

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. C. Klein

Sumoylierung und Targeting von ABCA3

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

vorgelegt von
Anja Ziwen Zhang

aus Peking

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. univ. A. Holzinger
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Hanno Leuchte Priv. Doz. Dr. Claus Neurohr
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Judith Glöckner-Pagel Dr. rer. nat. M. Hammel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	19.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Atemnotsyndrom – eine Lungenfunktionsstörung bei Surfactantmangel.....	1
1.2	ABCA3 – Ein Protein aus der Familie der ABC-Transporter	3
1.2.1	Molekularer Aufbau, Bedeutung und Funktion der ABC-Transporter	3
1.2.2	Die Subfamilie der ABCA-Transporter	6
1.2.3	Aufbau und Funktion von ABCA3.....	7
1.2.4	ABCA3-Mangel.....	9
1.3	Sumoylierung – eine spezielle Form der posttranslationalen Modifikation.....	13
1.3.1	Molekulare Grundlagen	13
1.3.2	Sumoylierung von Transmembranproteinen	15
1.3.3	Sumoylierung von ABC-Transportern.....	17
2	Zielsetzung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Material	19
3.1.1	Geräte und Zubehör	19
3.1.2	Ausgangsplasmide	20
3.1.3	Enzyme	20
3.1.4	Bakterien und Zellen.....	20
3.1.5	Kulturmedien.....	21
3.1.6	Antikörper	21
3.1.7	Chemikalien	21
3.2	Molekularbiologische Standardmethoden.....	22
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	22
3.2.2	Gelelektrophorese	23
3.2.3	DNA-Aufreinigung und Isolierung von Plasmiden	23
3.2.4	Restriktion.....	24
3.2.5	Ligation	24
3.2.6	Transformation.....	25
3.3	Zellkulturmethoden	26
3.3.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen	26
3.3.2	Transiente Transfektion.....	26

3.4	Der Yeast-Two-Hybrid Assay.....	27
3.4.1	Prinzip.....	27
3.4.2	Klonierung der Bindungspartnervektoren.....	28
3.4.3	Herstellung von Plasmidkonstrukten mit mutierten SUMOsites.....	28
3.4.4	Durchführung des Yeast-Two-Hybrid Assay.....	30
3.5	Die Co-Immunpräzipitation.....	32
3.5.1	Prinzip.....	32
3.5.2	Herstellung eines Leervektors und Vektor-ABCA3 mit mutierten Sumosites.....	33
3.5.3	Transfektion von Wildtyp-und Mutationsplasmid in CHO-Zellen.....	36
3.5.4	Zellyse und Immunpräzipitation.....	36
3.5.5	Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgele.....	37
3.5.6	Westernblot.....	38
3.6	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	40
3.6.1	Prinzip.....	40
3.6.2	Transfektion von Wildtyp-und Mutationsplasmid in A549- und MLE 12-Zellen.....	40
3.6.3	Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie.....	40
4	Ergebnisse.....	42
4.1	ABCA3 enthält zwei mögliche SUMO-Motive.....	42
4.2	Analyse der Sumoylierung von ABCA3 im Yeast-Two-Hybrid System.....	43
4.2.1	Klonierung von ABCA3-Teilkonstrukten mit Wildtyp- und mutierten SUMOsites.....	43
4.2.2	SUMOsites interagieren mit SUMO 1 bis 4.....	44
4.3	Analyse der Sumoylierung von ABCA3 in kultivierten Säugetierzellen.....	46
4.3.1	Erstellung eines Expressionsplasmids mit vollständiger ABCA3 cDNA mit mutierten SUMOsites.....	46
4.3.2	Nachweis der Interaktion von SUMO 2 mit ABCA3 in CHO Zellen.....	47
4.4	Einfluss der Sumoylierung auf das Targeting von ABCA3 in der Zelle.....	49
5	Diskussion.....	53
6	Zusammenfassung.....	56
7	Anhang.....	57
8	Literaturverzeichnis.....	61
9	Danksagung.....	66

Abb. 1: Röntgenaufnahmen des Thorax eines Frühgeborenen mit RDS	3
Abb. 2: Schematische Darstellung eines ABC-Transporters.....	4
Abb. 3: Darstellung der Genstruktur der ABC-Halb- und Volltransporter	4
Abb. 4: Schematische Darstellung von ABCA3.....	8
Abb. 5: Axiale hochauflösende CT-Thorax Aufnahmen eines Kindes mit ABCA3-Mangel.....	11
Abb. 6: Histopathologische Aufnahme von dem Lungengewebe eines Patienten mit ABCA3-Mangel	11
Abb. 7: Vergleichende elektronenmikroskopische Aufnahmen von abnormen und gesunden Lamellarkörperchen.....	12
Abb. 8: Vergleich der Struktur von SUMO 1 und Ubiquitin.....	13
Abb. 9: Darstellung der Sumoylierung und Desumoylierung.....	15
Abb. 10: Sumoylierung an verschiedenen Proteinen der Zelle	16
Abb. 11: Schematische Darstellung der Yeast-Two-Hybrid Methode	28
Abb. 12: Schematische Darstellung der Co-Immunpräzipitation.....	33
Abb. 13: Darstellung der zwei möglichen Sumoylierungsstellen in ABCA3	42
Abb. 14: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der Wildtyp-Inserts von ABCA3 mit den möglichen SUMOsites	43
Abb. 15: Vergleich der Inserts von ABCA3 mit Wildtyp- und Mutations-SUMOsites	44
Abb. 16: Darstellung der Interaktion von ABCA3-Teilkonstrukten (fish) mit SUMO 1-4 und Ubc9 (bait)	45
Abb. 17: Darstellung der Interaktion von ABCA3-Teilkonstrukten (bait) mit SUMO 1-4 und Ubc9 (fish)	45
Abb. 18: Vektoren mit Wildtyp-ABCA3 und ABCA3 mit mutierten SUMOsites	46
Abb. 19: Westernblot mit Detektion des ABCA3-HA-FLAG-SUMO-Komplex nach Co-IP von ABCA3 und SUMO 1	47
Abb. 20: Westernblot mit Detektion des ABCA3-HA-FLAG-SUMO-Komplex nach Co-IP von ABCA3 und SUMO 2.....	48
Abb. 21: Immunfluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-WT	49
Abb. 22: Immunfluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-M-I.....	50
Abb. 23: Immunfluoreszenzaufnahmen einer A549-Zelle mit transient transfiziertem ABCA3-M-II	50
Abb. 24: Immunfluoreszenzaufnahmen von MLE 12-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-WT und ABCA3-M-I	51
Abb. 25: Immunfluoreszenzaufnahmen von MLE 12-Zellen mit transient transfiziertem ABCA-WT, ABCA3-M-II und ABCA3-M-I-M-II.....	52
Abb. A 1: Darstellung der Aminosäuresequenz von ABCA3 mit den Motiven der SUMOsites I und II	58
Abb. A 2: Vektormap von pGBKT7.....	58
Abb. A 3: Vektormap von pGADT7	58

Tab. 1: Ausgewählte humane ABC-Transporter und die bei Genmutation assoziierten Erkrankungen	5
Tab. 2: Standard PCR Programm für den PCR-Cycler	23
Tab. 3: Liste der Oligonukleotidprimer zur Herstellung der Megaprimer für die SDM	29
Tab. 4: Medien und Agarplatten zur Durchführung des Y2H.....	31
Tab. 5: Liste der Mutationsvektoren von ABCA3 mit den zugehörigen Oligonukleotidprimern.....	35
Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Vektoren für die transiente Transfektion in CHO-Zellen.....	36
Tab. 7: Zusammensetzung des Lysispuffers zur Herstellung der Gesamtzelllysate	37
Tab. 8: Zusammensetzung und Mengenangaben der stacking gel-Schicht.....	38
Tab. 9: Zusammensetzung und Mengenangaben der running gel-Schicht.....	38
Tab. 10: Zusammensetzung und Mengenangaben der spezifischen Puffer A und B	38
Tab. 11: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen für den Westernblot	39
Tab. A 1: Übersicht der Plasmidkonstrukte (fish) für den Y2H	59
Tab. A 2: Übersicht der Plasmidkonstrukte (bait) für den Y2H.....	60

°C	Grad Celsius
ABC	ATP-binding-cassette
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CPAP	continous positive airway pressure
c-terminal	carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FBS	fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gramm
H₂O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HDL	high density lipoprotein
kDa	kiloDalton
Mg	Milligramm
µl	Microliter
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
NBF	nucleotid-binding fold
n-terminal	aminoterminal
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEEP	positive endexpiratory pressure
RDS	respiratory distress syndrome
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	revolutions per minute
SDM	site directed mutagenesis
SENP	sentrin specific peptidase
SP	Surfactantprotein
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Ubc9	Ubiquitin-conjugating enzyme 9
WB	Westernblot
WT	Wildtyp

1 Einleitung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wird die Sumoylierung des Proteins ABCA3 untersucht. ABCA3 ist in der Produktion und Speicherung von Surfactant involviert und Mutationen in der Sequenz des codierenden Gens *ABCA3* spielen eine Rolle in der Pathologie des respiratory distress syndrome (=RDS) des Neugeborenen und einer chronischen interstitiellen Lungenerkrankung im Kindesalter.

Zuerst wird auf die Pathologie und Bedeutung des RDS eingegangen. Es folgt eine molekulare Einführung über den Aufbau, die Einteilung und Bedeutung der ABC-Transporter im Allgemeinen und ABCA3 im Speziellen. Zum Abschluss wird das Augenmerk auf die Definition der Sumoylierung, ihre Bedeutung und die Sumoylierungsstellen in ABCA3 gelegt. Die Sumoylierungsstellen und die Untersuchung der möglichen Sumoylierung sind Gegenstand dieser Arbeit und der Fragestellung. Die Vorlage zu den Experimenten in dieser Arbeit lieferte der erfolgreiche Nachweis der Sumoylierung von dem ebenfalls aus der Familie der ABC-Transporter stammenden Proteins CFTR, welches auch als ABCC7 bekannt ist (Schulze 2009).

ABCA3 sollte auf mögliche Sumoylierungsstellen *in vitro* (=außerhalb des lebenden Organismus) und *in vivo* (=im lebenden Organismus) getestet werden. Ebenso interessant gestaltete sich die Frage nach der Rolle der Sumoylierung im Targeting von ABCA3 an sein Zielorganell, das Lamellarkörperchen.

1.1 Das Atemnotsyndrom – eine Lungenfunktionsstörung bei Surfactantmangel

Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen (engl.: respiratory distress syndrome, RDS), welches auch hyalines Membransyndrom genannt wird, ist eine Lungenfunktionsstörung in der Neonatalperiode. Es ist ein häufiges Krankheitsbild von Frühgeborenen und tritt bei 1% aller Neugeborenen auf (Koletzko 2004).

Die Pathophysiologie äußert sich in einer nicht genügend ausgereiften Lunge des Frühgeborenen, die unfähig ist, ausreichend Surfactant zu bilden. Surfactant (= surface-active-agent), ein Gemisch aus Phospholipiden, anderen Lipiden und Proteinen, wird in der Lunge durch Pneumozyten Typ II gebildet und setzt die Oberflächenspannung der Alveolen herab. Der Mangel an Surfactant nach der Geburt führt zu einem Kollaps der Alveolen und Atelektase im Lungengewebe, so dass die Entfaltung der Lungenbläschen und letztendlich die Belüftung der Lunge nur noch durch hohe Beatmungsdrücke aufrechterhalten werden kann. Dieser hohe Beatmungsdruck führt zu einer weiteren Schädigung der Lunge und durch Anhäufung von Plasmaproteinen zur Ausbildung von hyalinen Membranen in den Alveolen, welche eine weitere Elastizitätsreduktion der Lunge zur Folge hat. Neben dieser primären

Surfactantbildungsstörung werden auch eine sekundäre Surfactantbildungsstörung bei Hypoxie, Durchblutungsstörungen und Veränderungen in der Struktur und dem Stoffwechsel der Lunge beschrieben (z.B. bei der Lungenhypoplasie oder pulmonaler Hypertension). Auch eine vermehrte Inaktivierung von Surfactant, z.B. bei Infektionen, Mekoniumaspiration oder Lungenblutungen, können zu den typischen Symptomen eines RDS führen.

Die häufigsten klinischen Symptome sind Zyanose, Tachypnoe, respiratorische Einziehungen im Bereich der Rippenzwischenräume oder über dem Sternum, expiratorisches Giemen, Nasenflügeln und vermehrter Sauerstoffbedarf. Mögliche Komplikationen des RDS sind die Ausbildung eines Lungenemphysems oder eine pathologische Ansammlung von Atemgas in Körperhöhlen wie ein Pneumothorax, Pneumomediastinum oder Pneumoperitoneum. Radiologisch äußert sich ein RDS in einer homogenen Verschattung der Lunge auf dem Röntgenbild und kann insgesamt in die Schweregrade I bis IV nach Couchard eingeteilt werden (Couchard et al. 1974).

Stadium	Radiologische Zeichen
Stadium I	Fein granuläre Zeichnung der gesamten Lunge
Stadium II	Zusätzlich positives Luftbronchogramm jenseits des Herzschattens
Stadium III	Zusätzlich Unschärfe des Herzschattens und der Zwerchfellkonturen
Stadium IV	Weißer Lunge

Tabelle 1.1: Radiologische Einteilung des RDS nach Couchard (Couchard et al. 1974)

Die Therapie des RDS richtet sich nach der Schwere der sich manifestierenden Symptome. Bei einem leichten Atemnotsyndrom kann die Sauerstoffgabe oder die Beatmung mit kontinuierlichem positivem Druck (=CPAP-Beatmung) eingesetzt werden. Schwere ausgeprägte Krankheitsbilder erfordern eine endotracheale Intubation und die Beatmung mit erhöhtem inspiratorischem Druck und positivem endexpiratorischem Druck (=PEEP). Bei einer Langzeittherapie können sich durch die forcierte Beatmung mit hohen Sauerstoffpartialdrücken Komplikationen wie die bronchopulmonale Dysplasie oder eine Frühgeborenenretinopathie entwickeln. Zur Prophylaxe eines primären Atemnotsyndroms bei drohenden Frühgeburten wird die Lungenreifung des Kindes durch Gabe von Kortikosteroiden an die Mutter beschleunigt. Die endotracheale Gabe von Surfactant kann bei Frühgeborenen unmittelbar nach der Geburt oder später interventionell bei klinischen oder radiologischen Zeichen durchgeführt werden. Sie wirkt sich positiv auf den Gasaustausch aus und führt zu einer Reduktion von Komplikationen und Sterblichkeit (Koletzko 2004).

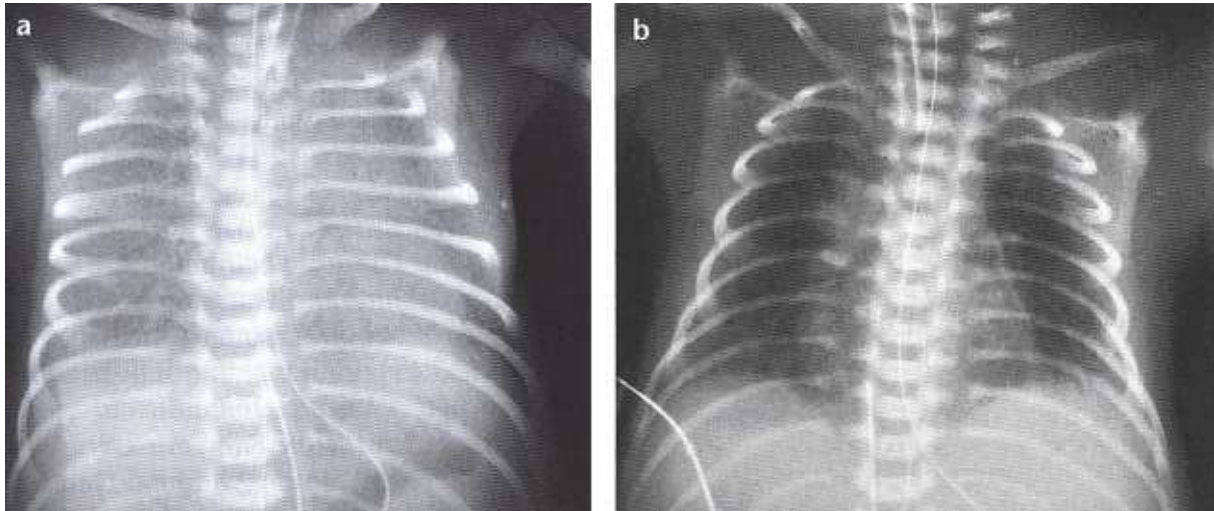


Abb. 1: Röntgenaufnahmen des Thorax eines Frühgeborenen mit RDS

- a:** Röntgenaufnahme des Thorax eines Frühgeborenen mit RDS nach Intubation, 2 Stunden nach der Geburt. Die Aufnahme zeigt eine sehr geringe Inspiration und milchglasartige Transparenzminderung mit positivem Luftbronchogramm. Das Herz und Mediastinum sind nicht scharf abgrenzbar.
- b:** Die Röntgenaufnahme des Thorax 4 Stunden nach der Surfactantgabe zeigt eine deutliche Transparenzzunahme beider Lungenflügel trotz Minderung des endexpiratorischen Beatmungsdrucks (Kauffman 2006).

1.2 ABCA3 – Ein Protein aus der Familie der ABC-Transporter

1.2.1 Molekularer Aufbau, Bedeutung und Funktion der ABC-Transporter

ABC-Transporter bilden die größte Untergruppe in der Superfamilie der Transmembranproteine (Dean 2002). Ihre Aufgaben sind von großer biologischer und medizinischer Bedeutung, unter anderem für den Pathomechanismus der cystischen Fibrose oder für die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika.

Der Name der ABC-Transporter leitet sich aus der englischen Bezeichnung „ATP-binding-cassette“ ab und bezeichnet die gemeinsame Strukturdomäne aller Proteine dieser Familie. An dieser ATP (=Adenosintriphosphat) -bindenden Domäne, welche auch „nucleotid-binding-fold (= NBF)“ genannt wird, findet die Hydrolyse von ATP statt. ABC-Transporter benutzen die daraus gewonnene Energie, um den Transport von verschiedenen Substanzen durch Zellmembranen zu gewährleisten. Der strukturelle Aufbau aller funktionsfähigen Volltransporter ist gleich: Sie bestehen aus zwei hydrophilen NBF und zwei vorwiegend hydrophoben Transmembrandomänen (=TMD). ABC-Transporter können auch als Halbtransporter gebildet werden, wobei sie dann nur jeweils eine NBF und TMD enthalten. Zur Erlangung der vollständigen Funktionsfähigkeit müssen die Halbtransporter zu Dimeren

fusionieren (Dean 2002). Die NBF enthält die charakteristischen Walker A und Walker B Sequenzen, welche 90-120 Aminosäuren voneinander getrennt liegen (Walker et al. 1982). N-terminal der Walker B Sequenz enthält jeder ABC-Transporter das hoch konservierte C-Motiv („signature“), das sich aus der Aminosäuresequenz „LSGGQ“ zusammensetzt. Die im Vergleich zur NBF weit weniger konservierte Sequenz der TMD besteht aus 6-11 Segmenten, welche als α -Helices die Membran durchziehen und die Substratbindungsstelle enthalten. Die Anordnung der verschiedenen Domänen ist unterschiedlich, wobei (von n-terminal bis c-terminal) TMD-NBF-TMD-NBF als übliche Zusammensetzung viel häufiger als NBF-TMD-NBF-TMD oder TMD-NBF und NBF-TMD zu finden ist (Dean 2002).

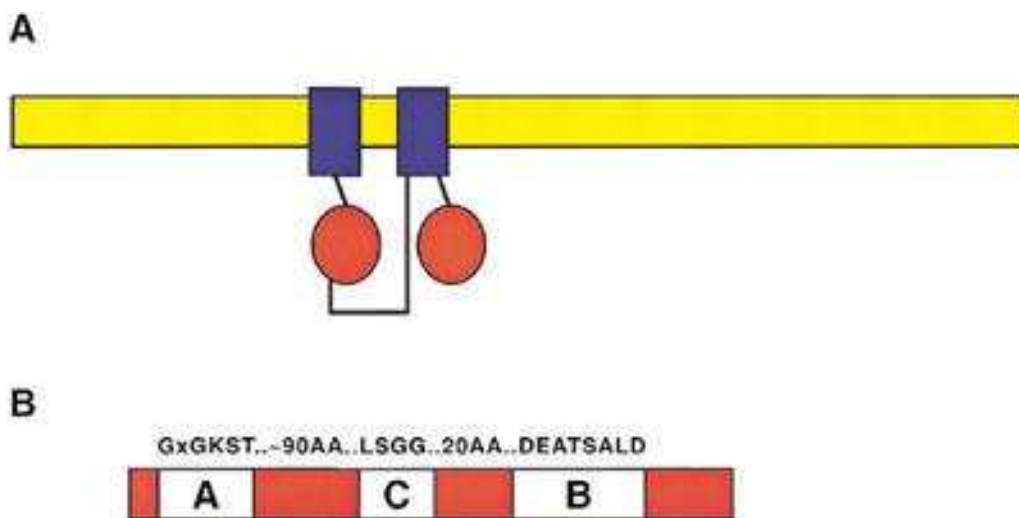


Abb. 2: Schematische Darstellung eines ABC-Transporters

2a: Die Transmembrandomänen (**blau**) und Nucleotid-Bindungsstellen (**rot**) des ABC-Transporters befinden sich in der Lipiddoppelschicht (**gelb**).

2b: Die NBF enthält das Walker A und B Motiv, mit der dazwischen liegenden C-Sequenz. Die häufigsten Aminosäuresequenzen sind darüber angegeben (Dean 2002).



Abb. 3: Darstellung der Genstruktur der ABC-Halb- und Volltransporter

TM bezeichnet die **blau** markierte Transmembrandomäne und ATP die **rot** dargestellte ATP-binding-cassette (Dean 2002).

Es gibt insgesamt 49 bekannte ABC-Transporter, die in fast jedem Organismus zu finden sind. Die Einteilung der ABC-Transporter erfolgt in 7 Untergruppen von A bis G und richtet sich nach der Anordnung der Proteindomänen, der Ähnlichkeit der Genstruktur und der Homologie der Aminosäuresequenzen. In den letzten Jahren wurde nicht nur das

medizinische Interesse an den ABC-Transportern immer größer, sondern auch industriell und ökonomisch konnten sie an Bedeutung gewinnen. Als Beispiel dafür ist die Rolle von ABC-Transportern in der Resistenz von pathogenen Keimen und Pflanzen gegenüber Antibiotika, Antimykotika und Herbiziden zu nennen. Viele Tumorpatienten sterben durch die Unwirksamkeit der Chemotherapeutika, hervorgerufen durch die „multidrug resistance“, eine vermehrte Expression von ABC-Transportern in Tumorgeweben, die einen Transport der Chemotherapeutika aus den Tumorzellen bewirkt (Pauwels et al. 2007; Dean et al. 2001). Mutationen in *ABC*-Transportergenen des Menschen können mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert sein (Stefkova et al. 2004).

Gen	Erkrankung
<i>ABCA1</i>	Morbus Tangier
<i>ABCA2</i>	Demenz vom Alzheimer-Typ
<i>ABCA3</i>	Surfactant-Mangel-Syndrom
<i>ABCA4</i>	Stargardt-Krankheit (juvenile Makuladegeneration), Retinitis pigmentosa, Zapfen-Stäbchendystrophie, Altersabhängige Makuladegeneration
<i>ABCA7</i>	Sjögren-Syndrom
<i>ABCA12</i>	Harlequin-Ichthyose, Lamelläre Ichthyose
<i>ABCB1</i>	Colitis ulcerosa
<i>ABCB3</i>	Morbus Wegener-ähnliche Granulomatose
<i>ABCB4</i>	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3, intrahepatische Schwangerschaftscholestase
<i>ABCB7</i>	X-chromosomale Sideroblastose mit Anämie
<i>ABCB11</i>	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
<i>ABCC1</i>	Überexpression in Tumorzellen
<i>ABCC2</i>	Dubin-Johnson-Syndrom
<i>ABCC6</i>	Pseudoxanthoma elasticum
<i>ABCC7</i>	Cystische Fibrose
<i>ABCC8</i>	Familiäre persistente insulinabhängige Hypoglykämie des Kindes
<i>ABCC9</i>	Dilatative Kardiomyopathie, Regulierung der Schlafdauer
<i>ABCD1</i>	X-Adrenoleukodystrophie
<i>ABCD3</i>	Zellweger-Syndrom Typ 2
<i>ABCG2</i>	Protoporphyrin IX
<i>ABCG5</i>	Beta-Sitosterolämie
<i>ABCG8</i>	Beta-Sitosterolämie

Tab. 1: Ausgewählte humane ABC-Transporter und die bei Genmutation assoziierten Erkrankungen

Eukaryotische ABC-Transporter der äußeren Zellmembran sind Exporter. Sie können substrat- oder multispezifisch sein. Mit wenigen Ausnahmen wie dem CFTR-Rezeptor, ein Chlorid-Ionenkanal bestehend aus zwei NBF, zwei Transmembrandomänen und einer verbindenden Regulatordomäne, sind fast alle ABC-Transporter aktiv. Ihre Aufgabe ist die Beförderung (=Translokation) einer Vielzahl von Substraten wie Lipide, Sterole, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Elektrolyte und Medikamente über die Zellmembran hinweg. Daneben sind ABC-Proteine auch an der Signaltransduktion, Medikamentenresistenz sowie der Antigenprozessierung und -präsentation beteiligt. ABC-Transporter befinden sich nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in den Membranen von Zellorganellen wie dem Golgiapparat, dem Endoplasmatischen Retikulum oder den Peroxisomen. Ihre Funktion liegt hierbei im unidirektionalen Transport von überwiegend hydrophoben Substanzen vom Intra- in den Extrazellulärraum oder aus dem Zytoplasma in ein Zellkompartiment hinein (Higgins 1992). Dabei ist die genaue biologische Funktion etlicher ABC-Transporter aufgrund ihrer komplexen Struktur und ihrer unterschiedlichen Lokalisationen bis heute nicht ausreichend geklärt.

1.2.2 Die Subfamilie der ABCA-Transporter

Die Untergruppe der humanen ABCA-Transporter umfasst 12 Mitglieder, die mit ABCA1 bis ABCA13 bezeichnet werden. ABCA11 wurde aus dieser Nomenklatur gestrichen, da sich das in Frage kommende Gen als ein Pseudogen herausstellte. Pseudogene sind Gensequenzen, die der Sequenz codierender Gene sehr ähnlich sehen. Aus Pseudogensequenzen kann jedoch kein funktionierendes Protein abgelesen werden (Gerstein et al. 2006).

Die ABCA-Gene exprimieren ausschließlich Volltransporter, die in zwei Untergruppen unterteilt werden (Albrecht et al. 2007). Die erste Untergruppe beinhaltet einen Gencluster mit fünf auf dem Chromosom 17 liegenden Transportergenen: *ABCA5*, *ABCA6*, *ABCA8*, *ABCA9* und *ABCA10* (Arnould et al. 2001). Die zweite Subgruppe umfasst die übrigen im Genom verteilten Transportergene: *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCA4*, *ABCA7*, *ABCA12* und *ABCA13* (Albrecht et al. 2007).

Die ABCA-Subfamilie stellt einige der größten ABC-Proteine, manche von ihnen bestehen aus mehr als 2100 Aminosäuren (Dean 2002). Mehrere ABCA-Transporter, wie ABCA1 oder ABCA4 konnten bisher in ihrer Funktion ausführlich charakterisiert werden, wobei alle entscheidende Funktionen im Lipidstoffwechsel besitzen.

ABCA1 spielt eine wichtige Rolle im peripheren Lipidtransport durch die Regulierung des Cholesterinexportes und ist an der Synthese von HDL (=high density lipoprotein) beteiligt (Dean et al. 2001). Mutationen in diesem Gen führen zur Ausprägung der Tangier Krankheit.

Bei dieser seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung kommt es zu einer Anhäufung von Cholesterin in den Zellen des retikulo-endothelialen Systems. Aufgrund von niedrigen HDL-Spiegeln im Blut kommt es bei den betroffenen Patienten in frühen Jahren schon zur Ausprägung von Atherosklerose und peripherer Neuropathie (Serfaty-Lacrosniere et al. 1994; Bodzioch et al. 1999).

ABCA4 gehörte zu den ersten ABCA-Proteinen, dessen Mutation mit einer erblichen Erkrankung in Verbindung gebracht wurde (Allikmets et al. 1997). Es handelt sich hierbei um einen spezifischen ABC-Transporter der Retina, der N-Retinylidene-Phosphatidylethanolamin als Substrat durch die Membran von Photorezeptorzellen befördert. Mutationen im ABCA4-Gen führen zu degenerativen Erkrankungen der Retina, wie der juvenilen Makuladegeneration (Stargardt-Krankheit), der altersbedingten Makuladegeneration, Retinitis pigmentosa RP19 und der Zapfen-Stäbchendystrophie (Allikmets 2000).

Die restlichen Mitglieder der ABCA-Familie konnten bereits in verschiedenen Geweben detektiert werden. Bisher gibt es keine gesicherten Daten über ihre Substrate oder die spezifische Funktion der Transporter. ABCA2 findet sich in den Lysosomen der Oligodendrozyten des Gehirns der Ratte (Zhou et al. 2001) und spielt womöglich eine Rolle bei der Bildung von Myelin. ABCA7 wird vermehrt in der Milz und in hämatopoetischem Gewebe exprimiert (Dean et al. 2001). ABCA5 und ABCA10 finden sich vermehrt im Skelettmuskel, ABCA6 im Lebergewebe, ABCA8 in den Eierstöcken, ABCA9 im Herzen und ABCA12 und ABCA13 im Magengewebe (Dean 2002).

1.2.3 Aufbau und Funktion von ABCA3

Im Jahre 1996 entdeckten Norbert Klugbauer und seine Arbeitsgruppe im Zuge von Expressionsstudien in den Zellen eines humanen medullären Schilddrüsenkarzinoms die messenger-RNA (=Boten-RNA) eines ABC-Transporters mit unbekannter Funktion (Klugbauer et al. 1996). Dieses Protein wurde zunächst ABC-C benannt. Einige Zeit später wurde durch Immunisierung einer Maus mit isolierten Lamellarkörperchen aus der Ratte ein Antikörper generiert, der gegen ein Protein namens LBM180 (=lamellar body membrane protein, mit einer Größe von 180 kDa) aus den Lamellarkörperchen der Pneumozyten II reagierte (Zen et al. 1998). Eine japanische Arbeitsgruppe entdeckte die cDNA-Sequenz eines Proteins in der menschlichen Lunge, welches der ABCA-Subfamilie zugeordnet werden konnte und ABCA3 benannt wurde (Yamano et al. 2001). Es stellte sich heraus, dass ABC-C und ABCA3 dasselbe Protein darstellten und auch dass LBM180 mit ABCA3 völlig übereinstimmte (Mulugeta et al. 2002).

ABCA3 besteht aus 1704 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 190 kDa. Es handelt sich, gemäß der typischen Grundstruktur der ABC-Transporter, um einen Volltransporter mit 2 Transmembrandomänen, bestehend aus jeweils 6 Transmembranregionen und 2 Nucleotid-bindenden Domänen auf der zyttoplasmatischen Seite. Das humane ABCA3-Gen liegt auf dem Chromosom 16p13.3 (Connors et al. 1997). Es wird physiologisch am meisten in der Lunge exprimiert (Mulugeta et al. 2002), obwohl die Expression von ABCA3 auch in extrapulmonalen Geweben (u.a. Gehirn, Pankreas, Herz, Niere) festgestellt werden konnte. Pränatal steigt die Expression von ABCA3 im Lungengewebe des Kindes an und erreicht das höchste Expressionsniveau um die Geburt herum (Mulugeta et al. 2002).

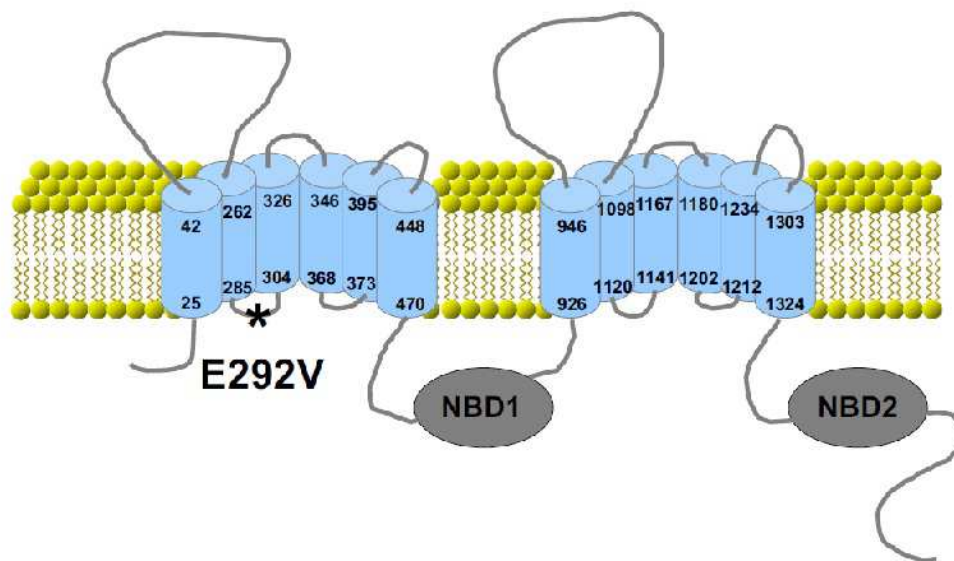


Abb. 4: Schematische Darstellung von ABCA3

Die Transmembrandomänen mit ihren 6 Untereinheiten (blau) in der Lipiddoppelschicht (gelb) sind mit Zahlen markiert, die verschiedene Aminosäurepositionen anzeigen. Die beiden Nucleotid-bindenden Domänen sind grau abgebildet. Mit einem Stern * ist die Stelle der häufigsten Mutation in ABCA3 bezeichnet (Bullard et al. 2006).

ABCA3 befindet sich in der Außenmembran der Lamellarkörperchen, einem Zellorganell der Alveolarepithelzellen Typ II (=Pneumozyten Typ II) in der Lunge. Diese Lamellarkörperchen sind vermutlich von Lysosomen abgeleitete Zellorganelle (Balis et al. 1964), deren konzentrische Membranen das Surfactant zwiebelschalenartig umgeben. Sie werden durch die Fusion verschiedener Multivesikularkörper gebildet.

Die genaue Funktion von ABCA3 ist bis heute nicht ausreichend geklärt. In Zellkulturversuchen zeigte sich, dass ABCA3 die Aufnahme von Lipiden in intrazelluläre, lamellarkörperchenähnliche Vesikel fördert (Nagata et al. 2004; Cheong et al. 2007). Vieles deutet darauf hin, dass ABCA3 eine Rolle im Transport von Surfactant spielt (Yamano et al. 2001; Mulugeta et al. 2002). Surfactant ist ein Gemisch aus Phospholipiden und

Surfactantproteinen (=Surfactant Protein-A, SP-B, SP-C und dSP-D), das durch Exocytose in den Alveolarraum abgegeben wird. Dort reduziert es die Oberflächenspannung an der Grenzschicht der Alveolen zwischen Luft und Flüssigkeit und verhindert so die Atelektase (=Kollaps der Lungenbläschen).

Bei Menschen und Mäusen wurde beobachtet, dass ein ABCA3-Mangel zur Ausbildung von Surfactant mit niedrigem Phosphatidylcholin- und Phosphatidylglycerinanteil führt und die Fehlbildung der Lamellarkörperchen begünstigt (Garmany et al. 2006). Dies zeigt, dass ABCA3 essentiell für den Surfactantstoffwechsel in der Lunge ist. In Anbetracht der Lokalisation von ABCA3 in der Membran der Lamellarkörperchen ist es sehr wahrscheinlich, dass ABCA3 vorwiegend für die Regulation des Transportes der Lipidbestandteile von Surfactant verantwortlich ist.

1.2.4 ABCA3-Mangel

Der ABCA3-Mangel ist eine genetisch bedingte Erkrankung, welche rezessiv (=bei Mutation beider Allele treten Merkmale der Krankheit auf) vererbt wird. Ähnlich wie bei SP-B- und SP-C-Mangel ist die Funktion des Surfactantstoffwechsels in der Lunge beeinträchtigt (Hartl et al. 2005). Es sind mittlerweile mehr als 180 Mutationen im *ABCA3*-Gen bekannt (Hamvas 2010). Diese Mutationen sind nicht nur mit dem lebensbedrohlichen Mangel an Surfactant bei Neugeborenen assoziiert, sondern auch bei Kindern mit schweren interstitiellen Lungenerkrankungen wurden Mutationen im *ABCA3*-Gen gefunden. Man geht davon aus, dass 2 defekte Allele zur neonatalen tödlichen Erkrankung führen und bei den chronischen Erkrankungen mindestens 1 Allel eine Restfunktion hat (Shulenin et al. 2004; Bullard et al. 2005).

Haplotypanalysen der finnischen Arbeitsgruppe um Minna Karjalainen beschäftigten sich mit dem Einfluss genetischer Polymorphismen von ABCA3 auf die Anfälligkeit für die Ausbildung eines Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen. So scheinen bestimmte Haplotypen für ein gehäuftes Vorkommen bei Frühgeborenen mit RDS und die Prädisposition für die Entwicklung einer chronischen Lungenerkrankung verantwortlich zu sein (Karjalainen et al. 2008).

ABCA3-Genmutationen werden in Typ I und II eingeteilt, die verschiedene Funktionen von ABCA3 beeinträchtigen. Typ I Mutationen führen zu einer gestörten intrazellulären Verteilung von ABCA3, während Typ II Mutationen die Hydrolyseaktivität des Transporters vermindern (Matsumura et al. 2006).

Die Mutationen in *ABCA3* betreffen verschiedene Lokalisationen und Funktionen im Gen. Die Arbeitsgruppe um Sergey Shulenin führte 2004 eine Sequenzierung der Exons von *ABCA3* bei 21 termingerecht geborenen Kindern mit den klinischen und radiologischen Zeichen eines RDS durch. Diese Kinder wurden anhand ihrer Familienanamnese, wie zum Beispiel

bereits erkrankte Geschwister oder Konsanguinität der Eltern, ausgewählt. Bei 16 Kindern konnten homozygote Nonsense-Mutationen (=sinnentstellende Mutation), Frameshift-Mutationen (=Rasterschubmutation) sowie Splice-site-Mutationen (=Mutationen in der Ansatzstelle zum Entfernen der Introns) im *ABCA3*-Gen entdeckt werden. Die hohe Zahl der Mutationen schien darauf hinzuweisen, dass der *ABCA3*-Mangel im Vergleich zu den bereits bekannten genetischen Ursachen für Surfactant-Mangel wie *SP-B*-Mangel oder Mutationen im *SFTPC* (=pulmonary surfactant-associated protein C) häufiger auftreten könnte. *ABCA3* könnte mit der längeren Aminosäuresequenz (1704 AS), im Gegensatz zu prozessiertem *SP-B* (79 AS) oder *SP-C* (34 AS), eine sehr viel größere Wahrscheinlichkeit für Mutationen im betreffenden Gen bieten. Desweiteren wurde in derselben Studie bereits beobachtet, dass homozygote *ABCA3*-Mutationen nicht immer letal endeten und es durchaus mildere Ausprägungsformen der Erkrankung gab, da von den betroffenen Kindern ein Patient die Neonatalperiode überleben konnte (Shulenin et al. 2004).

In einer weiteren Studie wurden 195 Neugeborene mit chronischer Lungenerkrankung untersucht. Dabei fand man bei ursprünglich mit desquamativer interstitieller Pneumonie (desquamative interstitial pneumonitis, DIP) histologisch diagnostizierten Kinder im Rahmen der Sequenzierung des *ABCA3*-Gens bei drei von vier Kindern eine Punktmutation auf einem Allel. Diese Mutation führte zu einem Austausch von Valin zu Glutaminsäure in der Aminosäuresequenz von *ABCA3* und wurde E292V benannt (s. Abb. 4). Bei einer Kontrolle mit 200 gesunden Probanden stellte sich heraus, dass diese Mutation kein häufiger Polymorphismus war (Bullard et al. 2005). Bei der Untersuchung von 150 weiteren Kindern konnte E292V bei sieben dieser Kinder identifiziert werden, während eine weitere Mutation auf einem anderen Allel von *ABCA3* bei 5 Kindern gefunden wurde.

Eine vor kurzem durchgeführte Studie bezüglich dieser häufig bei Patienten mit RDS auftretenden Mutation E292V zeigte in einer Kohorte von 3177 Neugeborenen mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht von unter 1500 g im heterozygoten Zustand keine Auswirkung auf die Lungenerkrankung. In einer Analyse der Subgruppe von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von unter 30 Wochen, wiesen diese ein höheres Risiko zur Ausbildung von interstitieller Lungenerkrankung auf und erfordereten eine längere und häufigere Beatmung (Härtel et al. 2012).

Das klinische Bild bei *ABCA3*-Mangel ist sehr variabel. Die Arbeitsgruppe um Minh L. Doan beobachtete neun Kinder mit *ABCA3*-Mutationen im Zeitraum zwischen 1992 und 2005. Das erste Auftreten der Symptome sowie die Schwere ihrer Ausprägung war von Patient zu Patient sehr unterschiedlich. Mitunter äußerten sie sich in Husten, Rasselgeräuschen, Gedeihstörungen und der Ausbildung von Trommelschlegelfingern. In Computertomographieaufnahmen der Lunge ließen sich meist eine milchglasartige Verdichtung des Gewebes mit verdickten Septen sowie Zystenbildung erkennen.

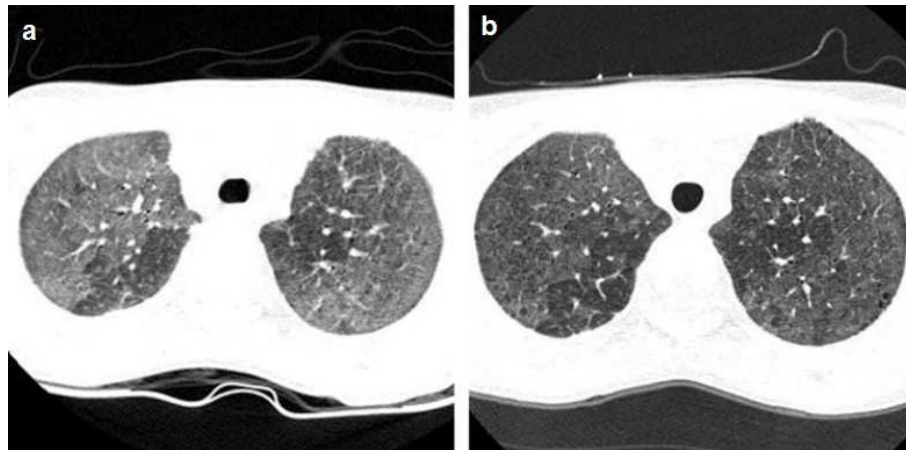


Abb. 5: Axiale hochauflösende CT-Thorax Aufnahmen eines Kindes mit ABCA3-Mangel

Aufnahme **a** zeigt die CT-Thorax-Aufnahme eines 6 Jahre alten Kindes mit mosaikartiger Signaldämpfung und diffuser, milchglasartiger Verdichtung des Lungengewebes. Aufnahme **b** zeigt dasselbe Kind, im Alter von 9 Jahren, mit persistierenden pathologischen Zeichen sowie neu aufgetretener Zystenbildung und verdichteten Septen im Lungengewebe.

Die histopathologischen Untersuchungen zeigten das Bild einer pulmonalen Alveolarproteinose, einer desquamativen interstitiellen Pneumonie oder einer unspezifischen interstitiellen Pneumonitis. Der Verlauf der Erkrankung war mitunter sehr verschieden. Manche Patienten erkrankten schon im frühen Kindesalter an einem schweren, irreversiblen Atemnotsyndrom oder einer progressiven interstitiellen Lungenerkrankung, die eine frühe Lungentransplantation erforderten. Andere Patienten dagegen konnten bis ins junge Erwachsenenalter ohne eine Transplantation überleben (Doan et al. 2007).

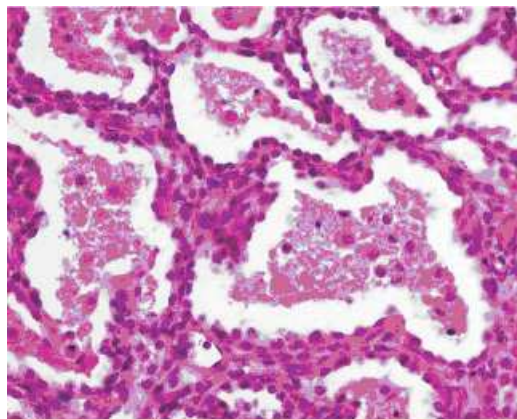


Abb. 6: Histopathologische Aufnahme von dem Lungengewebe eines Patienten mit ABCA3-Mangel

Das Lungengewebe wurde in der Autopsie des an der Folge einer homozygoten Splicing-Mutation erkrankten und später verstorbenen Patienten entnommen. Die Aufnahme zeigt eine Verdickung des interstiellen Gewebes sowie deutliche Alveolarmakrophagen und Bereiche mit granulösem proteinartigem Material (modifiziert nach Shulenin et al. 2004).

Eine Studie im Jahre 2005, welche 4 Neugeborene mit einem angeborenem Surfactant-Mangel untersuchte, zeigte in 2 Fällen einen SP-B-Mangel. Bei den anderen 2 Kindern wurden Mutationen im *ABCA3*-Gen als Ursache für die Erkrankung und das oft folgende Versterben der Kinder identifiziert. In den Lungengewebsbiopsien der Kinder wurden abnormale Lamellarkörperchen gefunden (Edwards et al. 2005).

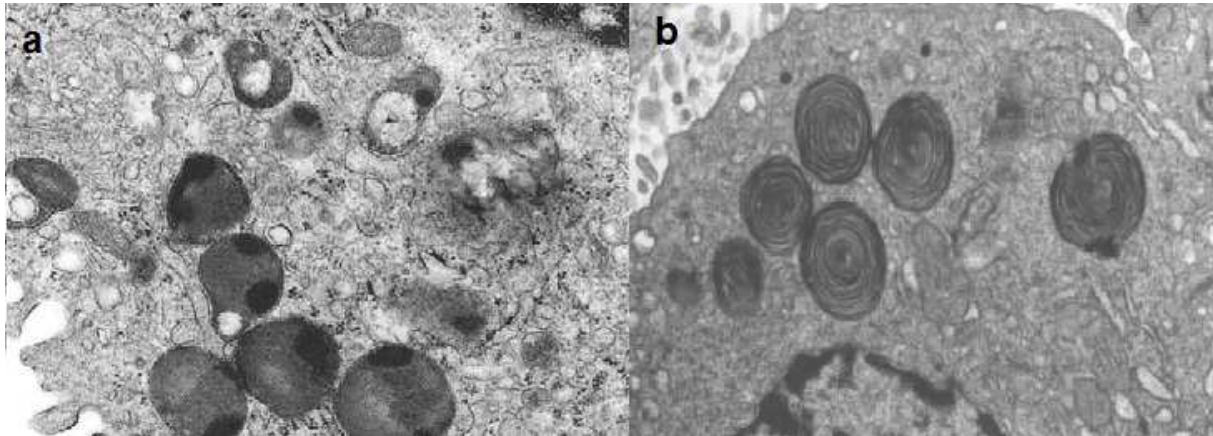


Abb. 7: Vergleichende elektronenmikroskopische Aufnahmen von abnormen und gesunden Lamellarkörperchen

In Abbildung **a** sind die Lamellarkörperchen eines Patienten mit Mutationen in *ABCA3* zu sehen, in Abbildung **b** zum Vergleich Lamellarkörperchen aus dem Lungengewebe eines gesunden Patienten. Die dunklen, kugeligen Gebilde zeigen in **a** einen Verlust des konzentrisch angeordneten Zwiebschalenmusters wie in **b**. Stattdessen zeigt sich hier eine „spiegeleiartige“ Abbildung mit elektronendichtem Material innerhalb der Lamellarkörperchen (modifiziert nach Edwards et al. 2005 und Shulenin et al. 2004).

In Knockout-Modellen für *ABCA3* in der Maus, einschließlich eines Modells unserer Arbeitsgruppe, kam es zum raschen Versterben von Mäusen mit homozygoten Null-Allelen kurz nach ihrer Geburt aufgrund von respiratorischer Insuffizienz (Fitzgerald et al. 2006; Hammel et al. 2007; Cheong et al. 2007). Histologische Analysen der Lunge zeigten die Abwesenheit von normalen Lamellarkörperchen und Surfactant sowie eine massive Reduktion von Phosphatidylglycerin (Fitzgerald et al. 2006). Ein Vergleich von homozygoten Knockout-Mäusen (=ABCA3 $-/-$) und heterozygoten (=ABCA3 $+/-$) sowie gesunden Tieren (=ABCA3 $+/+$) zeigte Atelektasen in der Lunge der homozygot erkrankten Mäuse, während die Gasverteilung in der Lunge der heterozygoten und gesunden Tiere normal war (Hammel et al. 2007). Valérie Besnard und ihre Arbeitsgruppe generierten Knockout-Mäuse, bei denen nur spezifisch in respiratorischen Epithelzellen *ABCA3* homozygot mutiert wurde. Diese Inaktivierung eines Gens in nur einem Organ, die allerdings immer unvollständig ist, wird „conditional knockout“ genannt. Der Großteil dieser Tiere verstarb kurz nach der Geburt an einem Mangel an Surfactant. Etwa 30 Prozent überlebten und zeigten die Ausbildung einer chronischen Lungenerkrankung mit Störung in der Surfactantgenese (Besnard et al. 2010).

1.3 Sumoylierung – eine spezielle Form der posttranslationalen Modifikation

1.3.1 Molekulare Grundlagen

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen ist eine Möglichkeit der Zelle, die Proteine nach ihrer Translation zu beeinflussen. Es gibt eine ganze Reihe posttranslativaler Modifikationen, wie zum Beispiel die Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung und die Sumoylierung. Die Sumoylierung bezeichnet die posttranslationale Modifikation durch das Ubiquitin-ähnliche SUMO-Protein. Dabei werden zahlreiche Prozesse eines Proteins, wie seine Lokalisation, Stabilität, Aktivität oder Interaktion mit anderen Proteinen in der Zelle reguliert (Melchior 2000; Melchior et al. 2003).

Der Name der SUMO leitet sich aus dem englischen Begriff „small ubiquitin-like modifier“ ab (Mahajan et al. 1997). SUMO-Proteine haben eine ihrer Bezeichnung nach geringe Größe von ungefähr 10 kDa und Ähnlichkeit zu Ubiquitin. Dieses enthält meist 76 Aminosäurereste und der Name leitet sich aus dem „ubiquitären“ Vorhandensein des Proteins im Gewebe von eukaryotischen Zellen ab (Ozkaynak et al. 1987).

In Säugetieren sind 4 SUMO-Proteine, auch Isoformen genannt, bekannt: SUMO 1, 2, 3 und 4 (Matunis et al. 1998; Bohren et al. 2004). Das SUMO 1 Protein zeigt eine hohe räumlich-strukturelle Kongruenz mit Ubiquitin, obwohl beide Proteine nur zu 18% in der Primärstruktur übereinstimmen (Bayer et al. 1998). Beide Proteine gehen eine kovalente Bindung mit einem Target-Protein ein (=Konjugation). Dabei ist jedoch die Ubiquitinierung meist für die Markierung von Proteinen zum intrazellulären Abbau verantwortlich, während die Sumoylierung der Proteinstabilisierung (Klenk et al. 2006), der Lokalisation des Proteins in der Zelle oder der Regulierung der Proteinaktivität dienen kann (Geiss-Friedlander et al. 2007).

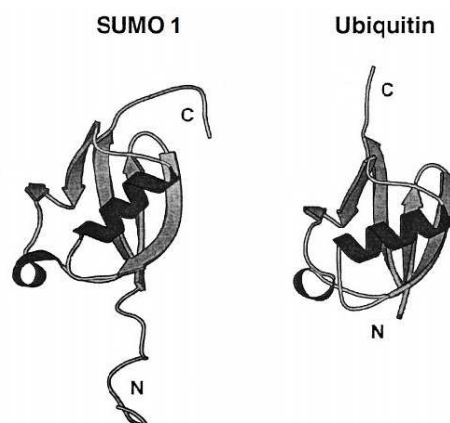


Abb. 8: Vergleich der Struktur von SUMO 1 und Ubiquitin

C bezeichnet jeweils das C-terminale und N das N-terminale Ende der Proteine. Das SUMO 1-Protein und Ubiquitin zeigen eine hohe Ähnlichkeit in der 3D-Struktur, obwohl beide Proteine nur wenig in der Primärsequenz übereinstimmen (modifiziert nach Melchior 2000).

Die Isoformen 2 und 3 sind beinahe identisch in ihrer Struktur und zeigen eine Übereinstimmung von 46% mit der Sequenz von SUMO 1 (Ding et al. 2005). Über SUMO 4 existieren derzeit keine ausreichenden Forschungsergebnisse.

Das SUMO-Protein wird als Vorläuferprotein von Cystein-Proteasen, SENP (=SUMO/sentrin-specific protease) genannt, am C-Terminus prozessiert (Kamitani et al. 1997; 1998). Die aktive, zur Konjugation befähigte Form des Proteins trägt am C-Terminus ein Doppelglycin-Motiv.

Die Modifikation durch die SUMO-Proteine erfolgt durch die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des SUMO-Proteins und einer ϵ -Aminogruppe eines Akzeptorlysins des Target-Proteins (=Zielprotein). Die Isopeptidbindung erfolgt an einen Lysinrest, der meist in das SUMO-Motiv eingebettet ist und die spezifische Sumoylierungsstelle darstellt. Das Konsensus-Motiv „ Ψ KxE“ besteht aus 4 Aminosäuren, wobei Ψ für eine aliphatisch verzweigte Aminosäure, K für Lysin, x für eine beliebige Aminosäure und E für Glutaminsäure steht.

Das SUMO-Konsensus-Motiv stellt dabei die Bindungsstelle für die SUMO-Proteine dar und vermittelt auch die direkten Interaktionen mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 (= ubiquitin-conjugating enzyme 9), welches ebenfalls sehr wichtig für die SUMO-vermittelte Modifikation ist (Sampson et al. 2001).

Die Konjugation des SUMO-Proteins an das Target-Protein beginnt mit einer ATP-abhängigen Bindung des SUMO-Proteins an das SUMO-aktivierende Enzym E1 (=AOS1/UBA2). Das SUMO-Adenylat bildet über seine Carboxygruppe am C-terminalen Ende eine Thioesterbindung mit dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms aus. Dann geht das konjugierende Enzym E2 (=Ubc9) auch über das Cystein seines aktiven Zentrums eine Thioesterbindung mit dem SUMO-Protein ein (Geiss-Friedlander et al. 2007). Im letzten Schritt wird das SUMO-Protein auf das Target-Protein übertragen (Hochstrasser 2000).

Dies kann auch in Abwesenheit der E3-Enzyme (s. Abb. 6) ablaufen, jedoch gibt es in diesem Schritt, ähnlich wie bei der Ubiquitinierung, E3-ähnliche Faktoren, die als Adaptoren oder Substraterkennungsproteine fungieren und so die Sumoylierung effizienter machen (Matunis et al. 1996; Mahajan et al. 1997).

Die Sumoylierung ist reversibel und die Desumoylierung erfolgt durch die SENP-Proteine (s.o.), die auch für die Prozessierung der Vorläuferproteine von SUMO verantwortlich sind (Gong et al. 2000). Es gibt insgesamt 8 SENP-Proteine in Säugetieren und 4 von ihnen zeigen eine Prozessierungs- und SUMO-Isopeptidase-Aktivität: SENP 1, 2, 3 und 6.

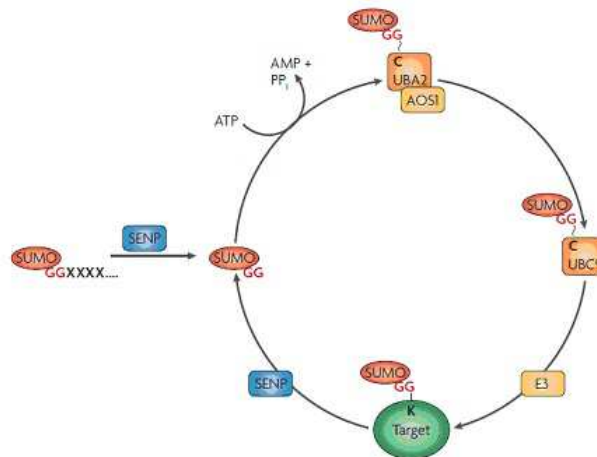


Abb. 9: Darstellung der Sumoylierung und Desumoylierung

Die Vorstufe des SUMO-Proteins wird durch sumo-spezifische Isopeptidasen (sentrin-specific-peptidase=SENP) gespalten, so dass sein C-terminales Gly-Gly-Motiv frei wird. Das reife SUMO-Protein wird an einem C-terminalen Glycinrest in einer ATP-abhängigen Reaktion durch eine Thioesterbindung an das E1 Heterodimer AOS1-UBA2 gebunden. Danach wird SUMO auf den Cystinrest des E2 Enzyms Ubc9 übertragen. Schlussendlich bildet sich meist mithilfe der E3 Ligase eine Isopeptidbindung zwischen dem Glycinrest von SUMO und dem Lysinrest des Substrates aus. Die SUMO-Substrat-Bindung kann durch die SENPs wieder gelöst werden (Geiss-Friedlander et al. 2007).

Es gibt eine große Anzahl an verschiedenen Proteinen, die durch SUMO modifiziert werden. Sie befinden sich unter anderem in der Plasmamembran, dem Zytoplasma, dem Zellkern und dem Endoplasmatischen Retikulum. Diese Proteine üben unterschiedliche Funktionen aus, wie zum Beispiel die Regulierung der DNA-Replikation und -Reparatur und die Steuerung der Membrankanalaktivität oder der intrazellulären Lokalisation von Target-Proteinen (Geiss-Friedlander et al. 2007).

1.3.2 Sumoylierung von Transmembranproteinen

Der Kaliumkanal K2P1 wurde als erstes sumoyliertes Membranprotein beschrieben (Rajan et al. 2005). Demnach bewirkte die Sumoylierung des K2P1-Kanals eine negative Regulation des Kaliumtransportes. Umgekehrt betrachtet führte die Inaktivierung des SUMO-Motivs zu einem Kaliumstrom über die Zellmembran. Diese Ergebnisse konnten jedoch von einer weiteren Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Felicangeli et al. 2007). Das bereits identifizierte SUMO-Motiv konnte nicht verifiziert werden und es wurde die Hypothese aufgeworfen, nicht die künstliche Unterbindung der Sumo-Bindung, sondern die negative Ladung des anstelle vom Lysinrest eingeführten Glutaminsäurerestes führe zu den beobachteten Effekten.

Auch für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.5 wurde eine reversible Sumoylierung beschrieben, die anscheinend die Steuerung der Erregbarkeit von Herzmuskelzellen beeinflusste (Benson et al. 2007). Man fand zwei zytoplasmatisch lokalisierte SUMO-Motive,

an denen die Bindung von Ubc9 und SUMO-Protein 1, 2 und 3 nachgewiesen werden konnte. Versuche sowohl *in vitro* (=außerhalb des lebenden Organismus) als auch *in vivo* (=im lebenden Organismus) zeigten die Desumoylierung von Kv1.5 durch SENP 2, und eine Mutation der SUMO-Motive oder die Koexpression von SENP 2 resultierte in einer selektiven Hyperpolarisation (=Senkung des Membranpotentials). Zudem konnten SUMO-Motive an analogen Stellen an weiteren α -Untereinheiten des Kv-Kanals, wie Kv1.1 und 1.2, nachgewiesen werden.

Einen interessanten Ansatz zum Zusammenhang zwischen Endozytose (=Membrantransport durch Einstülpeln und Abschnüren der Zellmembran) und Sumoylierung lieferte die Entdeckung der Modifikation durch SUMO an der Kainatrezeptoruntereinheit GluR6 (Martin et al. 2007). Die Abwesenheit von Kainat triggerte demnach wahrscheinlich eine Rezeptorvermittelte Endozytose. Auch im metabotropen Glutamaterezeptor 8 (=mGluR8, ein Rezeptor mit intrazellulärer Signalkaskade) wurde ein SUMO-Motiv entdeckt und durch spezifische Mutagenese des Lysins im Konsensus-Motiv später *in vivo* verifiziert (Tang et al. 2005). Die genaue Funktion der Sumoylierung von mGluR8 ist bisher unklar.

Eine Interaktion zwischen Ubc9 und den Glucosetransportern 1 und 4 konnte mit Hilfe von Hefen (Giorgino et al. 2000) nachgewiesen werden. Die physiologische Interaktion von Ubc9 mit GLUT4 ist mittlerweile bekannt, jedoch gibt es keinen Anhalt für eine direkte Sumoylierung des Transporters.

Das Membranprotein Phosphoducin wurde in sumoylierter Form in transfizierten HEK293- und COS7-Zellen bei Überexpression von SUMO-1 und Ubc9 gefunden (Klenk et al. 2006).

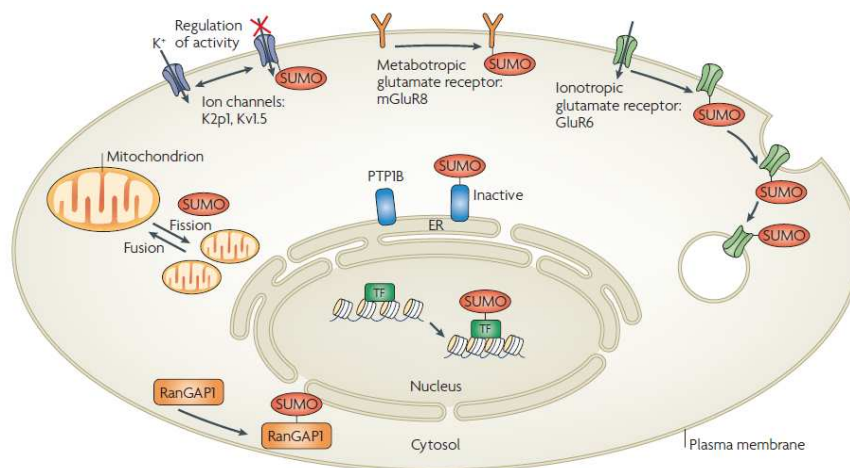


Abb. 10: Sumoylierung an verschiedenen Proteinen der Zelle

Zielproteine von SUMO befinden sich oft im Nucleus. Es gibt aber auch Proteine in der Plasmamembran, im Endoplasmatischen Reticulum und im Cytoplasma, die sumoyliert werden. Einige Beispiele werden in dieser Abbildung gezeigt und im vorangegangenen Text näher beschrieben. Dazu gehören die Ionenkanäle K2P1 und Kv1.5, die scheinbar nach ihrer Modifikation durch SUMO weniger aktiv sind. Die Sumoylierung des Glutamaterezeptors GluR6 führt zu seiner Endozytose durch einen bisher unbekanntem Mechanismus. Auch die Wirkung des sumoylierten Glutamaterezeptors mGluR8 konnte bisher nicht aufgeklärt werden (Geiss-Friedlander et al. 2007).

1.3.3 Sumoylierung von ABC-Transportern

Es gibt ABC-Transporter, an denen bereits die Sumoylierung und ihre Bedeutung für das Protein erforscht wurden.

Ein Beispiel dafür ist der Transporter ABCC2, der in die Sekretion von organischen Anionen aus Hepatozyten involviert ist. Die Arbeitsgruppe um Satoko Minami entdeckte 2009 durch Yeast-Two-Hybrid Experimente in der „linker region“ von ABCC2 eine SUMOsite. Diese wurde durch das SUMO 1-Protein mit Unterstützung durch Ubc9 sumoyliert. Durch den Austausch des Lysins im Erkennungsmotiv der Sumoylierungsstelle zu Arginin konnte nachgewiesen werden, dass keine Bindung zwischen SUMO 1 und der „linker region“ stattfand. Zusätzlich wurde die mögliche Sumoylierung der ABCC2-linker-region durch SUMO 1 mittels eines Anti-HA-Antikörpers im Westernblot untersucht. Dabei zeigte sich eine erfolgreiche Sumoylierung durch den Shift der unsumoylierten Bande bei einer Größe von 43 kDa auf 55 kDa bei dem sumoylierten Proteinteil, da das kovalent gebundene SUMO Protein 1 eine Größe von 12 kDa besitzt.

In vivo wurde der Verdacht einer Sumoylierung erhärtet, indem McARH7777-Zellen mit ABCC2 transfiziert wurden und die Sumoylierung mittels der Co-Immunpräzipitationsmethode nachgewiesen wurde. Desweiteren konnte herausgefunden werden, dass die spezifische Hemmung von Ubc9 in den Zellen keinen maßgeblichen Einfluss auf die Lokalisation von ABCC2 hatte, jedoch die Expression von ABCC2 in den McARH7777-Zellen um 30 Prozent verringert wurde (Minami et al. 2009).

Ein weiteres Beispiel ist CFTR (Synonym: ABCC7). Durch die Arbeitsgruppe von Dr. Judith Glöckner-Pagel (Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München) wurden zwei mögliche SUMOsites in der Primärsequenz des Proteins entdeckt und die Sumoylierung konnte als wesentlicher Beitrag in der Regulierung des intrazellulären Targeting von CFTR identifiziert werden. Dabei zeigte sich mittels der Yeast-Two-Hybrid Methode, dass CFTR an beiden SUMOsites durch SUMO-Proteine gebunden wurde.

In Zellen durch transiente Transfektion eingebracht, konnte die Sumoylierung des kompletten CFTR-Proteins durch gleichzeitig in der Zelle exprimierte SUMO-Proteine nachgewiesen werden. Desweiteren wurde beobachtet, dass der Transport von CFTR in die apikale Plasmamembran maßgeblich durch die Einführung von Mutationen in die SUMOsites oder durch Überexpression der Desumoylierungsprotease (SUMO spezifische Protease) gestört wurde. Mithilfe der Dichtegradientenzentrifugationsmethode und einem sich anschließenden Westernblot konnte gezeigt werden, dass CFTR mit mutierten SUMOsites nicht wie Wildtyp-CFTR in das endoplasmatische Retikulum transportiert wurde, sondern im Golgi-Apparat verblieb. Einige Experimente deuteten an, dass die Sumoylierung an CFTR eine Rolle in der Interaktion mit dem für den vesikulären Transport innerhalb der Zelle verantwortlichen Adaptor-Protein-Komplex spielen könnte (Schulze 2009).

2 Zielsetzung

Mutationen im ABCA3-Gen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Surfactantmangels und somit auch in der Pathologie des RDS des Neugeborenen.

Detaillierte Transport-Mechanismen und Domänen von ABCA3 sind bis jetzt nicht ausreichend erklärt und verstanden. Die Erforschung der Sumoylierung einiger ABC-Transporter hatte interessante neue Aspekte bezüglich ihrer Modifizierung und Targetings (=Zielsteuerung des Proteins) gebracht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Sinne einer Definition von weiteren Domänen des Proteins, durch Computeralgorithmen potentielle SUMOsites zu identifizieren und experimentell zu definieren, sowie ihre biologische Bedeutung zu erfassen.

Daraus ergaben sich folgende Ziele für diese Arbeit:

1. Die Identifizierung von möglichen SUMO-Motiven in der Proteinsequenz von ABCA3
2. Der Nachweis der Sumoylierung von ABCA3 durch Vergleich der SUMO-Bindung zwischen Wildtyp-ABCA3 und an spezifischen SUMO-sites mutiertem ABCA3
 - 2.1 Durch den Yeast-Two-Hybrid Assay
 - 2.2 Durch die Co-Immunpräzipitation
3. Untersuchung der Funktion der Sumoylierung von ABCA3 in Bezug auf das Targeting des Proteins mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

Geräte/Zubehör	Modell	Hersteller/Vertreiber
PCR-Cycler	Mastercycler Thermal Cycler	Eppendorf AG, Hamburg
Agarosegelkammer	Easy-Cast™ Electrophoresis System	Thermo Scientific, Rochester, USA
Geldokumentation	Gel iX Imager	Intas Imaging Industries GmbH, Göttingen
Filterpapier	Dickes Filterpapier 15 x 20 cm, 30 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Film	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Entwicklungsmaschine	CP 1000	AGFA, Köln
Gewebekulturflaschen	Cellstar Tissue Culture Flasks 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifuge	Hettich Rotanta/S	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Mikroskop	Axiovert 40 c	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Probenrad	L 28	Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Schwabach
SDS-Gelelektrophoresekammer	Running/Transfer: Mini Protein Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilwerkbank	Lamin Air HBB 2472	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischkühlzentrifuge	5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	5415C	
Nitrozellulose	Hybond™-ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Zellinkubator	Hera Cell 240	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

3.1.2 Ausgangsplasmide

Bezeichnung	Enthaltene cDNA	Größe (kb)	Resistenz	Hersteller/Vertreiber
pGBKT7	GAL 4 -Bindungsdomäne	7.3	Kanamycin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA
pGADT7	GAL 4 -Aktivierungsdomäne	8.1	Ampicillin	
pGEMT-Easy	-	3.0	Ampicillin	Promega Corporation, Madison, USA
pUB6-ABCA3-HA	Humanes ABCA3 mit Hämagglutinin-Tag	5.5	Ampicillin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pFLAG-CMV-6a-SUMO 1	SUMO 1	4.5	Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
pFLAG-CMV-6a-SUMO 2	SUMO 2	4.5	Ampicillin	

3.1.3 Enzyme

Enzymname	Funktion	Hersteller/Vertreiber
Taq	DNA-Polymerase	Roche GmbH, Mannheim
Pfu	DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase	Ligase	Invitrogen GmbH, Heidelberg
NdeI	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
BamHI		Roche GmbH, Mannheim
KpnI		Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
XhoI		
AscI		New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
Klenow Enzym	DNA-Polymerase	Roche GmbH, Mannheim

3.1.4 Bakterien und Zellen

Name	Hersteller/Vertreiber
E.coli DH5 α	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
X-L 10 Gold ultracompetent cells	Stratagene, La Jolla, USA
X-L 1 Blue competent cells	
A549	ATCC, Manassas, USA
CHO	
MLE 12	

3.1.5 Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller/Vertreiber
LB-Medium	1% NaCl, 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, ad 1L H ₂ O bidest., pH 7,5	nach Sambrook et al.1989
LB-Agar	LB-Medium mit 20g/L Agar	nach Sambrook et al.1989
Kulturmedium A549 und MLE 12	500ml RPMI Media 1640+ GlutaMAX™ 5ml FBS Fetal Bovine Serum 1ml Penicillin/Streptomycin	GIBCO/Invitrogen GmbH, Darmstadt
Kulturmedium CHO	500ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 2mM/L L-Glutamin 1ml Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3.1.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Hersteller/Vertreiber
Anti-HA	Ratte	Hämagglutinin-Epitope- Tag	Roche GmbH, Mannheim
Anti-FLAG	Maus	FLAG Epitope-Tag	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Anti-Lamp3/Anti- CD63	Maus	Human Lamellar body membrane protein 3	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-Rat	Ziege	IgG Heavy und light chain	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Anti-Mouse	Ziege	IgG Heavy und light chain	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Anti-Rat Rhodamin (TRITC)- conjugated	Ziege	IgG Heavy und light chain	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Suffolk, GB
Anti-Mouse Fluorescein (FITC)-conjugated	Ziege	IgG Heavy und light chain	

3.1.7 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Zellkulturmedien und Medienzusätze stammten von Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim), PAA (Pasching) und BD Biosciences (Heidelberg). Die allgemein gebräuchlichen Puffer und Lösungen wurden mit H₂O bidest. hergestellt.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (=PCR) dient zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA in vitro (Mullis et al. 1986).

Dabei entstehen Produkte definierter Länge mithilfe einer Vorlage-DNA (=Template). Zuerst muss der Template-Doppelstrang bei einer Temperatur von 94°C aufgetrennt werden. Dieser Vorgang wird auch Denaturierung oder Melting genannt. Danach erfolgt das Annealing, bei dem sich jeweils am Anfang und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Stranges in vitro synthetisierte DNA-Einzelstränge mit einer Länge zwischen 18-30 Basenpaaren (=Primer) anlagern. Die verwendeten, hitzestabilen DNA-Polymerasen können DNA-Stränge nur dort verlängern, wo diese Primer gebunden haben. Durch die beiden Primer wird die Länge des zu amplifizierenden Fragments bestimmt, da der Forward-Primer die Anfangssequenz des codierenden DNA-Stranges und der Reverse-Primer die Sequenz des komplementären Stranges bildet. Die Temperatur in dieser Phase hängt von der Länge und der Zusammensetzung der Primer ab und liegt normalerweise 5-10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer (55-65°C). Je mehr Guanosin- und Cytosinnukleotide ein Primer enthält, desto höher liegt der Schmelzpunkt, da GC-Basenpaare eine energetisch günstigere Stapelwechselwirkung als Adenosin-Thymidin-Basenpaare auf die Stabilität der DNA-Doppelhelix haben. Während der Phase der Elongation verlängert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase den DNA-Strang in Fortsetzung des gebundenen Primers. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Die Temperatur variiert in Abhängigkeit vom Arbeitsoptimum der Polymerase (68-74°C). Insgesamt wird ein Zyklus, bestehend aus Denaturierung-Annealing-Elongation, 20 bis 30 Mal wiederholt, um vorwiegend DNA in der gewünschten Länge und Sequenz zu erhalten.

Für die im Folgenden durchgeführten PCR-Reaktionen wurden die Taq-DNA-Polymerase und die Pfu-DNA-Polymerase (s. Kap. 3.1.3) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Zusammensetzung für eine 50 µl PCR Reaktion:

- 1 µl Template (10ng)
- 1 µl Forward Primer (10pmol)
- 1 µl Reverse Primer (10pmol)
- 1 µl dNTP's (10mM)
- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 0,8 µl Taq-DNA-Polymerase
- ad 50 µl H₂O bidest.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94°C	2 min	1x
2	94°C	30 sec	25-35x
3	55-65°C	30 sec	
4	72°C	50 sec	
5	72°C	7 min	1x
6	4°C	Hold	∞

Tab. 2: Standard PCR Programm für den PCR-Cycler

3.2.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Gemische aus geladenen, hochmolekularen Stoffen in einem elektrischen Feld nach ihrer relativen Größe aufgetrennt. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große.

Die am häufigsten verwendeten Gele bestehen aus Agarose oder Polyacrylamid. Sie bilden engmaschige Netze, die die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindern. Agarosegele sind im Gegensatz zu Polyacrylamidgelen relativ großporig und eignen sich daher gut zur Auftrennung von DNA im Bereich von 150-20000 Basenpaaren und hochmolekularen Proteinen. Für Proteine mit einer Molmasse von 5-500 kDa oder DNA-Fragmente bis zu 1 kb eignen sich Polyacrylamidgele. Je höher dabei die Konzentration der Agarose oder des Polyacrylamids ist, desto engmaschiger wird das Gel und desto kleinere Moleküle können aufgetrennt werden. Niedrigere Konzentrationen dagegen ergeben größere Poren und eine bessere Auftrennung für große Moleküle.

Zur DNA-Auftrennung und Identifizierung wurden 1%- und 3%-Agarosegele hergestellt. Für das 1%-Gel (für Moleküle >500 bp) wurden 100 ml TBE Puffer mit 1g Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg) aufgekocht und in Form gegossen. Beim 3%-Gel (für Moleküle <500 bp) wurden entsprechend 3g Agarose für 100 ml TBE Puffer verwendet.

3.2.3 DNA-Aufreinigung und Isolierung von Plasmiden

Zum Einsatz von Plasmid-DNA für verschiedene Versuchsschritte (Restriktion, Ligation, Transformation, Transfektion) wurde diese aufgereinigt. Sollten vor einer Ligation nur Primer und Puffer aus einem PCR-Produkt entfernt werden, so konnte dies direkt durch Anwendung des Qiaquick™ PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden) erfolgen. Musste eine spezifische Bande von unspezifischen Produkten oder von einem Template-Überschuss getrennt werden, konnte diese Bande direkt nach einer Auftrennung in der Gelelektrophorese aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels Qiaquick™ Gel

Extraction Protocol aus dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt werden.

Der Mechanismus der DNA-Isolierung ist bei beiden Methoden dabei derselbe. Die DNA wird bei hoher Salzkonzentration an einer Silikat-Membran adsorbiert, mittels verschiedenen Puffern gereinigt und anschließend in H₂O bidest. wieder gelöst. Die Größe der DNA-Fragmente, die gelöst werden können ist abhängig vom Puffer.

Für die Isolierung von kleinen Mengen (bis zu 20µg) Plasmid-DNA gilt dabei die gleiche Methode. Es werden große Mengen von Bakterienzellen durch alkalische Lyse zerstört und die sich im Lysat befindende DNA mittels Qiagen™ Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gewonnen. Für größere DNA-Mengen wurde diese bei niedriger pH-Bedingung und Salzkonzentration durch Bindung an einer Anionen-Austauschsäule isoliert. Die anschließende Eluation erfolgte bei hoher Salzkonzentration, auf die eine Präzipitation der DNA mit Isopropanol folgte. Mit dem Qiagen™ Plasmid Purification Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) konnten bis zu 100µg, mit dem Qiagen™ Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) bis zu 500µg DNA gewonnen werden.

3.2.4 Restriktion

Die Restriktion erfolgt durch Restriktionsendonukleasen. Diese sind bakterielle Enzyme, welche die DNA an bestimmten Stellen schneiden können. Jede Endonuklease hat dabei ihre eigene Erkennungssequenz, in der oder in deren Nähe das Enzym den Doppelstrang durchtrennt. Diese DNA-Sequenzen sind meist Palindrome (=von vorne und hinten gelesen gleichbleibende Zeichenkette) aus mehreren Basenpaaren und der Schnitt kann in glatten Enden (=blunt ends) oder versetzt, mit überhängenden Enden (=sticky ends) resultieren. Sticky ends eignen sich wesentlich besser zur Weiterverarbeitung, wie bei der Ligation (s. Kap. 3.2.5) in Vektorplasmide, da sie im Gegensatz zu den blunt ends nur in einer bestimmten Richtung wieder mit ihrem passenden Ende zusammengeführt werden können. Die Verwendung der Restriktionsenzyme erfolgte nach den jeweiligen Herstellerangaben. Die Standardinkubationszeit betrug zwischen 1,5 bis 4 Stunden bei der jeweiligen optimalen Arbeitstemperatur der Enzyme.

3.2.5 Ligation

Unter Ligation versteht man die enzymkatalysierte Verknüpfung von DNA oder RNA Fragmenten an ihren Enden. Dabei geht die 3'-Hydroxygruppe des einen Fragments mit der 5'-Phosphatgruppe des anderen Fragments eine Phosphodiesterbindung ein. Diese energieabhängige Reaktion wird von dem Enzym Ligase katalysiert. Anwendung findet die

Ligation meist in der Klonierung. Dabei wird ein Vektorplasmid mithilfe von Restriktionsenzymen geschnitten (=linearisiert). Die ebenfalls lineare, in das Plasmid einzubringende Fremd-DNA (=Insert) wird dann zusammen mit dem geschnittenen Vektor und einer DNA Ligase inkubiert, welche die Enden von Insert und Vektor miteinander verknüpft. Für die Ligation von Insert mit dem Vektor wurde die T4-DNA Ligase (s. Kap. 3.1.3) verwendet. Inserts, die von einer Taq-DNA-Polymerase hergestellt wurden, besitzen einen TA-Überhang an ihrem 5'- und 3'-Ende, der eine schnelle und unkomplizierte Ligation in den pGEMT easy Vektor (s. Kap. 3.1.2) ermöglichen. Die Ligationen wurden nach Herstellerangaben zusammengestellt und bei 16°C über Nacht inkubiert.

3.2.6 Transformation

Als Transformation wird die nicht-virale Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen, Hefen, Algen, Pilze und Pflanzen bezeichnet. Am häufigsten werden Transformationen in Bakterienzellen durchgeführt.

Die Transformation von Plasmiden in Bakterien dient zur Vervielfältigung der Plasmide. Diese können dann in großer Menge und Reinheit isoliert werden (s. Kap. 3.2.3). Die Bakterienzellwände müssen erst durch verschiedene Schritte durchlässig gemacht werden, dann erst erhält man sogenannte „kompetente Zellen“, die fremde DNA aufnehmen können (=Transformation). Die so transformierten Bakterienzellen können dann auf Selektionsagar (=Agar mit einem bestimmten Antibiotikum) gezüchtet werden. Da das transformierte Plasmid im Gegensatz zur DNA der Bakterienzelle ein Resistenzgen gegen ein bestimmtes Antibiotikum enthält, können nur transformierte Zellen auf dem Selektionsagar wachsen.

Für die Herstellung chemisch kompetenter E. coli DH5α wurde wie folgt vorgegangen:

1. 500 µl einer Vorkultur mit E. coli DH5α werden zu 25 ml LB-Medium gegeben und bei einer Temperatur von 37°C in einem Schüttler für 3 Stunden inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,6 bis 0,8 beträgt
2. Die Zellen werden bei 3000 U/min und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert
3. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 2 ml eisgekühltes CaCl₂ (0,1 M, eisgekühlt) resuspendiert; danach wird mit CaCl₂ auf 10 ml aufgefüllt
4. Die Zellen werden erneut 15 Minuten lang bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 1ml CaCl₂ resuspendiert

Das Protokoll für die Transformation:

1. 1 µl Plasmid DNA werden zu 50 µl E. coli DH5α gegeben und 30 min auf Eis inkubiert
2. Um die Bakterienzellen für die Transformation permeabel zu machen, werden sie 1 min im Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen
3. Anschließend lässt man sie für 2 min auf Eis abkühlen und gibt 200 µl LB Medium hinzu
4. Für die Expression des Resistenzgens wird der Ansatz 45 Minuten lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert
5. Die Suspension wird nun auf einer selektiven Agarplatte ausplattiert und 12-24 h bei 37°C inkubiert

3.3 Zellkulturmethoden

3.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellkulturen wurden unter einer sterilen Arbeitsbank angelegt und bearbeitet, wobei nur sterile Medien, Lösungen und Geräte eingesetzt wurden. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre in den entsprechenden Medien inkubiert. Zur Passage der Zellen wurden diese mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C abgelöst. Durch Zugabe von 9 ml Nährmedium wurde der Ablösevorgang gestoppt und die Zellen nach der Zentrifugation (5 Minuten bei 300g) und dem Absaugen des trypsinhaltigen Nährmediums in frischem Medium resuspendiert. Für die Langzeitlagerung der Zellen wurden diese aus einer sehr dicht bewachsenen 75 cm² Kulturflasche abzentrifugiert (5 Minuten bei 300g) und in 6 ml Einfriermedium (50% Nährmedium, 40% FBS, 10% DMSO) resuspendiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden für 24 bis 48 Stunden erst bei -80°C eingefroren und im Anschluß zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.2 Transiente Transfektion

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von fremder Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurde dafür das FUGENE-HD Transfektionsreagenz (Roche GmbH, Mannheim) verwendet. Wie im Herstellerprotokoll angegeben, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 60-70% transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde auf die Fläche einer 6 Well-Platte (BD Falcon, Heidelberg) abgestimmt. Das Transfektionsreagenz (2 µl/Well) und die Plasmid-DNA (2 µg/Well) wurden zusammen mit dem entsprechenden Antibiotikum- und

FBS-freiem Nährmedium (100µl/Well) vermischt und bei Raumtemperatur für 15 bis 30 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen durchgeführt und anschließend das inkubierte Gemisch zum frischen Medium in den Wells gegeben. Die Transfektion der Zellen war nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C abgeschlossen.

3.4 Der Yeast-Two-Hybrid Assay

3.4.1 Prinzip

Das Yeast-Two-Hybrid-System (=Y2H) ist eine genetische Methode zur Erfassung von Protein-Protein-Interaktionen. Diese wurde im Jahre 1989 von Fields und Song entwickelt und seitdem in vielen Experimenten eingesetzt (Fields et al. 1989).

Man bedient sich dabei der Wechselwirkungen von Proteinen in der Hefe, in der Regel des Stammes *Saccharomyces cerevisiae*. Die Grundlage bildet ein zur Genregulation benötigter Transkriptionsfaktor, in *Saccharomyces* meist GAL4. Er besitzt zwei unterschiedliche Domänen: eine DNA-Bindungsdomäne (GAL4-BD) und eine Aktivierungsdomäne, welche die Transkription aktiviert (GAL4-AD). Normalerweise befinden sich beide Domänen auf derselben Polypeptidkette, aber sie können auch wirksam sein, wenn sie durch Protein-Protein-Interaktion zusammengebracht werden.

Dazu bedient man sich zweier Expressionsvektoren, die in die Hefezellen eingebracht werden können. Auf dem einen Vektor befindet sich ein konstruiertes Fusionsgen, das ein Hybridprotein, bestehend aus GAL4-BD und einem zu untersuchendes Protein (=bait-Protein), als einen Polypeptidstrang codiert. Der andere Vektor codiert die Sequenz der GAL4-AD und einem möglichen Bindungspartner (=fish-Protein) für das bait-Protein.

Beide Plasmide werden in einen Hefestamm transformiert, der kein funktionierendes GAL4-Gen besitzt, aber eine GAL4-Bindungsstelle, der Reportergene nachgeschaltet sind. Diese können entweder die Herstellung bestimmter Aminosäuren codieren oder eine optische Erkennung ermöglichen (z.B. einen Farbumschlag durch Aktivierung eines Enzyms in Gegenwart eines Substrats). Durch die Bindung der bait- und fish-Proteine kann der Transkriptionsfaktor funktionell wiederhergestellt werden, so dass es zu einer Expression der Reportergene kommt, die auf verschiedenen Selektionsmedien nachgewiesen werden kann.

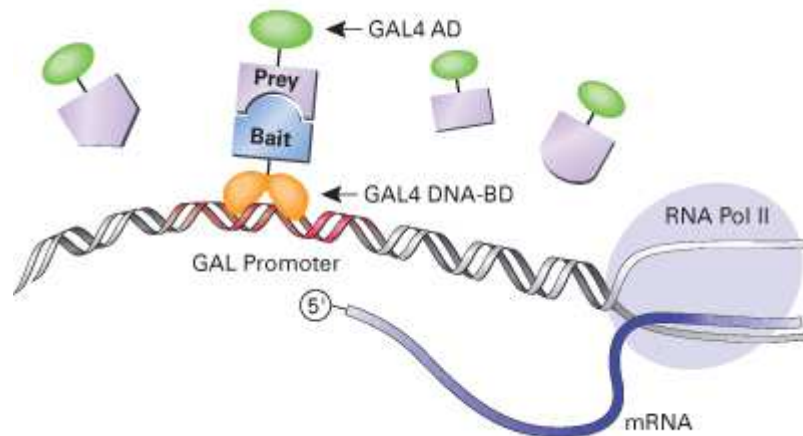


Abb. 11: Schematische Darstellung der Yeast-Two-Hybrid Methode

Das Bait-Protein (**hellblau**) bindet über die Gal4-DNA-BD (**orange**) an den der Reportersequenz vorgeschalteten Promotor (**rot**). Die Transkription der Reporter-gen-mRNA (**dunkelblau**) wird aktiviert, sobald das Prey-Protein (**violett**), welches an die GAL4-AD (**grün**) gebunden ist, mit dem Bait-Protein interagiert (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA).

3.4.2 Klonierung der Bindungspartnervektoren

Die Expressionsvektoren pGBKT7 (enthält BD) und pGADT7 (enthält AD) wurden freundlicherweise von Dr. Judith Glöckner-Pagel (Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Im Anhang auf S. 59 sind Vektormaps von pGBKT7 und pGADT7 dargestellt.

Beide Vektoren enthielten jeweils ein Fusionsgen der Sequenz einer Domäne mit einem der vier zu untersuchenden SUMO-Proteine (SUMO 1-4).

Die Wildtyp-Sequenzen von ABCA3 waren bereits in unserer Arbeitsgruppe (AG Holzinger) in den Vektor pGBKT7 kloniert worden. Es existierten insgesamt 3 Wildtypkonstrukte. Konstrukt A-I enthielt beide SUMOsites. A-II enthielt nur SUMOsite I und A-III nur SUMOsite II. Alle 3 Konstrukte besaßen eine NdeI-Schnittstelle am 5'- und eine BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende. Die Umklonierung der vier Konstrukte in pGADT7 erfolgte durch Restriktion an diesen Schnittstellen nach Herstellerangaben. Mittels Gelelektrophorese in 1-3% Agarose wurden die Konstrukte im Gel von den übrigen DNA-Fragmenten getrennt (s. Kap. 3.2.2) und aufgereinigt (s. Kap. 3.2.3). Die Ligation in den ebenso geschnittenen pGADT7 Vektor erfolgte durch die T4 DNA Ligase (s. Kap. 3.2.5).

3.4.3 Herstellung von Plasmidkonstrukten mit mutierten SUMOsites

Für die Herstellung der Konstrukte mit jeweils einer mutierten SUMOsite erfolgte eine site-directed mutagenesis (=SDM) an dem Lysin-codierenden Triplet der SUMOsite. Dabei

wurden jeweils die ersten zwei Basen des Triplets ausgetauscht, die einen Austausch der ursprünglichen Bindungsamino­säure Lysin zu Alanin bewirkte (AAG gegen GCG in SUMOsite I und AAA gegen GCA in SUMOsite II). Die SDM erfolgte mittels einer Megaprimer-PCR. Dazu wurden in einer ersten PCR zueinander komplementäre Teilkonstrukte erstellt, die bereits die mutierte Stelle enthielten. Diese Produkte bildeten in der zweiten PCR jeweils einen Megaprimer zueinander, der durch DNA-Polymerase zu einem vollständigen, mutierten Konstrukt vervollständigt wurde. Die in der ersten PCR eingesetzten Primer wurden von der Firma Metabion aus Martinsried bezogen.

Megaprimer-Konstrukt	Oligonukleotidprimer	5'-3' Sequenz
MI-a	MI-f (forward)	CGC CAT CAT GGC <u>CGC</u> GGG GGA GCT GCA GTG
	II-r (reverse)	TAG GAT CCC AGC GTC ATG TGA TAG CCG G
MI-b	I-f	ATC ATA TGA GCG GGT ATG AAA TTT CCC AGG
	MI-r	CAC TGC AGC TCC CCC <u>GCG</u> GCC ATG ATG GCG
MII-a	MII-f	CTC TTT GCT <u>GCA</u> CTG GAG AAG AAG CAG
	I-r	TAG GAT CCG CCA GCT GTA TGC GGC CTT C
MII-b	IV-f	ATC ATA TGC ACT GCA ACC CGG AAG ACA TC
	MII-r	CTT CTC CAG <u>TGC</u> AGC AAA GAG ACC TTC AAA C

Tab. 3: Liste der Oligonukleotidprimer zur Herstellung der Megaprimer für die SDM

Die ausgetauschten Basen (=Punktmutationen) in der DNA-Sequenz der Oligonukleotidprimer sind rot unterstrichen.

Als Template diente humane ABCA3-cDNA (Klugbauer et al. 1996), welche in den pcDNA 3.1 Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert wurde. Für die relativ kurzen Konstrukte (ca. 500 bp oder kleiner) wurde die Taq-DNA-Polymerase (s. Kap. 3.1.3) eingesetzt. Die Annealingtemperatur betrug 55° C und die Schritte 2-4 der PCR (s. Tab. 2) wurden 35 Mal wiederholt. Bei der nachfolgenden Analyse im Agarosegel (s. Kap. 3.2.2) wurden die Proben mit 12 µl gel loading solution (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) versetzt und zusammen mit 200ng DNA Leiter V (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgetragen. Nach erfolgreicher Identifizierung des PCR-Produkts wurde dieses mit einem Skalpell ausgeschnitten und geextrahiert (s. Kap. 3.2.3). Die Elution fand in 30 µl H₂O bidest. statt.

Die so gewonnenen DNA-Fragmente konnten nun in die Megaprimer-PCR eingesetzt werden (s. Kap. 3.2.1). Dabei wurden jeweils 10ng eines zueinander komplementären Konstruktpaares als Primer in die Reaktion gegeben. Der sich so aneinanderbindende Megaprimer diente dann als Template. Die Annealingtemperatur betrug 55°C und es liefen 25 Zyklen der Schritte 2-4. Da die PCR-Produkte in zu wenigen Mengen vorhanden waren, wurden sie aufgereinigt (s. Kap. 3.2.3) und als Template in eine weitere PCR mit den Oligonukleotidprimern, die die äußeren Schnittstellen enthielten, eingesetzt (s. Kap. 3.2.1 und Taq-DNA-Polymerase PCR Protokoll).

Die nun in ausreichender Menge vorhandenen DNA-Fragmente wurden im 3%-Agarosegel identifiziert (s. Kap. 3.2.2), geextrahiert (s. Kap. 3.2.2) und in 30 µl H₂O bidest. eluiert. Das DNA-Fragment wurde an den überhängenden TA-Enden direkt in den pGEMT easy Vektor ligiert (s. Kap. 3.2.5) und anschließend in DH5α-Bakterienzellen transformiert (s. Kap. 3.2.6). Der Ausstrich erfolgte auf Ampicillin-Agarplatten. Aus den auf der Platte ausgebildeten Klonen wurde eine Bakterienkultur in Ampicillin-LB-Medium angeimpft und bebrütet (5 ml Medium 14 h bei 37°C), aus der eine Plasmidaufreinigung gemacht wurde. Anschließend fand ein doppelter Restriktionsverdau mit NdeI und BamHI statt.

Protokoll Double Digest:

30 µl PCR-Produkt	}	1,5 Stunden bei 37°C
0,7 µl NdeI (s. 3.1.3)		
0,7 µl BamHI (s. 3.1.3)		
5 µl 10x SureCut Buffer B (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)		
ad 40 µl H ₂ O bidest.		

Das geschnittene DNA-Fragment wurde in den pGKT7- und pGADT7 Vektor ligiert (s. Kap. 3.2.5) und in DH5α-Bakterienzellen transformiert (s. Kap. 3.2.6). Die pGBKT7-transformierten Zellen wurden auf Kanamycinplatten ausgestrichen, pGADT7-transformierte Zellen dagegen auf Ampicillinplatten. Mit den auf den Platten gewachsenen Klonen wurden jeweils Kanamycin- bzw. Ampicillin-LB-Mediumkulturen angesetzt und 14 h bei 37°C hochgezüchtet. Aus den Kulturen erfolgte eine Aufreinigung der Plasmide, welche auf den korrekten Einbau der Punktmutationen analysiert wurden (MWG Operon Eurofins, Martinsried). Eine ausführliche Auflistung aller fish- und bait-Plasmidkonstrukte befindet sich im Anhang in den Tabellen A 1 und A 2.

3.4.4 Durchführung des Yeast-Two-Hybrid Assay

Der Yeast-Two-Hybrid wurde entsprechend den Angaben im Matchmaker GAL4 *Two-Hybrid-System 3 User Manual* (BD Biosciences Clontech Laboratories, Heidelberg) durchgeführt.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller/Vertreiber
YPD Medium	50 g/l YPD	BD Biosciences Clontech Laboratories, Heidelberg
YPD Agar	50 g/l YPD + 20 g/l Agar	
10 x Lithiumacetat	1 M Lithiumacetat pH 7,5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
10 x TE	0,1 M Tris-HCl 10 mM EDTA pH 7,5	
50 % PEG 3350	50 g Polyethylenglykol, ad 100 ml mit H ₂ O bidest.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PEG 40 %/Lithiumacetat	8 ml 50% PEG 1 ml 10 x TE 1 ml 10 x Lithiumacetat	
SD 2(-)-Platten (Synthetisches Minimalmedium ohne Leu und Trp)	26,7 g/l Minimal SD Base 0,6 g/l DO Supplement - A/- H/-Leu/-Trp 10 ml/l 100 x Histidin (2 g/l) 10 ml/l 100 x Adenin (2 g/l) 20 g/l Agar	BD Biosciences Clontech Laboratories, Heidelberg
SD 3(-)-Platten (Synthetisches Minimalmedium ohne His, Leu und Trp)	26,7 g/l Minimal SD Base 0,6 g/l DO Supplement - Ade- /-His/-Leu/-Trp 10 ml/l 100 x Adenin (2 g/l) 1 M 3 AT (3-amino-1, 2, 4 - Triazol) 20 g/l Agar	BD Biosciences Clontech Laboratories, Heidelberg
X α Gal	20 mg/ml Dimethylformamide	BD Biosciences Clontech Laboratories, Heidelberg

Tab. 4: Medien und Agarplatten zur Durchführung des Y2H

3 bis 4 Hefeklonen vom Stamm der *Saccharomyces cerevisiae* (BD Biosciences Clontech Laboratories, Heidelberg) wurden in 50 ml YPD inokuliert und für 24 Stunden bei 30°C auf dem Rüttler (240 rpm) inkubiert. 30 ml dieser Übernachtskultur wurden zu 300 ml YPD Medium gegeben und erneut bei 30°C auf dem Rüttler bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 inkubiert. Mittels Zentrifugation (2200 rpm über 5 min) wurden die Hefezellen sedimentiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50 ml 1 x TE resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (2200 rpm über 5 min) konnte das gewonnene Zellsediment in 1,5 ml sterilem 1xTE/1xLithiumacetat aufgenommen werden. Zu 100 µl Hefezellen wurden jeweils 0,1 µg pGADT7- oder pGBKT7-Konstrukt gegeben und vermischt. Zum Hefe-Plasmidgemisch wurden 600 µl PEG/Lithiumacetat zugefügt und 10 min lang gemischt. Anschließend wurden die Hefezellen 30 Minuten lang auf dem Rüttler (240 rpm) bei 30°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock (15 min bei 42°C) erfolgte die Zugabe von 70 µl DMSO und eine Inkubation auf Eis für 5 min. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation bei 2200 rpm für 10 min. Das Zellpellet wurde in 500 µl 1xTE aufgenommen und das gesamte Volumen auf SD 2(-)-Platten ausplattiert. Diese wurden für 3-8 Tage bei 30°C inkubiert.

Vor dem Ausstempeln der Hefeklone auf eine SD 3(-)-Platte wurde diese kurz vorher mit 100 µl X-α-Gal bestrichen. Ein gewachsener Hefeklon pro Ansatz wurde in 70 µl H₂O bidest. gelöst und mit einem Stempel auf die mit X-α-Gal behandelte Platte aufgedrückt. Es erfolgte eine Inkubation bei 30°C, bis sich blau gefärbte Hefekolonien zeigten.

3.5 Die Co-Immunpräzipitation

3.5.1 Prinzip

Eine Co-Immunpräzipitation (=Co-IP) dient zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen. Dabei wird ein Antigen, in vielen Fällen das zu untersuchende Protein, mittels eines spezifischen Antikörpers aus einer Lösung herausgezogen. In der Regel ist der Antikörper dabei an ein festes Substrat (=Sepharosekügelchen) gekoppelt und immobilisiert aufgrund seiner Affinität zum Antigen eben dieses aus dem Zelllysat.

Interagiert das zu untersuchende Protein mit einem anderen Protein, so können beide Bindungspartner durch die Immunpräzipitation eines Partners aus einem Proteingemisch isoliert werden. Ein präzipitiertes Protein und sein Interaktionspartner können dann in verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, wie zum Beispiel durch einen Westernblot oder durch eine vorherige radioaktive Markierung.

In dieser Arbeit wurde ABCA3-Wildtyp-Protein mit ABCA3-Proteinen, deren SUMOsites in der entscheidenden Sumoylierungsaminosäure Lysin durch Alanin ersetzt wurde, auf ihre Bindung mit SUMO-Protein 1 und 2 verglichen.

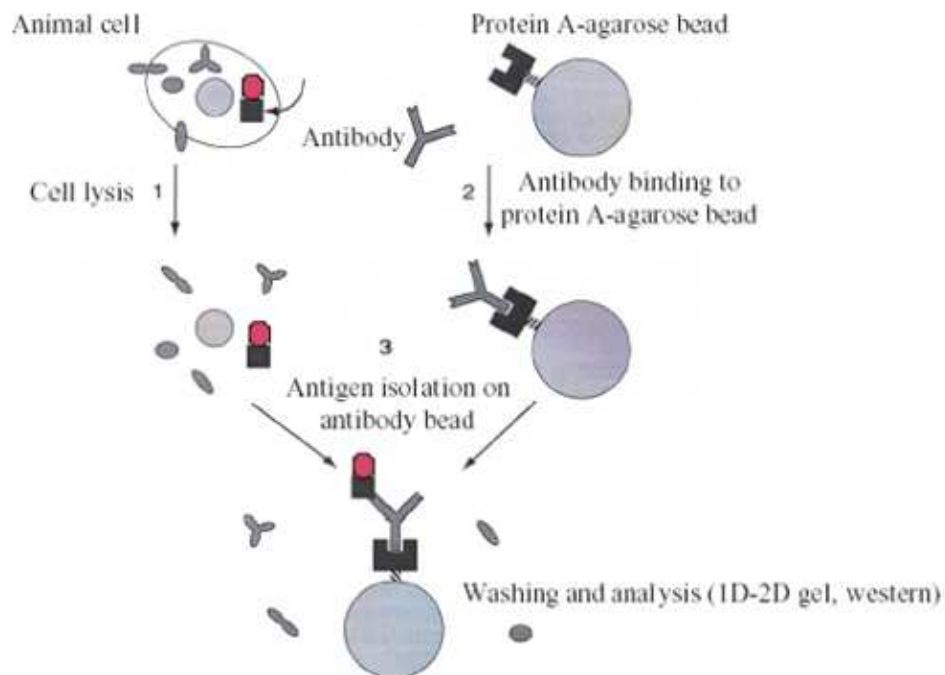


Abb. 12: Schematische Darstellung der Co-Immunpräzipitation

Der Protein-Protein-Bindungskomplex (**rot-schwarz**) wird im Schritt 1 aus der Zelle mittels Lyse freigesetzt. Im Schritt 2 bindet ein spezifisch gegen ein Protein gerichteter Antikörper (**dunkelgrau**) an eine Bindungsstelle für das Fc-Fragment (**schwarz**) an einem Sepharosekugelchen (**hellgrau**). Der so gekoppelte Antikörper bindet im Schritt 3 das Protein und zieht so beide Proteine aus dem Zelllysate heraus (=pull down). Nach dem Waschen (=Trennung des Protein-Protein-Komplexes vom Antikörper und Sepharosekugelchen) kann die weitere Detektion der Proteine im Westernblot oder 1D-2D Gel erfolgen (molecularsciences.org 2006-2012, eNom, Inc., Calgary, Kanada).

3.5.2 Herstellung eines Leervektors und Vektor-ABCA3 mit mutierten Sumosites

Die Wildtypsequenz des ABCA3 mit dem c-terminalen HA-Tag im puB6-Vektor wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Griese (Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

Für den Leervektor puB6 wurde ABCA3 mittels der spezifischen Restriktionsenzyme KpnI und XhoI (s. Liste 3.1.3) aus dem Vektor ausgeschnitten und dieser mittels Gelelektrophorese im 1%-Agarosegel (s. Kap. 3.2.2) von dem Insert (=ABCA3) getrennt. Zuvor wurde das Insert nach einer PCR-Purification (s. Kap. 3.2.3) zur Entfernung der vorherigen Enzyme und Puffer noch mit dem Enzym AscI (s. Liste 3.1.3), welches nur genau einmal innerhalb einer Sequenz im ABCA3 schneidet, verdaut. Sonst wären Vektor und Insert fast gleich groß und könnten im Gel nicht durch verschiedene Größen und Laufweiten unterschieden werden.

Protokoll Double Digest (KpnI und XhoI):

1,5 µl puB6-ABCA3-WT (1µg / µl)	}	1 Stunde bei 37°C
3 µl 10xTango Buffer (Fermentas, St. Leon-Rot)		
6 µl KpnI		
ad 19,5 µl H ₂ O bidest.		

dann direkt zu dem Verdau hinzugeben:

3,75 µl 10xTango Buffer	}	1 Stunde bei 37°C
6 µl XhoI		

Es erfolgte eine PCR-Purification (s. 3.2.3) zur Entfernung der Puffer und Enzyme für den anschließenden Verdau mit Ascl.

Protokoll Restriktionsverdau mit Ascl:

20 µl Eluat aus der PCR-Purification	}	1,5 Stunden bei 37°C
2,5 µl SdaI Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot)		
1,5 µl Ascl		
ad 1 µl H ₂ O bidest.		

Der Restriktionsverdau wurde 20 Minuten lang bei 65°C erhitzt, um Ascl zu inaktivieren. Die gesamte Reaktionsmenge wurde mit 1 µl dNTP's (20mM) und 2 µl Klenow-Enzym (s. Liste 3.1.3) bei 30°C für 15 min und danach bei 75°C für 10 Minuten lang inkubiert. Das Klenow-Enzym füllt die spezifischen, überhängenden „sticky ends“ zu „blunt ends“ auf (s. Kap. 3.2.4), damit der puB6-Vektor wieder religiert werden kann. Nach dem Auftragen auf ein 0,5 %-Agarosegel (s. Kap. 3.2.2) wurde der Vektor ausgeschnitten, geextrahiert (s. Kap. 3.2.3) und einer Ligation unterzogen.

Ligationsprotokoll:

3 µl puB6 DNA (50ng)	}	1 Stunde bei 22° C 10 min bei 65° C
5 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer (Fermentas, St-Leon-Rot)		
1 µl T4 DNA Ligase (s. 3.1.3)		
ad 41 µl H ₂ O bidest.		

4 µl der Ligation wurde in Anschluss in kompetente DH5α-Bakterienzellen transformiert (s. 3.2.6) und diese auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen. Mit den auf der Platte gewachsenen Klonen wurde eine Ampicillin-LB-Medium-Vorkultur angesetzt und 14 h bei 37°C hochgezüchtet. Diese Vorkultur wurde in 200 ml Ampicillin-LB-Medium gegeben und nochmals 14 h bei 37°C inkubiert. Aus dieser Hauptkultur erfolgte eine Aufreinigung des Plasmids mithilfe eines Maxi-Kits (s. Kap. 3.2.3).

Die Wildtypsequenz im puB6-Vektor diente bei den ersten zwei Vektoren als Template für die site directed mutagenesis zum Basenaustausch von den ersten 2 Basen des DNA-Triplets, welches die Aminosäure Lysin codiert. Diese Mutation führt zu einem Austausch von Lysin zu Alanin in der Sumoylierungsstelle von ABCA3.

Insgesamt wurden drei Mutationsvektoren hergestellt. Ein Vektor sollte nur den Basenaustausch in der ersten SUMO-Bindungsstelle beinhalten (AAG zu GCG), der zweite Vektor nur die Mutation in der zweiten Sumoylierungsstelle (AAA zu GCA) und ein Vektor sollte beide Mutationen enthalten. Für letzteren Vektor diente der zuvor erstellte Mutationsvektor puB6-ABCA3-MI (s.u.) als Template.

Vektorbezeichnung	Mutationsprimer	5'-3' Sequenz
puB6-ABCA3-M-I	SDM-MI-f (forward)	GCC ATC ATG GCC <u>GCG</u> GGG GAG CTG CAG TGC
	SDM-MI-r (reverse)	GCA CTG CAG CTC CCC <u>CGC</u> GGC CAT GAT GGC
puB6-ABCA-M-II	SDM- MII-f	GAA GGT CTC TTT GCT <u>GCA</u> CTG GAG AAG AAG CAG AAA GAG
	SDM-MII-r	CTC TTT CTG CTT CTT CTC CAG <u>TGC</u> AGC AAA GAG ACC TTC
puB6-ABCA-MI-MII (hier wurde als Template puB6- ABCA3-MI eingesetzt)	SDM-MII-f	GAA GGT CTC TTT GCT <u>GCA</u> CTG GAG AAG AAG CAG AAA GAG
	SDM-MII-r	CTC TTT CTG CTT CTT CTC CAG <u>TGC</u> AGC AAA GAG ACC TTC

Tab. 5: Liste der Mutationsvektoren von ABCA3 mit den zugehörigen Mutationsprimern

Die ausgetauschten Basen in der DNA-Sequenz der Mutationsprimer für die SDM sind rot unterstrichen.

Der Vektor puB6-ABCA3-MI wurde mit dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla) laut Herstellerprotokoll erstellt.

Anschließend erfolgte die Transformation in DH5α-Bakterienzellen (s. Kap. 3.2.6) und die Ausplattierung auf Ampicillin-Agar-Platten. Danach wurden die Zellen in der Vorkultur mit Ampicillin-LB-Medium und anschließend in der Hauptkultur (beide 14h bei 37°C) hochgezüchtet. Zur Gewinnung der Plasmide wurde ein Maxiprep (s. Kap. 3.2.3) angefertigt.

Die PCR zur Einführung der Mutation in die Vektoren puB6-ABCA3-MII und puB6-ABCA3-MI-MII wurden mithilfe des KAPAHiFi™ Hot Start PCR Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben erstellt. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Restriktion durch die Zugabe von 1 µl DpnI (Fast digest Enzym: Fermentas, St. Leon-Rot). Die Reaktion wurde 15 min bei 37°C und dann 5 min bei 80°C inkubiert. Damit wurde nur der methylierte Mutterstrang zerstört. Der in der PCR durch die KAPAHiFi™ Hot Start Polymerase neu synthetisierte Tochterstrang konnte aufgrund der fehlenden Methylierung nicht verdaut werden. 5 µl der Restriktion wurden in 50 µl XL-1 Blue Zellen (s. Liste 3.1.4) transformiert und aus den angezüchteten Hauptkulturen eine Plasmidaufreinigung erstellt (s. Kap. 3.2.3). Die gesamte cDNA-Sequenz von ABCA3 innerhalb des entstandenen Plasmids wurde analysiert (MWG Operon Eurofins, Martinsried), um den korrekten Einbau der Mutationen und die Fehlerfreiheit der restlichen Sequenz zu kontrollieren und zu gewährleisten.

3.5.3 Transfektion von Wildtyp- und Mutationsplasmid in CHO-Zellen

Für die transiente Transfektion (s. Kap. 3.3.2) wurden CHO-Zellen (Hamster Ovarienzellen, s. Liste 3.1.4) verwendet. Insgesamt wurden 5 verschiedene Vektoren verwendet.

Vektor
puB6 (Mock-Transfektion)
puB6-ABCA3-WT
puB6-ABCA3-M-I
puB6-ABCA3-M-II
puB6-ABCA3-MI-MII

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Vektoren für die transiente Transfektion in CHO-Zellen

3.5.4 Zelllyse und Immunpräzipitation

Für die Präparation von den Gesamtzelllysaten wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Zur Herstellung der Lysate wurden die Zellen nach der Transfektion zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 167 µl Lysispuffer (s.u.) pro Well versetzt. Die Zellen wurden mit einem Schaber vom Plattenboden abgelöst. Anschließend wurde das Zell-Lysispuffer-Gemisch 8 bis 10 Mal durch eine Spritze mit feiner Kanüle (27G, Braun Melsungen AG, Melsungen) gezogen. Das Homogenat wurde 5 min bei 13200g zentrifugiert und der Überstand in gekühlte Eppendorfgläser überführt. 20 µl des Lysats wurden in 80 µl 6x-SDS-Probenpuffer (s. Tab. 11) aufgenommen und bei -20°C eingefroren, bis die Proben zusammen mit den Immunpräzipitationsproben (s.u.) analysiert werden konnten.

Lysispuffer	Zusammensetzung
TNT+N-Ethylmaleimide (pH 8,5)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,02% SDS 1 mM DTT Protease Inhibitor Cocktail (1000x) 100 mg/ml PMSF 20mMN-Ethylmaleimide

Tab. 7: Zusammensetzung des Lysispuffers zur Herstellung der Gesamtzelllysate

Auch für die Immunpräzipitation wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C unter Verwendung gekühlter Lösungen ausgeführt. Zunächst wurden 60 µl Protein-G-Sepharose-Kügelchen (=Beads, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) in Lysispuffer äquilibriert. Diese Menge an Beads gilt für 1 ml Reaktion. Dann wurden 6 µl Anti-HA-Antikörper zu den Beads (s. Liste 3.1.6) hinzugegeben. Der an Protein-G-Sepharose-gebundene Anti-HA-Antikörper wurde zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad mit dem Zelllysate inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Lysispuffer wurden die Sepharose-G-Beads in 50 µl 6x-SDS-Probenpuffer aufgenommen. Dies führte zur Trennung des Antikörpers von den Beads. Die Sepharose-Beads konnten nun verworfen und der Überstand mittels SDS-Page-Gel und Westernblot analysiert werden.

3.5.5 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgele

Für die Auftrennung der Proteine wurden 6%-Gele nach den Maßen der Gelkammer (s. Liste 3.1.1) mit einer Dicke von 1,5 mm gegossen.

Ein Gel besteht aus 2 Schichten: Einem stacking gel, in welchem Taschen für das Einfüllen und Sammeln der Proteine liegen, und ein running gel, in dem die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Herstellung der beiden Gelschichten wurden die spezifischen Puffer A und B (s.u.) verwendet.

Die Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel erfolgte bei konstanter Spannung von 120 Volt für 3 Stunden.

stacking gel Komponenten	10 ml Ansatz
30% Acrylamid Mix	1,7 ml
Puffer B	1,25 ml
20% SDS	100 µl
APS	100 µl
TEMED	10 µl
bidest. H ₂ O	6,8 ml

Tab. 8: Zusammensetzung und Mengenangaben der stacking gel-Schicht

running gel Komponenten	10 ml Ansatz
30% Acrylamid Mix	2 ml
Puffer A	2,5 ml
20% SDS	100 µl
APS	100 µl
TEMED	8 µl
bidest. H ₂ O	5,22 ml

Tab. 9: Zusammensetzung und Mengenangaben der running gel-Schicht

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	36,3 g Tris base (3M) 48 ml 1 N HCl auf 100 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt; pH 8,9
Puffer B	5,7 g Tris base (0,47M) 25,6 ml 1M H ₃ PO ₄ auf 100 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt; pH 6,7

Tab. 10: Zusammensetzung und Mengenangaben der spezifischen Puffer A und B

3.5.6 Westernblot

Beim spezifischen Nachweis von Proteinen durch die Immunoblot-Methode wurden die Proteine nach der Auftrennung elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (s. Liste 3.1.1) übertragen (Towbin et al. 1979) und durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. Bei der verwendeten Blotting-Apparatur handelt es sich um eine SDS-Gelelektrophoresekammer Running/Transfer: Mini Protein Tetra Cell (s. Liste 3.1.1). Der Proteintransfer erfolgte bei 70 V konstanter Spannung für 90 min.

Die Membran wurde nach dem Transfer für 3-4 Stunden in 5% TBST-Milch (s. Tab. 11) bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach wurde der primäre Antikörper in geeigneter Verdünnung nach Herstellerangaben in 5% TBST-Milch auf die Membran aufgetragen. Die mit Anti-HA (s. Liste 3.1.6) versetzte Membran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur, die mit Anti-FLAG (s. Liste 3.1.6) versetzte Membran über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen der Membran mit TBST wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Rat oder Anti-Mouse, s. Liste 3.1.6) für 60 min dazugegeben. Nach vier weiteren 5-minütigen Waschschrinen in TBST wurde die Membran mit der ECL Western blotting detection reagents Lösung (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) nach Herstellerangaben entwickelt. Die Belichtungszeit der Membranen betrug, aufgrund der höheren Bindungsaffinität des Anti-HA-Antikörpers zum Protein, nur 1 Minute, während die Belichtung der Anti-FLAG-Membran 1 Stunde benötigte.

Puffer	Zusammensetzung
6x-SDS-Probenpuffer	7,5 ml Sammelgelpuffer 0,2 g SDS 600 µl Mercaptoethanol 36 mg BPB 1,6 ml Glycerin ad 10 ml H ₂ O bidest.
10x Elektrophoresepuffer (EP) (pH 8,6)	250 mM Tris-Base 1,92 M Glycin
1x Laufpuffer	70 ml 10x EP 7 ml 10% SDS ad 700 ml H ₂ O bidest.
10x Tris-Glycine (pH 8,5)	144 g Glycine 30 g Tris Base auf 1 l H ₂ O bidest.
1x Transferpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin 200 ml Methanol 1 ml 20% SDS 700 ml H ₂ O bidest.
TBST (pH 7,5)	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween-20
5% TBST-Milch	TBST mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver

Tab. 11: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen für den Westernblot

3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.6.1 Prinzip

Bei den ABCA3-Konstrukten mit dem HA-Tag wurde das getagte Protein in der Zelle durch einen primären Antikörper detektiert, der gegen den „Tag“ gerichtet ist. Der primäre Antikörper wird durch die Bindung eines sekundären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff des sekundären Antikörpers mit einem engen spezifischen Lichtspektrum angeregt. Der Farbstoff leuchtet daraufhin mit einem spezifischen, nicht überlappenden Emissionsspektrum.

Gibt es zwei verschiedene Proteine, die mit zwei Farben doppel-gefärbt werden, müssen die primären Antikörper von zwei unterschiedlichen Spezies (z. B. Maus und Kaninchen) verwendet werden. Zur Detektion werden Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper einer dritten Spezies (z. B. Ziege) verwendet, deren Exzitations- und Emissionsspektren weit genug auseinanderliegen. Die verschiedenen Exzitations- und Emissionswellenlängen werden mit spezifischen Filtern herausgefiltert. Das Signal wird dann mit einem geeigneten Photosystem dokumentiert.

In dieser Arbeit wurden als primäre Antikörper der Anti-HA-Antikörper (s. Liste 3.1.6) und ein Antikörper gegen Lamp3 (=lysosome-associated membrane glycoprotein 3, s. Liste 3.1.6) als lysosomaler Kontrollmarker verwendet. Durch die Übereinstimmung oder unterschiedliche Lokalisation der Punktmuster der beiden Färbungen konnte eine Aussage über den Transport von Wildtyp-ABCA3 und des an den SUMOsites mutierten ABCA3 gemacht werden.

3.6.2 Transfektion von Wildtyp- und Mutationsplasmid in A549- und MLE 12-Zellen

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden A549- und MLE 12 Zellen (s. Liste 3.1.4) in einem 6-Well auf Deckgläschen (12 mm Ø, Superior Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) eingesät und mit Plasmid-DNA transfiziert (s. Kap. 3.3.2). Für die Transfektion wurden die in Tabelle 6 dargestellten Vektoren verwendet.

3.6.3 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Deckplättchen mit den Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl 3,7% Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und mit 100 µl 0,1% Triton bei RT permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem

primären Antikörper (Anti-HA, s. Liste 3.1.6) für 1 Stunde bei RT. Dann folgte ein 12 bis 18-maliger Waschgang mit PBS, um den überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (FITC- oder TRITC-gekoppelt) fand ebenfalls bei Raumtemperatur und lichtgeschützt 1 Stunde lang statt. Danach folgten wieder 12 bis 20 Waschschriffe mit PBS. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Plättchen mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit 10 µl DAPI-haltigem Vectashield Mounting Medium (Vectorlabs Laboratories Inc, Burlingame, USA) gegeben und fixiert.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiovert 135 invertierten Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) und den entsprechenden Immunfluoreszenzfiltern durchgeführt. Dabei lag das Absorptionsmaximum für TRITC bei 550 nm und für FITC bei 495 nm. Das Emissionsmaximum lag für TRITC bei 570 nm, für FITC bei 520 nm. Zur Dokumentation wurde eine Digitalkamera der Firma Zeiss mit der Software Axiovision benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 ABCA3 enthält zwei mögliche SUMO-Motive

Die Sumoylierung eines Proteins erfolgt durch die Bindung des SUMO-Proteins an seine spezifische Erkennungssequenz (=SUMOsite). Diese besteht aus 4 Aminosäuren und lautet „ΨKxE“, wobei Ψ für eine aliphatisch verzweigte Aminosäure, K für Lysin, x für eine beliebige Aminosäure und E für Glutaminsäure steht. Desweiteren dürfen sie nur in der Region des Proteins liegen, welche zellulär zugänglich ist, da sonst eine Bindung durch SUMO unmöglich wäre.

Auf ABCA3 konnten mithilfe des Programms „fuzzpro“ aus der EMBOSS Suite (<http://emboss.sourceforge.net>) zwei SUMOsites identifiziert werden, welche diesem Anforderungsprofil entsprechen. Sie liegen auf Höhe der Aminosäuren 737 bis 740 (A-K-G-E) und 811 bis 814 (A-K-L-E). Ein drittes Motiv auf Höhe 1236 bis 1239 (V-K-L-E) wurde als nicht relevant ausgeschlossen, da es innerhalb einer Transmembrandomäne von ABCA3 liegt und den SUMO-Proteinen nicht zugänglich ist.

Die beiden möglichen Sumoylierungs-Motive wurden gemäß ihrer n- zu c-terminalen Abfolge SUMOsite I (AS 737-740) und SUMOsite II (AS 811-814) benannt (siehe Anhang Abb. A 1).

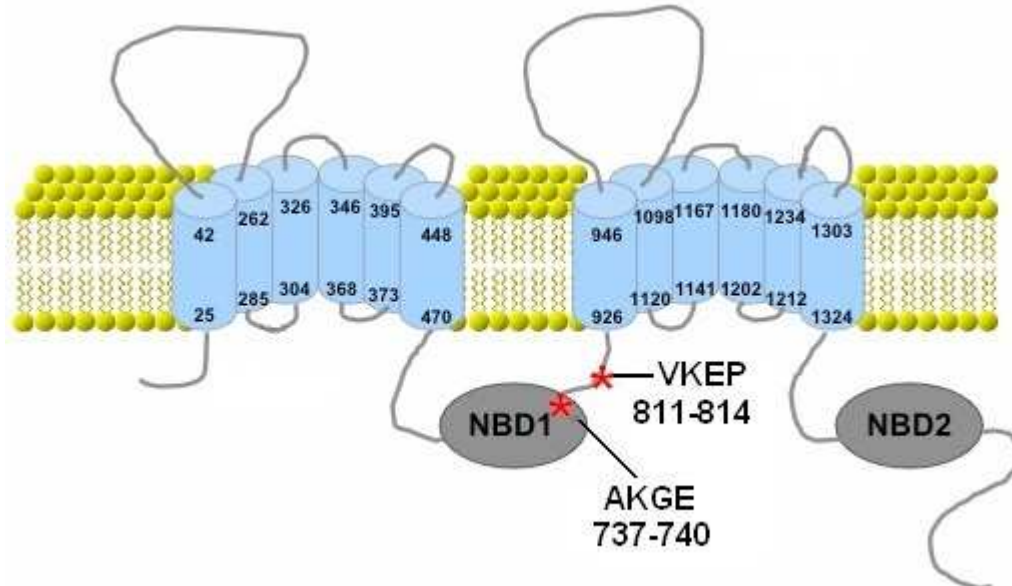


Abb. 13: Darstellung der zwei möglichen Sumoylierungsstellen in ABCA3

In der schematischen Abbildung von ABCA3 stellt sich die Lipiddoppelschicht **gelb** dar. Die Transmembrandomänen mit ihren 6 Untereinheiten (**blau**) sind mit Zahlen markiert, die verschiedene Aminosäurepositionen anzeigen. Die beiden Nucleotid-bindenden Domänen sind **grau** abgebildet. Die Lokalisationen der beiden SUMOsites sind mit **roten Sternen** markiert. Die Aminosäuresequenz und -positionen sind ebenfalls **schwarz** beschriftet mitaufgeführt (Modifiziert nach Bullard et al. 2006).

4.2 Analyse der Sumoylierung von ABCA3 im Yeast-Two-Hybrid System

Der Yeast-Two-Hybrid sollte die mögliche Interaktion zwischen den gefundenen SUMOSites auf ABCA3 und den SUMO-Proteinen untersuchen. Dabei wurden die Proteinfragmente von ABCA3 mit den Wildtyp-SUMOSites direkt mit den die mutierten SUMOSites enthaltenden Proteinfragmenten verglichen.

4.2.1 Klonierung von ABCA3-Teilkonstrukten mit Wildtyp- und mutierten SUMOSites

Der Vektor pGADT7 enthielt ein Fusionsgen mit der Sequenz einer Domäne und einer der vier zu untersuchenden SUMO-Proteine (SUMO 1-4) und diente als fish. Die DNA-Teilkonstrukte von ABCA3 mit den Wildtyp-Sequenzen von den zwei möglichen SUMOSites befanden sich bereits im Vektor pGBKT7 und wurden als bait eingesetzt (s. Anhang Tab. A 1-2). Es wurden drei Wildtyp-Inserts hergestellt: Insert A-I enthält beide Sumosites und erstreckt sich in der Aminosäuresequenz von ABCA3 von Position 593 bis 920, A-II enthält nur Sumosite I und spannte sich zwischen Aminosäure 593 bis 762. A-III enthält nur Sumosite II und verläuft von den Aminosäuren 767 bis 920.

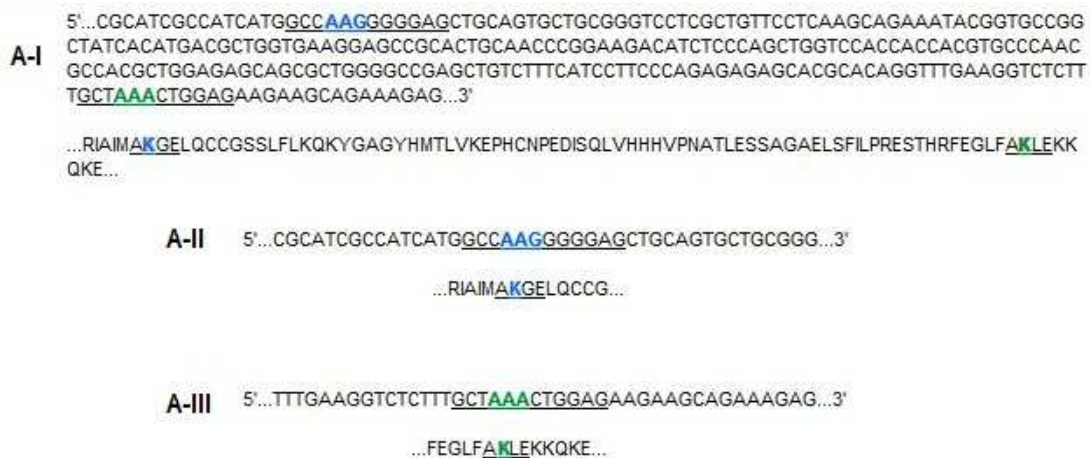


Abb. 14: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der Wildtyp-Inserts von ABCA3 mit den möglichen SUMOSites

Die Sequenz (von 5' nach 3' dargestellt), die für die 4 Aminosäuren der SUMO-Motive codiert, ist **blau** (SUMOSite I) und **grün** (SUMOSite II) unterstrichen. Insert A-I enthält beide SUMOSites in ihrer Wildtypsequenz, A-II die erste SUMOSite und A-III die zweite mögliche Sumoylierungsstelle.

Die Einführung von zwei Punktmutationen erfolgte mithilfe der „site directed mutagenesis“-Methode (s. Kap. 3.4.3). Dabei erfolgte im codierenden Triplet des Lysins in der SUMOSite ein Austausch von Lysin zur Aminosäure Alanin. Durch das Ausschalten der spezifischen Bindungsstelle für die SUMO-Proteine sollte die mögliche Interaktion zwischen intakter SUMO-Bindungsstelle im Wildtyp- und „Knockout“-SUMOSite in den mutierten Konstrukten getestet werden.

Das Konstrukt M-I enthält dabei die mutierte SUMOsite I, während Konstrukt M-II die mutierte SUMOsite II trägt. Die Länge der Aminosäuresequenzen von M-I und M-II entspricht der Sequenz von A-II und A-III (s.o).

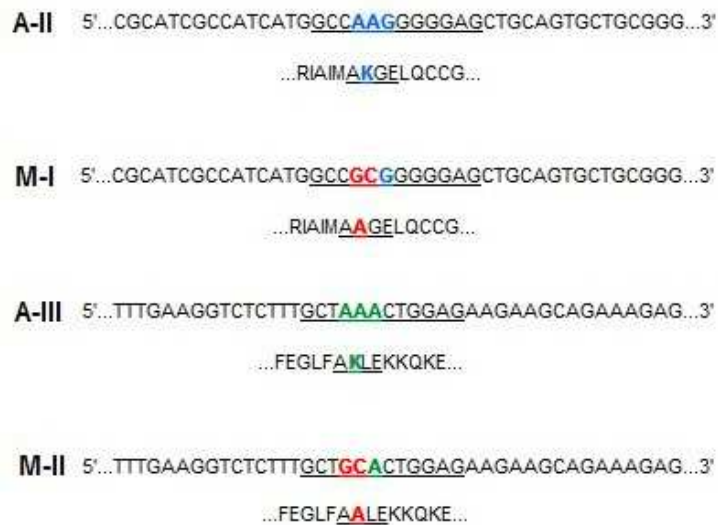


Abb. 15: Vergleich der Inserts von ABCA3 mit Wildtyp- und Mutations-SUMOsites

Die DNA-Sequenz ist von 5' nach 3' angegeben. Im Insert A-II findet sich nur die Wildtypsequenz der ersten SUMOsite, die im Konstrukt M-I durch Punktmutation der ersten beiden Basenpaare (rot: AA → GC) zum Austausch von Lysin zu Alanin in der AS-Sequenz führt. Dasselbe Prinzip gilt für die Mutation der Wildtypsequenz der zweiten SUMOsite im Insert A-III zum Insert M-II.

4.2.2 SUMOsites interagieren mit SUMO 1 bis 4

Der Yeast-Two-Hybrid wurde wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis zeigt eine Interaktion zwischen den SUMOsites im Wildtyp- und den SUMO-Proteinen 1 bis 4 und Ubc9. Durch Mutation der SUMOsites dagegen konnte die Interaktion mit den SUMO-Proteinen unterbunden werden. Alle Plasmidkonstrukte wurden durch Ubc9 gebunden und weisen auf eine tatsächlich stattgefundenen Sumoylierung hin. Zum Ausschluss einer möglichen Beeinflussung der Proteinbindung durch den spezifischen Vektor in dieser Konstellation wurden die SUMO Proteine und Inserts von ABCA3 als fish und bait vertauscht. Auch in dieser Konstellation blieb die Protein-Protein Interaktion zwischen Wildtyp-ABCA3 und SUMO 1-4 weitgehend bestehen, während die mutierten SUMOsites eine schlechtere oder gar keine Bindung mit den SUMO-Proteinen zeigten. M-I wurde kaum durch SUMO-Proteine gebunden, während M-II im Vergleich zur Positivkontrolle keine Interaktion mit SUMO 2 und 3 aufweisen konnte. Als Positivkontrolle wurde die bereits bekannte Bindung zwischen den Ubc9 und CFTR-IC verwendet. Die Intrazellulardomäne (=IC) des CFTR-Proteins enthält eine SUMOsite, die nachweislich durch SUMO-Proteine gebunden wird (Schulze 2009).

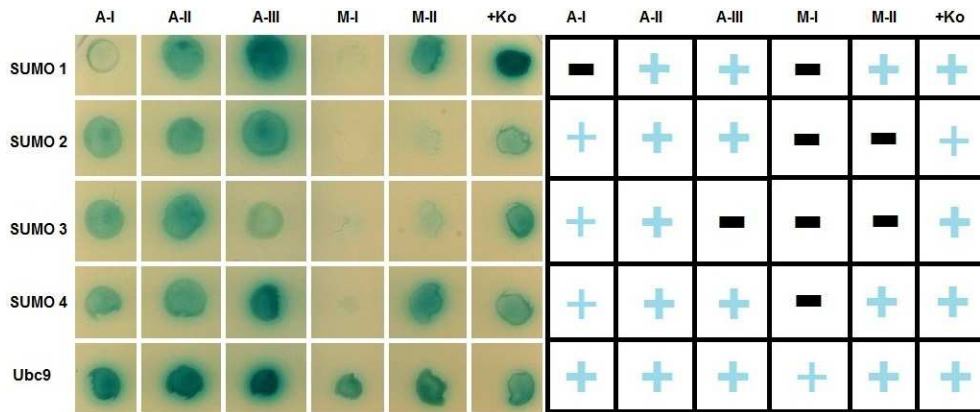


Abb. 16: Darstellung der Interaktion von ABCA3-Teilkonstrukten (fish) mit SUMO 1-4 und Ubc9 (bait)

Auf der linken Seite ist das Ergebnis des Y2H auf der Agarplatte, auf der rechten Seite schematisch zu sehen. Die **Blaufärbung** der aufgestempelten Kolonien zeigen eine stattgefundenen Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen an, die rechts durch die **blauen Pluszeichen** dargestellt werden. In den Feldern mit den **Minuszeichen** findet keine Interaktion zwischen den Proteinen statt. Die Wildtypkonstrukte mit den Inserts A-I (enthält beide SUMOSites), A-II (enthält SUMOSite I) und A-III (enthält SUMOSite II) zeigen überwiegend Bindung durch SUMO-Protein 1-4 sowie Ubc9. M-I (enthält mutierte SUMOSite I) zeigt keine Interaktion mit SUMO 1-4, aber mit Ubc9, während M-II (enthält mutierte SUMOSite II) von SUMO1, Ubc9 und SUMO 4 gebunden wird, mit SUMO 2-3 jedoch nicht interagiert. Als Positivkontrolle (+Ko) fungierte die CFTR-Intrazellulärdomäne. Sie enthält ein SUMO-Motiv, das von Ubc9 gebunden wird. Durch die Mutation der SUMOSites in ABCA3-Inserts kann die Interaktion von den SUMOSites mit den SUMO-Proteinen unterbunden werden, während der ABCA3-Wildtyp Interaktion mit SUMO 1-4 zeigt. Diese Ergebnisse deuten auf eine stattgefundenen Sumoylierung hin.

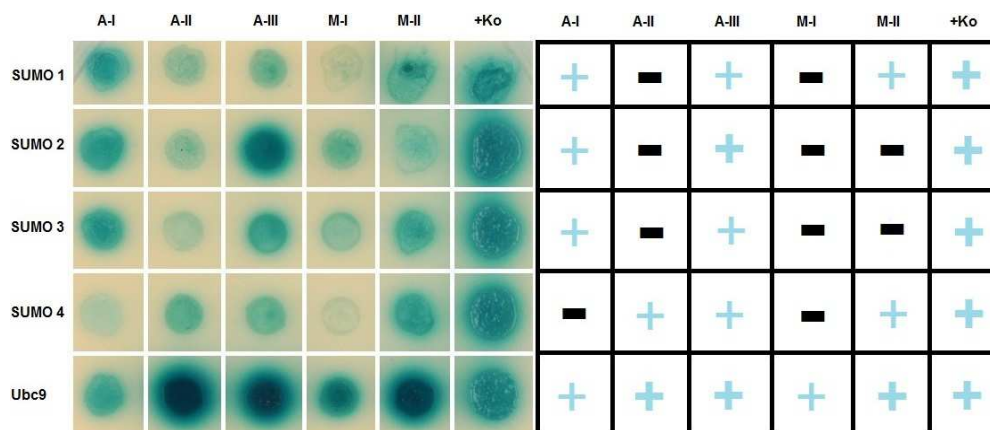


Abb. 17: Darstellung der Interaktion von ABCA3-Teilkonstrukten (bait) mit SUMO 1-4 und Ubc9 (fish)

Zum Ausschluss der Beeinflussung der Interaktion zwischen ABCA3 und SUMO 1-4 sowie Ubc9 durch den spezifischen Vektor wurden die SUMO-Proteine und Inserts von ABCA3 als fish und bait in den Vektoren vertauscht und der Y2H erneut durchgeführt (s. Kap. 3.4.4). Die Konstrukte A-I (enthält beide WT-SUMOSites) und A-III (enthält SUMOSite II) zeigen überwiegend Bindung durch SUMO-Protein 1 bis 4. A-II (enthält SUMOSite I) interagiert nicht mit den SUMO-Proteinen, während M-I (enthält die mutierte SUMOSite I) nicht durch SUMO 1 bis 4 gebunden wird. M-II (mit der mutierten SUMOSite II) interagiert nicht mit SUMO-Protein 2-3. Als Positivkontrolle (+Ko) fungierte wie bereits im vorherigen Experiment die CFTR-Intrazellulärdomäne in Interaktion mit Ubc9. Auch hier zeigt sich eine überwiegend nicht vorhandene Interaktion bei mutierten SUMOSites im Vergleich zum ABCA3 mit Wildtyp-SUMOSites und unterstützt die Vermutung der Sumoylierung von ABCA3.

4.3 Analyse der Sumoylierung von ABCA3 in kultivierten Säugetierzellen

Die Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid lieferten erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen den gefundenen Sumoylierungsstellen auf ABCA3 und den SUMO-Proteinen. Diese Theorie musste auch im zellulären System getestet werden, da der Yeast-Two-Hybrid ein künstliches System darstellt, in dem zudem durch den Einsatz von Teilfragmenten der ABCA3-cDNA nicht das gesamte Protein in Interaktion beobachtet werden konnte. Daher boten sich weiterführende Versuche zur Testung der Interaktion von SUMO-Protein mit kompletten ABCA3 in kultivierten Säugetierzellen als Folgeexperimente an.

4.3.1 Erstellung eines Expressionsplasmids mit vollständiger ABCA3 cDNA mit mutierten SUMOSites

Für die Testung einer Interaktion von den SUMOSites mit den SUMO-Proteinen wurden 3 Vektoren erstellt, die das komplette ABCA3 mit den mutierten SUMOSites enthielten. Mithilfe der „site directed mutagenesis“-Methode wurden, wie schon in Kapitel 3.4.3 beschrieben, Punktmutationen im codierenden Triplet des Lysins in der SUMOSite eingeführt, die zu einem Austausch des Lysins zu Alanin führte. Der Vektor puB6-ABCA-M-I enthält ABCA3 mit der mutierten SUMOSite I, der Vektor puB6-ABCA3-M-II die mutierte SUMOSite II und der Vektor puB6-ABCA3-M-I-M-II beide Mutations-SUMOSites. C-terminal von ABCA3 befindet sich ein Hämagglutinin-Epitope-Tag. Die SUMO-Proteine wurden als Fusion mit dem n-terminalen Epitope-Tag gegen das FLAG-Protein exprimiert.

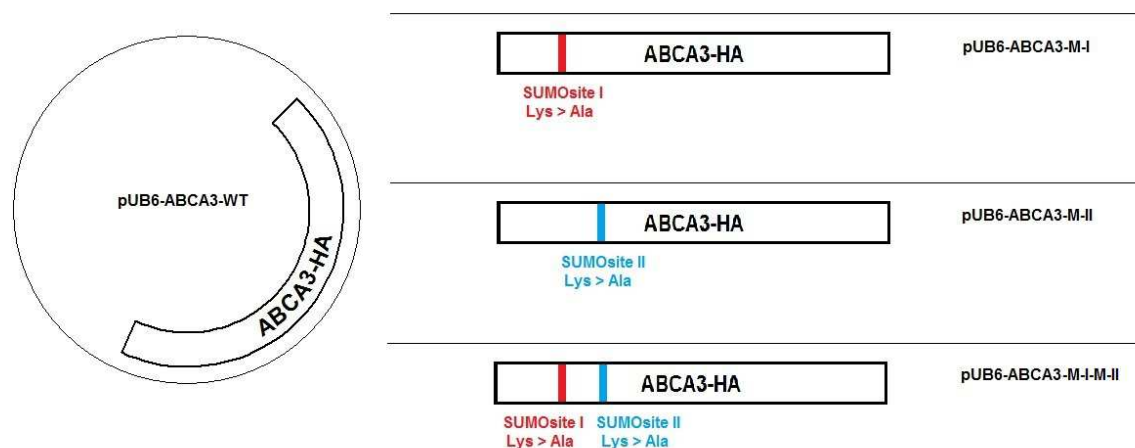


Abb. 18: Vektoren mit Wildtyp-ABCA3 und ABCA3 mit mutierten SUMOSites

Der Vektor pUB6, der Wildtyp-ABCA3 enthält, ist zirkulär auf der linken Seite dargestellt. Am c-terminalen Ende des ABCA3 befindet sich ein HA-Tag. Daneben werden die 3 Vektoren mit den mutierten SUMOSites in linearer Form gezeigt. Vektor pUB6-ABCA3-M-I enthält die mutierte SUMOSite I (**rot**). pUB6-ABCA3-M-II trägt die zweite mutierte SUMOSite (**blau**). Auf dem Vektor pUB6-ABCA3-M-I-M-II sind beide SUMOSites durch Mutation verändert.

4.3.2 Nachweis der Interaktion von SUMO 2 mit ABCA3 in CHO Zellen

Die Transfektion der ABCA3-HA- und FLAG-SUMO-Plasmide und die anschließende Co-Immunpräzipitation wurde wie in Kapitel 3.5 dargestellt durchgeführt. Die Immunpräzipitation von ABCA3-HA erfolgte durch einen aus der Ratte isolierten Anti-HA-Antikörper. Die Detektion im Westernblot erfolgte durch einen monoklonalen Maus-Anti-FLAG-Antikörper, welcher das FLAG-Tag am SUMO-Protein erkannte. Bei einer bestehenden kovalenten Bindung zwischen ABCA3 und SUMO-Protein wurde somit auch der gesamte ABCA3-SUMO-Komplex gebunden.

Die Testung der Interaktion von Protein SUMO 1 mit dem Wildtyp und den Mutationen von ABCA3 zeigte, wie erwartet, eine Sumoylierung des Wildtyps in der Zelle. Jedoch konnte trotz mutierter SUMOsite I eine Bindung zwischen SUMO 1 und ABCA3-M-I detektiert werden. Eine Interaktion zwischen ABCA3-M-II und ABCA3-M-I-M-II war hier nicht zu erkennen.

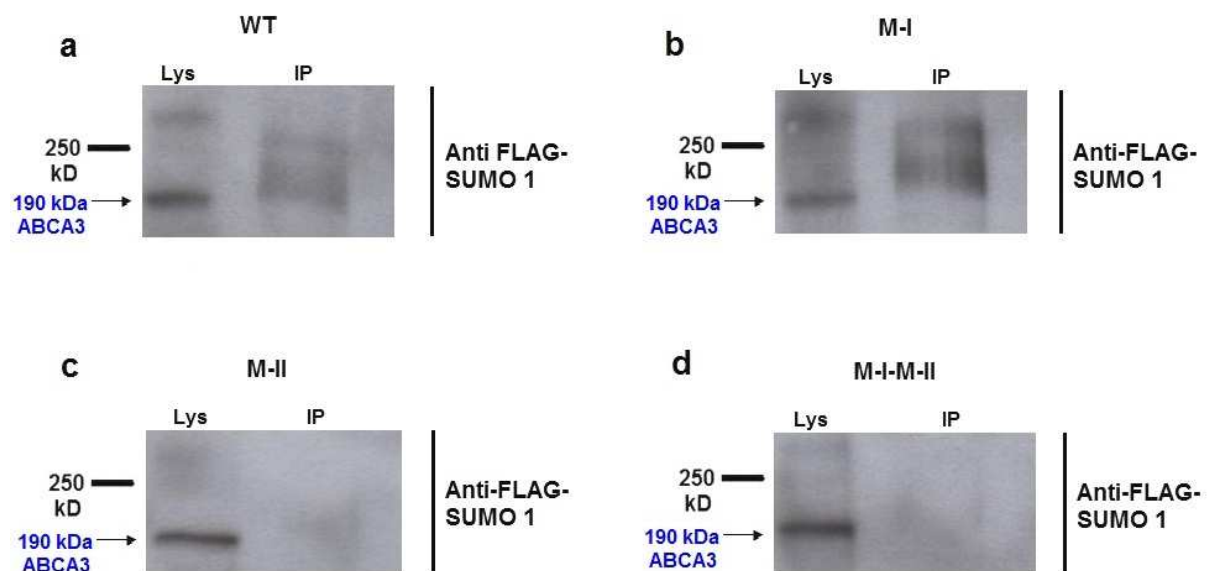


Abb. 19: Westernblot mit Detektion des ABCA3-HA-FLAG-SUMO-Komplex nach Co-IP von ABCA3 und SUMO 1

Der Marker auf der linken Seite der Bilder zeigt die Größe der Proteine an. Die Größe und Lokalisation von ABCA3 ist mit **Pfeil** und in **blau** bei 190 kiloDalton beschriftet. Das Zelllysate (**Lys**) nach der Lyse der Co-transfizierten CHO-Zellen ist als Kontrolle für die gelungene Immunpräzipitation (**IP**) mit dem HA-Antikörper zu werten. Der anschließende Westernblot wurde mit dem Antikörper gegen FLAG-SUMO-Protein 1 durchgeführt (rechts beschriftet). War es zu einer Interaktion mit SUMO-Protein gekommen, lässt sich ABCA3 durch den Antikörper präzipitieren. Sumoyliert werden Wildtyp-ABCA3 im Bild **a** und auch ABCA3 mit der mutierten SUMOsite I (ABCA3-M-I) im Bild **b**. Dagegen zeigt sich im Bild **c** keine Bindung zwischen SUMO 1 und ABCA3 mit der Mutations-SUMOsite II (ABCA3-M-II) oder dem in Bild **d** dargestellten ABCA3 mit beiden mutierten SUMOsites (ABCA3-M-I-M-II).

Da SUMO 4 als mögliches Produkt eines Pseudogens (s. Kap. 1.2.2) nicht ausreichend erforscht ist (Vidal 2010), wurde es nicht in den folgenden Versuchen berücksichtigt. Die Struktur von SUMO 2 und 3 stimmt zu großen Teilen überein (Ding et al. 2005), daher wurde als nächstes die Interaktion zwischen SUMO 2 und ABCA3 getestet.

Das Ergebnis des Westernblots zeigt eine Copräzipitation von SUMO 2 mit Wildtyp ABCA3 und eine fehlende Bindung beim ABCA3 Protein, wenn beide SUMOSites „ausgeknockt“ werden. Bei nur einer mutierten SUMOSite kann jedoch immer noch eine Interaktion nachgewiesen werden. Beide SUMOSites interagieren somit unabhängig voneinander mit dem SUMO-Protein, während eine Bindung durch SUMO-Protein bei zwei zerstörten SUMOSites auf ABCA3 nicht erfolgt.

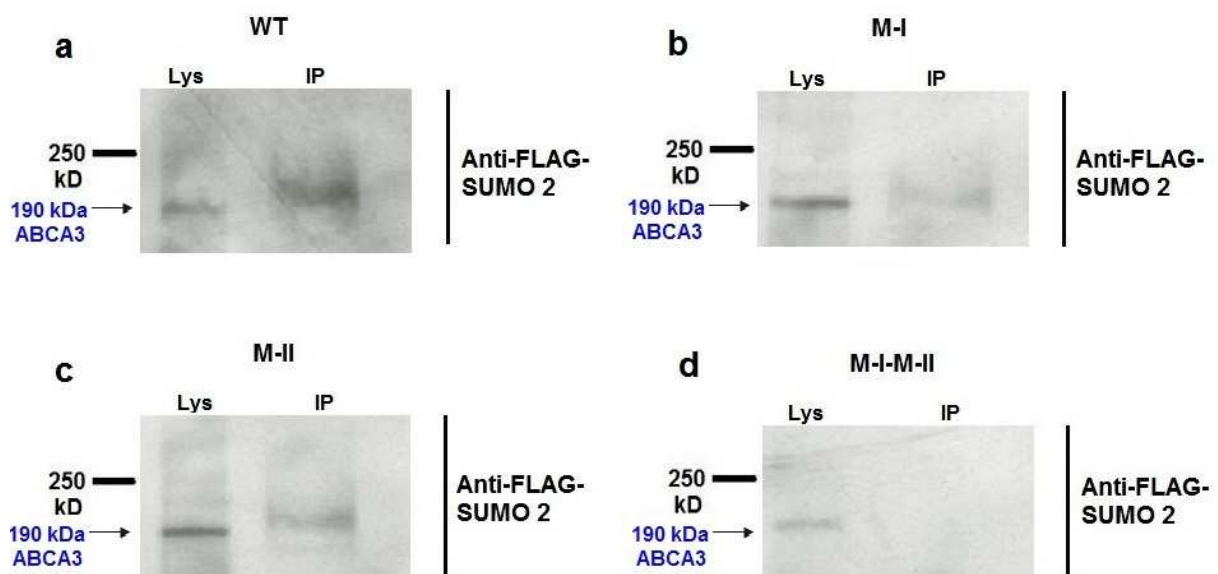


Abb. 20: Westernblot mit Detektion des ABCA3-HA-FLAG-SUMO-Komplex nach Co-IP von ABCA3 und SUMO 2

Der Marker auf der linken Seite der Bilder zeigt die Größe der Proteine an. Die Größe und Lokalisation von ABCA3 ist mit **Pfeil** und in **blau** bei 190 kiloDalton beschriftet. Das Zelllysate (**Lys**) nach der Lyse der Co-transfizierten CHO-Zellen ist als Kontrolle für die gelungene Immunpräzipitation (**IP**) mit dem Antikörper gegen HA zu werten. Der anschließende Westernblot wurde mit dem Antikörper gegen FLAG-SUMO-Protein 2 durchgeführt (rechts beschriftet). Sowohl Wildtyp-ABCA3 (ABCA3-WT) im Bild **a**, als auch ABCA3-Protein mit jeweils nur einer mutierten SUMOSite (ABCA3-M-I oder ABCA3-M-II) in den Bildern **b** und **c** werden sumoyliert. ABCA3-Protein mit beiden mutierten SUMOSites (ABCA3-M-I-M-II) im Bild **d** zeigt dagegen keine Bindung durch SUMO 2. Somit kann anhand der Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die Co-Präzipitation des SUMO-Proteins mit ABCA3 und die Detektion von FLAG-SUMO 2 im Westernblot die Sumoylierung von ABCA3 durch SUMO nachweist. Bei mutierten SUMOSites zeigt sich keine Sumoylierung von ABCA3.

4.4 Einfluss der Sumoylierung auf das Targeting von ABCA3 in der Zelle

Die Lokalisation von Wildtyp-ABCA3 und ABCA3 mit den mutierten SUMOsites in der Zelle sollte bezüglich möglicher Unterschiede getestet werden. Die Plasmide mit der Wildtyp- und mutierten ABCA3-Sequenz wurden, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, in A549-Zellen transfiziert und die Immunfluoreszenzanfärbung und Dokumentation wie im Kapitel 3.6.3 durchgeführt.

Da ABCA3 in der Zelle hauptsächlich in den Lamellarkörperchen gespeichert wird und diese lysosomalen Ursprungs sind, lässt sich das Vorhandensein von korrekt lokalisiertem ABCA3 am Besten durch die Anfärbung mithilfe des Antikörpers gegen Lamellarkörperchenmembranprotein 3 (=Anti-Lamp3) kontrollieren.

Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp-ABCA3 und ABCA3-M-I. Beide Proteine wiesen dieselbe Lokalisation auf wie der lysosomale Kontrollmarker Lamp3. Damit ist eine Fehllokalisierung des ABCA3 bei mutierter SUMOsite I sehr unwahrscheinlich.

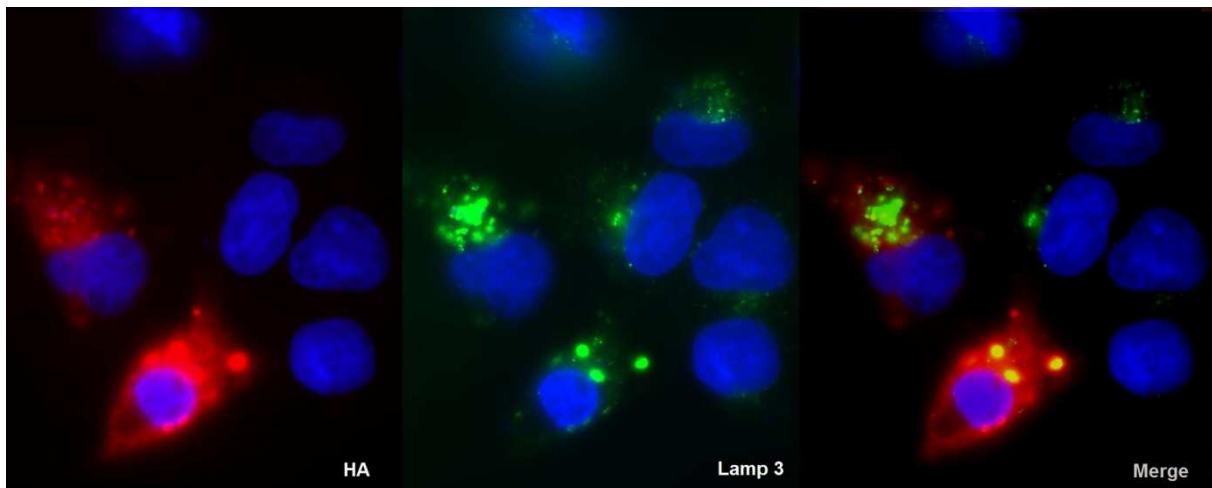


Abb. 21: Immunfluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-WT

Die Zellen wurden gemäß Protokoll mit pUB6-ABCA3-HA-WT (s. Kap. 3.6.2) transfiziert und einer doppelten Antikörperfärbung (s. Kap. 3.6.3) mit Anti-HA (**rot**) und Anti-Lamp3 (**grün**) unterzogen. Die Zellkerne wurden im Anschluss mittels DAPI (**blau**) sichtbar gemacht. Die Lamp3-Färbung repräsentiert die Lamellarkörperchen. Im linken Bild zeigt sich eine **Rotfärbung** von ABCA3-HA-WT im Zytoplasma von zwei erfolgreich transfizierten Zellen. Die rundlichen **roten** Gebilde mit ABCA3-HA-WT lassen auf die Speicherung von ABCA3 in Lamellarkörperchen schließen. Im mittleren Bild ist die Anfärbung von Lamp3 als lysosomaler Marker in **grün** zu sehen. Man kann erkennen, dass auch die nicht erfolgreich mit ABCA3-HA-WT transfizierten Zellen Lysosomen besitzen, welche durch Anti-Lamp3-AK gebunden werden. Rechts ist eine Aufnahme mit beiden Spektren übereinander gelegt zu sehen. Die Kongruenz der Lokalisation von ABCA3-HA-WT und Lamp3 (**gelb**) lässt darauf schließen, dass ABCA3 in Lamellarkörperchen im Zytoplasma akkumuliert.

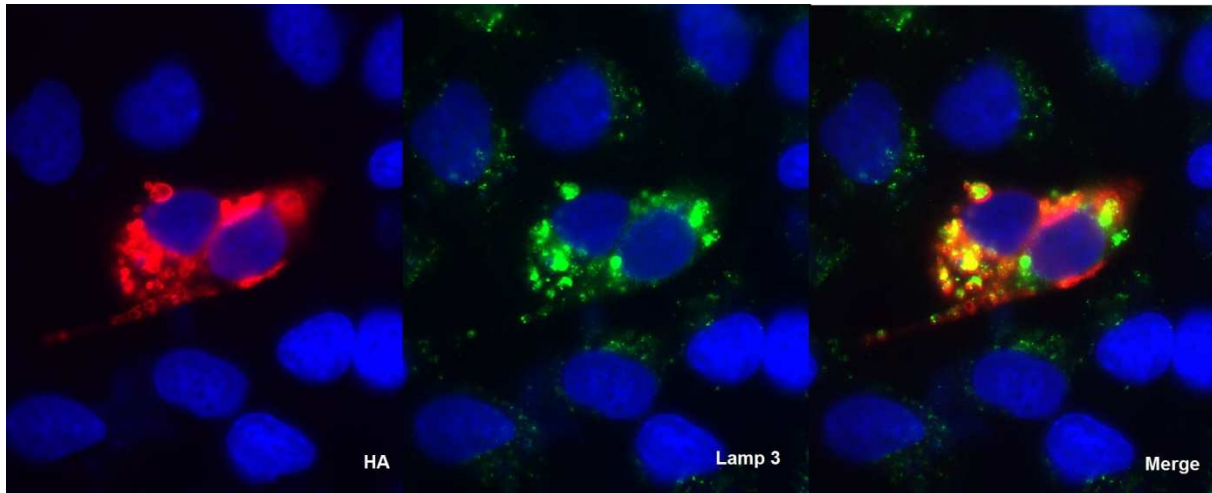


Abb. 22: Immunfluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-M-I

Wiederum ist die **rote** Anfärbung der Lamellarkörperchen durch den Anti-HA-Antikörper als rundliches Gebilde im Zytoplasma der zwei Zellen in der Bildmitte im linken Bild zu sehen. Im mittleren Bild befindet sich im Vergleich dazu die Immunreaktion derselben Zellen auf den Anti-Lamp3-Antikörper als lysosomaler Marker (**grün**). Im rechten Bild zeigt das Übereinanderlegen der Anti-HA und Anti-Lamp3-Färbungen eine überwiegende Übereinstimmung (**gelb**) der Lokalisation von ABCA3-HA-M-I in lysosomalen Gebilden. Dies lässt auf ein korrektes Targeting von ABCA3 trotz mutierter SUMOsite I in die Lamellarkörperchen der Zelle schließen.

Die Färbung von den A549 Zellen mit transfiziertem ABCA3-M-II zeigte dagegen keine Übereinstimmung zwischen der Lokalisation von Lysosom und dem ABCA3 mit der mutierten SUMOsite II. Da Lamp3 die Lamellarkörperchen beziehungsweise lysosomale Organellen in der Zelle sichtbar macht, scheint das ABCA3-Protein mit der mutierten SUMOsite II im Zytoplasma außerhalb der Lamellarkörperchen lokalisiert zu sein.

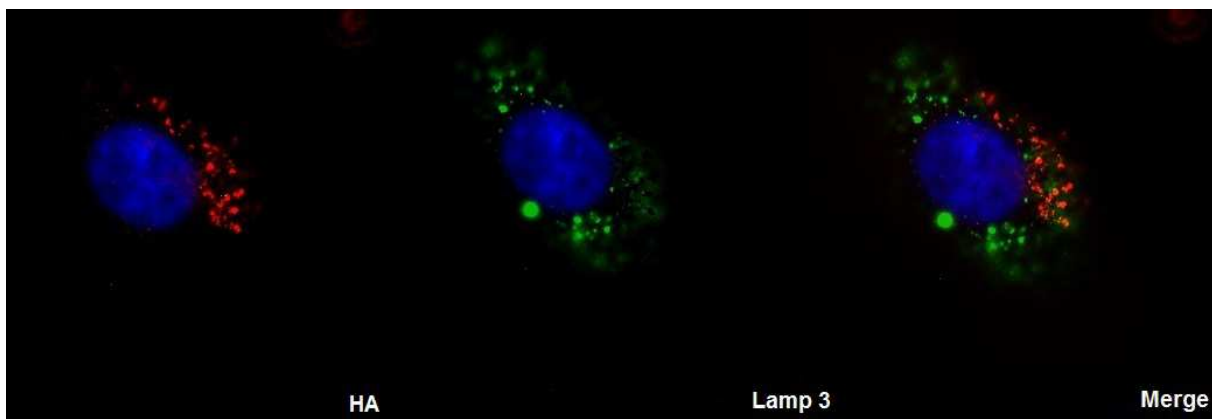


Abb. 23: Immunfluoreszenzaufnahmen einer A549-Zelle mit transient transfiziertem ABCA3-M-II

Der Zellkern stellt sich **blau** dar. Die gleichzeitige Anfärbung von HA (**rot**) und Lamp 3 (**grün**) im rechten Bild zeigt keine Übereinstimmung zwischen dem lysosomalen Marker und der Lokalisation von ABCA3-HA-M-II in der Zelle. Bei alleiniger Anfärbung von HA (**rot** im linken Bild) befindet sich ABCA3 an anderer Stelle als das im mittleren Bild mit **grünem** Fluoreszenz markierten Lamp3. Somit befindet sich ABCA3-HA-M-II nicht in den Lamellarkörperchen der A549-Zelle. Bei Mutation der SUMOsite II scheint kein korrektes Targeting von ABCA3 in der Zelle zu erfolgen.

Zur Bestätigung der Vermutungen zum Targeting von ABCA3 in die Lamellarkörperchen wurden MLE 12-Zellen mit ABCA3 in Wildtyp und mutierter Form nach Kapitel 3.6.2 transfiziert und erneut nach Kapitel 3.6.3 dargestellt und dokumentiert.

Dabei zeigten sich in den Wildtyp-transfizierten Zellen sowie in den Zellen, die mit ABCA3-M-I transfiziert wurden, deutlich erkennbare, zytoplasmatisch gelegene Ringstrukturen, die mit Lamellarkörperchen vereinbar waren. In den mit ABCA3-M-II transfizierten Zellen waren deutlich weniger und noch schemenhaft erkennbare Lamellarkörperchen zu erkennen. Die HA-Färbung der Zellen mit transfiziertem ABCA3-M-I-M-II zeigte eine willkürlich ubiquitäre Verteilung des Proteins ohne Ausbildung von Ringstrukturen im Zytoplasma. Diese Ergebnisse lassen auf ein fehlerhaftes Targeting mit ungeordneter Akkumulation des an SUMOsite II und an beiden SUMOsites mutierten ABCA3-Proteins schließen.

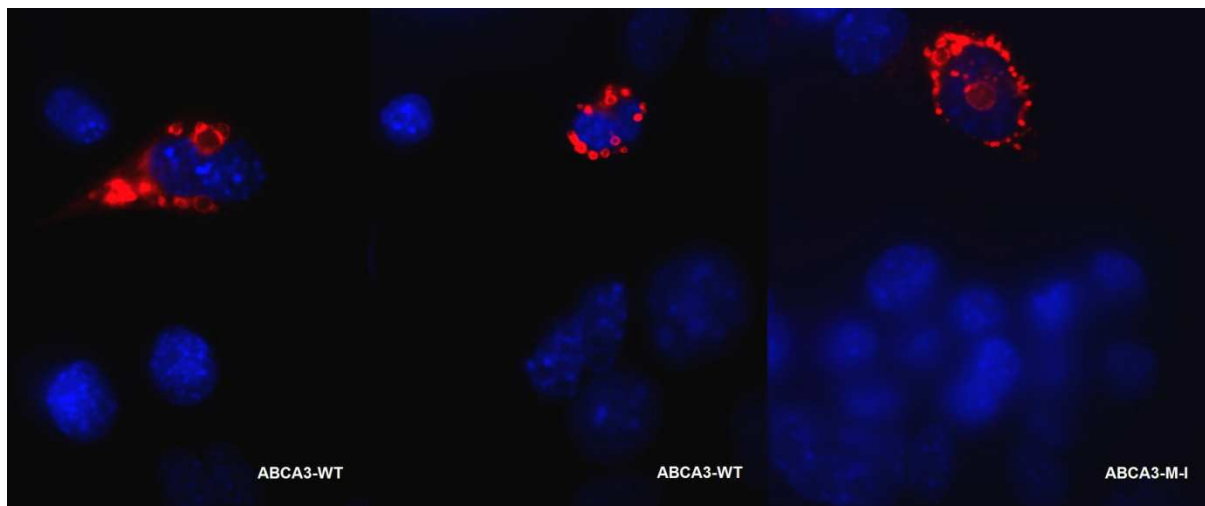


Abb. 24: Immunfluoreszenzaufnahmen von MLE 12-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-WT und ABCA3-M-I

Die Bilder links und in der Mitte zeigen Zellen, welche das ABCA3 Wildtyp Protein enthalten. Die HA-Färbung (rot) bringt deutliche, den blauen Zellkern umgebende, Ringstrukturen (=Lamellarkörperchen) hervor. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Aufnahme von MLE 12-Zellen mit transfiziertem ABCA3-HA-M-I im rechten Bild. Es ist kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem ABCA3 mit mutierterer SUMOsite I erkennbar, denn in beiden Fällen bilden sich Ringstrukturen aus, die als Lamellarkörperchen erkennbar sind.

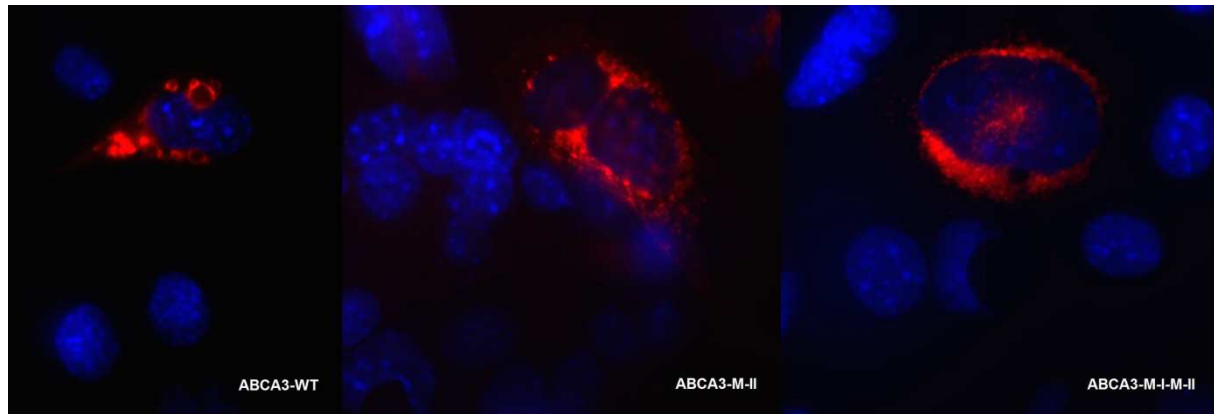


Abb. 25: Immunfluoreszenzaufnahmen von MLE 12-Zellen mit transient transfiziertem ABCA3-WT, ABCA3-M-II und ABCA3-M-I-M-II

In den mit HA angefärbten Zellen sind die Lamellarkörperchen **rot** dargestellt und die Zellkerne in **blau**. Im linken Bild befindet sich, wie in Abb. 21, die Wildtyp-ABCA3-transfizierten MLE 12-Zellen. Die Lamellarkörperchen hier sind deutlich ringförmig zu erkennen. Das mittlere Bild mit transfiziertem ABCA3-M-II zeigt weniger deutlich ausgebildete Ringstrukturen und eine gleichmäßige Verteilung von ABCA3-Protein im Zytoplasma. Im rechten Bild ist keine Akkumulation von ABCA3-HA-M-I-M-II im Lamellarkörperchen zu sehen, das Protein scheint überall im Zytoplasma der Zelle vorhanden zu sein und weist auf ein Fehltargeting von nicht-sumoyliertem ABCA3 hin.

Zusammenfassend ist zu notieren, dass die Ergebnisse des Yeast-Two-Hybrid einen Hinweis auf eine vorhandene Interaktion zwischen den SUMO-Proteinen und ABCA3-Wildtyp lieferten, während ABCA3 mit mutierten Sumoylierungsstellen in den meisten Fällen keine Interaktion aufweisen konnte. Diese Ergebnisse wurden in der Co-Immunpräzipitation weiter verdeutlicht, da es sich herausstellte, dass das ABCA3-Protein mit mutierter SUMOsite II keine kovalente Bindung mit SUMO-Protein 2 ausbilden konnte und somit nicht sumoyliert zu werden schien. In den Immunfluoreszenzaufnahmen von mit ABCA3 transfizierten A549 und MLE 12-Zellen stellte sich bei dem an beiden SUMOSites mutierten ABCA3 keine korrekte Speicherung des Proteins in den Lamellarkörperchen dar.

5 Diskussion

ABCA3 spielt eine bedeutsame Rolle im Surfactant-Stoffwechsel, da Defekte im ABCA3-Gen mit parenchymatösen Lungenerkrankungen assoziiert werden können. ABCA3-Defekte führen zur Verarmung der Lunge und von bronchioalveolärem Lavagematerial an Phospholipiden, vornehmlich DPPC (=Dipalmitoylphosphatidylcholin) und POPC (=Palmitoyloleoylphosphatidylcholin). Über die genaue Funktion und Arbeitsmechanismen von ABCA3 intrazellulär ist jedoch noch wenig bekannt.

Ein interessanter Aspekt der Regulierung von Proteinen innerhalb der Zelle ist die Sumoylierung, ein posttranslationaler Modifikationsprozess, bei dem durch die SUMO-Proteine aktive Untereinheiten auf das zu modifizierende Protein übertragen werden. Dabei binden die Untereinheiten an eine spezifische Erkennungssequenz (=SUMOsite), welche einen Lysinrest als Bindungspartner enthält.

Die Frage nach der Bedeutung und Funktion der Sumoylierung stellt sich bei etlichen Proteinen, bei denen SUMOsites entdeckt wurden (Geiss-Friedlander et al. 2007). In der Gruppe der ABC-Transporter dienten die Untersuchungsansätze über die Bedeutung und Funktion der Sumoylierung von ABCC7, auch bekannt als CFTR (Schulze 2009), und ABCC2 (Minami et al. 2009) als Vorlage für diese Arbeit.

Mit dem speziellen Softwareprogramm „fuzzpro“ konnte in der Aminosäuresequenz von ABCA3 zwei SUMOsites identifiziert werden. Beide SUMOsites zeigten im Yeast-Two-Hybrid Screening eine Interaktion mit SUMO-Protein. Diese Interaktion konnte durch die Co-Immunpräzipitation als eine kovalente Bindung zwischen ABCA3 und SUMO-Protein nachgewiesen werden und bestätigte die Aktivität der gefundenen SUMOsites.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktive SUMOsites im ABC-Transporter der Untergruppe A3 existieren. Diese Ergebnisse zeigen Analogie zu der bereits erwiesenen Sumoylierung von CFTR (Schulze 2009) und ABCC2 (Minami et al. 2009). CFTR besitzt zwei SUMOsites, welche sich, bezogen auf das zentrale Lysin, an den Aminosäurepositionen 447 in der NBD und Position 1486 am c-terminalen Ende von CFTR befinden. Die Sumoylierung des Proteins CFTR an diesen zwei SUMOsites konnte nachgewiesen werden, sowie ein Bezug zur Regulation des intrazellulären Transportes von CFTR. Ebenso erwies sich, dass die Mutation der SUMOsites oder eine Überexpression von SENP 1 nicht wie üblich zum Transport des CFTRs in die apikale Plasmamembran, sondern zu einer Retention (=Zurückhalten) von CFTR im Golgiapparat führte (Schulze 2009).

Die SUMOsite auf ABCC2 befindet sich auf Position 949 in der „linker region“. Auch hier konnte die Aktivität der SUMOsite im Beisein von Ubc9 nachgewiesen werden, sowie eine

Reduktion der Expression vom ABCC2 um 30 Prozent innerhalb der Zelle, ohne erkennbaren Einfluss auf die Lokalisation von ABCC2 (Minami et al. 2009).

Die Position der SUMOsites im ABCA3-Protein hat große Ähnlichkeit mit der von CFTR und ABCC2. Genau wie bei diesen befinden sich die SUMOsites in dem im Zytoplasma gelegenen Teil des Proteins und nicht in der Transmembrandomäne. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die Relevanz der SUMOsites, da eine in der Transmembrandomäne liegende SUMOsite schwer bis gar nicht zugänglich für die SUMO-Proteine wäre.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Sumoylierung von ABCA3. Experimente zur Klärung der Funktion der Sumoylierung von ABCA3 wären als nächste Schritte sinnvoll. Bei CFTR führte die Mutation in den SUMOsites zur Retention von CFTR im Golgiapparat und nicht wie beim Wildtyp-CFTR zum Transport in die apikale Plasmamembran (Schulze 2009). Es ist möglich, dass sich ein ähnlicher Pathomechanismus auch bei nicht sumoyliertem ABCA3 abspielt. Unsere Immufluoreszenzmikroskopie hat das Kompartiment, in dem nicht-sumoyliertes ABCA3 angehäuft wird, bislang noch nicht identifiziert.

Die Bedeutung der Sumoylierung für ABCA3 ist noch nicht ausreichend geklärt. Durch die Transfektion von ABCA3-Wildtyp und ABCA3 mit mutierten SUMOsites und der anschließenden Immunfluoreszenzfärbung gegen ABCA3 allein sowie der Co-lokalisation von ABCA3 und Lamp3 konnten einige erste Aussagen bezüglich der Bedeutung der Sumoylierung im Targeting gemacht werden.

So scheint eine Mutation und Zerstörung der Funktion der ersten Sumoylierungsstelle im ABCA3 im Vergleich mit dem Wildtyp zu keinem sichtbar abweichenden intrazellulären Fehltransport des Proteins zu führen. Es findet sich jedoch eine zytoplasmatische Fehllokalisierung des ABCA3-Proteins bei mutierter SUMOsite II mit wenig bis gar nicht vorhandenem Targeting in die lysosomalen Speicherorganellen (=Lamellarkörperchen). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zweite SUMOsite eine wichtige Rolle im korrekten Targeting des Proteins in der Zelle spielt. Bei Zerstörung dieser Sumoylierungsstelle wird ABCA3 fehlgeleitet. Dabei ist festzustellen, dass dieses Fehltargeting nicht unbedingt nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip funktioniert, sondern auch von dem Membranpotential oder einem anderen, bisher nicht geklärten Zustand der Zelle, wie zum Beispiel dem Einfluss von Reparaturmechanismen, abhängt. Es ist auch möglich, dass das korrekte Targeting nur herunterreguliert wurde und der Großteil von ABCA3 an das vorbestimmte Ziel gelangt.

Bei der beobachteten inkorrekten subzellulären Lokalisation kann von einer Relevanz für die Funktion ausgegangen werden. Das Trapping von defektem ABCA3 im Endoplasmatischen Retikulum wurde beim Vorliegen bestimmter Mutationen nachgewiesen (Weichert et al. 2011). Dabei wurden die drei häufigsten Mutationen in ABCA3, die im Lungengewebe von Kindern mit interstitieller Lungenerkrankung oder Surfactantmangel gefunden wurden, R43L,

R280C und L101P, in A549-Zellen untersucht. Es konnte neben dem Verbleiben von mutiertem ABCA3 im ER auch ein erhöhter intrazellulärer Stress und vermehrte Apoptosesignale der Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch für nicht korrekt sumoyliertes ABCA3 eine Retention im ER oder Golgiapparat in Frage kommen könnte.

Aufgrund des Fehlens von hochaffinen nativen SUMO-Protein- und ABCA3-Antikörpern konnte kein direkter Nachweis von natürlich exprimiertem ABCA3- und SUMO-Protein aus Lungengewebe im Westernblot erfolgen. Dieser Nachweis konnte nach artifizieller Expression von HA- und FLAG-getagtem ABCA3- und SUMO-Protein mittels respektiver hochaffiner Antikörper durchgeführt werden. Obwohl die Tags dieser so künstlich geschaffenen Proteine keinen wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der Proteine intrazellulär haben, würden Versuche mit nativen Antikörpern gegen ABCA3 und SUMO-Protein ein besseres Abbild der natürlichen Vorgänge in der Zelle darstellen. Desweiteren ist die Möglichkeit zu beachten, dass die Faltung und Stabilität des Proteins durch die Mutation in der SUMOsite beeinträchtigt wurde, womit ebenso eine Fehlfunktion und -lokalisation von ABCA3 bedingt sein könnte.

Die Immunfluoreszenzfärbung gegen HA und Lamp3 deutet auf ein mögliches Eingreifen der Sumoylierung in den Transportmechanismus von ABCA3 hin. Sie liefert wichtige Hinweise auf die möglichen Vorgänge im Targeting von ABCA3 und ist die bisher einzige ohne immensen experimentellen Aufwand durchzuführende Methode. Für zukünftige Experimente an der intrazellulären Funktion der Sumoylierung des ABCA3 wäre ein einfacher funktioneller Essay ideal.

Die Sumoylierung von ABCA3 ist ein Beispiel für die Regulation von ABC-Transportern. Es wäre von großem Interesse, profunderes Wissen über die genauen Mechanismen dieser Modifikation im Hinblick auf den intrazellulären Transport zu erfahren. Ebenso ist auch noch nicht bekannt, welche praktischen Anwendungen die Auswirkungen dieser Entdeckungen neben dem besseren Verständnis für die molekularen Vorgänge noch auf den eventuellen Eingriff in die Mechanismen zum Zwecke der Therapie von Erkrankungen spielen wird. Daher ist es wünschenswert, dass in Zukunft noch möglichst viele Proteine auf die Möglichkeit einer Sumoylierung und ihrer Bedeutung untersucht werden, um sie in Zukunft für Diagnostik und Therapie von Erkrankungen einsetzen zu können.

6 Zusammenfassung

ABCA3 ist ein Protein aus der Familie der ABC-Transporter, das in den Transport von Surfactant involviert ist. Es ist einiges über Mutationen im Gen von ABCA3 und zum klinischen Bild von ABCA3-abhängigen Erkrankungen bekannt, dennoch gibt es über das Protein und insbesondere sein intrazelluläre Funktion relativ wenige Daten. In dieser Arbeit wurde die Sumoylierung von ABCA3 und ihre Auswirkungen auf das Targeting des Proteins in der Zelle untersucht.

Die Sumoylierung gehört zu den posttranslationalen Modifikationsprozessen an Proteinen und zeichnet sich durch die Übertragung aktiver Untereinheiten auf das zu modifizierende Protein durch SUMO-Proteine aus. Dieser Prozess findet durch Bindung der SUMO-Proteine an der spezifischen Erkennungssequenz (=SUMOsite) statt.

Auch in der Aminosäuresequenz von ABCA3 wurden zwei mögliche SUMOsites entdeckt, deren Echtheit und Funktionalität zunächst im Yeast-Two-Hybrid-Versuch angedeutet und durch die Co-Immupräzipitationsmethode bestätigt wurden. Durch die Co-Immupräzipitationsmethode konnten kovalente Bindungen und somit eine erfolgreiche Sumoylierung zwischen ABCA3 und SUMO 1 und 2 nachgewiesen werden. In anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Hämagglutinin-getagtes ABCA3 wurde die mögliche Bedeutung dieser Sumoylierung nach Transfektion von Wildtyp-ABCA3-DNA und mutierter ABCA3-DNA in kultivierten Säugetierzellen untersucht. Bei gleichzeitiger Detektion mit dem lysosomalen Marker Lamp3 zeigte sich, dass für ein ABCA3-Protein mit beiden zerstörten SUMOsites kein korrektes Targeting in die Lamellarkörperchen der Zelle erfolgen konnte. Es wird vermutet, dass das unsumoylierte ABCA3 das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgiapparat nicht adäquat in Richtung Lamellarkörperchen verlassen kann, wobei das Ausmaß des Fehltargeting auch von dem Zustand der Zelle abhängt.

Diese Ergebnisse können sich in Zukunft in der Messung und Regulation der Menge an ABCA3 innerhalb der Lamellarkörperchen der Zellen als wichtig erweisen. Es wäre möglich, dass Defekte im Targeting von ABCA3, die auf Mutationen in den SUMOsites beruhen, durch die Klärung der Mechanismen adäquat therapiert werden können. Bisher sind in der Literatur keine natürlichen Mutationen in den SUMOsites von ABCA3 bekannt. Sollten diese Mutationen aus Patientengewebe isoliert werden können, wäre es möglich, dass diese Ergebnisse einen Beitrag zur pharmazeutischen oder gentechnologischen Therapie von parenchymatösen Lungenerkrankungen liefern.

Die Sumoylierung des ABCA3-Transporters und anderen ABC-Transportern zeigt die zunehmende Bedeutung der Sumoylierung im Prozess der Proteinmodifikation in der Zelle. Das steigende Interesse an der Erforschung der Sumoylierung an ABCA3 und anderen ABC-Transportern kann in Zukunft neue Erkenntnisse für derzeit noch ungeklärte Fragen erbringen.

7 Anhang

10	20	30	40	50	60
MAVLRQLALL	LWKNYTLQKR	KVLVTVLELF	LPLLFSGILI	WLRLKIQSEN	VPNATIYPGQ
70	80	90	100	110	120
SIQELPLFFT	FPPPGDTWEL	AYIPSHSDAA	KTVTETVRRRA	LVINMRVRGF	PSEKDFEDI
130	140	150	160	170	180
RYDNCSSSVL	AAVVEHHPFN	HSKEPLPLAV	KYHLRFSYTR	RNYMWTQTGS	FFLKETEGWH
190	200	210	220	230	240
TTSLFPLFPN	PGPREPTSPD	GGEPGYIREG	FLAVQHAVDR	AIMEYHADAA	TRQLFQRLTV
250	260	270	280	290	300
TIKRFYPPFF	IADPFLVAIQ	YQLPLLLLLLS	FTYTALTIAI	AVVQEKERRL	KEYMRMMGLS
310	320	330	340	350	360
SWLHWSAWFL	LFFLFLLIAA	SFMTLLFCVK	VKPNVAVLSR	SDPSLVLAFL	LCFAISTISF
370	380	390	400	410	420
SFMVSTFFSK	ANMAAAFVGGF	LYFFTYIPYF	FVAPRYNWM	LSQKLCSCLL	SNVAMAMGAQ
430	440	450	460	470	480
LIGKFEAKGM	GIQWRDLLSP	VNVDDDFCFG	QVLGMLLLDS	VLYGLVTWYM	EAVFPGQFGV
490	500	510	520	530	540
PQPWYFFIMP	SYWCGKPRAV	AGKEEEDSDP	EKALRNEYFE	AEPEDLVAGI	KIKHLSKVFR
550	560	570	580	590	600
VGNKDRAAVR	DLNLNLYEQ	ITVLLGHNGA	GKTTTLSMLT	GLFPPTSGRA	YISGYEISQD
610	620	630	640	650	660
MVQIRKSLGL	CPQHDILFDN	LTVAEHLYFY	AQLKGLSRQK	CPEEVKQMLH	IIGLEDKWS
670	680	690	700	710	720
RSRFLSGGMR	RKLSIGIALI	AGSKVLILDE	PTSGMDAISR	RAIWDLLQRQ	KSDRTIVLTT
730	740	750	760	770	780
HFMDEADLLG	DRIAIAKGE	LQCCGSSLFL	KQKYGAGYHM	TLVKEPHCNP	EDISQLVHHH
790	800	810	820	830	840
VPNATLESSA	GAELSFILPR	ESTHRFEGLF	AKLEKKQKEL	GIASFGASIT	TMEEVFLRVG
850	860	870	880	890	900
KLVDSMDIQ	AIQLPALQYQ	HERRASDWAV	DSNLCGAMDP	SDGIGALIEE	ERTAVKLNTG
910	920	930	940	950	960
LALHCQQFWA	MFLKKAAYSW	REWKMVAQV	LVPLTCVTLA	LLAINYSSEL	FDDPMLRLTL
970	980	990	1000	1010	1020
GEYGRTVVPF	SVPGTSQLGQ	QLSEHLKDAL	QAEGQEPREV	LGDLEEFLLIF	RASVEGGGFN
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ERCLVAASFR	DVGERTVVNA	LFNNQAYHSP	ATALAVVDNL	LFKLLCGPHA	SIVVSNFPQP
1090	1100	1110	1120	1130	1140
RSALQAQKQDQ	FNEGRKGFDI	ALNLLFAMAF	LASTFSILAV	SERAVQAKHV	QFVSGVHVAS
1150	1160	1170	1180	1190	1200
FWLSALLWDL	ISFLIPSLLL	LVVFKAFDVR	AFTRDGHMAD	TLLLLLLLYGW	AIIPMLYLMN
1210	1220	1230	1240	1250	1260
FFFLGAATAY	TRLTIFNILS	GIATFLMVTI	MRIPAVKLEE	LSKTLDHVFL	VLPNHCLGMA
1270	1280	1290	1300	1310	1320
VSSFYENYET	RRYCTSSEVA	AHYCKKYNIQ	YQENFYAWSA	PGVGRFVASM	AASGCAYLIL
1330	1340	1350	1360	1370	1380

LFLIETNLLQ	RLRGILCALR	RRRTLTELYT	RMPVLPEDQD	VADERTRILA	PSPDSSLHTP
1390	1400	1410	1420	1430	1440
LIIKELSKVY	EQRVPLLAVD	RLSLAVQKGE	CFGLLGFNGA	GKTTTFKMLT	GEESLTSGDA
1450	1460	1470	1480	1490	1500
FVGGHRISSD	VGKVRQRIGY	CPQFDALLDH	MTGREMLVMY	ARLRGIPERH	IGACVENTLR
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GLLLEPHANK	LVRTYSGGNK	RKLSTGIALI	GEPAVIFLDE	PSTGMDPVAR	RLWDTVARA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
RESGKAIIT	SHSMEECEAL	CTRLAIMVQG	QFKCLGSPQH	LKSKFGSGYS	LRAKVQSEGQ
1630	1640	1650	1660 </td <td>1670</td> <td>1680</td>	1670	1680
QEALEEFKAF	VDLTFPGSVL	EDEHQGMVHY	HLPGRDLSWA	KVFGILEKAK	EKYGVDDYSV
1690	1700				
SQISLEQVFL	SFAHLQPPTA	EEGR			

Abb. A 1: Darstellung der Aminosäuresequenz von ABCA3 mit den Motiven der SUMOsites I und II

Die komplette AS-Sequenz von ABCA3 ist hier abgebildet und nummeriert. Die Nummerierung gilt dabei für die letzte Aminosäure von 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren. **Gelb** und **grün** hinterlegt sind jeweils die SUMO-Motive I und II (The UniProt Consortium 2012).

Abb. A 2: Vektormap von pGBKT7

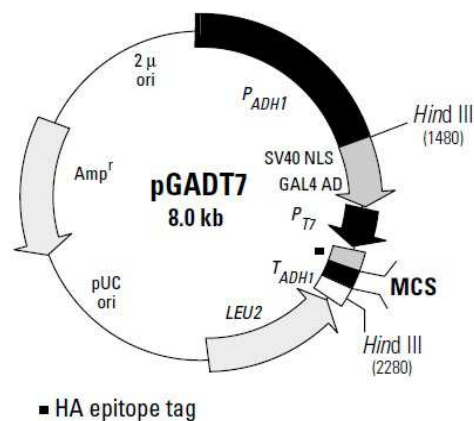


Abb. A 3: Vektormap von pGADT7

Insert	Leer-vektor	Oligonukleotidsequenz 5'-3' (forward und reverse)	DNA-Matrize
A-I	pGBKT7	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	pcDNA3.1-ABCA3
		TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	
A-II	pGBKT7	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	pcDNA3.1-ABCA3
		TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	
A-III	pGBKT7	ATCATATGCTGCAGTGCTGCGGGTCCTC	pcDNA3.1-ABCA3
		TAGGATCCGCAAAGAGACCTTCAAACCTG	
M-I	pGBKT7	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	pcDNA3.1-ABCA3
		TAGGATCCAGCGTCATGTGATAGCCGG	
M-II	pGBKT7	ATCATATGCACTGCAACCCGGAAGACATC	pcDNA3.1-ABCA3
		TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	
SUMO 1	pGBKT7	CATGCCATGGAGATGTCTGACCAG	pcDNA/HISc-SUMO 1
		CGGGATCCCTAAACTGTTGAATGA CC	
SUMO 2	pGBKT7	CATGCCATGGCCGACGAAAAGCCC	pcDNA/HISc-SUMO 2
		CGGGATCCCTCAGTAGACACCTCCC GT	
SUMO 3	pGBKT7	CATGCCATGGCCGAGGAGAAG CCC AAG	pcDNA/HISc-SUMO 3
		CGGGATCCCTAGAACTGTGCCCT GC	
SUMO 4	pGBKT7	CATGCCATGGCCAACGAAAAGCCC ACA	pcDNA/HISc-SUMO 4
		CGGGATCCCTCAGTAGACACCTCCC GT	
CFTR-IC	pGBKT7	GGAATTCATATGACTCGGCAATTTCCCTG G	pcDNA/HISc-CFTR
		AACTGCAGAGCTCTTGTGGACAGTAATATATCGAAGGTA	
Ubc9	pGBKT7	CATGCCATGGTTATGAGGGCGCAAACCTTCTTGG C	pFLAG CMV 6a-Ubc9
		CGGGATCCCTTATGAGGGCGCAAAC	

Tab. A 1: Übersicht der Plasmidkonstrukte (fish) für den Y2H

Die Schnittstellen der Oligonukleotidprimer für Restriktionsenzyme sind **rot markiert**.

Insert	Leer-vektor	Oligonukleotidsequenz 3'-5' (forward und reverse)	DNA-Matrize
A-I	pGADT7	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	pcDNA3.1- ABCA3
		TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	
A-II	pGADT7	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	pcDNA3.1- ABCA3
		TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	
A-III	pGADT7	ATCATATGCTGCAGTGCTGCGGGTCCTC	pcDNA3.1- ABCA3
		TAGGATCCGCAAAGAGACCTTCAAACCTG	
M-I	pGADT7	ATCATATGAGCGGGTATGAAATTTCCCAGG	pcDNA3.1- ABCA3
		TAGGATCCAGCGTCATGTGATAGCCGG	
M-II	pGADT7	ATCATATGCACTGCAACCCGGAAGACATC	pcDNA3.1- ABCA3
		TAGGATCCGCCAGCTGTATGCGGCCTTC	
SUMO 1	pGADT7	CATGCCATGGAGATGTCTGACCAG	pcDNA/HISc- SUMO 1
		CGGGATCCCTAAACTGTTGAATGA CC	
SUMO 2	pGADT7	CATGCCATGGCCGACGAAAAGCCC	pcDNA/HISc- SUMO 2
		CGGGATCCCTCAGTAGACACCTCCC GT	
SUMO 3	pGADT7	CATGCCATGGCCGAGGAGAAG CCC AAG	pcDNA/HISc- SUMO 3
		CGGGATCCCTAGAAACTGTGCCCT GC	
SUMO 4	pGADT7	CATGCCATGGCCAACGAAAAGCCC ACA	pcDNA/HISc- SUMO 4
		CGGGATCCCTCAGTAGACACCTCCC GT	
CFTR- IC	pGADT7	GGAATTCCATATGACTCGGCAATTTCCCTG G	pcDNA/HISc- CFTR
		AAGTGCAGAGCTCTTGTGGACAGTAATATATCGAAGGTA	
Ubc9	pGADT7	CATGCCATGGTTATGAGGGCGCAAACCTTCTTGG C	pFLAG CMV 6a-Ubc9
		CGGGATCCCTTATGAGGGCGCAAAC	

Tab. A 2: Übersicht der Plasmidkonstrukte (bait) für den Y2H

Die Schnittstellen der Oligonukleotidprimer für Restriktionsenzyme sind **rot markiert**.

8 Literaturverzeichnis

Albrecht, C. and Viturro, E. (2007). "The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases." *Pflugers Arch* 453(5): 581-589.

Allikmets, R. (2000). "Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease." *Am J Hum Genet* 67(4): 793-799.

Allikmets, R., Shroyer, N. F. et al. (1997). "Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration." *Science* 277(5333): 1805-1807.

Balis J. and Conen, P. (1964). "The role of alveolar inclusion bodies in the developing lung." *Lab Invest.*: 1215-29.

Bayer, P., Arndt, A. et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." *J Mol Biol* 280(2): 275-286.

Benson, M. D., Li, Q. J. et al. (2007). "SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1805-1810.

Besnard, V., Matsuzaki, Y. et al. (2010). "Conditional deletion of Abca3 in alveolar type II cells alters surfactant homeostasis in newborn and adult mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298(5): L646-659.

Bodzioch, M., Orso, E. et al. (1999). "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease." *Nat Genet* 22(4): 347-351.

Bohren, K. M., Nadkarni, V. et al. (2004). "A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus." *J Biol Chem* 279(26): 27233-27238.

Bullard, J. E., Wert, S. E. et al. (2005). "ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease." *Am J Respir Crit Care Med* 172(8): 1026-1031.

Bullard, J. E., Wert, S. E. et al. (2006). "ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease." *Semin Perinatol* 30(6): 327-334.

Cheong, N., Zhang, H. et al. (2007). "ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo." *J Biol Chem* 282(33): 23811-23817.

Clontech Laboratories, Inc., "The Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System." Mountain View, CA.

Connors, T. D., Van Raay, T. J. et al. (1997). "The cloning of a human ABC gene (ABC3) mapping to chromosome 16p13.3." *Genomics* 39(2): 231-234.

Couchard, M., Polge, J. et al. (1974). "Hyaline membrane disease: diagnosis, radiologic surveillance, treatment and complications." *Ann Radiol (Paris)* 17(7): 669-683.

Dean, M., Hamon, Y. et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *J Lipid Res* 42(7): 1007-1017.

- Doan, M. L.**, Guillerman, R. P. et al. (2008). "Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children." *Thorax* 63(4): 366-373.
- Ding, H.** et al. (2005). "Solution Structure of Human SUMO-3 C47S and Its Binding Surface for Ubc9." *Biochemistry* 44, 2790-2799.
- Edwards, V.**, Cutz, E. et al. (2005). "Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency." *Ultrastruct Pathol* 29(6): 503-509.
- Feliciangeli, S.**, Bendahhou, S. et al. (2007). "Does sumoylation control K2P1/TWIK1 background K⁺ channels?" *Cell* 130(3): 563-569.
- Fields, S.** and Song O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* 340(6230): 245-246.
- Fitzgerald, M. L.**, Xavier, R. et al. (2007). "ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol." *J Lipid Res* 48(3): 621-632.
- Garmany, T. H.**, Moxley, M. et al. (2006). "A. Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations." *Pediatr.Res.* 59(6), 801-805.
- Geiss-Friedlander, R.** and Melchior, F. (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 947-956.
- Gerstein, M.** and Zheng, D. (2006). „The real life of pseudogenes.“ *Sci Am.* ; 295(2):48-55.
- Giorgino, F.**, de Robertis, O. et al. (2000). "The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1125-1130.
- Gong, L.**, Kamitani, T. et al. (1997). "Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9." *J Biol Chem* 272(45): 28198-28201.
- Gong, L.**, Millas, S. et al. (2000). "Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease." *J Biol Chem* 275(5): 3355-3359.
- Hammel, M.**, Michel, G. et al. (2007). "Targeted inactivation of the murine Abca3 gene leads to respiratory failure in newborns with defective lamellar bodies." *Biochem Biophys Res Commun* 359(4): 947-951.
- Hamvas, A.** (2010). "Evaluation and management of inherited disorders of surfactant metabolism." *Chin Med J (Engl)* 123(20): 2943-2947.
- Hartel, C.**, Felderhoff-Muser, U. et al. (2012). "ATP-binding cassette member A3 (E292V) gene mutation and pulmonary morbidity in very-low-birth-weight infants." *Acta Paediatr* 101(4): 380-383.
- Hartl, D.** and Griese, M. (2005). "Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes." *Respir Res* 6: 32.
- Higgins, C. F.** (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.

- Hershko, A.** and Ciechanover, A. (1990). "The ubiquitin system for protein degradation." *Annu. Rev. Biochem.*: 61 :761-807.
- Hochstrasser, M.** (2000). "Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems." *Nat Cell Biol* 2(8): E153-157.
- Kamitani, T.,** Kito, K. et al. (1998). "Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins." *J Biol Chem* 273(18): 11349-11353.
- Karjalainen, M. K.,** Haataja, R. et al. (2008). "Haplotype analysis of ABCA3: association with respiratory distress in very premature infants." *Ann Med* 40(1): 56-65.
- Kauffmann, G.,** Moser, E., Sauer, R. (2006). "Radiologie." Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Klenk, C.,** Humrich, J. et al. (2006). "SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosducin." *J Biol Chem* 281(13): 8357-8364.
- Klugbauer, N.** and Hofmann, F. (1996). "Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein." *FEBS Lett* 391(1-2): 61-65.
- Koletzko, B.** (2004). "Kinderheilkunde und Jugendmedizin." Springer Verlag.
- Mahajan, R.,** Delphin, C. et al. (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." *Cell* 88(1): 97-107.
- Martin, S.,** Nishimune, A. et al. (2007). "SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission." *Nature* 447(7142): 321-325.
- Matsumura, Y.,** Ban, N. et al. (2006). "Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency." *J Biol Chem* 281(45): 34503-34514.
- Matunis, M. J.,** Coutavas, E. et al. (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." *J Cell Biol* 135(6 Pt 1): 1457-1470.
- Matunis, M. J.,** Wu, J. et al. (1998). "SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex." *J Cell Biol* 140(3): 499-509.
- Melchior, F.** (2000). "SUMO--nonclassical ubiquitin." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 591-626.
- Melchior, F.,** Schergaut, M. et al. (2003). "SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores." *Trends Biochem Sci* 28(11): 612-618.
- Minami, S.,** Ito, K. et al. (2009). "Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(2): G406-413.
- Molecularsciences.org** (2006-2012). "Proteomics: Protein Protein Interaction." eNom, Inc., Calgary, Kanada
- Mullis, K.,** Faloona, F. et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.

- Mulugeta, S.**, Gray, J. M. et al. (2002). "Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3." *J Biol Chem* 277(25): 22147-22155.
- Nagata, K.**, Yamamoto, A. et al. (2004). "Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles." *Biochem Biophys Res Commun* 324(1): 262-268.
- Ozkaynak, E.** Finley, D. et al. (1987). "The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions." *The EMBO Journal* vol.6 no.5 pp. 1429-1439.
- Pauwels, E. K.**, Erba, P. et al. (2007). "Multidrug resistance in cancer: its mechanism and its modulation." *Drug News Perspect* 20(6): 371-377.
- Rajan, S.**, Plant, L. D. et al. (2005). "Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1." *Cell* 121(1): 37-47.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sampson, D. A.**, Wang, M. et al. (2001). "The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification." *J Biol Chem* 276(24): 21664-21669.
- Schulze, C.** (2009) *Sumoylierung – ein neuer Regulationsmechanismus des Transportes von CFTR zur Membran*. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Serfaty-Lacrosniere, C.**, Civeira, F. et al. (1994). "Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease." *Atherosclerosis* 107(1): 85-98.
- Shulenin, S.**, Nogee, L. M. et al. (2004). "ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency." *N Engl J Med* 350(13): 1296-1303.
- Stefkova, J.**, Poledne, R. et al. (2004). "ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases." *Physiol Res* 53(3): 235-243.
- Tang, Z.**, El Far, O. et al. (2005). "Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8." *J Biol Chem* 280(46): 38153-38159.
- The UniProt Consortium** (2012). "Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource." *Nucleic Acids Res.* 40: D71-D75.
- Towbin, H.**, Staehelin, T. et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Vidal, C. J.** (2011) "Post-Translational Modifications in Health and Disease (Protein Reviews)", Springer US.

Walker, J. E., Saraste, M. et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." *EMBO J* 1(8): 945-951.

Weichert, N., Kaltenborn, E. et al. (2011): "Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells." *Respiratory Research* 12:4

Yamano, G., Funahashi, H. et al. (2001). "ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells." *FEBS Lett* 508(2): 221-225.

Zen, K., Notarfrancesco, K. et al. (1998). "Generation and characterization of monoclonal antibodies to alveolar type II cell lamellar body membrane." *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): L172-183.

Zhou, C., Zhao, L. et al. (2001). "ATP-binding cassette transporter ABC2/ABCA2 in the rat brain: a novel mammalian lysosome-associated membrane protein and a specific marker for oligodendrocytes but not for myelin sheaths." *J Neurosci* 21(3): 849-857.

9 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. D. Reinhardt, dem ehemaligen Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und seinem Nachfolger, Prof. Dr. C. Klein für die Möglichkeit, meine Promotion an der Klinik realisieren zu können.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Holzinger für die Bereitstellung des Themas und die intensive Unterstützung, Geduld und Motivation in dem Prozess der Entstehung dieser Dissertation. Seine wertvollen Anregungen waren von entscheidender Bedeutung zur Verwirklichung dieser Dissertation.

Einen großen Anteil an der Themenstellung dieser Arbeit hat Dr. Judith Glöckner-Pagel geleistet, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Ebenso möchte ich Dr. Markus Hammel, Dr. Rashmi Mittal und Dr. Louiza Papatheodorou für die Unterweisung in den verschiedenen molekularbiologischen Methoden und die fortwährende Unterstützung im Labor danken.

Ferner möchte ich Jan Tausendfreund meinen Dank aussprechen, der mit viel praktischer Erfahrung und hilfreichen Ratschlägen zu den experimentellen Arbeiten beigetragen hat. Auch die Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen der Labore K0.21 und KU.50 wird mir immer in guter Erinnerung verbleiben.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die unermüdliche Aufmunterung während der Entstehung möchte ich Julia Kurz, Linda Grießer und Karin Schade danken.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mein Medizinstudium ermöglicht und mich bei allen Plänen und Entscheidungen ermutigt und unterstützt hat.