3519 ± 0.089	1.4883 ± 0.186	0.0772 ± 0.013	0.0181 ± 0.005	0.0150 ± 0.007
p-value		< 0.01	0.92	0.48	0.47	0.07	< 0.01	0.97	0.31

		PC 38:3	PC 38:4	PC 38:5	PC 38:6	PC 40:4	PC 40:5	PC 40:6	PC 44:0
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	Wildtyp	0.0987 ± 0.050	1.1997 ± 0.461	0.3757 ± 0.113	1.3420 ± 0.212	0.0183 ± 0.005	0.0373 ± 0.015	0.4910 ± 0.170	0.1966 ± 0.028
	Abca3 +/-	0.0917 ± 0.026	1.2625 ± 0.564	0.3708 ± 0.063	1.3453 ± 0.264	0.0175 ± 0.005	0.0392 ± 0.015	0.5094 ± 0.240	0.1902 ± 0.010
p-value		0.47	0.63	0.83	0.96	0.49	0.62	0.72	0.21

Tab. 30: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylcholone in allen Tieren [Leber]

Nach Normierung besteht weiterhin eine Reduktion von PC 34:0 ($p = 0.01$) und PC 36:0 ($p < 0.01$) in der [Abca3+/-]-Leber. Ebenfalls ist PC 40:4 erniedrigt ($p = 0.03$).

PC 32:1, PC 34:3 und PC 36:5 sind auch nach Normierung in der [Abca3+/-]-Leber erhöht vorhanden ($p = 0.02$ bis $p = 0.03$).

		PC 32:1	PC 32:2	PC 34:0	PC 34:3	PC 36:0	PC 36:5	PC 40:4
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	Wildtyp	0.0091 ± 0.002	0.0012 ± 0.000	0.0047 ± 0.002	0.0103 ± 0.003	0.0018 ± 0.001	0.0069 ± 0.001	0.0019 ± 0.000
	Abca3 +/-	0.0102 ± 0.002	0.0012 ± 0.000	0.0037 ± 0.001	0.0117 ± 0.002	0.0013 ± 0.000	0.0077 ± 0.002	0.0017 ± 0.000
p-value		0.03	0.68	0.01	0.02	< 0.01	0.02	0.03

Tab. 31: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylcholone in allen Tieren in Bezug auf Cholesterinester [Leber]

Kurzkettige Phosphatidylcholone wurden weiter nach Geschlecht getrennt untersucht. PC 32:2 zeigt in der [Abca3+/-][♀]-Leber einen Trend zu einer erniedrigten Konzentration (p = 0.07). PC 34:0 ist in der [Abca3+/-][♂]-Leber erniedrigt (p = 0.03). Bei PC 36:0 besteht in der [Abca3+/-][♀]-Leber eine signifikante Erniedrigung (p = 0.01) und bei der [Abca3+/-][♂]-Leber ein Trend in diese Richtung (p = 0.06).

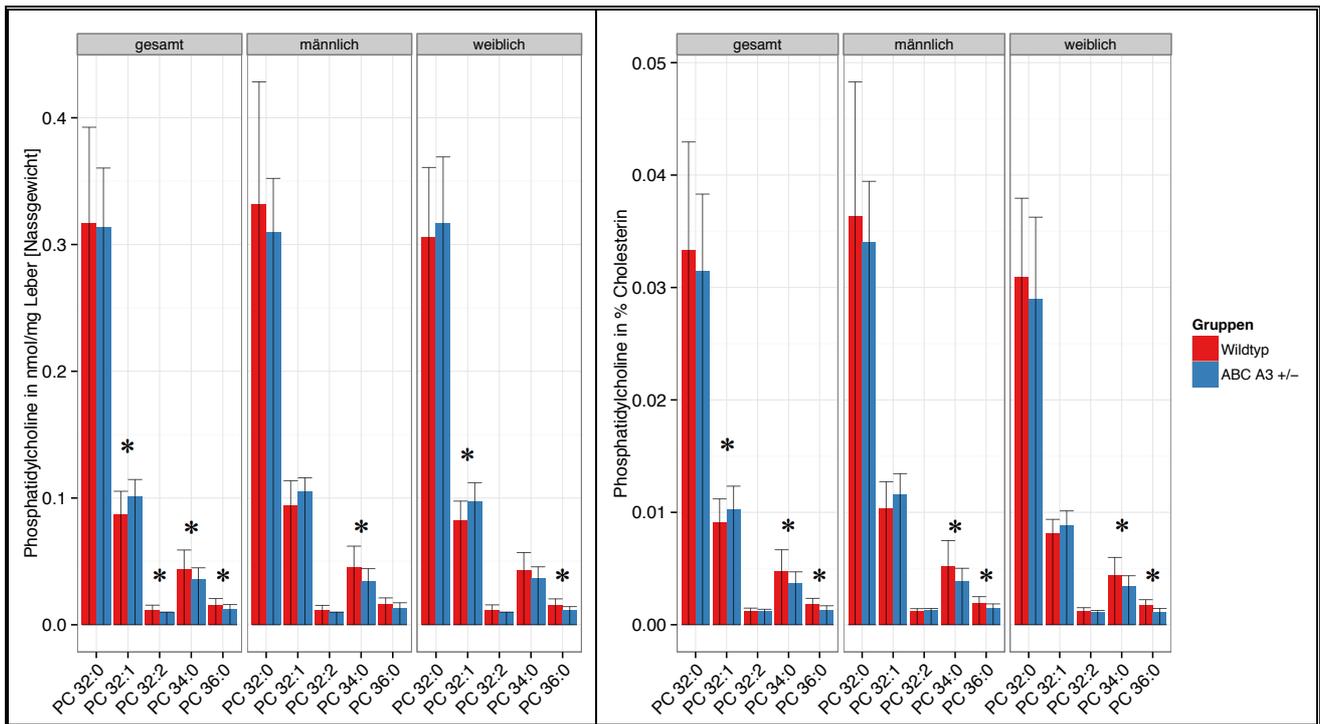


Abb. 32: Vergleich einzelner Phosphatidylcholone, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

		Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
PC 32:0	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.3315 ± 0.097	0.3100 ± 0.042	0.3059 ± 0.055	0.3167 ± 0.052
	p-value	0.41		0.56	
PC 32:1	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0938 ± 0.020	0.1050 ± 0.011	0.0824 ± 0.015	0.0972 ± 0.015
	p-value	0.05		0.01	
PC 32:2	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0115 ± 0.004	0.0100 ± 0.000	0.0118 ± 0.004	0.0100 ± 0.000
	p-value	0.09		0.07	

Ergebnisse der Untersuchung der Leber

		Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
PC 34:0	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0454 ± 0.017	0.0344 ± 0.010	0.0429 ± 0.014	0.0367 ± 0.009
	p-value	0.03		0.12	
PC 36:0	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0162 ± 0.005	0.0128 ± 0.005	0.0153 ± 0.005	0.0111 ± 0.003
	p-value	0.06		0.01	

Tab. 32: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylcholine nach Geschlechtern getrennt [Leber]

Nach Normierung mittels Cholesterinester sind PC 34:0 und PC 36:0 sowohl vor, wie auch nach Trennung nach Geschlecht in der [Abca3+/-]-Leber erniedrigt ($p < 0.01$ bis $p = 0.05$). PC 32:1 und PC 32:2 sind nicht signifikant verändert.

		Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
PC 32:0	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.0364 ± 0.012	0.0340 ± 0.005	0.0309 ± 0.007	0.0290 ± 0.007
	p-value	0.46		0.42	
PC 32:1	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.0103 ± 0.002	0.0116 ± 0.002	0.0081 ± 0.001	0.0088 ± 0.001
	p-value	0.10		0.11	
PC 32:2	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.0012 ± 0.000	0.0013 ± 0.000	0.0012 ± 0.000	0.0011 ± 0.000
	p-value	0.30		0.13	
PC 34:0	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.0052 ± 0.002	0.0039 ± 0.001	0.0044 ± 0.002	0.0034 ± 0.001
	p-value	0.05		0.04	
PC 36:0	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.0019 ± 0.001	0.0015 ± 0.000	0.0017 ± 0.001	0.0011 ± 0.000
	p-value	0.03		< 0.01	

Tab. 33: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylcholine nach Geschlechtern getrennt und in Bezug auf Cholesterinester [Leber]

4.3.2 Phosphatidylglycerin

Bei den Phosphatidylglycerin zeigt sich in der Übersicht keine signifikante Veränderung.

Nach Trennung nach Geschlecht sind die Phosphatidylglycerine in der [Abca3+/-][♀]-Leber in der absoluten Konzentration signifikant erhöht vorhanden. Allerdings verschwindet diese Signifikanz nach Normierung mit Cholesterinester.

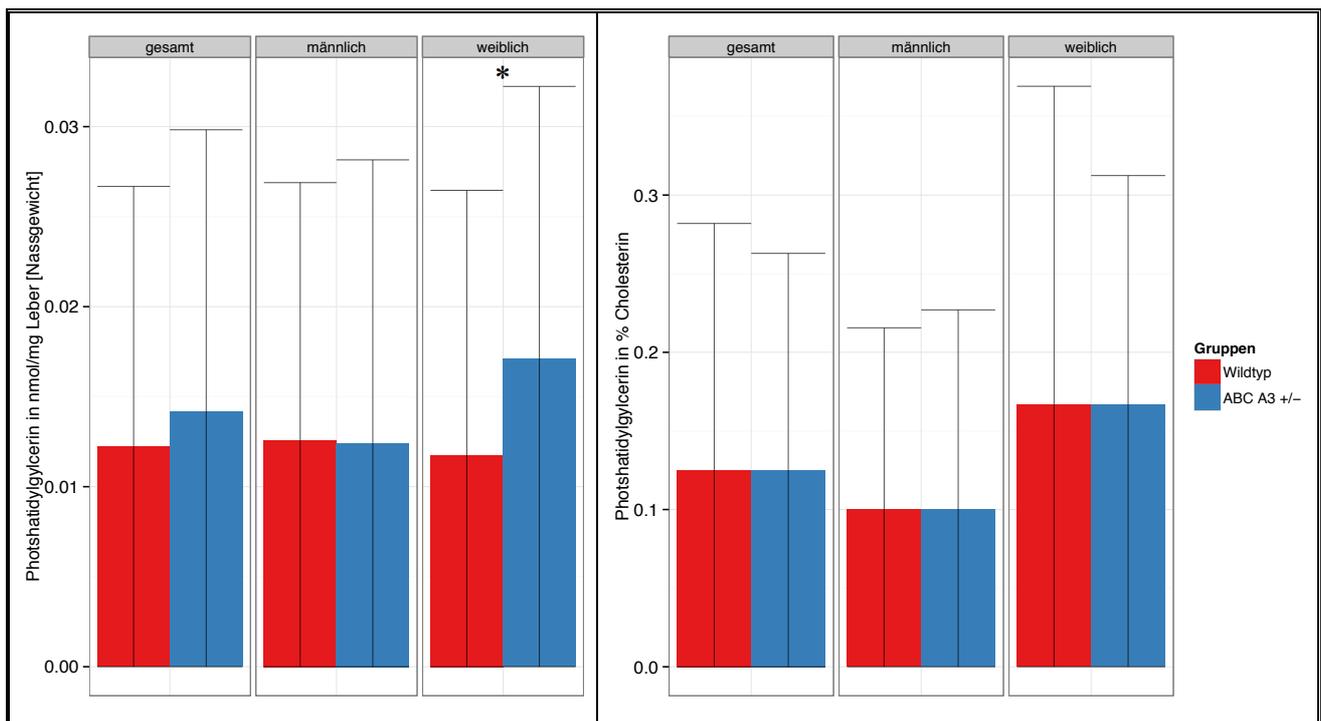


Abb. 33: Vergleich von Phosphatidylglycerin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

	Wildtyp [gesamt]	Abca3+/- [gesamt]	Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
p-value	0.10		0.93		0.01	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.10 ± 0.15	0.10 ± 0.13	0.10 ± 0.12	0.10 ± 0.13	0.17 ± 0.20	0.17 ± 0.15
p-value	1.00		1.00		1.00	

Tab. 34: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylglycerin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

Bei einzelner Betrachtung der Subgruppen der Phosphatidylglycerine besteht eine signifikante Erhöhung von PG 34:1 ($p < 0.01$) und PG 36:2 ($p = 0.04$) in der [Abca3+/-]-Leber, die aber in Bezug auf Cholesterinester nicht mehr nachweisbar ist.

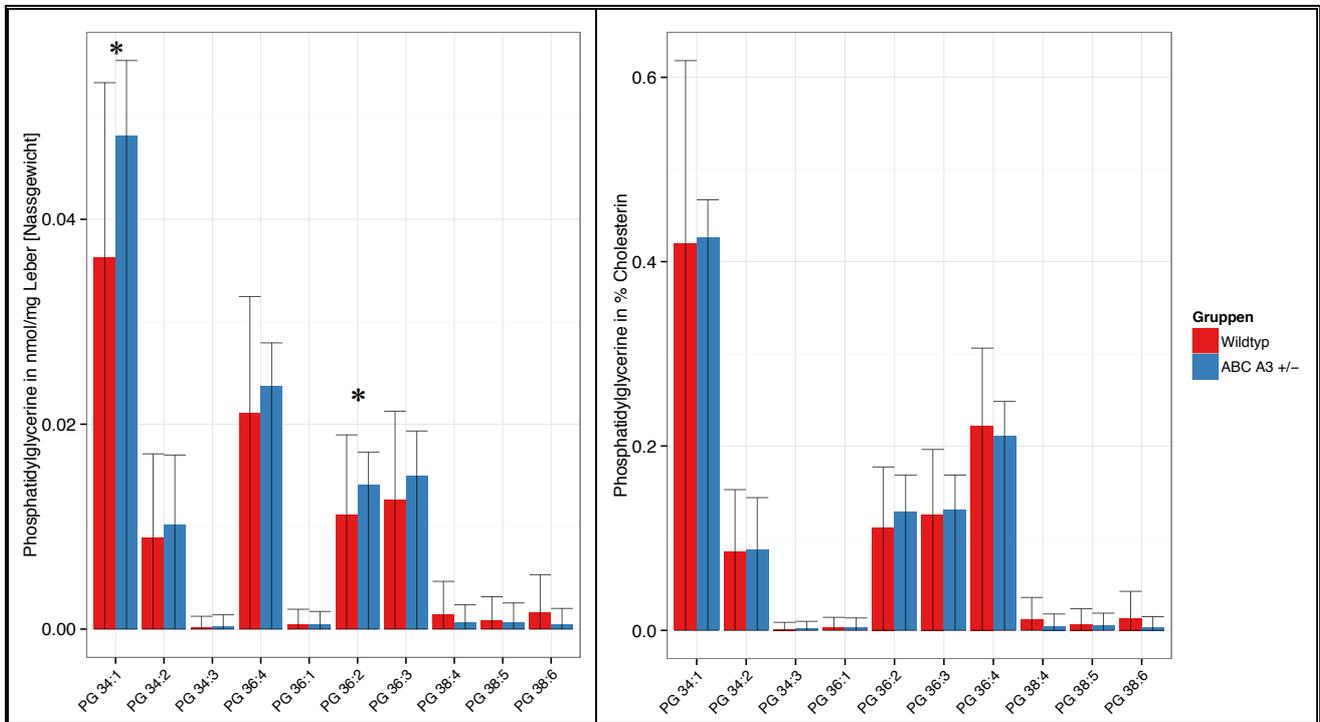


Abb. 34: Vergleich einzelner Phosphatidylglycerine in allen Tieren [Leber]

		PG 34:1	PG 34:2	PG 34:3	PG 36:1	PG 36:2
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	Wildtyp	0.0363 ± 0.017	0.0090 ± 0.008	0.0002 ± 0.001	0.0004 ± 0.002	0.0111 ± 0.008
	Abca3+/-	0.0482 ± 0.007	0.0102 ± 0.007	0.0003 ± 0.001	0.0004 ± 0.001	0.0141 ± 0.003
p-value		< 0.01	0.49	0.78	0.98	0.04

		PG 36:3	PG 36:4	PG 38:4	PG 38:5	PG 38:6
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	Wildtyp	0.0126 ± 0.009	0.0211 ± 0.011	0.0014 ± 0.003	0.0009 ± 0.002	0.0016 ± 0.004
	Abca3+/-	0.0149 ± 0.004	0.0237 ± 0.004	0.0006 ± 0.002	0.0007 ± 0.002	0.0005 ± 0.002
p-value		0.17	0.21	0.21	0.68	0.11

Tab. 35: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylglycerine in allen Tieren [Leber]

Nach Normierung zeigt sich nur bei PG 38:6 ein Trend zu einer Reduktion in der [Abca3+/-]-Leber ($p = 0.07$).

		PG 34:1	PG 36:2	PG 38:4	PG 38:6
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	Wildtyp	0.4194 ± 0.199	0.1118 ± 0.065	0.0113 ± 0.024	0.0132 ± 0.029
	Abca3+/-	0.4259 ± 0.041	0.1281 ± 0.040	0.0045 ± 0.013	0.0034 ± 0.011
p-value		0.85	0.23	0.17	0.07

Tab. 36: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylglycerine in allen Tieren in Bezug auf Cholesterinester [Leber]

Kurzkettenige Phosphatidylglycerine wurden nach Geschlecht getrennt untersucht. Vor Normierung ist PG 34:1 in der [Abca3+/-]-Leber beider Geschlechter signifikant erhöht vorhanden ($p < 0.01$ und $p = 0.01$). PG 36:2 ist in der [Abca3+/-]-Leber erniedrigt ($p < 0.01$).

Anzumerken ist, dass PG 36:1 bei den Weibchen in keiner Probe und bei den Männchen nur in drei WT versus einer [Abca3+/-]-Leberprobe messbar war.

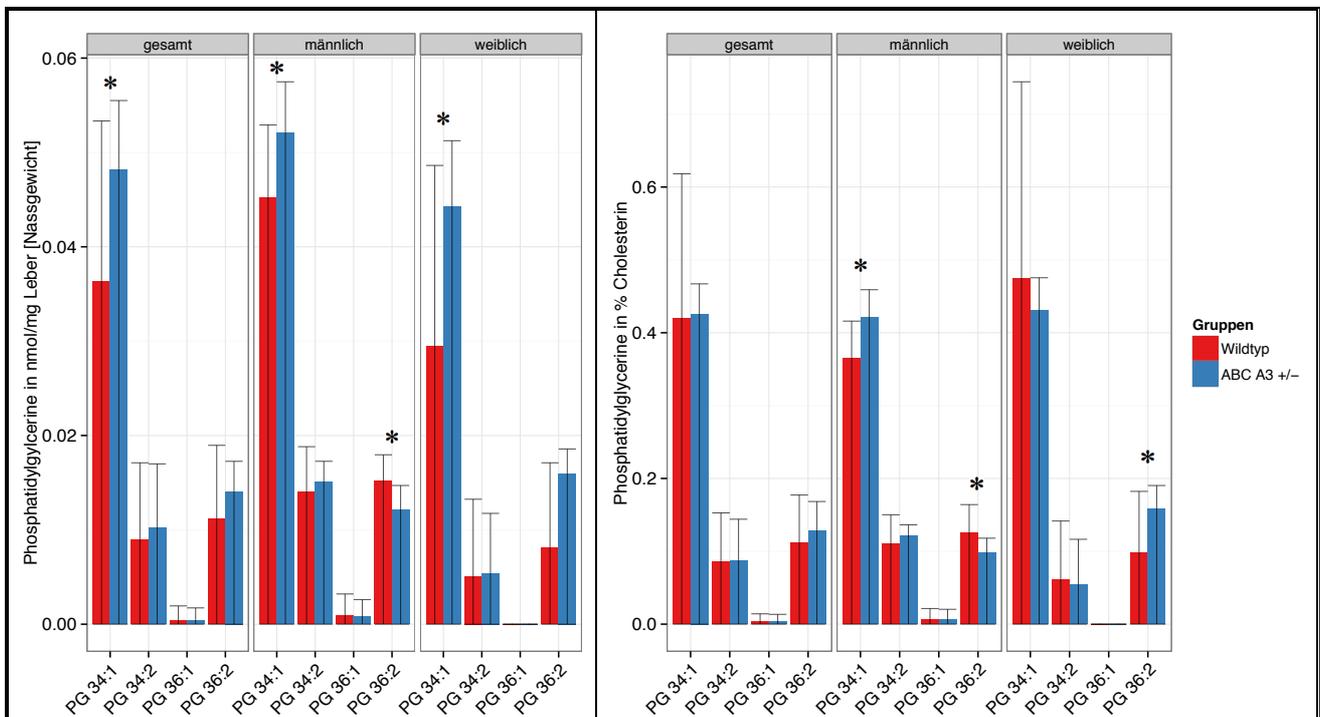


Abb. 35: Vergleich der Konzentrationen einzelner Phosphatidylglycerine, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

Ergebnisse der Untersuchung der Leber

		Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
PG 34:1	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0452 ± 0.008	0.0521 ± 0.005	0.0294 ± 0.019	0.0442 ± 0.007
	p-value	0.01		< 0.01	
PG 34:2	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0140 ± 0.005	0.0150 ± 0.002	0.0051 ± 0.008	0.0054 ± 0.006
	p-value	0.43		0.90	
PG 36:1	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0009 ± 0.002	0.0008 ± 0.002	N/A	N/A
	p-value	0.85		N/A	
PG 36:2	Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.0152 ± 0.003	0.0121 ± 0.003	0.0111 ± 0.008	0.0141 ± 0.003
	p-value	< 0.01		0.09	

Tab. 37: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylglycerine nach Geschlechtern getrennt [Leber]

Nach Normierung ist PG 34:1 nur noch in der [Abca3+/-][♂]-Leber erhöht (p < 0.01). PG 36:2 ist nach Normierung in der [Abca3+/-][♀]-Leber erhöht (p < 0.01) und in der [Abca3+/-][♂]-Leber erniedrigt vorhanden (p = 0.02).

		Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
PG 34:1	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.3649 ± 0.051	0.4208 ± 0.038	0.4738 ± 0.271	0.4310 ± 0.044
	p-value	< 0.01		0.51	
PG 34:2	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.1098 ± 0.040	0.1212 ± 0.015	0.0607 ± 0.081	0.0537 ± 0.063
	p-value	0.28		0.79	
PG 36:1	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.0062 ± 0.015	0.0062 ± 0.014	N/A	N/A
	p-value	0.99		N/A	
PG 36:2	Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.1252 ± 0.039	0.0982 ± 0.020	0.0081 ± 0.009	0.0160 ± 0.003
	p-value	0.02		< 0.01	

Tab. 38: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylglycerine nach Geschlechtern getrennt in Bezug auf Cholesterinester [Leber]

4.3.3 Phosphatidylethanolamin

Phosphatidylethanolamin ist vor und nach Normierung in keiner Untersuchung signifikant verändert.

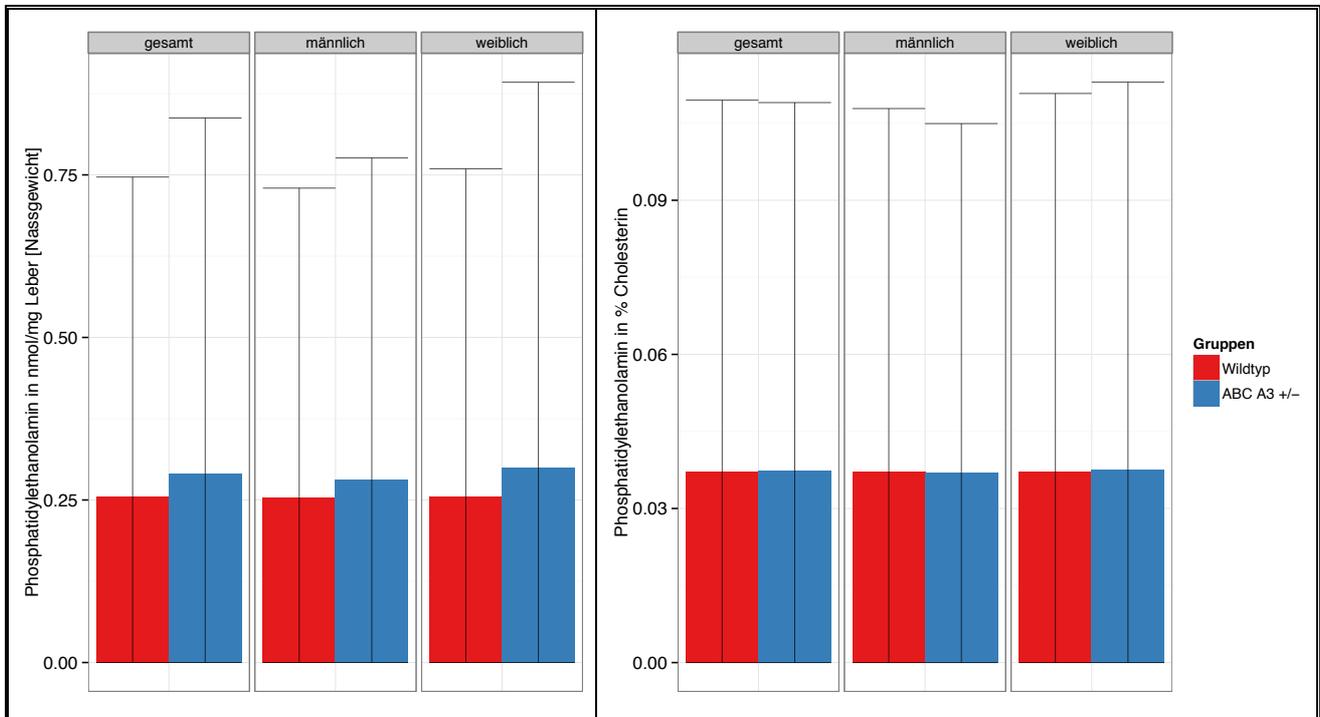


Abb. 36: Vergleich von Phosphatidylethanolamin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

	Wildtyp [gesamt]	Abca3+/- [gesamt]	Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.25 ± 0.49	0.29 ± 0.54	0.25 ± 0.48	0.28 ± 0.49	0.26 ± 0.50	0.30 ± 0.59
p-value	0.18		0.46		0.24	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.07	0.04 ± 0.08
p-value	0.95		0.99		0.92	

Tab. 39: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylethanolamin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

4.3.4 Phosphatidylinositol

Bei Phosphatidylinositol besteht in der absoluten Konzentration und nach Normierung kein signifikanter Unterschied.

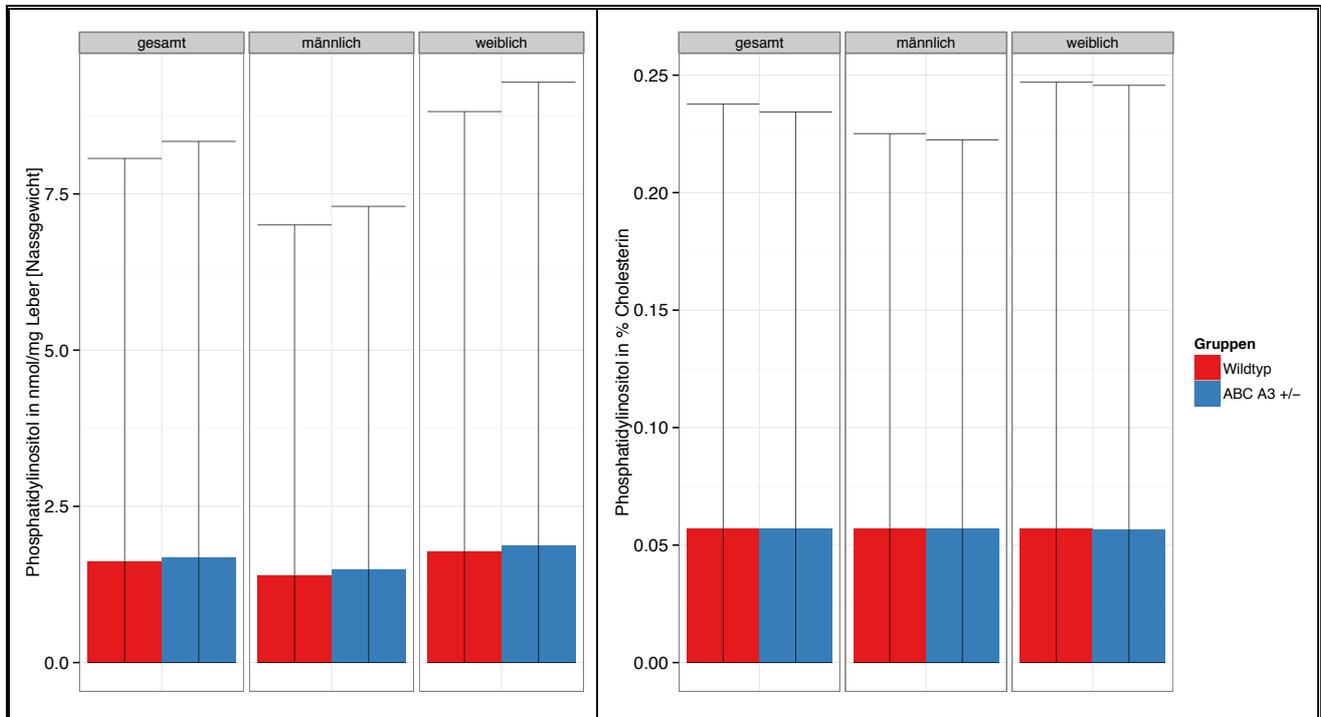


Abb. 37: Vergleich von Phosphatidylinositol, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

	Wildtyp [gesamt]	Abca3+/- [gesamt]	Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	1.61 ± 6.45	1.68 ± 6.66	1.40 ± 5.61	1.49 ± 5.81	1.78 ± 7.04	1.87 ± 7.42
p-value	0.86		0.84		0.88	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.06 ± 0.18	0.06 ± 0.18	0.06 ± 0.17	0.06 ± 0.17	0.06 ± 0.19	0.06 ± 0.19
p-value	0.99		0.99		1.00	

Tab. 40: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylinositol, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

4.3.5 Phosphatidylserin

Phosphatidylserin ist nach Trennung nach Geschlecht in der [Abca3+/-][♂]-Leber in der absoluten Konzentration erniedrigt (p = 0.04).

Diese Signifikanz ist nach Normierung mittels Cholesterinester nicht mehr gegeben.

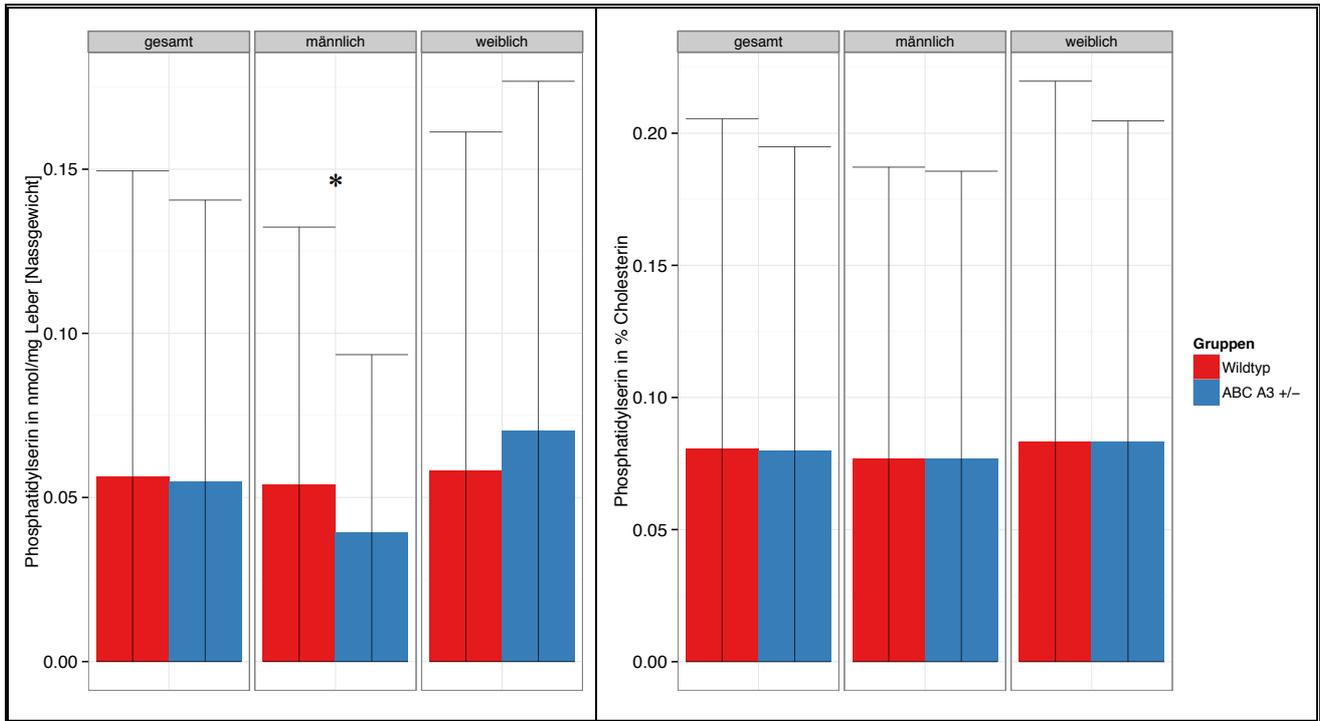


Abb. 38: Vergleich von Phosphatidylserin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

	Wildtyp [gesamt]	Abca3+/- [gesamt]	Wildtyp [♂]	Abca3+/- [♂]	Wildtyp [♀]	Abca3+/- [♀]
Mittelwert ± SD [nmol/mg Leber]	0.05 ± 0.09	0.05 ± 0.08	0.05 ± 0.08	0.04 ± 0.05	0.06 ± 0.10	0.07 ± 0.11
p-value	0.82		0.04		0.25	
Mittelwert ± SD [in % Cholesterin]	0.08 ± 0.12	0.08 ± 0.11	0.08 ± 0.11	0.08 ± 0.11	0.08 ± 0.14	0.08 ± 0.12
p-value	1.00		1.00		1.00	

Tab. 41: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylserin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]

4.3.6 Plasminogen, Sphingomyelin und Ceramid

Bei Plasminogen, Sphingomyelin und Ceramid besteht in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied zwischen den Gewebeproben der Leber.

5 Diskussion

5.1 Cholesterinester

Im Lungengewebe hat die Abca3-Defizienz keinen Einfluss auf die Cholesterinester-Konzentration [Fitzgerald et al. 2007].

Im Milchdrüsengewebe sind bisher ABCA1p und dessen interagierender Partner Apolipoprotein A-1 als ABC-Transporter von Cholesterinester am eingehendsten erforscht [Ontsouka et al. 2013]. Weiterhin sind ABCA7p, ABCG5p und ABCG8p, wie auch ABCG1p als Cholesterintransporter im Milchdrüsengewebe beschrieben worden [Ontsouka and Albrecht 2014]. ABCA1p ist in der Leber durch Bildung von HDL (*high density lipoprotein*) an der Regulation von Cholesterinester beteiligt [Timmins et al. 2005].

Eine Regulation von Cholesterinester im Brustdrüsengewebe oder in der Leber durch ABCA3p ist nicht bekannt.

5.2 Analyse der Milchstudie

5.2.1 Phosphatidylcholin ohne Aufteilung nach Melktag

In der ersten Auswertung der Milch besteht bei PC 32:2 eine grenzwertig signifikante Reduktion in der [Abca3+/-]-Milch ($p = 0.05$).

Die Untergruppen PC 36:0, PC 36:5, PC 38:5, PC 38:6 und PC 40:6 sind in der [Abca3+/-]-Milch erhöht ($p < 0.01$ bis $p = 0.03$).

Die Zunahme der langkettigen Phosphatidylcholone kann einen Kompensationsmechanismus darstellen, da in der Summe letztendlich kein signifikanter Unterschied sichtbar ist.

Jedoch bilden die veränderten Untergruppen nur einen prozentual geringen Anteil an der Gesamtmenge aller Phosphatidylcholine.

PC 30:0	PC 32:0	PC 32:2	PC 34:0	PC 34:1	PC 34:2
9.42 %	18.15 %	0.91 %	5.47 %	8.8 %	13.63 %
PC 36:0	PC 36:2	PC 36:5	PC 38:5	PC 38:6	PC 40:6
0.54 %	20.16 %	0.23 %	1.00 %	0.54 %	0.44 %

Tab. 42: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Phosphatidylcholine [Milch]

5.2.2 Phosphatidylcholin nach Aufteilung der Melktage

Kurzkettige Untergruppen neben PC 32:0 (DPPC) wurden auf die einzelnen Melktage aufgeschlüsselt betrachtet. Es zeigt sich eine Reduktion von PC 30:0 und PC 32:0 in der [Abca3+/-]^{Tag5}-Milch (jeweils $p = 0.02$) und von PC 34:2 in der [Abca3+/-]^{Tag10}-Milch ($p = 0.03$). PC 32:2 ist an keinem Zeitpunkt signifikant verändert.

PC 30:0, PC 32:0 und PC 34:2 sind Subgruppen, die in der Mausmilch zu einem prozentual hohen Anteil vertreten sind (siehe Tab. 42). Am Tag 15 zeigt sich kein Unterschied in der einzelnen Untersuchung.

5.2.2.1 Zeitliche Veränderung der Lipidzusammensetzung

Die Lipidzusammensetzung der Milch verändert sich über die Dauer der Laktation. Bei den MFGs humaner Milch ist eine Zunahme der Phosphatidylcholine in reifer Milch im Verhältnis zu dem Kolostrum und der Übergangsmilch beschrieben [Zou et al. 2012].

In der untersuchten Milch nimmt die Konzentrationen der meisten kurzkettigen Phosphatidylcholine im Verlauf der Laktation ab. Das bedeutet, dass die Mausmilch am Tag 15 physiologisch weniger kurzkettige Phosphatidylcholine enthält.

	PC 30:0	PC 32:0	PC 32:1	PC 32:2	PC 34:0	PC 34:1	PC 34:2
Tag 5	10.64 %	22.24 %	3.77 %	0.86 %	4.39 %	9.64 %	13.72 %
Tag 10	9.30 %	17.96 %	2.42 %	0.89 %	6.35 %	8.84 %	13.47 %
Tag 15	8.90 %	15.14 %	2.15 %	0.97 %	5.92 %	8.23 %	13.53 %

	PC 36:1	PC 36:2	PC 36:3	PC 36:4	PC 38:3	PC 38:4	PC 38:5
Tag 5	2.09 %	16.21 %	4.32 %	3.16 %	1.14 %	3.80 %	0.89 %
Tag 10	2.58 %	20.21 %	4.53 %	3.15 %	1.56 %	4.63 %	0.99 %
Tag 15	2.77 %	23.16 %	4.80 %	3.19 %	1.92 %	4.92 %	1.07 %

Tab. 43: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Phosphatidylcholone in der Maussmilch im Verlauf der Melktage (rot = sinkender prozentualer Anteil; grün = steigender prozentualer Anteil)

Weitere Phosphatidylcholone mit einem prozentualen Anteil < 1 % sind nicht aufgelistet.

In der Massenspektrometrie der Lungen von [Abca3^{-/-}]-Mäusen sind besonders Phosphatidylcholone mit kurzkettigen Acylresten reduziert [Fitzgerald et al. 2007; Ban et al. 2007]. Das deutet darauf hin, dass ABCA3p vor allem am Transport von kurzkettigen Phosphatidylcholonen beteiligt ist.

Die abnehmende Gesamtkonzentration der kurzkettigen Phosphatidylcholone oder eine Herabregulation des ABCA3p im Verlauf der Laktation sind mögliche Erklärungen für die nicht mehr messbare Reduktion von PC 30:0, PC 32:0 und PC 34:2 am Tag 15.

5.2.2.2 Kompensation durch andere ABC-Transporter

Eine weitere Hypothese ist die kompensatorische Hochregulation eines zweiten ABC-Transporters, der zum Teil die Funktion von ABCA3p übernimmt. Dieser Mechanismus tritt auf bei Dysfunktion von anderen ABC-Transportern.

Bei *Abcc2-knock-out* Ratten kommt es im Rahmen der Hyperbilirubinämie zu einer kompensatorischen Hochregulation von *Abcc3* in der Leber [Zamek-Gliszczyński et al. 2013]. Bei der Adrenoleukodystrophie (X-ALD, Addison-Schilder-Syndrom) ist eine Kompensation des defekten ABCD1p durch den strukturell ähnlichen ABCD2p bekannt. ABCD1p ist in Peroxisomen lokalisiert. Im Mausmodell verhindert dies die Akkumulation von überlangen Fettsäuren (VLCFA, *very long chain fatty acid*) und die neurologischen Folgen [Pujol et al. 2004].

In der Aminosäuresequenz wäre ABCA1p dem ABCA3p am ähnlichsten. Bisher ist kein kompensatorischer Mechanismus für ABCA3p beschrieben.

5.2.3 Weitere Phospholipide in der Mausmilch

Phosphatidylethanolamine, -inositole, -serine und Plasminogene wurden ausgewertet und zeigen keine signifikanten Veränderungen. Sphingomyeline und Ceramide weisen ebenfalls keine signifikante Veränderung auf.

Lyso-Phosphatidylcholin wird von Zellen im Rahmen der Apoptose ausgeschüttet um Phagozyten auf sich aufmerksam zu machen. ABCA1p reguliert Lyso-Phosphatidylcholin, so dass eine Verminderung von aktivem ABCA1p eine Reduktion von Lyso-Phosphatidylcholin bewirkt und als Apoptose-Signal dient [Peter et al. 2012]. In unseren Ergebnissen ergibt sich kein Anhalt, dass ABCA3p Lyso-Phosphatidylcholin beeinflusst.

5.3 Analyse des Lebergewebes

5.3.1 Phosphatidylcholin in der Leber

In der Leber sind PC 34:0, PC 36:0 und PC 40:4 im Falle einer heterozygoten Abca3-Defizienz erniedrigt ($p < 0.01$ bis $p = 0.03$). PC 32:1, PC 34:3 und PC 36:5 sind dagegen erhöht nachzuweisen ($p = 0.02$ bis $p = 0.03$).

Nach Trennung nach Geschlecht besteht weiterhin die Reduktion von PC 34:0 und PC 36:0 in der [Abca3+/-]-Leber von männlichen und weiblichen Tieren ($p < 0.01$ bis $p = 0.05$).

In der Betrachtung der prozentualen Verteilung bemessen die betroffenen PCs weniger als 2 % und reduzierten PCs repräsentieren in der Summe sogar weniger als 1 %. Die jeweils mit über 10 % im Lebergewebe nachweisbare Phosphatidylcholone sind nicht signifikant verändert.

PC 32:0	PC 32:1	PC 32:2	PC 34:0	PC 34:1	PC 34:2	PC 34:3
3.15 %	0.95 %	0.11 %	0.39 %	10.61 %	15.65 %	1.10 %
PC 36:0	PC 36:2	PC 36:4	PC 36:5	PC 38:4	PC 38:6	PC 40:4
0.14 %	8.89 %	14.49 %	0.72 %	12.35 %	13.45 %	0.18 %

Tab. 44: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Phosphatidylcholone [Leber]

Bisher ist in der Literatur keine spezielle Funktion von PC 34:0, PC 36:0 oder PC 40:4 in der Leber beschrieben und könnte somit die geringen Konzentrationen erklären.

5.3.2 Phosphatidylcholin in der Leber im Vergleich zur Lunge

Im Vergleich zur Untersuchung des Lungengewebes ist PC 32:0 (DPPC) in der Leber in keiner Untersuchung signifikant verändert.

p-Werte:

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

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

Abb. 39: Untergruppen der Phosphatidylcholone im Lungengewebe [Hammel 2008, Daten der eigenen Arbeitsgruppe]

Hinsichtlich der in der Leber signifikant reduzierten Untergruppen PC 34:0 und PC 36:0, zeigt sich nur bei PC 34:0 in der Lunge der [Abca3+/-]-Tiere eine Reduktion (p = 0.01).

5.3.3 Phosphatidylglycerine in der Leber ohne Trennung nach Geschlecht

Bei Betrachtung der Phosphatidylglycerine aller Tiere ist zunächst nur PG 38:6 in der [Abca3+/-]-Leber tendenziell erniedrigt (p = 0.07)

5.3.4 Phosphatidylglycerine in der Leber nach Trennung nach Geschlecht

Nach Trennung nach Geschlecht besteht eine erhöhte Konzentration von PG 34:1 in der [Abca3+/-][♂]-Leber (p < 0.01). PG 36:2 ist in der [Abca3+/-][♂]-Leber erniedrigt (p = 0.02) und in der [Abca3+/-][♀]-Leber erhöht vorhanden (p < 0.01).

PG 34:1 und PG 36:2 entsprechen als Untergruppen der Phosphatidylglycerine jeweils großen prozentualen Anteilen, wobei PG 34:1 mit 40.81 % sogar die größte Untergruppe darstellt.

PG 34:1	PG 34:2	PG 34:3	PG 36:1	PG 36:2
40.81 %	9.20 %	0.22 %	0.38 %	12.15 %
PG 36:3	PG 36:4	PG 38:4	PG 38:5	PG 38:6
13.21 %	21.46 %	0.92 %	0.72 %	0.92 %

Tab. 45: Vergleich prozentualer Anteile der einzelnen Phosphatidylglycerine [Leber]

5.3.4.1 Cardiolipin

Cardiolipin ist ein Di-Phosphatidylglycerin und ein wichtiger Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran. Dort ist es beteiligt an der oxidativen Phosphorylierung [Mileykovskaya et al. 2005]. Es wurde zum ersten Mal im Gewebe von Rinderherzen nachgewiesen und erhielt daher seinen Namen [Pangborn 1942]. Bei Säugetieren und Pflanzen beinhalten die Phosphatidylglycerine des Cardiolipins ausschließlich Fettsäuren mit jeweils 18 Kohlenstoff-Atomen [Schlame et al. 1993; Mileykovskaya et al. 2005]. Hepatozyten sind aufgrund ihrer vielfältigen metabolischen Funktionen reich an Mitochondrien [Blouin et al. 1977].

Eine heterozygote *Abca3*-Defizienz beeinflusst die Konzentration von PG 36:2, so dass dadurch auch eine Auswirkung auf die Cardiolipin-Konzentration in der Leber möglich ist.

5.3.4.2 Geschlechtsspezifischer Dimorphismus

PG 36:2 ist in der [*Abca3*+/-]-Leber beider Geschlechter signifikant verändert vorhanden, aber die Konzentration ist je nach Geschlecht erhöht oder erniedrigt.

Eine unterschiedliche Expression bei ABC-Transportern in der Leber ist bei ABCG2p (= BRCP, *breast cancer resistance protein*) bekannt. Die erhöhte Expression von *Abcg2* in der Leber von männlichen Mäusen führt zu einer vermehrten hepatobiliären

Sekretion von Chemotherapeutika und anderen Medikamenten [Merino et al. 2005]. Ebenfalls ist eine geschlechtsspezifische, unterschiedliche Expressionsrate von Abcb1 (= Mdr1) in mehreren Organen der Maus beschrieben [Cui et al. 2009].

Es wäre möglich, dass auch bei ABCA3/Abca3 ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus vorliegt. Allerdings ergab eine Analyse von Yang et al. keinen Hinweis auf eine geschlechtsspezifische, unterschiedliche Expressionsrate von Abca3 im Lebergewebe [Yang et al. 2012].

5.4 Weitere Phospholipide in der Leber

Eine heterozygote Abca3-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Konzentration von Phosphatidylethanolamin, -inositol, -serin oder Plasminogen.

Ebenfalls besteht bei Sphingomyelin und Ceramid keine signifikante Veränderung in der [Abca3+/-]-Leber.

6 Schlussfolgerung

6.1 Schlussfolgerung und Ausblick der Milchstudie

Die heterozygote Abca3-Defizienz der Maus bewirkt eine veränderte Konzentration von Phosphatidylcholin-Untergruppen in der murinen Milch. Dies könnte ein Hinweis sein, dass ABCA3p auch im Milchdrüsengewebe am Phospholipidtransport beteiligt ist. Allerdings wird dies erst deutlich, wenn man die Milch anhand der Melktage getrennt betrachtet. Die signifikante Veränderung einzelner Phosphatidylcholone ist nur an den ersten zwei Melkzeitpunkten zu messen und am Tag 15 nicht mehr vorhanden.

Zwei mögliche Erklärungen sind hierfür denkbar. Zum einen kann es bei abnehmender Konzentration der kurzkettigen Phosphatidylcholone in der späteren Milch zu einer physiologischen Herabregulation von ABCA3p kommen. Zum anderen kann zum Ausgleich des Funktionsmangels ein kompensatorischer ABC-Transporter zum Tag 15 hochreguliert werden.

Um die Veränderung der Phospholipidzusammensetzung über die Zeit feststellen zu können, wäre eine tägliche Milchprobengewinnung von Vorteil. Hinsichtlich eines Kompensationsmechanismus ist der Transporter ABCA1p am wahrscheinlichsten, so

dass hier eine vergleichende, quantitative Messung der Abca1-RNA im Milchdrüsengewebe von Interesse wäre.

Da es sich um heterozygot Abca3-defiziente Tiere handelt, ist von einer verbliebenen Aktivität von ABCA3p von etwa 50 % auszugehen. Um diese Aktivität weiter zu minimieren, ist ein konditioneller *knock-out* von Abca3 im Milchdrüsengewebe sinnvoll.

Ebenfalls ist durch eine Verbesserung der Saugvorrichtung ein direktes Sammeln der Milch im Eppendorfer-Gefäß geplant. Das Tier muss dann nicht wiederholt abgesetzt werden und der Melkprozess wird beschleunigt.

6.2 Schlussfolgerung und Ausblick der Analyse der Leber

Eine heterozygote Abca3-Defizienz beeinflusst ebenfalls die Phospholipid-Konzentration im Lebergewebe.

Bei Phosphatidylcholin sind allerdings nur Untergruppen, die einen kleinen prozentualen Anteil ausmachen, signifikant verändert. Daher ist in diesem Falle eine pathophysiologische Auswirkung fraglich.

Auch Phosphatidylglycerin wird in der Leber von der heterozygoten Abca3-Defizienz beeinflusst. Hier bilden die beiden signifikant veränderten Untergruppen in der Summe über 50 % der Phosphatidylglycerin-Gesamtkonzentration. Eines dieser Phosphatidylglycerine ist PG 36:2, ein Bestandteil von Cardiolipin und für die mitochondriale Energiegewinnung von Bedeutung. Da es je nach Geschlecht zu einer Zu- oder Abnahme von PG 36:2 kommt, wäre ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus bei der Expression von Abca3 in der Leber möglich. Dies ist ein interessanter Punkt, da bereits bei anderen ABC-Transportern geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben sind.

Cardiolipine sind Diphosphatidylglycerine und enthalten jeweils vier Fettsäureester. Denkbar ist eine Bestimmung der einzelnen Fettsäuren zur detaillierteren Aufschlüsselung. Ebenfalls ist eine quantitative Bestimmung der Cardiolipin-Konzentration je nach Genotyp und Geschlecht sinnvoll, um der Frage nach einem geschlechtsspezifischen Dimorphismus weiter nachzugehen. Eine Analyse der

Zusammensetzung der Phospholipide in der Gallenflüssigkeit, wie bei der Milch, ist ebenfalls ein nächster Schritt.

Auch bei der Untersuchung der Leber handelt es sich um heterozygot Abca3-defiziente Mäuse mit etwa 50 % erhaltener Aktivität von ABCA3p und ein konditioneller *knock-out* im Lebergewebe könnte auch hier zu weiteren Erkenntnissen führen.

Organentnahme

Ernahmsdatum	Ziffer	Kfz (kennalt)	Anzahl	Geschlecht	Geb Datum	Ganzkörper	Blut	Serum (l)	Herz	Lunge	Ösophagus	Niere	Nebenniere	Leber	Galle (*)	Milz	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Muskel	Großhirn	Kleinhirn	Augen	Tailclip
17.11.09	1	U203	1	m	17.05.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
05.01.09	3	U2A5	1	m	22.04.07	C57Bl/6	1k	+++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	4	U2A5	1	m	22.04.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	5	U2A6	1	w	20.05.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	6	U2A6	1	w	20.05.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	7	U2A5	1	w	20.09.07	C57Bl/6	1k	+++	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	8	U2A3	2	m	22.04.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	10	U2A3	1	m	10.05.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	11	U2A3	1	m	08.09.2007	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	12	U2A3	1	m	22.04.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	13	U2A4	1	w	03.09.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	14	U2A4	1	w	03.09.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	15	U2A4	1	w	03.09.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	16	U2A1	1	w	02.04.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
13.01.09	17	U2E3	1	m	22.04.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	18	U2E4	1	m	20.05.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	19	U2E1	1	m	20.05.07	C57Bl/6	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	20	U2E1	1	m	20.05.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	21	U2E5	1	m	20.05.07	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	22	U2E2	1	w	20.05.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	23	U2E2	1	w	20.05.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	24	U2E2	1	w	20.05.07	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	25	U2E3	1	m	03.09.2007	C57Bl/6	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	26	U2A2	1	w	28.04.2007	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	27	U2A2	1	w	28.04.2007	C57Bl/6	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	28	U2A2	1	w	28.04.2007	C57Bl/6	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	29	U2C1	1	w	16.05.2007	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	30	U2C1	1	w	16.05.2007	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	31	U2C1	1	w	16.05.2007	C57Bl/6	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
13.05.09	32	U2A1	1	m	22.04.07	C57Bl/6	1k	+++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	33	U2E1	1	w	22.04.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	34	U2E1	1	w	22.04.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	35	U2E2	1	m	22.04.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	36	U2E2	1	m	22.04.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	37	U2D4	1	w	11.03.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	38	U2D4	1	w	11.03.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	39	U2D4	1	w	11.03.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	40	U2E2	1	w	17.05.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	41	U2E1	1	m	17.05.07	Area 3-H	1k	+++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	42	U2E5	1	w	19.08.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	43	U2E6	1	w	09.03.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	44	U2E4	1	w	05.04.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
19.05.09	45	U2A6	1	m	17.05.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	46	U2A6	1	m	17.05.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	47	U2A6	1	m	17.05.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	48	U2A6	1	w	08.03.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	49	U2C4	1	m	24.08.07	Area 3-H	1k	++	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	50	U2C4	1	m	24.08.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	51	U2C4	1	m	24.08.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	0	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	52	U2C4	1	m	24.08.07	Area 3-H	1k	+++	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	53	U2A6	1	m	17.05.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
27.05.09	54	U2E3	1	m	08.03.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	55	U2E3	1	m	08.03.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	56	U2E3	1	w	25.08.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	57	U2C5	1	w	24.08.07	Area 3-H	1k	0	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	58	U2C5	1	w	24.08.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	59	U2C5	1	m	19.08.07	Area 3-H	1k	+	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	60	U2C8	1	m	19.08.07	Area 3-H	1k	+++	2x	2x	2x	2x		2x	+++	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1k
	61	U2C8	1	m	19.08.07	Area 3-H	1k																	

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Abca3	Gen beim Tier / bei der Maus
ABCA3	Gen beim Menschen
ABCA3p	Genprodukt, Transporterprotein
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BRCP	<i>breast cancer resistance protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cer	Ceramid
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Chol / CE	Cholesterinester
DNA / DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EMMA	European Mouse Mutant Archive
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Gramm
GMC	German Mouse Clinic
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HEPA-Filter	<i>high efficiency particulate air</i> -Filter
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
IE	internationale Einheiten
IVC	<i>individual ventilated cages</i>
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
MDR1	<i>multidrug resistance proteine 1</i>

MEC	<i>mammary epithelial cell</i>
MFG(M)	<i>milk fat globules (membrane)</i>
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBF	<i>nucleotide binding fold</i>
OHB	optimierter Hygiene-Bereich
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PFIC	progressiven familiären intrahepatischen Cholestase
PG	Phosphatidylglycerin
Pgp1	P-glycoprotein 1
PI	Phosphatidylinositol
Plasm	Plasminogen
PS	Phosphatidylserin
(I)RDS	<i>(infant) respiratory distress syndrome</i>
SP	<i>surfactant protein</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SPM	Sphingomyelin
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TMD	Transmembran-Domäne
VLCFA	<i>very long chain fatty acid</i>
WT	Wildtyp
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines ABC-Transporters der Klasse A.....	10
Abb. 2: Schematische Darstellung der fünf Motive des ABC-Transporters.....	11
Abb. 3: Elektronenmikroskopische Analyse von Lamellarkörperchen in Pneumozyten Typ II des Menschen	19
Abb. 4: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von Pneumozyten Typ II der Maus	20
Abb. 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Lungengewebe vom Wildtyp und Abca3 ^{-/-} . 21	
Abb. 6: Aminosäuresequenz des 310-bp-Abca3 Nukleotidtranskripts von Ratte und Maus im Vergleich zum Menschen.....	21
Abb. 7: Expression von Abca3-RNA in Pneumozyten Typ II und weiteren Organen der Ratte	22
Abb. 8: Schematische Darstellung einer apokrinen Brustdrüsenepithelzelle.....	23
Abb. 9: Nachweis von ABCA3p in der Membran der MFG (Mausmilch) durch Immunfluoreszenzfärbung.....	24
Abb. 10: Schematische Darstellung der wichtigsten Transporter in Hepatozyten.....	27
Abb. 11: Kryokonservierung im European Mouse Mutant Archive (EMMA).....	29
Abb. 12: Schematische Darstellung der Platzierung der Ohrlochstanze.....	31
Abb. 13: Ergebnis der PCR	34
Abb. 14: Materialien für die Milchgewinnung.....	37
Abb. 15: Ablauf der Milchgewinnung.....	39
Abb. 16: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Milch]	46
Abb. 17: Vergleich von Cholesterinester [Milch]	47
Abb. 18: Vergleich der Phospholipide [Milch]	48
Abb. 19: Vergleich von Phosphatidylcholin [Milch]	49
Abb. 20: Vergleich der absoluten Konzentration der Phosphatidylcholine [Milch].....	50
Abb. 21: Vergleich der Phosphatidylcholine in Bezug auf Cholesterinester [Milch]....	52
Abb. 22: Vergleich einzelner, kurzkettiger Phosphatidylcholine [Milch].....	53
Abb. 23: Vergleich von Phosphatidylethanolamin [Milch].....	55
Abb. 24: Vergleich von Phosphatidylinositol [Milch]	56

Abb. 25: Vergleich von Phosphatidylserin [Milch].....	57
Abb. 26: Vergleich von Plasminogen [Milch].....	58
Abb. 27: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Leber]	59
Abb. 28: Vergleich von Cholesterinester, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	60
Abb. 29: Vergleich der Phospholipide in allen Tieren [Leber]	61
Abb. 30: Vergleich von Phosphatidylcholin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	62
Abb. 31: Vergleich der einzelnen Phosphatidylcholone in allen Tieren [Leber]	63
Abb. 32: Vergleich einzelner Phosphatidylcholone, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	65
Abb. 33: Vergleich von Phosphatidylglycerin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	67
Abb. 34: Vergleich einzelner Phosphatidylglycerine in allen Tieren [Leber].....	68
Abb. 35: Vergleich der Konzentrationen einzelner Phosphatidylglycerine, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber].....	69
Abb. 36: Vergleich von Phosphatidylethanolamin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	71
Abb. 37: Vergleich von Phosphatidylinositol, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	72
Abb. 38: Vergleich von Phosphatidylserin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	73
Abb. 39: Untergruppen der Phosphatidylcholone im Lungengewebe.....	78

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Untergruppen der humanen ABC-Transporter.....	9
Tab. 2: Humane ABC-Transporter und assoziierte Erkrankungen.....	13
Tab. 3: Einteilung der Phospholipide	16
Tab. 4: Klassifikation der IRDS nach Bomsel	17
Tab. 5: ABC-Transporter in der Leber	25
Tab. 6: Gensequenz der Primer	32
Tab. 7: Bandenlänge der Produkte nach Durchführung der PCR.....	32
Tab. 8: Reaktionslösung	33
Tab. 9: PCR-Programm	33
Tab. 10: Aufbau der Milchstudie.....	36
Tab. 11: Materialien für die Milchgewinnung.....	37
Tab. 12: Übersicht der vorhandenen Gallenflüssigkeit- und Leberproben	41
Tab. 13: Aufbau der Leberstudie mit Genotyp, Geburtsdatum und Proben.....	44
Tab. 14: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Milch].....	46
Tab. 15: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Cholesterinester [Milch]	47
Tab. 16: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phospholipide [Milch]	49
Tab. 17: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylcholin [Milch]	50
Tab. 18: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phosphatidylcholone [Milch]	51
Tab. 19: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phosphatidylcholone in Bezug auf Cholesterinester [Milch].....	52
Tab. 20: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner, kurzkettiger Phosphatidylcholone [Milch]	54
Tab. 21: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner, kurzkettiger Phosphatidylcholone in Bezug auf Cholesterinester [Milch].....	54
Tab. 22: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylethanolamin [Milch].....	55

Tab. 23: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylinositol [Milch]	56
Tab. 24: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylserin [Milch]	57
Tab. 25: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Plasminogen [Milch].....	58
Tab. 26: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipide [Leber]	59
Tab. 27: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Cholesterinester, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber].....	60
Tab. 28: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der Phospholipide in allen Tieren [Leber].....	62
Tab. 29: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylcholin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber].....	63
Tab. 30: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylcholone in allen Tieren [Leber]	64
Tab. 31: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylcholone in allen Tieren in Bezug auf Cholesterinester [Leber].....	64
Tab. 32: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylcholone nach Geschlechtern getrennt [Leber].....	66
Tab. 33: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylcholone nach Geschlechtern getrennt und in Bezug auf Cholesterinester [Leber]	66
Tab. 34: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylglycerin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	67
Tab. 35: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylglycerine in allen Tieren [Leber]	68
Tab. 36: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value der einzelnen Phosphatidylglycerine in allen Tieren in Bezug auf Cholesterinester [Leber].....	69
Tab. 37: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylglycerine nach Geschlechtern getrennt [Leber].....	70
Tab. 38: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value einzelner Phosphatidylglycerine nach Geschlechtern getrennt in Bezug auf Cholesterinester [Leber]	70
Tab. 39: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylethanolamin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	71

Tab. 40: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylinositol, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber]	72
Tab. 41: Mittelwerte, Standardabweichung und p-value von Phosphatidylserin, gesamt und nach Geschlechtern getrennt [Leber].....	73
Tab. 42: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Phosphatidylcholine [Milch].....	75
Tab. 43: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Phosphatidylcholine in der Mausemilch im Verlauf der Melktage.....	76
Tab. 44: Vergleich prozentualer Anteile einzelner Phosphatidylcholine [Leber]	77
Tab. 45: Vergleich prozentualer Anteile der einzelnen Phosphatidylglycerine [Leber]	79
Tab. 46: Organentnahme	83

Literaturverzeichnis

- AGASSANDIAN, M., MATHUR, S.N., ZHOU, J., FIELD, F.J., AND MALLAMPALLI, R.K. 2004. Oxysterols trigger ABCA1-mediated basolateral surfactant efflux. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 31, 2, 227–33.
- AKIYAMA, M., SUGIYAMA-NAKAGIRI, Y., SAKAI, K., ET AL. 2005. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. *The Journal of clinical investigation* 115, 7, 1777–84.
- ALLEBRANDT, K.V., AMIN, N., MÜLLER-MYHSOK, B., ET AL. 2013. A K(ATP) channel gene effect on sleep duration: from genome-wide association studies to function in *Drosophila*. *Molecular psychiatry* 18, 1, 122–32.
- ALLIKMETS, R., SINGH, N., SUN, H., ET AL. 1997. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nature genetics* 15, 3, 236–46.
- AMIGO, L., MENDOZA, H., ZANLUNGO, S., ET AL. 1999. Enrichment of canalicular membrane with cholesterol and sphingomyelin prevents bile salt-induced hepatic damage. *Journal of lipid research* 40, 3, 533–42.
- ANNILO, T., CHEN, Z.-Q., SHULENIN, S., AND DEAN, M. 2003. Evolutionary analysis of a cluster of ATP-binding cassette (ABC) genes. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society* 14, 1, 7–20.
- AVERY, M.E. AND MEAD, J. 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *A.M.A. journal of diseases of children* 97, 5, Part 1, 517–23.
- BAHADUE, F.L. AND SOLL, R. 2012. Early versus delayed selective surfactant treatment for neonatal respiratory distress syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews* 11, CD001456.
- BALLARD, P.L. AND BALLARD, R.A. 1995. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *American journal of obstetrics and gynecology* 173, 1, 254–62.
- BAN, N., MATSUMURA, Y., SAKAI, H., ET AL. 2007. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 282, 13,

- 9628–34.
- BERGE, K.E., TIAN, H., GRAF, G.A., ET AL. 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 5497, 1771–1775.
- BESNARD, V., MATSUZAKI, Y., CLARK, J., ET AL. 2010. Conditional deletion of Abca3 in alveolar type II cells alters surfactant homeostasis in newborn and adult mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 298, 5, L646-59.
- BLOUIN, A., BOLENDER, R.P., AND WEIBEL, E.R. 1977. Distribution of Organelles and Membranes Between Hepatocytes and Non-hepatocytes in the Rat Liver Parenchyma. *The Journal of cell biology* 72, 441–455.
- BOMSEL, F. 1970. Radiologic study of hyaline membrane disease: 110 cases. *Journal de radiologie, d'électrologie, et de médecine nucléaire* 51, 5, 259–68.
- BOYER, J.L. 2013. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology* 3, 3, 1035–78.
- BULLARD, J.E., WERT, S.E., WHITSETT, J.A., DEAN, M., AND NOGEE, L.M. 2005. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172, 8, 1026–31.
- CHEONG, N., ZHANG, H., MADESH, M., ET AL. 2007. ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. *The Journal of biological chemistry* 282, 33, 23811–7.
- COELHO, D., KIM, J.C., MIOUSSE, I.R., ET AL. 2012. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics* 44, 10, 1152–1155.
- CONNORS, T.D., VAN RAAJ, T.J., PETRY, L.R., KLINGER, K.W., LANDES, G.M., AND BURN, T.C. 1997. The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3. *Genomics* 39, 2, 231–4.
- CRAWFORD, A.R., SMITH, A.J., HATCH, V.C., OUDE ELFERINK, R.P.J., BORST, P., AND CRAWFORD, J.M. 1997. Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *The Journal of clinical investigation* 100, 10, 2562–7.
- CREUWELS, L.A., VAN GOLDE, L.M., AND HAAGSMAN, H.P. 1997. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175, 1, 1–39.
- CROUCH, E. AND WRIGHT, J.R. 2001. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annual review of physiology* 63, 521–54.

- CROWLEY, P., CHALMERS, I., AND KEIRSE, M.J. 1990. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *British journal of obstetrics and gynaecology* 97, 1, 11–25.
- CUI, Y.J., CHENG, X., WEAVER, Y.M., AND KLAASSEN, C.D. 2009. and Chemical Induction of Multidrug Resistance Transporter Genes (Mdr1a , Mdr1b , Mdr2) in Mice ABSTRACT : *Pharmacology* 37, 1, 203–210.
- DAVIDSON, A.L., DASSA, E., ORELLE, C., AND CHEN, J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 72, 2, 317–64, table of contents.
- DEAN, M. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of lipid research* 42, 7, 1007–17.
- DEAN, M. AND ANNILO, T. 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics* 6, 123–42.
- EDWARDS, V., CUTZ, E., VIERO, S., MOORE, A.M., AND NOGEE, L.M. 2005. Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency. *Ultrastructural pathology* 29, 6, 503–9.
- FEDRICK, J. AND BUTLER, N.R. 1972. Hyaline-membrane disease. *The Lancet* 300, 7780, 768–769.
- FERDINANDUSSE, S., JIMENEZ-SANCHEZ, G., KOSTER, J., ET AL. 2015. A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Human Molecular Genetics* 24, 2, 361–370.
- FITZGERALD, M.L., XAVIER, R., HALEY, K.J., ET AL. 2007. ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. *Journal of lipid research* 48, 3, 621–32.
- FONG, B.Y., NORRIS, C.S., AND MACGIBBON, A.K.H. 2007. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal* 17, 4, 275–288.
- FUJIWARA, T., CHIDA, S., WATABE, Y., MAETA, H., MORITA, T., AND ABE, T. 1980. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *The Lancet* 315, 8159, 55–59.
- GARMANY, T.H., MOXLEY, M.A., WHITE, F.V, ET AL. 2006. Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatric research* 59, 6, 801–5.

- GERTEN, K.A., COONROD, D.V, BAY, R.C., AND CHAMBLISS, L.R. 2005. Cesarean delivery and respiratory distress syndrome: does labor make a difference? *American journal of obstetrics and gynecology* 193, 3 Pt 2, 1061–4.
- GOERKE, J. 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et biophysica acta* 1408, 2–3, 79–89.
- GÖRS, S., KUCIA, M., LANGHAMMER, M., JUNGHANS, P., AND METGES, C.C. 2009. Technical note: Milk composition in mice - methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. *Journal of dairy science* 92, 2, 632–7.
- GOTTESMAN, M.M. 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* 53, 615–27.
- GOWER, W.A., WERT, S.E., GINSBERG, J.S., GOLAN, A., WHITSETT, J.A., AND NOGEE, L.M. 2010. Fatal familial lung disease caused by ABCA3 deficiency without identified ABCA3 mutations. *The Journal of pediatrics* 157, 1, 62–8.
- GRAF, G.A., LI, W.P., GERARD, R.D., ET AL. 2002. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *Journal of Clinical Investigation* 110, 5, 659–669.
- GUILLEN, J. 2012. FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 51, 3, 311–21.
- HALLIDAY, H.L. 2008. Surfactants: past, present and future. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 28 Suppl 1, S47-56.
- HAMMEL, M., JIN, L., MITTAL, R., ET AL. 2011. ABCA3, ein Transporter pulmonaler Surfactantphospholipide, wird auch in Leberzellen exprimiert und bestimmt die Phospholipidzusammensetzung der Galle. 37. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin [Posterbeitrag]. <http://reg.mcon-mannheim.de/onlineprogramm-mmv/render.aspx?kongressID=14&t=a&n=18960&speach=GER>.
- HAMMEL, M., MICHEL, G., HOEFER, C., ET AL. 2007. Targeted inactivation of the murine *Abca3* gene leads to respiratory failure in newborns with defective lamellar bodies. *Biochemical and biophysical research communications* 359, 4, 947–51.
- HARTL, D. AND GRIESE, M. 2005. Interstitial lung disease in children - genetic background and associated phenotypes. *Respiratory research* 6, 32.
- HAY, D.W. AND CAREY, M.C. 1990. Chemical species of lipids in bile. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 12, 3 Pt 2, 6S–14S; discussion 14S–16S.

- HAYES, D., LLOYD, E.A., FITCH, J.A., BUSH, A., AND HOSPITAL, R.B. 2012. ABCA3 Transporter Deficiency Erratum : Primary Isoniazid Resistance in Mycobacterium bovis Disease Erratum : A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients. *186*, 1, 2011–2012.
- HEID, H.W. AND KEENAN, T.W. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European journal of cell biology* 84, 2–3, 245–58.
- HEID, H.W., SCHNÖLZER, M., AND KEENAN, T.W. 1996. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *The Biochemical journal* 320 (Pt 3, 1025–1030.
- HIGGINS, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* 8, 67–113.
- HIGGINS, C.F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Research in Microbiology* 152, 3–4, 205–210.
- HIGGINS, C.F. AND LINTON, K.J. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* 11, 10, 918–26.
- HOFMANN, A.F. AND HAGEY, L.R. 2008. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 16, 2461–83.
- HOLLAND, I.B. AND BLIGHT, M.A. 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of molecular biology* 293, 2, 381–99.
- HOPFNER, K.-P. AND TAINER, J.A. 2003. Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Current Opinion in Structural Biology* 13, 2, 249–255.
- HOPFNER, K.P., EICHINGER, A., ENGH, R.A., ET AL. 1999. Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7, 3600–5.
- HYDE, S.C., EMSLEY, P., AND HIGGINS, C.F. 1990. Structural Model of ATP-Binding Proteins associated with Cystic Fibrosis, Multidrug Resistance and Bacterial Transport. *Nature Publishing GroupGroup*.
- ISHIBASHI, H., NAKAMURA, M., KOMORI, A., MIGITA, K., AND SHIMODA, S. 2009. Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in immunopathology* 31, 3, 399–

409.

- JANSEN, P.L. AND MÜLLER, M. 2000. The molecular genetics of familial intrahepatic cholestasis. *Gut* 47, 1, 1–5.
- JONES, P.M. AND GEORGE, A.M. 2002. Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 20, 12639–44.
- JONES, P.M. AND GEORGE, A.M. 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 6, 682–99.
- JONES, P.M., O'MARA, M.L., AND GEORGE, A.M. 2009. ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in biochemical sciences* 34, 10, 520–31.
- KLEIN, I., SARKADI, B., AND VÁRADI, A. 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1461, 2, 237–62.
- KLUGBAUER, N. AND HOFMANN, F. 1996. Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS letters* 391, 1–2, 61–5.
- KNISELY, A.S., STRAUTNIEKS, S.S., MEIER, Y., ET AL. 2006. Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44, 2, 478–86.
- KOBAYASHI, A., TAKANEZAWA, Y., HIRATA, T., ET AL. 2006. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *Journal of lipid research* 47, 8, 1791–802.
- LIGGINS, G.C. AND HOWIE, R.N. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50, 4, 515–525.
- LINTON, K.J. 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda, Md.)* 22, 27, 122–30.
- LOO, T.W. AND CLARKE, D.M. 2001. Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *The Journal of biological chemistry* 276, 18, 14972–9.
- MANI, O., KÖRNER, M., ONTSOUKA, C.E., ET AL. 2011. Identification of ABCA1 and

- ABCG1 in milk fat globules and mammary cells--implications for milk cholesterol secretion. *Journal of dairy science* 94, 3, 1265–76.
- MANI, O., KÖRNER, M., SORENSEN, M.T., ET AL. 2010. Expression, localization, and functional model of cholesterol transporters in lactating and nonlactating mammary tissues of murine, bovine, and human origin. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 299, 2, R642-54.
- MATSUMURA, Y., BAN, N., UEDA, K., AND INAGAKI, N. 2006. Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency. *The Journal of biological chemistry* 281, 45, 34503–14.
- MCDANIEL, M.A., MAIER, S.F., AND EINSTEIN, G.O. 2003. “Brain-specific” nutrients: a memory cure? *Nutrition* 19, 11–12, 957–975.
- MERINO, G., HERWAARDEN, A.E., AND WAGENAAR, E. 2005. Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Molecular* 67, 5, 1765–1771.
- MIETTINEN, T.A. 1980. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *European journal of clinical investigation* 10, 1, 27–35.
- MILEYKOVSKAYA, E., ZHANG, M., AND DOWHAN, W. 2005. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry (Moscow)* 70, 2, 154–158.
- MOLINA, D.K. AND DIMAIO, V.J.M. 2012. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *The American journal of forensic medicine and pathology* 33, 4, 368–72.
- MOSCHETTA, A., VANBERGE-HENEGOUWEN, G.P., PORTINCASA, P., PALASCIANO, G., GROEN, A.K., AND VAN ERPECUM, K.J. 2000. Sphingomyelin exhibits greatly enhanced protection compared with egg yolk phosphatidylcholine against detergent bile salts. *Journal of lipid research* 41, 6, 916–24.
- MOSES, D., HOLM, B.A., SPITALE, P., LIU, M., AND ENHORNING, G. 1991. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 164, 2, 477–481.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., AND ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263–273.

- MULUGETA, S., GRAY, J.M., NOTARFRANCESCO, K.L., ET AL. 2002. Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. *The Journal of biological chemistry* 277, 25, 22147–55.
- NAGATA, K., YAMAMOTO, A., BAN, N., ET AL. 2004. 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. *Biochemical and biophysical research communications* 324, 1, 262–8.
- NEVENS, F. AND LALEMAN, W. 2012. Artificial liver support devices as treatment option for liver failure. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 26, 1, 17–26.
- NISHIDA, T., GATMAITAN, Z., CHE, M., AND ARIAS, I.M. 1991. Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 15, 6590–4.
- NISHIMORI, K., YOUNG, L.J., GUO, Q., WANG, Z., INSEL, T.R., AND MATZUK, M.M. 1996. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 21, 11699–704.
- NOGEE, L.M., DEMELLO, D.E., DEHNER, L.P., AND COLTEN, H.R. 1993. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine* 328, 6, 406–410.
- ONTSOUKA, E.C. AND ALBRECHT, C. 2014. Cholesterol transport and regulation in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 19, 1, 43–58.
- ONTSOUKA, E.C., HUANG, X., STIEGER, B., AND ALBRECHT, C. 2013. Characteristics and functional relevance of apolipoprotein-A1 and cholesterol binding in mammary gland tissues and epithelial cells. *PloS one* 8, 7, e70407.
- ORAM, J.F. AND LAWN, R.M. 2001. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid Res.* 42, 8, 1173–1179.
- OUDE ELFERINK, R.P.J. AND PAULUSMA, C.C. 2007. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 453, 5, 601–10.
- PANGBORN, M.C. 1942. Isolation and Purification of a Serologically active Phospholipid from Beef Heart. *Journal of Biological Chemistry* 143, 1, 247–256.

- PARK, S.-K., AMOS, L., RAO, A., ET AL. 2010. Identification and characterization of a novel ABCA3 mutation. *Physiological genomics* 40, 2, 94–9.
- PARODI, P.W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *The Journal of nutrition* 127, 6, 1055–1060.
- PETER, C., WAIBEL, M., KEPPELER, H., ET AL. 2012. Release of lysophospholipid 'find-me' signals during apoptosis requires the ATP-binding cassette transporter A1. .
- PIEHLER, A.P., OZCÜRÜMEZ, M., AND KAMINSKI, W.E. 2012. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Frontiers in psychiatry* 3, March, 17.
- PUJOL, A., FERRER, I., CAMPS, C., ET AL. 2004. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Human molecular genetics* 13, 23, 2997–3006.
- RESHETNYAK, V.I. 2013. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World journal of gastroenterology : WJG* 19, 42, 7341–60.
- ROBERTSON, J.D. 1960. The molecular structure and contact relationships of cell membranes. *Progress in biophysics and molecular biology* 10, 343–418.
- ROERIG, P., MAYERHOFER, P., HOLZINGER, A., AND GÄRTNER, J. 2001. Characterization and functional analysis of the nucleotide binding fold in human peroxisomal ATP binding cassette transporters. *FEBS letters* 492, 1–2, 66–72.
- RUSSELL, T.D., PALMER, C.A., ORLICKY, D.J., ET AL. 2007. Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. *Journal of lipid research* 48, 7, 1463–75.
- SALEN, G., SHEFER, S., NGUYEN, L., NESS, G.C., TINT, G.S., AND SHORE, V. 1992. Sitosterolemia. *Journal of lipid research* 33, 7, 945–55.
- SAURIN, W., HOFNUNG, M., AND DASSA, E. 1999. Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Journal of Molecular Evolution* 48, 1, 22–41.
- SCHIMANSKI, S., WILD, P.J., TREECK, O., ET AL. 2010. Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue. *Hormone and metabolic research* 42, 2, 102–9.
- SCHINKEL, A.H., MAYER, U., WAGENAAR, E., ET AL. 1997. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

- 94, 8, 4028–33.
- SCHLAME, M., BRODY, S., AND HOSTETLER, K.Y. 1993. Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *European Journal of Biochemistry* 212, 3, 727–733.
- SCHMITZ, G. AND MÜLLER, G. 1991. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of lipid research* 32, 10, 1539–70.
- SCHOLEY, A.B., CAMFIELD, D.A., HUGHES, M.E., ET AL. 2013. A randomized controlled trial investigating the neurocognitive effects of Lacprodan® PL-20, a phospholipid-rich milk protein concentrate, in elderly participants with age-associated memory impairment: the Phospholipid Intervention for Cognitive Ageing Rev. *Trials* 14, 404.
- SHEPPARD, D.N. AND WELSH, M.J. 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews* 79, 1 Suppl, S23-45.
- SHULENIN, S., NOGEE, L.M., ANNILO, T., WERT, S.E., WHITSETT, J.A., AND DEAN, M. 2004. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *The New England journal of medicine* 350, 13, 1296–303.
- SLAMA, M., ANDRÉ, C., HUON, C., ANTOUN, H., AND ADAMSBAUM, C. 1999. Radiological analysis of hyaline membrane disease after exogenous surfactant treatment. *Pediatric radiology* 29, 1, 56–60.
- SMIT, J.J., SCHINKEL, A.H., MOL, C.A., ET AL. 1994. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71, 5, 638–49.
- STAHLMAN, M.T., BESNARD, V., WERT, S.E., ET AL. 2007. Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 55, 1, 71–83.
- STEFKOVÁ, J., POLEDNE, R., AND HUBÁČEK, J.A. 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 53, 3, 235–43.
- STRIDE, B.D., COLE, S.P., AND DEELEY, R.G. 1999. Localization of a substrate specificity domain in the multidrug resistance protein. *The Journal of biological chemistry* 274, 32, 22877–83.
- SUN, H., MOLDAY, R.S., AND NATHANS, J. 1999. Retinal stimulates ATP hydrolysis by

- purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *The Journal of biological chemistry* 274, 12, 8269–81.
- SUNDARAM, S.S. AND SOKOL, R.J. 2007. The multiple facets of ABCB4 (MDR3) deficiency. *Current Treatment Options in Gastroenterology* 10, 6, 495–503.
- TIMMINS, J.M., LEE, J.-Y., BOUDYGUINA, E., ET AL. 2005. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *The Journal of clinical investigation* 115, 5, 1333–42.
- VASILIOU, V., VASILIOU, K., AND NEBERT, D.W. 2008. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics* 3, 3, 281.
- WALKER, J.E., SARASTE, M., RUNSWICK, M.J., AND GAY, N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* 1, 8, 945.
- WANG, N., LAN, D., GERBOD-GIANNONE, M., ET AL. 2003. ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) binds apolipoprotein A-I and mediates cellular phospholipid but not cholesterol efflux. *The Journal of biological chemistry* 278, 44, 42906–12.
- WAT, E., TANDY, S., KAPERA, E., ET AL. 2009. Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 205, 1, 144–50.
- WEAVER, T.E., NA, C.-L., AND STAHLMAN, M.T. 2002. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Seminars in cell & developmental biology* 13, 4, 263–70.
- WHITSETT, J.A., WERT, S.E., AND WEAVER, T.E. 2010. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annual review of medicine* 61, 105–19.
- WIRBELAUER, J. AND SPEER, C.P. 2009. The role of surfactant treatment in preterm infants and term newborns with acute respiratory distress syndrome. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 29 Suppl 2, S2, S18–S22.
- WLCEK, K. AND STIEGER, B. 2013. ATP-binding cassette transporters in liver. *BioFactors (Oxford, England)* 40, 2, 188–98.
- YAMANO, G., FUNAHASHI, H., KAWANAMI, O., ET AL. 2001. ABCA3 is a lamellar body

- membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS letters* 508, 2, 221–5.
- YANG, L., LI, Y., HONG, H., ET AL. 2012. Sex Differences in the Expression of Drug-Metabolizing and Transporter Genes in Human Liver. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology* 3, 3, 119.
- YU, L., HAMMER, R.E., LI-HAWKINS, J., ET AL. 2002. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 25, 16237–42.
- ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M.J., GOLDSTEIN, K.M., PAULMAN, A., BAKER, T.K., AND RYAN, T.P. 2013. Minor compensatory changes in SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats do not detract from their utility in the study of transporter-mediated pharmacokinetics. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41, 6, 1174–8.
- ZOU, X.-Q., GUO, Z., HUANG, J.-H., ET AL. 2012. Human milk fat globules from different stages of lactation: a lipid composition analysis and microstructure characterization. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 29, 7158–67.

Dankaussagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Holzinger für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung über die gesamte Zeit. Ebenfalls möchte ich mich auch für das Vertrauen und die Unterstützung bei allen Herausforderungen im Rahmen dieses Projektes bedanken.

Weiterhin möchte ich Dr. med. Rashmi Mittal und Dr. rer. nat. Markus Hammel für die stetige Unterstützung im Labor bei molekularbiologischen Methoden und praktischen Problemen bedanken. Ebenfalls gilt mein Dank den Arbeitsgruppen im gesamten Labor K0.21 für regen wissenschaftlichen Austausch und die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Für die Analyse der Milch möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Gerd Schmitz und Dr. rer. nat. Gerhard Liebisch bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellung im Umgang mit den Tieren möchte ich Dr. med. vet. Heinz-Peter Scheuber und allen Mitarbeitern der ZVH danken.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir generell das Medizinstudium ermöglicht hat und die mich, neben der Promotion, auch in meinem täglichen Tun fortwährend ermutigt und unterstützt.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

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.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand