

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

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

Funktionelle Analyse des ABCA3 Transporters

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

vorgelegt von
Stefanie Höppner
aus München

2020

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Griese

Mitberichterstatter: PD Dr. Nikolaus Kneidinger
Prof. Dr. Melanie Königshoff

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Der ATP-binding cassette (ABC) Transporter A3 (ABCA3) befindet sich in der äußeren Membran der Lamellarkörperchen (LB) in den Typ II Pneumozyten. Er ist einerseits für den strukturellen Aufbau der LBs und andererseits für den ATP-abhängigen Transport von Lipiden aus dem Zytosol in die LBs von entscheidender Bedeutung. Die LBs werden exozytiert und stellen damit den Surfactant auf der Lungenoberfläche bereit. Mutationen im ABCA3 Gen können den Transporter sowohl strukturell als auch funktionell beeinträchtigen. Diese können zu einem akuten Atemnotsyndrom bei Neugeborenen, mit frühem letalen Ausgang, bzw. zu diffusen interstitiellen Lungenerkrankungen bei Kindern und Erwachsenen führen.

Bis dato gab es keine Möglichkeit die Funktionen des ABCA3 Proteins (Lipidtransport, LB Herstellung) auf dem Level der LBs innerhalb der Zelle zu analysieren. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde in dieser Arbeit ein an Haemagglutinin- (HA-) gekoppeltes Wildtyp (WT) bzw. mutiertes ABCA3 Protein stabil in A549 Zellen exprimiert. Es wurden Liposomen hergestellt, die dem Lungensurfactant in ihrer Zusammensetzung nachempfunden wurden und das fluoreszierende Top Fluor Phosphatidylcholin (TopF-PC) enthielten. Die Inkubation der Zellen mit den Liposomen erfolgte unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Daran anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes in mehreren axialen Ebenen dargestellt. Die so entstanden Fluoreszenzbilder wurden mit einem umfangreichen Bildanalyse Tool ausgewertet und dabei sowohl die Fluoreszenzintensität der Top Fluor Lipide innerhalb der ABCA3-positiven (ABCA3+) Vesikel als auch das Volumen der ABCA3+ Vesikel bestimmt. Die fluoreszierenden Lipide akkumulierten innerhalb der ABCA3+ Vesikel sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig, was sich durch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität in den ABCA3+ Vesikeln zeigte, während das Volumen der ABCA3+ Vesikel unverändert blieb. Nachdem die ATPase Aktivität des ABCA3 Transporters mit Orthovanadat gehemmt wurde, kam es zu einer verminderten Transportaktivität und die Fluoreszenzintensität innerhalb der ABCA3+ Vesikel nahm ab. Ähnliche Ergebnisse waren in Zellen mit der ABCA3 Mutation p.K1388N zu finden. Diese ist in der Nähe der Nukleotid Binde Domäne (NBD) des ABCA3 Transporters lokalisiert, und beeinflusst somit den Lipidtransport. Im Gegenzug dazu hat die Mutation

p.E292V, die im ersten zytoplasmatischen Protein Loop lokalisiert ist, keinen Einfluss auf die Transportaktivität, wohl aber auf das Volumen der LBs und damit auf ihre Genese.

Die in dieser Arbeit neu entwickelte Methode wird in Zukunft sehr von Nutzen sein, um weitere ABCA3 Mutationen näher zu klassifizieren, um ABCA3 Inhibitoren zu evaluieren und um Korrektoren sowie Potentioren für die Mutationen zu finden und zu testen. Diese Korrektoren und Potentioren könnten nach erfolgreicher Testung die Grundlage für einen Therapieansatz bilden, da es bisher noch keine Therapieoptionen für Krankheiten bedingt durch ABCA3 Mutationen gibt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie der Atemwege und Lunge	1
1.2 Pulmonaler Surfactant	3
1.2.1 Entstehung von Surfactant	3
1.2.2 Zusammensetzung von Surfactant	4
1.2.3 Funktionen des Surfactants	6
1.3 Der ABCA3 Lipidtransporter	7
1.3.1 Die ABC-Transporter Subklassen	7
1.3.2 Aufbau des ABCA3 Transporters	8
1.3.3 Synthese und Prozessierung des ABCA3 Transporters	9
1.3.4 Funktionen des ABCA3 Transporters	11
1.3.5 Mutationen im ABCA3 Transportergen	12
1.3.6 Möglichkeiten zur Analyse des ABCA3 Transporters	14
1.4 Interstitielle Lungenerkrankungen	14
1.4.1 Definition und Klassifikation	14
1.4.2 Epidemiologie und Krankheitsursache	15
1.4.3 Pathogenese	16
1.4.4 Symptomatik	17
1.4.5 Diagnostik	18
1.4.6 Therapieoptionen	19
2 Zielsetzung	21
3 Material und Methoden	23

Inhaltsverzeichnis

3.1	Material.....	23
3.1.1	Geräte.....	23
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.3	Chemikalien und Pufferlösungen	26
3.1.4	Geräte und Kits.....	28
3.1.5	Zelllinien und Plasmide	28
3.1.6	Primer für Site Directed Mutagenesis und qPCR.....	29
3.1.7	Antikörper	29
3.1.8	Software	30
3.2	Methoden	31
3.2.1	Klonierung und stabile Transfektion von A549-Zellen.....	31
3.2.2	Zellkultur	32
3.2.3	Mikroskopie	37
3.2.4	Fluoreszenzanalyse mit dem Fiji-Plugin Particle_in_Cell-3D.....	38
3.2.5	Vesikel Volumen.....	39
3.2.6	Prozentsatz an gefüllten Vesikeln	40
3.2.7	Statistische Analyse	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Herstellung von A549 Zellen mit ABCA3 Expression	41
4.2	Darstellung des ABCA3-Transporters	41
4.3	Einfluss der Lipide auf die Zellebensfähigkeit.....	41
4.4	Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel	42
4.5	Konzentrationsabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel.....	45
4.6	ABCA3 spezifische Lipidaufnahme in die Lamellarkörperchen.....	48
4.7	Effekte der Mutationen auf den ABCA3 abhängigen Phosphatidylcholin-Transport und das Vesikelvolumen.....	50
5	Diskussion.....	55
5.1	Herstellung stabiler Zellklone mit ABCA3 Expression in A549 Zellen.....	56
5.2	Darstellung des ABCA3 Transporters und Volumen der LBs	57

5.3	Zusammensetzung und Aufnahme der Liposomen in die A549 Zellen.....	57
5.4	Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme	58
5.5	Konzentrationsabhängigkeit der Lipidaufnahme	58
5.6	ABCA3 spezifische Lipidaufnahme in die Lamellarkörperchen.....	59
5.7	Einfluss der ABCA3 Mutationen p.E292V und p.K1388N auf den Lipidtransport und das Vesikelvolumen.....	60
5.8	Bedeutung der neuen Methode.....	62
6	Ausblick.....	63
6.1	Anwendung der Quantifizierungsmethode bei der Auswahl von Korrektoren für ABCA3 Mutationen.....	63
6.2	Analyse des ABCA3 Transporters mit Hilfe von Propargylcholin.....	64
6.3	Zusammenfassende Bewertung	65
	Literaturverzeichnis	XIII
	Erklärung	XXII
	Eidesstattliche Versicherung	XXIII
	Danksagung	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Adenokarzinom-Typ II-Lungenepithelzelllinie
ABC	ATP-bindende Kasette (<i>ATP binding cassette</i>)
ABCA3	ABC Unterfamilie A, Gen Nummer 3
ABCA3+	ABCA3 positiv
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	Willkürliche Einheit (<i>Arbitrary units</i>)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum-Albumin
CB	„ <i>composite bodies</i> “
CD63	Oberflächenprotein mit <i>Cluster of Differentiation</i> Nummer 63
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CMV	humanes Cytomegalie-Virus
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CPI	chronische Pneumonitis des Kindesalters (<i>chronic pneumonitis of infancy</i>)
DABCO	Diazabicyclooctan
DAPI	Diamidinphenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
DPLD	diffuse parenchymatöse Lungenerkrankung (<i>diffuse parenchymal lung disease</i>)
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin

DR	sich wiederholende DNA Abschnitte (<i>direct repeats</i>)
E	Aminosäure Glutaminsäure
E. coli	Escherichia coli, Bakterienstamm
ECD	extrazelluläre Domäne (<i>extracellular domain</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	frühes Endosom (<i>early endosome</i>)
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälber-Serum (<i>fetal calf serum</i>)
GA	Golgi Apparat
GM-CSF	Granzulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HR-CT	hochauflösende Computer-Tomographie (<i>high resolution computed tomography</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin der Klasse G, Gammaglobulin
IIP	idiopathische interstitielle Pneumonie (<i>idiopathic interstitial pneumonia</i>)
ILE	interstitielle Lungenerkrankung
IND	Iodonitrotetrazolium
IR	sich wiederholende gegenläufige DNA Sequenzen (<i>inverted repeats</i>)

Abkürzungsverzeichnis

K	Aminosäure Lysin
kDa	Kilodalton
LB	Lamellarkörperchen (<i>lamellar body</i>)
LDH	Laktatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
min	Minute
Mio	Million
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MVB	multivesikuläre Körperchen (<i>multivesicular bodies</i>)
N	Aminosäure Asparagin
NBD	Nukleotidbindende Domäne
NEHI	neuroendokrine Zellhyperplasie des Säuglings (<i>neuroendocrine cell hyperplasia of infancy</i>)
nt	Nukleotide
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
PGK	Phosphoglyceratkinase
PIG	pulmonale interstitielle Glykogenose
PNGase F	Peptid N-Glycosidase F
PuR	Puromycinresistenz
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>real-time quantitative PCR</i>)
RDS	Atemnotsyndrom (<i>respiratory distress syndrome</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
s	Sekunde

SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Surfactantprotein
SSW	Schwangerschaftswoche
SV	„ <i>sorting vesicle</i> “
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TM	tubuläres Myelin
TMD	Transmembrandomäne
TopF-PC	Top Fluor Phosphatidylcholin
TTF1	thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
UIP	gewöhnliche interstitielle Pneumonie (<i>usual interstitial pneumonia</i>)
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine (<i>unfolded protein response</i>)
V	Aminosäure Valin
WT	Wildtyp
XTT	Triphenyltetrazoliumchlorid
Z stacks	axiale Bildstapel-Serien

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lunge und einer Alveole	3
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Surfactanthomöostase	4
Abbildung 3 Zusammensetzung pulmonaler Surfactant	5
Abbildung 4 Lipidzusammensetzung von pulmonalem Surfactant.....	6
Abbildung 5 Schematische Darstellung des ABCA3 Proteins mit Lage der zwei untersuchten Mutationen (p.E292V und p.K1388N)	9
Abbildung 6 Synthese des ABCA3 Transporters und Zyklus innerhalb der Zelle	10
Abbildung 7 Funktion des ABCA3 Transporters	12
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Entstehung von Interstitiellen Lungen Erkrankungen	17
Abbildung 9 Vektor pT2/HB-Transposon-Vektor.....	31
Abbildung 10 Strukturformel Top Fluor Phosphatidylcholin	34
Abbildung 11 Schematische Darstellung der Zellbehandlung.....	36
Abbildung 12 3D Darstellung einer Zelle mit Wildtyp ABCA3 Transporter und Lipiden	38
Abbildung 13 Auswahl der ABCA3+ Vesikel.....	39
Abbildung 14 Einfluss der Liposomen auf die Zelllebensfähigkeit	42
Abbildung 15 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel.....	42
Abbildung 16 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel.....	43
Abbildung 17 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel.....	44
Abbildung 18 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel.....	44
Abbildung 19 Konzentrationsabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel..	45
Abbildung 20 Effekte verschiedener Liposomenkonzentrationen auf die Fluoreszenzintensität in den ABCA3+ Vesikeln	46

Abbildung 21 Effekte verschiedener Liposomenkonzentrationen auf den Prozentsatz an gefüllten ABCA3+ Vesikeln.....	47
Abbildung 22 Effekte verschiedener Liposomenkonzentrationen auf das Volumen von ABCA3+ Vesikeln	47
Abbildung 23 ABCA3 spezifische Lipidaufnahme.....	48
Abbildung 24 Effekte von Orthovanadat auf den ABCA3 Lipidtransport.....	49
Abbildung 25 Effekte von Orthovanadat auf den ABCA3 Lipidtransport.....	49
Abbildung 26 Effekte von Orthovanadat auf das Volumen der ABCA3+ Vesikel.....	50
Abbildung 27 Effekte von ABCA3-Mutationen auf den ABCA3 abhängigen Lipidtransport und das Volumen der ABCA3+ Vesikel	51
Abbildung 28 Effekte der ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V auf den ABCA3 abhängigen Lipidtransport	52
Abbildung 29 Effekte der ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V auf den Prozentsatz an gefüllten ABCA3+ Vesikeln.....	53
Abbildung 30 Effekte der ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V auf das Volumen von ABCA3+ Vesikeln	53
Abbildung 31 Kupfer katalysierte Click Reaktion (CuAAC) zwischen Propargylcholin (Alkin) und 5-TAMRA-PEG3-Azide.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenhang zwischen Abschnitten des Bronchialbaumes und dem zugehörigen Lungengewebe	1
Tabelle 2 Klassifikation von interstitiellen Lungenerkrankungen im Kindesalter	15

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Atemwege und Lunge

Die Atemwege können anatomisch in obere und untere Atemwege aufgeteilt werden. Sie werden zur Luftleitung benötigt. Die oberen Atemwege, die der Reinigung, Aufwärmung und Anfeuchtung der Atemluft dienen, verlaufen vom Nasenrachenraum bis zur Epiglottis. Mit dem Kehlkopf beginnt der Abschnitt der unteren Atemwege. Dieser startet mit der Trachea, die sich dann in die beiden Hauptbronchien aufzweigt und diese wiederum verzweigen sich in die Lappenbronchien, Segmentbronchien und Subsegmentbronchien bis hin zu den *Bronchioli terminales*. Dort beginnt mit den *Bronchioli respiratorii* und den Alveolen der gasaustauschende Abschnitt¹.

Die Lunge besteht aus zwei Lungenflügeln, *Pulmones dexter* und *sinister*, die sich durch die Anzahl der Lungenlappen und Segmente unterscheiden. Der rechte Lungenflügel besteht aus drei Lappen mit zehn Segmenten, der linke Lungenflügel nur aus zwei Lappen mit neun Segmenten. Die Aufteilung in die Segmente entsteht durch die Verzweigungen des Bronchialbaumes. Die Segmente wiederum können weiter in Läppchen aufgeteilt werden¹ (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Zusammenhang zwischen Abschnitten des Bronchialbaumes und dem zugehörigen Lungengewebe. Nach Duale Reihe Anatomie 3. Auflage S. 550¹.

Lungengewebe Einheit	Trenn-Strukturen	Bronchialbaum- abschnitt	Anzahl rechts	Anzahl links
Lobus pulmonalis	<i>Fissurae</i>	<i>Bonchus lobaris</i>	3/ Lunge	2/ Lunge
Segmentum bronchopulmonale	Bindegewebssepten	<i>Bronchus segmentalis</i>	10/ Lunge	9/ Lunge
Lobus pulmonalis	Bindegewebe, unvollständige Trennung	<i>Bronchus lobularis</i>	Ca. 4000/ Lunge	
Azinus	-	<i>Bronchiolus terminalis</i> mit <i>Bronchiolus respiratorius</i>	Ca. 12-18 Azini/ <i>Lobulus</i>	

Einleitung

		<i>Ductus alveolaris</i>		
		<i>Sacculus alveolares</i>		
		Alveolen	Ca. 200 Alveolen/ <i>Bronchiolus respiratorius</i>	

Die Lunge stellt das zentrale Organ für den Gasaustausch im menschlichen Körper dar. Der Gasaustausch erfolgt in den *Bronchioli respiratorii* und in den *Ductus* und *Sacculi alveolares*. Der Aufbau dieser Lungenblässchen erfolgt durch zwei morphologisch und funktionell verschiedene Zellarten, die Typ I Pneumozyten (flach, Deckzellen, 40% der Alveolarepithelzellen) und die Typ II Pneumozyten (kuboid, Surfactantproduzenten, 60% der Alveolarepithelzellen) (siehe Abbildung 1). Die Alveolen werden von schmalen bindegewebigen Septen umgeben und durch ein Kapillarnetz umspannt. Durch die Verschmelzung der Basalmembranen von den flachen Typ I Pneumozyten, die 90% der Alveolaroberfläche ausmachen, und den Endothelzellen der Kapillaren, entsteht eine sehr dünne Diffusionsbarriere (Blut-Luft-Schranke), die den Gasaustausch ermöglicht. Die Typ I Pneumozyten regulieren über ihre Ionentransporter den Ein- und Ausstrom von Wasser in die Alveolen und spielen damit eine entscheidende Rolle im Balanceakt zwischen ausreichender Feuchtigkeit in der Lunge und einem Alveolarödem². Die kleineren Typ II Pneumozyten sind mengenmäßig stärker vertreten (60% der Zellen), als die Typ I Pneumozyten, machen aber durch ihre kuboide Form einen geringeren Flächenanteil aus (10%), um den Gasaustausch nicht zu stören. Die Funktion der Typ II Pneumozyten beruht auf der Surfactantproduktion und sie können durch ihre Teilungsfähigkeit geschädigte Typ I Pneumozyten ersetzen^{2,3}.

Die *Aa. pulmonales* transportieren sauerstoffarmes Blut aus der rechten Herzkammer zum alveolären Kapillarnetz, wo der Gasaustausch stattfindet. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut wird im Anschluss über die *Vv. pulmonales* zum linken Vorhof transportiert und gelangt von dort aus in den Körperkreislauf³.

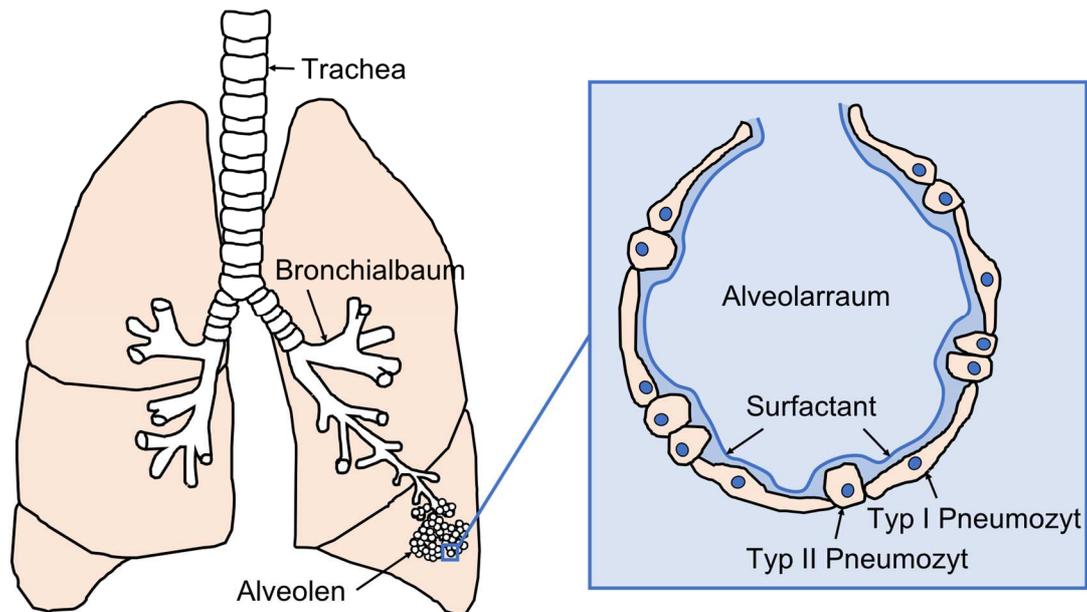


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lunge und einer Alveole

Schematische Zeichnung einer Lunge mit Trachea, Bronchialbaum und Alveolen (links). Daraus vergrößert dargestellt ist eine einzelne Alveole mit Surfactant, sowie Typ I und Typ II Pneumozyten (rechts). Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Frau U. Schindlbeck zur Verfügung gestellt.

1.2 Pulmonaler Surfactant

1.2.1 Entstehung von Surfactant

Der Begriff Surfactant ist ein Kunstwort aus den Wörtern „surface active agent“. Er wird aber auch Anti-Atelektase-Faktor genannt. Darunter versteht man biochemisch gesehen ein Gemisch aus bestimmten Lipiden und spezialisierten Surfactant Proteinen (SP) -A, -B, -C und -D. Die SP werden im Endoplasmatischen Reticulum (ER) und Golgi der Typ II Pneumozyten synthetisiert und prozessiert. Die Surfactant Lipide, SP-B und SP-C werden in den Typ II Pneumozyten innerhalb der LBs gespeichert⁴. Die SP-A und -D werden unabhängig von den LBs an die Lungenoberfläche abgegeben. Die LBs werden exozytiert und der Inhalt bildet in der Hypophase (Flüssigkeitsphase) auf den Pneumozyten einen Lipoproteinkomplex, das sogenannte Tubuläre Myelin (TM), das der Surfactant Reserve dient. Es bildet röhrenartige Strukturen, die je nach Bedarf in den Surfactantfilm eingebaut oder bei Verkleinerung der Oberfläche herausgenommen werden können. Der Surfactant

selbst breitet sich als dünner Film über der Hypophase auf den Pneumozyten aus. Ein Teil des Surfactantfilms wird von den Alveolarmakrophagen phagozytiert^{5,2,6}. Der andere Teil wird von den Typ II Pneumozyten erneut aufgenommen⁷ und in den Multivesicular Bodies (MVB) bzw. LBs recycelt⁸ oder aber in den Lysosomen abgebaut (siehe Abbildung 2)⁴. Jacobs *et al.* konnten zeigen, dass jede Stunde ca. 10% des Surfactants in die Typ II Pneumozyten wieder aufgenommen und recycelt wird⁹.

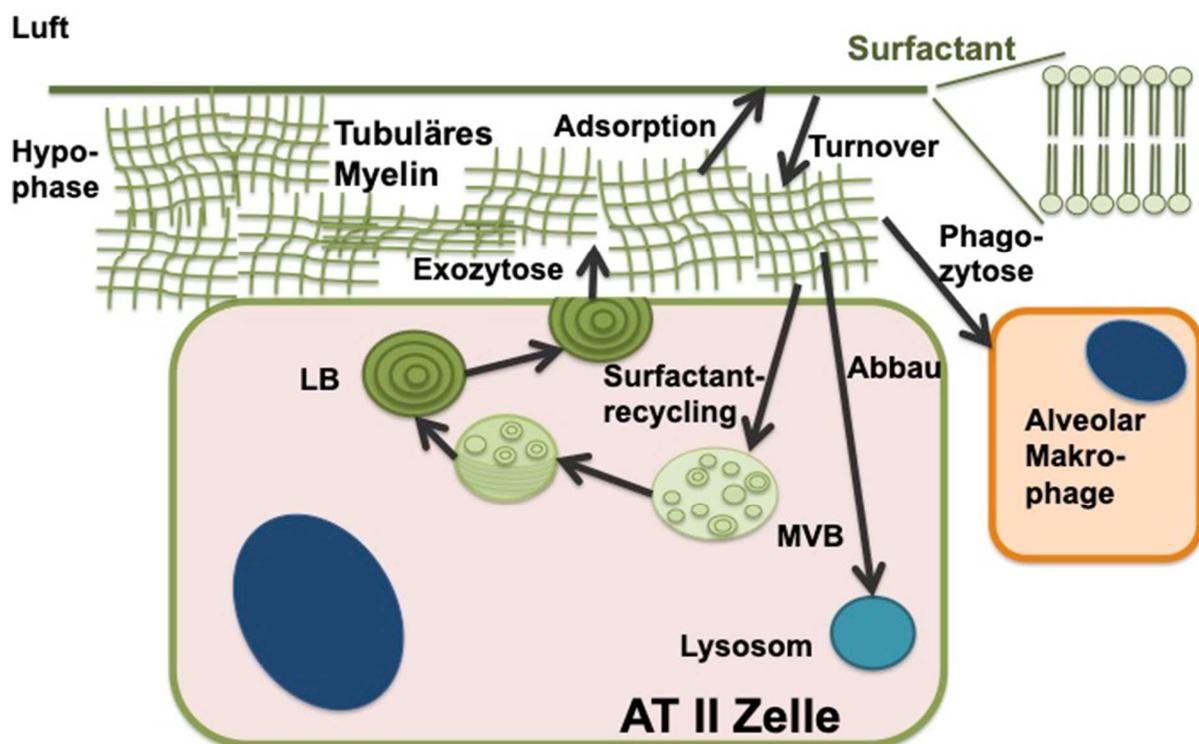


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Surfactanthomöostase.

Die Surfactantproduktion (Lipide, SP-B, -C) findet in den Lamellarkörperchen (LBs) statt, die LBs werden exozytiert und bilden zusammen mit SP-A das Tubuläre Myelin. Dieses gilt in der wässrigen Hypophase als Speicher für den Surfactant, der sich als Monolayer-multilayer Film zwischen der Hypophase und der Luft im Alveolarraum befindet. Surfactantbestandteile können entweder wieder in die Typ II Pneumozyten (AT II Zelle) aufgenommen und in den Multivesicular Bodies (MVBs) recycelt bzw. in den Lysosomen abgebaut werden oder sie werden von Alveolarmakrophagen phagozytiert⁶.

1.2.2 Zusammensetzung von Surfactant

Surfactant besteht zu 90% aus Lipiden und zu 10% aus Proteinen (siehe Abbildung 3). Der Lipidbestandteil setzt sich vor allem aus Phosphatidylcholin (PC)

zusammen, von dem wiederum mehr als 65% als gesättigtes Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegen. DPPC ist durch seinen amphiphilen Charakter von großer Bedeutung für die Herabsetzung der Oberflächenspannung¹⁰ (siehe Abbildung 4).

Neben dem Lipidbestandteil spielen auch die Surfactantproteine eine wichtige Rolle. Man unterscheidet die hydrophoben Proteine SP-B und SP-C, sowie die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D¹⁰.

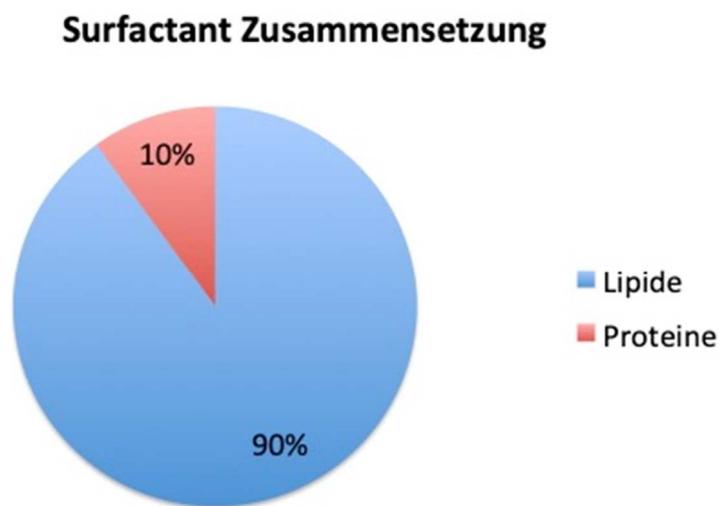


Abbildung 3 Zusammensetzung pulmonaler Surfactant

Surfactant besteht zu 90% aus Lipiden und 10% aus Proteinen. Die Surfactant Proteine setzen sich aus den hydrophilen SP-A und SP-D sowie den hydrophoben SP-B und SP-C zusammen.

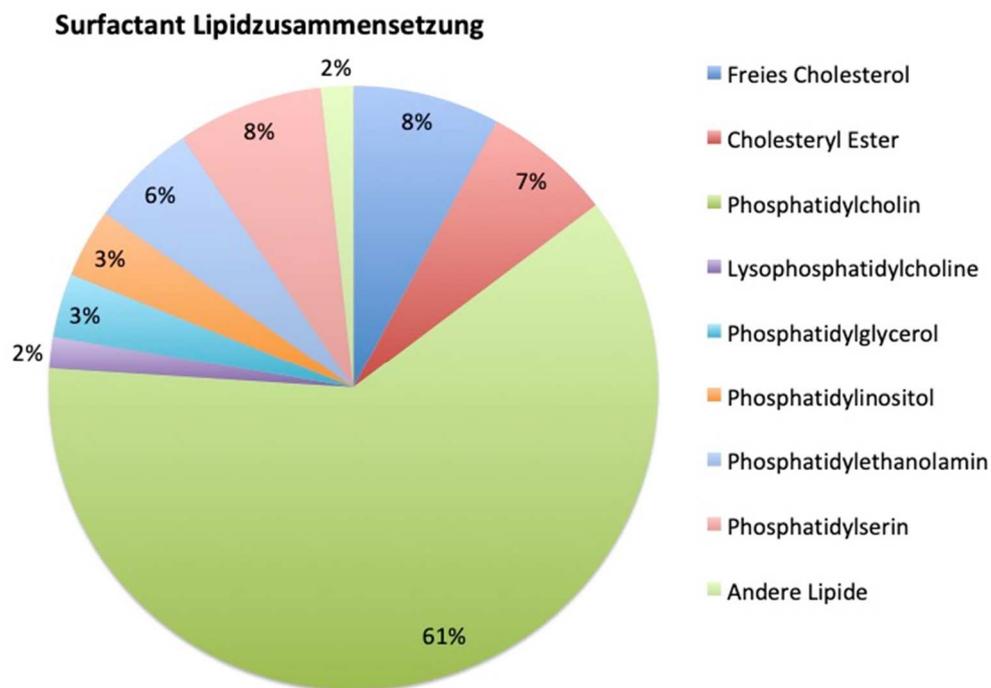


Abbildung 4 Lipidzusammensetzung von pulmonalem Surfactant

Zu den prozentual am meisten vertretenen Lipiden zählen Phosphatidylcholin (PC) mit seiner Untergruppe Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC). Abbildung mit Werten nach Griesse *et al.*¹¹.

1.2.3 Funktionen des Surfactants

Funktionell wird der Surfactant benötigt, um die Oberflächenspannung der Lunge herab zu setzen und damit bei der Expiration einen Kollaps der Alveolen zu verhindern¹². Die Phospholipide können sich mit ihrem amphiphilen Aufbau zwischen wässriger Phase und Gasphase ausrichten und damit einen Kontakt zwischen Luft und Wasserschicht verhindern, wodurch die Oberflächenspannung der Lunge an der Grenzfläche reduziert wird¹³. Dadurch kann das Volumen der Alveolen mühelos verändert werden.

Die SP-A und SP-B dienen der strukturellen Bildung des tubulären Myelins. SP-B und SP-C fördern durch ihren starken hydrophoben Charakter die Adsorption der Lipide an der Grenzfläche und die strukturelle Organisation des Surfactants, sowie die Stabilisierung der Phospholipidmembran während der Atemexkursion^{14,15}. Fehlt Surfactant in der Lunge kommt es bei der Expiration zum Kollaps der Alveolen, die

bei der Inspiration mit viel Druck wieder geöffnet werden müssen. Dadurch entsteht ein Bild der Lunge mit wenigen emphysematösen Bezirken und vielen kleinen kollabierten Alveolen.

Neben dieser wichtigen atemphysiologischen Funktion hat der Surfactant auch eine Bedeutung bei der Immunabwehr in der Lunge. Die Surfactant Proteine SP-A und SP-D können die Abwehr gegen Viren und Bakterien verstärken. Dazu können die C-Terminalen Lektin-Domänen dieser Proteine die viralen und bakteriellen Oligosaccharide binden und damit opsonieren, d.h. für das angeborene Immunsystem erkennbar machen¹⁶.

1.3 Der ABCA3 Lipidtransporter

1.3.1 Die ABC-Transporter Subklassen

Die Familie der ABC Transporter kann in allen pro- und eukaryotischen Spezies nachgewiesen werden und ist für den ATP-abhängigen Substrattransport durch verschiedene zelluläre Membranen von großer Bedeutung. Charakteristisch für die ABC Transporter sind zwei Nukleotid-bindende Domänen (NBDs), die durch die Hydrolyse von ATP die notwendige Energie für den Substrattransport zur Verfügung stellen, sowie zwei Transmembrandomänen (TMDs), die das Protein in der Zellmembran verankern und die Passage durch die Membran bilden¹⁷. Die TMDs sind je nach ABC Untergruppe aus fünf bis zwölf membrandurchspannenden Einheiten aufgebaut und können die jeweils spezifischen Substrate durch die Membran transportieren. Die beiden NBDs enthalten die konservierten Walker A und B Motive, sowie ein jeweils für die verschiedenen ABC Transporter charakteristisches C Motiv¹⁸. Insgesamt sind im humanen Genom 49 funktionelle ABC Transporter Gene zu finden, die durch ihre jeweiligen strukturellen Ähnlichkeiten in sieben Gruppen unterteilt werden können (ABCA bis ABCG)¹⁹.

Die ABC-Transporter sind unter anderem von physiologischer Bedeutung für die Antigenpräsentation im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ABCB2/ABCB3)²⁰, den Ionentransport (ABCC7 (CFTR))²¹, den Lipidtransport in den

Typ II Pneumozyten (ABCA3) und für die Resistenz gegen Medikamente in Tumorzellen (ABCB1)²².

Dabei ist die Gruppe der ABCA Transporter eine der größten Untergruppen mit 12 verschiedenen Transportern (ABCA1 bis ABCA13, ABCA11 stellte sich als Artefakt heraus). Die ABCA-Transporter bestehen aus ca. 2300 Aminosäuren und weisen ein breites Expressionsspektrum im humanen Gewebe auf¹⁷. Defekte in ABCA Transportern können zu autosomal rezessiv vererbten Krankheiten führen. Dazu zählen verschiedene Erkrankungen, wie die durch einen ABCA1 Gen Defekt ausgelöste Tangier-Krankheit²³, der durch einen ABCA3 Defekt ausgelöste Surfactantmangel, die durch einen ABCA4 Defekt ausgelöste Netzhautdystrophie²⁴ sowie die durch einen ABCA12 Defekt ausgelösten lamellären Ichthyosen^{25,17}.

1.3.2 Aufbau des ABCA3 Transporters

Der ABCA3 Transporter wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, unter anderem im Magen, im Darm, in der Leber, in den Nieren, im Gehirn, vor allem aber in den Typ II Pneumozyten der Lunge. In den Typ II Pneumozyten befindet sich der ABCA3 Transporter in der äußeren Membran der LBs. Das ABCA3 Gen ist auf dem Chromosom 16p13.3 lokalisiert und beinhaltet 33 Exons, von denen 30 transkribiert werden und für das 1704 Aminosäuren große ABCA3 Protein codieren²⁶. Das Protein besteht wie alle ABCA Transporter aus vier Hauptdomänen, die zwei ähnlich aufgebaute Untereinheiten bilden. Diese Untereinheiten bestehen jeweils aus sechs Transmembrandomänen und einer zytosolischen ATP-Binde Stelle (ATP-binding cassette, NBD). Die ATP-Binde Stelle wiederum beinhaltet zwei konservierte Peptid Motive, auch bekannt als Walker A und Walker B Sequenz, sowie eine für die ABCA Transporter typische Walker C Sequenz²⁷ (siehe Abbildung 5). Die TMDs bilden einen Kanal in der Phospholipidmembran der LBs durch den die Lipide mit der von den NBDs bereit gestellten Energie transportiert werden²⁸.

können im Anschluss entweder erneut den MVBs, oder den Lysosomen zugeführt werden (siehe Abbildung 6). Dort findet eine Cathepsin-L vermittelte proteolytische Spaltung im 1. extrazellulären Loop (EL1) statt (siehe Abbildung 5), wodurch ein verkürztes Protein entsteht³². Die Spaltung dient dem Abbau des ABCA3 Proteins.

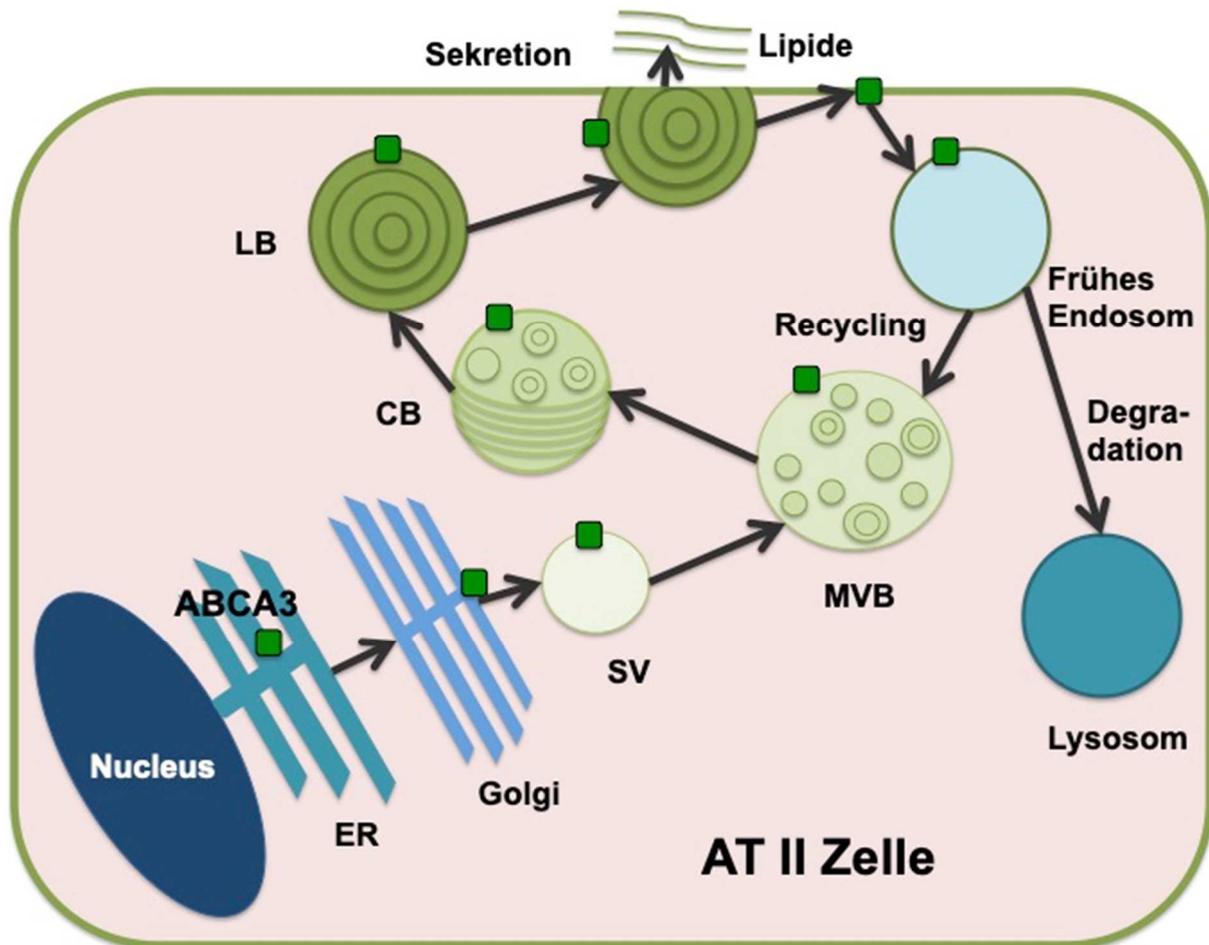


Abbildung 6 Synthese des ABCA3 Transporters und Zyklus innerhalb der Typ II Pneumozyten

Das ABCA3 Protein wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und zum Golgi Apparat transportiert. Dort schnüren sich die „sorting vesicles“ (SV) ab, die sich im Anschluss zu „multivesicular bodies“ (MVB) zusammenlagern. Daraus entstehen in einem weiteren Schritt die „composite bodies“ (CB) und schlussendlich die LBs, die exozytiert werden und die Surfactant Lipide und Proteine an der Lungenoberfläche bereitstellen. Das ABCA3 Protein verbleibt in der Zellmembran und wird entweder recycelt oder in den Lysosomen abgebaut.

1.3.4 Funktionen des ABCA3 Transporters

Der ABCA3 Transporter fungiert einerseits als Lipid Transporter und ist andererseits auch von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Biogenese der LBs und für den Surfactant Metabolismus^{33,34,35}. Als Lipid Transporter transportiert das ABCA3 Protein die Lipide PC, PG, Sphingomyelin, Cholesterol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (siehe Abbildung 7)³⁶. Neugeborene mit homozygoten ABCA3 Mutationen leiden unter Surfactant Mangel und einem Atemnot Syndrom³⁷. Bei ihnen kann in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) eine deutlich Reduktion des PC und PG Gehaltes mit einer signifikant reduzierten Oberflächenaktivität festgestellt werden³⁸. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Lungengewebes der betroffenen Babys konnte gezeigt werden, dass sie in ihren Typ II Pneumozyten keine reifen LBs bilden können. Sie weisen nur viele kleinere und dichter gepackte LBs auf³⁹.

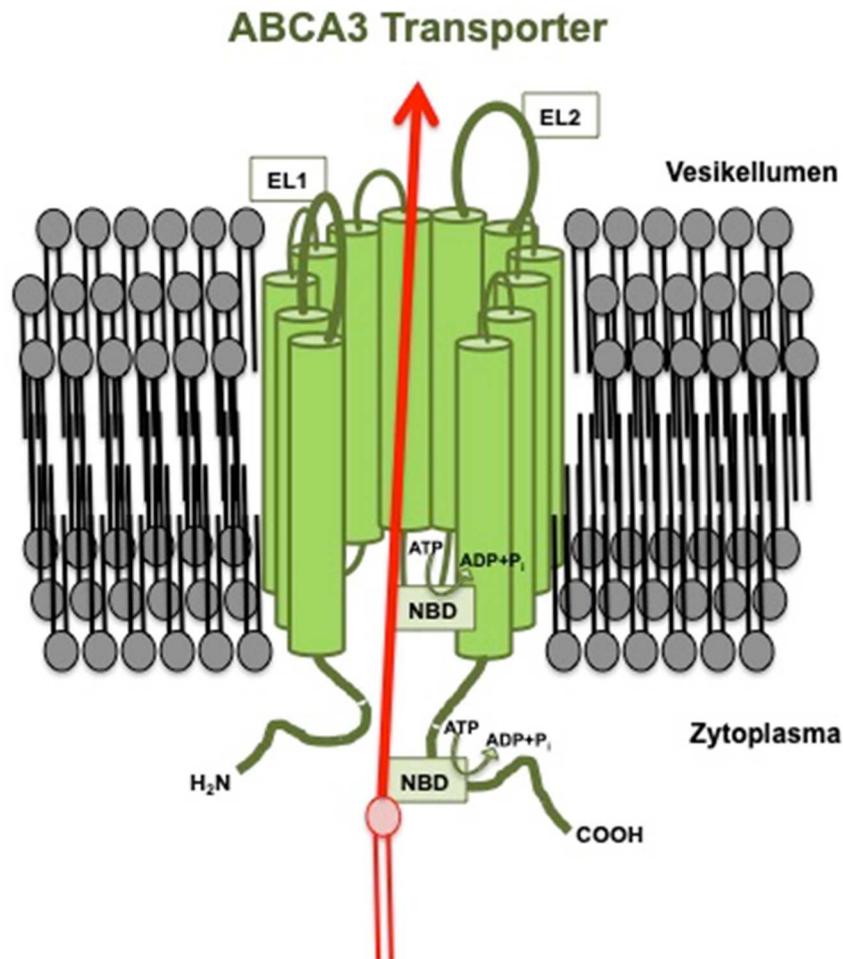


Abbildung 7 Funktion des ABCA3 Transporters

Das ABCA3 Protein transportiert Lipide aus dem Zytoplasma ATP-abhängig in das Vesikellumen der LBs. EL, Extrazellulärer Loop; NBD, Nukleotid Binde Domäne.

1.3.5 Mutationen im ABCA3 Transportergen

Bisher konnten über 200 Mutationen im ABCA3 Gen identifiziert werden. Homozygote ABCA3 Mutationen gelten als wichtigste Ursache von Lungenerkrankungen, die zu einem Surfactant Mangel führen⁴⁰. Bisher wurden verschiedene Arten von Mutationen in codierenden und nicht-codierenden Abschnitten des ABCA3 Gens beschrieben. Darunter findet man Missense-, Nonsense-, Raster- und Splice Mutationen, Insertionen, sowie Deletionen. Die meisten Mutationen führen zu einem Defekt im ABCA3 Protein und daraus folgend zu einem relevanten Surfactant Mangel mit Lungenversagen und *Exitus letalis* innerhalb der ersten Lebensmonate⁴⁰.

Histopathologisch zeigen die Patienten eine pulmonale Fibrose mit Typ II Pneumozyten Hyperplasie, eine Verbreiterung des Interstitiums und eine Einwanderung von Schaumzellen in den Alveolarraum⁴¹. In der Pathologie wird dieses Krankheitsbild als chronische Pneumonitis der Kindheit (Chronic pneumonitis of infancy, CPI), als unspezifische interstitielle Pneumonie und als neonatale oder kongenitale pulmonale Alveolarproteinose bezeichnet. Deutlich seltener treten ABCA3 Mutationen auf, die eine chronische Verlaufsform bei Kindern oder Erwachsenen zeigen und damit zu einer chronischen interstitiellen Lungenerkrankung führen^{42,43}. Hierbei liegt ein Funktionsverlust des ABCA3 Transporters durch eine fehlerhafte Proteinsynthese oder durch eine eingeschränkte Lipid-Pumpfunktion vor.

Im Jahr 2012 konnten Wambach *et al.* in einer in den USA durchgeführten Studie zeigen, dass auch heterozygote ABCA3 Mutationen das Risiko für das Respiratory Distress Syndrom (RDS) bei Neugeborenen steigern. In der Kohorte mit Kindern, die an RDS erkrankt sind, wiesen 14,3% eine einzelne ABCA3 Mutation auf, in der gesunden Kontrollgruppe hingegen hatten nur 3,7% der Kinder eine einzelne ABCA3 Mutation. Am häufigsten waren bei den betroffenen Kindern die Mutationen p.E292V und p.R288K zu finden. Insgesamt konnte aus diesen Daten in der Bevölkerung eine Häufigkeit von etwa 1:3100 für eine ABCA3 Mutation ermittelt werden. Dies entspricht in etwa der Häufigkeit der Erkrankung Mukoviszidose⁴⁴.

Wittmann *et al.* konnten 2016 nachweisen, dass auch die heterozygote ABCA3 Mutation p.R288K das Risiko für die Entwicklung von interstitiellen Lungenerkrankungen erhöht. Eine Erklärung hierfür kann eine gesteigerte Anfälligkeit für externe Faktoren, wie Infektionen oder Frühgeburtlichkeit sein⁴⁵.

Insgesamt lässt sich bisher ausgehend von der Mutation keine direkte Vorhersage über die Schwere der daraus resultierenden Erkrankungen treffen. Schindlbeck *et al.* hat in einer 2017 veröffentlichten Publikation Methoden entwickelt, mit deren Hilfe Mutationen in verschiedene Kategorien eingeteilt werden können. Dazu zählen Mutationen, die die ABCA3 Lokalisation innerhalb der Zelle verändern, oder die den Lipidtransport des ABCA3 Transporters beeinflussen. Zudem gibt es Mutationen, die durch bisher unbekannte Mechanismen zu interstitiellen Lungenerkrankungen

führen³⁹. Ziel dieser Klassifikation soll es sein, die Mutationen besser verstehen und entsprechende Therapieoptionen finden zu können.

1.3.6 Möglichkeiten zur Analyse des ABCA3 Transporters

Innerhalb der letzten Jahre wurden einige Methoden entwickelt, um den ABCA3 Transporter mit seinen Funktionen genauer analysieren zu können. Verschiedene Forschungsgruppen haben z.B. Saccharose Fraktionierungen von intrazellulären Kompartimenten, biochemische Lipidanalysen und Elektronenmikroskopie angewendet, um nachzuweisen, dass der ABCA3 Transporter die Lipidaufnahme in die Lamellarkörperchen vermittelt und für dessen Herstellung benötigt wird^{36, 46}. Cehong *et al.* konnten zeigen, dass eine Blockierung des ABCA3 Transporters mit kleiner RNA, die Aufnahme von PC in die ABCA3 exprimierenden Zellen blockiert und deshalb PC ein Substrat des ABCA3 Transporters sein muss⁴⁷. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz Färbungen konnte bisher die räumliche Verteilung und die zelluläre Dysfunktion von mutierten ABCA3 Proteinen genauer charakterisiert werden^{48,49}. Andere Arbeitsgruppen konnten die ABCA3 Aktivität indirekt messen, indem sie die ABCA3 Funktion, Doxorubicin und Imatinib abbauen zu können, genutzt haben⁵⁰.

All diese Experimente konnten bereits viele Fragestellungen zur Charakterisierung des ABCA3 Transporters beantworten. Bislang konnte aber der ABCA3 abhängige Lipidtransport noch nicht auf dem Level der LBs innerhalb der Zelle dargestellt und analysiert werden.

1.4 Interstitielle Lungenerkrankungen

1.4.1 Definition und Klassifikation

Unter interstitiellen Lungenerkrankungen (ILE) versteht man seltene, chronische Lungenerkrankungen, die durch entzündliche und fibrotische Veränderungen im Bereich der Alveolen und der angrenzenden distalen Atemwege gekennzeichnet sind. Klinisch fallen bei diesen Patienten eine (Tachy-) Dyspnoe, eine Hypoxämie

und knisternde Rasselgeräusche auf. In der Bildgebung sieht man diffuse Infiltrate, in der Lungenfunktion liegt eine Restriktion der Atemwege vor¹⁰. Man unterteilt die ILEs nach Manifestationszeitpunkt und Ätiologie (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Klassifikation von interstitiellen Lungenerkrankungen im Kindesalter¹⁰

1.	Manifestation der ILE bei Neugeborenen und Säuglingen bis zum 2. Lebensjahr nach Deutsch et al.⁵¹
	<ul style="list-style-type: none"> - diffuse Entwicklungs- und Wachstumsstörungen (z.B. Lungenhypoplasie) - spezifische Entitäten unbekannter Ätiologie (z.B. pulmonale interstitielle Glykogenose) - Surfactant Störungen (z.B. ABCA3 Mutationen) - genetisch determinierte ILE mit neonataler Manifestation (z.B. NKX2.1 Mutationen)
2.	Manifestation der ILE in allen Altersgruppen
	<ul style="list-style-type: none"> - idiopathische interstitielle Pneumonien (z.B. akute interstitielle Pneumonie (AIP)) - Primäre Lungenerkrankungen unbekannter Ätiologie (z.B. Eosinophile Lungenerkrankungen) - ILE bekannter Ätiologie (z.B. Exogen allergische Alveolitis) - Systemerkrankungen mit Lungenbeteiligung (z.B. Sarkoidose) - ILE bei Immundefizienz (z.B. nach Organ-/ Stammzelltransplantation)
3.	(Aktuell) nicht klassifizierbare ILE

1.4.2 Epidemiologie und Krankheitsursache

Da die ILE im Kindesalter zu den seltenen Erkrankungen zählt, gibt es hierzu nur relativ wenig statistische Angaben. In Deutschland wurden im Jahr 2005 und 2006 aus der Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen epidemiologische Daten für die Prävalenz von ILEs erhoben. Dazu wurden Neugeborene >36 Schwangerschaftswochen (SSW) bis zum Alter von unter 17 Jahren eingeschlossen. Es ergab sich eine Inzidenz für pädiatrische ILEs von 1,32 neue Fälle pro 1 Million

Kinder und Jahr. Das Mädchen-Jungen Verhältnis belief sich auf 1,10. Bei etwa einem Drittel der Kinder manifestierte sich die Erkrankung innerhalb ihres ersten Lebensjahres. Häufig führten vor allem Erkrankungen, ausgelöst durch monogenetische Defekte, zu einem Erkrankungsbeginn im frühen Kindesalter, wohingegen die ILEs, die durch exogene Faktoren ausgelöst wurden, erst später in der Kindheit und Adoleszenz auftraten⁵².

Die Analyse der Pathogenese und die Identifikation der Ursache der ILEs erweist sich in vielen Fällen als schwierig, da die Erkrankungen insgesamt sehr selten auftreten und zur Diagnosestellung ein spezialisiertes Team benötigt wird. Auch in Frankreich wurde 2012 eine große Studie veröffentlicht, in der man die dortige Datenbank für seltene Lungenerkrankungen analysiert hat. Dabei konnte bei 72,7% der Patienten die Ätiologie der ILE gefunden werden. Dazu zählten in 17,6% der Fälle ein Surfactant Mangel, in 9,7% die Alveolarproteinose, in 11,2% eine Hämosiderose, sowie in 10,2% eine Sarkoidose. In 27,3% der Fälle blieb die Krankheitsursache jedoch unklar⁵³.

Die häufigste Ursache für ILEs im Kindesalter war sowohl in Deutschland als auch in Frankreich die Surfactant Dysfunktion, die durch Mutationen in den Genen der SP-B, SP-C und ABCA3 Proteinen ausgelöst wird. Bei der in Deutschland durchgeführten Datenanalyse war die ABCA3 Mutation die häufigste Ursache für einen Surfactantmangel⁵².

1.4.3 Pathogenese

Bei der Entstehung von ILEs spielen die Alveolarepithelzellen eine entscheidende Rolle. Nach einer Schädigung des Alveolarepithels z.B. durch Bakterien oder Viren, kommt es im Normalfall zu einem komplexen Reparaturvorgang, bei dem das defekte Alveolarepithel mit Hilfe von proliferierenden Typ II Pneumozyten ersetzt wird. Die Typ II Pneumozyten können sich im Anschluss zu Typ I Pneumozyten weiter differenzieren und überschüssiges Zellmaterial wird durch Apoptose abgebaut, sodass am Ende wieder die ursprünglichen Verhältnisse vorliegen.

Unter bestimmten genetischen Einflüssen und auch in Abhängigkeit von der Art der Noxe, kann es aber auch zu einem Remodeling des Alveolarepithels kommen (siehe

Abbildung 8). Dabei nimmt ein Teil der Pneumozyten mesenchymale Eigenschaften an. Es kommt unter dem Einsatz von verschiedenen Mediatoren zur Vergrößerung und Verbreiterung der extrazellulären Matrix und zur Einsprossung von neuen Blutgefäßen, die in einer irreversiblen Lungenfibrose resultiert⁵⁴. Kaltenborn *et al.* konnten 2012 den Einfluss des Respiratory syncytial virus (RSV) auf Alveolarepithelzellen mit mutiertem ABCA3 Protein nachweisen. Die Infektion führte bei diesen Zellen zu einer Zunahme der mesenchymalen Eigenschaften⁵⁵.

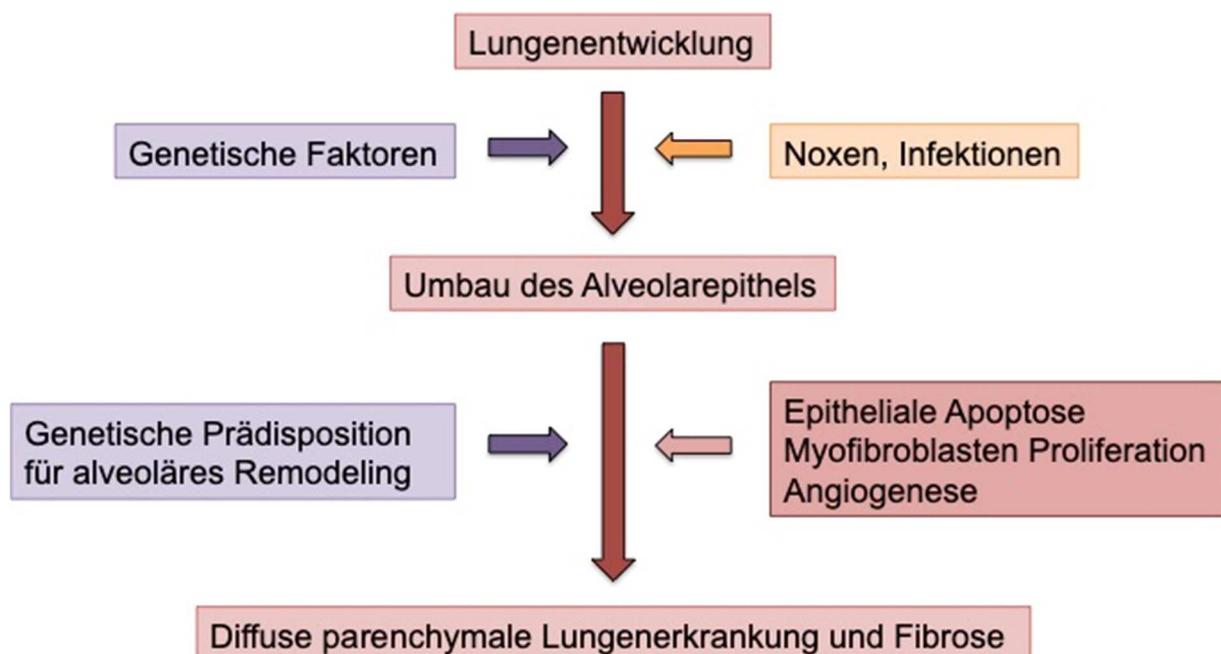


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Entstehung von interstitiellen Lungen Erkrankungen⁵⁴

1.4.4 Symptomatik

Da die Symptomatik der ILE im Kindesalter oft schleichend beginnt, wird diese häufig erst spät erkannt. Bei Säuglingen treten initial oftmals Trinkschwächen und Gedeihstörungen auf. Bei Störungen der Surfactant Produktion kann sich aber auch schon bereits kurz nach der Geburt eine respiratorische Insuffizienz mit Dyspnoe, Tachypnoe, Orthopnoe und Zyanose manifestieren. Klinisch fallen dabei interkostale Einziehungen und Nasenflügeln auf. Ältere Kinder klagen im Verlauf über einen Leistungsknick im Alltag, sowie eine mangelnde Größen- und Gewichtszunahme. Die Patienten zeigen eine rasselnde Atmung mit Knistern oder Pfeifen, einen

anhaltenden Husten und Zyanosezeichen. Im Verlauf entwickeln sie Trommelschlägelfinger und Uhrglasnägel als Zeichen einer chronischen Hypoxie¹⁰.

1.4.5 Diagnostik

In einer ausführlichen Anamnese sollte neben pulmonalen Symptomen auch auf Hinweise für Systemerkrankungen, gestörtes Trinkverhalten, Gedeihstörungen, mögliche Aspirationen, auf Schwangerschafts- und Geburtsverlauf, sowie auf die ausführliche Familienanamnese eingegangen werden. Dabei sollte nach Lungenerkrankungen, Immundefekten und unklaren Todesursachen gefragt werden. Des Weiteren ist bei älteren Kindern eine Umgebungsanamnese bezüglich Stäuben, Schadstoffen und Medikamenten wichtig¹⁰.

Zur initialen Diagnostik gehört die Kontrolle der Sauerstoffsättigung und eine Blutgasanalyse in Ruhe sowie bei Belastung, eine Lungenfunktionsdiagnostik, ein Röntgen Thorax, ein Elektrokardiogramm (EKG), eine Echografie, eine infektiologische Diagnostik mit immunologischer Basisdiagnostik, sowie der Ausschluss wichtiger Differenzialdiagnosen mit Schweißtest, Zilienfunktion und pH-Metrie. Wenn sich aus diesen diagnostischen Mitteln noch keine Diagnose ergibt, muss eine erweiterte Diagnostik durchgeführt werden. Dazu zählen ein High Resolution CT (HR-CT), eine Bronchoskopie mit BAL und eine molekulargenetische Diagnostik. Falls auch diese Untersuchungsergebnisse nicht eindeutig sind, muss eine Lungenbiopsie erfolgen^{56,10}.

Goldstandard der Bildgebung ist ein HR-CT des Thorax, bei dem am häufigsten typische Milchglasverdichtungen zu sehen sind. Es können aber auch noduläre, retikuläre, zystische und wabenartige Strukturen auffallen. Auf einer normalen Röntgen Thorax Aufnahme kann aufgrund der geringen Sensitivität eine ILE nicht ausgeschlossen werden. Eine für eine ILE typische Aufnahme würde diffuse, milchglasartige Verschattungen und retikuläre Zeichnungsvermehrungen aufweisen^{56,10}.

In der Lungenfunktion fällt eine restriktive Ventilationsstörung auf. Neben der Bodyplethysmographie kann auch die Lungencompliance und CO-Diffusionskapazität gemessen werden, die entsprechend erniedrigt sind. Leider kann

diese Methode erst ab dem 5.-6. Lebensjahr eingesetzt werden, gilt dann aber als wichtigste nicht-invasive Methode zum Verlaufsmontoring¹⁰.

Die Bronchoskopie dient dem Ausschluss von Atemwegsanomalien, die BAL dem Ausschluss bzw. Nachweis von Infektionen, Nachweis von krankheitsspezifischen Zellen, z.B. Schaumzellenmakrophagen, und der Surfactant Analyse. Der gewonnene Surfactant kann im Verlauf biochemisch aufbereitet und der Lipid- und Proteinanteil mit Hilfe von Massenspektrometrie, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Blots analysiert werden^{11,57}.

Eine Lungenbiopsie wird nur dann durchgeführt, wenn mit allen anderen Methoden keine sichere Diagnose gestellt werden konnte. Die Entnahmestelle wird mit Hilfe der HR-CT bestimmt. Die Proben sollten im Anschluss in Formalin fixiert und in eine Referenzpathologie zur Diagnostik geschickt werden¹⁰.

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer familiären Erkrankung sollte eine genetische Untersuchung durchgeführt werden. Dabei sollte der Fokus auf den folgenden Genen liegen, die zu einer ILE führen können: *SFTPB* (codierend für SP-B), *SFTPC* (codierend für SP-C), *ABCA3*, *NKX2.1* (codierend für den Thyroid transcription factor-1 (TTF1)) sowie *CSFRA* und *CSFRB* (codierend für die Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) Rezeptoren α und β)⁵⁸. Eine Haploinsuffizienz im *NKX2.1*-Gen kann zum Brain-Lung-Thyroid Syndrom und damit zu einem respiratorischen Versagen führen⁵⁹, Mutationen im *SFTPC*-Gen führen zu einer Surfactantinsuffizienz mit Alveolar Proteinose und ILE und Mutationen im *SFTPB*-Gen sind mit einem akuten RDS assoziiert⁶⁰.

1.4.6 Therapieoptionen

Da die ILEs in der Pädiatrie nur sehr selten auftreten, gibt es aktuell keine systematischen Therapiestudien und keine zielgerichteten Therapien. Die am häufigsten angewendeten Medikamente sind antiinflammatorische Glukokortikoide, sowie Hydroxychloroquin, das antifibrotisch wirken soll. Falls diese Medikamente keine Wirkung zeigen, kann man über den Einsatz von weiteren Immunsuppressiva nachdenken. Hier können Azathioprin, Cyclophosphamid, Methotrexat, Cyclosporin, Anti-Tumor Nekrose Faktor (Anti-TNF) Medikamente und Immunglobuline zum

Einsatz kommen. Die Ultima Ratio stellt am Ende bei ausbleibendem Therapieansprechen eine Lungentransplantation dar¹⁰.

Supportiv sollte an regelmäßige Physiotherapie und bei Gedeihstörungen an diätische Maßnahmen, mit ggf. einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie- (PEG-) Anlage, gedacht werden. Infektionen sollten bereits frühzeitig antibiotisch therapiert werden und ein ausreichender Impfschutz inklusive Influenza sollte angestrebt werden. Die Patienten sollten von inhalativen Noxen z.B. Tabakrauch ferngehalten werden. Bei Sauerstoffbedarf sollte frühzeitig mit einer O₂-Therapie begonnen werden, um die Ausbildung eines *Cor pulmonale* zu verhindern¹⁰.

Neben der medikamentösen und supportiven Therapie sollten die Patienten und ihre Angehörigen psychosozial begleitet und unterstützt werden.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe man direkt die Funktion des ABCA3 Transporters analysieren kann. Zum aktuellen Zeitpunkt gab es lediglich Methoden, die die Lipidzusammensetzung der gesamten Zelle analysieren können (z.B. Massenspektrometrie), jedoch keine, die die Funktion des ABCA3 Transporters auf Ebene der LBs in den Fokus nehmen kann. Die Herausforderung die sich bei der Analyse des ABCA3 Transporters ergibt, ist, dass dieser vorwiegend intrazellulär lokalisiert ist und dort seine Funktion in der äußeren Membran der LBs ausübt.

Die Ansprüche die an die Methode gestellt wurden und die Fragen die zu beantworten waren:

- Entwicklung einer Methode, die den Lipidtransport auf Ebene der LBs messen kann.

Dazu wurden Lipidmischungen (Liposomen), die dem humanen Surfactant in ihrer Zusammensetzung nachempfunden waren und fluoreszierendes Phosphatidylcholin (TopF-PC) enthielten, hergestellt und die ABCA3-HA Wildtyp (WT) bzw. mutierten Zellen (p.E292V, p.K1388N) mit dieser Lipidmischung inkubiert. Im Anschluss konnten innerhalb der ABCA3+ Vesikel die fluoreszierenden Lipide mit dem Konfokalmikroskop dargestellt werden und die Fluoreszenzintensität des TopF-PCs mit Hilfe des Fiji Plug-Ins Particle_in_Cell-3D gemessen werden. Neben der Fluoreszenzintensität wurde auch das Volumen der LBs bestimmt.

- Wie entwickelt sich der Lipidtransport über einen Zeitraum von 24h?

Dazu wurden ABCA3 WT-Zellen über 24h mit Lipiden inkubiert und die Lipidkonzentration in den ABCA3+ Vesikeln zum Zeitpunkt 0h, 4h, 8h, 12h und 24h gemessen.

- Welche Auswirkungen haben eine höhere und eine niedrigere Lipidkonzentration auf die Transportfunktion?

Dazu wurden die ABCA3 WT-Zellen mit Liposomenverdünnungen von 1:2, 1:20 und 1:200 über 24h inkubiert und im Anschluss die Lipidkonzentration in den Vesikeln bestimmt.

- Ist der Lipidtransport ABCA3 abhängig und kann dieser inhibiert werden? Kann hier ein Unterschied mit der neuen Methode nachgewiesen werden?
Dazu wurden ABCA3 WT Zellen für 24h mit den Liposomen und für 22h mit dem ATPase Inhibitor Orthovanadat behandelt und im Anschluss die Lipidkonzentration in den ABCA3+ Vesikeln gemessen und mit Zellen verglichen, die nur mit den Liposomen behandelt wurden.
- Welche Auswirkungen haben die Mutationen p.K1388N und p.E292V auf den Lipidtransport?
Dazu wurden Zellen mit diesen ABCA3 Mutationen für 24h mit den Liposomen inkubiert und im Anschluss die Lipidkonzentration in den LBs mit ABCA3 WT Zellen verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Arbeitsbank Zellkultur	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Blot-Kammer Xcell SureLock™ Mincell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Blot-Modul Xcell II™ E19051	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank Galaxy® 170R	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Bunsenbrenner Fireboy Plus	INTEGRA Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Cellometer® Auto T4 Cell Counter	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Fast Real-Time PCR System 7900HT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Feinwaage R200D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Flüssigstickstofftank Cryo 200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glaskolben Duran 50ml	Lenz Laborglas, Wertheim, Deutschland
Inkubator <i>New Brunswick Galaxy 170R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Konfokalmikroskop Leica	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank (+8°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Malvern laser particle analyser	Zetasizer, Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland

Material und Methoden

Mehrfachdispenser HandyStep®	BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland
Mikroplatten Spektralphotometer Eon™	BioTek Instruments, Vermont, USA
Mini Zentrifuge Rotilabo®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
NS-Hahn, Übergangsstück	Lenz Laborglas, Wertheim, Deutschland
PCRThermocycler T1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Pipette Xplorer® 15-300µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Research® Plus (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Easypet® 4421	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plattenzentrifuge PerfectSpin P	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Spektralphotometer NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ThermoBlock TDB 120	BioSan, Riga, Lettland
Ultrazentrifuge Optima™ TLX	Beckman Coulter, Brea, USA
Ultrazentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Schüttler 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad Zellkultur	GFL, Burgwedel, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cellometer® Einweg-Zählkammern	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Gefriergefäß CryoPure (1,6ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Ibidi-Slides µ-Slide 8 Well	Ibidi, Planegg, Deutschland
Pasteurpipetten Glas (225mm)	BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10µl, 100 µl, 200 µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Combitips advanced® (5 ml, 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-Lock (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Real time PCR Plates 96 well	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Serologische Einwegpipetten Costar® Stripette® (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning Life Science, Corning, USA
Zellkulturflaschen T75 (250ml/ 75cm ²)	BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur Platten 12-Well	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zellkultur Platten 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugen Tubes (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugen Tubes Falcon™ (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Pufferlösungen

Chemikalie	Hersteller
Cholesterol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Merck Schuchardt, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diamidinphenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Merck Millipore, Burlington, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraacid (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd	Merck Millipore, Burlington, USA
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Merck Millipore, Burlington, USA
Magermilchpulver	Merck Millipore, Burlington, USA
Methanol	Merck Millipore, Burlington, USA
Natriumchlorid	Merck Millipore, Burlington, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ortho-vanadate	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
OptiMEM reduced Serum Medium	ThermoFisher, Waltham, USA
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Pre-stained Protein Standard Novex® Sharp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Propargylcholine	Jena Bioscience, Jena, Deutschland
L- α -Phosphatidylcholine (Egg-PC)	Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA
16:0 Phosphatidylcholine	Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA
Phosphatidylglycerol	Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640 Medium + GlutaMAX™, Gibco®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Saponine	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5-TAMRA-PEG3-Azide	Base click, Neuried, Deutschland
Terralin® protect	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
TopFluor Phosphatidylcholine (TopF-PC)	Avanti Polar Lipid, Alabaster, USA
Triphenyltetrazoliumchlorid (XTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
X-tremeGENE HP DANN transfection reagent	Roche, Mannheim, Deutschland
Wasser (nukleasefrei)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Immunfluoreszenz-Puffer (IF-Puffer)

FCS	10%
BSA	3%

3.1.4 Geräte und Kits

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

3.1.5 Zelllinien und Plasmide

Zelllinie	Artikelnummer	Hersteller
A549	# ACC 107	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
Escherichia coli	# C 2987	New England BioLabs,

Ipswich, USA

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

3.1.6 Primer für Site Directed Mutagenesis und qPCR

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

ABCA3 Mutation	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
p.E292V (c.875A>T)	AGGCTGAAGGTGTACATGCGC	CCTTTCCTTCTCCTGCAC
p.K1388N (c.4164G>C)	AGCTCTCCAACGTGTACGAGC	CCTTGATAATCAGAGGTGTG

ABCA3 Mutation	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
p.E292V (c.875A>T)	AGGCTGAAGGTGTACATGCGC	CCTTTCCTTCTCCTGCAC
p.K1388N (c.4164G>C)	AGCTCTCCAACGTGTACGAGC	CCTTGATAATCAGAGGTGTG

Gen in der qPCR	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ABCA3	CATGGTCAGCACCTTCTTCA	TTCTGGCTCAGAGTCATCCA
p.K1388N (c.4164G>C)	AGCTGACCTGCTGGATTAC	TGCGACCTTGACCATCTT

3.1.7 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
------------------	------------

Anti-HA (monoklonal, Ratte)	Roche, Mannheim, Deutschland
Sekundärantikörper	
Alexa-Fluor® 555 Anti-Ratte (Ziege)	IgG Roche, Mannheim, Deutschland

3.1.8 Software

Software	Version	Hersteller
Clone Manager Suite	6.0	Sci-Ed Software, Denver, USA
Fiji		Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
GraphPad Prism	5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
ImageJ	1.5	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Leica Microsystems LAS AF		Leica, Wetzlar, Deutschland
NEBaseChanger™	1.2	New England BioLabs, Ipswich, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Klonierung und stabile Transfektion von A549-Zellen

Zur besseren Detektierbarkeit wurde ein c terminaler HA-Tag an die humane ABCA3 complementary DNA (cDNA) (Referenz: NM_001089) gebunden und um die Expression zu steigern, an einen Cytomegalievirus- (CMV-) Promotor gekoppelt. Diese CMV-ABCA3-HA-Sequenz wurde in einen pT2/HB-Transposon Vektor kloniert, der ein Puromycin-Resistenzgen inklusive zugehörigem Phosphoglyceratkinase- (PGK-) Promotor enthielt. Dies ermöglichte eine spätere Selektion nach der Zelltransfektion.

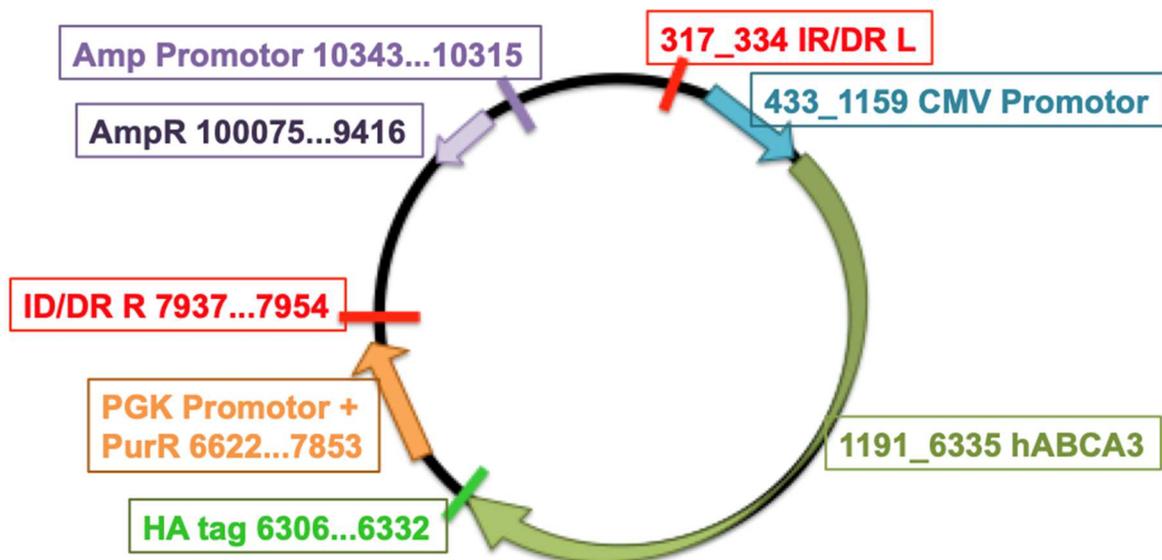


Abbildung 9 Vektor pT2/HB-Transposon-Vektor mit humanem ABCA3

Darstellung des klonierten Vektors mit Gen Abschnitten codierend für den ABCA3 Transporter (grün) mit HA tag (hellgrün), CMV Promotor (türkis) und Puromycinresistenz (PurR) mit PKG-Promotor (orange). Die umgebenden inverted repeats (IR) dienen als Schnittstelle für die sleeping beauty Transposase SB100. Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid, dem bakteriellen Replikationsursprung entsprechend, in umgekehrter Leserichtung eine Ampicillinresistenz mit zugehörigem Promotor (lila) für die positive Selektion transformierter Bakterien.

Die jeweiligen ABCA3 Mutationen wurden durch gezielte Mutagenese mit dem Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit eingefügt. Die entsprechenden Primer wurden mit der Software NEBaseChanger™ entworfen und von Metabion als Mismatch Primer

synthetisiert. Die PCR Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Mutationen wurden mit Hilfe von Sanger Sequenzierung verifiziert.

In Summe wurden damit für diese Arbeit folgende Plasmidvektoren hergestellt: pT2/HB-Puro-ABCA3-HA als ABCA3 WT, sowie die entsprechenden Mutationen p.E292V (c.875A>T) und p.K1388N (c.4164G>C).

Im Anschluss daran wurden nun die Plasmidvektoren in *E. coli* Bakterien vervielfältigt. Dazu wurden die Plasmide, die zusätzlich ein Ampicillin Resistenzgen im Leseraster nach dem bakteriellen Replikationsursprung beinhalten, mit Hilfe von Elektroporation bei 1,80kV in *E. coli* eingebracht. Die Selektion erfolgte mittels Ampicillin im Kulturmedium. Die Plasmidvektoren wurde im Anschluss mit dem Plasmid DNA Prep Kit isoliert.

3.2.2 Zellkultur

Alle folgenden Zellversuche wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkultur Arbeitsbank unter Verwendung von ausschließlich sterilen Reagenzien und Geräten durchgeführt.

3.2.2.1 Kultur von A549 Zellen

Die in Stickstoff gelagerten A549 Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine mit 10ml Nährmedium (RPMI+10%fetales bovines Serum (FBS)) gefüllte T75-Flasche gegeben. Diese wurde im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ für ca. zwei Tage aufbewahrt bis sich die Zellen am Flaschenboden angelagert haben und das Medium gewechselt werden konnte. Dafür wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 10ml frisches Nährmedium ersetzt.

Nach ca. fünf Tagen hatten sich die Zellen ausreichend vermehrt und konnten gesplittet werden. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 10ml Phosphate-Buffered Saline (PBS) gewaschen und für zehn Minuten mit 5ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Nach der Inkubation wurden 5ml Nährmedium zugegeben, um den Ablösungsvorgang durch Inhibition des Trypsins zu stoppen. 9ml der Zellsuspension wurden abgenommen und verworfen bzw. für weitere Experimente verwendet, 1ml wurde in der T75-Flasche zurückgelassen und mit 9ml

Nährmedium aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen zurück in den Inkubator gestellt.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen aus einer dicht bewachsenen T75 Flasche gelöst, das Medium wurde abzentrifugiert und abgesaugt und die Zellen in 1ml Einfriermedium (50%FBS, 40%RPMI, 10%Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in Cryotubes transferiert. Diese wurden für mindestens 24h bei -80°C aufbewahrt, bevor sie in flüssigen Stickstoff (-180°C) umgelagert werden konnten.

3.2.2.2 Stabile Transfektion von A549 Zellen

Ziel der stabilen Transfektion ist es, die fremde DNA dauerhaft in das Genom der Zelle zu integrieren. Hierfür wurde in dieser Arbeit das Sleeping-Beauty-Transposon System verwendet⁶¹. Dazu musste die passende DNA in einen Transposon Vektor mit flankierenden, sich gegenläufig wiederholenden Endsequenzen kloniert werden. An den Endsequenzen konnte die passende Sleeping Beauty Transposase SB100 schneiden, um gezielt den Abschnitt mit der zu transfizierenden DNA aus dem Vektor freizusetzen und in das Genom der Zelle einzufügen. Dazu wurden A549 Zellen mit einer Konzentration von 400.000 Zellen/ml in 6-Well-Zelkulturplatten ausgebracht und nach 24h Lagerung im Brutschrank durch Lipofektion mit Lipofektamin P3000 transfiziert. Dafür musste zuerst die DNA (4µg, Plasmidvektor und Transposase, Verhältnis 5:2) mit 8µl P3000 in Opti-MEM gelöst, anschließend mit 7,5µl Lipofektamin vermischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert werden. In diesem Zeitraum konnte die DNA von Lipofektamin eingeschlossen werden. Im Anschluss daran wurde die DNA in die entsprechenden Wells mit den A549 Zellen gegeben werden, damit die Zellen die DNA inkorporieren konnten. Nach 48h Inkubation im Brutschrank wurde die Selektion der positiv transfizierten Zellen durch Zugabe von 1µg/ml Puromycin in das Kulturmedium durchgeführt. Nach 7d wurden die erfolgreich transfizierten Zellen vereinzelt, in dem sie auf 5 Zellen/ml verdünnt und mit je 200µl pro Well in 96-Well Platten vereinzelt wurden. Durch tägliche Kontrolle der Platten konnten bereits nach wenigen Tagen einzelne Zellkolonien, die von einer einzelnen Vorläufer Zelle ausgegangen sind, unter dem Mikroskop detektiert werden. Diese Kolonien wurde manuell abgelöst und nach und nach in

zentrifugiert, die flüssige Phase mit den Liposomen abgenommen, in ein steriles 2ml Gefäß gegeben und bei 4°C lichtgeschützt bis zum endgültigen Gebrauch gelagert.

Mit einem Malvern Laser Particle Analyser wurde bestätigt, dass die Liposomen unilamellar waren, eine Größe von ca. 100nm aufwiesen und einen Polydispersity Index von 0,4 hatten.

Zur Behandlung der Zellen mit den Surfactant-artigen Liposomen, wurden diese in OptiMEM Medium in einem Verhältnis von 1:20 für alle grundlegenden Experimente bzw. in einem Verhältnis von 1:2 und 1:200 für die dosisabhängigen Experimente gelöst.

Zur Durchführung der Experimente wurden die Zellen in μ -slides mit acht einzelnen Zellkammern ausgesät und für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die folgenden Experimente wurden die gleichen Konditionen jeweils als Duplikate angefertigt. Nach der 24 stündigen Inkubation wurden die Zellen für 15min bei 4°C gelagert, um den Zellstoffwechsel herunter zu fahren. Das Zellmedium wurde abgesaugt und durch die OptiMEM-Liposomen Mischung (100 μ l/ Well) ersetzt. Die Zellen wurden nun für 30min bei 4°C inkubiert, damit sich die Liposomen an der Zelloberfläche anlagern können (siehe Abbildung 11A). Darauf folgend wurde die Liposomenmischung durch angewärmtes OptiMEM Medium (200 μ l) ersetzt und die Zellen wurden je nach Experiment für unterschiedliche Zeitperioden (4h, 8h, 12h, 24h) oder für ausschließlich 24h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In diesem Zeitraum konnten die Zellen die Lipide über den Lipid Recycling Mechanismus in die Zelle aufnehmen und im Anschluss ABCA3 vermittelt in die LBs transportieren (siehe Abbildung 11B). Um die Lipidaufnahme in die Zelle zu beenden und die Lipide von der äußeren Zellmembran zu entfernen, wurde das OptiMEM durch gekühltes 5% bovines Serum Albumin (BSA) gelöst in PBS ersetzt und es folgte eine Inkubation bei 4°C für weitere 30min. Abschließend wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 20min fixiert und mit 0,1% Glycin für 10min behandelt.

In einem Versuchsansatz wurde 2h nach der Zugabe der Liposomen, das Medium durch OptiMEM mit 12,5mM Orthovanadat ersetzt, um die ATPase Aktivität des ABCA3 Transporters zu hemmen (siehe Abbildung 11C).

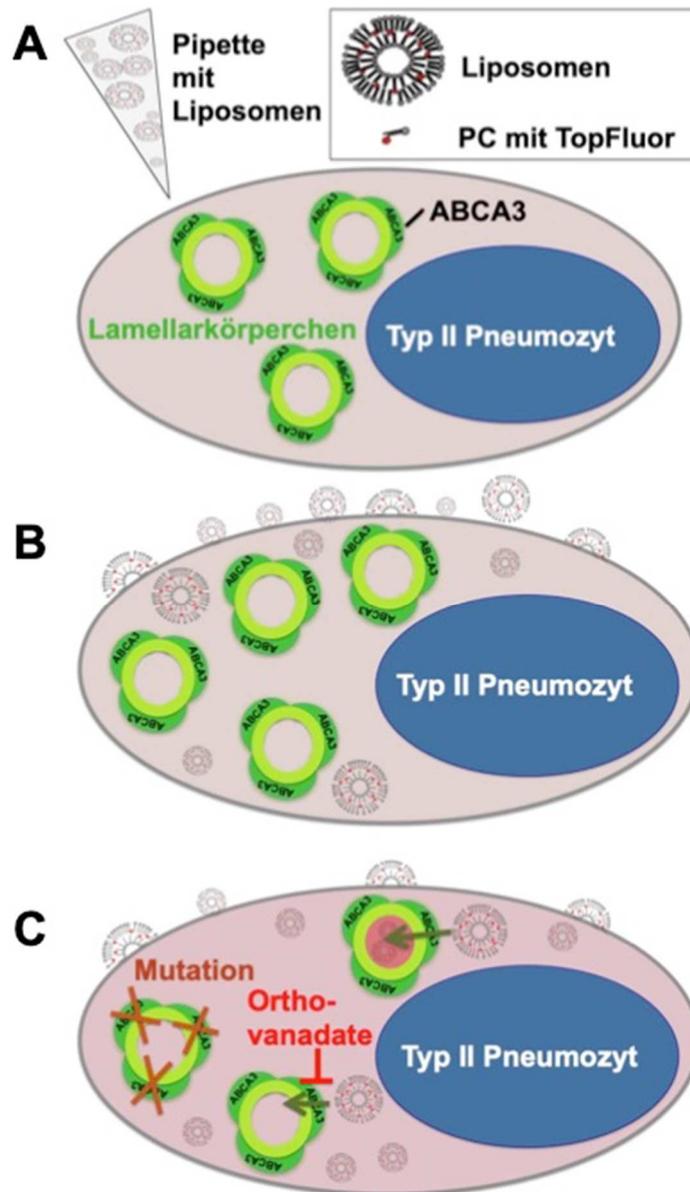


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Zellbehandlung mit den Liposomen

Die Liposomen werden zu den Zellen gegeben und inkubiert (A). Dabei werden die Lipide in die Zellen aufgenommen (B) und dann ABCA3 abhängig in die Lamellarkörperchen transportiert (C). Der Transport kann durch Mutationen oder Orthovanadate gehemmt werden.

3.2.2.4 Zytotoxizität von TopF-PC

Um eine Zytotoxizität von TopF-PC auf die Zellviabilität ausschließen zu können wurde ein XTT-Assay durchgeführt. Dazu wurden WT-ABCA3 Zellen mit einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml in phenolrotfreiem RPMI Medium mit 10% fetal calf serum (FCS) in 96-Well Platten ausgebracht und für 24h inkubiert. Im Anschluss wurde die Liposomenmischung in einem Verhältnis von 1:20 in OptiMEM gelöst und

für weitere 24h in einen Teil der Wells gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde Triphenyltetrazoliumchlorid- (XTT-) Salz in phenolrotfreiem RPMI (1mg XTT/ml) gelöst und zusammen mit Phenazinmethosulfat (PMS) auf die Zellen mit bzw. ohne Liposomen gegeben. Während einer Inkubationszeit von 30min können metabolisch aktive Zellen das XTT durch komplexe zelluläre Mechanismen in Formazan umwandeln. Dieser Stoffwechselschritt kann nur in lebendigen Zellen ablaufen und ist von der NAD(P)H Produktion in der Glykolyse abhängig. Dadurch korreliert die Menge an Formazan im Zellüberstand direkt mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen. Mit Hilfe eines Spektralphotometers kann die Absorption, und damit die Menge von Formazan bei 450nm gemessen werden. Je höher die Absorption ausfällt, desto mehr lebendige Zellen, die XTT zu Formazan umwandeln können, liegen vor.

3.2.2.5 Immunfluoreszenzbehandlung

Die fixierten Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 0.5% Saponin gelöst in PBS für 10min permeabilisiert und im Anschluss für 30min mit einem Blocking Puffer, der 3% BSA und 10% FBS (= IF-Puffer) enthält, inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mit einem primären Antikörper, gerichtet gegen die HA-Markierung (rat anti HA), für eine Stunde behandelt. Der Antikörper wurde in IF-Puffer gelöst und 100µl der Lösung wurden je Well zugegeben. Nachdem die Zellen drei mal mit 300µl PBS gewaschen wurden, wurde der Sekundärantikörper Alexa 555 goat anti rat, ebenfalls in IF-Puffer gelöst, für 30min zugegeben. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 300µl PBS wurden die Zellen für 10min mit DAPI inkubiert, ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und zur Lagerung mit Mounting Medium beschichtet. Dieses bestand aus 90% Glycerin und 20% DABCO (1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane; gelöst in PBS).

3.2.3 Mikroskopie

Von jeder Zellkammer wurden jeweils drei axiale Z-Stacks (Bildstapelserie) (siehe Abbildung 12) mit einer Höhe von 0,4µm, 123,02µm Länge und 123,02µm Breite mit einem Leica Konfokalmikroskop angefertigt, sodass von jeder Behandlungskondition sechs Z-Stacks vorlagen. Das Mikroskop verfügte über eine 405 Diode, einen Argon- und einen Helium-Neon 543 Laser. Alle Aufnahmen wurden unter den gleichen

Bedingungen für die Laser Intensität, Verstärkung, Offset und Blendengröße durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Für die Darstellung der TopFluor-PC Lipide wurde ein Anregungsfilter von 488nm, für den Alexa 555 Antikörper ein Filter von 543nm und für DAPI ein Filter von 405nm verwendet, da hierbei jeweils die stärkste Absorption vorlag.

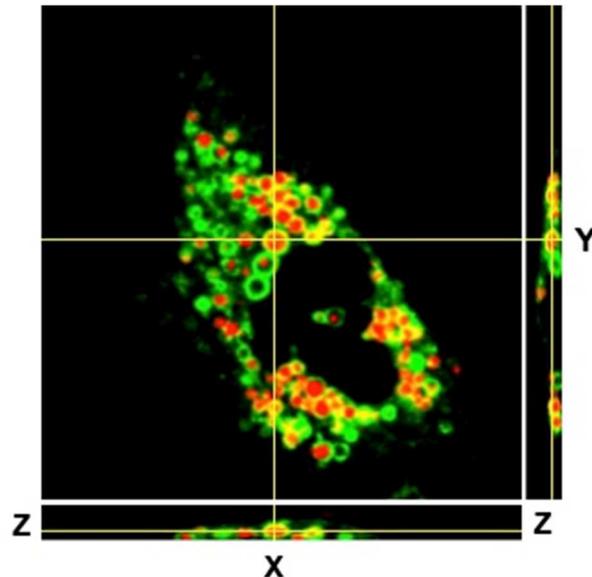


Abbildung 12 3D Darstellung einer Zelle mit WT ABCA3
Der ABCA3 Transporter ist in grün und die Lipide in rot dargestellt.

3.2.4 Fluoreszenzanalyse mit dem Fiji-Plugin `Particle_in_Cell-3D`

Von jedem Z-Stack wurden 20 ABCA3+ Vesikel mit einer Vorlage, die 20 Felder enthält, ausgewählt (siehe Abbildung 13). Um eine unvoreingenommene Auswahl der Vesikel sicherzustellen, wurden die ABCA3 Vesikel im 543nm Filter ausgewählt, der keine Rückschlüsse darauf zulässt, ob die Vesikel mit Lipiden gefüllt sind, oder nicht. Im Anschluss wurden die Lipide im 488nm Filter sichtbar gemacht und die Fluoreszenz Intensität innerhalb der Vesikel, die proportional zum Gehalt an TopF-PC ist, mit dem Fiji-Plugin `Particle_in_Cell-3D` Routine 4 gemessen⁶³. Dies ist ein Plugin, das ursprünglich für die Analyse von Nanopartikeln in einzelnen Zellen verwendet und nun für diese Arbeit an die Analyse von multiplen Vesikeln angepasst wurde. Die Methode erlaubt die Quantifizierung der Lipidaufnahme in die Vesikel.

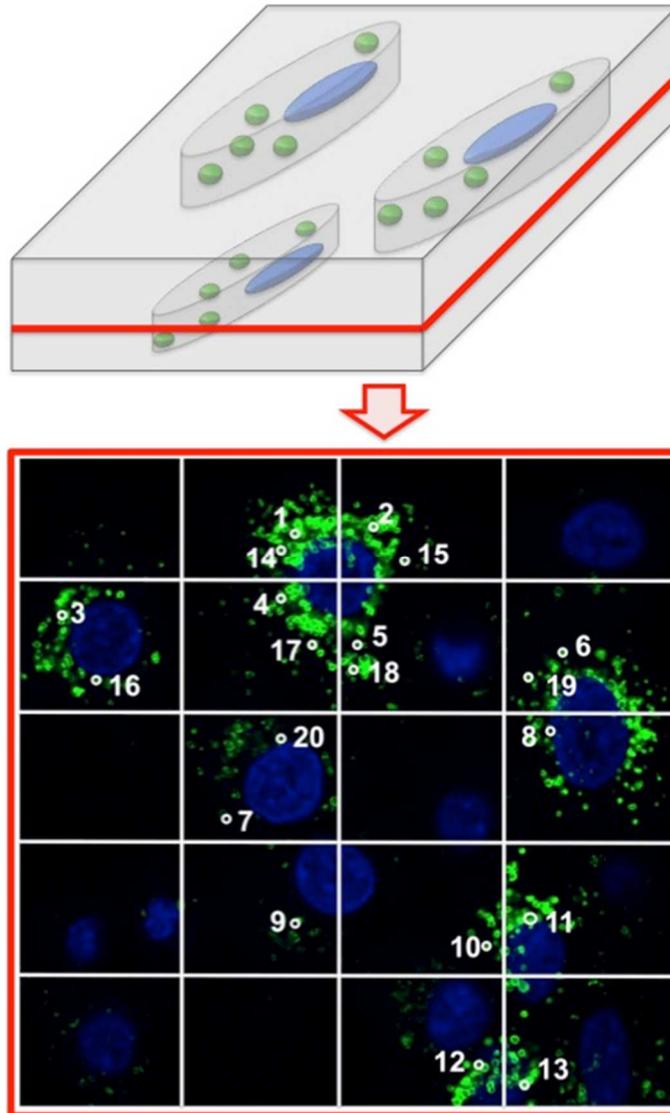


Abbildung 13 Auswahl der ABCA3+ Vesikel (grün) für die weitere Analyse aus einem Z-Stack

Über die Abbildung wurde ein Raster mit 20 Kästchen gelegt, aus denen nacheinander 20 einzelne Vesikel für die Analyse mit dem Fiji Plugin Particle_in_Cell-3D ausgewählt wurden.

3.2.5 Vesikel Volumen

Der Durchmesser der zuvor ausgewählten Vesikel wurde mit der Fiji Software gemessen und das Volumen wurde mit der folgenden Formel unter der Annahme,

dass sphärische Vesikel vorliegen, berechnet: $V = \frac{4}{3}\pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3$

3.2.6 Prozentsatz an gefüllten Vesikeln

Um die Menge an ABCA3+ Vesikeln, die mit fluoreszierenden Lipiden gefüllt sind zu bestimmen, wurde der Prozentsatz der gefüllten Vesikel je analysierter Z-Stack (20 ausgewertete Vesikel) berechnet. Ein Gesamtdurchschnitt wurde ermittelt, indem die einzelnen Stack-Ergebnisse einer Kondition zusammengefasst wurden.

3.2.7 Statistische Analyse

Von allen gefüllten ABCA3+ Vesikeln wurde der Mittelwert und der Standard Fehler der Fluoreszenzintensität berechnet. Zum Vergleich von verschiedenen Gruppen wurde ein one-way repeated measure ANOVA mit Dunnett's multiple comparison Test durchgeführt. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student's t-Test angewendet. Für eine bessere Übersicht wurden nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem ABCA3-WT und den jeweiligen zu untersuchenden Graphen eingezeichnet.

Für die Auswertung und Erstellung der Graphen wurde die Software Graph Pad Prism 5.0 verwendet. P-Werte $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Es gilt:

* = $p < 0.05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,01$

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung von A549 Zellen mit ABCA3 Expression

Um die Funktion des ABCA3 Lipidtransporters analysieren zu können, wurde ein *in vitro* Zellmodell benötigt. Dazu wurden A549 Zellen verwendet, die als Zellmodell für Typ II Pneumozyten fungieren. In das Genom dieser Zellen wurde entweder das ABCA3 WT Gen, oder jeweils eine der in Patienten entdeckten Mutationen (p.K1388N, p.E292V) kloniert. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des Sleeping Beauty Transposon Systems SB100⁶¹ und einem CMV-Promotor, die zusammen eine stabile Transfektion und eine ca. 200-fache Überexpression des ABCA3 Vektors ermöglichten. Dadurch waren die Ergebnisse untereinander vergleichbar.

Die Auswahl der Zellklone anhand ihrer mRNA Expression und ihres Protein Levels wurde von Frau Ulrike Schindlbeck durchgeführt und die ausgewählten Klone für die weitere Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt³⁹.

4.2 Darstellung des ABCA3-Transporters

Um den ABCA3 Transporter optisch darstellen zu können, wurde dieser mit einem Hämagglutinin- (HA)-Tag markiert, an den ein Primärantikörper spezifisch binden konnte. Dieser wiederum konnte über einen fluoreszierenden Sekundärantikörper Konfokal-mikroskopisch dargestellt werden.

4.3 Einfluss der Lipide auf die Zellebensfähigkeit

Mit Hilfe des XTT-Assays konnte der Einfluss der TopF-PC beinhaltenden Liposomen auf die Lebensfähigkeit der Zellen spektroskopisch gemessen und quantifiziert werden. Dazu wurden ABCA3 WT Zellen, die über 24h mit TopF-PC beinhaltenden Liposomen behandelt wurden und unbehandelte ABCA3 WT Zellen mit einem ungepaarten t-Test verglichen. Es ergab sich kein signifikanter (n.s.) Unterschied (siehe Abbildung 14), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die TopF-PC beinhaltenden Liposomen keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben.

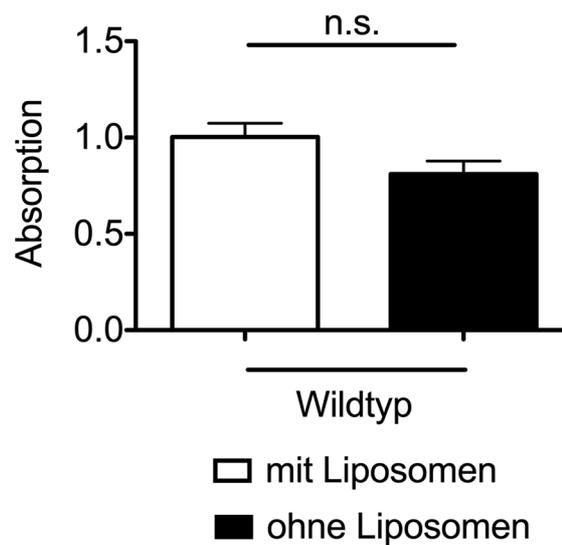


Abbildung 14 Einfluss der Liposomen auf die Zellebensfähigkeit
 Metabolische Aktivität von ABCA3 Wildtyp Zellen mit bzw. ohne Liposomenbehandlung nach 24h Inkubation. Die Aktivität wird mit Hilfe des XTT Assays bestimmt und dabei die spektrale Absorption von Formazan bestimmt. (SEM, n.s.)

4.4 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel

Um die zunehmende Lipidaufnahme in die ABCA3+ Vesikel über einen Zeitraum von 24 Stunden darstellen zu können, wurden die Zellen für jeweils 4h, 8h, 12h und 24h mit den Lipiden inkubiert und im Anschluss daran die Fluoreszenzintensität der Lipide innerhalb der ABCA3+ Vesikel bestimmt (siehe Abbildung 15).

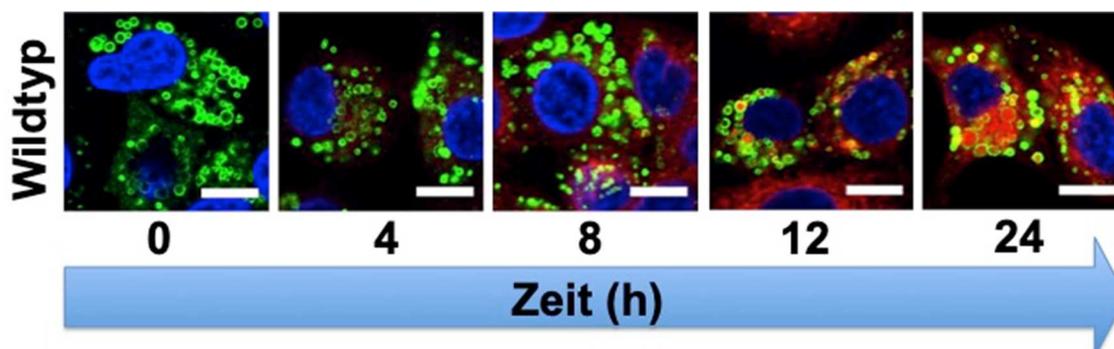


Abbildung 15 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel
 Immunfluoreszenzfärbung von ABCA3-HA WT Protein (grün) in A549 Zellen, jeweils nach

Behandlung der Zellen mit TopF-PC (rot) für 0h, 4h, 8h, 12h und 24h. Die Zellkerne wurden mit DAPI in blau dargestellt. Der Messbalken entspricht 10µm.

Es konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität innerhalb der ABCA3+ Vesikel über den Zeitraum von 24h zugenommen hat (siehe Abbildung 15 und 16) und somit die Lipidaufnahme zeitabhängig ist.

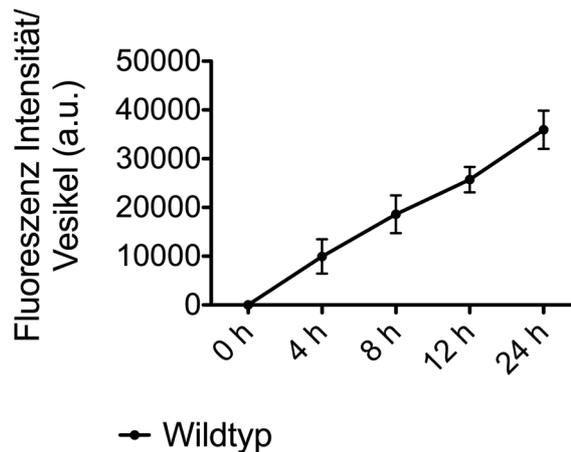


Abbildung 16 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel

Die Fluoreszenzintensität innerhalb von ABCA3+ Vesikeln steigt über einen Inkubationszeitraum von 24h an. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem Fiji Plugin Particle_in_Cell-3D, Angabe in arbitrary units (a.u.).

Der Prozentsatz der gefüllten Vesikel stieg ebenfalls entsprechend im Verlauf von 12h an, stagnierte dann aber bis zum Zeitpunkt von 24h (siehe Abbildung 17), sodass für die folgenden Versuche eine 24 stündige Inkubationszeit der Zellen mit den Liposomen verwendet wurde.

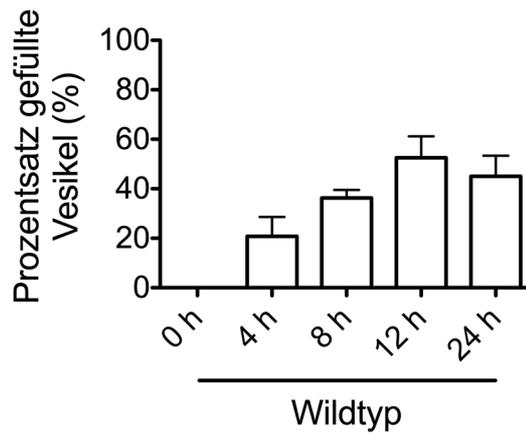


Abbildung 17 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel

Prozentsatz der mit TopF-PC gefüllten ABCA3+ Vesikel innerhalb von 24h Inkubation.

Das Volumen der ABCA3+ Vesikel war über den Inkubationszeitraum von 24h mit den Lipiden gleichbleibend (siehe Abbildung 18).

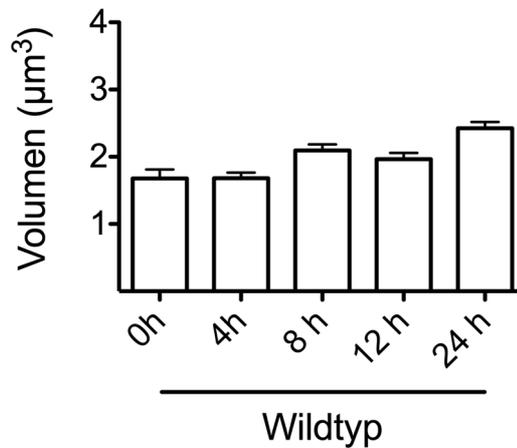


Abbildung 18 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel

Volumen der ABCA3+ Vesikel in μm^3 über einen Zeitraum von 24h. Das Volumen wurde basierend auf dem mit Fiji bestimmten Durchmesser der Vesikel berechnet.

4.5 Konzentrationsabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel

In einer weiteren Versuchsreihe wurden verschiedene Liposomenverdünnungen in OptiMEM Medium (1:200, 1:20, 1:2) verglichen (siehe Abbildung 19).

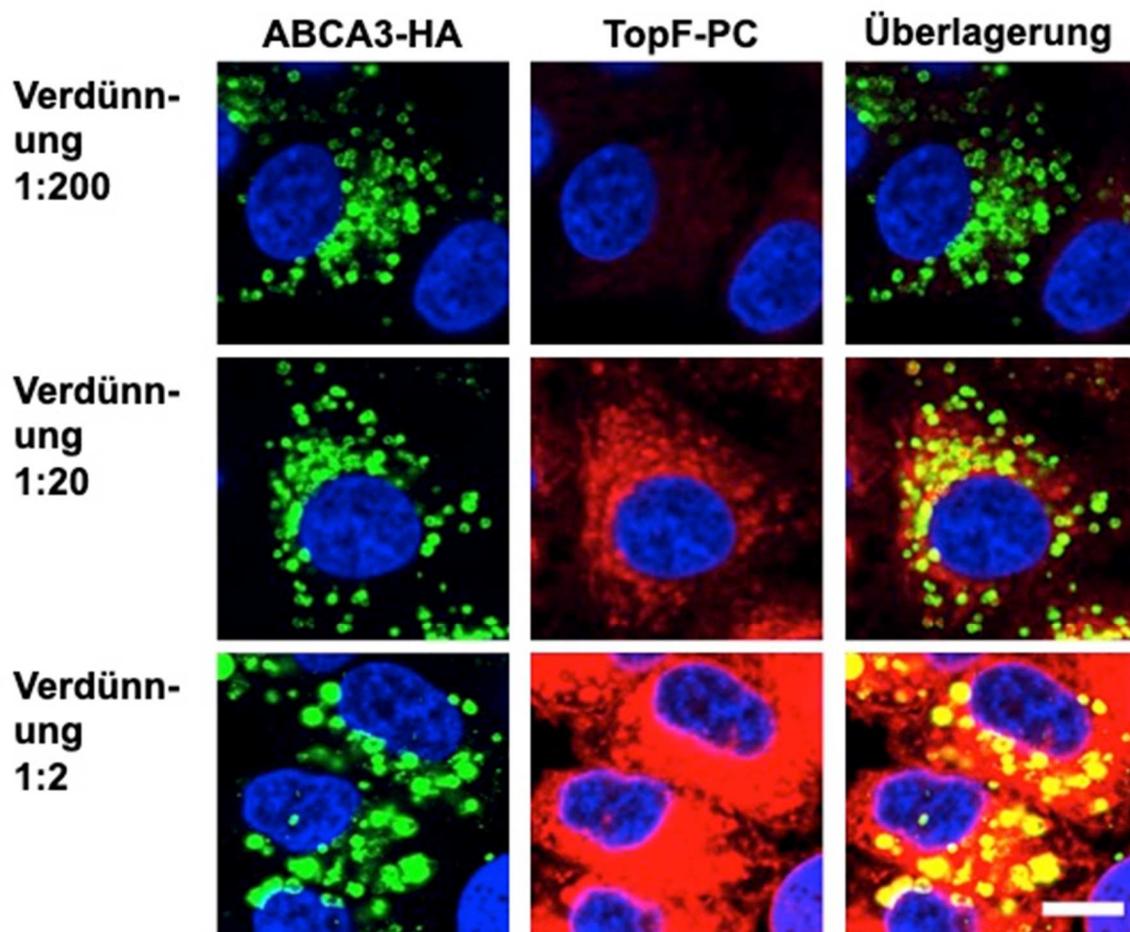


Abbildung 19 Konzentrationsabhängigkeit der Lipidaufnahme in ABCA3+ Vesikel

Immunfluoreszenzfärbung nach Behandlung der ABCA3 WT Zellen mit verschiedenen Lipid-Konzentrationen. Der ABCA3 Transporter wurde mit einem Sekundärantikörper grün markiert. Die Lipide (TopF-PC) sind in rot dargestellt. Dabei wurden TopF-PC beinhaltende Liposomen in OptiMEM im Verhältnis ein Teil Liposomen und 200 Teile OptiMEM, ein Teil Liposomen und 20 Teile OptiMEM sowie ein Teil Liposomen und zwei Teile OptiMEM gelöst und die Zellen damit jeweils für 24h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau markiert. Der Messbalken entspricht 10µm.

Dabei zeigte sich, dass je mehr Lipide der Zelle angeboten wurden, desto effektiver wurden diese ABCA3 vermittelt in die Vesikel transportiert. Die Unterschiede in der

Fluoreszenzintensität innerhalb der ABCA3+ Vesikel waren signifikant in den drei Versuchsgruppen (siehe Abbildung 20).

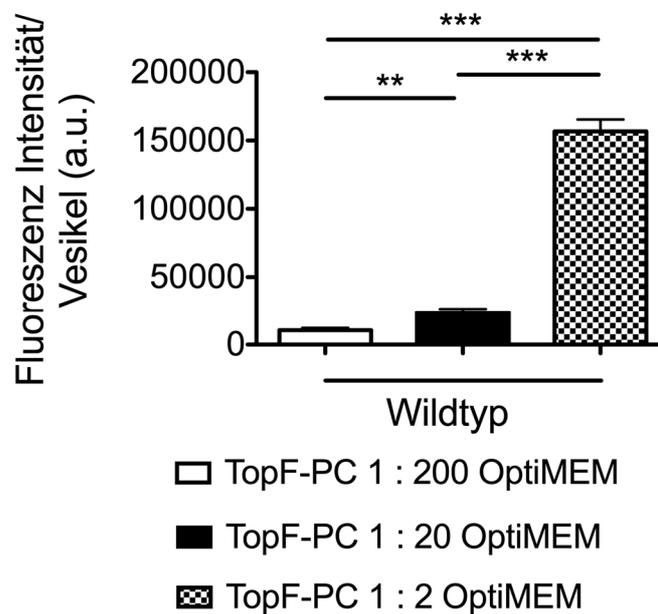


Abbildung 20 Effekte verschiedener Liposomenkonzentrationen auf die Fluoreszenzintensität in den ABCA3+ Vesikeln

Fluoreszenz Intensität je ABCA3+ Vesikel nach 24h Inkubation mit der entsprechenden Lipidkonzentration in a.u., gemessen mit dem Fiji Plugin Particle_in_Cell-3D. (SEM, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$).

Auch die Berechnung des prozentualen Anteils an gefüllten Vesikeln zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Einzelnen Liposomen Verdünnungen (siehe Abbildung 21). Je mehr Liposomen dem ABCA3 Transporter angeboten wurden, desto mehr transportierte dieser in die LBs und desto mehr LBs waren insgesamt mit Lipiden gefüllt.

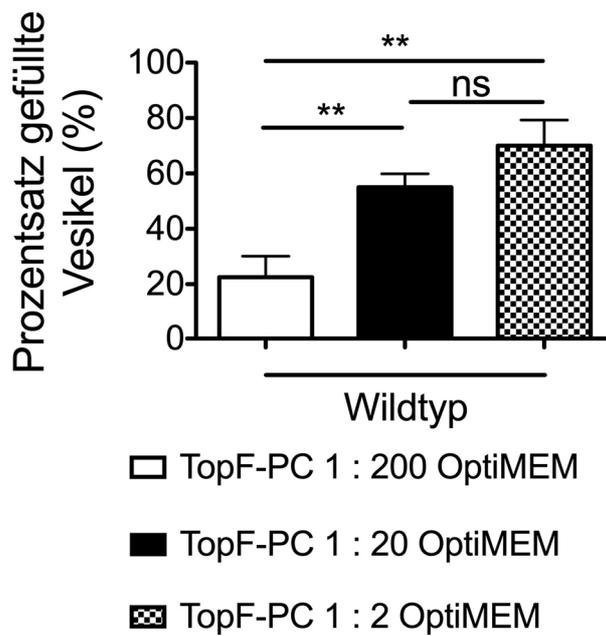


Abbildung 21 Effekte verschiedener Liposomenkonzentrationen auf den Prozentsatz an gefüllten ABCA3+ Vesikeln

Prozentsatz der ABCA3+ Vesikel, die TopF-PC beinhalten. (SEM, ** = $p < 0,01$).

Dabei blieb das Volumen der ABCA3+ Vesikel in allen Versuchsgruppen annähernd gleich (siehe Abbildung 22) und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

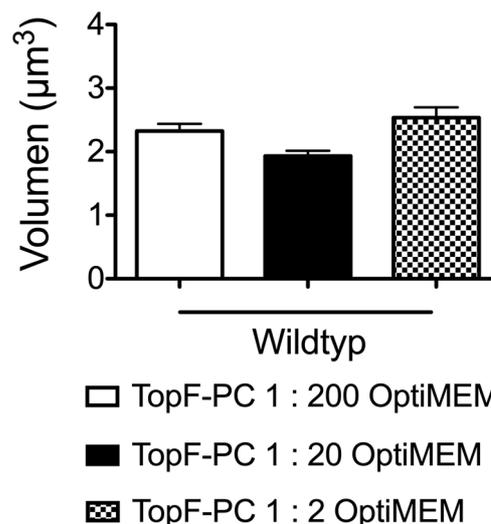


Abbildung 22 Effekte verschiedener Liposomenkonzentrationen auf das Volumen von ABCA3+ Vesikeln

Volumen von ABCA3+ Vesikeln nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Liposomenkonzentrationen für 24h.

Diese Versuchsreihe stellte die Grundlage für die Verwendung der 1:20 Verdünnung der Liposomen in OptiMEM für alle weiteren Experimente dar.

4.6 ABCA3 spezifische Lipidaufnahme in die Lamellarkörperchen

Um nachzuweisen, dass die Lipidaufnahme in die Vesikel aktiv durch ABCA3 durchgeführt wird und keine passive Diffusion der Lipide in die LBs vorliegt, wurden WT-Zellen mit Orthovanadat behandelt. Orthovanadat hemmt die ATPase Aktivität und damit den Motor der ABC Transporter^{64,65}. Um einen Einfluss von Orthovanadat bei der Lipidaufnahme in die Zelle auszuschließen, wurden die Zellen für 2h ausschließlich mit den Liposomen behandelt und im Anschluss daran wurde für 22h Orthovanadat 12,5mM ins Zellmedium zugegeben (siehe Abbildung 23).

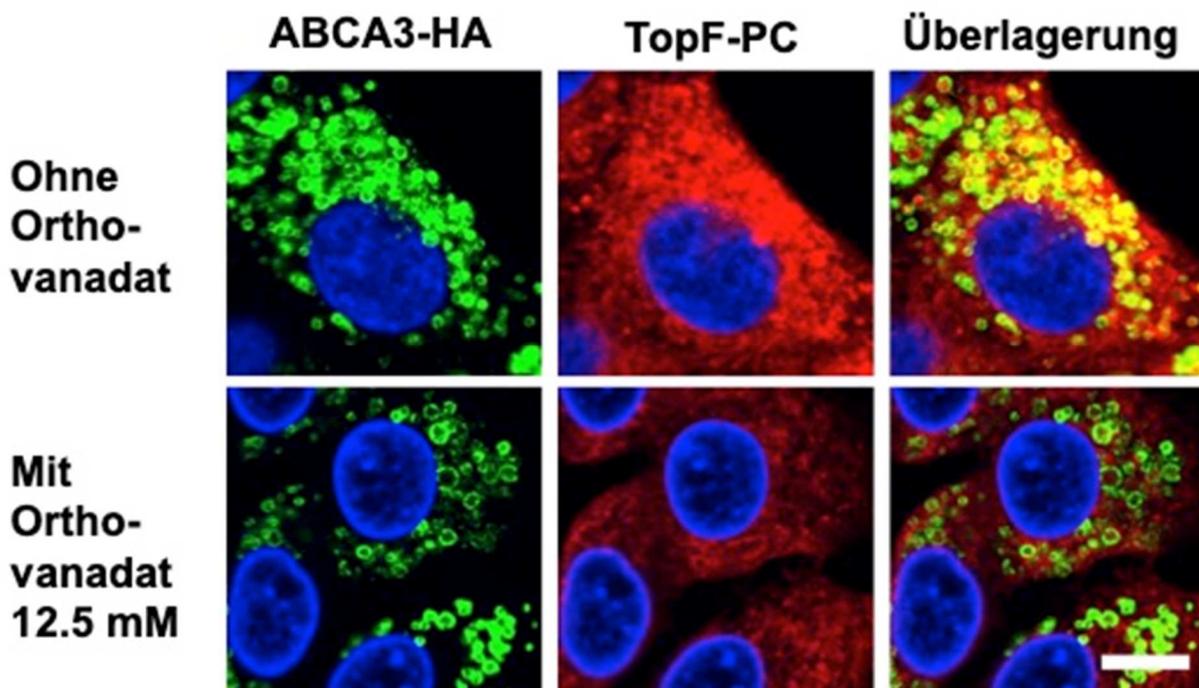


Abbildung 23 ABCA3 spezifische Lipidaufnahme

Fluoreszenzdarstellung der Zellen nach Behandlung mit Liposomen (rot) für 24h und mit bzw. ohne Orthovanadat für 22h. ABCA3-HA Proteine wurden mit Antikörpern markiert (grün). Der Zellkern wurde mit DAPI dargestellt (blau). Der Messbalken entspricht 10µm.

Dabei zeigte sich ein signifikanter Abfall in der Fluoreszenz Intensität in mit Orthovanadat behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 24).

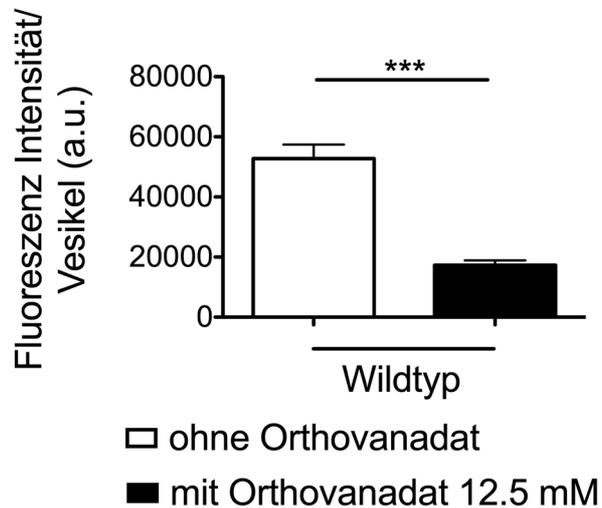


Abbildung 24 Effekte von Orthovanadat auf den ABCA3 Lipidtransport

Fluoreszenz Intensität der Liposomen in ABCA3+ Vesikel in a.u., gemessen mit dem Fiji Plugin Particle_in_Cell-3D. Zellen nach Zustand mit bzw. ohne Behandlung mit Orthovanadat 12.5mM für 22h. SEM, *** P < 0,001.

Der Prozentsatz der gefüllten Vesikel zeigte sich leicht reduziert, jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 25).

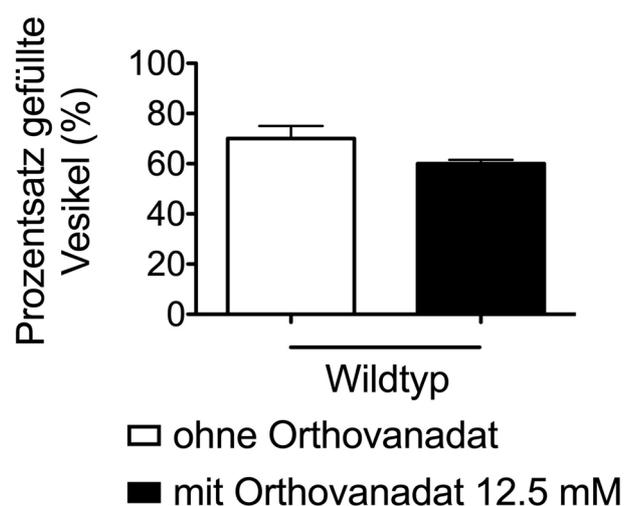


Abbildung 25 Effekte von Orthovanadat auf den ABCA3 Lipidtransport

Prozentsatz der ABCA3+ Vesikel, die TopF-PC enthaltende Liposomen aufgenommen

Ergebnisse

haben, nachdem sie mit Orthovanadat 12.5mM für 22h behandelt wurden. Hier dargestellt im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die Behandlung mit Orthovanadat hatte keinen Einfluss auf das Volumen der Vesikel (siehe Abbildung 26).

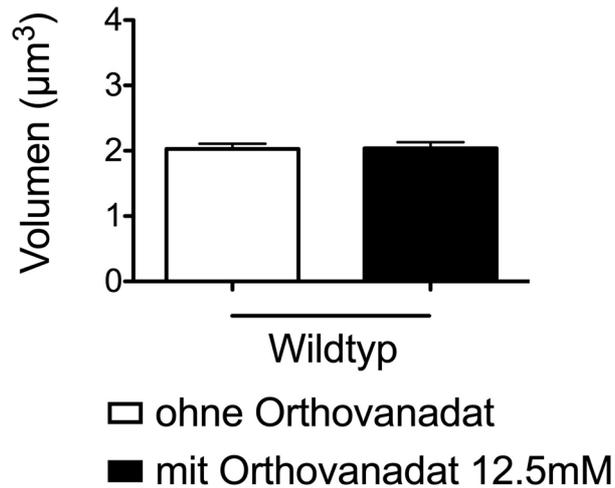


Abbildung 26 Effekte von Orthovanadat auf das Volumen der ABCA3+ Vesikel
Volumen der ABCA3+ Vesikel mit bzw. ohne Behandlung mit Orthovanadat 12.5mM.

4.7 Effekte der Mutationen auf den ABCA3 abhängigen Phosphatidylcholin-Transport und das Vesikelvolumen

Um den Effekt von ABCA3 Mutationen auf den Lipidtransport und die Form der Vesikel untersuchen zu können, wurden zwei verschiedene Mutationen (p.K1388N, p.E292V) ausgewählt, die an unterschiedlichen Stellen im ABCA3 Protein lokalisiert sind (siehe Abbildung 5). Diese Zellen wurden jeweils für 24h mit den Liposomen inkubiert und im Anschluss daran der Lipidgehalt in den LBs und das Volumen der LBs bestimmt (siehe Abbildung 27).

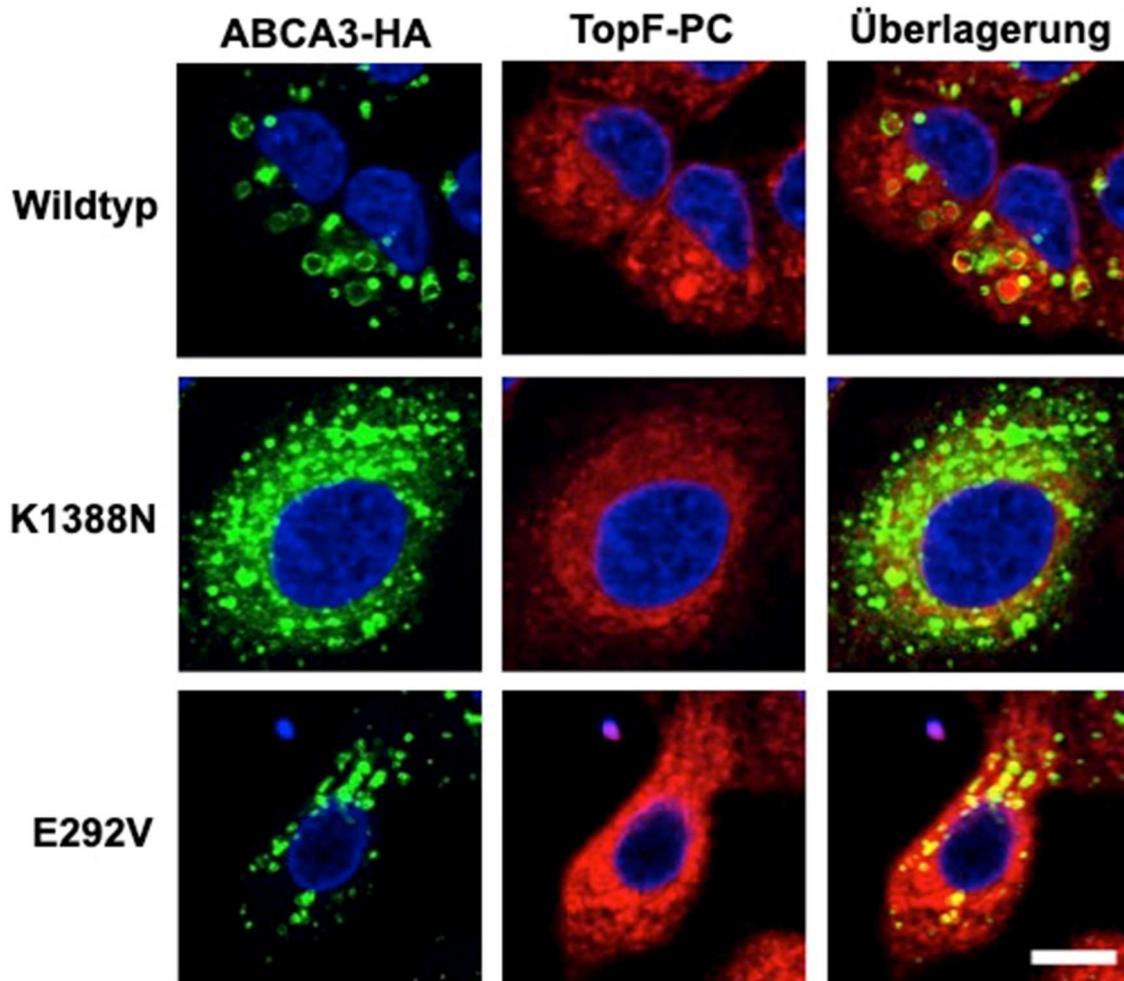


Abbildung 27 Effekte von ABCA3 Mutationen auf den ABCA3 abhängigen Lipidtransport und das Volumen der ABCA3+ Vesikel

Immunfluoreszenz Darstellung von HA-ABCA3-WT, HA-ABCA3-p.K1388N und HA-ABCA3-p.E292V nach Inkubation mit TopF-PC enthaltenden Liposomen für 24h. Der Messbalken entspricht 10 μ m.

Die ABCA3 Mutation p.K1388N, die in räumlicher Nähe zur NBD2 Domäne des ABCA3 Proteins lokalisiert ist (siehe Abbildung 5), zeigte einen deutlichen Effekt auf den Lipidtransport des ABCA3 Proteins. Sowohl die Lipidaufnahme (siehe Abbildung 28), als auch der Prozentsatz der mit Lipiden gefüllten Vesikel war im Vergleich zum WT signifikant verringert (siehe Abbildung 29), ebenso war das Volumen der p.K1388N ABCA3+ Vesikel deutlich kleiner (siehe Abbildung 30).

Im Vergleich dazu zeigte die ABCA3 Mutation p.E292V, die sich in einem Verbindungsstück zwischen zwei Transmembrandomänen befindet (siehe Abbildung 5), einen etwas geringer ausgeprägten Effekt auf die Transportfunktion der

Ergebnisse

Lipide. Die Fluoreszenz Intensität in den ABCA3+ Vesikeln unterschied sich nicht signifikant zum WT-ABCA3 (siehe Abbildung 28). Das Volumen hingegen war signifikant verringert im Vergleich zum WT-ABCA3 (siehe Abbildung 30), sodass von einem Effekt auf die Herstellung der Lamellarkörperchen ausgegangen werden kann. Ebenso war der Prozentsatz der gefüllten Vesikel verringert, wenn auch nicht signifikant (siehe Abbildung 29).

Die Statistiken in diesem Experiment wurden mit einem 1-way ANOVA Test berechnet, um jeweils den WT mit den Mutationen vergleichen zu können.

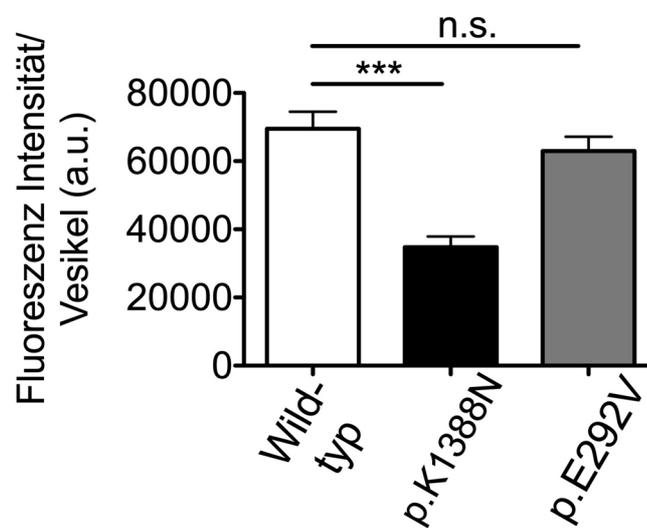


Abbildung 28 Effekte der ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V auf den ABCA3 abhängigen Lipidtransport

Fluoreszenz Intensität per Vesikel in a.u., gemessen mit dem Fiji-Plugin Particle_in_Cell-3D nach 24h Inkubation (SEM, *** $P < 0,001$).

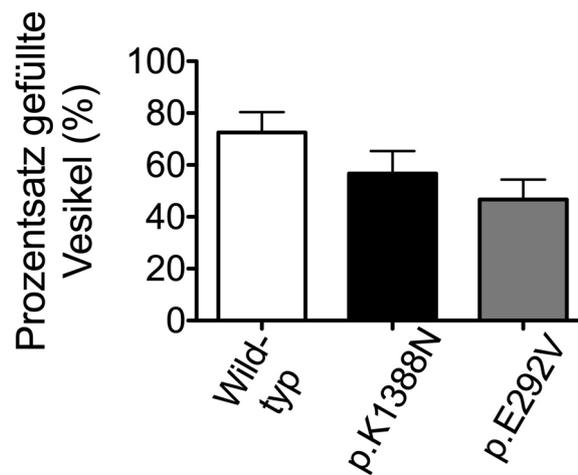


Abbildung 29 Effekte der ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V auf den Prozentsatz an gefüllten ABCA3+ Vesikeln

Prozentsatz der mit Lipiden gefüllten Vesikel in den Zellen mit den ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V im Vergleich zum WT-ABCA3.

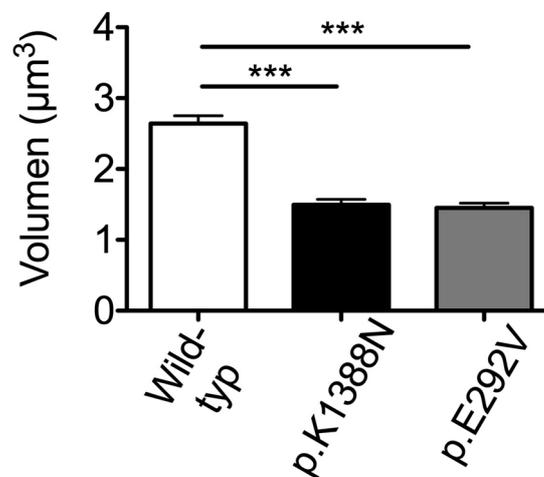


Abbildung 30 Effekte der ABCA3 Mutationen p.K1388N und p.E292V auf das Volumen von ABCA3+ Vesikeln

Vesikel Volumen von ABCA3 WT im Vergleich zu zwei ABCA3 Mutationen, gemessen mit Fiji (SEM, *** P < 0.001).

5 Diskussion

Der ABCA3 Transporter ist von essentieller Bedeutung für die Surfactantproduktion³⁸ und die Biogenese der LBs in den Typ II Pneumozyten⁶⁶. Er transportiert ATP-abhängig spezifische Lipide in die intrazellulären Vesikel, die im Anschluss exozytiert werden und den lipid- und proteinhaltigen Surfactant bereitstellen. Mutationen im ABCA3 Gen können zu schweren interstitiellen Lungenerkrankungen führen, die mit einem respiratorischen Versagen einher gehen können³⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe man die Transportfunktion des ABCA3 Transporters messen und quantifizieren kann. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Analyse und Kategorisierung von ABCA3 Mutationen. Es konnte gezeigt werden, dass der ABCA3 Lipidtransport zeit- und konzentrationsabhängig ist. Je länger die Zellen mit den fluoreszierenden Lipiden über einen Zeitraum von 24h inkubiert wurden, desto mehr Lipide haben sie im Verlauf in ihren LBs gespeichert. Bei einem erhöhten Lipidangebot lag eine gesteigerte Lipidaufnahme in die ABCA3+ Vesikel vor. Des Weiteren zeigte sich, dass der von ABCA3 durchgeführte Lipidtransport ATP-abhängig ist und mit dem ATPase Inhibitor Orthovanadat gehemmt werden kann. Interessanterweise variierten in den jeweiligen Versuchen nur die Fluoreszenzintensität je Vesikel und der Prozentsatz an gefüllten Vesikeln. Das Volumen der LBs hingegen blieb in den ABCA3 WT Zellen bei allen Konditionen konstant. Ein deutlich kleineres Volumen der ABCA3 Vesikel, jeweils in Bezug auf den WT, konnte hingegen bei den ABCA3-Mutationen p.K1388N und p.E292V gezeigt werden. Die Mutation p.K1388N zeigte zudem eine reduzierte Transportfunktion.

Die neue Methode wird benötigt, um Korrektoren und Potentioren, die das fehlgefaltete und funktionslose bzw. funktionseingeschränkte ABCA3 Protein korrigieren sollen, testen und finden zu können. In den letzten Jahren wurden bereits einige Methoden entwickelt, die die Funktion des ABCA3 Transporters analysieren können, jedoch gab es bisher keine Möglichkeit, dies auf der Ebene der LBs durchzuführen. Die Schwierigkeit lag dabei immer darin, dass der ABCA3 Transporter intrazellulär lokalisiert ist und nur Lipide transportiert. Ein anderer ABC Transporter, ABCC7 (CFTR-Transporter) z.B. transportiert Chlorid Ionen, sodass ein Ladungsunterschied in der Zelle mit Hilfe der Patch Clamp

Methode messbar ist^{67,68}. Diese Methode ist für den Lipidtransporter ABCA3 leider nicht anwendbar.

5.1 Herstellung stabiler Zellklone mit ABCA3 Expression in A549 Zellen

Als Versuchsmodell wurden in dieser Arbeit humane A549 Zellen verwendet. Die Zellen wurden ursprünglich 1972 als Alveolarepithelzellen aus einem kaukasischen, humanen Adenokarzinom gewonnen. Seitdem werden sie in Kultur gehalten und als Zellmodell für die Forschung an Typ II Pneumozyten verwendet. Durch den Ursprung der Zellen in einem humanen Karzinom sind diese Zellen meist hypotriploid (Chromosomenzahl 66) und weisen einige Mutationen in ihrem Genom auf⁶⁹. Über den langen Zeitraum, den diese Zellen nun schon in Kultur gehalten werden, haben sie ihre Möglichkeit zur endogenen LB Bildung verloren. Schindlbeck *et al.* konnten in der Elektronenmikroskopie der hier verwendeten A549 Zellen keine endogenen LBs mehr nachweisen, sodass davon auszugehen ist, dass alle hier beobachteten Effekte auf die stabile ABCA3 Transfektion und Überexpression zurück zu führen sind³⁹. Durch die ca. 200-fache ABCA3 Überexpression in den stabil transfizierten Zelleklonen wird zudem die geringe endogene ABCA3 Expression der A549 Zellen überlagert. Leider standen bis dato keine A549 Zellen mit ABCA3 Knock out zur Verfügung, mit denen man ausschließlich den Effekt des stabil transfizierten ABCA3 Proteins hätte beobachten können.

Insgesamt sollte also bedacht werden, dass es sich bei diesem Zellmodell nur um ein artifizielles System handelt und der endogene Einfluss der seit langem kultivierten A549 Zellen mit ihrem hypotriploidem Chromosomensatz nicht herausgerechnet werden kann. Alternativ könnte man in der Zukunft über kultivierte Patientenzellen mit den entsprechenden ABCA3 Mutationen oder über pluripotente Lungenepithel Stammzellen mit der jeweiligen Mutationsexpression nachdenken. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit standen diese Zellen aber noch nicht zur Verfügung.

5.2 Darstellung des ABCA3 Transporters und Volumen der LBs

In der Arbeit von Wittmann *et al.* konnte gezeigt werden, dass das ABCA3 Protein mit dem Oberflächenmarker CD63 kolokalisiert. CD63 ist ein Marker für späte Endosomen und LBs⁴⁸. Da sich der ABCA3 Transporter in der äußeren Schicht der LBs befindet, konnte somit eine Aussage über die Form und Struktur, sowie das Volumen der LBs getroffen werden.

5.3 Zusammensetzung und Aufnahme der Liposomen in die A549 Zellen

Um den ABCA3 Lipidtransport optisch darstellen zu können wurden in dieser Arbeit Liposomen verwendet, die in ihrer Lipidzusammensetzung dem Lungensurfactant nachempfunden sind. Muller *et al.* wiesen 1995 nach, dass surfactantartige Liposomen, die ein fluoreszierendes PC-Analogon (NBD-PC) enthalten, endozytotisch in Typ II Pneumozyten aufgenommen werden⁷⁰. Dies entspricht der Annahme, dass die Surfactantlipide von den Typ II Pneumozyten recycelt werden können und nach der Aufnahme in die Typ II Pneumozyten erneut der Surfactant Synthese durch den ABCA3 Transporter zur Verfügung stehen⁹.

In dieser Arbeit wurde ein fluoreszierendes PC (TopF-PC) als Bestandteil der Liposomen verwendet, da PC ein Substrat des ABCA3 Transporters ist und mengenmäßig den größten Anteil des Surfactants ausmacht³⁸. Bis dato wurde vor allem NBD-PC in diesem Zusammenhang benutzt. Der Vorteil von TopF-PC gegenüber NBD-PC ist, dass dieses stabiler ist und weniger schnell bei Lichtkontakt ausbleicht^{62,71,72}. Dadurch war es möglich auch kleine Lipidmengen in den LBs mit dem Konfokalmikroskop zu detektieren und die Fluoreszenzintensität mit dem Fiji Plugin Particle_in_Cell-3D zu quantifizieren. Selbst kleine Unterschiede bei der Lipidaufnahme über einen Zeitraum von 24h waren dadurch messbar.

In einem zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, dass nur TopF-PC alleine in OptiMEM gelöst nicht von den Zellen aufgenommen werden kann. Deshalb ist die Mischung mit den anderen Lipiden zu den Surfactant-artigen Liposomen notwendig.

5.4 Zeitabhängigkeit der Lipidaufnahme

Um zu zeigen, dass die Lipidkonzentration in den ABCA3+ Vesikeln im Zeitverlauf zunimmt, wurden die Zellen für jeweils 4h, 8h, 12h und 24h mit den Liposomen inkubiert und im Anschluss daran die Lipidkonzentration in den Vesikeln gemessen. Durch die ausgeprägte Fluoreszenz von TopF-PC konnten bereits nach 4h Lipide in den LBs nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzintensität innerhalb der ABCA3+ Vesikeln stieg im Verlauf von 24h kontinuierlich an, der Prozentsatz der gefüllten Vesikel stieg innerhalb der ersten 12h, blieb dann aber vergleichbar zwischen 12h und 24h. In der Zusammenschau wurde deshalb für alle weiteren Experimente eine Lipidinkubationszeit von 24h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt sicher Unterschiede zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen detektiert werden konnten.

5.5 Konzentrationsabhängigkeit der Lipidaufnahme

Nagata *et al.* stellten 2004 fest, dass die ATPase Aktivität des ABCA3 Transporters von der Menge der angebotenen Lipide abhängig ist. Stehen keine Lipide zur Verfügung kommt es zu einer verminderten ATPase Aktivität des ABCA3 Transporters⁴⁶. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass zudem die Transportaktivität von ABCA3 durch ein größeres Lipidangebot gesteigert werden kann. Je mehr Lipide der Zelle und damit auch dem ABCA3 Transporter zur Verfügung stehen, desto mehr Lipide werden in die Lamellarkörperchen transportiert. Dazu wurden drei Verdünnungen der Liposomen in OptiMEM Medium verwendet (1:2, 1:20, 1:200). Sowohl die Fluoreszenz Intensität als auch der Prozentsatz an mit Lipiden gefüllten Vesikeln zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen und eine jeweils deutliche Zunahme bei größerem Lipidangebot. Das Volumen der ABCA3+ Vesikel blieb hingegen bei allen Verdünnungen gleich groß. Damit ist davon auszugehen, dass die Lipide innerhalb der LBs dichter gepackt werden.

Diese Versuchsreihe stellte die Grundlage für die Verwendung der Verdünnung 1:20 Liposomen in OptiMEM für alle weiteren Experimente dar. Bei der Verdünnung 1:200 standen der Zelle zu wenig Lipide zu Verfügung, und bei der Verdünnung 1:20 zu viele Lipide, sodass ein kleiner Unterschied in den weiteren Experimenten vermutlich nicht messbar gewesen wäre. Auch rein optisch gesehen überzeugte die Verdünnung 1:20.

5.6 ABCA3 spezifische Lipidaufnahme in die Lamellarkörperchen

Um sicher zu stellen, dass die Lipidaufnahme in die LBs aktiv durch den ABCA3 Transporter vermittelt wird, und es sich nicht um eine passive Lipiddiffusion handelt, wurden die Zellen in dieser Arbeit mit Orthovanadat behandelt. Kluth *et al.* konnte zeigen, dass Orthovanadat die ATPase Aktivität in ABC Transportern und damit ihre Funktion hemmt⁶⁵. Nagata *et al.* wiesen nach, dass auch direkt die ATPase Funktion des ABCA3 Transporters durch Orthovanadat gehemmt werden kann⁴⁶. Nach 22h Behandlung der Zellen mit Orthovanadat war in dieser Arbeit die Lipidkonzentration in den ABCA3+ Vesikeln und der Prozentsatz an mit Lipiden gefüllten ABCA3+ Vesikeln signifikant geringer im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Um auszuschließen, dass durch das Orthovanadat nicht die Lipidaufnahme in die Zelle beeinflusst, sondern nur der ABCA3 abhängige Transport gehemmt wird, wurde das Orthovanadat 2h nach Beginn der Inkubation der Zellen mit den Liposomen ins Zellmedium zugegeben. Nach diesen 2h waren bereits TopF-PC Lipide innerhalb der Zelle konfokalmikroskopisch darstellbar. Die verringerte Lipidkonzentration in die ABCA3+ Vesikel nach Behandlung der Zellen mit Orthovanadat hat bestätigt, dass die Lipide ABCA3 abhängig in die Lamellarkörperchen transportiert werden und nicht passiv diffundieren. Trotzdem sollte bedacht werden, dass Orthovanadat alle ATPasen hemmt und nicht rein spezifisch den ABCA3 Transporter. Nachdem es bis dato aber keine Möglichkeit gibt, selektiv den ABCA3 Transporter zu hemmen, ohne dabei die ABCA3 Expression zu beeinflussen, wie es z.B. bei siRNA der Fall wäre, war Orthovanadat die beste Wahl für dieses Experiment.

Das Volumen der ABCA3⁺ Vesikel blieb während der Behandlung der Zellen mit Orthovanadat vergleichbar zu den unbehandelten Zellen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Orthovanadat in diesem Inkubationszeitraum keinen direkten Einfluss auf die Genese der LBs hat.

5.7 Einfluss der ABCA3 Mutationen p.E292V und p.K1388N auf den Lipidtransport und das Vesikelvolumen

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der ABCA3 Mutationen p.E292V und p.K1388N auf den Lipidtransport und die Genese der Vesikel untersucht. Wittmann *et al.* und Schindlbeck *et al.* charakterisierten die Mutationen p.K1388N und p.E292V in ihren Arbeiten genauer und klassifizierten diese als ABCA3 Varianten mit gestörtem Lipidtransport. Beide ABCA3 Mutanten wurden sowohl im ER als auch im Golgi Apparat korrekt prozessiert, wobei auffiel, dass im Vergleich zum WT-ABCA3 ein geringerer Anteil den Golgi Apparat passiert hatte. Sowohl Zellen mit der p.E292V und der p.K1388N Mutation zeigten eine Kolo-kalisation des ABCA3 Proteins mit dem vesikulären Marker CD63, was wiederum bedeutet, dass beide mutierten ABCA3 Proteine in den LBs ankommen und diese generieren. Dabei war bei der Mutation p.K1388N zusätzlich noch ein schwächeres diffuses ABCA3 Signal in den Zellen zu beobachten, das als zytoplasmatische Proteinlokalisierung von fehlgefaltetem ABCA3 Protein gewertet wurde. In der Elektronenmikroskopie konnte bei den Zellen mit stabiler p.K1388N Expression deformierte LBs nachgewiesen werden, die vermutlich in ihrer Fähigkeit Surfactant bereit zu stellen eingeschränkt sind. Zudem wurde sowohl bei der p.E292V, als auch bei der p.K1388N Mutation im Vergleich zum WT ein intrazellulär verminderter PC und DPPC Gehalt mit der Massenspektrometrie gemessen. Dies spricht mutmaßlich für eine veränderte Surfactantzusammensetzung in diesen Zellen^{39, 48}.

In dieser Arbeit wurden Zellen verwendet, in die die Mutationen p.K1388N und p.E292V jeweils stabil transfiziert wurden. Innerhalb des ABCA3 Proteins liegt die Mutation p.K1388N in räumlicher Nähe zur NBD2 und hat damit vermutlich einen Einfluss auf diese Proteineinheit. Mit der Funktionsanalyse dieser Mutation sollte noch einmal eruiert werden, welche Rolle eine intakte ATPase Domäne im

ABCA3 Protein für den Lipidtransport und auch für den strukturellen Aufbau der Lamellarkörperchen spielt. Zellen mit der Mutation p.K1388N konnten Vesikel formen, aber diese Vesikel waren signifikant kleiner als beim WT-ABCA3. Ebenso war der Lipidgehalt in den Vesikeln signifikant geringer im Vergleich zum WT und der Prozentsatz an gefüllten Vesikeln geringer als beim WT. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Damit konnte gezeigt werden, dass die Surfactantproduktion nicht nur von der LB-Genese, sondern auch von der Transportfunktion des ABCA3 Proteins abhängig ist.

Im Vergleich zur Mutation p.K1388N liegt die ABCA3 Mutation p.E292V in einem zytoplasmatischen Loop des ABCA3 Proteins⁶⁴ und hat damit einen deutlich geringeren Einfluss auf den ABCA3 Lipidtransport. Dieser war im Verhältnis zum WT nicht signifikant verringert, nur das Volumen der LBs zeigte sich signifikant kleiner und auch der Prozentsatz an gefüllten Vesikeln war geringer. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation p.E292V die LB Bildung einschränkt und dadurch insgesamt die Surfactant Produktion negativ beeinflusst. Diese Ergebnisse stimmen mit den zuvor veröffentlichten Ergebnissen von Matsumura *et. al* überein, der auch nur eine geringe Einschränkung des Lipidtransportes feststellen konnte⁶⁴. Daraus lässt sich ableiten, dass Mutationen in einem Protein Loop die LB Herstellung beeinflussen, aber eher nicht den Lipidtransport, für den die NBD Domänen die entscheidende Rolle spielen.

Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit der klinischen Präsentation der Patienten. Die Patienten mit der homozygoten Mutation p.E292V entwickelten im Verlauf eine interstitielle Lungenerkrankung, teilweise bereits im Kindesalter, manche aber auch erst im Erwachsenenalter^{73,74,75}. Die klinische Bandbreite dieser ABCA3 Mutation ist insgesamt sehr groß und bedarf auch in Zukunft einer weiteren Charakterisierung des Phänotyps. Die Patienten haben aber im Vergleich zu Patienten mit der Mutation p.K1388N durchschnittlich eine höhere Lebenserwartung. Diese neue Mutation wurde von Wittmann *et al.* genauer beschrieben. Die Patientin, bei der die Mutation p.K1388N homozygot vorlag, entwickelte postnatal ein schweres neonatales Atemnotsyndrom mit einem *Exitus letalis* bereits im Säuglingsalter⁴⁸.

5.8 Bedeutung der neuen Methode

Schindlbeck *et al.* haben 2018 in ihrer Arbeit verschiedene Methoden angewendet, um die unterschiedlichen ABCA3 Mutationen, die bei Patienten mit ILE aufgefallen waren, näher zu charakterisieren und einzuordnen³⁹. Um die Funktion des ABCA3 Transporters zu messen, wurden Analysen der intrazellulären PC und DPPC Mengen mit Hilfe der Massenspektrometrie durchgeführt. Dies wiederum sollte Rückschlüsse auf die intrazelluläre Surfactant Synthese geben. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Massenspektrometrie eine sehr weitläufig angewendete Methode im Bereich des Lipidmetabolismus ist und exakt die verschiedenen angereicherten Lipide innerhalb einer Zelle messen und ihre jeweilige Konzentration bestimmen kann. Der Nachteil wiederum ist, dass mit dieser Methode keine direkte Aussage über die LBs als einzelne Zellorganellen und die direkte Funktion des ABCA3 Transporters getroffen werden kann. Für diese konkrete Messung wird die hier erarbeitete neue Methode benötigt. Die Methode erlaubt es den PC Transport durch das ABCA3 Protein direkt innerhalb der Zelle in ihrem natürlichen Milieu messen und quantifizieren zu können. Da dies ein neuer Ansatz zur Analyse der ABCA3 Funktion ist und es bis dato keine andere Standard Methode dafür gab, konnte leider keine unabhängige Kontrolle der Ergebnisse durchgeführt werden.

In Zukunft soll die Methode angewendet werden, um weitere ABCA3 Mutationen zu charakterisieren und verschiedene Korrektoren und Potentioren für ABCA3 Mutationen zu screenen.

6 Ausblick

6.1 Anwendung der Quantifizierungsmethode bei der Auswahl von Korrektoren für ABCA3 Mutationen

Kinting *et al.* konnten 2017 bereits die hier vorgestellte Methode in ihrer Arbeit anwenden. Das Ziel der Arbeit war es, kleine Moleküle als Korrektoren für verschiedene ABCA3 Mutationen *in vitro* zu testen und diejenigen auszuwählen, die sowohl einen ABCA3 Trafficking Defekt, als auch eine funktionelle Einschränkung des Transporters korrigieren konnten. Die verwendeten Korrektoren kommen ursprünglich aus der Forschung zur Erkrankung Mukoviszidose (Cystische Fibrose (CF)), wo man sie zur Korrektur von Mutationen im ABCC7 Protein (CFTR- Kanal) anwendet. Mittlerweile gibt es dafür zugelassene Medikamente (Ivacaftor, Lumacaftor), die den gleichen molekularen Ursprung haben, wie die von Kinting *et al.* verwendeten Korrektoren. Ivacaftor und Lumacaftor sind seit geraumer Zeit in klinischer Erprobung bei CF-Patienten und die Ergebnisse sind durchaus vielversprechend^{76,77}. Um die Korrektoren im Bezug auf das ABCA3 Protein zu testen, wurden fünf verschiedene Mutationen ausgewählt, die zu einer Fehlfaltung und Fehllokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle führen (p.K1388N, p.M760R, p.Q215K, p.A1046E, p.G1421R). Es wurden verschiedene kleine Moleküle angewendet und unterschiedliche Molekül Konzentrationen ausprobiert, wobei die Komponenten C13 und C17 (Klasse II Korrektoren) am vielversprechendsten waren. Diese Korrektoren können das fehlgefaltete Protein korrigieren, indem sie die NBD2 Domäne stabilisieren⁷⁸. Nach Behandlung der Zellen mit C17 oder C13 konnten vier von fünf Mutationen richtig lokalisiert in der äußeren Membran der LBs gefunden werden. Im nächsten Schritt wurden die korrigierten ABCA3 Mutationen auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Dafür wurde die in dieser Arbeit neu beschriebene Methode angewendet. Die Behandlung der Zellen mit C17 und mit C13 hat zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz Intensität innerhalb der LBs geführt und auch das Volumen der ABCA3+ Vesikel nahm nach der Behandlung deutlich zu⁷⁹. Damit zeigte sich, dass diese Methode für die Auswahl von Korrektoren für

ABCA3 Mutationen geeignet ist und eine wichtige Rolle für eine Entwicklung von Therapieansätzen bei Patienten mit ABCA3 Mutationen spielt.

6.2 Analyse des ABCA3 Transporters mit Hilfe von Propargylcholin

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode wurde in Bezug auf den Surfactant Metabolismus vor allem das Recycling der Lipide untersucht, da surfactantartige Liposomen zu den Zellen gegeben wurden und diese dann über den Surfactant Recycling Mechanismus in die Typ II Pneumozyten aufgenommen und der erneuten Surfactantproduktion zugeführt wurden. Dabei wurde aber die endogene Lipidproduktion und Verwendung zur Surfactantsynthese außer Acht gelassen. Um dies genauer untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit ein Protokoll entwickelt, mit dessen Hilfe man die Lipidsynthese und Lipidverteilung innerhalb der Typ II Pneumozyten beobachtet und gemessen werden konnte. Das Protokoll wurde in Anlehnung an das von Siegrist *et al.* verwendete Protokoll zur intrazellulären Kupfer katalysierten Click Reaktion von Zucker Molekülen⁸⁰ erarbeitet. In dem hier neu entwickelten Ansatz wurden die Zellen, an Stelle der von den bei Siegrist *et al.* verwendeten Peptidoglykanen zur intrazellulären Bakteriendarstellung, mit einem Cholin Molekül (Propargylcholin) inkubiert. Propargylcholin verfügt über eine Dreifachbindung (Alkin) und kann durch eine Kupfer katalysierte Click Reaktion (CuAAC)⁸¹ mit einem fluoreszierenden Azid (TAMRA-Azid) markiert (siehe Abbildung 31), und damit konfokalmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Hierbei war zu beachten, dass das im Originalartikel von Siegrist *et. al.* zur Zellpermeabilisierung verwendete Triton die Lipide beeinflussen kann und dieses deshalb durch Saponin ersetzt wurde.

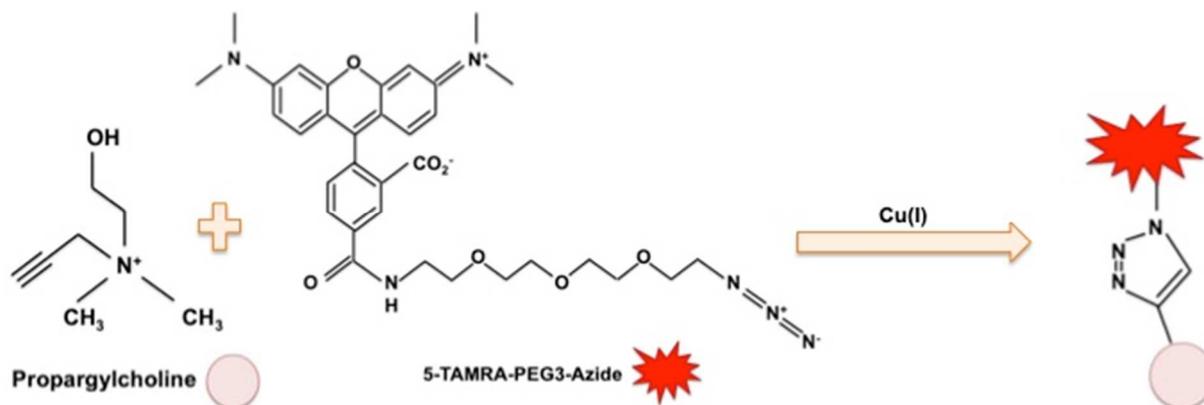


Abbildung 31 Kupfer katalysierte Click Reaktion (CuAAC) zwischen Propargylcholin (Alkin) und 5-TAMRA-PEG3-Azide

Es konnte gezeigt werden, dass über einen Inkubationszeitrahmen von 24h das Propargylcholin zur Lipidsynthese innerhalb der Zelle verwendet und anschließend ATP abhängig in ABCA3+ Vesikel transportiert werden konnte. Die Quantifizierung der Lipidkonzentration innerhalb der LBs erfolgte mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Messmethode. Die weiteren Experimente waren Bestandteil der Promotionsarbeit von Frau Yang Li.

6.3 Zusammenfassende Bewertung

Die beiden zuletzt aufgeführten Beispiele, bei denen die in dieser Arbeit entwickelte Messmethode angewendet wurde, konnten noch einmal die direkte Relevanz der Methode aufzeigen. Diese ermöglicht es, die verschiedenen ABCA3 Mutationen genauer zu charakterisieren, indem die Fluoreszenzintensität der Lipide innerhalb der ABCA3+ Vesikel gemessen und dadurch ein Rückschluss auf die ABCA3 Transportaktivität gezogen werden kann. Dabei kann zusätzlich durch die Verwendung von TopF-PC der Surfactant Recycling Mechanismus oder mit Propargylcholin die endogene Lipidsynthese in den Typ II Pneumozyten beobachtet werden. Ebenso ist es durch diese Messmethode möglich, verschiedene Korrektoren und Potentioren für ABCA3 Mutationen zu screenen und diejenigen auszuwählen, die zu einer Verbesserung des Lipidtransportes führen können. Dies stellt die Grundlage für einen späteren Therapieversuch bei betroffenen Kindern dar.

Literaturverzeichnis

1. Aumüller, G. *Anatomie*. (Thieme, 2014).
2. Deller, T. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch*. (Elsevier, 2018).
3. Bösch, D. *Lunge und Atemwege*. (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
doi:10.1007/978-3-642-28223-2
4. Whitsett, J. A., Wert, S. E. & Weaver, T. E. Diseases of Pulmonary Surfactant Homeostasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **10**, 371–393 (2015).
5. Nichols, B. A. Normal rabbit alveolar macrophages. I. The phagocytosis of tubular myelin. *Journal of Experimental Medicine* **144**, 906–919 (1976).
6. Whitsett, J. A. & Weaver, T. E. Hydrophobic Surfactant Proteins in Lung Function and Disease. *New England Journal of Medicine* **347**, 2141–2148 (2002).
7. Geiger, K., Gallagher, M. L. & Hedley-Whyte, J. Cellular distribution and clearance of aerosolized dipalmitoyl lecithin. *J Appl Physiol* **39**, 759–766 (1975).
8. Hallman, M., Epstein, B. L. & Gluck, L. Analysis of labeling and clearance of lung surfactant phospholipids in rabbit. Evidence of bidirectional surfactant flux between lamellar bodies and alveolar lavage. *J. Clin. Invest.* **68**, 742–751 (1981).
9. Jacobs, H., Jobe, A., Ikegami, M. & Conaway, D. The significance of reutilization of surfactant phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **258**, 4159–4165 (1983).
10. *Pädiatrische Pneumologie*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
doi:10.1007/978-3-642-34827-3
11. Griese, M. *et al.* Quantitative Lipidomics in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2019).
doi:10.1164/rccm.201901-0086OC
12. Avery, M. E. Surface Properties in Relation to Atelectasis and Hyaline Membrane Disease. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* **97**, 517 (1959).
13. Neergaard, K. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik: Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der

Oberflächenspannung in den Alveolen. *Zeitschrift für Die Gesamte Experimentelle Medizin* **66**, 373–394 (1929).

14. Curstedt, T., Jörnvall, H., Robertson, B., Bergman, T. & Berggren, P. Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity. *Eur. J. Biochem.* **168**, 255–262 (1987).

15. Weaver, T. E. & Conkright, J. J. Function of surfactant proteins B and C. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 555–578 (2001).

16. Han, S. & Mallampalli, R. K. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Annals of the American Thoracic Society* **12**, 765–774 (2015).

17. Wenzel, J. J., Piehler, A. & Kaminski, W. E. ABC-A-Transporter – Schlüsselgene des molekularen Lipidtransports. *Medizinische Klinik* **102**, 524–530 (2007).

18. López-Marqués, R. L. *et al.* Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**, 461–475 (2015).

19. Quazi, F. & Molday, R. S. Lipid transport by mammalian ABC proteins. *Essays In Biochemistry* **50**, 265–290 (2011).

20. Abele, R. & Tampé, R. The TAP translocation machinery in adaptive immunity and viral escape mechanisms. *Essays In Biochemistry* **50**, 249–264 (2011).

21. Hunt, J. F., Wang, C. & Ford, R. C. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (ABCC7) Structure. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a009514–a009514 (2013).

22. Hodges, L. M. *et al.* Very important pharmacogene summary: *Pharmacogenetics and Genomics* **21**, 152–161 (2011).

23. Rust, S. *et al.* Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **22**, 352–355 (1999).

24. Allikmets, R. *et al.* A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* **15**, 236–246 (1997).

25. Lefèvre, C. *et al.* Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2369–2378 (2003).
26. Connors, T. D. *et al.* The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3. *Genomics* **39**, 231–234 (1997).
27. Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007–1017 (2001).
28. Kos, V. & Ford, R. C. The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 3111–3126 (2009).
29. Beers, M. F. *et al.* Disruption of N-linked glycosylation promotes proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCA3. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **305**, L970–L980 (2013).
30. Beers, M. F. *et al.* A novel conserved targeting motif found in ABCA transporters mediates trafficking to early post-Golgi compartments. *Journal of Lipid Research* **52**, 1471–1482 (2011).
31. Schaller-Bals, S. *et al.* Surface-expressed lamellar body membrane is recycled to lamellar bodies. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**, L631–L640 (2000).
32. Hofmann, N. *et al.* Analysis of the Proteolytic Processing of ABCA3: Identification of Cleavage Site and Involved Proteases. *PLOS ONE* **11**, e0152594 (2016).
33. Yamano, G. *et al.* ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* **508**, 221–225 (2001).
34. Ban, N. *et al.* ABCA3 as a Lipid Transporter in Pulmonary Surfactant Biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 9628–9634 (2007).
35. Yoshida, I., Ban, N. & Inagaki, N. Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 547–555 (2004).
36. Matsumura, Y., Sakai, H., Sasaki, M., Ban, N. & Inagaki, N. ABCA3-mediated choline-phospholipids uptake into intracellular vesicles in A549 cells. *FEBS Letters*

581, 3139–3144 (2007).

37. Bullard, J. E., Wert, S. E. & Noguee, L. M. ABCA3 Deficiency: Neonatal Respiratory Failure and Interstitial Lung Disease. *Seminars in Perinatology* **30**, 327–334 (2006).
38. Garmany, T. H. *et al.* Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatr. Res.* **59**, 801–805 (2006).
39. Schindlbeck, U. *et al.* ABCA3 missense mutations causing surfactant dysfunction disorders have distinct cellular phenotypes. *Human Mutation* **39**, 841–850 (2018).
40. Shulenin, S. *et al.* ABCA3 Gene Mutations in Newborns with Fatal Surfactant Deficiency. *New England Journal of Medicine* **350**, 1296–1303 (2004).
41. Wert, S. E., Whitsett, J. A. & Noguee, L. M. Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr. Dev. Pathol.* **12**, 253–274 (2009).
42. Ota, C., Kimura, M. & Kure, S. ABCA3 mutations led to pulmonary fibrosis and emphysema with pulmonary hypertension in an 8-year-old girl: ABCA3 Mutations Led to Fibrosis and Emphysema. *Pediatric Pulmonology* **51**, E21–E23 (2016).
43. Griese, M. Chronic interstitial lung disease in children. *European Respiratory Review* **27**, 170100 (2018).
44. Wambach, J. A. *et al.* Single ABCA3 Mutations Increase Risk for Neonatal Respiratory Distress Syndrome. *PEDIATRICS* **130**, e1575–e1582 (2012).
45. Wittmann, T. & Frixel, S. Increased Risk of Interstitial Lung Disease in Children with a Single R288K Variant of ABCA3. *Molecular Medicine* **22**, 1 (2016).
46. Nagata, K. *et al.* 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**, 262–268 (2004).
47. Cheong, N. *et al.* Functional and Trafficking Defects in ATP Binding Cassette A3 Mutants Associated with Respiratory Distress Syndrome. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 9791–9800 (2006).
48. Wittmann, T. *et al.* Tools to explore ABCA3 mutations causing interstitial lung

disease: Molecular Tools for ABCA3 Mutations Causing ILD. *Pediatric Pulmonology* (2016). doi:10.1002/ppul.23471

49. Wambach, J. A. *et al.* Functional Characterization of *ATP-Binding Cassette Transporter A3* Mutations from Infants with Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **55**, 716–721 (2016).

50. Chapuy, B. *et al.* ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica* **94**, 1528–1536 (2009).

51. Deutsch, G. H. *et al.* Diffuse Lung Disease in Young Children: Application of a Novel Classification Scheme. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **176**, 1120–1128 (2007).

52. Griese, M. *et al.* Incidence and classification of pediatric diffuse parenchymal lung diseases in Germany. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **4**, (2009).

53. Nathan, N. *et al.* A national internet-linked based database for pediatric interstitial lung diseases: the French network. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **7**, 40 (2012).

54. Clement, A. & Eber, E. Interstitial lung diseases in infants and children. *European Respiratory Journal* **31**, 658–666 (2008).

55. Kaltenborn, E. *et al.* Respiratory syncytial virus potentiates ABCA3 mutation-induced loss of lung epithelial cell differentiation. *Human Molecular Genetics* **21**, 2793–2806 (2012).

56. Clement, A. Task force on chronic interstitial lung disease in immunocompetent children. *European Respiratory Journal* **24**, 686–697 (2004).

57. Tredano, M. *et al.* Clinical Biological and Genetic Heterogeneity of the Inborn Errors of Pulmonary Surfactant Metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **39**, (2001).

58. Kuo, C. S. & Young, L. R. Interstitial lung disease in children: *Current Opinion in Pediatrics* **26**, 320–327 (2014).

59. Peca, D. *et al.* Altered surfactant homeostasis and recurrent respiratory failure secondary to TTF-1 nuclear targeting defect. *Respir. Res.* **12**, 115 (2011).

60. Noguee, L. M. Alterations in SP-B and SP-C Expression in Neonatal Lung Disease. *Annual Review of Physiology* **66**, 601–623 (2004).
61. Geurts, A. M. *et al.* Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol. Ther.* **8**, 108–117 (2003).
62. Kay, J. G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T. & Grinstein, S. Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 2198–2212 (2012).
63. Torrano, A. A. *et al.* A fast analysis method to quantify nanoparticle uptake on a single cell level. *Nanomedicine* **8**, 1815–1828 (2013).
64. Matsumura, Y., Ban, N. & Inagaki, N. Aberrant catalytic cycle and impaired lipid transport into intracellular vesicles in ABCA3 mutants associated with nonfatal pediatric interstitial lung disease. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* **295**, L698–L707 (2008).
65. Kluth, M. *et al.* A Mutation within the Extended X Loop Abolished Substrate-induced ATPase Activity of the Human Liver ATP-binding Cassette (ABC) Transporter MDR3. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 4896–4907 (2015).
66. Cheong, N. *et al.* ABCA3 Is Critical for Lamellar Body Biogenesis *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 23811–23817 (2007).
67. Billet, A., Froux, L., Hanrahan, J. W. & Becq, F. Development of Automated Patch Clamp Technique to Investigate CFTR Chloride Channel Function. *Frontiers in Pharmacology* **8**, (2017).
68. Ren, H. Y. *et al.* VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 3016–3024 (2013).
69. Giard, D. J. *et al.* In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors². *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1417–1423 (1973).
70. Muller, W. J., Zen, K., Fisher, A. B. & Shuman, H. Pathways for uptake of fluorescently labeled liposomes by alveolar type II cells in culture. *Am. J. Physiol.* **269**, L11-19 (1995).

71. Weichert, N. *et al.* Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. *Respiratory Research* **12**, (2011).
72. Griese, M., Gobran, L. I. & Rooney, S. A. Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues. *Am. J. Physiol.* **261**, L434-442 (1991).
73. Coghlan, M. A. *et al.* Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respiratory Research* **1**, e000057 (2014).
74. Turcu, S., Ashton, E., Jenkins, L., Gupta, A. & Mok, Q. Genetic testing in children with surfactant dysfunction. *Archives of Disease in Childhood* **98**, 490–495 (2013).
75. Wambach, J. A. *et al.* Genotype–Phenotype Correlations for Infants and Children with ABCA3 Deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **189**, 1538–1543 (2014).
76. Wainwright, C. E. *et al.* Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del *CFTR*. *New England Journal of Medicine* **373**, 220–231 (2015).
77. Pettit, R. S. & Fellner, C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P T* **39**, 500–511 (2014).
78. Okiyonedo, T. *et al.* Mechanism-based corrector combination restores Δ F508-CFTR folding and function. *Nature Chemical Biology* **9**, 444–454 (2013).
79. Kinting, S. *et al.* Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors. *Human Molecular Genetics* **27**, 943–953 (2018).
80. Siegrist, M. S. *et al.* D -Amino Acid Chemical Reporters Reveal Peptidoglycan Dynamics of an Intracellular Pathogen. *ACS Chemical Biology* **8**, 500–505 (2013).
81. Liang, L. & Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews* **255**, 2933–2945 (2011).

Publikationen

A Originalpublikationen	JIF
2019	
Li Y, Kinting S, Höppner S , Forstner ME, Uhl O, Koletzko B, Griese M. „Metabolic labelling of choline phospholipids probes ABCA3 transport in lamellar bodies.“ <i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA)</i> . 2019 Aug 26. doi:10.1016/j.bbalip.2019.158516	
2018	
Kinting S, Höppner S , Schindlbeck U, Forstner ME, Harfst J, Wittmann T, Griese M. “Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors.” <i>Human Molecular Genetics</i> . 2018 Mar 15. doi: 10.1093/hmg/ddy011.	5.68
Schindlbeck U, Wittmann T, Höppner S , Kinting S, Liebisch G, Hegermann J, Griese M. “ABCA3 missense mutations causing surfactant dysfunction disorders have distinct cellular phenotypes” <i>Human Mutations</i> . 2018 Mar 5. doi: 10.1002/hum.23416.	4.60
2017	
Höppner S , Kinting S, Torrano AA, Schindlbeck U, Bräuchle C, Zarbock R, Wittmann T, Griese M. “Quantification of volume and lipid filling of intracellular vesicles carrying the ABCA3 transporter.” <i>Biochimica et Biophysica Acta (BBA)</i> . 2017 Sep 6, doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.08.013.	5.34
2016	
Wittmann T, Schindelbeck U, Höppner S , Kinting S, Frixel S, Kröner C, Liebisch G, Hegermann J, Aslanidis C, Brasch F, Reu S, Lasch P, Zarbock R, Griese M. “Tools to explore ABCA3 mutations causing interstitial lung disease.” <i>Pediatric Pulmonology</i> . 2016 May 13. doi: 10.1002/ppul.23471.	2.85
Wittmann T, Frixel S, Höppner S , Schindlbeck U, Schams A, Kappler MV, Hegermann J, Wrede C, Liebisch G, Vierzig A, Zacharasiewicz A, Kopp M, Poets CF, Baden W, Hartl D, Van Kaam AH, Lohse P, Aslanidis C, Zarbock	4.68

R, Griese M. "Increased risk of interstitial lung disease in children with single R288K variant of ABCA3." Molecular Medicine. 2016 Feb 26. doi: 10.2119/molmed.2015.00244.	
---	--

B Reviews	JIF
2016	
Berker M ¹ , Frank LJ ¹ , Geßner AL ¹ , Grassl N ¹ , Holterman AV ¹ , Höppner S¹ , Kraef C ¹ , Leclaire MD ¹ , Maier P ¹ , Schoch D ¹ , Soll D ¹ , Woopen CM ¹ . ¹ all authors contributed equally to this work. "Allergies – A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm." Clinical Immunology. 2016 Nov 12. doi: 10.1016/j.clim.2016.11.001.	3.99

Erklärung

Der Inhalt dieser Promotionsarbeit wurde unter dem Titel “Quantification of volume and lipid filling of intracellular vesicles carrying the ABCA3 transporter.” im Journal *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* (doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.08.013.) am 06.09.2017 veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Stefanie Höppner, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Funktionelle Analyse des ABCA3 Transporters“

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.

Köln, 16.02.2020

Stefanie Höppner

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater Professor Matthias Griese für die umfassende Betreuung, die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, die Möglichkeit meine eigenen Ideen zu verwirklichen und das Vertrauen, das er mir jederzeit entgegen gebracht hat. Auch ein großer Dank für alles, was er mir in der Klinik bei diversen Praktika beigebracht und die Lebenserfahrungen, die er mit mir geteilt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Mitdotorandinnen Susanna Kinting und Ulrike Schindlbeck für ihre tolle Unterstützung zu jedem Zeitpunkt, die motivierenden Worte und die tiefgreifende Freundschaft, die in diesen Jahren entstanden ist. Ohne sie wäre dieses Projekt sicherlich nicht so erfolgreich geworden und die Zeit im Labor nicht so wertvoll gewesen.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der AG Griese für die Unterstützung, Motivation, die kollegiale Zusammenarbeit und die wunderschöne Doktorandenzeit.

Für seine extreme Einsatzbereitschaft danke ich Adriano Torrano sehr, der mir bei sämtlichen Fragen bezüglich der Bildauswertung jederzeit tatkräftig zur Seite stand und immer für mich erreichbar war. Ohne seine Ideen wäre dieses Projekt nicht so umsetzbar gewesen.

Ein besonderer Dank geht an meine Freunde aus der Arbeitsgruppe Glykowiedenschaften des Lebenswissenschaftlichen Kollegs der Studienstiftung, Daniel Engels und Katharina Kolbe, mit denen ich diese Arbeit diskutieren konnte und die mir wichtige Tipps gegeben haben.

Katharina Zierl danke ich sehr herzlich für ihre enge und tiefgreifende Freundschaft, ihre Unterstützung, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei all meinen Freunden für ihre Freundschaft, das Interesse an dieser Arbeit und die Unterstützung in den letzten Jahren.

Meinen Großeltern Edeltraud und Uwe Höppner, meinem Opa Georg Liebhard und meiner Schwester Mona Höppner danke ich sehr für die allgegenwärtige Unterstützung und das Verständnis in den letzten Jahren.

Mein allerherzlichster Dank aber gebührt meinen Eltern Claudia und Jürgen Höppner, die mir das Medizinstudium und diese Promotion ermöglicht und mich immer unterstützt und meine Entscheidungen mit getragen haben. Vielen, vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt und immer für mich da gewesen seid!

Zuletzt gilt mein Dank noch der Studienstiftung des deutschen Volkes und dem FöFoLe Programm, die diese Arbeit finanziell und ideell unterstützt haben.