

**Charakterisierung eines
neuen *ATP-binding-cassette* Transporters
aus der ABCA-Subfamilie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Frauke Petry

aus Dresden

Göttingen 2004

D7

Referent: Professor Dr. A. Zeeck

Korreferent: Professor Dr. H. Laatsch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis Mai 2004 in der Abteilung Toxikologie des Zentrums Pharmakologie und Toxikologie der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

F. PETRY, A. KOTTHAUS, K.I. HIRSCH-ERNST, Cloning of human and rat ABCA5/Abca5 and detection of a human splice variant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 343–350.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. K.I. Hirsch-Ernst und Herrn Prof. Dr. G.F. Kahl für die interessante Themenstellung, ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für ihre großzügige Förderung. Herrn Prof. Dr. A. Zeeck danke ich herzlich für sein Interesse an diesem Projekt und die Vertretung gegenüber der Fakultät für Chemie. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Laatsch für die freundliche Übernahme des Koreferates. Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung
ist eine ständige Flucht vor dem Staunen.

nach Albert Einstein (1879–1955)

Inhaltsverzeichnis

	ABKÜRZUNGEN	VI
1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Superfamilie der ABC-Proteine	1
1.2	Struktur und Topologie der ABC-Proteine	2
1.3	Humane ABC-Proteine – Die 7 Subfamilien	3
1.3.1	Die ABCG-Subfamilie (<i>White</i> Subfamilie)	3
1.3.2	Subfamilien E (OABP) und F (GCN20)	
1.3.3	Subfamilie D (ALD)	4
1.3.4	Subfamilie C (CFTR/MRP)	4
1.3.5	Subfamilie B (MDR/TAP)	5
1.4	Charakterisierung der ABCA-Subfamilie	7
1.4.1	Stand der aktuellen ABCA-Forschung	7
1.4.1.1	ABCA1	7
1.4.1.2	ABCA4	8
1.4.1.3	Weitere ABCA-Transporter	9
1.4.1.4	Der ABCA-Gencluster auf Chromosom 17	10
1.5	Ziele der vorliegenden Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Reagenzien und Enzyme	12
2.1.2	Kits	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.4	Geräte	15
2.1.4.1	Zellkultur	15
2.1.4.2	Molekularbiologie	15
2.1.4.3	DNA- und RNA-Analytik	16
2.1.4.4	Protein-Analytik	16
2.1.5	Puffer und Lösungen	17
2.1.6	Kulturmedien	17
2.1.6.1	Kulturmedien für kompetente <i>E.coli</i> Bakterien	17
2.1.6.2	Medien für die Zellkultur	18
2.1.6.2.1	Eukaryotische Zelllinien	18
2.1.6.2.2	Primäre Rattenhepatozyten	19
2.1.7	Tiere und Biologisches Material	20
2.1.7.1	Versuchstiere	20

2.1.7.2	Bakterien	20
2.1.7.3	Vektoren	20
2.1.7.4	Eukaryotische Zelllinien	20
2.1.7.5	Antikörper	21
2.1.7.6	Oligonukleotide	21
2.1.7.7	Gensonden	24
2.1.7.8	RNA-Proben	24
2.1.7.9	Molekulargewichtstandards	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Vorbehandlung und Sterilisation	25
2.2.2	Präparation von Nucleinsäuren	25
2.2.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	25
2.2.2.2	Herstellung von Glycerinkryokulturen	26
2.2.2.3	Endotoxin-freie Maxipräparation von Plasmid-DNA	26
2.2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA	26
2.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	28
2.2.3	Enzymatische Modifikationen von Nucleinsäuren	28
2.2.3.1	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	28
2.2.3.2	Herstellung von <i>blunt-end</i> DNA-Fragmenten	28
2.2.3.3	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	29
2.2.3.4	Digoxigenin-Markierung von cRNA-Sonden	29
2.2.3.5	Dot-Blot-Analyse der cRNA-Sonden	30
2.2.3.6	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	31
2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.4.1	QIAquick Gel Extraction Kit	32
2.2.4.2	Low-Melting-Methode	32
2.2.4.2	DNA-Präzipitation	32
2.2.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	32
2.2.5.1	TOPO-Ligation	3
2.2.5.2	Ligation mit T4-DNA-Ligase	33
2.2.5.3	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> Zellen	33
2.2.5.4	Transformation durch Elektroporation	33
2.2.6	PCR-Techniken	34
2.2.6.1	<i>Reverse Transcription</i> -PCR (RT-PCR)	34
2.2.6.2	5'-RACE-PCR	36
2.2.6.3	<i>Two-step</i> RT-PCR	37
2.2.6.4	<i>Real-Time quantitative</i> PCR (RTQ-PCR) I	38
2.2.6.5	Kolonie-PCR	42
2.2.7	Sequenzanalyse	43
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	43

2.2.8.1	DNA-Gelelektrophorese	43
2.2.8.2	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	44
2.2.9	Transfer von Nukleinsäuren	45
2.2.9.1	RNA-Transfer auf Nylon-Membranen	45
2.2.10	Radioaktive Hybridisierung von RNA an Northern Blots	46
2.2.10.1	Hybridisierung mit ³² Phosphor-markierten Sonden	46
2.2.11	Nicht-radioaktive Hybridisierung - <i>In situ</i> Hybridisierung	47
2.2.11.1	Herstellung von Paraffinschnitten	47
2.2.11.2	Vorbehandlung und Hybridisierung	48
2.2.11.3	Waschschritte und Antikörper-Inkubation	48
2.2.11.4	Waschschritte und Antikörper-Inkubation	50
2.2.11.5	Fotografische Auswertung	50
2.2.12	Zellkultur	50
2.2.12.1	Kultur eukaryotischer Zelllinien	50
2.2.12.2	Kultur primärer Rattenhepatozyten	51
2.2.12.3	Abbruch der Kultivierung	52
2.2.13	Transfektion von Zelllinien mit Expressionsplasmiden	53
2.2.14	Proteinbiochemische Methoden	53
2.2.14.1	Subfraktionierung von Zellen	53
2.2.14.2	Homogenisation von Zellen	53
2.2.14.3	Fraktionierung der Zellhomogenate	53
2.2.14.4	Isolierung von Gesamt-Proteinextrakten	55
2.2.14.5	Proteinbestimmung	56
2.2.14.6	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.2.14.7	Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen	57
2.2.14.8	Probenvorbereitung	58
2.2.14.9	Elektrophorese	58
2.2.14.10	Nachweis von Proteinen im Western-Blot	59
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Vorarbeiten	62
3.2	Charakterisierung eines neuen humanen ABCA5-Gens	62
3.2.1	Isolierung des humanen ABCA5-Gens	62
3.2.2	Genomische Struktur von ABCA5	67
3.2.3	Identifizierung einer ABCA5-Splicevariante ABCA5 V20+16	68
3.2.4	Isolierung des orthologen Abca5-Gens der Ratte	69
3.2.5	Genomische Struktur des Abca5-Gens der Ratte	73
3.2.6	Identifizierung einer rAbca5-Splicevariante rAbca5 V+16	74
3.2.7	Untersuchungen zur Membran-Topologie	75
3.2.7.1	Membransegmente in ABCA5 und ABCA5 V20+16	75

3.2.7.2	Membransegmente in rAbca5 und rAbca5 V+16	76
3.3	Untersuchungen zur mRNA-Gewebeverteilung von <i>hABCA5</i> und <i>rAbca5</i>	77
3.3.1	Expression des humanen <i>ABCA5</i> -Gens	77
3.3.2	Expression des <i>Abca5</i> -Gens der Ratte	78
3.4	Zellspezifische Verteilung der <i>rAbca5</i>-mRNA in Organen der Ratte	79
3.4.1	Generierung der DIG-cRNA-Sonden	79
3.4.2	Morphologie des Testis der Ratte	80
3.4.3	Expression des <i>rAbca5</i> -Gens im Testis der Ratte	81
3.4.4	Morphologie der Epididymis der Ratte	84
3.4.5	Expression des <i>rAbca5</i> -Gens in der Epididymis der Ratte	85
3.5	Expression des <i>Abca5</i>-Gens der Ratte in Kulturen primärer Hepatozyten	87
3.5.1	Einfluß von 22-R-Hydroxycholesterol auf die <i>rAbca5</i> -mRNA- Expression	88
3.5.2	Einfluß von 22-R-Hydroxycholesterol und 9- <i>cis</i> -Retinsäure auf die <i>rAbca5</i> -mRNA Expression	88
3.5.3	Einfluß eines synthetischen LXR-Agonisten auf die <i>rAbca5</i> -mRNA Expression	89
3.5.4	Zeitabhängige Zunahme der <i>rAbca5</i> -mRNA-Expression	91
3.6	Quantitative Analyse der Expression von <i>rAbca5 V+16</i>	92
3.7	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation	94
3.7.1	Generierung von V5-Expressionsklonen für rAbca5 und rAbca5 V+16	95
3.7.1.1	Herstellung von Konstrukten mit V5-Epitop	95
3.7.1.2	Überexpression der V5-Konstrukte	96
3.7.2	Herstellung von Konstrukten mit EGFP-Epitop	96
3.7.3	Expression der EGFP-Konstrukte	96
4	DISKUSSION	99
4.1	Screening von Testis-RNA mittels degenerierter RT-PCR	99
4.2	<i>ABCA5</i> des Menschen und <i>Abca5</i> der Ratte	100
4.2.1	Zur Struktur des <i>ABCA5</i> -Gens des Menschen	100
4.2.2	Das <i>ABCA5</i> -Gen ist Bestandteil eines <i>ABCA</i> -Genclusters	101
4.2.3	Zur Struktur des <i>Abca5</i> -Gens der Ratte	102
4.2.4	Zur Struktur der Proteine hABCA5 und rAbca5	102
4.2.5	Zur Struktur der Splicevariantengene <i>ABCA5 V20+16</i> und <i>rAbca5 V+16</i>	104
4.2.6	Zur Struktur der putativen Proteine hABCA5 V20+16 und rAbca5 V+16	105
4.3	Gewebeverteilung von <i>hABCA5</i> und <i>rAbca5</i>	106
4.4	Zellspezifische Verteilung des <i>rAbca5</i>-Gens der Ratte	107
4.4.1	<i>rAbca5</i> -mRNA Expression im Testis	107
4.4.2	<i>rAbca5</i> -mRNA Expression in der Epididymis	107

4.6	Einfluß der Kulturbedingungen auf die <i>rAbca5</i>-mRNA-Expression in Kulturen primärer Hepatozyten der Ratte	108
4.7	Einfluß von LXR-Liganden auf die <i>rAbca5</i>-mRNA-Expression in Kulturen primärer Hepatozyten der Ratte	109
4.7.1	Induktion der <i>rAbca5</i> -mRNA-Expression mit 22- <i>R</i> -Hydroxycholesterol	109
4.7.2	Induktion der <i>rAbca5</i> -mRNA mit 22- <i>R</i> -Hydroxycholesterol und 9- <i>cis</i> -Retinsäure	109
4.7.3	Induktion der <i>rAbca5</i> -mRNA mit <i>Acetyl-podocarpic Dimer (APD)</i>	110
4.8	Subzelluläre Lokalisation von <i>rAbca5</i> und <i>rAbca5 V+16</i> in Zelllinien	110
4.9	Weiterführende Arbeiten	111
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	112
6	LITERATURVERZEICHNIS	114
	DANKSAGUNGEN	128
	LEBENS LAUF	129

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
d-	Desoxy-
dd-	Didesoxy
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dest.	Destiliert
DIG	Digoxygenin-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alteri</i>
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescin
FKS	Fetales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidiniumthiocyanat
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
I.E.	Internationale Einheit
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid

kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani Medium
LSB	Lämmli Sample Buffer
M	Molarität
MD	Membrandomäne
MGB	<i>minor groove binder</i>
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Membransegment
NBR	Nukleotidbindungsregion
NBT	Nitrotetrazoliumblau
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS	Phosphatpuffer mit Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	pH-Wert
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RE	Restriktionsendonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>standard saline citrate buffer</i> (Standard Natrium Citrat Puffer)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Saccharose-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen

w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

Code der Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Code der Aminosäuren

A (Ala)	Alanin	M (Met)	Methionin
C (Cys)	Cystein	N (Asp)	Asparagin
D (Asp)	Asparaginsäure	P (Pro)	Prolin
E (Glu)	Glutaminsäure	Q (Glu)	Glutamin
F (Phe)	Phenylalanin	R (Arg)	Arginin
G (Gly)	Glycin	S (Ser)	Serin
H (His)	Histidin	T (Thr)	Threonin
I (Ile)	Isoleucin	V (Val)	Valin
K (Lys)	Lysin	W (Trp)	Tryptophan
L (Leu)	Leucin	Y (Tyr)	Tyrosin

1 Einleitung

Der Transport von Molekülen durch Membranen stellt eine essentielle Funktion aller lebenden Organismen dar. Im Lauf der Evolution entstand eine Vielzahl von spezifischen Transportproteinen, die sich nach ihrer Abhängigkeit von einem Energielieferanten in aktive und passive Transporter klassifizieren lassen. Letztere ermöglichen eine erleichterte Diffusion von Substraten (z.B. Ionen) durch membranständige Poren (Kanäle) als Reaktion auf einen chemischen, elektrophysiologischen oder mechanischen Stimulus entlang eines Konzentrationsgradienten. Aktive Transportproteine hingegen vermitteln eine energieabhängige Substratbewegung entgegen einem Konzentrationsgradienten.

Membranpumpen wie die ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportproteinen und koppeln die freiwerdende Energie aus der exergonisch verlaufenden ATP-Hydrolyse (-30.5 kJ/mol) mit der endergonischen Translokation diverser Substrate durch Membranen.

1.1 Die Superfamilie der ABC-Proteine

Die Superfamilie der *ATP-binding-cassette* (ABC)-Proteine ist eine der größten Proteinfamilien mit Vertretern in allen bekannten Organismen von Bakterien bis zu Säugetieren und besteht überwiegend aus Membranproteinen, die als aktive Transporter (s.o.) eine Vielzahl chemisch diverser Substrate, darunter Kohlenhydrate, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Steroide, Metallionen und ein breites Spektrum hydrophober Verbindungen bzw. ihrer Metabolite durch zelluläre Membranen transportieren. Einige ABC-Proteine fungieren als Ionenkanäle (CFTR bzw. ABCC7), ATP-sensitive Kanalmodulatoren (SUR1/2) oder als RNase L Inhibitor ohne Transportaktivität (OABP bzw. ABCE1). Mutationen in ABC-Genen sind an der Ausbildung verschiedener genetisch bedingter Dysfunktionen beteiligt, darunter Mukoviszidose (CFTR), Degenerationen der Retina (ABCA4), Defekte des Transports von Cholesterol, Gallensäuren und pflanzlichen Sterolen (ABCA1, ABCB4, ABCB11, ABCG5 und ABCG8), neuronale Störungen (ABCD1 und ABCD2), anämische Zustände (ABCB7) und veränderte Medikamenten-Suszeptibilität (ABCB1 bzw. Pgp und ABCC1, ABCC2, ABCC4 und ABCC5 bzw. MRP1/2/4/5).

Die Charakterisierung eukaryotischer Genome führte zur vollständigen Identifizierung aller ABC-Gene in den Genomen der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* (31), der Fruchtfliege *Drosophila* (56) und des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (56). Aktuell sind 49 humane ABC-Proteine bekannt, die auf Basis der Homologie ihrer Aminosäuresequenz und der Organisation der Proteindomänen in 7 Subfamilien (A–G) unterteilt sind.

1.2 Struktur und Topologie der ABC-Proteine

ABC-Transporter sind aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut, den hydrophoben Membrandomänen (MD) und den hydrophilen Nukleotidbindungsregionen (NBR), den ATP-Bindungskassetten (WALKER et al. 1982, HIGGINS et al. 1986). Diese 100–150 Aminosäuren lange zytoplasmatische Proteinregion enthält mehrere Sequenzmotive, die in allen ABC-Genen konserviert sind. Die sogenannten Walker A und Walker B Motive sind jeweils 6–8 Aminosäuren lang und durch 90–120 Aminosäuren voneinander getrennt. Die Signatursequenz LSGGQ (auch C-Motiv genannt) befindet sich ca. 25 Aminosäuren strangaufwärts der Walker B Sequenz und ist in der ersten NBR der ABC-Gene ebenfalls stark konserviert (HYDE et al. 1990). Während die ATP-Bindungskassetten mittels ATP-Hydrolyse die Funktion eines Transportmotors übernehmen, stellen die Membrandomänen das Transportvehikel dar. Die Sequenzen der Membrandomänen besitzen einen geringeren Konservierungsgrad als die ATP-Bindungskassetten und damit die Voraussetzung für eine individuelle Substratbindung. Eine Membrandomäne besteht aus 6–11 hydrophoben Segmenten, die durch Ausbildung α -helikaler Strukturen die Membran durchspannen.

Ein funktionell aktives ABC-Protein benötigt 2 Nukleotidbindungsregionen und 2 Membrandomänen, die in verschiedenen Anordnungen vorkommen können (DASSA et al. 2001). Eukaryotische ABC-Gene werden als Volltransporter mit je 2 NBR- und 2 MD-Einheiten in einem Polypeptidmolekül (MD–NBR–MD–NBR oder NBR–MD–NBR–MD) oder als Halbtransporter (MD–NBR oder NBR–MD) exprimiert, wobei letztere zur Erlangung ihrer Funktionalität Homo- oder Heterodimere bilden müssen. In bakteriellen Transportern wird dieses Ziel z.B. durch Vereinigung von vier separat exprimierten essentiellen Proteindomänen erreicht.

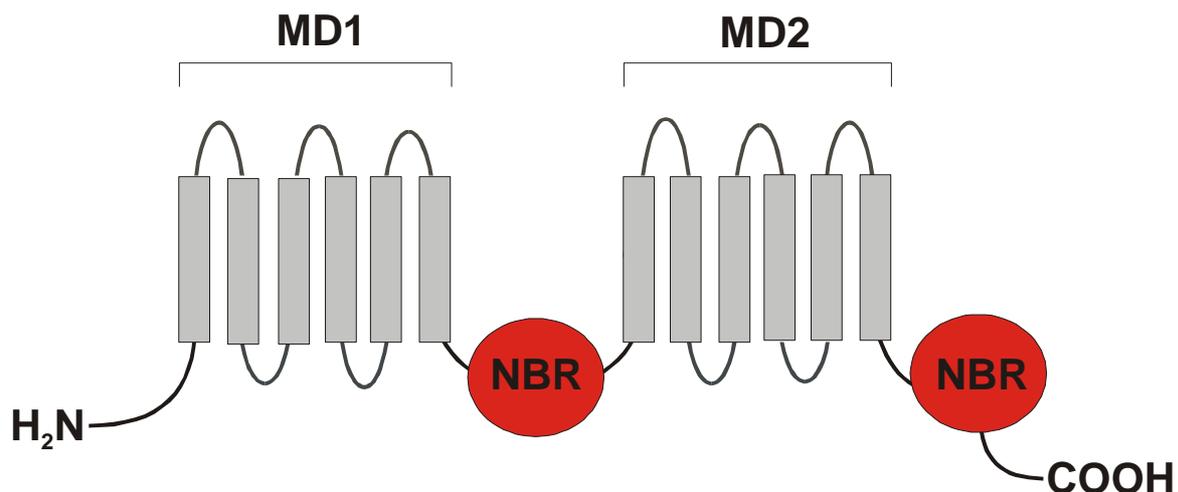


Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines typischen ABC-Volltransporters. Die putative, zweidimensionale Topologie verdeutlicht den Aufbau des Proteins aus je zwei in der Membran verankerten Membrandomänen (MD) und zwei intrazellulär lokalisierten, hydrophilen Nukleotidbindungsregionen.

Die zumeist unidirektionalen ABC-Transporter erfüllen je nach Organismus spezialisierte Aufgaben. In Bakterien vermitteln sie sowohl den Import lebenswichtiger Verbindungen, die die Membran nicht mittels Diffusion überwinden können (Kohlenhydrate, Vitamine, Metallionen) als auch den Efflux diverser Substrate (z.B. Antibiotika). In Eukaryoten sind ABC-Transporter nach bisherigem Erkenntnisstand ausschließlich am Efflux von meist hydrophoben Molekülen aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum oder in intrazelluläre Kompartimente (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Peroxisomen) beteiligt.

1.3 Humane ABC-Proteine – Die 7 Subfamilien

Neben den bisher charakterisierten 49 humanen ABC-Genen wurden mindestens 19 ABC-Pseudogene und weitere mögliche ABC-Genfragmente im menschlichen Genom identifiziert (DEAN 2002). Vergleicht man die humane ABC-Gensuperfamilie mit den ABC-Genen anderer Eukaryoten (z.B. *Drosophila*), so scheint es in der Evolution aufgrund von Selektionsinflüssen unterschiedliche Auffächerungen von ABC-Genen und damit ein weiteres Indiz für das hohe Spezialisierungsniveau der ABC-Transporter zu geben.

Im folgenden werden die einzelnen ABC-Subfamilien in umgekehrter Reihenfolge (ABCG–ABCA) vorgestellt.

1.3.1 Die ABCG-Subfamilie (*White Subfamilie*)

Die ABCG-Subfamilie besteht aus fünf Halbtransportern und einem weiteren, bisher nur in der Maus identifizierten Vertreter, *Abcg3*. Alle ABCG-Gene weisen eine reverse Domänenstruktur der Form NBR-MD auf. Das humane *ABCG1* zeigt eine dominante Expression in Makrophagen und ist über einen *nuclear receptor protein* regulierten ($LXR\alpha$) Mechanismus am Cholesterol-Efflux beteiligt (VENKATESWARAN et al. 2000). Ein kürzlich identifiziertes zweites *ABCG1*-Transkript zeigt eine ähnliche Regulierbarkeit und könnte als Dimerpartner in Frage kommen (KENNEDY et al. 2001). Ebenfalls über $LXR\alpha$ reguliert sind die in Leber, Dünn- und Dickdarm exprimierte Halbtransporter *ABCG5* und *ABCG8* an der Kontrolle der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen aufgenommenen pflanzlichen Sterolen bzw. Cholesterol beteiligt. Defekte in den beiden benachbarten Genloki auf Chromosom 2p21 verursachen eine Störung der intestinalen Aufnahme pflanzlicher Sterole (Sitosterolämie), die meistens mit einer Hypercholesterinämie einhergeht. Eine dauerhafte erhöhte Aufnahme und Akkumulation pflanzlicher Sterole und Cholesterol führen zu sklerotischen Lipidablagerungen und infolge dessen zu einem erheblichen Risiko, an Durchblutungsstörungen, insbesondere der Koronargefäße zu erkranken (LEE et al. 2001). Zum Substratspektrum des vermehrt in Plazenta, Brustgewebe und daraus entstandenen Tumoren exprimierte *ABCG2*-Proteins gehören diverse zytostatisch wirksame Medikamente wie Mitoxantron und diverse Anthracycline, die eine Beteiligung von *ABCG2* an der

Ausprägung einer *multidrug resistance* nahelegen (DOYLE et al. 1998). Neuere ABCG2-Transportsubstrate umfassen Sulfatkonjugate von Steroiden und Chlorophyll-Metaboliten (JONKER et al. 2002, SUZUKI et al. 2003). Für *ABCG4* ist bisher keine Funktion bekannt.

1.3.2 Subfamilien E (OABP) und F (GCN20)

Die ABC-Proteine dieser Subfamilien besitzen aufgrund fehlender Membrandomäne keine eigene Transportaktivität, sondern fungieren als Regulationsenzyme bei der Proteinsynthese. ABCF1 (GCN50) interagiert mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 2 (eIF2) am Ribosom (TYZACK et al. 2000). ABCE1 hat eine inhibierende Wirkung innerhalb des 2-5A/RNase-L-Signalwegs und beeinflusst die antiviralen bzw. antiproliferativen Effekte der zellulären Interferonantwort. (BISBAL et al. 1995).

1.3.3 Subfamilie D (ALD)

Diese Subfamilie ist nach einer erblichen X-chromosomalen neurodegenerativen Störung, der Adrenoleukodystrophie, benannt, die aufgrund behinderter peroxisomaler β -Oxidation zur Ablagerung langkettiger gesättigter Fettsäuren in der weißen Gehirnschicht, aber auch in anderen Geweben führen kann. Assoziiert mit diesem peroxisomalen Defekt ist das ALD-Protein (ABCD1), ein an der zytosolischen Peroxisomenmembran lokalisierter Halbtransporter, der vermutlich in den Import oder Katabolismus langkettiger Fettsäuren eingreift (DODD et al. 1997). Auch ABCD2–4 sind in den Peroxisomen lokalisiert und werden mit verwandten peroxisomalen Störungen in Verbindung gebracht. Mittels *two-hybrid*-Untersuchungen konnten Interaktionen zwischen drei peroxisomalen ABCD-Proteinen (ABCD1–3 bzw. ALDP, ALDR, PMP70) untereinander und mit einem an der Peroxisomenbiosynthese beteiligten Protein PEX19p beobachtet werden, so daß eine Homo- und Heterodimerbildung zwischen den verschiedenen ABCD-Proteinen möglich erscheint (LIU et al. 1999, GLÖCKNER et al. 2000).

1.3.4 Subfamilie C (CFTR/MRP)

Die ABCC-Subfamilie besteht aus 12 Volltransportergenen und einem mit 325 Aminosäuren ungewöhnlich kurzen Gen *ABCC13* (YABUUCHI et al. 2002). Sie fungieren als Vermittler im Transport diverser Anionsubstrate, als Ionenkanalmodulatoren und sind an der Sekretion verschiedener, im Rahmen der Biotransformation gebildeten, Xenobiotika-Konjugate beteiligt.

Das bekannteste Protein dieser Subfamilie CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, ABCC7) leitet seinen Namen von der mit ihm assoziierten genetischen Störung, der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose), ab, die in ihren vielen Ausprägungen gestörter exokriner Funktionen in verschiedenen Organen (u.a. Pankreas, Bronchien,

Schweißdrüsen, Darm) zu den häufigsten Erbkrankheiten zählt (QUINTON 1999). Das voll funktionstüchtige CFTR weist eine charakteristische MD–NBR–R–MD–NBR Topologie auf und bildet in zahlreichen Geweben einen cAMP-aktivierten Chloridionenkanal. Konservierte Serin-Substituenten in der regulatorischen R-Domäne wurden bereits 1992 von PICCIOTTO et al. als kritische Phosphorylierungsstellen postuliert. Seitdem wurde vielfach gezeigt, daß die selektive Phosphorylierung der R-Domäne durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) die Voraussetzung für die Öffnung der Kanalporen schafft (XIE et al. 2002).

ABCC8 (SUR1) und ABCC9 (SUR2) sind Sulfonylharnstoffrezeptoren an ATP-abhängigen Kaliumionenkanälen im Pankreas (SUR1, INAGAKI 1995), in Herz und Skelettmuskel (SUR2 Isoformen A und B, INAGAKI 1996) und regulieren über die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle die Insulinsekretion.

Von den verbleibenden ABCC-Proteinen wird vor allem ABCC1, und in einem geringeren Maß auch ABCC2 und 3 mit dem klinischen Phänomen der *multidrug resistance* assoziiert, das auf der intrinsischen oder erworbenen Fähigkeit der Zelle beruht, durch ATP-abhängigen Efflux hydrophober Zytostatika und ihrer Konjugate (Glutathione, Glukuronide, Sulfate) einer Anreicherung wirksamer Medikamentenkonzentrationen entgegenzuwirken. ABCC2 (MRP2) komplementiert den auch durch ABCB4 (MDR3) und ABCB11 (BSEP) vermittelten Transport organischer Anionkonjugate (z.B. Bilirubindiglukuronid) durch die kanalikuläre Hepatozytenmembran in den biliären Kreislauf. Ein genetisch bedingter Ausfall von MRP2 wird mit dem Dubin-Johnson-Syndrom in Verbindung gebracht, das sich durch das Auftreten einer konjugierten Hyperbilirubinämie mit pigmentösen Ablagerungen in Hepatozyten auszeichnet. Möglicherweise kann diese Störung durch eine überlappende Substratspezifität alternativer MRP-Transporter in der Leber (MRP1 oder MRP3) kompensiert werden.

Die Peptide für ABCC4, ABCC5, ABCC11 und ABCC12 bestehen aus maximal 1437 Aminosäuren und sind damit etwas kleiner als die übrigen Proteine der Subgruppe (bis 1581 Aminosäuren für SUR1). Ihnen fehlt das strukturelle Merkmal der zusätzlichen N-terminalen Membrandomäne (MD0), für die bisher keine relevante Funktion beschrieben wurde. Die in diversen Geweben exprimierten Anionentransporter ABCC4 und 5 vermitteln den Efflux zyklischer Nukleotide und Nucleoside sowie auf diesen Strukturen basierender antiviraler Medikamente und können damit zur Resistenzentwicklung der exprimierenden Gewebe beitragen (SCHUETZ et al. 1999, WIJNHOLDS et al. 2000). Für ABCC11 und 12 wurden eine Vielzahl alternativer mRNA-Transkripte detektiert, deren Relevanz für die physiologische Funktion der beiden Proteine noch nicht geklärt ist (YABUUCHI et al. 2001). Die Überexpression von ABCC11 in einer humanen, gegen Nucleosid-Analoga resistenten T-Zell Leukämiezelllinie deutet auf eine mit ABCC4 und 5 überlappende Substratspezifität hin (TURRIZIANI et al. 2002).

1.3.5 Subfamilie B (MDR/TAP)

Diese Subfamilie enthält als einzige in Säugetieren sowohl Halbtransporter- (ABCB2 und 3, 6–10) als auch Volltransportergene (ABCB1, ABCB4, ABCB5 und ABCB11), darunter auch den ersten charakterisierten humanen ABC-Transporter MDR1 (ABCB1, CHEN et al. 1986). Am Beispiel dieses multisubstratspezifischen ABC-Proteins wurde die Grundlage einer durch Xenobiotikaefflux vermittelten *multidrug resistance* aufgeklärt und die Bedeutung dieses Phänomens als universelle Überlebensstrategie von Zellsystemen erkannt. MDR1 wird basal in gesunden exkretorischen Geweben der Leber, des Dünndarms, der Niere, an der Blut-Hirnschranke sowie in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und vermittelt vermutlich die Elimination potentiell toxischer Fremdstoffe bzw. endogener Verbindungen aus dem Zytoplasma. So wurde z.B. berichtet, daß funktionsrelevante Mutationen des *MDR1*-Gens zur Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für bestimmte MDR1-Substrate führen können (SCHINKEL et al. 1994, 1997, MEALEY et al. 2001). Diese Studien zeigen jedoch auch, daß ein *MDR1*-Defekt außer einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer Reihe von Xenobiotika keinen störenden Einfluß auf eine normale Entwicklung hat.

Im Gegensatz dazu sind ABCB4 (MDR3) und ABCB11 (BSEP, *bile salt export pump*) für die physiologische Leberfunktion unentbehrlich. Trotz einer hohen Sequenzhomologie im Vergleich zu MDR1 (75% bzw. 50%), gibt es keinen Hinweis auf eine *mdr*-Aktivität dieser beiden Proteine. ABCB4 und 11 vermitteln zusammen mit ABCC2 (→ 1.2.4) den Efflux von Phospholipiden bzw. Gallensalzen durch die kanalikuläre Hepatozytenmembran. Mutationen in den Genen dieser Transporter resultieren in der Entwicklung zweier Formen der Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestase (PFIC3 und PFIC2), einer Erbkrankheit, die zu zirrhotischen Leberveränderungen führen kann (SMIT et al. 1993, STRAUTNIEKS et al. 1998). ABCB2 und ABCB3 (TAP1 und TAP2) konstituieren ein Heterodimer an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Sie transportieren degradierte Peptide ins ER-Lumen zur Präsentation durch Glykoproteine des *major histocompatibility complex* (MHC) an der Zelloberfläche (SPIES et al. 1990) und sind damit inhärenter Bestandteil der zellulären Immunantwort. Genetisch bedingte Mutationen auf den Genloki von *TAP1* und *TAP2* können Immundefizienzen zur Folge haben (DE LA SALLE et al. 1999, 1994).

Das am nächsten den TAP-Proteinen verwandte Gen ist *ABCB9*, ein in den Lysosomen lokalisiertes Protein, dessen Funktion ebenso wie die von ABCB8 und ABCB10 bisher nicht aufgeklärt wurde. Die verbleibenden vier ABCB-Halbtransporter (ABCB6, 7, 8 und 10) sind in den Mitochondrien lokalisiert und an der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase bzw. am Transport von Eisen/Schwefel-Proteinvorstufen ins Zytosol beteiligt. ABCB6 (UMAT, *ubiquitously expressed mammalian transporter*) und ABCB7 werden als funktionelle Entsprechungen des *Atm1p*-Transporters in *S. cerevisiae* diskutiert (MITSUHASHI et al. 2000). Bei Mutationen auf dem Genlokus für *ABCB7* kommt es zur Ausbildung cerebraler Ataxien und anämischer Störungen, die mit Eisenablagerungen in den Mitochondrien der Erythroblasten einhergehen (ALLIKMETS et al. 1999, BEKRI et al. 2000).

1.4 Charakterisierung der ABCA-Subfamilie

Die ausschließlich aus Volltransportergenen bestehende ABCA-Subfamilie des Menschen wurde auf Basis der Intron-Exon-Organisation und einer phylogenetischen Analyse in zwei ABCA-Subgruppen unterteilt (BROCCARDO et al. 1999). Die erste Subgruppe umfaßte zu Beginn dieses Projekts vier, für vollständige Leserahmen kodierende cDNA-Sequenzen (*ABCA1*, *ABCA3*, *ABCA4*, und *ABCA7*) und Genfragmente drei weiterer ABCA-Vertreter (*ABCA2*, *ABCA11* und *ABCA13*), von denen sich *ABCA11* als Pseudogen herausstellte. Die zweite ABCA-Subgruppe enthielt zu diesem Zeitpunkt eine nahezu vollständige cDNA-Sequenz für ein Gen auf Chromosom 17 (*KIAA0822*, später *ABCA8*, NAGASE et al. 1998). Der Fortschritt des Humangenomprojekts erlaubte außerdem auf Basis von Homologierecherchen mit den bekannten ABCA-Vertretern die Vorhersage weiterer vier Gene auf Chromosom 17, die im weiteren Verlauf zusammen mit *ABCA8* als Bestandteile eines neuen ABCA-Genclusters identifiziert wurden (DEAN et al. 2001, ARNOULD et al. 2001, ANNILO et al. 2003). Die ABCA-Subfamilie ist die einzige ohne strukturelle Entsprechung in den Genomen von *Drosophila* und *S. cerevisiae* und konnte bisher nur in multizellulären Organismen gefunden werden. Evolutionsgenetische Untersuchungen lassen den Ursprung der ABCA-Gene in Halbtransportern vermuten, die nach der Trennung der Entwicklungsstränge von Wirbeltieren, Insekten und Würmern durch Duplikation zu Volltransportergenen wurden (ANJARD et al. 2002).

1.4.1 Stand der aktuellen ABCA-Forschung

Zum aktuellen Zeitpunkt enthält die ABCA-Subfamilie 12 vollständig charakterisierte Gene. Für einige Vertreter wird eine Rolle in der Lipidhomöostase verschiedener Zellsysteme diskutiert, die bisher aber nur für *ABCA1* nachgewiesen werden konnte (ORAM et al. 2001).

1.4.1.1 ABCA1

Das bereits 1994 von LUCIANI et al. identifizierte *ABCA1*-Gen weist eine ubiquitäre Expression in der Zytoplasmamembran humaner Zellen auf und ist ein kritischer Faktor der komplexen Lipidexportmaschine der Zelle, ohne selbst ein direkter Cholesterintransporter zu sein. Bindungsstudien in *ABCA1*-überexprimierenden Zellen konnten zeigen, daß *ABCA1* an freies Apolipoprotein A-I (apo-AI als Kernprotein des Cholesterin-transportierenden *high-density-lipoprotein* [HDL] Partikels) bindet und als direkte Folge ein gesteigerter zellulärer Phospholipidefflux (Phosphatidylcholin und -serin) und Cholesterinexport zu beobachten sind (WANG et al. 2000). Daher wird eine Flippase-Funktion für *ABCA1* postuliert, die durch den Transport von Phospholipiden vom inneren zum äußeren Membranblatt und damit zum auf der Zelloberfläche gebundenen lipiddefizienten Apo-AI-Partikel dessen anschließende Beladung mit Cholesterin vermittelt (DEAN et al. 2001). Desweiteren wird eine Rolle von *ABCA1* bei der Makrophagen-gestützten Vernichtung von apoptotischem Zellmaterial diskutiert (HAMON et al. 2000, 2002).

Die Charakterisierung endogener Oxysterole als Liganden der *nuclear- hormone*-Rezeptoren (LXR, FXR, RXR) eröffnete neue Einblicke in die Regulation des Lipidstoffwechsels. Diese Rezeptoren binden zur Regulation des Zielgens als Heterodimere (LXR/RXR bzw. FXR/RXR) an charakteristische DNA-Sequenzen (*response elements*) im Promotor und aktivieren über diesen Mechanismus auch ABCA1 (REPA et al. 2000, VENKATESWARAN et al. 2000). Die Entdeckung zahlreicher Bindungsstellen für Lipidmetabolismus-assoziierte Transkriptionsfaktoren in der *ABCA1*-Promotorregion bestätigte die Hypothese einer zentralen Rolle dieses ABCA-Proteins in der zellulären Lipidhomöostase und ermöglicht neue experimentelle Strategien zur Therapie von Lipidstoffwechselerkrankungen (PULLINGER et al. 2000, SANTAMARINA-FOJO et al. 2001).

Im Fall einer mutationsbedingten Inaktivierung des *ABCA1*-Gens treten die als Tangier-Krankheit oder familiäre HDL-Defizienz bekannten rezessiven Störungen der Lipidhomöostase auf. Bei den betroffenen Personen wird einerseits ein ungewöhnlich niedriger HDL-Plasmaspiegel, andererseits eine verstärkte Ablagerung von Cholesterinestern in Makrophagen und Gefäßen diagnostiziert (SCHMITZ et al. 2001). Kürzlich konnte am *Abca1*-defizienten Mausmodell auch eine Entwicklungsstörung in Sertoli- und Leydigzellen beobachtet werden, die vermutlich auf einen *Abca-1* bedingten Defekt des Lipidtransports im Testis zurückzuführen ist (SELVA et al. 2004).

1.4.1.2 ABCA4

Neue Analysemethoden wie die quantitative RT-PCR ermöglichen die Bestimmung der mRNA-Expression von Genen bis zu wenigen Kopien pro Zelle. Dennoch läßt sich die Spezialisierung von ABC-Proteinen auch an ihrer dominanten Expression in individuellen Geweben verdeutlichen. Der ABCA4-Transporter wird ausschließlich in den Membranen der äußeren Stäbchensegmente der Netzhaut (Retina) exprimiert und fungiert analog zu ABCA1 vermutlich als Flippase für einen protonierten Schiff-Basen-Komplex aus *all-trans*-Retinylaldehyd und Phosphatidylethanolamin (N-Retinyli-den-Phosphoethanolamin) im Rahmen des Transports von Vitamin A- und Phospholipid-Derivaten ins Zytoplasma der Photorezeptorzellen (AZARIAN et al. 1997, WENG et al. 1999). Mutationen des *ABCA4*-Gens resultieren in diversen Augenfunktionsstörungen, die entweder bereits in früher Kindheit (Retinitis pigmentosa, Stargardt Krankheit) oder aber als Ergebnis von Umweltfaktoren und einer *ABCA4*-assoziierten genetischen Prädisposition im späteren Lebensalter auftreten können (AMD, *age-related macular degeneration*, ALLIKMETS et al. 1997). Der genaue Mechanismus dieser retinalen Degenerationserscheinungen ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, wird aber mit einer im *Abca4*-defizienten Mausmodell detektierten abnormalen Akkumulation von Retinoiden im hinteren Pigmentepithel der Netzhaut in Verbindung gebracht (MATA et al. 2001).

1.4.1.3 Weitere ABCA-Transporter

Auf Basis der bekannten Daten zur subzellulären Lokalisation von ABC-Transportern wurde lange postuliert, daß Volltransporter in der Plasmamembran verankert sind, Halbtransporter dagegen an intrazellulären Organellmembranen wirken. Für das funktionell aktive Heterodimer ABCG5/ABCG8 konnte jedoch eine Lokalisation in der apikalen Membran an der Zelloberfläche gezeigt werden (GRAF et al. 2003).

Das erste Beispiel eines intrazellulären Volltransporters ist das zweitgrößte ABC-Protein ABCA2 (2436 Aminosäuren), das in lysosomalen und endosomalen Vesikeln neuraler Zellen des Gehirns, des Zentralnervensystems und des Rückenmarks (VULEVIC ET AL. 2001) lokalisiert ist. Aufgrund der Präsenz einer Signatursequenz für Lipocalin in einer regulatorischen Region im Zentrum von ABCA2 wird eine Funktion des Proteins im Lipid- oder Steroidtransport vermutet. Lipocaline bilden eine Proteinfamilie, die am Transport diverser Retinoide, Steroide, Cholesterin und anderer Lipide beteiligt sind (FLOWER 1996). Bis zur Charakterisierung endogener ABCA2-Substrate bleibt die genaue Rolle dieses Transporters jedoch unklar.

Auch ABCA3 scheint ein intrazellulär in der Lunge wirksames Protein zu sein. Lokalisiert in Vesikelmembranen alveolarer Typ II Zellen, könnte es am Aufbau der tensidhaltigen Lamellarkörperchen mitwirken. Nach Exozytose der Lamellarkörperchen in den Alveolarraum sorgt ihr Inhalt aus oberflächenaktiven Verbindungen (Phospholipide und Proteine) durch Herabsetzung der Oberflächenspannung für die Aufrechterhaltung des Gas-Flüssigkeitsgleichgewichts in der Lunge (YAMANO et al. 2001) und verhindert das Kollabieren des Organs. Diese Hypothese wird durch neue Erkenntnisse über bei Neugeborenen auftretende pulmonale Tensiddefizienzen gestützt, die sich in der Bildung anormaler Lamellarkörperchen äußern und meist mit Mutationen des *ABCA3*-Gens einhergehen (SHULENIN et al. 2004).

Aufgrund der Verwandtschaft zu *ABCA1* werden alle *ABCA*-Gene in Bezug auf ihre Relevanz in der zellulären Lipidhomöostase untersucht. Für das vor allem in den myelolymphatischen Geweben des Immunsystems exprimierte *ABCA7* wurde kürzlich eine *ABCA1*-komplementierende oder kompensierende Rolle im apo-A1-gekoppelten Cholesterintransport vorgeschlagen (ABE-DOHMAE et al. 2004).

Für den Locus des *ABCA12*-Gens auf Chromosom 2q35 wurden kürzlich mehrere Mutationen assoziiert, die eine schwere Verhornungsstörung der Epidermis (Lamelläre Ichtyose Typ 2) hervorrufen (ANNILO et al. 2002, LEFÈVRE et al. 2003). Dies könnte in Analogie zu den diskutierten Beispielen einen weiteren Hinweis für die Relevanz von ABCA-Transportern in der Aufrechterhaltung des Lipidmetabolismus diverser Zellsysteme (hier Keratinozyten) darstellen.

Das verbleibende Mitglied der ersten ABCA-Subgruppe ist zugleich das größte bekannte ABC-Protein. Das *ABCA13*-Gen erstreckt sich auf Chromosom 7p11–q11 über 450 kb und kodiert für ein Polypeptid der Länge 5058 Aminosäuren. Trotz seiner immensen Länge besitzt dieses Protein die typische ABCA-Topologie eines vorwärts gerichteten Volltransporters. Es besitzt das zusätzliche N-terminale Membransegment, gefolgt von einer hydrophilen Schleife (PRADES et al. 2002), die hier 3500 Aminosäuren beinhaltet (*ABCA1*: 596 Aminosäuren) und ein zentrales hydrophobes Segment HH1 (*highly hydrophobic*), dem eine Bedeutung in der Regulation der Transporter zugeschrieben wird. *ABCA13* zeigt auf Ebene der Aminosäuresequenz die größte Sequenzähnlichkeit zu *ABCA1* (31%) und *ABCA4* (30%). Kürzlich wurde ein murines *Abca13*-Gen identifiziert, das mit 2143 Aminosäuren eine zu anderen *ABCA*-Genen vergleichbare Länge aufweist (BARROS 2003).

1.4.1.4 Der *ABCA*-Gencluster auf Chromosom 17

Die fünf Vertreter dieses Clusters (*ABCA5*, *ABCA6*, *ABCA8*, *ABCA9* und *ABCA10*) bilden die zweite ABCA-Subgruppe und führen mit ca. 1600 Aminosäuren zu wesentlich kürzeren Polypeptiden als die übrigen ABCA-Proteine. Sie besitzen einen kürzeren N-Terminus mit einer kleineren hydrophilen Schleife und ein möglicherweise degeneriertes hydrophobes Segment im Anschluß an die erste ATP-Bindungskassette. Das Signaturmotiv der zweiten ATP-Bindungskassette ist in allen fünf Vertretern degeneriert. In *ABCA8* fehlt zusätzlich in der ersten ATP-Bindungskassette ein Bereich der Länge 36 Aminosäuren zwischen dem Walker A und dem Walker B Motiv, der die Signatursequenz beinhaltet. Die Sequenzhomologie zwischen einzelnen Vertretern beträgt bis zu 71% (*ABCA8* und *ABCA9*) und deutet auf Duplikationsereignisse während der Entstehung dieses Clusters hin (ANJARD et al. 2002). Die Expressionsmuster dieser Gene variieren zwischen den einzelnen Vertretern. Für *ABCA6*, *ABCA9* und *ABCA10* wurde während der Differenzierung von Makrophagen eine Cholesterin-Responsivität beobachtet, die bisher jedoch nicht mit speziellen Funktionen in Verbindung gebracht werden konnte (KAMINSKI et al. 2001, PIEHLER et al. 2002, WENZEL et al. 2003). Transportversuche mit *ABCA8* in *Xenopus laevis* Oozyten ergaben ein Substratspektrum ähnlich dem des *ABCC2*-Transporters (u.a. Estradiol- β -glukuronid, Taurocholat, Leukotrien C4 und Ochratoxin-A) und lassen eine Vielfalt physiologischer Substrate für die neuen ABCA-Transporter vermuten (TSURUOKA et al. 2002).

Das interessanteste Gen des Genclusters ist *ABCA5*. Es weist eine vergleichbare geringe Homologie (40–42%) zu den übrigen *ABCA*-Clustergen auf und wurde in genomischen Studien anderer Organismen (Maus, japanischer Kugelfisch, Anophelesmücke) als evolutionär ältestes Gen dieser Subgruppe bestätigt (ANNILO et al 2003, THE ANOPHELES GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, Genbank XM_311531). Auch die vergleichbar geringe Ähnlichkeit zu *ABCA1* und *ABCA4* (23% bzw. 24%) legt eine von anderen ABCA-Vertretern abweichende Funktion für *ABCA5* nahe.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen eines Genscreenings nach bisher unbekanntem *ABC*-Genen in humanem Testisgewebe wurde ein Fragment eines neuen *ABCA*-Gens identifiziert, das später als das *ABCA5*-Gen des neuen *ABCA*-Clusters auf Chromosom 17 identifiziert wurde.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten die Existenz eines funktionell aktiven, neuen *ABCA*-Gens bestätigen und eine umfassende Charakterisierung dieses Gens zum Ziel haben. Dazu gehörte die Erschließung der gesamten kodierenden Sequenz und angrenzender untranslatierter Bereiche, Analysen der mRNA-Expression in verschiedenen Zellsystemen unter dem Einfluß geeigneter Effektoren, und, wenn möglich, Studien zur zellspezifischen mRNA-Expression. Außerdem sollte das resultierende *ABCA5*-Protein biochemisch hinsichtlich seiner subzellulären Verteilung untersucht werden. Der bekannt hohe Konservierungsgrad zwischen homologen *ABC*-Genen verschiedener Säugetierarten, insbesondere zwischen Mensch und Ratte, legte die Existenz eines orthologen *Abca5*-Gens der Ratte nahe. Es sollte versucht werden, diese Hypothese zu bestätigen und parallel zu den Arbeiten am humanen *ABCA5*-Gen eine Charakterisierung des entsprechenden Gens der Ratte vorzunehmen. Insgesamt ergaben sich daraus folgende Aufgabenstellungen:

1. Auswahl eines geeigneten Zellsystems zur experimentellen Erschließung der vollständig kodierenden cDNA des neuen *ABCA*-Gens.
2. Erfassung des vollständigen *ABCA*-Gens mittels einer 5'/3'-RACE-PCR Strategie mit nachfolgender Klonierung der Genfragmente und Sequenzanalyse.
3. Untersuchungen zur Verteilung der mRNA-Expression in verschiedenen Geweben und Zellkulturmodellen.
4. Untersuchung des Einflusses möglicher Expressionsmodulatoren auf die mRNA-Expression in geeigneten Zellkulturmodellen.
5. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung des Transporters durch Klonierung der gesamten kodierenden cDNA-Sequenz in Expressionsvektoren zur Expression als Fusionsprotein in geeigneten Zellsystemen.
6. Parallele Charakterisierung eines putativen orthologen Rattentransporters *Abca5*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Enzyme

Alle im folgenden nicht gesondert aufgeführten Reagenzien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bzw. als für die Zellkultur und Molekularbiologie geeignet von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen.

Acrylamid 4K (29 : 1, 30% in H ₂ O)	Applichem, Darmstadt
Agar	Applichem
Agarose	Genaxis, Spechbach
Agarose LM	Genaxis
Ampicillin	Applichem
Aquamount	BDH/Promochem, Wesel
β-Agarase	MBI Fermentas
BSA, Fraktion V	Paesel und Lorei, Frankfurt
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Chloroform	Merck
Complete Protease Inhibitor	Roche
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dextransulfat	Sigma
DTT	Applichem
DNase I	MBI Fermentas
dNTPs	MBI Fermentas
Entwickler G153	Agfa-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
Ethidiumbromid	Serva
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin
Ficoll (MW 400 000)	Sigma
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck
Formaldehyd	Merck
Formamid	Merck
Fugene 6	Roche Diagnostics, Mannheim
Guanidiniumthiocyanat (97%)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Heparin (Liquemin N 25 000)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
IPTG	Applichem

Hefeextrakt	Applichem
Heringssperma-DNA	Roche
High Fidelity Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Hydrocortisonhemisuccinat	Sigma
Kanamycin	Applichem
Klenow Fragment (5 u/μl)	MBI Fermentas
Kollagenase CLS II (172 I.E./mg)	Biochrom
Lachssperma-DNA	Biomol, Plymouth Meeting (PA, CA, USA)
Expand Long Template System	Roche
β-Mercaptoethanol	Merck
Magermilchpulver Fremareform	DE-VAU-GE Gesundkostwerk Lüneburg
MEM Non-essential Amino Acid Solution	Sigma, M7145
Mikrospin-Säulen G-25, S-300	Amersham
MOPS	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylenendiamin	Serva
Penicillin/Streptomycin, A2213 10 000 E/ 10 000 μg/ml	Biochrom
Phenol	Roth, Karlsruhe
Poinceau S	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
[γ- ³² P]-dATP (Aktivität in 222 TBq/mmol)	PerkinElmer, Wellesley (MA, USA)
Proteinase K, S3004, S3020	DAKO, Hamburg
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas New England Biolabs, Beverly (MA, USA)
Rinderinsulin	Sigma
RNAse A	MBI Fermentas
RNAse Block	Stratagene, La Jolla (CA, USA)
RPMI 1640, R6504	Sigma
Schnellfixierer G354	Agfa-Gevaert
SDS	Sigma
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
T4-DNA-Ligase, 5 u/μl	MBI Fermentas
T3-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-Polynucleotid-Kinase	Roche Diagnostics
Thermoscript Reverse Transcriptase	Invitrogen
Trinatriumcitrat	Merck

Tris-Base	Merck
Trypsin/EDTA	Biochrom
Trypton	Applichem
Tween 20	Sigma
X-Gal	Applichem

2.1.2 Kits

BigDye Terminator Cycle	Applied Biosystems, Weiterstadt
DAKO ChemMate (DAB)	DAKO
DIG RNA-Labeling Kit	Roche
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Human 12-Lane MTN Blot	Clontech, Palo Alto (USA)
One-Step RT-PCR Kit	Invitrogen
pcDNA3.1/V5-His TOPO Cloning Kit	Invitrogen
pCR2.1 TOPO Cloning Kit	Invitrogen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
5'/3' RACE PCR Kit	Roche
Super Signal West Pico Kit	Pierce Biotechnology, Rockford (IL, USA)
TOPO-XL Cloning Kit	Invitrogen
TSA™ Biotin Kit	PerkinElmer
Human 18S-RNA-Kit	Applied Biosystems, #4319413E
Taqman Mastermix	Eurogentec, Liège (Belgien)
TOP 10 Electrocompetent cells	Invitrogen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Nicht gesondert aufgeführte Verbrauchsmaterialien, wurden von den Firmen Krannich und Schütt (Göttingen), Nunc (Kamstrup, Dänemark), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Braunülen	Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Peqlab, Erlangen
Eppendorf UVetten 50–1000 µl	Eppendorf
Falcon-Röhrchen 15 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Filterkartuschen Sartolab-P-plus (0.2 µm)	Sartorius
Filterpapier: fein (2043) und grob (2668)	Schleicher und Schüll

Halbmikro-Kunststoff-Küvetten 1.6 ml	Sarstedt
Hyperfilm-ECL	Amersham
Hyperfilm-MP	Amersham
Kanülen	Braun
Kryoröhrchen 1.8 ml	Nunc
Kulturschalen. 56.7 cm ² , 21.9 cm ² , 8.8 cm ²	Nunc
Kunststoffpipetten 1 ml, 2 ml, 10 ml	Greiner
Multiwell Platten, 6 Vertiefungen à 9.6 cm ²	Nunc
PCR tubes 0,2 ml	Abigene, Epsom (GB)
Polaroid-667-Filme	Sigma
PP-Röhrchen: 13 ml, 50 ml	Sarstedt
Spitzen Gel Saver II	Gerlinde Kisker, Mühlhausen
Sephadex Micro Spin Säulen G-25	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spritzenvorsatzfilter 0.2 µm und 0.45 µm	Schleicher und Schüll
Spritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml	Braun
Vakuumfilter 125 ml, 0.2 µm und 0.45 µm	Schleicher und Schüll

2.1.4 Geräte

2.1.4.1 Zellkultur

<i>Autoklav</i>	Verikal-Autoklav: FV	Technomara, Fernwald
<i>Inkubatoren</i>	Steri-Cult 3033 C200	Forma Scientific, Marietta (USA) Labotect, Göttingen
<i>Kühlzentrifuge</i>	5810R mit Ausschwingrotor	Eppendorf, Hamburg
<i>Mikroskop</i>	Inverstoskop: ID 02	Zeiss, Oberkochen
<i>Perfusionspumpe</i>	Masterflex 7013.21	Cole-Parmer (Chicago, USA)
<i>Sterilbank</i>	Biogard Hood B40-112 SterilGard III Advance	Baker, Sanford (MN, USA) Labotect, Göttingen
<i>Sterilfiltration</i>	Schlauchpumpe: PML 1305-ND100	KNF Flodos/ Sartorius
<i>Tischzentrifuge</i>	Rotanta/P	Hettich, Tuttlingen
<i>Zählkammer</i>	Fuchs-Rosenthal: Bright Line Tiefe: 0.2 mm, 0.0625 mm ²	Karl-Hecht-Assistent, Sonderheim/Röhn

2.1.4.2 Molekularbiologie

<i>Elektroporator</i>	Gene Pulser II	Bio-Rad
<i>Inkubator</i>	Trockeninkubator MIR-153	Sanyo/Krannich
<i>Schüttler</i>	Vibramax 100	Heidolph, Kehlheim
<i>Sequencer</i>	3100 Genetic Analyzer	ABI

<i>Software</i>	Staden Package Chromas ClustalW DNA Sequencing Analysis	
<i>Taqman</i>	7900 HT	ABI, Darmstadt
<i>Thermocycler</i>	Gradient Mastercycler Thermoblock UNO	Eppendorf Biometra, Göttingen
<i>Vakuummzentrifuge</i>	Concentrator 5301 mit Membranvakuumpumpe	Eppendorf Vaccubrand, Wertheim

2.1.4.3 DNA- und RNA-Analytik

<i>Elektrophorese</i>	Horizontale Gelkammer: H5 Horizon 11-14 Horizon 20-25	Gibco/BRL, Eggenstein Biometra Biometra
<i>Hybridisierung</i>	Glasröhrchen 15 x 3,5 cm Hybridisierungssofen Hybaid Hybridisierungssofen OV5	Biometra Biometra Biometra
<i>Kamera</i>	Polaroid DS-34 mit Abblendung und Orangefilter	Sigma
<i>Küvetten</i>	Quarz-Küvetten: 1 ml	Hellma, /Krannich
<i>Membran</i>	Nylon-Membran: Hybond-N; 0.45 µm	Amersham
<i>Netzteil</i>	Phero-Stab 330	Biotech-Fischer, Reiskirchen
<i>[³²P]-Nachweis:</i>	Bio-Imaging-Analyzer BAS1500 Imaging-Plates, 2040 (³² P-sensitiv), Fujix-Kassetten Auswertesoftware Bas-Reader2.9, TINA 2.0	Fujix, Tokio
<i>Photometer</i>	Biophotometer 6313	Eppendorf
<i>Schüttler</i>	GFL 1083 (Wasserbad)	Schütt
<i>Strahlendetektor</i>	Flächendetektor (β/γ) LB122	Berthold, Pforzheim
<i>UV-Durchlichttisch</i>	TI2	Biometra
<i>UV-Crosslinker</i>	Bio-Link	Biometra

2.1.4.4 Protein-Analytik

<i>Elektrophorese</i>	Horizon 11-14 Gel casting system Mighty Small SE245 DualGel Caster Mighty Small II Vertikal-Elektrophorese-Kammer	Hofer, San Francisco (USA)
<i>Homogenisation:</i>	Rührmotor RW12 Glas/Teflonhomogenisatoren	Janke & Kunkel, Staufen Braun

<i>Mikroskop</i>	Fluoreszenzmikroskop DM Irbe	Leica
<i>Membran</i>	PVDF-Membran Immobilon-P; 0.45 µm	Millipore, Eschborn
<i>Netzteil</i>	Standard Power Pack P25	Biometra
<i>Transfer:</i>	Semidry-Kammer mit Glas/Graphit- und Edelstahlelektrode	Phase, Lübeck
<i>Ultraschallbad:</i>	Sonorex RK 106	Bandelin, Berlin
<i>Zentrifugen:</i>	L8-M Ultrazentrifuge J2-21M/E Kühlzentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor Rotanta/P Tischzentrifuge Kühlzentrifuge 22R	Beckmann, München Eppendorf Hettich, Tuttlingen Hettich

2.1.5 Puffer und Lösungen

Reagenzien für Puffer und Lösungen wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem oder deionisiertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Zusammensetzung der erforderlichen Puffer wird im Zusammenhang mit der jeweils beschriebenen Methode erläutert.

2.1.6 Kulturmedien

2.1.6.1 Kulturmedien für kompetente *E.coli* Bakterien

	SOC-Medium	LB-Medium	LB-Agar-Platten
Trypton	2.0% (w/v)	1.0% (w/v)	1.0% (w/v)
Hefeextrakt	0.5% (w/v)	0.5% (w/v)	0.5% (w/v)
NaCl	0.06% (w/v)	1.0% (w/v)	1.0% (w/v)
KCl	2 mM	–	–
MgCl ₂	10 mM	–	–
MgSO ₄	10 mM	–	–
Glucose	20 mM	–	–
Agar		–	1.5% (w/v)
pH	7.0	7.0	7.0

Die Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Die erforderliche Glukosemenge wurde in autoklaviertem Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium zugesetzt. SOC-Medium wurde bei –20 °C aufbewahrt und vor

Gebrauch aufgetaut. LB-Medium wurde bei 4 °C für einige Wochen gelagert. LB-Agar-Medium wurde nach dem Autoklavieren auf ca. 55 °C gekühlt, mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Endkonzentrationen Ampicillin 0.1 mg/ml, Kanamycin 0.05 mg/ml) und nach Bedarf IPTG und X-Gal (Endkonzentrationen 80 mg/l X-Gal, 100 µM IPTG) versetzt und unter semi-sterilen Bedingungen in Kulturschalen (56.7 cm²) gegossen. Nach dem Aushärten der Agarplatten wurden diese für einige Wochen bei 4 °C gelagert.

Stammlösungen

50 mg/ml Ampicillin in H₂O

50 mg/ml Kanamycin in H₂O

100 mM IPTG in H₂O

40 mg/ml X-Gal in DMF

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei –20 °C gelagert.

2.1.6.2 Medien für die Zellkultur

2.1.6.2.1 Eukaryotische Zelllinien

Medien für die Kultur eukaryotischer Zelllinien (Caco-2, HepG2, HEK 293 und SER-W3) wurden als Pulver-Medien von Sigma bezogen und wie folgt mit autoklaviertem Wasser angesetzt:

<u>DMEM Grundmedium</u>	13.4 g/l DMEM-Pulver (Sigma R5648) 3.7 g/l Natriumhydrogenkarbonat pH 7.4
<u>RPMI-Grundmedium</u>	10.4g/l RPMI 1640-Pulver (Sigma R6504) 2.0 g/l Natriumhydrogenkarbonat pH 7.4
<u>Caco-2 Medium</u>	DMEM Grundmedium 1% (v/v) MEM Non-essential Amino Acid Mix (100x) 10% (v/v) FKS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
<u>HepG2 Medium</u>	RPMI 1640 Grundmedium 10% (v/v) FKS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

HEK 293 Medium

DMEM Grundmedium
10% (v/v) FKS
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

SER-W3 Medium

DMEM Grundmedium
10% (v/v) FKS

Zur Langzeitlagerung von Zellstocks in flüssigem Stickstoff wurde dem entsprechenden Kulturmedium Fetales Kälberserum (FKS) in einer Endkonzentration von 20% und DMSO in einer Endkonzentration von 10% zugesetzt.

2.1.6.2.2 Primäre Rattenhepatozyten

Medien für die Kultur primärer Rattenhepatozyten wurde aus Einzelkomponenten wie folgt hergestellt:

MX-82 nach HOFFMANN et al. (1989) diente als Grundmedium für das MX-83-Medium und als Medium für die ca. 3-stündige Anwachsperiode. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation des DMEMs (Dulbecco's modified Eagle's medium; SMITH et al. 1960). Das Medium enthielt als Antibiotika Penicillin G (15 µg/l) sowie Streptomycinsulfat (31.5 µg/l). Die Pufferung war auf eine Kulturatmosphäre vom 10% CO₂ abgestimmt. Das zweifach konzentrierte Grundmedium wurde aus den Einzelkomponenten angesetzt, eine Stunde mit CO₂ begast und anschließend durch Sartolab-P-plus Filterkartuschen (0.2 µm) sterilfiltriert. MX-82 wurde für einige Wochen bei 4 °C gelagert.

MX-83 enthielt als Grundmedium MX-82 und wurde mit weiteren Vitaminen, Lipiden, Spurenelementen, Metaboliten und Transferrin (10 nM) angereichert. Die Aminosäure Arginin wurde im MX-83 Medium durch Ornithin (67.4 mg/ml) ersetzt, um das Wachstum anderer Zelltypen zu hemmen. Da der Harnstoffzyklus eine hepatozytenspezifische Stoffwechselfunktion darstellt, sind nur Hepatozyten in der Lage, Arginin durch Umsetzung von Ornithin über den Harnstoffzyklus zu synthetisieren. Zusätzlich war im MX-83-Medium in den vorliegenden Experimenten, abweichend von HOFFMANN et al. (1989) 60 mg/ml Mevalonsäure enthalten. Dem serumfreien MX-83-Medium wurde zur Aufrechterhaltung differenzierter Zellfunktionen und zur besseren Substratanheftung unter Standardbedingungen Rinderinsulin (1 µM, Stammlösung: 100 µM in 0.1 M HCl /0.1 % BSA) und Hydrocortisonhemisuccinat (20 µM, Stammlösung: 2 mM in sterilem Aqua bidest.) zugegeben. Alle Stammlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt. MX-83 wurde direkt vor dem Gebrauch frisch angesetzt und nur wenige Tage bei 4 °C gelagert.

2.1.7 Tiere und Biologisches Material

2.1.7.1 Versuchstiere

Für die Präparation primärer Rattenhepatozyten wurden männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus* L.) mit einem Körpergewicht von 180–240 g aus der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universität Göttingen verwendet. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit abwechselnden Hell- und Dunkelperioden von jeweils 12 Stunden gehalten und erhielten Standardfutter (Altrumin Standard, Nr. 13324, Lage, Lippe) und Wasser *ad libitum*.

2.1.7.2 Bakterien

Es wurde mit folgenden *Escherichia coli* Stämmen gearbeitet:

DH10β	Abt. Immungenetik, Göttingen
TOP10	Invitrogen

2.1.7.3 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

pCR [®] -XL-TOPO	Invitrogen
pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pcDNA 4-TOPO TA	Invitrogen
pcDNA3.1/V5-His TOPO	Invitrogen
pEGFP-N1	BD Biosciences

2.1.7.4 Eukaryotische Zelllinien

Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen.

Caco-2	Humane Kolonkarzinomzelllinie	FOGH et al. (1977) ROUSSET et al. (1986) PINTO et al. (1983) BACHER et al. (1992)
HEK 293	Humane Nierenzelllinie	GRAHAM et al. (1977)
HepG2	Humane Hepatomzelllinie	ADEN et al. (1979) KNOWLES et al. (1980)

SER-W3

Ratten-Sertolizelllinie

POGNAN et al. (1997)

2.1.7.5 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Primäre Antikörper

Anti-Maus IgG Alkalische-Phosphatase-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch
Anti-Kaninchen DIG/HRP-gekoppelt	DAKO
Living Colors Anti-GFP-AK (polyklonal)	BD Biosciences
Anti-V5-AK (polyklonal)	Invitrogen

Sekundäre Antikörper

Anti-Peroxidase Maus/Kaninchen	Sigma
Anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelt	Sigma

2.1.7.6 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma IBA (Göttingen) als 100 µM Stocklösung oder von Sigma/ARK (München) als Lyophilysat bezogen und mit autoklaviertem Wasser auf 100 µM eingestellt. Stocks wurden bei -20 °C gelagert.

Die Sequenzabschnitte aller benutzten Primer und Sonden sind in 5'→3'-Richtung auf dem Plus-Strang dargestellt.

2.1.7.6.1 Sense-Primer für die Charakterisierung der humanen ABCA5 cDNA

Sense-Primer	5'-Sequenz-3'
HF1	CAGACTGAGCGCGTCCAG
HF2	GAGGTTTATTCAGAAAACATGTCC
HF3	CATCCAGTCTCTCTAAGCCGAGCA
HF4	TGTGAGGCTGCTCAGTACTGGTCCTC
HF5	GAGGAGTTATCAGAGGGCAATG
HF6	GTGGTATTCAGAAGACATACAG
HF7	CTGCCTTACTTGGCCACAGTGG AAC
HF8	GTGGACTCTGCCCACCTTCTG
HF9	TGCCACCTTCTGATGGGTTTGC
HF10	CTTCAATCAAAGGGATAACCAGCC
HF11	GCTGTCATTAGGAATTGCTGTTCTTG
HF12	GTCTGCTTCTTCAA AATTC

HF13	GAGCTGATGGGTTGCCAGTGTTG
HF14	CGAACACAAGAAGATAGAGTAG
A1	GACCA GCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT
A2	GACCACGCGTATCGATGTCGAC

Tabelle 2.1 Verwendete Sense-Primer für *hABCA5*. A1 ist ein kommerzieller Ankerprimer aus dem 5'/3'-RACE-Kit (Roche), V = A/C/G.

2.1.7.6.2 Antisense-Primer für die Charakterisierung der humanen *ABCA5* cDNA

Antisense-Primer	5'-Sequenz-3'
HR14	CTCAATCCTATGGACAAG
HR13	GCAGCATCATGCAGAAAGTGTCT
HR12	CAGTCTCTCTAAGCCGAG
HR11	GAGGCTGCTCAGTACTGGTCCTC
HR10	GtATTGCaCAGGTCATGC
HR9	GTGGACTCTGCCACCTTCTG
HR8	TGCCACCTTCTGATGGGTTTGC
HR7	CAATCAAAGGGATACCAGCCA
HR6	GCTGTCATTAGGAATTGCTGTTCTTG
HR5	GAGCTGtATTTTCAAGCAGC
HR4	GTGGCAACTAAATACATCTC
HR3	CACAAGAAGATAGAGTAGTATTT
HR2	GTTTCGGTCTGCTTACTGGGAC
HR1	GGAATGGTAACTGGAGAACCAAG

Tabelle 2.2 Verwendete Anti-Sense-Primer für *hABCA5*.

2.1.7.6.3 Sense-Primer für die Charakterisierung der Ratten *Abca5* cDNA

Sense-Primer	5'-Sequenz-3'
RF1	CGCTTCAGCGGAGAGAGTAAG
RF2	CAGCGGAGAGAGTAAGCTGACC
RF3	CTGACCTAGAAAACATGGCTAC
RF4	GCTGATATTAATTAGCATGATG
RF5	CATCTACCTCGTCATAGCCTTC
RF6	GCTGGCTGTGTACCTTGATCAGGTCA
RF7	GACATCTATGAAGGCCAG
RF8	GATTGGCATATGTCCACAGTCAGA
RF9	TGGCTTCAGTCAAAGGAATACCAGCC

RF10	CAGAGTCGCTCTCGTCGCTG
RF11	CTGCTGCAGCAGAATGACCAGC
RF12	CTGCTCTAGACATTCATTC
RF13	GCTGTGGTTCCCATCAAGCTCG
RF14	GCATTGGAACAGTACAACATC
A1	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTTTTTTTTTTTTTTTTTV
A2	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C

Tabelle 2.3 Verwendete Sense-Primer für *rAbca5*. A1 ist ein kommerzieller Ankerprimer aus dem 5'/3'-RACE-Kit (Roche), V = A/C/G.

2.1.7.6.4 Antisense-Primer für die Charakterisierung der Ratten *Abca5* cDNA

Antisense-Primer	5'-Sequenz-3'
RR13	GACGTCATGTCCTATGAACTGC
RR12	CAGCTTTACAGGCCTCAATAG
RR11	GCTCGCTCTGGACAGTGTG
RR10	GCTGGCTGTGTACCTTGATCAGGTCA
RR9	GGAGCTATCAGAGGGCAACATCAATG
RR8	TGCCACCTTCTGATGGGTTTGC
RR7	GGCTTCAGTCAAAGGAATACCAGCC
RR6	CTCTAGTGAGCACCATGAG
RR5	CATAGTGCGGCTCTCAATGTG
RR4	GAGCTGATGGGTTGCCAGTG
RR3	CAAACAGCACATGTGGCGAGC
RR2	GCAGGAAGACAGAGTCGTGTTC
RR1	GCACTTGAAATTTCTAACTCC

Tabelle 2.4 Verwendete Anti-Sense-Primer für *rAbca5*.

2.1.7.6.5 PCR-Primer für die Charakterisierung der Splicevarianten

Primer	5'-Sequenz-3'
HSV FR1	GTAGA GTGTGTGAAGAC
KRSV R1	TCTACTGGTGAGAGCGTG
RSV R1	GTGAGAGCGTGTGAAGAT
RSV F1	CTGGTGAGAGCGTGTGAAG

Tabelle 2.5 Verwendete Sense- und Anti-Sense-Primer zur Erfassung der Splicevarianten.

2.1.7.6.6 Diverse PCR-Primer

Primer	5'-Sequenz-3'	Verwendung
S1.for	TCN GGN KSN GGN AAR AGY AC	D-RT-PCR
S2.rev	TCN ARN GCR CTN GTN GSY TCR TC	D-RT-PCR
RTQ F1	AGAAAGCAAATCAGTGCCTCT	RTQ-PCR
RTQ R1	TGCTTCAAATTCTACTGATTC	RTQ-PCR
SVRTQ R1	GTGAGAGCGTGTGAAGATTCAGA	RTQ-PCR
RISH F1	TAATACGACTCACTATAGGGCTGCCCTAGACAGTCATTC	ISH-RT-PCR
RISH R1	CTCTAGTGAGCACCATGAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAAT	ISH-RT-PCR

Tabelle 2.6 Verschiedene Sense- und Antisense-Primer für *hABCA5* und *rAbca5*.

D-RT-PCR = Degenerierte RT-PCR, RTQ-PCR = *real time quantitative* PCR, ISH-RT-PCR = RT-PCR für *in situ* Hybridisierungs-Sonden.

2.1.7.7 Gensonden

Die nachfolgende Tabelle erläutert die Verwendung, Herkunft und Größe sämtlicher in der Arbeit benutzter Gensonden.

Sonde	5'-Sequenz-3' bzw. Herkunft	Verwendung
HR8	GCAAA CCATCAGAAGGTGGGCA	Nachweis <i>hABCA5</i> im Northern Blot
R8	GCAAACCCATCAGAAGGTGGGCA	Nachweis <i>rAbca5</i> im Northern Blot
R13	GCAGTTCATAGGACA TGACGTC	Nachweis <i>rAbca5</i> im Northern Blot
β-Aktin (h)	GCGCTCAGGAGGAGCAATG	Kontrollhybridisierung Northern Blot
β-Aktin (r)	GACTTCCTGTAACCATCTATGCCGTG	Kontrollhybridisierung Northern Blot
GAPDH (r)	CAGGATGCATTGCTGACAATCTTGA	Kontrollhybridisierung Northern Blot
RTQ 1	6-FAM-TGCTGTGGTCCCAT-MGB	<i>Real time quantitative</i> -PCR
RISH 1	308 bp Fragment aus <i>rAbca5</i>	<i>In-situ</i> Hybridisierung
RISH 2	232 bp Fragment aus <i>rAbca5</i>	<i>In-situ</i> Hybridisierung

Tabelle 2.7 Verwendete Anti-Sense-Primer für *hABCA5*. Die RISH1-Sonde entspricht dem Sequenzbereich Nukleotide 2241–2548, die RISH2-Sonde dem Sequenzbereich Nukleotide 2317–2548 auf der cDNA-Sequenz für *rAbca5* (Genbank Accession Number AJ426052).

2.1.7.8 RNA-Proben

Zur Erschließung der Gensequenz für humanes *ABCA5* wurde Biopsiematerial aus humaner Leber (Universitätsklinikum Göttingen) verwendet. Gesamt-RNA aus verschiedenen Rattengeweben wurde aus frisch isolierten Organen präpariert. Der Verwendung menschlichen Materials zur Analyse war durch die Ethikkommission zugestimmt worden.

2.1.7.9 Molekulargewichtstandards

DNA-Längenstandard	1 kb Leiter 1 µg/µl (0.12–12.2 kb)	Invitrogen
SDS-Proteinmarker	SDS-6H (29–205 kDa)	Sigma
	Low Range Marker (6–66 kDa)	Sigma
	Color Burst Marker (8–220 kDa)	Sigma

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbehandlung und Sterilisation

Alle Geräte zur RNA-Isolierung und Northern-Blot-Analyse wurden für 20 min in 50 mM NaOH-Lösung inkubiert, um eine eventuelle RNase Kontamination zu eliminieren. Wasser für *in situ* Hybridisierungspuffer wurde mit 0.1% DEPC für mehrere Stunden inkubiert und anschließend autoklaviert. Für die *in situ* Hybridisierung wurden alle Puffer mit DEPC-vorbehandeltem Wasser in RNase-freien Gefäßen angesetzt.

Hitzebeständige Lösungen, sowie hitzebeständige Glas- und Kunststoffmaterialien wurden durch einen 25-minütigen Autoklaviervorgang bei 121 °C sterilisiert. Nicht hitzestabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Die Porenweite (0.2 µm bzw. 0.45 µm) der Sterilfilter richtete sich dabei nach der Konsistenz der Lösungen.

2.2.2 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Resuspensionspuffer (pH 8.0)	50 mM Tris 10 mM EDTA 0.1% RNase A
Lysepuffer	200 mM NaOH 1% SDS
Neutralisationspuffer (pH 5.5)	3 M Kaliumacetat

Zur Herstellung einer Minikultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt und anschließend mit einer frisch isolierten Kolonie von der Agarplatte inokuliert. Diese Kultur wurde ca. 8–12 h bei 750–900 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Isolierung der auf diese Weise erhaltenen Plasmid-DNA diente analytischen Zwecken (Restriktionsverdau, Sequenzierung) und wurde in modifizierter Form der alkalischen Lyse (BIRNBOIM und DOLY, 1979) durchgeführt. Von der Minikultur wurden 2 ml für 10 min bei 1780 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl RNase A

enthaltenden Resuspensionspuffer aufgenommen, 5 min mit 200 µl alkalischem Lysepuffer und anschließend für 5 min mit schwach saurem Neutralisationspuffer inkubiert. Das Proteinpräzipitat wurde 30 min bei 21910 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1.5 ml Eppendorfgefäß) überführt, mit 2 Volumenanteilen absoluten Ethanol (1 ml) versetzt und nach sorgfältigem Mischen 20 min bei 4 °C und 21910 x g zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 4 °C und 21910 x g zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet und in 20–40 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.2.2 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Glycerinkryokulturen wurden aus den LB-ü.N.-Kulturen der Plasmidminipräparationen (→ 2.2.2.1) durch Zugabe von 200 µl Glycerin zu 400 µl der Bakteriensuspension hergestellt. Die Stocklösungen wurden gut gemischt und unverzüglich bei –20 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Eppendorfgefäße zur Dauerlagerung in den –80 °C Tiefkühlschrank überführt.

2.2.2.3 Endotoxin-freie Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurde das Plasmid mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) gemäß dem mitgelieferten Protokoll präpariert. Dazu wurden 100 ml ü.N. Bakterienkultur durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 3220 x g sedimentiert (5810R, Eppendorf) und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Zelltrümmer, Proteine und Salzkomplexe wurden nach der Neutralisation mittels Filtration durch die *QIAfilter Maxi Cartridge* abgetrennt. Einem Schritt zur Entfernung von Endotoxinen schloß sich eine Aufreinigung der DNA über eine äquilibrierte Anionen-Austauscher-Silica-Säule an. Das gereinigte DNA-Eluat wurde mit 0.7 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und für 30 min bei 4 °C und 17000 x g (J2-21M/E Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 80% Ethanol, erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 17000 x g wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 80–100 µl endotoxinfreiem TE-Puffer (Qiagen) aufgenommen. Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration in einer 1:1000 Verdünnung mit Aqua bidest. (→ 2.2.2.5) wurde die DNA bei –80 °C aufbewahrt.

2.2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamtzelluläre RNA wurde mittels einer Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach einer Modifikation der ursprünglich von CHOMZYNSKI und SACCHI (1987) veröffentlichten Methode gewonnen.

GTC-Lösung (pH 7.5):	4 M	GTC
	17 mM	Sarcosyl
	25 mM	Trinatriumcitrat
	0.1 M	β-Mercaptoethanol

GTC, Sarcosyl (N-Dodecanoyl-N-methylglycin, Na-Salz) und Trinatriumcitrat wurden bei 50 °C gelöst und sterilfiltriert. Diese Lösung konnte bei 4 °C bis zu drei Monate gelagert werden. Vor Gebrauch wurde der Lösung 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol zugesetzt.

2.2.2.4.1 Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von RNA wurden pro Parameter 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen (ein bis zwei 10 cm-Kulturschalen) eingesetzt. Die kultivierten und in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Zellen wurden mit einem Gummiwischer in 3 x 1 ml Guanidiniumthiocyanat (GTC)-Lösung von den Kulturplatten geschabt und das erhaltene Zellysate in sterile 13 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 0.3 ml Natriumacetat-Lösung (2 M; pH 4.0), 3 ml Phenol (wassergesättigt; pH 4.3) und 0.6 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und die Ansätze kräftig geschüttelt. Die Ansätze wurden bis zur Phasentrennung (etwa 10 min) auf Eis stehengelassen und anschließend für 20 min bei 7740 x g und 4 °C in einem JA 20 Festwinkelrotor zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde vorsichtig abgenommen, in ein weiteres steriles Röhrchen überführt und zur Fällung der RNA mit 3 ml Isopropanol versetzt. Die Ansätze wurden dann für mindestens 3 h bei -20 °C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 x g für 30 min wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Sediment in 1.5 ml GTC-Lösung resuspendiert. Die erhaltene Lösung wurde mit 2 ml Isopropanol versetzt und für mindestens 3 h bei -20 °C gefällt. Die Ansätze wurden erneut für 30 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Sedimente mit 2 x 1 ml 70 %-igem Ethanol gespült, um Salze herauszulösen. Schließlich wurde die RNA in 20–40 μ l autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.4.2 Gesamt-RNA aus Gewebe

Gesamt-RNA wurde aus unterschiedlichen Geweben der Ratte und aus humaner Leber isoliert. Die frisch entnommenen Organe wurden unverzüglich mit einem sterilen Skalpell zerteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zerstoßen und unter ständiger Stickstoffkühlung zu feinem Pulver zerrieben. 3–5 Minispatelspitzen dieses Organpulvers wurden mit 3 ml Guanidiniumthiocyanat (GTC)-Lösung in einem sterilen 13 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen versetzt und sofort kräftig gemischt, bis eine homogene Suspension entstand. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen (\rightarrow 2.2.2.4.1).

RNA-Proben wurden zur Konzentrationsbestimmung in autoklaviertem Aqua bidest. 1:1000 verdünnt.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde in einem Biophotometer (Eppendorf) vorgenommen. Die Extinktionswerte wurden bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen und die Quotienten $OD_{260/280}$ und $OD_{260/230}$ ermittelt. Eine Extinktion (OD) von 1.0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl bzw. einer DNA-Konzentration von 50 ng/μl. Auf Grundlage dieser Definitionen wurden die Konzentrationen der jeweiligen Nukleinsäure errechnet. Die Quotienten $OD_{260/280}$ und $OD_{260/230}$ sind ein Maß für die Protein- bzw. Salzkontamination (OD_{max} für Proteine bei 280 nm) und sollten >1.8 und <2.0 betragen.

2.2.3 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen (RE) verschiedener Hersteller gespalten und weiterverarbeitet. Die Restriktionsansätze enthielten im Standardprotokoll 1/10 Volumenanteil des entsprechenden Pufferkonzentrats und maximal 1/10 Volumenanteil des vorgesehenen Restriktionsenzym. Analytische Restriktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 10 μl, präparative Ansätze bis zu 50 μl. Je nach Reaktionsdauer und Herstellerempfehlung wurden Restriktionsenzyme im Überschuß eingesetzt (i.d.R. 2–10 U RE/μg DNA). Für die simultane Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen wurde, soweit möglich, ein mit beiden Enzymen kompatibler Puffer eingesetzt. Wenn dies nicht möglich war, wurde die DNA zwischen beiden Reaktionen präzipitiert (→ 2.2.4.3), um einen Pufferwechsel zu ermöglichen. BSA wurde entsprechend den Herstellerempfehlungen in einer Endkonzentration von 100 μg/ml benutzt. Die Reaktion erfolgte über 1–4 h im Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms. Anschließend wurde das Enzym entweder durch Hitze (20 min bei 65–80 °C) inaktiviert, oder der Ansatz direkt auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen (hitzeresistente RE, → 2.2.8.1).

2.2.3.2 Herstellung von *blunt-end* DNA-Fragmenten

Durch die Behandlung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen entstehen DNA-Fragmente, die entweder glatte Enden (*blunt-end*), 5'-überhängende oder 3'-überhängende Enden (*sticky-end*) besitzen. Für eine *blunt-end* Ligation müssen daher DNA-Fragmente mit überhängenden Enden aufgefüllt oder überhängende Nukleotide enzymatisch entfernt werden.

2.2.3.2.1 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden durch Klenow-Behandlung

Für das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde das Enzym DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow Enzym) verwendet. Der präzipitierte Restriktionsansatz mit 10 μg Plasmid-DNA wurde in 37 μl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen. Nach Zugabe von 5 μl dNTPs (2 mM), 5 μl Klenow Pufferkonzentrat (10x) und 3 μl Klenow Fragment (10 u/μl)

wurde der Ansatz gut gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 75 °C für 10 min. Je nach Erfordernis wurde der Reaktionsansatz elektrophoretisch aufgereinigt (→ 2.2.8.1) oder direkt präzipitiert (→ 2.2.4.3).

2.2.3.2 Entfernen von 3'-überhängenden DNA-Enden mit T4 DNA-Polymerase

Da 3'-überhängende DNA-Enden nicht durch enzymatische Behandlung aufgefüllt werden können, wird die 3'→5' Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase genutzt, um diese Überhänge zu entfernen. Der präzipitierte Restriktionsansatz mit 10 µg Plasmid-DNA wurde in 12 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl dNTPs (10 mM), 4 µl T4 DNA-Polymerase Pufferkonzentrat (5x) und 3 µl T4 DNA-Polymerase (5 u/µl) wurde der Ansatz gut gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 75 °C für 10 min. Je nach Erfordernis wurde der Reaktionsansatz elektrophoretisch aufgereinigt (→ 2.2.8) oder direkt präzipitiert (→ 2.2.4.3).

2.2.3.3 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) katalysiert die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von DNA, RNA sowie Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphaten, wodurch eine Religation von Vektor-DNA nach erfolgreichem Restriktionsverdau verhindert wird. Die Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau durchgeführt. Zum hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz (→ 2.2.3.1) wurden 6 µl CIAP-Pufferkonzentrat (10x) und 3 µl CIAP-Enzym (3 u/µl) gegeben und der Ansatz auf 60 µl mit autoklaviertem Aqua bidest. aufgefüllt. Zum Entfernen von 5'-Phosphatgruppen an doppelsträngiger DNA mit 5'-Überhang wurde dieser Reaktionsansatz 1 h bei 37 °C, an doppelsträngiger DNA mit 3'-Überhang oder *blunt-end* 1 h bei 56 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 75 °C beendet. Anschließend wurde die Vektor-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) isoliert (→ 2.2.4.1) und in Aliquots von 25 ng/µl Vektor in Tris-Puffer bei -80 °C gelagert.

2.2.3.4 Digoxigenin-Markierung von cRNA-Sonden

(*in vitro* Transkription von cDNA)

Zur Generierung der Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden wurde der DIG RNA Labeling Kit (Roche) verwendet. Als cDNA-Template für die Sonde RISH1 (→ 2.1.7.7) diente ein Plasmid (pCR4-TOPO), in das ein PCR-amplifiziertes 308 bp (RF6, RR12, → 2.1.7.6) Fragment aus *rAbca5* eingebracht worden war (→ 2.2.5). Dieses Plasmid wurde in zwei getrennten Restriktionsansätzen mit den Restriktionsendonukleasen *BclI* oder *NotI* linearisiert (→ 2.2.3.1), um unspezifische Plasmid-DNA vor der *in vitro* Transkriptionsreaktion über den T3- bzw. T7-Promotor zu entfernen. Die Gesamtlänge der RISH1-Sonden (Anti-Sense, Sense) betrug durch restriktionsbedingte Vektorfragmente 375 bp bzw. 354 bp. Alternativ wurde für RISH2 (→ 2.1.7.7) als cDNA-Vorlage (Template) ein über S-300 Mikrospin-Säulen (Amersham) gereinigter RT-PCR Ansatz verwendet, der die gewünschte

Sondensequenz, flankiert von der T7/T3-Promotorsequenzen am 5'/3'-Ende enthielt (→ 2.2.6.1.4). Bedingt durch die 20 bp-Promotorüberhänge an den Primern (RISH F1 und RISH R1) betrug die Gesamtlänge der RISH2-Sonden (Anti-Sense, Sense) 272 bp. Folgende Reagenzien wurden unter Eiskühlung zum Reaktionsansatz pipettiert:

	10 µl	gereinigter PCR-Ansatz (cDNA Template)
oder	1 µg	linearisierte Plasmid-DNA
	2 µl	Transkriptionspuffer 10x
	2 µl	DIG RNA Labeling Mix
	1 µl	RNAse Inhibitor
	1 µl	T7/T3 RNA-Polymerase
	ad 20 µl	DEPC-Wasser

Diese Ansätze wurden bei einer zweiten Zugabe von je 1 µl der entsprechenden RNA-Polymerase für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Template-Degradation wurde durch Zugabe von 2 µl DNase und einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C bewirkt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl einer 0.2 M EDTA-Lösung in DEPC behandeltem Aqua bidest. (pH 8.0) gestoppt und der Ansatz durch Zugabe von 1/10 Volumenanteil 4 M LiCl-Lösung und 3 Volumenanteilen absoluten Ethanol bei -20 °C ü.N. gefällt. Das durch Zentrifugation erhaltene RNA-Pellet (21910 x g, 15min, 4 °C) wurde mit kaltem, sterilem 70% Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurden 1 µl dieses Reaktionsansatzes auf ein 1% Agarosegel geladen und elektrophoretisch analysiert. Zum Abschätzen der Fragmentlänge wurde der 1 kb DNA-Leiterstandard (Invitrogen) verwendet. Die Lagerung dieser Stammlösung für die *in situ* Hybridisierung erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.5 Dot-Blot-Analyse der cRNA-Sonden

PBS-Puffer (7.4)	136 mM NaCl 2.68 mM KCl 8.2 mM Na ₂ HPO ₄
Blockierungspuffer	1% (v/v) FKS 1% (w/v) Blockierungsreagenz aus TSA Biotin Kit in PBS
NTM-Puffer (pH 9.5)	100 mM NaCl 100 mM Tris 50 mM MgCl ₂

Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde mittels des Dot-Blot-Verfahrens überprüft. Dazu wurde aus der cRNA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und

1:160, Aqua bidest.) hergestellt und 1 µl jeder Verdünnungsstufe mit einer Pipettenspitze auf eine Nylonmembran (ca. 3 x 6 cm) aufgebracht. Nach UV-Fixierung der RNA im Crosslinker mit 0.120 mJ wurde die Membran 5 min in 10 ml PBS-Puffer gewaschen und mindestens 10 min in 10 ml Blockierungspuffer inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl des Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Anti-DIG-Antikörpers wurde die Membran für 30 min bis zu 2 h inkubiert und anschließend dreimal je 5 min in 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Zur Vorbereitung der Chromogenreaktion wurde die Membran zweimal je 5 min in 10 ml NTM-Puffer gewaschen und nachfolgend in 10 ml NTM-Puffer mit 200 µl NBT/BCIP-Konzentrat ohne Schütteln inkubiert. Die Signale wurden nach wenigen Sekunden sichtbar. Die Chromogenreaktion wurde durch kräftiges Spülen mit Aqua bidest. beendet und die Membran zwecks Aufbewahrung getrocknet.

2.2.3.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden wurde die endständige Phosphatgruppe von [γ - 32 P]-ATP mittels T4-Polynukleotidkinase auf das 5'-Ende von Oligonukleotiden übertragen. Die Markierung der verwendeten Oligonukleotide wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Der Markierungsansatz bestand aus 50 pmol Oligonukleotid, autoklaviertem Aqua bidest. ad 3 µl, 1 µl T4-Polynukleotidkinase Pufferkonzentrat (10x, Endkonzentration: 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 70 mM Tris-HCl), sowie 5 µl (entspricht 1,85 mBq) [γ - 32 P]-ATP (spezifische Aktivität: 222 TBq/mmol). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase (8 I.E./µl) gestartet und für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

Zur Trennung von markierten Oligonukleotiden und freiem [γ - 32 P]-ATP wurden G-25 MicroSpin Sephadex-Säulen (Pharmacia) eingesetzt. Das Säulenmaterial wurde zunächst durchmischt und die Säule nach Entfernung des Verschlusses in einem Reaktionsgefäß für 1 min bei 735 x g zentrifugiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 40 µl 100 mM EDTA-Lösung gestoppt, der vollständige Ansatz mittig auf die Oberfläche der Säule aufgegeben und erneut für 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde anschließend mit 300 µl denaturierter Heringssperma-DNA (Stammlösung 10 mg/ml) versetzt und für die Hybridisierung eingesetzt. Die Effizienz der Markierungsreaktion wurde durch Bestimmung der Radioaktivität im Eluat überprüft.

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente weiteren Experimenten (z.B. → 2.2.3.1 bis 2.2.3.3) zugänglich zu machen. Hierbei wurden der *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) oder die Low-Melting-Methode (Isolierung von DNA aus Low Melting Agarose durch Agaraseverdau) angewendet.

Die entsprechende DNA-Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose- oder LM-Agarosegel auf einem Transilluminator unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und wie folgt weiter behandelt:

2.2.4.1 QIAquick Gel Extraction Kit

Zur in Agarose eingebetteten DNA-Bande wurde eine hochmolare Lösung des chaotropen Salzes Natriumperchlorat (NaClO_4) zugegeben, die die Agarose bei 50 °C innerhalb von 10 Minuten irreversibel auflöste. Diese Lösung wurde zur Adsorption der DNA auf eine Anionenaustauschsilikat-Säule gegeben und die DNA nach dem Waschen mit einem weiteren Puffer bei pH 8.5 eluiert.

2.2.4.2 Low-Melting-Methode

Die LM-Agarose mit der eingebetteten DNA-Bande wurde für 5–10 min bei 65 °C geschmolzen und anschließend auf 42 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden zügig 1 u β -Agarase/100 mg LM-Agarose (bei 1% LM-Gelen) zugegeben, der Ansatz für 1 h bei 42 °C inkubiert und anschließend präzipitiert (\rightarrow 2.2.4.3).

2.2.4.3 DNA-Präzipitation

Hierzu wurde die zu präzipitierende DNA-Lösung mit 1 μl einer Glykogenlösung (20 mg/ml), 1/10 Volumenanteil einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4.6) und 2 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und gut gemischt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 21910 x g und 4 °C wurde das DNA-Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und 5 min bei 4 °C und 21910 x g zentrifugiert. Die DNA wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.5.1 TOPO-Ligation

Diese von Invitrogen patentierte Methode erlaubt die direkte Ligation von gereinigten PCR-Produkten in diverse Klonierungs- und Expressionsvektoren (z.B. pCR-XL-TOPO, pcDNA3.1/V5-His TOPO TA) mit einer wesentlich höheren Ligationseffizienz als die klassische Ligation mit T4-Ligase. TOPO-Vektorlösungen enthalten linearisierten Vektor mit 3'-T-Überhängen, die komplementär zu den von der Taq-DNA-Polymerasen erzeugten 5'-A-Überhängen sind. Die Ligation wird von einer mit den Vektorenden assoziierten Topoisomerase vermittelt. Für die Ligrationsreaktion nach Herstellerprotokoll wurden PCR-Produkt und Vektorlösung in einem Gesamtvolumen von 6 μl gemischt, 5 min bei RT inkubiert und die Reaktion mit einer konzentrierten Salzlösung (0.3 M NaCl, 0.06 M MgCl_2) gestoppt. Das Ligrationsprodukt wurde entweder direkt zur Elektroporation (Transformation) eingesetzt oder vorher einer Isopropanolpräzipitation (\rightarrow 2.2.4.3) unterzogen, um den Salzgehalt und damit eine erhöhte Leitfähigkeit der Ligrationslösung zu reduzieren (zur

Vermeidung eines Kurzschlusses während des Hochspannungspulses bei der Elektroporation elektrokompetenter *E.coli*, → 2.2.5.4).

2.2.5.2 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Restriktionsenzymatisch gespaltene, isolierte und bei Bedarf enzymatisch modifizierte DNA-Fragmente konnten direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des nach Bedarf dephosphorylierten Vektors ligiert werden. Dafür wurde das Verhältnis der DNA : Vektor auf ca. 3 : 1 eingestellt und in einer 20 µl-Reaktion mit 2 µl Ligasepuffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (5 u/µl) vermischt. Der Ansatz wurde ü.N. bei 12 °C inkubiert und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65 °C beendet. Zur Reinigung und Konzentration des Ligationsprodukts schloß sich eine DNA-Fällung mit Isopropanol an (→ 2.2.4.3), die pelletierte DNA wurde in 5–10 µl autoklaviertem Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.5.3 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Zellen

Eine Vorkultur aus 20 µl Bakterienstock (Bakterienstämme → 2.1.7.2) in 6 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde ü.N. unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschließend gleichmäßig auf 3 x 200 ml LB-Medium aufgeteilt. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0.65-0.8$ vermehrt, auf Eis abgekühlt und auf 12 vorgekühlte 50 ml-Röhrchen (Sarstedt) verteilt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Eiskühlung oder bei 4 °C (Zentrifuge) ausgeführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 3220 x g wurden die Pellets in je 1 ml eiskaltem 10% Glycerin (in autoklaviertem Aqua bidest.) resuspendiert, auf 30 ml mit 10% Glycerin aufgefüllt und erneut 10 min bei 3220 x g zentrifugiert. Nach Resuspension in je 1 ml eiskaltem 10% Glycerin wurden je 2 Pellets in 30 ml 10% Glycerin vereinigt und die Zentrifugation wiederholt (6 Röhrchen). Es erfolgte eine Resuspension in 30 ml 10% Glycerin und Zentrifugation für 10 min bei 3220 x g und eine weitere Vereinigung der Pellets (3 Röhrchen). Nach einer finalen Resuspension in 30 ml 10% Glycerin und Zentrifugation für 10 min bei 3220 x g wurden die drei Bakterien-Pellets vorsichtig in je 400 µl 10% Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Bakterien wurden in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße (60 µl) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.2.5.4 Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation eines Ligationsansatzes wurde ein Aliquot (60 µl) elektrokompetenter *E. coli* (→ 2.2.5.3) für 30 min auf Eis aufgetaut und mit 2–4 µl des Ligationsprodukts vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt und die gefüllte Küvette im Elektroporator unverzüglich mit einem Hochspannungspuls (2500 V, 25 µF, 200 Ω) behandelt. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem SOC-Medium in die Küvette wurde der gesamte Transformationsansatz in ein Falcon-Röhrchen überführt und ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte das Ausplattieren von 10–300 µl transformierter *E.coli*-Suspension auf Selektionsplatten (LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum, → 2.1.6.1) und Inkubation im Trockeninkubator

für 12–18 h bei 37 °C. Die entstandenen Kolonien wurden mittels einer Minipräparation (→ 2.2.2.1) und nachfolgendem Restriktionsverdau oder einer Kolonie-PCR (→ 2.2.6.5) analysiert und die isolierte Plasmid-DNA gegebenenfalls sequenziert (→ 2.2.7).

2.2.6 PCR-Techniken

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA-Matrizen (Templates) sequenzspezifisch amplifiziert. Dazu wird die DNA durch Hitze zunächst denaturiert. Im zweiten Schritt, der Anlagerungsreaktion, hybridisieren anschließend die Oligonukleotidprimer mit ihrem komplementären DNA-Strang (Anlagerung), worauf im dritten Schritt die DNA-Polymerase eine DNA-Neusynthese zwischen diesen Primern in 5'→3'-Richtung vornimmt (Verlängerung). Der Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung wird 20-35mal wiederholt, wobei die neu synthetisierten Tochterstränge im nächsten Zyklus selbst als DNA-Matrizen fungieren. Schon ab dem dritten Zyklus entstehen so DNA-Doppelstränge, deren Länge dem Abstand zwischen den Primern entspricht. Mit jedem Zyklus erhöht sich der Anteil dieser DNA-Abschnitte mit der Zielsequenz auf etwa das doppelte, so daß theoretisch nach n Zyklen eine Anzahl von maximal 2^n DNA-Molekülen dieser Länge im Reaktionsansatz enthalten ist. Dies entspricht einer logarithmischen Vervielfältigung der DNA-Zielsequenz. Alle PCR-Produkte wurden im Anschluß an die Reaktion elektrophoretisch auf einem DNA-Agarosegel analysiert (→ 2.2.8.1).

2.2.6.1 Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

Bei dieser Variante ist mRNA die initiale PCR-Matrize und muß mittels einer reversen Transkription (RT) in *copy* oder *complementary* DNA (cDNA) übersetzt werden. Erfolgen reverse Transkription und PCR-Amplifikation ohne Isolierung der intermediären cDNA, spricht man von einem *one-step* Verfahren, in dem von Beginn an beide Enzyme (Reverse Transkriptase und DNA-Polymerase) vorhanden sind.

2.2.6.1.1 Reverse Transkription (RT)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene RT-Protokolle durchgeführt. Dabei wurden hitzelabile Transkriptasen, z.B. AMV Reverse Transcriptase, (Roche) und Superscript II Reverse Transcriptase, (Invitrogen) unter niedrigeren Reaktionstemperaturen (42–55 °C) mit kürzeren Primern oder statistischen Primermischungen zur Generierung von cDNA-Pools (→ 2.2.6.1.2–2.2.6.3) verwendet. Thermostabile Transkriptasen, z.B. Thermoscript (Invitrogen) wurde bei höheren Reaktionstemperaturen (bis 65 °C) zur genspezifischen Selektion bei der cDNA-Synthese eingesetzt. Die einzelnen RT-Reaktionsprotokolle werden im Rahmen der entsprechenden PCR-Methode beschrieben.

2.2.6.1.2 One-step RT-PCR

Hierzu wurde der *one-step* RT-PCR Kit (Invitrogen) eingesetzt, um mit genspezifischen Primern (i.d.R. 18–24 bp) cDNA-Fragmente bis zu 1.5 kb zu amplifizieren. Folgender Reaktionsansatz wurde unter Eiskühlung in einem 0.2 ml PCR-Gefäß hergestellt:

16.2 µl	Autoklaviertes Aqua bidest.
1.8 µl	MgSO ₄ – Lösung (50 mM)
2.5 µl	Sense Primer(10 µM)
2.5 µl	Antisense Primer(10 µM)
1 µl	RNA (1 µg/µl)
1 µl	DNA Polymerase/Reverse Transkriptase-Mix
25 µl	2x Reaktionsmix

Es kam das folgende Temperatur-Protokoll zum Einsatz, wobei die reverse Transkriptase nach der initialen cDNA-Synthese bei hoher Temperatur denaturiert und simultan die DNA-Polymerase aktiviert wurde:

	cDNA-Synthese:	45 min bei 45 °C
	Denaturierung/Aktivierung	1 min bei 96 °C
35 Zyklen:	Denaturierung	15 s bei 96 °C
	Anlagerung	30 s bei 60 °C
	Kettenverlängerung	1 min/kb bei 72 °C
Abschluß:	Finale Kettenverlängerung	5 min bei 72 °C

2.2.6.1.3 RT-PCR mit T3/T7-Promotorprimern

Diese PCR-Technik wurde ebenfalls mit dem *one-step* RT-PCR Kit (Invitrogen) durchgeführt, um cDNA-Matrizen für die Generierung von Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden über eine reverse-Transkriptionsreaktion zu erhalten (→ 2.2.6.1.2). Um die cDNA beidseitig mit den T3/T7-Promotorsequenzen auszustatten, erhielt der Antisense-Primer am 5'-Terminus einen T3-Promotoranhang, der Sense-Primer am 3'-Ende einen T7- Promotoranhang (Primer → 2.1.7.6.6). Die amplifizierten cDNA-Fragmentlängen für die cRNA-Sonden betragen 200–350 bp und wurden nach dem Standardprotokoll amplifiziert (→2.2.6.1.2). Anschließend wurde das PCR-Produkt über eine Microspin S-300 Säule (Amersham) von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Dazu wurde der Inhalt der Microspin-Säule durch Vortexen homogenisiert und für 1 min bei 750 x g und 4 °C zentrifugiert. Der PCR-Ansatz wurde in die Mitte des Säulenmaterials pipettiert und für 1 min bei 750 x g und 4 °C in ein neues Eppendorfgefäß zentrifugiert.

2.2.6.2 5'-RACE-PCR

Zur Erschließung der vollständigen kodierenden *ABCA5* cDNA-Sequenz (Accession Number AJ275973.1, → 2.2.6.1.3) wurde die *RACE*-Methode (Rapid Amplification of cDNA ends) nach FROHMAN et al. (1994) verwendet (5'/3'-*RACE*-Kit, Roche). Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA aus HepG2-Zellen mit einem genspezifischen Primer auf Basis der partiellen *ABCA5*-Sequenz AJ275973.1 (R6, → 2.1.7.6.2, → Abb. 3.1) zur reversen Transkription 1 h bei 55 °C und 10 min bei 65 °C in folgendem Reaktionsansatz inkubiert:

2.75 µl	Autoklaviertes Aqua bidest.
4 µl	cDNA Synthesis buffer (5x)
10 µl	dNTPs (2 mM)
1.25 µl	cDNA Synthese Primer R6 (10 µM)
1 µl	HepG2 RNA (1 µg/µl)
1 µl	AMV Reverse Transkriptase (20 u/µl)

Zur Entfernung von überschüssigen Primern und Nukleotiden wurde eine Reinigung der cDNA nach dem Protokoll des High Pure PCR Purification Kit (Roche) vorgenommen. Danach erfolgte eine Markierung der cDNA-Enden mit einem homopolymeren A-Schwanz, um eine spezifische Anlagerung des GC-reichen poly-dT-Ankerprimers A1 (→ 2.1.7.6.1) in der nachfolgenden PCR-Reaktion an den 5'-Terminus der generierten cDNA zu gewährleisten. Es wurden

19 µl	gereinigte cDNA
2.5 µl	Reaktionspuffer
2.5 µl	dATP (2 mM)

für 3 min bei 94 °C denaturiert und auf Eis mit 1 µl Terminaler Transferase (10 u/µl) vermischt. Diese Reaktion dauerte bei 37 °C 30 min und wurde mittels Hitze (10 min bei 70 °C) beendet. Die polyA-markierte cDNA wurde anschließend als Matrize in einer PCR nach dem Expand Long Template Protokoll (Roche) mit einem Oligo-dT-Anker Primer A1 und einem genspezifischen Primer eingesetzt:

5 µl	polyA-markierte cDNA
1 µl	Oligo dT-Anker Primer (12.5 µM)
1.25 µl	genspezifischer Primer (10 µM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
0.75 µl	Long Expand Enzym Mix (Taq/Pwo, 3.5 u/µl)
5 µl	Long Expand Puffer 1
36 µl	H ₂ O

1. Amplifikation der poly-dA-markierten cDNA

10 Zyklen	Denaturierung	10 s bei 94 °C
	Anlagerung	1 min bei 60 °C
	Verlängerung	1 min/1.5 kb bei 68 °C
20–35 Zyklen	Denaturierung	10 s bei 94 °C
	Anlagerung	1 min bei 60 °C
	Verlängerung	1 min/1.5 kb bei 68 °C
	+Zyklusverlängerung um jeweils 20 s ab dem 11. Zyklus	
Abschluß	Finale Verlängerung	5 min bei 68 °C

Konnten nach der 1. Amplifikation gelelektrophoretisch keine eindeutigen Produkte oder nur Produktmischungen detektiert werden, wurde mit dem verdünnten 1. PCR-Produkt (1:50) eine zweite Amplifikation (*nested* PCR) nach gleichem Protokoll mit einem weiter nach innen verschobenen genspezifischen Primer (*nested primer*) und einem Anker-Primer A2 (→ 2.1.7.6.1) ohne dT-Schwanz (Roche) durchgeführt.

Das *Expand Long Template* Protokoll wurde ebenfalls verwendet, um den 3'-Terminus des neuen *ABCA*-Gens in einer Brücken-PCR zwischen dem ursprünglichen *ABCA5* cDNA-Fragment (AJ275973.1) und einer bereits vorher von ALLIKMETS et al. (1996) publizierten, 1346 bp-langen EST-Sequenz (EST96025) zu amplifizieren. Dazu wurde zunächst eine cDNA-Synthese mit dem Primer HR1 (→ 2.1.7.6.2) nach obigem Protokoll vorgenommen und die resultierende cDNA nach Reinigung mit zwei genspezifischen Primern HF1 und HR1 (→ 2.1.7.6) amplifiziert. Zur Erschließung der vollständigen *ABCA5* cDNA-Sequenz wurden alle PCR Produkte in den pCR-XL-TOPO Vektor ligiert, in kompetenten *E.coli* Bakterien vermehrt und analysiert (→ 2.2.5.1–2.2.5.4, 2.2.7). Die vollständige kodierende Sequenz wurde anschließend durch Zusammenfügen der überlappenden cDNA-Fragmente erstellt und mittels einer weiteren *two-step* RT-PCR überprüft (→ 2.2.6.3).

2.2.6.3 Two-step RT-PCR

Zur reversen Transkription wurde die thermostabile Transkriptase Thermoscript (Invitrogen) benutzt. Zunächst erfolgte eine Denaturierung von 1 µg RNA, 10 µl dNTPs (2 mM) und 1 µl Primer (10 µM) für 5 min bei 65 °C. Unter Eiskühlung wurden 4 µl Synthesepuffer (5x), 1 µl Thermoscript (15 u/µl) und 3 µl autoklaviertes Aqua bidest. hinzugegeben. Der Ansatz inkubierte für 30 min bei 60 °C und 5 min bei 85 °C.

Die cDNA wurde in einer PCR-Reaktion mit dem High Fidelity Polymerase Mix (Invitrogen) oder mit dem Expand Long Template Mix (Roche) eingesetzt:

2 µl	cDNA
1 µl	dNTPs (10 mM)

5 µl	High Fidelity Puffer/Long Expand Puffer 1
2 µl	MgSO ₄ -Lsg. (50 mM)
1.5 µl	Sense-Primer (10 µM)
1.5 µl	Antisense-Primer (10 µM)
0.3 µl	Platinum Taq HF Mix (5 u/µl) oder
0.75 µl	Expand Long Template Mix (3.5 u/µl)
	Auoklaviertes Aqua bidest. ad 50 µl

Folgendes Temperaturprotokoll wurde verwendet:

	Aktivierung/ Denaturierung	1 min bei 94 °C
25–35 Zyklen	Denaturierung	30 s bei 94 °C
	Anlagerung	30 s bei 60 °C
	Verlängerung	ca. 1 min/kb bei 68 °C
Abschluß	Finale Verlängerung	ca. 1 min/kb bei 68 °C

2.2.6.4 Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR) I

Diese Methode erlaubt es, den Verlauf einer PCR-Reaktion zu verfolgen und das gebildete Produkt relativ zu einem Standard zu quantifizieren. Nach HOLLAND et al. (1991) und LIVAK et al. (1995) benötigt man neben den üblichen Oligonukleotidprimern für die Amplifikation ein beidseitig markiertes Oligonukleotid (Taqman-Sonde) für die Detektion des gebildeten Produkts. Diese Markierung besteht hier aus dem nicht fluoreszierenden 3'-gebundenen Quencher *Minor Groove Binder* (MGB, Applied Biosystems) und dem fluoreszierenden 5'-gebundenen 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), das als Reporter fungiert (Abb. 2.1).

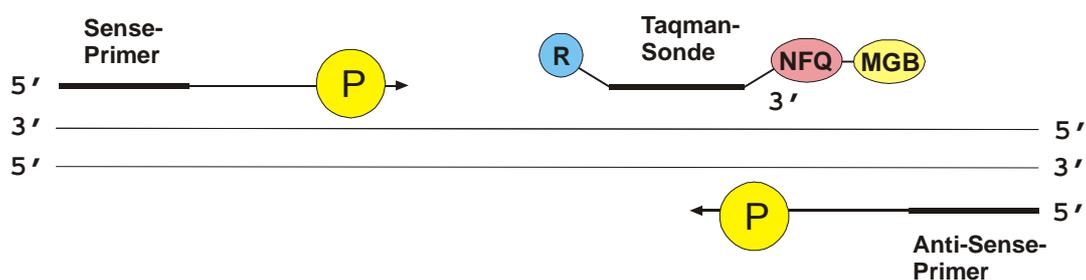


Abb. 2.1 Anlagerung der Primer und der Taqmansonde während der PCR. Die Taqmansonde kann je nach Syntheserichtung entweder mit dem Plus-Strang (5' → 3') oder mit dem komplementären cDNA-Strang (3' → 5') hybridisieren. Solange die Sonde intakt ist, wird durch den nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) die Fluoreszenzstrahlung des Reporters (R) unterdrückt. P = DNA-Polymerase, MGB = Minor Groove Binder (verankert die Sonde in der kleinen Furche der DNA und erlaubt eine spezifische Anlagerung trotz geringer Sondenlänge, ca. 13-17 bp).

Wird die an die cDNA gebundene Sonde im Verlauf der DNA-Synthese durch die 5'–3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgespalten, wird der Reporter in zunehmendem Maß freigesetzt und entfernt sich räumlich vom Quencher. Während der PCR-Reaktion werden die freien Reporter-moleküle durch regelmäßige Fluoreszenzeinstrahlung angeregt und geben ihrerseits Fluoreszenzstrahlung ab.

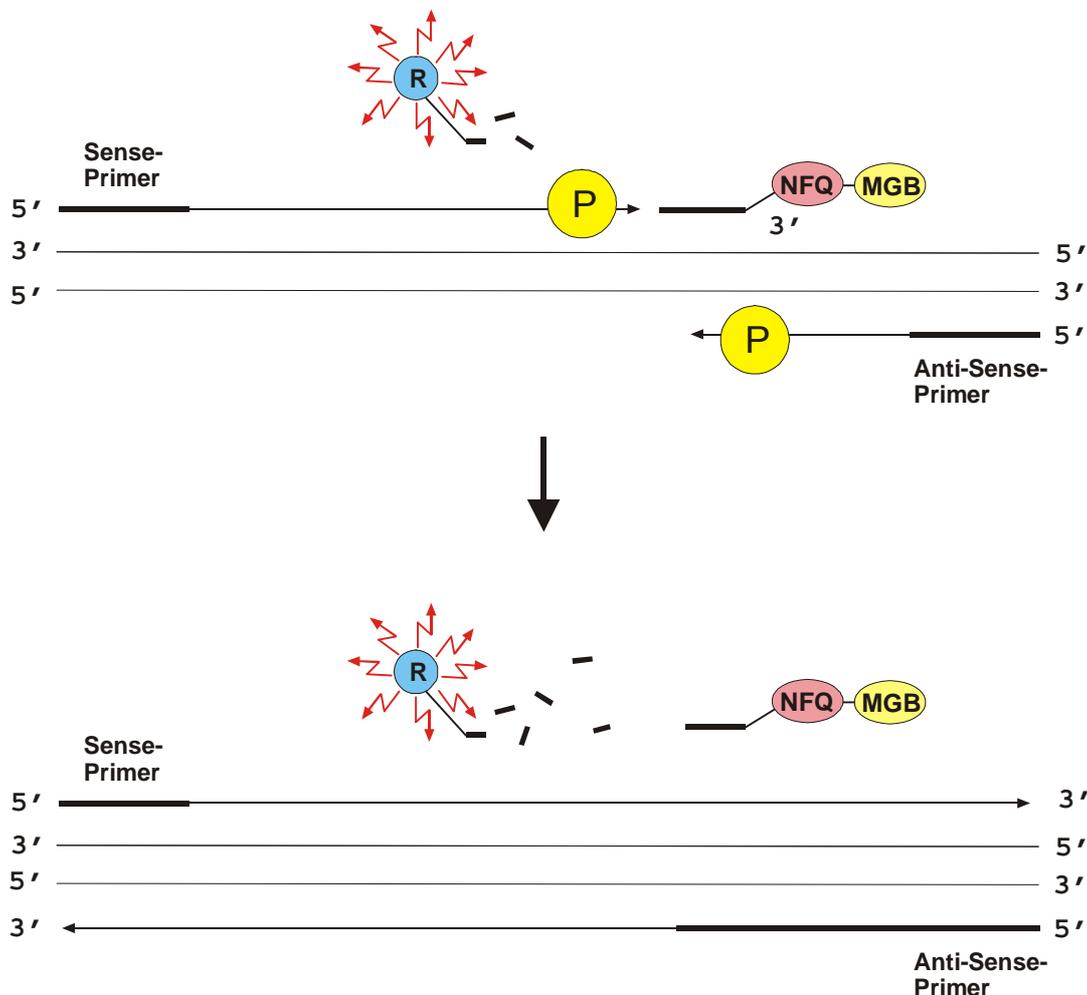


Abb. 2.2 **Abspaltung der Taqmansonde und cDNA-Synthese.** Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase führt zur Abspaltung der Sonde und Freisetzung des Reporters, der in räumlicher Entfernung vom Quencher bei Anregung Fluoreszenzstrahlung abgibt. Nur tatsächlich angelagerte Sondenmoleküle werden durch die Exonukleaseaktivität gespalten. Nach Abspaltung der Sonde wird die cDNA-Strangsynthese fortgesetzt. Dieser Prozeß läuft in jedem PCR-Zyklus ab und interferiert nicht mit der exponentiellen Produktzunahme.

Das Ansteigen des Fluoreszenzsignals korreliert in der exponentiellen Phase der PCR direkt mit der Zunahme des PCR-Produktes. Mittels der SDS 2.1 Software (ABI) läßt sich die Zykluszahl (C_T -Wert) bestimmen, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Reaktionshintergrund abhebt. Führt man parallel zur eigentlichen Messung die gleiche Reaktion mit bekannten cDNA-Matrizenmengen durch (z.B. mit Referenzplasmiden), erhält

man eine Standardkurve mit C_T -Werten, die einen Rückschluß auf die Produktmengen zulassen.

In dieser Arbeit wurde die Methode der *real-time quantitative* PCR benutzt, um auf mRNA-Ebene die relative Häufigkeit des Splicevariantengens *rAbca5-V20+16* (SV) im Verhältnis zur Häufigkeit des *Abca5*-Transkripts der Ratte (VT) in verschiedenen Rattengeweben und einer Zelllinie zu bestimmen. Da die mRNA-Sequenz des *Abca5*-Haupttranskripts und der Splicevariante sich nur in der 16 bp-Insertion in der mRNA der Splicevariante unterschieden, wurde ein *rAbca5*-cDNA-Fragment (198 bp) ausgewählt, an dessen 3'-Ende die 16 bp-Insertion der Splicevariante lag, so daß das zu amplifizierende Fragment sich nur in der Zusammensetzung des Antisense-Primers unterschied, um für beide PCR-Reaktionen möglichst kinetisch identische Bedingungen zu schaffen (Primer RTQ F1, RTQ R1, RSVTQ R1 → 2.1.7.6.6, Abb. 2.1). Für beide PCR-Reaktionen wurde die gleiche Taqman-Sonde (5'-6-FAM-TGCTGTGGTTCCCAT-MGB-3') benutzt, die im Zentrum des PCR-Fragments hybridisierte (Abb 2.1).

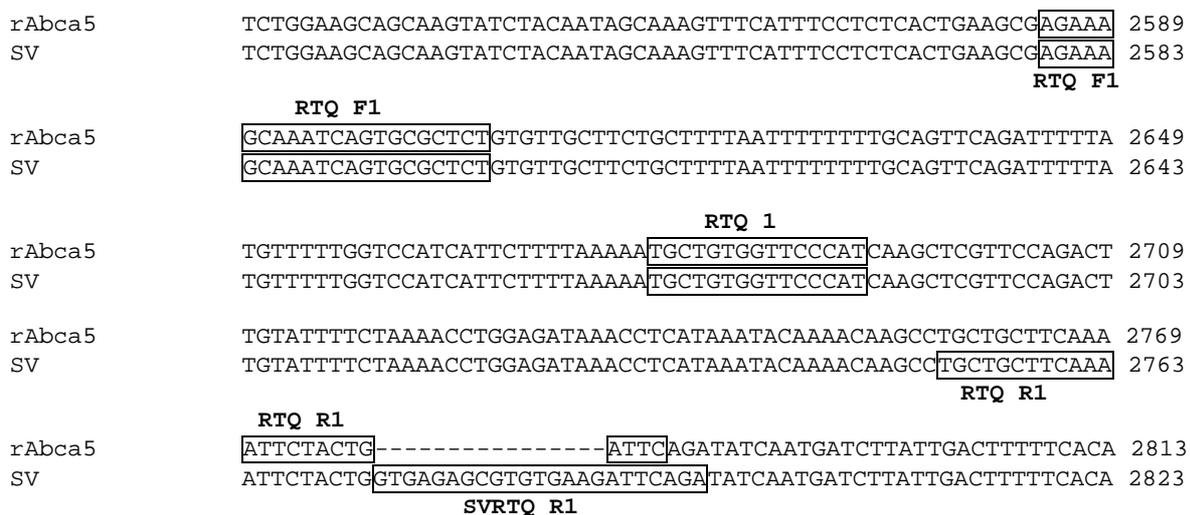


Abb. 2.3 PCR-Bereich der *real-time quantitative* PCR auf *rAbca5* (Genbank Accession No. AJ426052) und *rAbca5 V+16* (AJ550165).

Die Primer und die Taqmansonde (→ 2.1.7.6) wurden durch Positionsrahmen gekennzeichnet. Die PCR für *rAbca5* wurde mit RTQ F1 und RTQ R1, die PCR für *rAbca5 V+16* wurde mit RTQ F1 und SVRTQ R1 ausgeführt (→ 2.2.6.4.2).

2.2.6.4.1 Reverse Transkription der RNA-Proben

Folgender Reaktionsansatz wurde nach 10-minütiger Denaturierung von RNA und Primer bei 70 °C für 1 h bei 42 °C inkubiert:

1 µg	Gesamt RNA auf 12.5 µl mit autoklaviertem Aqua bidest. verdünnen
1 µl	<i>Random Hexamer Primer</i> (dN6)
6 µl	Superscript RT Puffer (5x)
3.5 µl	DTT (0.1 M)

5 µl	dNTPs (2 mM)
1.5 µl	RNAse Inhibitor
0.25 µl	Superscript Reverse Transcriptase (200 u/µl)

Die auf 10 ng/µl eingestellte cDNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.2.6.4.2 Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) II

Mit je einem Referenzplasmid für das *rAbca5*-Haupttranskript (VT) und das Splicevariantentranskript (SV) wurde eine 5-stufige Verdünnungsreihe erstellt, die als Standardkurve zur quantitativen Bestimmung der in den Proben gemessenen cDNA-Transkripte dienen sollte. Die Referenzplasmide enthielten den gesamten Leserahmen des *rAbca5*-Gens bzw. des *rAbca5 V+16*-Transkripts im pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektor und wurden durch eine TOPO-Ligation von PCR-Produkten mit anschließender Vermehrung in elektrokompenten *E. coli* Bakterien erhalten (→ 2.2.5).

Rechenbeispiel für VT-Referenzplasmid

Das verwendete VT-Referenzplasmid bestand aus 10463 bp (*rAbca5*-Insert + Vektor-DNA). Pro Basenpaar wurde ein genähertes Molgewicht von 660 g/mol verwendet.

Daraus ergab sich für das gesamte Plasmid ein Molgewicht von

$$10463 \times 660 \text{ g/mol} = 6.906 \times 10^6 \text{ g/mol}$$

bzw. In 1 ng cDNA befanden sich

$$1.448 \times 10^{-16} \times 6.022 \times 10^{23} = 8.72 \times 10^7 \text{ cDNA-Moleküle.}$$

oder Die Molekülzahl der ersten Verdünnungsstufe von 4.48×10^5 cDNA-Molekülen befand sich in 0.00514 ng = 5.14 pg cDNA.

Die cDNA des VT-Referenzplasmids besaß eine Ausgangskonzentration von 2.1 µg/µl und wurde 1:10 000 verdünnt ($c = 0.21 \text{ ng/µl}$). Von dieser Verdünnung wurden 1.22 µl (= 0.257 ng) mit autoklaviertem Aqua bidest. auf 500 µl verdünnt. Damit enthielten 10 µl dieser cDNA-Lösung 5.14 pg cDNA (= 4.48×10^5 cDNA-Moleküle). Ausgehend von dieser Stammlösung wurden vier weitere 1:5-Verdünnungen hergestellt (8.96×10^4 , 17920, 3584 und 717 cDNA-Moleküle/10 µl cDNA-Lösung). Folgender Reaktionsansatz wurde zur Erstellung der Standardkurve pro Probe in Doppelbestimmung angesetzt:

10 µl	Plasmid DNA (für 5 Verdünnungsstufen, s.o.)
15 µl	Eurogentec Mastermix 2x (Puffer, MgCl ₂ , dNTPs, Enzym)
1 µl	Sense-Primer (22.5 µM)
1 µl	Antisense-Primer (22.5 µM)
1.5 µl	Taqman-Sonde (5 µM)
1.5 µl	autoklaviertes Aqua bidest.

und mit folgendem Temperaturprotokoll vermessen:

	Start	2 min bei 50 °C
	Denaturierung	10 min bei 95 °C
49 Zyklen	Denaturierung	15 s bei 95 °C
	Anlagerung und Verlängerung	1 min bei 60 °C

Die cDNA-Proben der Ratte (40 ng) wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit dem gleichen Temperaturprotokoll vermessen. Für alle Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert errechnet wurde. Zur Normalisierung der Proben wurde der 18S-RNA-Gehalt der Proben in unabhängigen PCR-Reaktionen mit Hilfe einer weiteren Standardkurve (s.o.) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der SDS 2.1 Software und ergab den relativen Anteil der SV-Genexpression in Bezug auf die Expression des VT.

2.2.6.5 Kolonie-PCR

Diese PCR wurde an frisch von der LB-Agarplatte gepickten *E. coli* Kolonien als alternative Methode der Plasmid-DNA-Charakterisierung zur Minipräparation mit anschließender Restriktionsanalyse durchgeführt. Es wurden Amplifikate zwischen 500 bp und 1 kb mit insertspezifischen Primern ausgewählt. Für 100 µl Mastermix (5 Kolonien à 20 µl pro Reaktion) wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

10 µl	Taq Puffer (10x)
2 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Sense-Primer (100 µM)
1 µl	Antisense-Primer (100 µM)
1 µl	Taq DNA-Polymerase
85 µl	autoklaviertes Aqua bidest.

Nach Vorlegen des Mastermix' wurden die Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen von der Agarplatte abgehoben und unter kräftigem Auf- und Abpipettieren in das PCR-Reaktionsgefäß (0.2 ml) gegeben. Das Temperaturprofil erforderte eine längere Denaturierungsphase, um die Plasmid-DNA in den Bakterien einer Amplifikation zugänglich zu machen.

Initiale Denaturierung der Plasmid-DNA		5 min bei 95 °C
30 Zyklen zur	Denaturierung	30 s bei 96 °C
	Anlagerung	30 s bei 60 °C
	Verlängerung	1 min/kb bei 72 °C
Abschluß	Finale Verlängerung	5 min bei 72 °C

2.2.7 Sequenzanalyse

Sequenzierungen wurden entweder als Auftragsarbeiten bei der Firma SeqLab (Göttingen) oder in der Abteilung Klinische Pharmakologie selbst durchgeführt. Die auf dem Ketten-Abbruch-Verfahren basierende Sequenzierreaktion von SANGER et al. (1975) verwendete fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (ddNTPs) zur Erzeugung einer statistischen Mischung von synthetisierten DNA-Fragmenten. Für die PCR-Amplifikation wurden DNA-Mengen zwischen 200 ng und 500 ng pro 10 µl-Ansatz zusammen mit 1 µl des entsprechenden Sequenzier-Primers (10 µM) und 2 µl BigDye-Mix (ddNTPs, DNA-Polymerase, MgCl₂ und Puffer) verwendet:

Start:	Initiale Denaturierung	2 min bei 94 °C
24 Zyklen:	Denaturierung	15 s bei 96 °C
	Anlagerung	15 s bei 56.5 °C
	Kettenverlängerung	4 min bei 60 °C
Abschluß:	Finale Kettenverlängerung	4 min bei 60 °C

Nach einer Sephadex-Filtration (Sephadex G-50 superfine, Amersham) wurde mit den erhaltenen Produkten das Standard-Leseweitenprogramm (700 bp) auf dem automatischen Sequenzierer *3100 Genetic Analyzer* (ABI) gestartet. Die Auswertung der Sequenzdateien (.abi) erfolgte mit den PC-Software-Produkten *Sequencing Analysis* (PerkinElmer), *Chromas* (Technelysium), *Staden Package* und *ClustalW* (EBI). Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und Genbank wurden mit Hilfe des Blast-Programms (ALTSCHUL et al. 1998) über den Webserver www.ncbi.nlm.nih am NIH (USA) oder über den Fasta3-Server www.ebi.ac.uk am EBI (Cambridge, GB) vorgenommen. Zur Bestätigung neuer Sequenzen wurden mindestens zwei identische cDNA-Klone oder ein direkt sequenziertes PCR-Produkt benötigt.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.8.1 DNA-Gelelektrophorese

TBE-Puffer 10x (pH 8.3)	1 M	Borsäure
	1 M	Tris-HCl
	200 mM	EDTA
Tris-Acetat-Puffer 10x (pH 7.2)	400 mM	Tris
	200 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
DNA-Auftragspuffer 6x	60% (v/v)	10x Tris-Acetat-Puffer pH 7.2
	30% (v/v)	Glycerin

0.15% (w/v)	Bromphenolblau
0.15% (w/v)	Xylencyanol
10% (v/v)	Aqua bidest.

Mit dieser Methode wurden analytische DNA-Mengen ($\leq 1 \mu\text{g}$) nach PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdau und präparative DNA-Mengen ($\leq 10 \mu\text{g}$) zum Zweck der Insertisolierung aufgetrennt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0.7–2%-ige Agarosegele in 1x TBE-Puffer hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Agarosemenge in der Hälfte des benötigten Puffers durch Erhitzen bis zur Siedetemperatur gelöst und nach Abkühlen mit dem verbleibenden Puffer mit 5 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Dieser Gelmix wurde zur Polymerisation zügig und blasenfrei in den Gelträger (14 x 11 x 0.7 cm) gegossen. Nach 30–60 min bei RT konnte das Gel benutzt werden. In der Gelkammer wurde es mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5–10 μl Auftragspuffer vermischt, aufgetragen und bei 45–100 mA getrennt. Auf einem UV-Durchlichttisch (302 nm) konnten die durch Interkalation von Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden fotografisch dokumentiert und ggf. mit dem Skalpell isoliert (\rightarrow 2.2.4) werden. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit einer DNA-Standard-Leiter (\rightarrow 2.1.7.9).

2.2.8.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

2.2.8.2.1 Gelherstellung

MOPS-Puffer (10x, pH 7.4):	0.2 M	MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA

Der Puffer wurde nach Einstellen des pH-Wertes autoklaviert. Die Gebrauchslösung wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit autoklaviertem Aqua bidest. hergestellt.

Für die RNA-Analytik wurden 1 %-ige Agarosegele eingesetzt. In einem autoklavierten Gefäß wurde 1 g Agarose in 90 ml 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer durch Aufkochen vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurden 10 ml 37%-ige Formaldehydlösung zugegeben und das Gel (14 x 11 x 0.7 cm) nach Einsetzen der Kämme luftblasenfrei gegossen. Gelkammer und Kämme waren vorher zur Inaktivierung von RNase 30 Minuten in einer 50 mM NaOH-Lösung inkubiert worden.

2.2.8.2.2 Probenvorbereitung

Blaupuffer:	5 mM	Na_2HPO_4
	0.45%	Bromphenolblau (w/v)
	13.7 mM	Glycerin

Formamid-Mix:	16.5 M	Formamid (deionisiert)
	13.2%	MOPS (10x, v/v)
	2.7 M	Formaldehyd (37%)

Zur Deionisierung von Formamid wurden 50 ml Formamid unter sterilen Bedingungen für 30 min mit 5 g Serdolit MB-1-Ionenaustauscherharz gerührt und anschließend das Austauscherharz durch einen Faltenfilter abfiltriert. Die Lösung wurde aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der fertige Probenpuffer konnte etwa 2-3 Wochen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Der verwendete Probenpuffer setzte sich aus Blaupuffer, Formamidmix und Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) in Volumenanteilen 50:250:1 zusammen.

Die RNA-haltigen Lösungen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Pro Bahn wurden 20–25 μg Gesamt-RNA eingesetzt und mit Aqua bidest auf ein einheitliches Volumen gebracht. Anschließend wurden jeder Probe 20 μl Probenpuffer zugesetzt, die Ansätze bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

2.2.8.2.3 RNA-Elektrophorese

Das auspolymerisierte Agarosegel wurde auf dem Gelträger fixiert und in die Elektrophoresekammer eingehängt. Nach Überschichtung mit 1x MOPS-Puffer wurden die Kämme vorsichtig entfernt. Zur Dichtigkeitsüberprüfung der Geltaschen belud man diese vor dem Auftragen der Proben mit je 2 μl Probenpuffer. Zum Einlaufen der Proben ins Gel wurde eine Stromstärke von 10 mA für 30–60 min angelegt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40–45 mA unter Umwälzung des Elektrophoresepuffers. Im Anschluß wurde die gleichmäßige Beladung der Bahnen mittels UV-Durchlicht überprüft und fotografisch dokumentiert. Das in die RNA interkalierende Ethidiumbromid ermöglicht es, die rRNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die 18 S und 28 S rRNA Banden (1.9 kb bzw. 4.8 kb in der Ratte) dienten als interner Molekulargewichtsstandard.

2.2.9 Transfer von Nukleinsäuren

2.2.9.1 RNA-Transfer auf Nylon-Membranen

SSC (20x, pH 7.0):	3 M	NaCl
	0.3 M	Trinatriumcitrat

Der Puffer wurde vor Gebrauch autoklaviert.

Der Transfer von RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylon-Membran (Northern Blotting) erfolgte in Anlehnung an eine von SOUTHERN (1975) beschriebene, auf Kapillarkräften beruhende Methode. Die verwendete Nylon-Membran (Porengröße $0.45\text{ }\mu\text{m}$) wurde vor dem

Transfer mit sterilem Aqua bidest. benetzt und wie die Filterpapiere für 5 min in 5 x SSC (*Standard Saline Citrate Buffer*) äquilibriert. Ein als Pufferbrücke dienendes dickes Filterpapier (Nr. 2668) wurde auf einer erhöhten Glasplatte so plaziert, daß beide Enden gleichmäßig in das darunter liegende mit 20x SSC gefüllte Pufferreservoir hineinragten. Auf der Pufferbrücke wurden von unten nach oben ein dickes Filterpapier, ein dünnes Filterpapier (Nr. 2043), das Gel mit den Taschen nach unten zeigend, die Membran, ein dünnes und wieder ein dickes Filterpapier (jeweils in der Größe des Gels) luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Das Pufferreservoir wurde mit Parafilm abgedichtet und der Aufbau mit einer Lage von 10–15 cm saugfähigen Zellstofftüchern (Kleenex) überschichtet und mit ca. 10 N beschwert. Die Transferzeit betrug 16–24 h. Im Anschluß an den Transfer wurde jede Seite der Nylon-Membran mit 0.120 mJ UV-Licht bestrahlt, um die RNA stabil auf der Membran zu fixieren. Die Vollständigkeit des Transfers wurde durch Betrachtung des Gels und der Membran auf dem UV-Durchlichttisch überprüft und fotografisch dokumentiert. Die Membran wurde vor dem Trocknen bzw. der direkten Prähybridisierung zweimal mit 95 °C heißer 0.05 %-iger SDS-Lösung und ein- bis zweimal in heißem Aqua bidest. gewaschen, um Bromphenolblau, Ethidiumbromid und Salze zu entfernen.

2.2.10 Radioaktive Hybridisierung von RNA an Northern Blots

2.2.10.1 Hybridisierung mit ³²Phosphor-markierten Sonden

Denhardts-Lösung (100x):	2% (w/v)	Ficoll (MW 400000)
	2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	2% (w/v)	Rinderserumalbumin
Prähybridisierungslösung:	0.9 M	NaCl
	0.09 M	Trinatriumcitrat
	12.5 M	Formamid (deionisiert)
	17 mM	SDS
	5% (v/v)	Denhardts-Lösung (100x)
	400 µg/ml	Heringssperma-DNA
Waschpuffer 2x SSC	300mM	NaCl
	30 mM	Trinatriumcitrat
	0.1%	SDS
Waschpuffer 1 x SSC	150 mM	NaCl
	15 mM	Trinatriumcitrat
	0.1%	SDS
Waschpuffer 0.1 x SSC	15 mM	NaCl
	1.5 mM	Trinatriumcitrat
	0.1%	SDS

Denhardts-Lösung wurde nach dem Ansetzen in Aqua bidest. durch 5 µm und 0,45 µm Vorsatzfilter sterilfiltriert. Heringssperma-DNA (10 mg/ml) wurde vor Gebrauch mit Ultraschall behandelt, um DNA-Fragmente einer Größe von ca. 500–700 kb zu erhalten, aliquotiert und anschließend bei –20 °C gelagert. Direkt vor der Verwendung wurde die Heringssperma-DNA durch 5-minütiges Erhitzen in siedendem Wasser und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurden die Membranen für 2–3 Stunden bei 38 °C im Hybridisierungssofen mit Prähybridisierungslösung inkubiert. Zur Einleitung der Hybridisierung wurden die Markierungsansätze (→ 2.2.3.5) zur Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung wurde für 16–24 h bei 38 °C vorgenommen. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Membranen zur Entfernung unspezifisch gebundener Oligonukleotide unter zunehmender Temperatur (37–55 °C) und abnehmender Ionenkonzentration des Waschpuffers (2x SSC / 0.1 % SDS (w/v), 1 x SSC / 0.1 % SDS (w/v), 0.1 x SSC / 0.1 % SDS (w/v) je 5 min unter Schütteln gewaschen. Waschtemperatur und Ionenkonzentration waren von der verwendeten Sonde abhängig. Nach jedem Waschschrift wurde die verbliebene Aktivität mit einem Flächenzähler gemessen. Beim Erreichen einer konstanten Aktivität wurde die Waschprozedur abgebrochen und die Membranen feucht in Klarsichtfolie eingeschweißt. Zur Quantifizierung der gebundenen Radioaktivität wurde ein Bio-Imaging-Analyzer, BAS 1500, verwendet. Hierzu wurden [³²P]-sensitive Nachweisplatten für 3–72 h der Stahlexposition durch die hybridisierte Membran ausgesetzt. Mit der Software BAS-Reader konnten die einzelnen Signale ausgewertet werden. Anschließend wurden die Membranen zur autoradiographischen Darstellung mit aufgelegten Röntgenfilmen in einer Kassette mit Verstärkerfolien bis zu 3 Wochen bei –80 °C gelagert. Anschließend wurden die Filme entwickelt.

2.2.11 Nicht-radioaktive Hybridisierung - *In situ* Hybridisierung

In situ cRNA/mRNA-Hybridisierungen an Gewebeschnitten wurden vorgenommen, um die zellspezifische Verteilung von mRNA-Transkripten zu untersuchen. Die im folgenden beschriebenen Protokolle wurden in der Abteilung Pathologie (Dr. P. Middel), Universität Göttingen, erlernt und durchgeführt. Die Herstellung der Paraffinschnitte wurde von Mitarbeiterinnen der Abteilung Pathologie übernommen.

2.2.11.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Das frisch präparierte Organmaterial wurde ü.N. in einer 4% Paraformaldehydlösung fixiert und durch eine aufsteigende Ethanolreihe in 70%, 90% und 100% Ethanol dehydratisiert. Zur vollständigen Entfernung des Alkohols wurde das Gewebe in Xylol und anschließend 2 h in flüssigem Paraffin (ca. 60 °C) inkubiert. Alle diese Schritte wurden automatisiert in einer Einbettungsstation durchgeführt. Das Organblöckchen wurde in eine Ausgießstation eingebracht und härtete in wenigen Minuten aus. Das abgekühlte Material wurde in einem

Mikrotom auf 0–2 µm geschnitten und auf Objektträger überführt. Paraffinblöcke und Schnitte wurden bei RT gelagert.

2.2.11.2 Vorbehandlung und Hybridisierung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst 2 x 10 min bei RT in Xylol deparaffiniert und durch eine absteigende Ethanolreihe in DEPC-H₂O (je 1 min in 100%, 90% und 70%) rehydratisiert. Nach zwei Waschschritten (je 5 min) in PBS wurden die Schnitte zum Blocken der endogenen Peroxidase für 10 min in 3%-iger H₂O₂-Lösung in DEPC-H₂O inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschrritte (je 5 min) in DEPC-H₂O und eine Behandlung mit 100 µl/Schnitt Proteinase K (1 Tropfen auf 1 ml PBS), um die durch Gewebe und Proteine maskierte RNA für die Hybridisierung mit der DIG-RNA-Sonde zugänglich zu machen. Diese Reaktion wurde nach 5 min abgestoppt, die Schnitte 5 min in PBS gespült und zur Neutralisierung positiver Ladungen eine Acetylierungsreaktion angeschlossen. Dazu wurden die Schnitte für 10 min in 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8.0) mit 0.25% Essigsäureanhydrid inkubiert. Zwei Waschschrritte (je 5 min) in PBS beendeten diese Reaktion. Nach einer Dehydratisierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe in DEPC-H₂O (je 1 min in 70%, 90% und 100%) wurden die Schnitte für 20 min bei RT vor Staub geschützt getrocknet. Währenddessen wurde die Lachssperma-DNA, die zur Absättigung unspezifischer Bindungen während der Hybridisierung dient, bei 95 °C für 10 min denaturiert, kurz auf Eis gekühlt und zum Hybridisierungspuffer gegeben (100 µl Puffer/Schnitt, davon 10% Lachssperma-DNA). Die markierte Sonde (1:50 aus der Stammlösung, → 2.2.3.4) wurde zum Puffer pipettiert und die Hybridisierungsansätze 5 min bei 55 °C inkubiert. In jedem Experiment wurde eine separate Probe mit der Sense-cRNA-Sonde als Negativkontrolle hybridisiert. Die Hybridisierungsösung wurde blasenfrei auf den Schnitt pipettiert und mit einem sterilen Deckglas abgedeckt. Der Objektträger wurde zur Denaturierung von Sonde und RNA 5 min bei 85 °C auf eine Heizplatte gelegt und anschließend in einer feuchten Kammer ü.N. bei 55 °C inkubiert. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen war diese Kammer zuvor außerdem mit deionisiertem Formamid/ DEPC-H₂O (50/50) so gefüllt worden, daß der Boden bedeckt war. Zur Vorbereitung der Waschschrritte am Folgetag, wurden 200 ml deionisiertes Formamid/ DEPC-H₂O (50/50), 150 ml DEPC-H₂O, 2 Küvetten und ein Standzylinder (250ml) ü.N. bei Hybridisierungstemperatur angewärmt.

2.2.11.3 Waschschrritte und Antikörper-Inkubation

Waschpuffer 1 (1x SSC, 1% SDS)	150 mM	NaCl
	15 mM	Trinatriumcitrat
	1%	SDS
Waschpuffer 2 (0.2x SSC, 2% SDS)	30 mM	NaCl
In einer 50/50-Mischung aus	3 mM	SDS
deionisiertem Formamid/DEPC-H ₂ O	2%	SDS

Die Waschpuffer wurden vor Beenden der Hybridisierung frisch angesetzt. Alle Waschschritte erfolgten unter Schütteln.

TBST-Puffer 10x (pH 7.4)	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	0.1%	Tween 20
Blockierungspuffer (pH 7.5)	0.1M	Tris-HCl
	0.15 M	NaCl
	0.5%	TNB-Blockierungsreagenz

Das Blockierungsreagenz wurde zum erwärmten Puffer gegeben (ca. 60 °C) und mehrere Stunden unter Rühren gelöst.

Stoppuffer (pH 8.0)	20 mM	Tris
	5 mM	EDTA
Meyers Hämalaun	0.1% (w/v)	Hämatoxylin
	105 mM	K Al(SO ₄) ₂ 12 H ₂ O
	1 mM	Na(IO ₃)
	3% (w/v)	Chloralhydrat
	0.1% (w/v)	Zitronensäure

Am ersten Tag wurden die ersten drei Komponenten in Aqua bidest. gelöst. Am zweiten Tag wurden die verbleibenden Komponenten hinzugefügt und der Puffer zum Sieden erhitzt.

Die Schnitte wurden einzeln in WP 1 geschwenkt, bis die Deckgläser von selbst abschwammen und in frischem WP 1 zweimal je 5 min bei RT gewaschen. Anschließend folgten 3 Waschschrte (je 20 min) bei Hybridisierungstemperatur mit WP 2 (GFL 1083 Wasserschüttler). Die Schnitte wurden unter Schütteln auf RT abgekühlt und 2x 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Zur Reduzierung des Reaktionshintergrunds wurden die Schnitte bei RT 30 min in Blockierungspuffer inkubiert (100 µl/Schnitt, trockene Kammer). In einer feuchten Kammer (DEPC-H₂O) folgte die Inkubation mit dem Anti-DIG-HRP-gekoppelten Antikörper (50 µl/Schnitt, 1:300 in Blockingpuffer) für 1 h. Die Schnitte wurden 3x 3 min in TBST gewaschen und zur Signalamplifikation 10 min bei RT mit biotinyliertem Tyramid-Reagenz (50 µl/Schnitt, 1:50 in Amplifikationsdiluent, TSA Biotin Kit) behandelt. Die immobilisierte *Horseradish* Peroxidase (HRP) katalysierte in diesem Schritt die kovalente Bindung des biotinylierten Tyamidreagenzes rund um den Signallokus und führte so zu einer vielfachen Signalamplifikation. Es folgten 3 Waschschrte (je 3 min) in TBST-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte 1 h bei RT mit Streptavidin-HRP-Konjugat (50 µl/Schnitt, 1:100 in Blockierungspuffer) inkubiert. Das tetramere Streptavidin band an die immobilisierten Biotinmoleküle und ermöglichte durch das HRP-Konjugat die Bildung brauner Farbpräzipitate.

2.2.11.4 Waschschritte und Farbreaktion

Nach 3 Waschschritten (je 3 min) in TBST-Puffer wurden die Schnitte in einer DAB-Chromogenlösung (DAKO ChemMate, 50 µl/Schnitt, 1:50 in Chromogenpuffer) unter Sichtkontrolle bis zu 15 min inkubiert, bis die gewünschte Signalintensität erreicht war. Die Reaktion wurde nach 5 min mit Stoppuffer beendet, die Schnitte kräftig mit Aqua bidest. gespült und eine Hämalaun-Gegenfärbung vorgenommen (2–5 min). Die Schnitte wurden für 5 min mit warmem Aqua bidest. gebläut und durch eine aufsteigende Ethanolreihe in DEPC-H₂O (je 1 min in 70%, 90% und 100%) dehydratisiert. Zur vollständigen Entfernung des Alkohols wurden die Schnitte für 1 min in Xylol inkubiert und mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel konserviert.

2.2.11.5 Fotografische Auswertung

Die *in situ* gefärbten Schnittpräparate wurden unter Durchlicht mikroskopisch analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Zur Bildbearbeitung wurden Adobe ® Photoshop und Corel ® Photo Paint benutzt.

2.2.12 Zellkultur

2.2.12.1 Kultur eukaryotischer Zelllinien

Nach dem Auftauen der Zellstocks wurden die Zellen in 10 ml des entsprechenden Mediums (→2.1.6.2.1) resuspendiert und für 2 min bei 270 x g (Rotanta/P) sedimentiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Sediment in 10 ml Medium resuspendiert und die Suspension in Kulturflaschen (Nunc, 25 cm²) überführt. Caco-2-, HepG2-, HEK 293- und SER-W3-Zellen wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ entsprechend der Pufferkapazität der verwendeten Medien kultiviert. Die Zelllinien wurden nach 2–3 Tagen zum ersten Mal passagiert. Hierzu wurden die Caco-2, HepG2 und SER-W3 Zellen nach dem Absaugen des Mediums mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.05% Trypsin/0.02% EDTA) in PBS überschichtet und für 5–7 min unter Kulturbedingungen inkubiert und mit 10 ml Medium abgespült. HEK 293 Zellen wurden direkt mit frischem Medium von der Flaschenoberfläche abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden 2 min bei 270 x g und 4 °C zentrifugiert, in Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen (Nunc, 75 cm²) überführt. Je nach Zelllinie wurde alle 48–72 h ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Zelllinien wurden alle 3–4 Tage im Verhältnis 1 :6 bis 1:10 verdünnt und passagiert. (→ 2.2.12.1).

Von den ersten Passagen einer Zelllinienkultur wurden Zellstocks angelegt. Nach Ablösung der konfluenten Zellen einer Kulturflasche (Nunc, 75 cm²) wurde die Zellsuspension 2 min bei 270 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml des entsprechenden Kulturmediums mit 20% FKS und 10% DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlten Kryoröhrchen aliquotiert und stufenweise auf –80 °C abgekühlt (1 h bei –20 °C, 24 h bei –80 °C), bevor die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

2.2.12.2 Kultur primärer Rattenhepatozyten

2.2.12.2.1 Isolierung von Rattenhepatozyten

Rattenhepatozyten wurden durch *in situ* Kollagenaseperfusion der Leber in Anlehnung an von BERRY und FRIEND (1969) sowie SEGLEN (1976) beschriebene Methoden gewonnen.

Suspensionspuffer (pH 7.6):	66 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1.6 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0.64 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	1.1 mM	KH ₂ PO ₄
	0.7 mM	Na ₂ SO ₄
	30 mM	Hepes
	17 mM	TES
	36 mM	Tricin
Vorperfusionspuffer (pH 7.4):	142 mM	NaCl
	10 mM	Hepes
	6.7 mM	KCl
Kollagenasepuffer (pH 7.6):	66 mM	NaCl
	6.7 mM	KCl
	4 mM	CaCl ₂
	100.7 mM	Hepes

Die zur Perfusion eingesetzten Puffer entsprachen der Vorschrift von SEGLEN et al. (1976). Der pH-Wert aller Lösungen wurde mit 1 N NaOH eingestellt, und die Puffer wurden vor Gebrauch durch Sartolab-P-plus Filterkartuschen (0.2 µm) sterilfiltriert. Kollagenase Typ CLS II (172 I.E./mg) wurde dem sterilen Kollagenasepuffer unmittelbar vor der Perfusion zugesetzt. Die Kollagenasekonzentration betrug 0.6 mg/ml.

Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Pentobarbital (25 mg/ml in 0.9% NaCl-Lösung) narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens wurde die Leber freipräpariert und zur Vermeidung einer intravasalen Blutgerinnung Heparinlösung in die *Vena portae* injiziert (250 I.E. in 0.5 ml). Anschließend wurde der Thorax eröffnet, die *Vena cava inferior* unterhalb des Herzens mit einer lockeren Ligatur angeschlungen und selbige über den rechten Vorhof kanuliert. Nach Fixierung des Katheters mittels der Ligatur wurde das Organ unter Eröffnung der *Vena portae* und Unterbindung der *Vena cava inferior* unterhalb der Leber zunächst für 10 min mit Vorperfusionspuffer bei einer Flußrate von 10 ml/min vollständig blutleer gespült. Anschließend wurde zur Lösung der Zell-Zell-Kontakte die Leber für 10 bis 15 min mit Kollagenaselösung (0.5 mg/ml, entspricht ca. 100 I.E./ml) bei einer Flußrate von 10 ml/min perfundiert. Beide Perfusionslösungen waren auf 37 °C temperiert. Im Anschluß wurde das Organ vorsichtig unter Schonung der Organkapsel

herauspräpariert, mit Suspensionspuffer abgespült und in ein steriles 50 ml Kunststoffröhrchen mit 4 °C kaltem Suspensionspuffer überführt.

Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Eröffnung der Organkapsel wurden die Hepatozyten durch Schwenken mit Suspensionspuffer freigesetzt. Zur groben Entfernung von Zellaggregaten, Bindegewebs- und Kapselbestandteilen wurde die erhaltene Suspension durch ein Nylonnetz der Maschenweite 250 µm filtriert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min in der 5810R Kühlzentrifuge (Eppendorf) bei 40 x g zentrifugiert, um nicht-parenchymale Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das erhaltene Zellsediment in MX-82 Medium + 10 % FKS (HOFFMANN et al., 1989) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch ein Nylonnetz der Maschenweite 60 µm filtriert, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Die Zelldichte wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt, und die Zellvitalität mittels Trypanblau-Ausschluß bestimmt. Dazu wurde der 1:100 verdünnten Zellsuspension ein äquivalentes Volumen einer 0.5%-ige Lösung des Postvitalfarbstoffes Trypanblau zugesetzt. Die Zellvitalität betrug mindestens 90%.

2.2.12.2 Aussaat und Kultur primärer Rattenhepatozyten

PBS (pH 7.4):	136 mM	NaCl
	2.68 mM	KCl
	8.2 mM	Na ₂ HPO ₄
	1.47 mM	KH ₂ PO ₄

Die erhaltene Hepatozytensuspension (→ 2.2.12.2.1) wurde mit MX-82 Medium + 10% FKS (→ 2.1.6.2.2) auf eine Endkonzentration von 0.5×10^6 Zellen eingestellt. Die Kultur der Zellen erfolgte in unbeschichteten Polystyrol-Zellkulturschalen (Nunc) bei 37 °C in einer Atmosphäre von 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte. Die Hepatozyten wurden in einer Dichte von 8.8×10^4 Zellen/cm² ausplattiert (10 ml Suspension/57 cm²) und durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf den Kulturschalen verteilt. Nach einer 2- bis 4-stündigen Anwuchsphase wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit serumfreiem MX-83 Medium weiterkultiviert. Mediumwechsel wurden alle 24 h vorgenommen. Die Zellen wurden für maximal 4 Tage kultiviert. Je nach Versuchsansatz wurden dem Medium verschiedene Effektoren zugegeben.

2.2.12.3 Abbruch der Kultivierung

Zur Präparation von Zellsubfraktionen, Gesamtprotein oder RNA aus Zellkulturen wurde am Ende der gewünschten Kulturdauer das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Platten wurden anschließend entweder direkt den Präparationen zugeführt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.13 Transfektion von Zell-Linien mit Expressionsplasmiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien mit Expressionsplasmiden transfiziert, um die subzelluläre Verteilung des Ratten *Abca5*-Gens zu untersuchen. Am Vortag der Transfektion wurden die Zelllinien dazu passagiert und auf Kulturplatten (21.9 cm²) oder Six-Well-Platten (6 x 9.6 cm²) ausplattiert.

Zur Transfektion wurde das Reagenz Fugene 6 (Roche) benutzt. Gemäß Herstellerprotokoll wurden pro Kulturschale (21.9 cm²) 6–12 µl Fugene 6 in einem Gesamtvolumen von 100 µl serumfreiem DMEM-Grundmedium (→ 2.1.6.2.1) verdünnt und je nach Plasmid 2–4 µg DNA dazugegeben. Zur Bildung des DNA-Lipidkomplexes wurde diese Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, tropfenweise auf die Kulturplatte gegeben und durch leichtes Schwenken sorgfältig verteilt. Für die einzelnen Vertiefungen einer Six-Well-Platte wurde die Hälfte des DNA-Lipidkomplexes angesetzt. Bei jeder Transfektion wurde eine nicht-transfizierte Kontrolle mitgeführt. Das Kulturmedium der Zellen wurden nach ca. 3 h gewechselt und der Verlauf der Transfektion mittels Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet. Spätestens 72 h nach der Transfektion wurde die Kultivierung der Zellen abgebrochen und je nach Bedarf eine Proteinisolierung und -analyse vorgenommen (→ 2.2.14).

2.2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.2.14.1 Subfraktionierung von Zellen

Kerne, Mitochondrien und Plasmamembranen wurden aus Zellhomogenaten durch differentielle Zentrifugation nach einer Modifikation der von SIMPSON et al. (1983) beschriebenen Methode gewonnen.

2.2.14.2 Homogenisation von Zellen

Die vorkultivierten und mit PBS gewaschenen Zellen wurden unter Verwendung eines Gummiwischers mit TES-Puffer von den Kulturplatten geschabt und in ein Glashomogenisationsgefäß (→ 2.2.14.3.2) oder in ein 1.5 ml-Eppendorfgefäß (→ 2.2.14.3.1) überführt. Die Homogenisation erfolgte durch bis zu 45 Hübe bei 1400 UPM des entsprechenden Pistills (Teflon oder Edelstahl). Pro Kultur wurden ein bis zwei Kulturschalen (21.9 cm² oder 56.7 cm²) eingesetzt.

2.2.14.3 Fraktionierung der Zellhomogenate

Je nach Bedarf wurde unterschiedliche Varianten der Zellfraktionierung durchgeführt. Bei der Grobfraktionierung wurden die Zellhomogenate von max. zwei Kulturplatten (21.9 cm²) in Kerne, Mitochondrien und eine die Plasmamembranen enthaltende zytoplasmatische Fraktion aufgetrennt (→ 2.2.14.3.1). Bei der Feinfraktionierung wurden Zellhomogenate von mind. 2 Kulturplatten à 56.7 cm² benutzt, um letztere Fraktion über einen Saccharosegradienten weiter aufzureinigen (→ 2.2.14.3.2).

TES-Puffer (pH 7.4):	20 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	254 mM	Saccharose
	2 Tabl/100 ml	Complete Protease Inhibitor
Saccharosekissen (pH7.4):	20 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	1.12 M	Saccharose
	2 Tabl/100 ml	Complete Protease Inhibitor
TE-Puffer (pH 7.4):	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA

Zur Hemmung von Serin-Proteasen enthielten das Saccharosekissen und der TES-Puffer den Protease-Inhibitor Complete (Mix verschiedener Protease-Inhibitoren von Roche), der als zerstoßene Tablette dem Puffer kurz vor Gebrauch zugesetzt wurde (Alternativ wurde ein 50x Protease Inhibitor Stock in TE-Puffer angesetzt und bei 4 °C aufbewahrt, 1 Tablette/ml TE). Der pH-Wert dieser Lösungen wurde mit 1 N HCl bei 4 °C eingestellt.

2.2.14.3.1 Grobfraktionierung der Zellhomogenate

Das Zellhomogenate von zwei Kulturplatten (21.9 cm²) mit 150 µl TES-Puffer wurden bei 3000 x g und 4 °C 10 min zentrifugiert (22R Kühlzentrifuge, Hettich). Das Sediment wurde in 100 µl TES-Puffer aufgenommen (Kerne), der Überstand wurde bei 10000 x g 30 min zentrifugiert. Das Sediment der zweiten Zentrifugation (Mitochondrien) wurde in 25 µl TES-Puffer resuspendiert und der Überstand als Plasmamembranhaltige Fraktion verwendet.

2.2.14.3.2 Feinfraktionierung der Zellhomogenate zur Anreicherung der Plasmamembranfraktion

Die Zellhomogenate wurden mit TES-Puffer auf ein Volumen von 12 ml aufgefüllt und bei 4 °C für 20 min in einem JA20 Festwinkelrotor bei 12 000 x g zentrifugiert um die zytoplasmatische, mikrosomenhaltige Fraktion von der Plasmamembranen-, Kerne- und Mitochondrien-enthaltenden Fraktion zu trennen. Zur Isolation von Plasmamembranen wurden die Sedimente der 12 000 x g Zentrifugation in 2 ml TES-Puffer resuspendiert, in ein Glashomogenisationsgefäß überführt und durch 12 Hübe des Teflonpistills bei 1400 UPM homogenisiert. Glasgefäß und Pistill wurden anschließend durch 6 Hübe bei 1400 UPM mit 1 ml TES-Puffer gespült und die erhaltene Suspension mit dem Homogenat vereinigt. Dann wurde die Suspension vorsichtig auf ein 38.3%-iges Saccharosekissen geschichtet und einer einstündigen Dichtegradientenzentrifugation bei 4 °C und 100 000 x g in einem SW27 Ausschwingrotor unterzogen. Anschließend wurde die sich in der Interphase zwischen TES-Puffer und Saccharosekissen befindliche, weißliche Plasmamembranfraktion vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, mit 10 mM TE-Puffer verdünnt und erneut für eine Stunde bei 4 °C und 100 000 x g zentrifugiert. Die so erhaltenen Sedimente wurden in 40–100 µl TE-

Puffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.14.4 Isolierung von Gesamt-Proteinextrakten

2.2.14.4.1 Isolierung von Gesamtprotein mit *Lämmli Sample Buffer (LSB) 2x*

Lämmli Sample Buffer (LSB) A 2x (pH 6.8)	119 mM	Tris
	4.76 mM	EDTA
	132 mM	SDS
	2.59 M	Glycerin
	0.0476% (w/v)	Bromphenolblau

Der LSB-Puffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zum Gebrauch wurde er mit 3% (w/v) Dithiothreitol versetzt.

Lysepuffer	1.6 ml	LSB-Puffer A 2x
	48 mg	DTT
	32 μ l	50x Complete-Protease-Inhibitor-Lsg.

Die vorkultivierten und mit PBS gewaschenen Zellen wurden unter Verwendung eines Gummiwischers mit max. $100\text{ }\mu\text{l}/56.7\text{ cm}^2$ -Platte Lysepuffer heruntergeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden zur Inaktivierung der Proteasen 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend 5 min auf Eis abgekühlt, 5 min zur Homogenisierung der Zellsuspension mit Ultraschall behandelt, 5 min bei 95 °C inkubiert, nochmals auf Eis abgekühlt und 10 min bei 21910 x g und 18 °C zentrifugiert (22R Kühlzentrifuge Hettich). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 5 min bei 95 °C inkubiert, 5 min auf Eis abgekühlt, 5 min mit Ultraschall behandelt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Diese Proben wurden ohne Proteinbestimmung im Western Blot eingesetzt und vor dem Auftragen 2 min bei 94 °C denaturiert, kurz auf Eis gekühlt und zentrifugiert.

2.2.14.4.2 Isolierung von Gesamtprotein mit LSB-Puffer ohne DTT und Bromphenolblau

Lämmli Sample Buffer (LSB) B 2x (pH 6.8)	119 mM	Tris
	4.76 mM	EDTA
	132 mM	SDS
	2.59 M	Glycerin

Protease-Inhibitor-Konzentrat 100x 1 Tablette (60 mg) in 500 μ l Aqua bidest.

Vor Beginn des Versuchs wurde der LSB-Puffer 2x im Verhältnis 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt und mit 10 μ l Inhibitor-Konzentrat pro ml Puffer versetzt.

Die vorkultivierten und mit PBS gewaschenen Zellen einer Kulturplatte (21.9 cm²) wurden unter Verwendung eines Gummiwischers mit 2 x 50 µl LSB-Puffer B heruntergeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Inaktivierung der Proteasen wurden die Proben 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend 5 min auf Eis abgekühlt, 5 min mit Ultraschall behandelt, 5 min bei 95 °C inkubiert, nochmals auf Eis abgekühlt und 10 min bei 21910 x g und 18 °C zentrifugiert (22R Kühlzentrifuge Hettich). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 5 min bei 95 °C inkubiert, 5 min auf Eis abgekühlt, 5 min zur Homogenisierung der Zellsuspension mit Ultraschall behandelt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Proteinbestimmung wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 1x LSB-Puffer B verdünnt. Für die Gelauftragung wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 1x LSB-Puffer A versetzt, 2 min bei 94 °C denaturiert, kurz auf Eis gekühlt und zentrifugiert.

2.2.14.5 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Kern-, Mitochondrien-, Plasmamembran- und Gesamtproteinfraktionen wurde in Anlehnung an eine von LOWRY et al. (1951) publizierte Methode bestimmt.

Je nach Fraktion wurden Vorab-Verdünnungen im Verhältnis von 1:2 bis 1:5 vorgenommen und zwischen 2 und 5 µl Proteinlösung eingesetzt. Die Proben wurden in Einmalküvetten mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 50 µl eingestellt und mit jeweils 150 µl NaOH (0.1 N) versetzt. Es erfolgte die Zugabe von je 1 ml Lowry-Gemisch. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:1 mit Aqua bidest. vorverdünnt) zugegeben, die Testansätze gut gemischt und nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT die Absorption bei 578 nm gemessen. Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen.

Die Proteingehalte der Lösungen wurden mittels einer parallel durchgeführten Eichreihe (Eichkonzentrationen 0–25 µg/ml BSA) errechnet. Da Tris-Puffer die Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) beeinflussen kann, wurde jedem Eichwert das für die zu bestimmenden Werte eingesetzte Probenvolumen an TE-Puffer zugesetzt. Das Lowry-Gemisch (189 mM Na₂CO₃/0.6 mM CuSO₄/0.7 mM Kalium-Natrium-Tartrat) wurde für jede Bestimmung frisch aus den folgenden Stammlösungen 1, 2 und 3 in den Volumenanteilen 50 + 1 + 1 zusammenpipettiert.

Lösung 1: 2% (w/v) Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH

Lösung 2: 0.5% (w/v) CuSO₄ x 7 H₂O

Lösung 3: 1% (w/v) Kalium-Natrium-Tartrat

2.2.14.6 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der immunchemischen Detektion im Western Blot wurden die Proteinfraktionen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach dem von LÄMMLI (1970) beschriebenen Verfahren aufgetrennt. Es wurde ein diskontinuierliches

Vertikal-Elektrophoresesystem verwendet. Je nach Anwendung wurden Acrylamidanteile im Trenngel zwischen 7.5% und 12% eingesetzt. Das Sammelgel hatte einen konstanten Acrylamidanteil von 3.9%.

2.2.14.7 Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen

Trenngelpuffer (pH 8.8):	1.5 M	Tris
	14 mM	SDS
Sammelgelpuffer (pH 6.8):	0.5 M	Tris
	14 mM	SDS
Acrylamidlösung 4K (29/1):	4.1 M	Acrylamid
	0.65 M	N,N'-Methylenbisacrylamid

Der pH-Wert von Trenn- und Sammelgelpuffer wurde mit 1 N HCl eingestellt. Die Lösungen konnten bei 4 °C gelagert werden. Ammoniumpersulfat wurde jeweils frisch in einer Konzentration von 0.5 mg/µl Aqua bidest. angesetzt.

SDS-Polyacrylamid-Minigele wurden in einer „Mighty Small SE Dual Gel Caster“-Kammer gegossen (Plattengröße: 83 x 101 mm, Geldicke 1 mm). Zur Herstellung der Gele wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen bis auf N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) zusammenpipettiert und die Mischung für bis zu 2 min im Wasserstrahlvakuum entgast. Anschließend wurde durch Zusatz von TEMED die radikalische Polymerisation gestartet, das Trenngel gegossen und sofort mit 0.5 %-iger SDS-Lösung überschichtet, um unter Luftabschluß eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu gewährleisten.

Trenngel	7.5%	10%	12%
Trenngelpuffer	1.56 ml	1.56 ml	1.56 ml
Aqua bidest.	2.94 ml	2.44 ml	2.04 ml
Acrylamidlösung 29/1	1.5 ml	2.0 ml	2.4 ml
Ammoniumpersulfat (0.5 mg/µl)	12 µl	12 µl	12 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl

Nach ca. 30 min war die Polymerisation abgeschlossen. Nach Entfernung der SDS-Lösung wurde ein Kamm (10 oder 15 Zähne) eingesetzt, Das Sammelgel wurde 90 s entgast, unter Zusatz von TEMED in folgender Zusammensetzung gegossen und ebenfalls für ca. 30 min polymerisiert.

Sammelgel	3.9%
Sammelgelpuffer	520 µl
Aqua bidest	1.22 ml
Acrylamidlösung 29/1	260 µl
Ammoniumpersulfat (0.5 mg/µl)	4 µl
TEMED	2 µl

2.2.14.8 Probenvorbereitung

Lämmli Sample Buffer (LSB) A 2x (pH 6.8)	119 mM	Tris
	4.76 mM	EDTA
	132 mM	SDS
	2.59 M	Glycerin
	0.0476% (w/v)	Bromphenolblau

Der LSB-Puffer A 2x wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zum Gebrauch wurde er mit 3 % (w/v) Dithiothreitol versetzt.

Je nach Probe wurden zwischen 2 und 25 µg Protein mit TE(S)-Puffer auf ein einheitliches Volumen gebracht und mit dem gleichen Volumen an 2x LSB-Puffer A 2x versetzt (insgesamt max. 20 µl). Bei der Untersuchung sehr niedrig konzentrierter Proteinproben wurde 4x-Probenpuffer benutzt. Es wurden verschiedene Molekulargewichtsstandards eingesetzt (→ 2.1.7.9) und stets als Referenz in den Außentaschen des Gels aufgetragen (→ 2.2.14.9.2). Die Proben wurden anschließend für 2 min im Heizblock bei 95 °C denaturiert, für 30 s auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Der Colour Burst Protein-Marker wurde ohne Denaturierung aufgetragen.

2.2.14.9 Elektrophorese

Elektrophoresepuffer 8x (pH 8.4)	0.2 M	Tris
	1.54 M	Glycin
	0.1% (w/v)	SDS

Die Elektrophorese wurde in einer „Mighty Small II“ Vertikal-Elektrophorese-Kammer unter Wasserkühlung und Verwendung eines einheitlichen Puffers durchgeführt. Die Proben wurden mittels Gel Saver-Spitzen aufgetragen und durchliefen das Sammelgel bei einer Stromstärke von 10 mA/Gel in ca. 1 h. Die Dauer der Auftrennung im Trenngel betrug bei 20 mA/Gel ca. 2 h. Nach dem Austritt der Bromphenolblaufront aus dem Gel wurde die Elektrophorese abgebrochen.

2.2.14.10 Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden aufgetrennte Proteine über einen Semidry-Transfer aus dem Gel eluiert und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) immobilisiert, um sie immunologischen Analysen zugänglich zu machen (Western Blotting).

2.2.14.10.1 Semidry-Transfer

Transferpuffer (pH 9.0)	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin
	1.3 mM	SDS
	15% (v/v)	Methanol

Der Puffer wurde vor Gebrauch für 10 min im Ultraschallbad entgast, um der Bildung von Luftblasen während des Transfers vorzubeugen.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran basierte auf einer ursprünglich von KYHSE-ANDERSEN (1984) beschriebenen Methode. Für das Semidry-Verfahren wurde eine Transferkammer mit einer Edelstahlkathode und einer Glas/ Graphitanode benutzt. Im Gegensatz zu dem von KYHSE-ANDERSEN (1984) beschriebenen Verfahren kam ein kontinuierliches Puffersystem zum Einsatz.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde zunächst das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt und das Trenngel für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 10 s in Methanol aktiviert, 5 min in Aqua bidest. gespült und ebenfalls in Transferpuffer für 10 min äquilibriert. Zeitgleich wurden 9 dicke und 2 dünne Filterpapiere (5.2 x 8.3 cm) in Transferpuffer getränkt. Das „Transfer-Sandwich“ wurde nach gleichmäßiger Befeuchtung der Elektroden mit Aqua bidest. wie folgt zusammengesetzt:

ANODE (+) oben

6 Filterpapiere Nr. 2668

1 Filterpapier Nr. 2043

PVDF-Membran

Polyacrylamidgel

1 Filterpapier Nr. 2043

3 Filterpapiere Nr. 2668

KATHODE (-) unten

Luftblasen wurden beim Aufbau des Sandwiches mit einer Gummiwalze entfernt. Der Transfer erfolgte für 1.5 h bei RT oder 4 °C bei einer konstanten Stromstärke von 0.8–1 mA/cm² (ca. 40 mA/Gel).

2.2.14.10.2 Färbungen

Ponceau-S-Färbelösung:	0.25% (w/v)	Ponceau-S
	40% (v/v)	Methanol
	15% (v/v)	Eisessig
Coomassie-Blau-Stammlösung:	1% (w/v)	Coomassie-Brilliantblau R 250
	5% (v/v)	Methanol
	50% (w/v)	Trichloressigsäure
Entfärber-Lösung:	10% (v/v)	Methanol
	7.6% (v/v)	Eisessig

Die Gebrauchslösung wurde durch 1:7 Verdünnung mit 50% (w/v) Trichloressigsäure hergestellt. Die Gebrauchslösung konnte mehrfach verwendet werden. Beide Färbelösungen wurden vor Gebrauch durch Faltenfilter filtriert.

Nach abgeschlossenem Transfer wurde der Bereich der PVDF-Membran, welcher den Molekulargewichtsstandard enthielt, von der restlichen Membran abgetrennt und für 1 min einer Ponceau-S-Proteinfärbung unterzogen. Die Hintergrundfärbung der Membran wurde durch Waschen mit Aqua bidest. entfernt. Die Proteinbanden (rot) wurden zur Molekulargewichtsbestimmung markiert. Um Effizienz und Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen, wurde das Polyacrylamidgel für 5 min in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend ü.N. mittels Entfärber differenziert. Die PVDF-Membran wurde für 10 min in Aqua bidest. gewaschen und entweder für eine spätere Immunreaktion getrocknet oder wie folgt weiterbehandelt.

2.2.14.10.3 Immunchemischer Nachweis

Puffer A (pH 7.4):	10 mM	Tris
	154 mM	NaCl
Puffer B (pH 7.0):	154 mM	NaCl
	7 mM	SDS
	0.5% (w/v)	Triton X 100
	0.5% (w/v)	Rinderserumalbumin
Puffer C	Puffer A mit	
	0.05 % (w/v)	Tween 20

Die PVDF-Membran wurde ü.N. bei 4 °C in Puffer C mit 5% Magermilchpulver (1 g Fett /100 g Granulat) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem horizontalen Schwenken. Die abgesättigte Membran wurde zunächst 3 x 5 min in Puffer A gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper in Puffer C für 1.5 h (nach Bedarf wurde 5% Magermilchpulver zugesetzt). Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper schlossen sich Waschschrte von 2 x 5 min mit Puffer A, 2 x 5 min mit Puffer B und 2 x 5 min mit Puffer A an. Anschließend wurde die Membran für 1.5 h mit sekundärem, peroxidasegekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:8000 bis 1:10000) in Puffer C inkubiert. Die Membran wurde erneut 2 x 5 min mit Puffer A, 2 x 5 min mit Puffer B und 2 x 5 min mit Puffer A gewaschen und mit Filterpapier vorsichtig von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Gleiche Volumina (1–2 ml) des Peroxidasesubstrats Luminol und des Co-Substrates H₂O₂ (Lösungen 1 und 2 des ECL-Systems, Amersham) wurden vermischt und die noch nebelfeuchte Membran unter leichtem Schütteln 5 min darin inkubiert. Überschüssige Substratlösung wurde mit Filterpapier vorsichtig aufgenommen und die feuchte Membran in Frischhaltefolie eingeschweißt. Die unter enzymatischer Umsetzung der Substrate auftretende Chemilumineszenz im Bereich der Immunkomplexe wurde durch Exposition von ECL-Filmen in einer Autoradiographie-Kassette bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Filmschwärzung detektiert. Je nach Intensität waren Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten notwendig. Die optimalen Verdünnungsverhältnisse für die primären Antikörper waren im Vorfeld im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge und zur Verdünnung des sekundären Antikörpers ausgetestet worden (EGFP-Antikörper 1:1000).

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war ein humanes cDNA-Fragment (392 bp) eines putativen neuen Gens aus der Familie der *ATP-binding-cassette* Transporter bekannt (HIRSCH-ERNST et al., 2000). Aufgrund von Homologieanalysen wurde das Genfragment der bisher weitgehend unerforschten ABCA-Subfamilie zugeordnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die vollständige, kodierende Sequenz des Gens zunächst auf experimentellem Weg erschlossen werden.

Das hohe Maß an Sequenzkonservierung zwischen orthologen ABC-Genen verschiedener Spezies legte die Existenz einer Entsprechung von humanem ABCA5 in der Ratte nahe. Dieses sollte ebenfalls identifiziert werden, um für spätere funktionelle Betrachtungen auf verschiedene Zellsysteme zurückgreifen zu können.

3.2 Charakterisierung eines neuen humanen ABCA-Gens

Als experimentelle Basis für die vollständige Sequenzanalyse des neuen ABCA-Gens wurde das 392 bp-Genfragment (AJ275973.1) aus dem Bereich einer ATP-Bindungskassette mittels *one-step* RT-PCR (→ 2.2.6.1.2) aus Gesamt-RNA (→ 2.2.2.4) der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 (Primer HF3, HR6, → 2.1.7.6) amplifiziert und damit die Anwesenheit des Transkripts in diesem Zellmodell bestätigt. Diese RNA wurde in allen weiteren PCR-Reaktionen als Matrize zur Erschließung der kodierenden cDNA-Sequenz des neuen ABCA-Gens benutzt. Zur Ermittlung der Gesamtlänge der bisher unbekanntenen mRNA wurden Northern-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Sie ergaben ein schwaches Signal von 2.6 kb (ohne Abb.), was eine Abweichung zu bisher beschriebenen mRNA-Transkripten für ABCA1 (6.9 kb, LUCIANI et al., 1994) und ABCA4 (7.3 kb, AZARIAN et al., 1997) der ABCA-Subfamilie darstellte.

3.2.1 Isolierung des humanen ABCA5-Gens

Kodierende Gensequenzen von Wirbeltieren weisen besonders in der Nähe des 5'-Terminus und im 5'-untranslatierten Bereich häufig GC-reiche Regionen auf. Während der reversen Transkription im Rahmen eines *RACE*-Experiments führt dies bei Temperaturen < 50 °C zur verstärkten Ausbildung von Sekundärstrukturen, die in einem Abbruch der Reaktion und damit unvollständigen cDNA-Transkripten resultieren können.

Mehrere 5'-*RACE*-Schritte wurden mit AMV Reverser Transkriptase und versetzten genspezifischen Primern bei 55 °C durchgeführt, um intakte cDNAs für den 5'-Terminus des neuen ABCA-Gens zu generieren und mittels PCR zu amplifizieren. Dazu wurde mit einer

DNA-Polymerasemischung gearbeitet, die für die Amplifikation langer cDNA-Bereiche geeignet sein sollte (Long Expand System von Roche). Zwecks Sequenzanalyse wurden alle PCR-Fragmente in den pCR® XL-TOPO-Vektor ligiert und die Plasmide in elektrokompetenten *E. coli* Zellen (→ 2.1.7.2) vermehrt (→ 2.2.5.4). Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus den selektierten Bakterienkolonien (→ 2.2.2.1) erfolgte eine Sequenzierung der Plasmid-Inserts (→ 2.2.7) und eine Kombination der cDNA-Fragmente zu einer kontinuierlichen cDNA zwischen AJ275973.1 und dem Translationsstart (Abb 3.1).

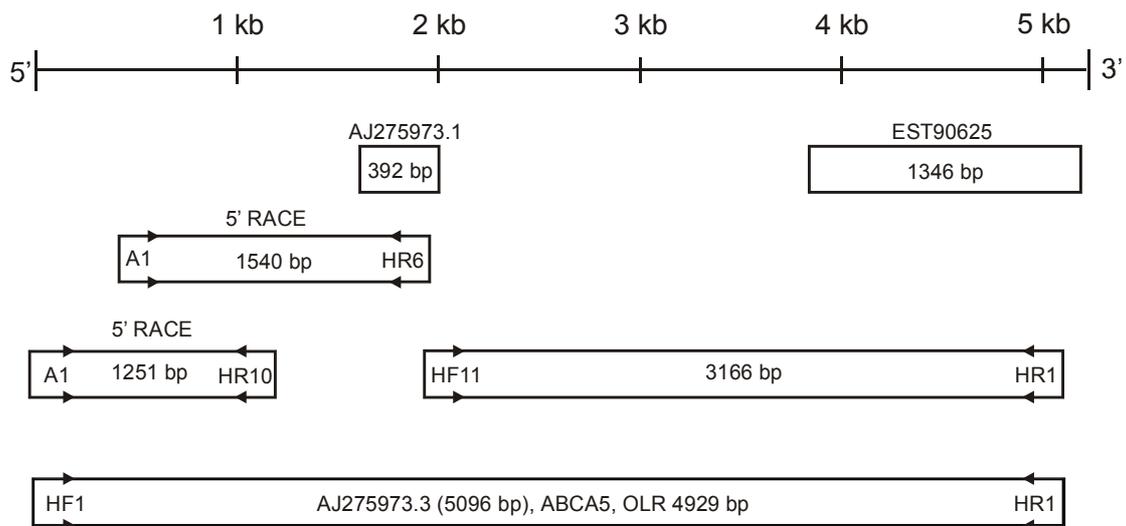


Abb. 3.1 Klonierungs-Strategie für humane *ABCA5*-cDNA. Die vollständige *ABCA5*-cDNA wurde aus mit 5'RACE-generierten und PCR-amplifizierten cDNA-Fragmenten zusammengesetzt. Reverse Transkriptionen erfolgten mit AMV Reverser Transkriptase und Thermoscript (→2.2.6.2f.). A1 ist ein kommerzieller oligo-dT-Ankerprimer, HR1, HR6, HR10 sowie HF1 und HF11 sind *ABCA5*-spezifische Primer (→ 2.1.7.6). bp = Basenpaare, OLR = Offener Leserahmen.

Das Syntheseoptimum der verwendeten reversen Transkriptase lag bei einer maximal möglichen Reaktionstemperatur von 55 °C zwischen 500 und 1500 bp. Infolge dessen stellte sich dieses Enzym als nur bedingt geeignet heraus, den > 3 kb-langen 3'-Terminus ausgehend von AJ275973.1 mit einer 3'-RACE-Reaktion zu erschließen. Diese Methode basierte darauf, cDNA-Transkripte ausgehend vom natürlichen poly-A-Schwanz der mRNA-Spezies mit dem oligo-dT-Ankerprimer A1 (→ 2.1.7.6.1) zu synthetisieren und anschließend in einer PCR-Reaktion mit dem Anker-Primer A2 und einem genspezifischen Primer auf Basis von AJ275973.1 zu amplifizieren. Experimente nach diesem Protokoll führten nicht zu genspezifischen PCR-Produkten.

Homologierecherchen mit dem Blastn-Algorithmus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) zeigten eine starke Ähnlichkeit des identifizierten 5'-Bereichs mit der ersten ATP-Bindungs-

kassette der Sequenz für humanes *ABCA8* (Acc. No. AB020629) von NAGASE et al. (1998) und ergaben, daß die entsprechenden Bereiche beider Gene auf Chromosom 17 lokalisiert waren. Nach einem Vergleich der *ABCA8*-Sequenz mit den Nukleotiddatenbanken von GenBank und EMBL wurden mit EST90625, (1346 bp, Abb. 3.1) von ALLIKMETS et al. (1996) und *KIAA1888* von NAGASE et al. (2001) partielle Sequenzen humaner Gene identifiziert, die miteinander überlappten und einem, dem neuen *ABCA* cDNA-Fragment benachbarten, genomischen Locus auf Chromosom 17 (17q24.3) zugeschrieben wurden. Beide Sequenzen wiesen eine starke Ähnlichkeit zur zweiten ATP-Bindungskassette von *ABCA8* auf (ca. 50% Sequenzhomologie über 1300 bp). Mittels einer PCR zwischen AJ275973.1 und EST90625 mit den Primern HF11 und HR1 (→ 2.1.7.6) wurde die Hypothese bestätigt, daß beide cDNA-Fragmente von verschiedenen Bereichen der gleichen mRNA abstammten (Abb.3.1). Da im Zuge der ABC-Klassifizierung der EST90625-Sequenz bereits das Gensymbol *ABCA5* zugeteilt worden war (BROCCARDO et al., 1999), wurde mit diesem Experiment der 3'-Bereich des humanen *ABCA5* identifiziert. Die vollständig kodierende cDNA-Sequenz von *ABCA5* (AJ275973.3) wurde anschließend gemäß Abb.3.1 amplifiziert und sequenziert. Die experimentell bestätigte cDNA bestand aus 5096 bp, der offene Leserahmen umfaßte 4929 bp inklusive Stopkodon. Dies entspricht einem Polypeptid von 1642 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 180 kDa (Abb. 3.2).

```

1 aacagactgagcgcgtccaggcctgacagctctgcggtcgggcccctgaggtttattcagaaaac 65
-21 Q T E R V Q A - Q L C G S G P E V Y S E N -1
66 atgtccactgcaattagggaggtaggagtttgagacagaccagaacacttctactgaagaatta 130
1 M S T A I R E V G V W R Q T R T L L L K N Y 22
131 cttaattaaatgcagaacccaaaaagagtagtgttcaggaaattctttttccactatttttttat 195
23 L I K C R T K K S S V Q E I L F P L F L 43
196 tttggttaataattagcatgatgccaaataagaatatgaagaagtgcctaataatagaa 260
44 F W L I L I S M M H P N K K Y E E V P N I E 65
261 ctcaatcctatggacaagtttactctttctaatctaatcttggatatactccagtgactaatat 325
66 L N P M D K F T L S N L I L G Y T P V T N I 87
326 tacaagcagcatcatgcagaaagtgtctactgatcatctacctgatgtcataattactgaagaat 390
89 T S S I M Q K V S T D H L P D V I I T E E 108
391 atacaaatgaaaaagaaatgtaaacatccagtcctctctaagccgagcaactttgtagggtgtggtt 455
111 Y T N E K E M L T S S L S K P S N F V G V V 130
456 ttcaaagactccatgtcctatgaacttcgttttttctgatatgattccagtatcttctattta 520
133 F K D S M S Y E L R F F P D M I P V S S I Y 152
521 tatggattcaagagctggctgttcaaaatcatgtgaggctgctcagtagtggctcctcaggtttca 585
155 M D S R A G C S K S C E A A Q Y W S S G F 173
586 cagttttacaagcatccatagatgctgccattatacagttgaagaccaatgtttctctttggaag 650
176 T V L Q A S I D A A I I Q L K T N V S L W K 195
651 gagctggagtcaactaaagctgttattatgggagaaactgctggttagaaatagatacctttcc 715
198 E L E S T K A V I M G E T A V V E I D T F P 217
716 ccgaggagtaattttaataatacctagttatagcattttcaccttttgatactttttggcaattc 780
220 R G V I L I Y L V I A F S P F G Y F L A I 238
781 atatcgtagcagaaaaagaaaaataaaagaatttttaagataatgggacttcatgatact 845
241 H I V A E K E K K I K E F L K I M G L H D T 260
846 gccttttggtttcctgggttcttctatatacaagtttaatttttcttatgtcccttcttatggc 910
263 A F W L S W V L L Y T S L I F L M S L L M A 282
911 agtcattgcgacagcttctttgttatttctctcaaagtagcagcattgtgatatttctgctttttt 975
285 V I A T A S L L F P Q S S S I V I F L L F 303
976 tcctttatggattatcatctgtatttttgctttaatgctgacacctctttttaaaaaatcaaaa 1040
306 F L Y G L S S V F F A L M L T P L F K K S K 325
1041 catgtgggaatagttgaattttttgttactgtggcttttgattttattggccttatgataatcct 1105

```

328 H V G I V E F F V T V A F G F I G L M I I L 347
 1106 catagaaagttttcccaaatcgtagtggtgcttttcagtcctttctgtcactgtacttttgtga 1170
 350 I E S F P K S L V W L F S P F C H C T F V 368
 1171 ttggatttgacaggtcatgcatttagaagattttaatgaaggtgcttcattttcaaatttgact 1235
 371 I G I A Q V M H L E D F N E G A S F S N L T 390
 1236 gcaggccatatacctctaattattacaattatcatgctcacacttaatagtatattctatgtcct 1300
 393 A G P Y P L I I T I I M L T L N S I F Y V L 412
 1301 cttggctgtctatcttgatcaagtcattccaggggaatttggcttacggagatcatctttatatt 1365
 415 L A V Y L D Q V I P G E F G L R R S S L Y 434
 1366 ttctgaagccttcatattggtcaaagagcaaaagaattatgaggagttatcagagggcaatggt 1430
 436 F L K P S Y W S K S K R N Y E E L S E G N V 456
 1431 aatggaaatattagtttttagtgaaattattgagccagtttcttcagaattttagtagaaaagaagc 1495
 456 N G N I S F S E I I E P V S S E F V G K E A 478
 1496 cataagaattagtggtattcagaagacatacagaagaaggggtgaaaatgtggaggctttgagaa 1560
 478 I R I S G I Q K T Y R K K G E N V E A L R 497
 1561 atttgtcatttgacatatatgaggggtcagattactgccttacttggccacagtggacaggaag 1625
 499 N L S F D I Y E G Q I T A L L **G H S G T G K** 519
Walker A
 1626 agtacattgatgaatattctttgtggactctgccaccttctgatgggtttgcatctatatatgg 1690
 521 **S T** L M N I L C G L C P P S D G F A S I Y G 543
W.A.
 1691 acacagagtctcagaaatagatgaaatgtttgaagcaagaaaaatgattggcatttgtccacagt 1755
 545 H R V S E I D E M F E A R K M I G I C P Q 564
 1756 tagatatacactttgatgttttgacagtagaagaaaatttatcaattttggcttcaatcaaaggg 1820
 566 L D I H F D V L T V E E N L S I L A S I K G 586
 1821 ataccgcaacaataatacaagaagtgacagaaggttttactagatttagacatgcagactat 1885
 588 I P A N N I I Q E V Q K V L L D L D M Q T I 608
 1886 caaagataaccaagctaaaaaattaagtgggtgggtcaaaaaagaaagctgtcattaggaattgctg 1950
 610 K D N Q A K K **L S G G Q** K R K L S L G I A 629
Signatur-Sequenz
 1951 ttcttgggaacccaaagatactgctgctagatgaaccaacagctggaatggaccctgttctoga 2015
 631 V L G N P K I **L L L D E P T A G M D** P C S R 651
Walker B
 2016 catattgtatggaatcttttaaaatacagaaaagccaatcgggtgacagtgttcagtactcattt 2080
 653 H I V W N L L K Y R K A N R V T V F S T H F 673
 2081 catggatgaagctgacattcttgcagatagaaaagctgtgatatacacaaggaatgctgaaatgtg 2145
 675 M D E A D I L A D R K G A V I S Q G M L K C 694
 2146 ttggttctcaatggttctcctcaaaagtaatrgkgagctaccgcctgagcatgtacatagac 2210
 696 V G S S M F L K S K W G I G Y R L S M Y I D 716
 2211 aatattgtgccacagaatctctttcttactggttaaacaacatatacctggagctactttatt 2275
 718 K Y C A T E S L S S L V K Q H I P G A T L L 738
 2276 acaacagaatgaccaacaacttgtgtatagcttgcctttcaaggacatggacaaattttcaggtt 2340
 740 Q Q N D Q Q L V Y S L P F K D M D K F S G 759
 2341 tgttttctgccctagacagtcattcaaatttgggtgtcatttcttatgggtgtttccatgacgact 2405
 761 L F S A L D S H S N L G V I S Y G V S M T T 787
 2406 ttggaagacgtattttaagctagaagvtgaagcagaattgaccaagcagattatagtgtatt 2470
 789 L E D V F L K L E V E A E I D Q A D Y S V F 809
 2471 tactcagacgccactggaggaagaaatggattcaaaatcttttgatgaaatggaacagccttac 2535
 811 T Q Q P L E E E M D S K S F D E M E Q S L 830
 2536 ttattctttctgaaaccaaggcttctctagtgagcaccatgagcctttggaaacaacagatgat 2600
 832 L I L S E T K A S L V S T M S L W K Q Q M Y 851
 2601 acaatagcaagtttcatctttaccttgaaacgtgaaagtaaatcagtgagatcagtggtgct 2665
 853 T I A K F H F F T L K R E S K S V R S V L L 873
 2666 tctgcttttaattttttcacagttcagatttttatgtttttggttcatcactcttttaaaaatg 2730
 875 L L L I F F T V Q I F M F L V H H S F K N 894
 2731 ctgtggttcccataacttgttccagacttatattttctaaaacctggagacaaaccacataaa 2795
 896 A V V P I K L V P D L Y F L K P G D K P H K 916
 2796 tacaaaacaagtctgcttcttcaaaattctgctgactcagatatcagtgatcttattagcttttt 2860
 918 Y K T S L L L Q N S A D S D I S D L I S F F 938
 2861 cacaagccagaaacataatgggtgacgatgattaatgacagtgactatgtatccgtggctcccata 2925
 940 T S Q N I M V T M I N D S D Y V S V A P H 959
 2926 gtgcggtttaaagtgtgatgcattcagaaaaggactatgtttttgcagctgttttcaacagtact 2990
 961 S A A L N V M H S E K D Y V F A A V F N S T 987
 2991 atggtttattctttacctatattagtgaaatcattagtaactactatctttatcatttaaatgt 3055
 989 M V Y S L P I L V N I I S N Y Y L Y H L N V 1009
 3056 gactgaaacccatccagatctggagtagccattctttcaagaaattactgatatagtttttaaaa 3120

1011 T E T I Q I W S T P F F Q E I T D I V F K 1030
3121 ttgagctgtattttcaagcagctttgcttggaaatcattggttactgcaatgccaccttactttgcc 3185
1032 I E L Y F Q A A L L G I I V T A M P P Y F A 1052
3186 atggaaaatgcagagaatcataagatcaaagcttataactcaacttaactttcaggtcttttgcc 3250
1054 M E N A E N H K I K A Y T Q L K L S G L L P 1072
3251 atctgcataatggattggacaagctgttggatgatcccttattttttatcattcttattttga 3315
1076 S A Y W I G Q A V V D I P L F F I I L I L 1083
3316 tgctaggaagcttattggcatttcattatggattatatttttataactgtaaagttccttgctgtg 3380
1087 M L G S L L A F H Y G L Y F Y T V K F L A V 1105
3381 gttttttgcttattgggtatgttccatcagttattctgttccacttataattgcttctttcacctt 3445
1109 V F C L I G Y V P S V I L F T Y I A S F T F 1127
3446 taagaaaatttttaataccaagaatttttggctatttatctattctgtggcagcgttggcttga 3510
1131 K K I L N T K E F W S F I Y S V A A L A C 1148
3511 ttgcaatcactgaataacttttctttatgggatacacaattgcaactattcttcattatgccttt 3575
1152 I A I T E I T F F M G Y T I A T I L H Y A F 1170
3576 tgtatcatctccaatctatccacttctaggttgcctgatttctttcataaagatttcttggaa 3640
1174 C I I I P I Y P L L G C L I S F I K I S W K 1192
3641 gaatgtacgaaaaaatgtggacacctataatccatgggataggctttcagtagctgttatatcgc 3705
1196 N V R K N V D T Y N P W D R L S V A V I S 1213
3706 cttacctgcagtgtgtactgtggattttccttacaataactatgagaaaaaatatggaggcaga 3770
1217 P Y L Q C V L W I F L L Q Y Y E K K Y G G R 1235
3771 tcaataagaaaagatccctttttcagaaacctttcaacgaagtctaaaaataggaagcttcaga 3835
1239 S I R K D P F F R N L S T K S K N R K L P E 1257
3836 acccagacaatgaggatgaagatgaagatgtcaaagctgaaagactaaaggtcaaagagctga 3900
1261 P P D N E D E D E D V K A E R L K V K E L 1278
3901 tgggttgccagtggtgtgaggagaaacctccattatggctcagcaatttgcataaagaatatgat 3965
1282 M G C Q C C E E K P S I M V S N L H K E Y D 1300
3966 gacaagaaaagattttcttttcaagaaaagtaagaaagtggaactaaatacatctctttctg 4030
1304 D K K D F L L S R K V K K V A T K Y I S F C 1322
4031 tgtgaaaaaaggagagatcttaggactattgggtccaaatgggtgctggcaaaagcacaattatta 4095
1326 V K K G E I L G L L **G P N G A G K S T** I I 1343

Walker A

4096 atattctggttggtgatattgaaccaacttcaggccagatatttttaggagattattcttcagag 4160
1347 N I L V G D I E P T S G Q I F L G D Y S S E 1365
4161 tcaagtgaagatgatgattcactgaagtgtatgggttactgtcctcagataaacctttgtggcc 4225
1369 S S E D D D S L K C M G Y C P Q I N P L W P 1387
4226 agatactacattgcaggaacattttgaaatttatggagctgtcaaaggaatgagtgcaagtgaca 4290
1391 D T T L Q E H F E I Y G A V K G M S A S D 1408
4291 tgaagaagtcataagtcgaataacacatgcacttgattttaaagaacatcttcagaagactgta 4355
1412 M K E V I S R I T H A L D L K E H L Q K T V 1430
4366 aagaaactacctgcaggaatcaaacgaaagtgtggttttgcctaaagtatgctagggaaatcctca 4420
1434 K K L P A G I K R K L C F A L S M L G N P Q 1452
4431 gattactttgctagatgaaccatctacaggtatggatcccaaagccaaacagcacatgtggcgag 4485
1456 I T **L L D E P S T G M D P** K A K Q H M W R 1473

Walker B

4496 caattcggactgcattttaaacaagcagaaagcggctgctattctgaccactcactatattggaggag 4550
1477 A I R T A F K N R K R A A I L T T H Y M E E 1495
4561 gcagaggctgtctgtgatcgagtagctatcatgggtgtctgggcagttaagatgtatcggaacagt 4615
1499 A E A V C D R V A I M V S G Q L R C I G T V 1517
4626 acaacatctaaagagtaaatggaaaaggctactttttggaaattaattgaaggactggatag 4680
1521 Q H L K S K F G K G Y F L E I K L K D W I 1538
4691 aaaacctagaagtagaccgccttcaaagagaaattcagtatattttcccaatgcaagccgctcag 4745
1542 E N L E V D R L Q R E I Q Y I F P N A S R Q 1560
4756 gaaagttttcttctattttggcttataaaaattcctaaggaagatgttcagtcctttcacaatc 4810
1564 E S F S S I L A Y K I P K E D V Q S L S 1582
4821 ttttttaagctggaagaagctaaacatgcttttgccattgaagaatatagcttttctcaagcaa 4875
1586 F F K L E E A K H A F A I E E Y S F S Q A 1603
4886 cattggaacaggtttttgtagaactcactaaagaacaagaggaggaagataatagttgtggaact 4940
1607 T L E Q V F V E L T K E Q E E E D N S C G T 1625
4951 ttaaacagcacacttttgggtgggaacgaacacaagaagatagagtagtatttt**tga**attttgtattgt 5005
1629 L N S T L W W E R T Q E D R V V F - 1642
5016 tcggtctgcttactgggacttctttcttttcttacttaatttttaactttggtttaaaaagttttt 5070
5071 attggaatggtaactggagaaccaag 5096

Abb. 3.2 Nukleotidsequenz der isolierten cDNA des *ABCA5*-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens. Die Sequenz des kodierenden Stranges der cDNA ist in Kleinbuchstaben angeführt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist unterhalb der Nukleotidsequenz angeordnet. Das Startkodon (atg), das Stopkodon (tga) und die charakteristischen Motive der Nukleotidbindungskassetten (Walker A, Signatur-Sequenz und Walker B) sind fett markiert und mit Rahmen hervorgehoben. Die Numerierung entspricht dem Genbank-Eintrag AJ275973.3.

3.2.2 Genomische Struktur von *ABCA5*

Die in dieser Arbeit identifizierte *ABCA5* cDNA von 5096 bp repräsentiert eins von bisher mehr als 30 verschiedenen, teilweise unvollständigen cDNA-Transkripten. Eine BLAST-Strukturanalyse des humanen Genoms ergab die Aufteilung der kodierenden Sequenz in 39 Exons, die sich über eine genomische Region von ca. 80 kb auf dem Chromosom 17q24.3 erstrecken (Abb.3.3).

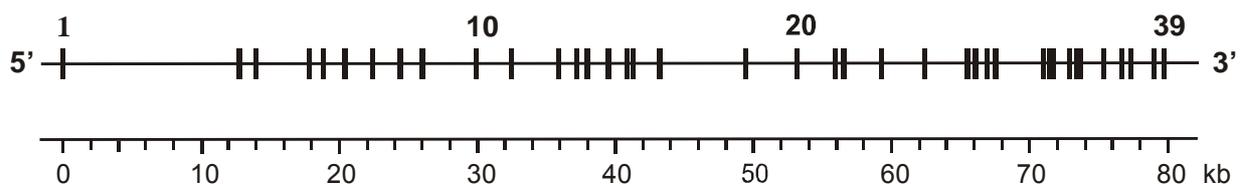


Abb. 3.3 Genomische Organisation des *ABCA5*-Gens in der Chromosomalregion 17q24.3. Die Exons sind in aufsteigender Reihenfolge vom 5'-Terminus nummeriert und werden trotz der Größenunterschiede als gleich große schwarze Balken gekennzeichnet. Das Exon-Intron-Schema ist mit einer metrischen Skala unterlegt.

Die individuellen Exongrößen variierten zwischen 52 bp und 233 bp, die Intronlängen zwischen 96 bp und 12678 bp, wobei sich das größte Intron zwischen Exons 1 und 2 befand (Tabelle 3.1). In Exon 2 wurde mit dem Sequenzmotiv AAC**ATG**T (Nukleotide 63–68 in AJ275973.3) ein Signal detektiert, das nach KOZAK (1986) dem Konsensusmotiv für den eukaryotischen Translationsstart entspricht.

Im Abstand von nur 7 bp zum 3'-Terminus von Exon 37 wurde eine unvollständige Variante dieses Exons (genannt Exon 37') detektiert, dessen Transkription zu einem vorzeitigen Translationsabbruch und damit zu einem verkürzten Proteinprodukt (1608 Aminosäuren) führen würde.

Exon	Exonlänge in bp	Intronlänge in bp	Exon	Exonlänge in bp	Intronlänge in bp
1	52	12678	21	130	409
2	120	1015	22	141	2548
3	207	3668	23	122	3079
4	163	892	24	175	2984
5	91	1324	25	116	357
6	233	1908	26	153	711
7	151	1760	27	77	540
8	191	1427	28	93	3421
9	152	3776	29	129	305
10	172	2476	30	121	96
11	61	3329	31	98	1050
12	112	1177	32	175	445
13	179	564	33	77	125
14	120	1424	34	102	1701
15	141	1297	35	121	1124
16	96	182	36	152	486
17	144	1818	37	86	1582
18	127	6109	37'	80	1496
19	206	3507	38	60	614
20	175	2669	39	212	

Tabelle 3.1 Intron-Exon-Organisation für das ABCA5-Gen des Menschen (AJ275973.3).

Die Strukturanalyse wurde mit dem BLAST-Genom-Programm durchgeführt. Die Exons sind fortlaufend numeriert, das zugehörige Intron folgt dem entsprechenden Exon. Exons 37 und 37' sind auf dem Genom nebeneinander angeordnet. Das Signal für den Translationsstop befindet sich in Exon 39 und beginnt an Position 4992. Die vorhergesagten Exongrenzen überlappen um bis zu 16 bp.

3.2.3 Identifizierung einer ABCA5-Splicevariante ABCA5 V20+16

Im Rahmen der Sequenzanalyse verschiedener ABCA5 cDNA-Klone wurde ein neues ABCA5-Transkript mit einer 16 bp-Insertion detektiert (ABCA5 V20+16). Es wurde angenommen, daß es sich dabei um ein Produkt eines alternativen Splice-Ereignisses während der RNA-Prozessierung handelte. Der 3'-Terminus des Exons 20 ist um 16 bp der nachfolgenden Intronsequenz verlängert, woraus eine Verschiebung des offenen Leserahmens und

ein vorzeitiger Abbruch der Translation nach 2775 bp in bezug auf das Startkodon resultierten (Abb. 3.4).

Die cDNA-Sequenz der neuen *ABCA5*-Splicevariante wurde durch ein unabhängiges RT-PCR-Experiment mit insertionsspezifischen Primern (HSV R1, → 2.1.7.6.5, F1, → 2.1.7.6.1) an Gesamt-RNA aus HepG2-Zellen und humaner Leber bestätigt und in der Datenbank unter der *Accession Number* AJ512612 abgelegt. In Datenbankrecherchen wurden zwei weitere, die identische Insertion tragende, Teilsequenzen aus humanem Leber- (AV653472) und Kleinhirn-Gewebe (AK094416.1) identifiziert. Darüber hinaus enthielt AK094416.1 eine zusätzliche 31 bp-Insertion am 3'-Terminus von Exon 23.

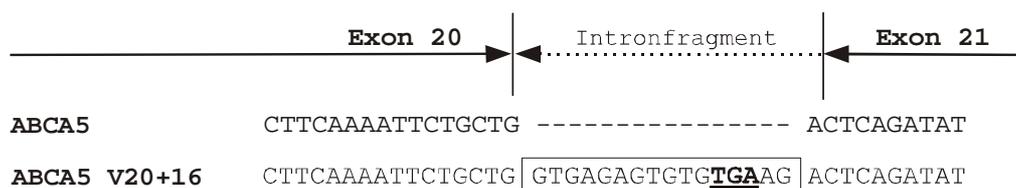


Abb. 3.4 Ausschnitt aus der *ABCA5*-cDNA in der Region zwischen Exons 20 und 21. Die 16 bp-Insertion (Rahmenbox) führt bei dem alternativen *ABCA5*-cDNA-Transkript (*ABCA5 V20+16*) zu einem vorzeitigen Stopkodon (TGA) und somit zu einem Translationsabbruch nach 2775 bp.

3.2.4 Isolierung des orthologen *Abca5*-Gens der Ratte

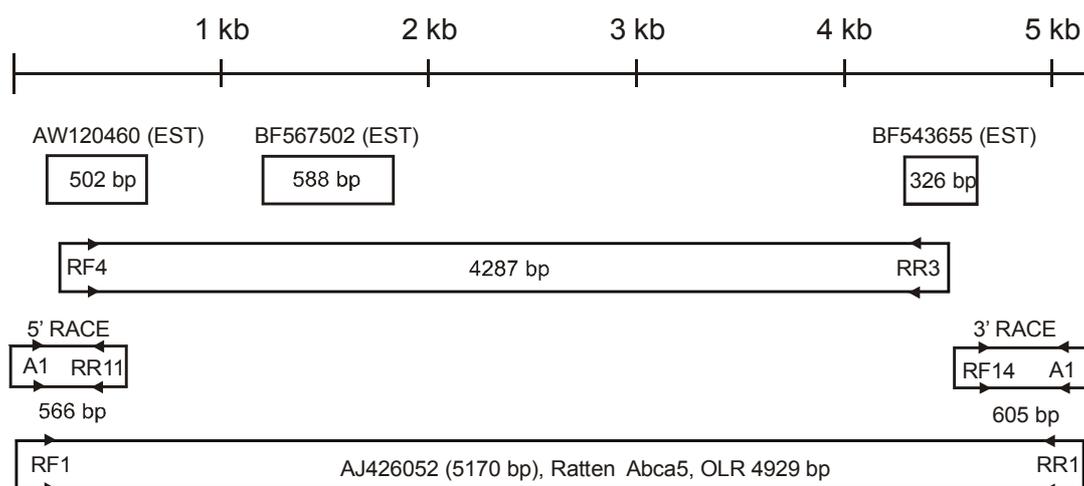


Abb.3.5 Klonierungsstrategie für die *Abca5*-cDNA der Ratte (*rAbca5*). Die vollständige *rAbca5*-cDNA wurde aus mit 5'/3' RACE-generierten und PCR-amplifizierten cDNA-Fragmenten zusammengesetzt. Reverse Transkriptionen erfolgten mit AMV Reverser Transkriptase und Thermoscript (→ 2.2.6.2f.). A1 ist ein kommerzieller

oligo-dT-Ankerprimer, RF1, RF4, RF14 sowie RR3 und RR11 sind *rAbca5*-spezifische Primer (→ 2.1.7.6). bp = Basenpaare, OLR = Offener Leserahmen.

BROCCARDO et al. (1999) beschrieben schon für die ersten ABCA-Gene (ABCA1, ABCA4) einen hohen Konservierungsgrad zwischen verschiedenen Säugetier-Spezies. Auf Grundlage der humanen ABCA5-cDNA (*hABCA5*) wurden daher Datenbankrecherchen nach cDNA-Fragmenten eines orthologen Gens der Ratte durchgeführt. Zwei ESTs der Ratte (BF567502, BF543655) und ein EST der Maus (AW120460) zeigten Sequenzhomologien zu *hABCA5* von > 86%. Sie wurden zur Generierung sequenzspezifischer Primer verwendet, um mittels PCR zu überprüfen, ob diese EST-Sequenzen von einem zu *hABCA5* orthologen Gen der Ratte abstammten. Mit den Primern RF4 und RR3 (→ 2.1.7.6) wurde ein cDNA-Produkt von 4287 bp amplifiziert (Abb. 3.5). Nach Klonierung des Fragments in den pCR® XL-TOPO-Vektor und anschließender Sequenzanalyse wurde die Existenz eines neuen *Abca5*-Gens der Ratte bestätigt (*rAbca5*). Mittels RACE-PCR mit den Primern A1, RR11 und RR14 (→2.1.7.6) erhielt man zwei cDNA-Fragmente (566 bp und 605 bp), die zur Vervollständigung des 5'- bzw. 3'-Terminus' dienten.

Im 3'-untranslatierten Bereich des *rAbca5*-Gens wurde 188 bp abwärts des Translationsstops ein putatives Polyadenylierungssignal (Poly-AS) **AATAAA** detektiert, obwohl nach BEAUDOING et al. (2000) die Existenz weiterer Polyadenylierungsloki im 3'-Terminus der mRNA nicht ausgeschlossen werden konnte. Gemäß Abb. 3.5 wurde die vollständig kodierende cDNA-Sequenz des *Abca5*-Gens der Ratte (Genbank Accession Number AJ426052) amplifiziert und sequenziert. Die experimentell bestätigte cDNA bestand aus 5170 bp, der offene Leserahmen umfaßte mit dem Stopkodon 4929 bp. Dies entsprach einem Polypeptid von 1642 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 180 kDa.

```

1  cgcttcagcggagagagtaagctgacctagaaaaatgctactgcaattagggatgtggcgctt  65
   L Q R R E - A D L E N M A T A I R D V G V  10
66  tggagacagaccagaacacttcttctgaagaattacctcgtcaaatgcaggactaaaagagtag  130
11  W R Q T R T L L L K N Y L V K C R T K K S S  32
131  tgttcaggaaattcttttctctatcttttcttattttggctgatattaattagcatgatgcac  195
32  V Q E I L F P L F F L F W L I L I S M M H  43
196  caaataagaatatgaagaagtatctgatatagaactcagccctatggacaaatccatcctttcc  260
44  P N K K Y E E V S D I E L S P M D K S I L S  65
261  aacctatcctggggtagactccagtgactaataactacaagcagcgtcatgcagagagtttctac  325
66  N L I L G Y T P V T N T T S S V M Q R V S T  87
326  cgatcatcttcccagcgttctagttactgaagaatacgcagtgagagaggagctgctggcatcca  390
88  D H L P D V L V T E E Y A S E K E L L A S  108
391  gtttgcctaagcccagcaacttctggtgggttttcaaagacgtcatgtcctatgaatgctg  455
109  S L S K P S N F V G V V F K D V M S Y E L R  130
456  ttttttctgatatggttccagtgcttctgtttatatggattcaagagcaggctgttcaaagtc  520
131  F F P D M V P V S S V Y M D S R A G C S K S  152
521  atgtgatgctgctcagtagcttctcagggtttacagctttacaggcctcaatagatgctgcca  585
153  C D A A Q Y W S S G F T A L Q A S I D A A  173
586  ttatacagttgaagaccaatgtttctctgtggagggagctggagtcaccaaagctgtcatcatg  650

```

174	I I Q L K T N V S L W R E L E S T K A V I M	195
651	ggggaagctgCGGtCGTGGagattgacacctcccacgaggggtcatcctcatctacctcgat	715
196	G E A A V V E I D T F P R G V I L I Y L V I	217
218	agccttctCGccttcgggtactttctggcaattcacattgtagcagaaaaggaaaagggttaa	780
716	A F S P F G Y F L A I H I V A E K E K R L	238
781	aggagttttaaagataatgggacttcacgacactgctttttggctgctcctgggtcctctgtac	845
239	K E F L K I M G L H D T A F W L S W V L L Y	260
846	acgagttgatcttccttatgtcccttcttatggcctgattgcaacagecgtcctcgttattccc	910
261	T S L I F L M S L L M A V I A T A S S L F P	282
911	tcagagtagcagcatcgatgtttttctgctcttctcctgtacggattgcatctgtgtttttg	975
283	Q S S S I V I F L L F F L Y G L S S V F F	303
976	ctttaatgttgacgcctcttttttaaaaaatcaaagcacgtgggagtcggtgagttttttgtcacc	1040
304	A L M L T P L F K K S K H V G V V E F F V T	325
1041	gtgggtgtttggctttgtcggcctgttgatgctcctcgtagaaaagtttccccaggtcgctagtgtg	1105
326	V V F G F V G L I V L I V L V E S F P R S L V W	347
1106	gctcttcagtcctttgtgtcagtgCGcctttctgattgggattgcacaggtcatgcattagaag	1170
348	L F S P L C Q C A F L I G I A Q V M H L E	368
1171	atltcaatgaaggagccttattttctagtttgactgaaggccctaccgctaattatcaccctt	1235
369	D F N E G A L F S S L T E G P Y P L I I T L	390
1236	accatgctcgtctcggacagtggttctatgcctgctggctgtgtaccttgatcaggtcatccc	1300
391	T M L A L D S V F Y A L L A V Y L D Q V I P	412
1301	aggggaatttggcttgaggaggtcatctttgtacttccaaagccatcatattggtcaaaaaaca	1365
413	G E F G L R R S S L Y F L K P S Y W S K N	433
1366	aaagaaactaaaggagctatcagagggcaacatcaatgggaatattagtctcaatgaaattgtt	1430
434	K R N Y K E L S E G N I N G N I S L N E I V	455
1431	gagcccgtttcttcagaatttataggaaaagaagctataagaataagtggtattcagaaaagccta	1495
456	E P V S S E F I G K E A I R I S G I Q K A Y	477
1496	taggaagaagaatgagaccgtggaggctttgagaaatgtcgtttgacatctatgaaggccaga	1560
478	R K K N E T V E A L R N L S F D I Y E G Q	498
1561	ttactgctcgtcgtggccacagtggaacaggaaaaagcacactaatgaatattctgtgtggactg	1625
499	I T A L L G H S G T G K S T L M N I L C G L	520
Walker A		
1626	tgcccaccttctgatgggtttgcttctatataatggacacagagtcctctgaaatagatgaaatgtt	1690
522	C P P S D G F A S I Y G H R V S E I D E M F	542
1691	tgaagcgaggaatgattggcatatgtccacagtcagatatgaactttgatgtctgacagtag	1755
543	E A R K M I G I C P Q S D M N F D V L T V	563
1756	aagaaaatttatcaatttttggcttcagtcaaaggaataaccagccaacaacataattcaggaagta	1820
564	E E N L S I L A S V K G I P A N N I I Q E V	585
1821	cagaaagtttactggattttggacatgcaagccatcaaagataatcaagcgaaaaaactaagtgg	1885
586	Q K V L L D L D M Q A I K D N Q A K K L S G	607
Signatur-		
1886	tggccaaaagagaaagctgtcttttaggaattgcagttcttgggaatccaagatcctcctgctag	1950
608	G Q K R K L S L G I A V L G N P K I L L L	628
Sequenz W.B.		
1951	atgagccgacagcaggaatggaccctgctcctcgcacattggtttggaatcttctcaagtacagg	2015
629	D E P T A G M D P C S R H I V W N L L K Y R	650
Walker B		
2016	aaggctaaccgagtgacagtccttcagcactcattcatggatgaggccgacattcttgccgacag	2080
651	K A N R V T V F S T H F M D E A D I L A D R	672
2081	gaaagctgtcatatcacaaggaatgctgaaatgtgttggttcttcaattttctgaaaagtaaat	2145
673	K A V I S Q G M L K C V G S S I F L K S K	693
2146	ggggaatcggctaccgctcgtgagcatgtatatagacaggtactgtgccacagagtcgctcctcgtc	2210
694	W G I G Y R L S M Y I D R Y C A T E S L S S	715
2211	ctggttagacagcacatccctgCGcctcgtcgtcgcagcagaatgaccagcagattgtctatag	2275
716	L V R Q H I P A A A L L Q Q N D Q Q I V Y S	737
2276	cttgccttcaaagacatggacaaaatttcaggctgttttctgctctagacattcattcaaac	2340
738	L P F K D M D K F S G L F S A L D I H S N	758
2341	tgggtgtaatttcttatgggtgtttccatgacgacattggaagacgtgtttttaaagctagaagtt	2405
759	L G V I S Y G V S M T T L E D V F L K L E V	780
2406	gaagcagaaatgaccaagcagattatagtgtatttaccagcagccacgggaggaagaacaga	2470
781	E A E I D Q A D Y S V F T Q Q P R E E E T D	802
2471	ttcaaagcttttgatgaaatggaacagagtttacttattctcctgaaaccaagcttctctag	2535
803	S K S F D E M E Q S L L I L S E T K A S L	823
2536	tgagccatgagtcctcgtggaagcagcaagtatctacaatagcaaagtttcttctcactg	2600
824	V S T M S L W K Q Q V S T I A K F H F L S L	845
2601	aagcgagaaagcaaatcagtgCGcctcgtgtgtcctcgtctttaaattttttttgagttcagat	2665

846 K R E S K S V R S V L L L L L I F F A V Q I 877
2666 ttttatgtttttgggtccatcattcttttaaaatgctgtgggtcccatcaagctcgttccagact 2730
878 F M F L V H H S F K N A V V P I K L V P D 898
2731 tgtattttctaaaacctggagataaacctcataaatacaaaaacaagcctgctgcttcaaaattct 2795
899 L Y F L K P G D K P H K Y K T S L L L Q N S 920
2796 actgattcagatatcaatgatcttattgactttttcacacagcagaacataaattgtggccatggt 2860
921 T D S D I N D L I D F F T Q Q N I I V A M F 942
2861 taatgacagtgactatgtgtctgctgctcctcatagtgcggctctcaatgtgggtgcagtcagaaa 2925
943 N D S D Y V S A A P H S A A L N V V Q S E 963
2926 aggactatgtttttactgctgtttttcaacagtactatggttttattctttgccagtaatgatgaac 2990
964 K D Y V F T A V F N S T M V Y S L P V M M N 985
2991 atcattagtaactactatctctatcatttaaatgtgactgacactatccagatctggagtacccc 3055
986 I I S N Y Y L Y H L N V T D T I Q I W S T P 1007
3056 gttcattcaggaaattactgacattgtttttaaagttgagctatattttcaagcagctttgtgctt 3120
1008 F I Q E I T D I V F K V E L Y F Q A A L L 1028
3121 gaatcattgttactgcaatgccaccttactttgccatggaaaatgcagagaatcataagatcaaaa 3185
1029 G I I V T A M P P Y F A M E N A E N H K I K 1050
3186 gcttacctcagcttaaaactttcaggtcttttgccatccgcctactggattggacaggtgtggt 3250
1051 A Y T Q L K L S G L L P S A Y W I G Q A V V 1072
3251 ggacattcccctgtttttgttctgactttgatgctgggaagtttatttgcctttcatcacg 3315
1073 D I P L F F V V L T L M L G S L F A F H H 1093
3316 gactgtatttttatcctgtaaagtttcttgcctcattgcttattgtgcccctcg 3380
1094 G L Y F Y P V K F L A V V F C L I A Y V P S 1115
3381 gttattctgttacttatatagcttctgcttcaacctttaagaaaattttaataccaaggaatttg 3445
1116 V I L F T Y I A S F T F K K I L N T K E F W 1137
3446 gtcatttatctattctgtgacagcattggcttgtgtcgcagtcacggaaataactttctttctgg 3510
1138 S F I Y S V T A L A C V A V T E I T F F L 1158
3511 ggtatggagttacggctgtttttcattacaccttctgcatagccatccaatctaccgctcctg 3575
1159 G Y G V T A V F H Y T F C I A I P I Y P L L 1180
3576 ggttgcctgatttctttcataaaggggttcttggagaataatacaaaaactgagaatgcctacaa 3640
1181 G C L I S F I K G S W K N I P K T E N A Y N 1202
3641 tccttgggacagacttttagttgctgtaatcatgccctacctgacagtggtgactgtggattttcc 3705
1203 P W D R L L V A A V I M P Y L Q C V L W I F 1223
3706 tcttacaacactagagaaaaaacatggaggcagatcaataagaaaggatccgcttttccagggcc 3770
1224 L L Q H Y E K K H G G R S I R K D P L F R A 1245
3771 ctctcaaaaaagccaaacataagaagtttccagaaccacccatcaatgaggatgaagatgaaga 3835
1246 L S Q K A K H K K F P E P P I N E D E D E D 1267
3836 tgtcaaagcggaaaggttgaaggttaaagagctgatgggttggcagtggtgtgaggagaaaccgg 3900
1268 V K A E R L K V K E L M G C Q C C E E K P 1288
3901 ccattatggtatacaatttgcataaagaatgatgacaagaagatttccctcactcaaggaaa 3965
1289 A I M V Y N L H K E Y D D K K D F L H S R K 1310
3966 acaacaaaagtagcaacaaaatacgtctctttctgtgtgaaaaaaggagagatcttgggactgtt 4030
1311 T C K V A T K Y V S F C V K K G E I L G L L 1332
4031 gggctcaaatgggtgctggcaaaagcagcattattaatattcttgggtgggatgttgaaccaactt 4095
1333 **G P N G A G K S T** I I N I L V G D V E P T 1353

Walker A

4196 caggcaagatatttctaggagattatggttcacattcaaatgaagatgatgaatccaccaagtgt 4160
1354 S G K I F L G D Y G S H S N E D D E S T K C 1375
4161 atgggttactgccccagacaaaccactctggccagatattactctgcaagaacattttgaaat 4225
1376 M G Y C P Q T N P L W P D I T L Q E H F E I 1397
4226 ttatggagctgtgaaagggatgagttcaggtgacatgaaggaagtaacagtcgaataacaaaag 4290
1398 Y G A V K G M S S G D M K E V I S R I T K 1418
4291 cccttgatttgaagaacatcttcagaaaaactgtaaagaactccctgcagggatcaagcgaag 4355
1419 A L D L K E H L Q K T V A K K L P A G I K R K 1440
4356 ctgtgttttgcctcagtatgctgggaatcctcaggtgacactgctggatgagccgtctacaggg 4420
1441 L C F A L S M L G N P Q V T **L L D E P S T G** 1462

Walker B

4421 tatggaccccagagccaaacagcacatgtggcgagccattcgaactgcgttttaaaaacaagaagc 4485
1463 **M D P** R A K Q H M W R A I R T A F K N K K 1483

W.B.

4486 gggctgcctcctcactacgcattacatggaagagcggaggctgtctgtgacaggggtggccatc 4550
1484 R A A L L T T H Y M E E A E A V C D R V A I 1505
4551 atgggtgtccggcagctaagatgcattggaacagtacaacatctaagagcaagtttggcaagg 4615
1506 M V S G Q L R C I G T V Q H L K S K F G K G 1527
4616 ctacttttagaaattaaactaaaggactggatagaaaacctggaaatagatcgcttcaaagag 4680
1528 Y F L E I K L K D W I E N L E I D R L Q R 1548

```

4681 aaattcaatatatcccccaaatgcaagccgccaagagagcttctcttctattctggcttataaa 4745
1549 E I Q Y I F P N A S R Q E S F S S I L A Y K 1570
4746 attccaaaagaagatgtccagtcctctctcacagtccttttgctaagttggaggaagcaaacacac 4810
1571 I P K E D V Q S L S Q S F A K L E E A K H T 1592
4811 ttttgccattgaagaatacacagcttttctcaagcaaccctggaacaggttttttagaacttacta 4875
1593 F A I E E Y S F S Q A T L E Q V F V E L T 1613
4876 aggagcaggaggaggaagataatagctgcgggactttaaacagcacgctctggtgggaaagaagg 4940
1614 K E Q E E E D N S C G T L N S T L W W E R R 1635
4941 caggaagacagagtcgtggttctgaatgtctgcgctcaccgccgctgctgaccctgaacttactct 5005
1636 Q E D R V V F - 1642
5006 tttttatttgtttttccttcttttatcttaactttgattttaaaagtttattacttgaatagtc 5070
5071 acaaacatgaaagcacttggaatttcctaaactccttaatttatgcaccatggttatttatgt 5135
5136 gtctgggttttctttaaataaatgtgtgtgtagtt 5170

```

Abb. 3.6 Nukleotidsequenz der isolierten cDNA des *Abca5*-Gens der Ratte und die abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens. Die Sequenz des kodierenden Stranges der cDNA ist in Kleinbuchstaben angeführt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist unterhalb der Nukleotidsequenz angeordnet. Das Startkodon (atg), das Stopkodon (tga) und die charakteristischen Motive der Nukleotidbindungskassetten (Walker A, Signatur-Sequenz und Walker B) sind fett markiert und mit Rahmen hervorgehoben. Die Numerierung entspricht dem Genbank-Eintrag AJ426052.

Eine kürzlich durchgeführte Datenbankrecherche mit dem 5'-Terminus des *rAbca5*-Gens führte zur Detektion eines cDNA-Klon der Länge 347 bp aus mRNA der Hypophyse einer weiblichen Wistarratte (CB808508 von FITZPATRICK et al. 2003). Das Fragment überlappt mit den ersten 192 bp des *rAbca5*-Gens und komplettiert die 5'-untranslatierte Region (UTR) der unter der Zugangsnummer AJ426052 abgelegten *rAbca5*-Sequenz. Der überdurchschnittliche GC-Gehalt des cDNA-Klons von 68% bietet auch eine mögliche Erklärung für den vorzeitigen Abbruch der 5'-UTR der von uns isolierten cDNA-Sequenz. Eine genomische Analyse des cDNA-Klons mittels Blast bestätigte die gemeinsame Abstammung beider Sequenzen vom Chromosom 10 der Ratte und die Existenz eines 8478 bp aufwärts vom bisherigen Exon 1 gelegenen untranslatierten Exons analog dem Exon 1 des *ABCA5*-Gens des Menschen.

3.2.5 Genomische Struktur des *Abca5*-Gens der Ratte

Die Analyse der genomischen Organisation von *rAbca5* wurde auf Basis der vorläufigen Version 2.1 des Ratten-Genoms (April 2004) vorgenommen. Danach wurde das Gen, das sich auf Chromosom 10 der Ratte über eine genomische Region von ca. 68 kb erstreckte (NW_047343.1), in 39 Exons aufgeteilt.

Die Exongrößen variieren zwischen 61 bp und 317 bp, die Intronlängen zwischen 92 bp und 8815 bp, wobei sich das größte Intron zwischen den Exons 28 und 29 befand (Tabelle 3.2). Ein mit dem Konsensusmotiv für den eukaryotischen Translationsstart kompatibles Sequenzmotiv AACATGG (Nukleotide 33–38 in AJ426052) wurde in Exon 2 detektiert.

Exon	Exonlänge in bp	Intronlänge in bp	Exon	Exonlänge in bp	Intronlänge in bp
1	174	8478	21	134	766
2	123	1147	22	141	1074
3	207	1142	23	119	2124
4	163	6499	24	175	1669
5	91	2430	25	115	339
6	233	2381	26	137	750
7	146	1061	27	77	1945
8	191	1911	28	94	8815
9	152	883	29	139	369
10	171	622	30	121	92
11	61	2455	31	94	736
12	112	1177	32	178	528
13	180	553	33	77	114
14	120	974	34	102	781
15	141	1122	35	121	1504
16	92	170	36	152	863
17	147	1375	37	86	879
18	126	1467	38	74	746
19	206	1564	39	317	
20	170	2062			

Tabelle 3.2 Intron-Exon-Organisation für das *Abca5*-Gen der Ratte (AJ426052). Die Strukturanalyse wurde mit dem BLAST-Genom-Programm auf Grundlage des *Rat Genome Build 2.1* (April 2004) durchgeführt. Die Exons sind fortlaufend nummeriert, das zugehörige Intron folgt dem entsprechenden Exon. Das Signal für den Translationsstop befindet sich in Exon 39 und beginnt an Position 4962. Die vorhergesagten Exongrenzen überlappen um bis zu 18 bp. Exon 1 wurde als Ergebnis einer Datenbankrecherche zugeordnet und noch nicht experimentell bestätigt.

3.2.6 Identifizierung einer *rAbca5*-Splicevariante *rAbca5 V+16*

Dieses alternative mRNA-Transkript des *rAbca5*-Gens der Ratte wurde im Rahmen der Sequenzanalyse detektiert. Es umfaßte wie *ABCA5 V20+16* die Länge der vollständig kodierenden cDNA und besaß ebenfalls ein um 16 bp verlängertes Exon 20, das sich von der Insertion im humanen *ABCA5*-Gen in nur einer Base an Position 8 (T → C) unterschied. Die Insertion verursachte eine Verschiebung des offenen Leserahmens und einen vorzeitigen Abbruch der Translation (Abb. 3.7).

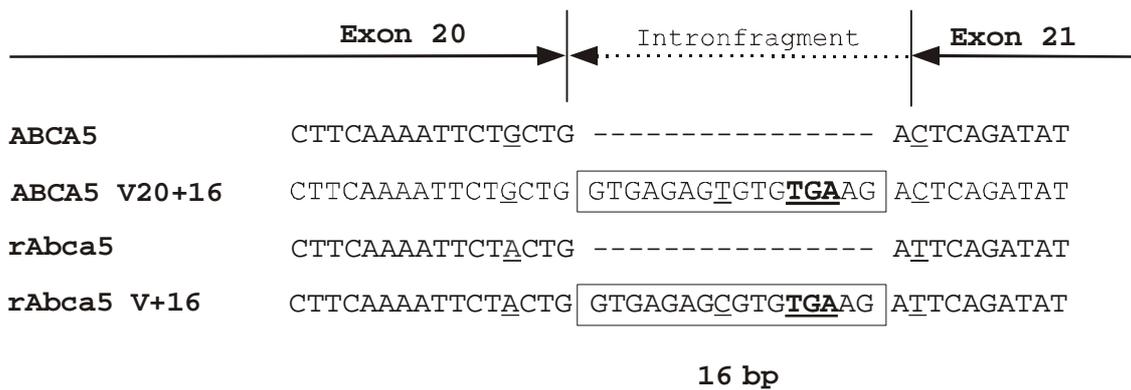


Abb. 3.7 Ausschnitt aus der *rAbca5* cDNA in der Region zwischen Exons 19 und 20 im Vergleich zu *ABCA5* und *ABCA5 V20+16*. Die 16 bp-Insertion (Rahmenbox) führt bei dem alternativen *rAbca5*-cDNA-Transkript (*rAbca5 V+16*) zu einem vorzeitigen Stopkodon (**TGA**) und somit zu einem Translationsabbruch nach 2775 bp bezogen auf das Startkodon.

Die cDNA-Sequenz der neuen *rAbca5*-Splicevariante wurde durch zwei unabhängige RT-PCR-Amplifikationen mit insertionsspezifischen Primern (RF1 und RSV R1, RSV F1 und RR1, → 2.1.7.6) an Gesamt-RNA aus Testisgewebe der Ratte bestätigt und in der EMBL-Gendatenbank abgelegt (*Accession Number* AJ550165).

3.2.7 Untersuchungen zur Membran-Topologie

Untersuchungen zur Lokalisation und Orientierung von Membransegmenten wurden mit SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/menu0.html>), TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) von HEIJNE et al. (1992, 1994), PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>) von NAKAI UND HORTON (1999) und TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) von KROGH et al. (2001) durchgeführt. Diese Programme basieren auf der Annahme, daß hydrophobe Sequenzabschnitte in Membranproteinen als alpha-helikale Membranstrukturen lokalisiert sein können. Mithilfe des Analysealgorithmus wurden anhand von Hydrophobizitätswerten für die einzelnen Aminosäuren Durchschnittswerte für Peptidabschnitte zwischen 20 und 23 Substituenten errechnet und daraus putative Membransegmente für das gesamte Protein vorausgesagt.

3.2.7.1 Membransegmente in *ABCA5* und *ABCA5 V20+16*

Eine Analyse der hydrophoben Regionen in *ABCA5* ergab eine maximal mögliche Anzahl von 15 Membransegmenten (MS) zwischen 20 und 23 Aminosäuren. Die ersten 7 Segmente befanden sich im ersten Viertel des Proteins (Aminosäuren 31 bis 416), die zweite Membranregion mit maximal 8 Segmenten im dritten Viertel (Aminosäuren 862 bis 1225). An die Membranregionen schlossen sich die hydrophileren Sequenzbereiche der ATP-

Bindungskassetten an. Damit erfüllte ABCA5 die topologischen Voraussetzungen für einen ABC-Volltransporter.

Helix	N-Terminus	Transmembranregion	C-Terminus	Länge
1	31	SSVQEILFPLFFLFWLILISM	51	21
2	223	IYLVIAFSPFGYFLAIHIVAEK	244	22
3	265	SWVLLYTSLIFLMSLLMAVIATA	287	23
4	298	VIFLLFFLYGLSSVFFALMLTPL	320	23
5	327	VGIVEFFVTVAFGFIGLMIILIE	349	23
6	355	LVWLFSPFCHCTFVIGIAQVMHL	377	23
7	394	YPLIITIIMLTLNSIFYVLLAVY	416	23
8	862	VRSVLLLLLIFFTVQIFMFLVHH	884	23
9	967	VFAAVFNSTMVYSLPILVNIISN	989	23
10	1018	KIELYFQAALLGIIVTAMPPYFA	1040	23
11	1068	GQAVVDIPLFFIILILMLGSLLA	1090	23
12	1103	LAVVFCLIGYVPSVILFTYIASF	1125	23
13	1136	FWSFIYSVAALCIAITEITFFMG	1158	23
14	1166	HYAFCIIPIYPLLGLISFIKI	1188	23
15	1206	LSVAVISPYLQCVLWIFLLQ	1225	20

Tabelle 3.3 Putative Membransegmente im ABCA5-Protein. Die Evaluation der hydrophoben Sequenzregionen wurde mit TopPred, SOSUI, PSORT II und THMM2.0 vorgenommen. Je nach Programm variierten die Längen der putativen Membransegmente um bis zu 3 Aminosäuren. Es wurden nur die von allen vier Programmen erkannten Membransegmente dargestellt.

Die Polypeptidsequenz für ABCA5 V20+16 betrug 925 Aminosäuren und war mit Ausnahme der vier terminalen Aminosäuren mit dem entsprechenden Sequenzbereich auf ABCA5 identisch. Für ABCA5 V20+16 wurden 8 Membransegmente vorhergesagt, gefolgt von einer hydrophilen Region, in der sich die ATP-Bindungskassette befand. Diese Membransegmente entsprachen den ersten 8 Segmenten in Tabelle 3.3.

3.2.7.2 Membransegmente in rAbca5 und rAbca5 V+16

Die Anzahl der maximal möglichen Membransegmente in rAbca5 betrug ebenfalls 15. Die Längen dieser Sequenzabschnitte betragen zwischen 21 und 23 Aminosäuren. Die erste Membrandomäne (MD) enthielt 7 Segmente (Aminosäuren 31 bis 415), die zweite MD befand sich mit 8 Membransegmenten zwischen den Aminosäuren 862 und 1227 des Gesamtproteins. An die Membranregionen schlossen sich wie in ABCA5 hydrophile Sequenzbereiche an, in denen die ATP-Bindungskassetten lokalisiert waren. Damit erfüllte Abca5 die topologischen Voraussetzungen für einen ABC-Volltransporter.

Helix	N-Terminus	Transmembranregion	C-Terminus	Länge
1	31	SSVQEILFPLFFLFWLILISM	51	21
2	223	IYLVIAFSPFGYFLAIHIVA EK	244	22
3	264	LSWVLLYTSLIFLMSLLMAVIAT	286	23
4	297	IVIFLLFFLYGLSSVFFALMLTP	319	23
5	327	VGVVEFFVTVVFGFVGLLIVLVE	349	23
6	355	LVWLFSPLCQCAFLIGIAQVMHL	377	23
7	393	PYPLIITLTLMLALDSVFYALLAV	415	23
8	862	VRSVLLLLLIFFAVQIFMFLVHH	884	23
9	966	YVFTAVFNSTMVYSLPVMNMI	986	23
10	1018	KVELYFQAALLGIIVTAMPPYFA	1040	23
11	1067	IGQAVVDIPLFFVVLTLMLGSLF	1089	23
12	1102	FLAVVFCLIAVPSVILFTYIAS	1124	23
13	1139	FIYSVTALACVAVTEITFFLGYG	1161	23
14	1169	TFCIAIPIYPLLGLISFIKGSW	1191	23
15	1205	DRLLVAVIMPYLQCVLWIFLLQH	1227	23

Tabelle 3.4 Putative Membransegmente im rAbca5-Protein. Die Untersuchung der hydrophoben Sequenzregionen erfolgte mit TopPred, SOSUI, PSORT II und THMM2.0. Je nach Programm variierten die Längen der putativen Membransegmente um bis zu 3 Aminosäuren. Es wurden nur die von allen vier Programmen erkannten Membransegmente dargestellt.

Die Polypeptidsequenz für rAbca5 V+16 umfaßte wie im humanen Ortholog 925 Aminosäuren und war mit Ausnahme der fünf terminalen Aminosäuren mit dem entsprechenden Sequenzbereich auf rAbca5 identisch. Für Abca5 V+16 wurden 8 Membransegmente vorhergesagt, gefolgt von einer hydrophilen Region, in der sich die ATP-Bindungskassette befand. Diese Membransegmente entsprachen den ersten 8 Segmenten in Tabelle 3.4.

3.3 Untersuchungen zur mRNA-Gewebeverteilung von *hABCA5* und *rAbca5*

3.3.1 Expression des humanen *ABCA5*-Gens

Die Untersuchung der Expression von humaner *ABCA5*-mRNA erfolgte mittels Northern-Blot-Analysen (→ 2.2.10) mit einem kommerziell erhältlichen Humangewebeblot (→ 2.1.2). Die Hybridisierung mit einer *ABCA5*-spezifischen Oligonukleotidsonde zeigte ein Signal bei 6.2 kb im Skelettmuskel, das ebenfalls in Niere, Leber und Plazenta detektiert werden konnte (Abb. 3.8). Das gleiche Signal wurde in RNA aus der humanen Kolonkarzinomzell-Linie Caco-2 detektiert. Northern-Blot-Untersuchungen an diversen humanen Neuroblastom- und Leukämiezelllinien ergaben ein längeres Transkript von > 9 kb (ohne Abb.). Das in ersten

Northern-Blot-Experimenten in Gesamt-RNA aus Hep-G2-Zellen ermittelte Signal von 2.6 kb konnte in späteren Versuchen nicht bestätigt werden und war entweder Zeichen einer zellspezifischen RNA-Degradation oder ein unspezifisches Hybridisierungsergebnis.

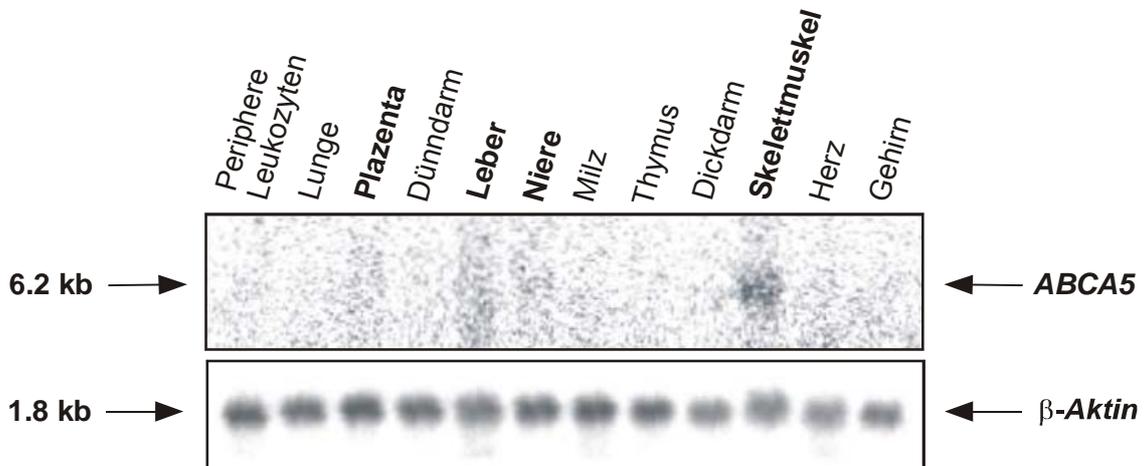


Abb. 3.8 Expression der *ABCA5*-mRNA in einer Auswahl von humanen Geweben. Für die Northern-Blot-Hybridisierung wurde ein *Human 12-Lane Blot* (Clontech) verwendet. Die genspezifische Hybridisierung erfolgte mit einer ^{32}P -markierten Oligonukleotidsonde (HR8, → 2.1.7.6.2) bei 38 °C. Eine Kontrollhybridisierung mit einer β -Aktinsonde zeigte, daß die polyA-RNA-Proben in Bezug auf ihren β -Aktin mRNA-Gehalt normalisiert worden waren.

3.3.2 Expression des *Abca5*-Gens der Ratte

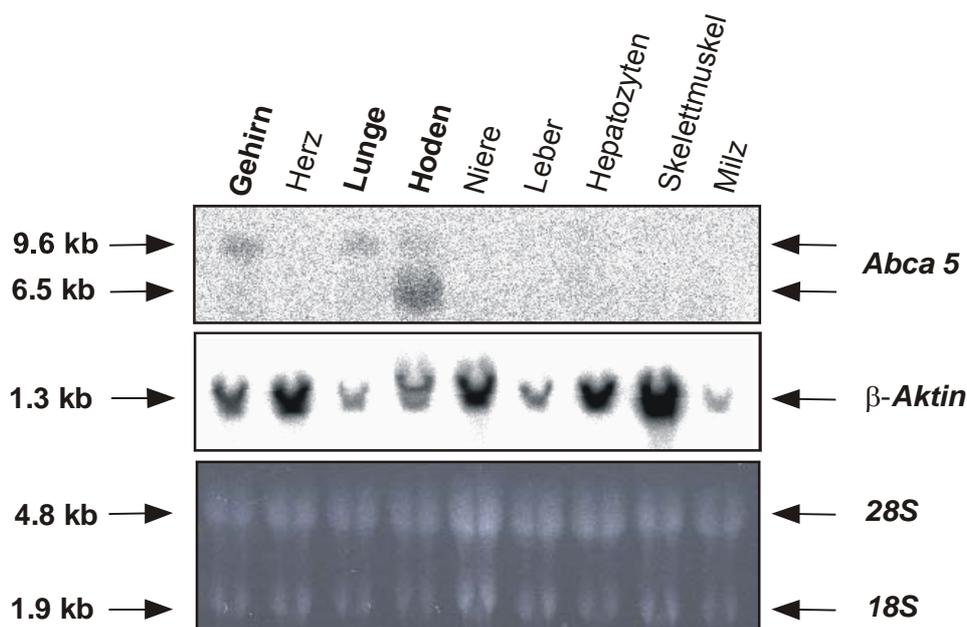


Abb. 3.9 Expression des *rAbca5*-Gens der Ratte in verschiedenen Geweben desselben Versuchstieres. Pro Bahn wurden 25 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die genspezifische Hybridisierung erfolgte mit ³²P-markierten Oligonukleotidsonden (RR8, RR13, → 2.1.7.6.4). Eine Kontrollhybridisierung mit einer β-Aktin-sonde der Ratte (→ 2.1.7.7) wurde vorgenommen und zeigt den natürlich variablen β-Aktingehalt in den verschiedenen Organen.

Zur Untersuchung der mRNA-Expression des *Abca5*-Gens der Ratte wurde ein mRNA-Organblot aus frisch isolierten Rattenorganen hergestellt (→ 2.2.2.4.2, 2.2.8.2.3 ff.) und mit zwei verschiedenen *rAbca5*-spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert. Eine besonders starke *rAbca5*-mRNA-Expression wurde im Testis (Hoden) detektiert, wobei neben dem erwarteten Transkript bei ca. 6.5 kb ein zweites Signal von ca. 9.6 kb auftrat. Dieses Transkript wurde auch in Lunge und Gehirn gefunden (Abb. 3.9).

3.4 Zellspezifische Verteilung der *rAbca5*-mRNA in Organen der Ratte

Voraussetzung für eine spätere funktionelle Aufklärung des neuen *Abca5*-Gens der Ratte war eine genaue Kenntnis der zellspezifischen Lokalisation. Zu diesem Zweck wurden Paraffinschnitte aus frisch isolierten Rattenhoden (Testis) und Nebenhoden (Epididymis) bei 55 °C einer *in-situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden (DIG-Sonden, → 2.2.3.4) unterzogen. Die Signaldetektion erfolgte indirekt über eine Signalamplifikation (→ 2.2.11) mit dem TSA Biotin System (PerkinElmer).

Alle *in situ* Hybridisierungsexperimente wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. P. Middel in der Abteilung Pathologie der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

3.4.1 Generierung der DIG-cRNA-Sonden

Zur Vermeidung von Kreuzhybridisierungen mit anderen *Abca*-Genen der gleichen Subgruppe wurde eine Sondenregion auf *rAbca5* ausgewählt, die im Bereich der zweiten Transmembranregion lag. Die Matrizen-cDNA für die cRNA-Sonden (*copy* oder *complementary* RNA) wurden entweder durch Klonierung eines RT-PCR-Fragments (308 bp) in den pCR4-TOPO Vektor und Restriktionslinearisierung (RISH1) oder direkt durch RT-PCR mit Primern generiert, die die für die *in vitro* Transkription nötigen Promotorsequenzen (T3 und T7) als Überhänge besaßen (RISH2). *In situ* Hybridisierungen mit cRNA-Sonden, die durch eine *in vitro* Transkription von Plasmid-DNA hergestellt worden waren, führten wiederholt zu hohen Hintergrundsignalen im Bereich der Zellkerne. Aus diesem Grund wurden die cRNA-

Sonden im Verlauf der Experimente auf Basis der direkten RT-PCR Methode generiert (→ 2.2.3.4).

3.4.2 Morphologie des Testis der Ratte

Die in der Hodenkapsel gelegenen Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) sind nach außen durch eine Basalmembran, eine Kollagenschicht und eine Schicht kontraktiver Myoepithelzellen begrenzt, die zusammen als Tunica propria bezeichnet werden. Das Lumen der Tubuli seminiferi trägt ein sich aktiv erneuerndes Keimepithel, in dem sich eine Population von Stützzellen, den Sertolizellen, befindetet, die außer der Stützfunktion diverse phagozytäre und sekretorische Aufgaben haben. Die Spermatogenese (Spermatozytogenese, Meiose und Spermiogenese) verläuft in Wellen spiralförmig in den Tubuli seminiferi von außen nach innen ab. Das interstitielle Gewebe zwischen den Tubuli ist ein lockeres Maschenwerk aus kollagenfaserigem Gewebe und besteht aus Fibroblasten, Kollagen mit gelegentlich eingelagerten Makrophagen und Mastzellen, Blut- und Lymphgefäßen sowie Gruppen interstitieller Zellen, den Leydigzellen (Abb. 3.10).

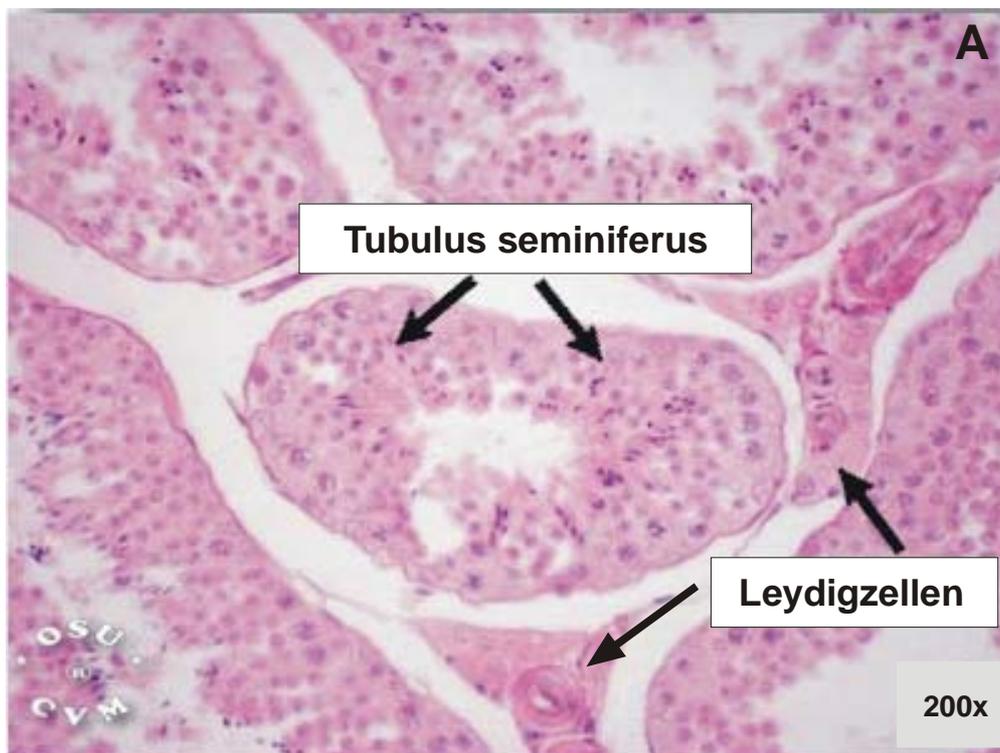


Abb. 3.10A Morphologie des Testis (200x). Es wurde der grundlegende Aufbau des adulten Testis aus Tubuli seminiferi mit Basalmembran, ausgewählten Spermien-Entwicklungsstadien und Interstitium mit Leydigzellen dargestellt. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von OWNBY et al. (2002) angefertigt und das Abdrucken in dieser Arbeit ausdrücklich genehmigt.

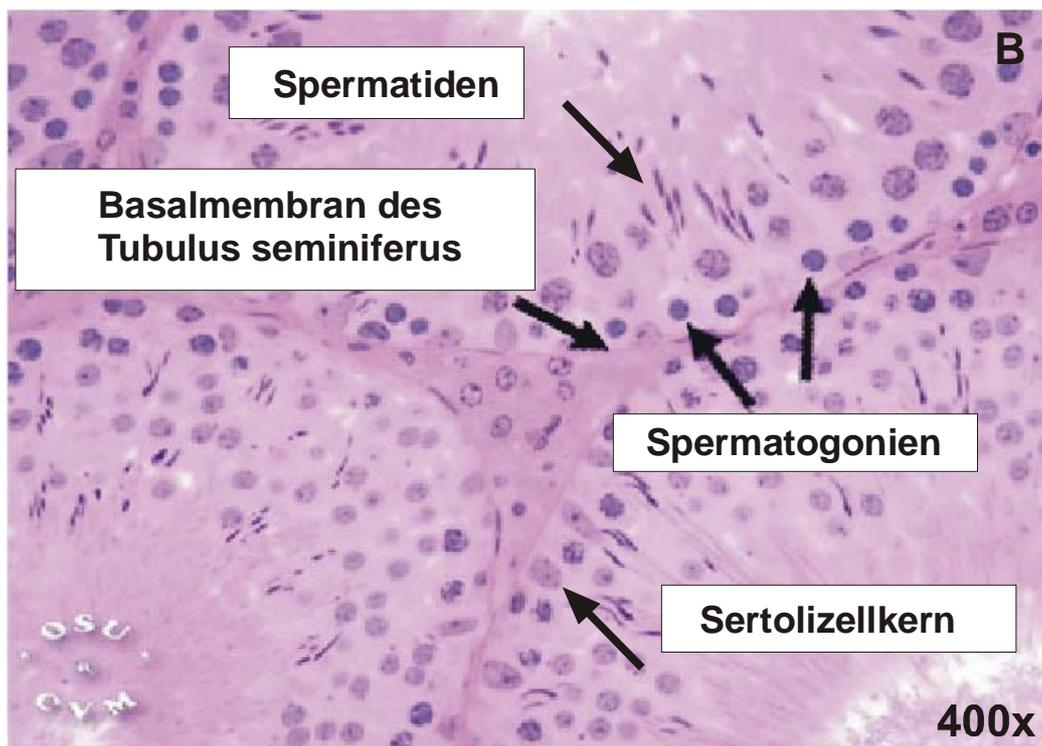


Abb. 3.10B Morphologie des Testis (400x). Nahe der Basalmembran befinden sich frühe Entwicklungsstadien der Spermien, die Spermatogonien (Spermatozytogenese). Die im Rahmen der Spermio-genese zu Spermatozoen reifenden Spermatiden haben sich bereits von der Basalmembran entfernt. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von OWNBY et al. (2002) angefertigt, das Abdrucken in dieser Arbeit ausdrücklich genehmigt.

3.4.3 Expression des *rAbca5*-Gens im Testis der Ratte

Die *in situ* Hybridisierung des adulten Testis des Ratte mit einer DIG-markierten cRNA-Sonde für *rAbca5* (RISH2-Antisense) bei 55 °C zeigte deutliche Signale in der Tunica propria der Tubuli seminiferi (Abb. 3.11, B, E, F und G), wobei keine eindeutige Differenzierung zwischen den verschiedenen Schichten vorgenommen werden konnte. Eine starke *rAbca5*-mRNA-Expression wurde im interstitiellen Raum detektiert, in dem sich Leydigzellen befinden (Abb. 3.11 C, E und F), die auch als Cluster auftreten können (C, E). Positive Hybridisierungssignale waren auch in Epithelzellen kleiner Blutgefäße sichtbar (ohne Abb.). Die Spezifität der Hybridisierungen wurde mittels einer Kontrollhybridisierung mit der RISH2-Sense-Sonde überprüft (Abb. 3.11, A und D).

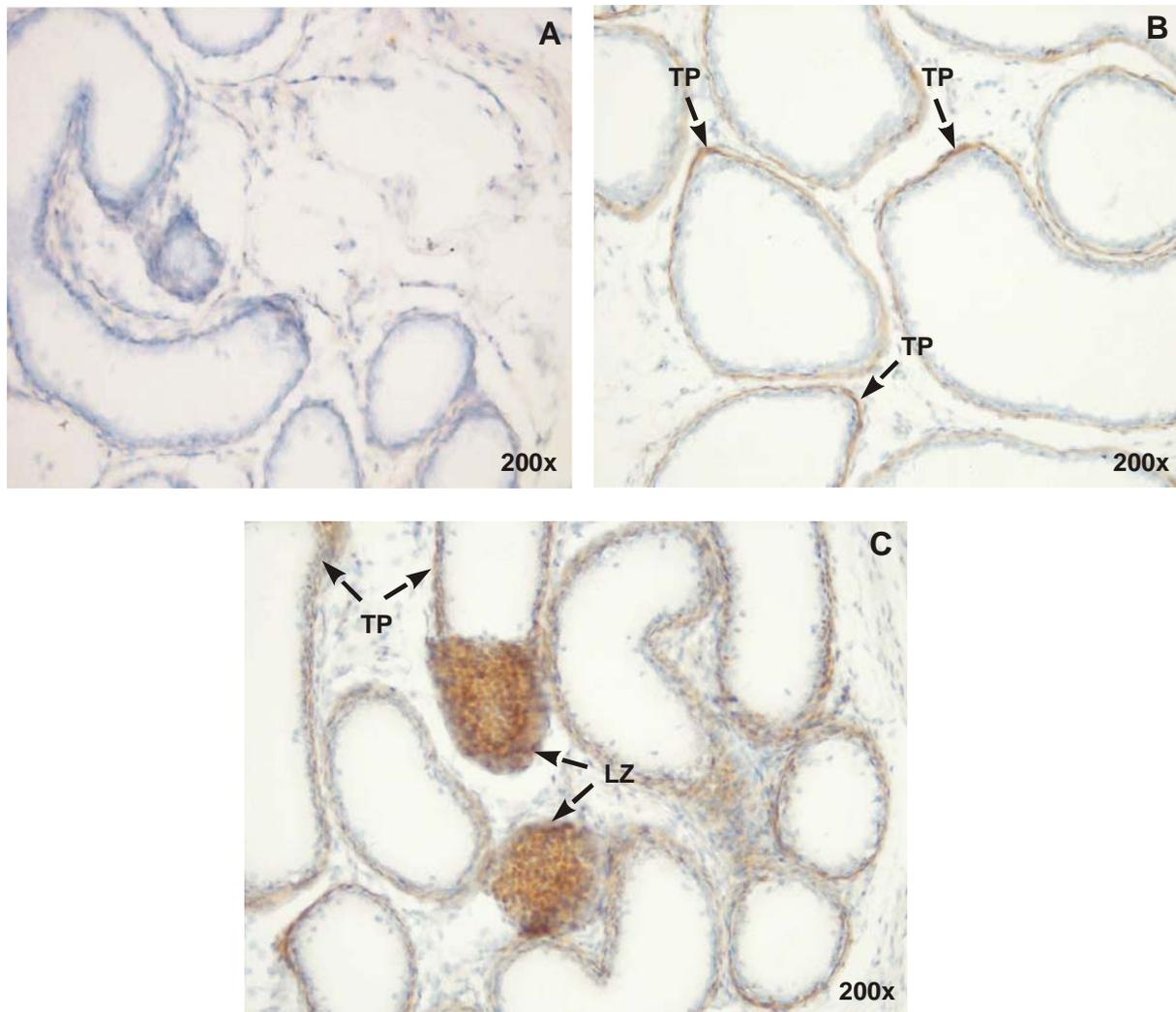


Abb. 3.11 A-C Testisspezifische Expression des *rAbca5*-Gens der Ratte (200x). Paraffinschnitte aus adultem Testis der Ratte wurden bei 55 °C mit einer DIG-markierten cRNA-Sonde RISH2 hybridisiert. Bild A zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der RISH2-Sense-Sonde als Negativkontrolle. Hybridisierungen mit der RISH2-Antisense-Sonde sind in den Aufnahmen B und C dargestellt und mit Pfeilen markiert. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne wurde im Anschluß an die Chromogenentwicklung mit Meyers Hämalaun vorgenommen. Positive Hybridisierungssignale erscheinen in braun. TP = Tunica propria, LZ = Leydigzellen.

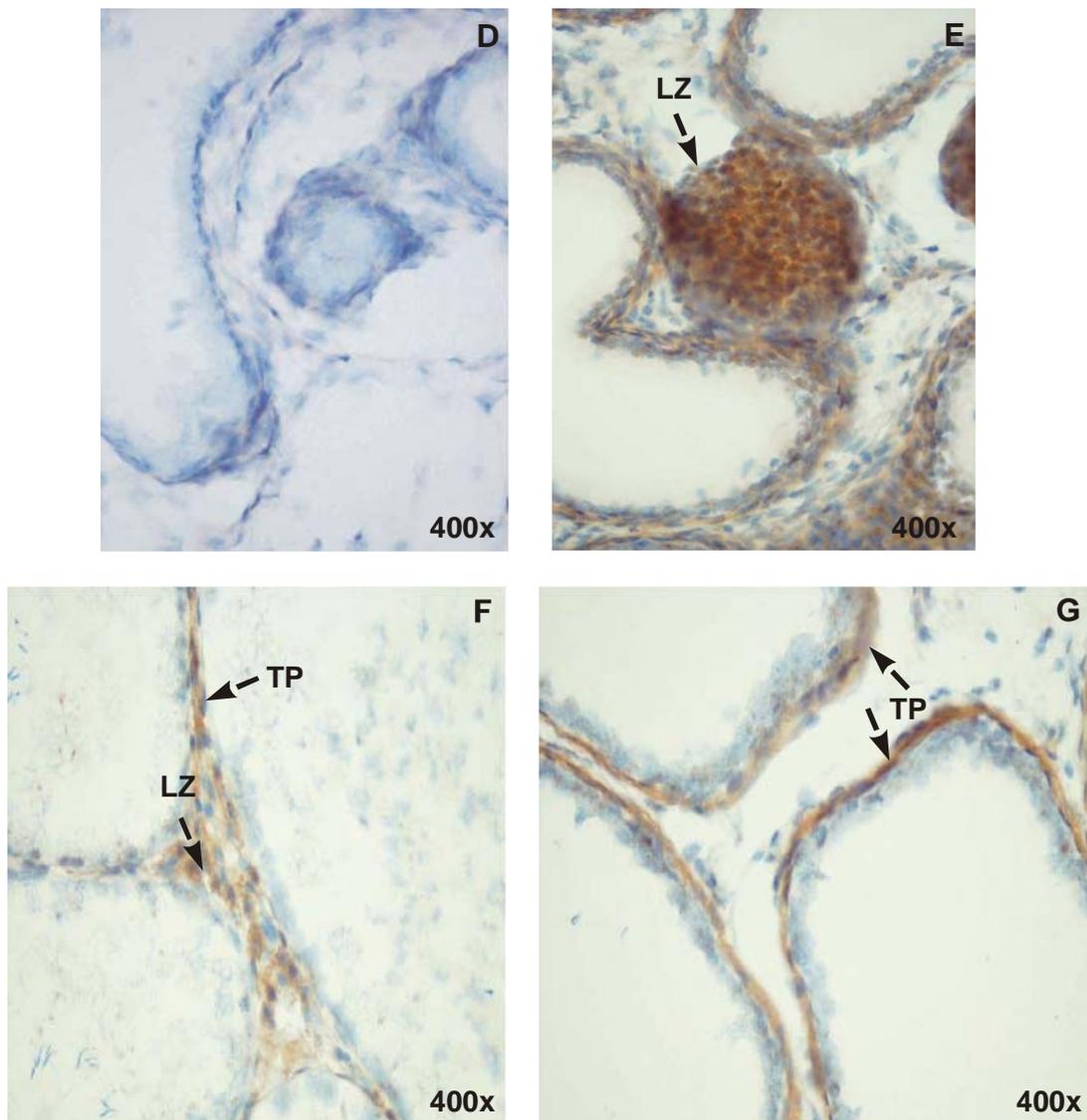


Abb. 3.11 D-G Testisspezifische Expression des *rAbca5*-Gens der Ratte (400x). Paraffinschnitte aus adultem Testis der Ratte wurden bei 55 °C mit einer DIG-markierten cRNA-Sonde RISH2 hybridisiert. Aufnahme D zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der RISH2-Sense-Sonde als Negativkontrolle. Hybridisierungen mit der RISH2-Antisense-Sonde sind in den Aufnahmen E bis F dargestellt und mit Pfeilen markiert. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne wurde im Anschluß an die Chromogenentwicklung mit Meyers Hämalaun vorgenommen. Positive Hybridisierungssignale erscheinen in braun. TP = Tunica propria, LZ = Leydigzellen.

3.4.4 Morphologie der Epididymis der Ratte

Der von einer straffen kollagenfaserigen Kapsel geschützte Nebenhodengang (Ductus epididymidis) ist in ein lockeres Stützgewebe aus Fibroblasten, Fibrozyten, Kollagen und eine Glykosaminoglykanmatrix eingebettet und wird durch ein hochprismatisches Zylinderepithel mit basalen Kernen begrenzt, das außen einen schmalen Saum glatter Muskulatur trägt. Das Zylinderepithel enthält atypisch lange Mikrovilli (40-80 μm), die wie die Sertoli-Zellen im Testis verschiedene resorbierende, phagozytierende und sezernierende Funktionen (Abb. 3.12) haben.

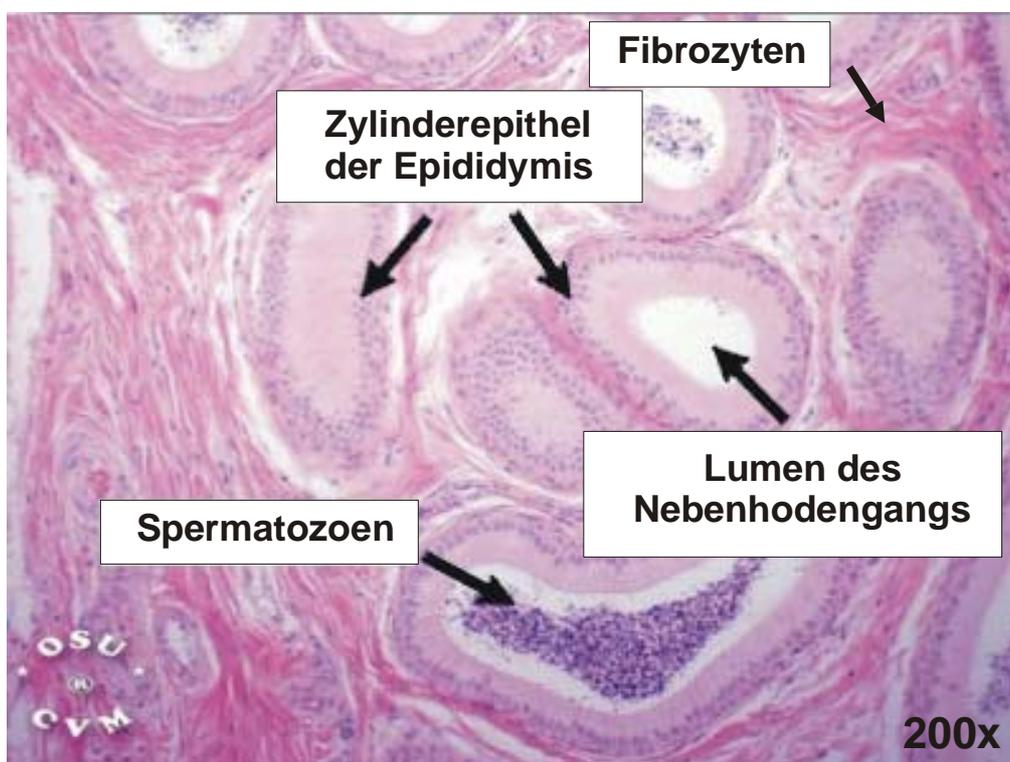


Abb. 3.12 Morphologie der Epididymis der Ratte (200x). Es wurde der grundlegende Aufbau der Epididymis der Ratte aus Ductus epididymidis und Stützgewebe dargestellt. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von OWNBY et al. (2002) angefertigt und das Abdrucken in dieser Arbeit ausdrücklich genehmigt.

3.4.5 Expression des *rAbca5*-Gens in der Epididymis der Ratte

Die Expression der *rAbca5*-mRNA war besonders stark im Zylinderepithel ausgeprägt und erstreckte sich bis in die Mikrovilli. Positive Signale wurden auch in den länglichen Fibrozyten des Stützgewebes detektiert (Abb. 3.13).

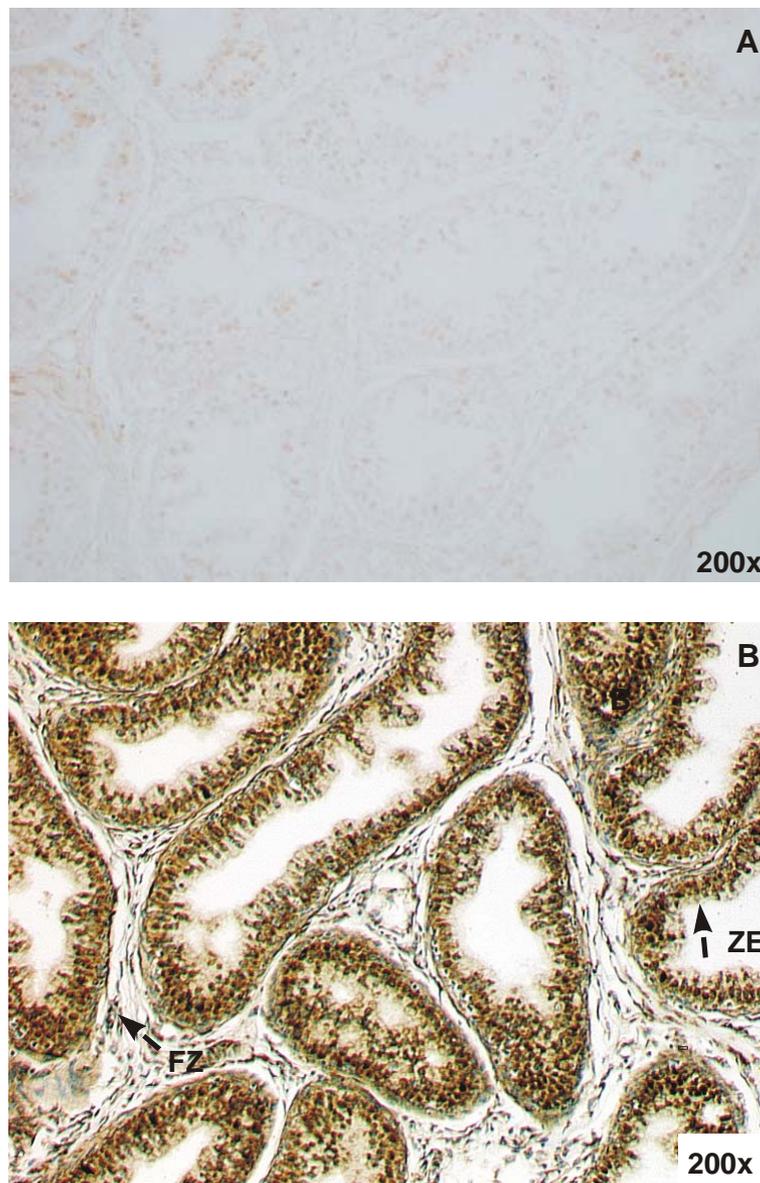


Abb. 3.13 A,B Epididymisspezifische Expression des *rAbca5*-Gens der Ratte. Paraffinschnitte aus adulter Epididymis der Ratte wurde bei 55 °C mit einer DIG-markierten cRNA-Sonde RISH1 hybridisiert. A zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der RISH1-Sense-Sonde als Negativkontrolle (200x). Die Hybridisierung mit der RISH1-Antisense-Sonde ist in B dargestellt, positive Signale sind mit Pfeilen markiert. Die blaue Gegenfärbung der Zellkerne wurde im Anschluß an die Chromogenentwicklung mit Meyers Hämalaun vorgenommen. Positive Hybridisierungssignale erscheinen in braun. FZ = Fibrozyten, ZE = Zylinderepithel.

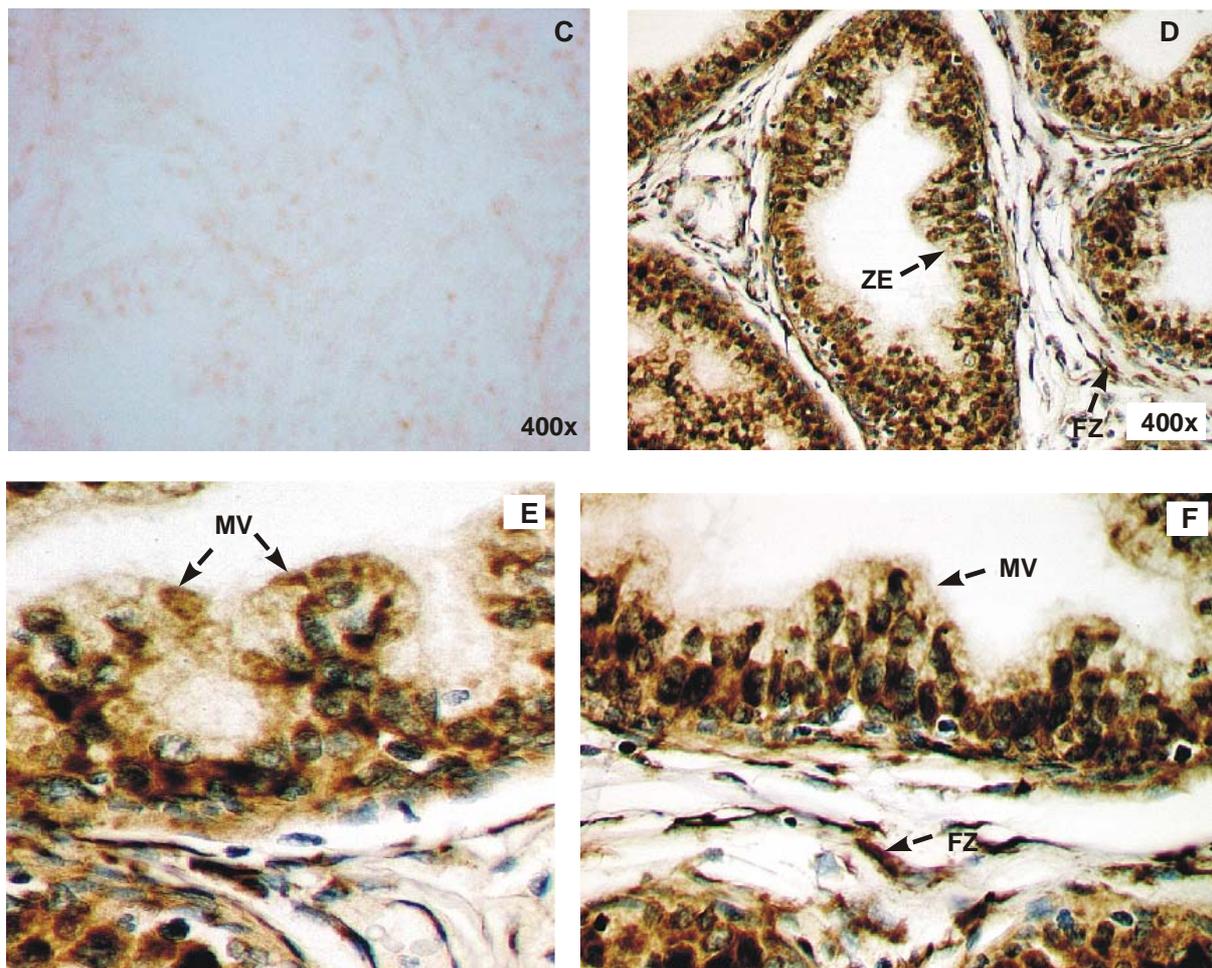


Abb. 3.13 C-F Epididymisspezifische Expression des *rAbca5*-Gens der Ratte (400x). Paraffinschnitte aus adulter Epididymis der Ratte wurde bei 55 °C mit einer DIG-markierten cRNA-Sonde RISH1 hybridisiert. C zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der RISH1-Sense-Sonde als Negativkontrolle (400x). Die Hybridisierung mit der RISH1-Antisense-Sonde ist in den Aufnahmen D-F im Detail dargestellt und zeigt die *rAbca5*-mRNA-Expression in den Fibrozyten (FZ) und den Mikrovilli des Zylinderepithels. FZ = Fibrozyten, ZE = Zylinderepithel, MV = Mikrovilli.

Die Hybridisierungen des Nebenhoden der Ratte wurden mit der cRNA-Sonde RISH1 durchgeführt, die zu Hintergrundsignalen im Bereich der Zellkerne führte (→ 3.4.1). Diese sind auch in Abbildung A (Negativkontrolle, Hybridisierung mit RISH1-Sense-Sonde) erkennbar (Abb. 3.13, A und C) und erschwerten die zellspezifische Zuordnung der Hybridisierungssignale. Daher sind weitere Experimente mit alternativen cRNA-Sonden (z.B. RISH2) nötig, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

3.5 Expression des *Abca5*-Gens der Ratte in Kulturen primärer Hepatozyten

In den vergangenen 5 Jahren wurden verschiedene Oxysterole als Aktivatorliganden für den Transkriptionsfaktor *liver X receptor* (LXR) identifiziert (EDWARDS et al. 2002). Zu den aktivierten Zielgenen gehörte neben den ABC-Transportergenen *ABCG5* und *ABCG8* mit *ABCA1* auch ein Mitglied der ABCA-Subfamilie. Da auch für andere ABCA-Vertreter (*ABCA6*, *ABCA7*, *ABCA9*) eine Regulation im Rahmen der Lipidhomöostase vermutet wird (KLUCKEN et al. 2000, KAMINSKI et al. 2000, PIEHLER et al. 2002), sollte das *rAbca5*-Gen im Zellkulturmodell primärer Hepatozyten der Ratte im Hinblick auf eine mögliche Regulation durch LXR-Aktivatoren untersucht werden. Dieses Zellkulturmodell erlaubt unter geeigneten Kulturbedingungen (→ 2.2.12.2) die Aufrechterhaltung differenzierter Funktionen wie der Albuminsekretion (HOFFMANN et al. 1989) und der Induzierbarkeit von Cytochrom-P450-Isoenzymen (AUBRECHT et al. 1993, 1996).

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden für 4 Tage mit einem Oxysterol inkubiert. Eine nachfolgende Untersuchung der *rAbca5*-mRNA Expression mittels einer Northern-Blot-Analyse (→ 2.2.10) zeigte den Einfluß des eingesetzten Effektors. Von den verwendeten Oxysterolen (20- α -Hydroxycholesterol, 25-Hydroxycholesterol, 22-*R*-Hydroxycholesterol) konnte nur unter dem potentesten Aktivator, 22-*R*-Hydroxycholesterol, ein Effekt beobachtet werden.

3.5.1 Einfluß von 22-R-Hydroxycholesterol auf die *rAbca5*-mRNA- Expression

Eine Konzentration von 10 μM 22-*R*-Hydroxycholesterol (Bahn 3) bewirkte in kultivierten primären Hepatozyten der Ratte nach 4 Tagen einen Anstieg der *rAbca5*-mRNA-Expression um 43% relativ zur ethanolhaltigen Kontrollprobe (Bahn 2). Unter Inkubation mit 20 μM 22-*R*-Hydroxycholesterol betrug dieser Anstieg 76% (Bahn 4). Unter Standardbedingungen kultivierte Rattenhepatozyten (Bahn 1) zeigten relativ dazu eine um 41% niedrigere *rAbca5*-mRNA-Expression (Abb. 3.14).

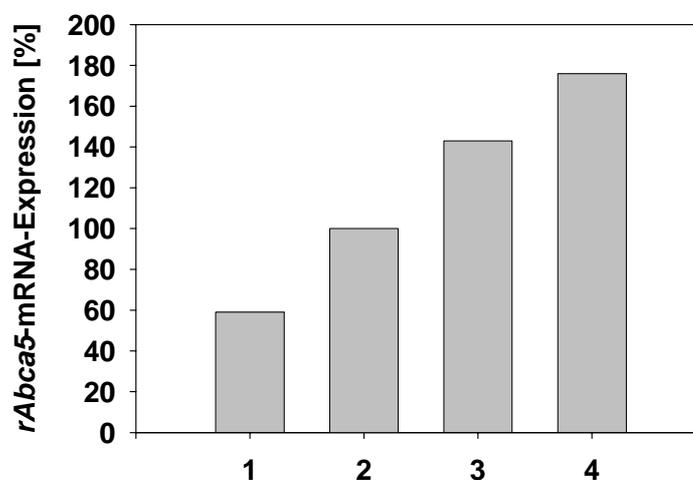


Abb. 3.14 Induktion von *rAbca5*-mRNA durch 22-*R*-Hydroxycholesterol. Rattenhepatozyten wurden für 4 Tage in Gegenwart von 22-*R*-Hydroxycholesterol kultiviert. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Northern Blots. Pro Probe wurden 25 μg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und *rAbca5*-mRNA mittels einer genspezifischen Oligonukleotidsonde (RR13, \rightarrow 2.1.7.6.4) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde der Blot mit einer GAPDH-genspezifischen Sonda rehybridisiert. Die ethanolhaltige Kontrolle nach 4 Tagen wurde gleich 100% gesetzt. Für die Säulen im Diagramm gelten folgende Zuordnungen: 1 = Kontrolle, 2 = Kontrolle + 0.15% (v/v) Ethanol, 3 = 10 μM 22-*R*-Hydroxycholesterol, 4 = 20 μM 22-*R*-Hydroxycholesterol.

3.5.2 Einfluß von 22-*R*-Hydroxycholesterol und 9-*cis*-Retinsäure auf die *rAbca5*-mRNA Expression

Zur Aktivierung von Zielgenen binden LXR-Rezeptoren mit dem Heterodimerisierungspartner RXR (*retinoid X receptor*) an spezifische Bindungselemente im Promotor des Zielgens. Um den Effekt des RXR-Liganden 9-*cis*-Retinsäure auf die Induktionseffekte der *rAbca5*-mRNA mit 22-*R*-Hydroxycholesterol zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten der Ratte für 4 Tage gleichzeitig mit beiden Liganden behandelt.

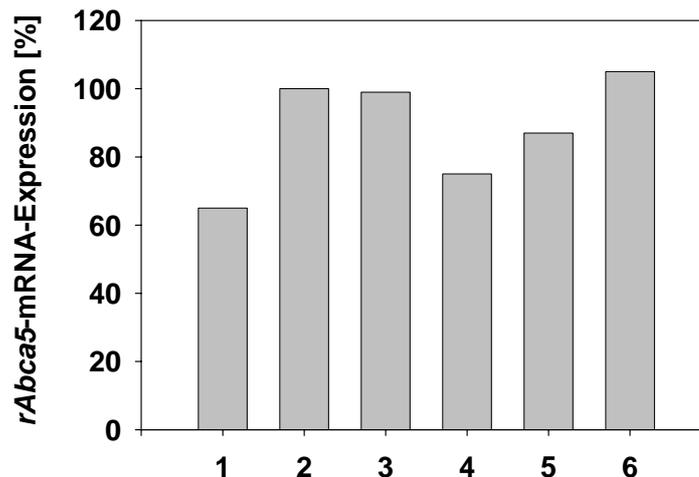


Abb. 3.15 Induktion von *rAbca5*-mRNA durch 22-*R*-Hydroxycholesterol und 9-*cis*-Retinsäure. Rattenhepatozyten wurden für 4 Tage in Gegenwart von 22-*R*-Hydroxycholesterol und 9-*cis*-Retinsäure kultiviert. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Northern Blots. Pro Probe wurden 25 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und *rAbca5*-mRNA mittels einer genspezifischen Oligonukleotidsonde (RR13, → 2.1.7.6.4) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde der Blot mit einer β-Aktin-spezifischen Sonde rehybridisiert. Der ethanolhaltige Kontrollwert nach 4 Tagen wurde gleich 100% gesetzt. Für die Säulen im Diagramm gelten folgende Zuordnungen: **1** = Kontrolle, **2** = Kontrolle + 0.15% (v/v) Ethanol, **3** = 1 µM 9-*cis*-Retinsäure/10 µM 22-*R*-Hydroxycholesterol, **4** = 1 µM 9-*cis*-Retinsäure/20 µM 22-*R*-Hydroxycholesterol, **5** = 10 µM 9-*cis*-Retinsäure/10 µM 22-*R*-Hydroxycholesterol, **6** = 10 µM 9-*cis*-Retinsäure/20 µM 22-*R*-Hydroxycholesterol.

Die 4-tägige Inkubation primärer Hepatozyten der Ratte mit 9-*cis*-Retinsäure und 22-*R*-Hydroxycholesterol führte relativ zur ethanolhaltigen Kontrolle (Bahn 2) zu uneinheitlichen Ergebnissen. Während die Expression der *rAbca5*-mRNA unter Zugabe von 1 µM 9-*cis*-Retinsäure und 10 µM 22-*R*-Hydroxycholesterol (Bahn 3) auf dem Niveau der Kontrolle verharrte, sank dieser Wert um 25%, wenn die Oxysterolkonzentration verdoppelt wurde (Bahn 4). Wurden äquimolare Mengen (10 µM) beider Liganden eingesetzt, war noch immer eine Hemmung auf 87% gegenüber der Kontrolle zu beobachten (Bahn 5). Erneute Verdoppelung der Oxysterolkonzentration auf 20 µM ließ die *rAbca5*-mRNA-Expression auf 105% des Kontrollniveaus steigen (Abb. 3.15).

3.5.3 Einfluß eines synthetischen LXR-Agonisten auf die *rAbca5*-mRNA Expression

Für die Expression von *ABCA1*-mRNA konnten SPARROW et al. (2002) in THP-1 Makrophagen (aus einer humanen Leukämiezelllinie) eine um den Faktor 1000 höhere Potenz des synthetischen LXR α/β -Agonisten *Acetyl-podocarpic dimer* (APD) im Vergleich zu 22-*R*-Hydroxycholesterol zeigen. Um den Effekt dieses LXR-Agonisten auf die *rAbca5*-

mRNA-Expression im Rattensystem zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten der Ratte für vier Tage mit APD inkubiert.

Unter Inkubation mit 100 nM APD (gelöst in DMSO) betrug die *rAbca5*-mRNA-Expression am vierten Tag 296% des DMSO-haltigen Kontrollwertes (Bahn 3). Die *rAbca5*-mRNA-Expression unter Standardbedingungen (Bahn 1) stieg im gleichen Zeitraum relativ zum Kontrollwert um 92% (Abb. 3.16).

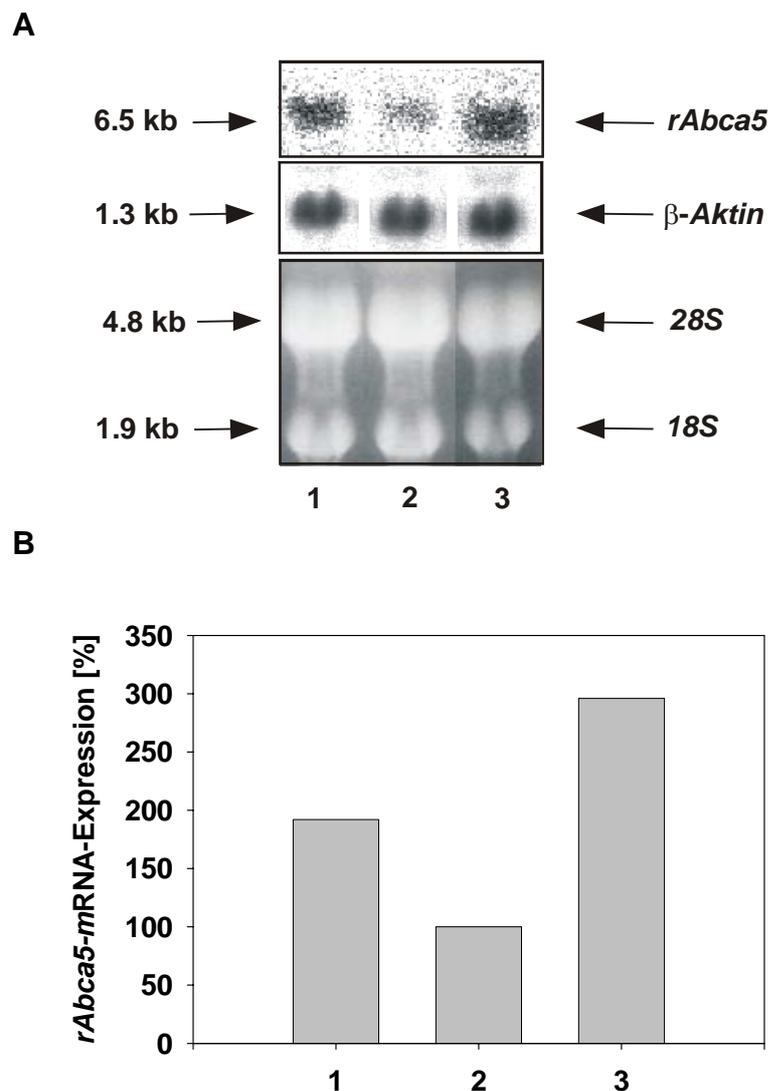


Abb. 3.16 Induktion von *rAbca5*-mRNA durch Acetyl-podocarpic dimer (APD). Rattenhepatozyten wurden für 4 Tage in Gegenwart von APD kultiviert.

A Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot. Pro Probe wurden 25 μ g Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und *rAbca5*-mRNA mittels einer genspezifischen Oligonukleotidsonde (RR13, → 2.1.7.6.4) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde der Blot mit einer β -Aktin-genspezifischen Sonde rehybridisiert.

B Dargestellt ist die densitometrische Auswertung eines repräsentativen Northern Blots. Der Kontrollwert mit vergleichbarer DMSO-Konzentration nach 4 Tagen wurde gleich 100% gesetzt. Für die Probenauftragung und die Säulen im Diagramm gelten folgende Zuordnungen: **1** = Kontrolle unter Standardbedingungen, **2** = Kontrolle + 0.15% (v/v) DMSO, **3** = 100 nM APD in DMSO.

3.5.4 Zeitabhängige Zunahme der *rAbca5*-mRNA-Expression

Im Rahmen der Induktionsversuche mit verschiedenen LXR-Liganden wurde auch die zeitabhängige Entwicklung der *rAbca5*-mRNA in Kulturen primärer Hepatozyten unter Standardbedingungen untersucht. Über 4 Tage wurde unter Kontrollbedingungen eine stetige Zunahme der Expression beobachtet. Am zweiten Tag des Experiments lag die *rAbca5*-mRNA-Expression bereits bis zu 20% über dem Ausgangswert. Tag 3 zeigte einen geringeren Expressionsanstieg um weitere 10%. Am vierten Tag war der deutlichste Anstieg zu verzeichnen, so daß die Gesamtzunahme der Expression über 4 Tage bis zu 75% betrug (Abb. 3.17).

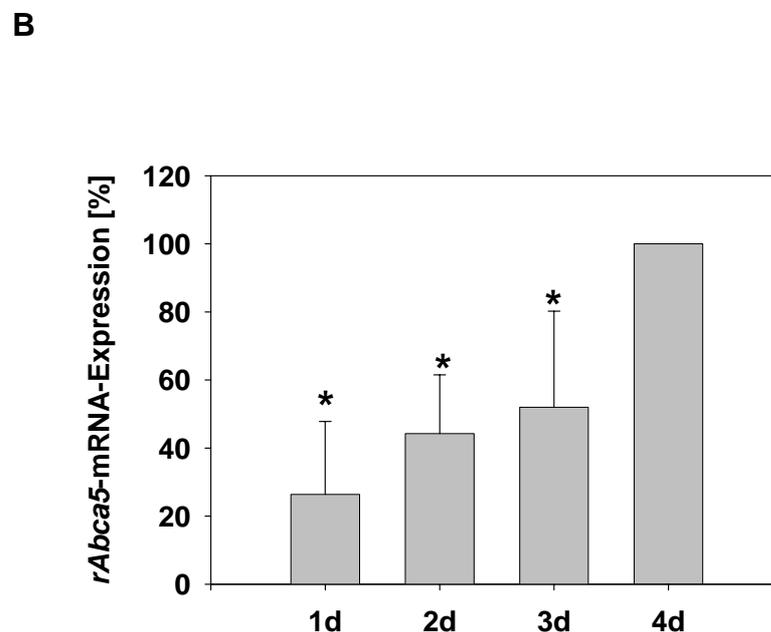
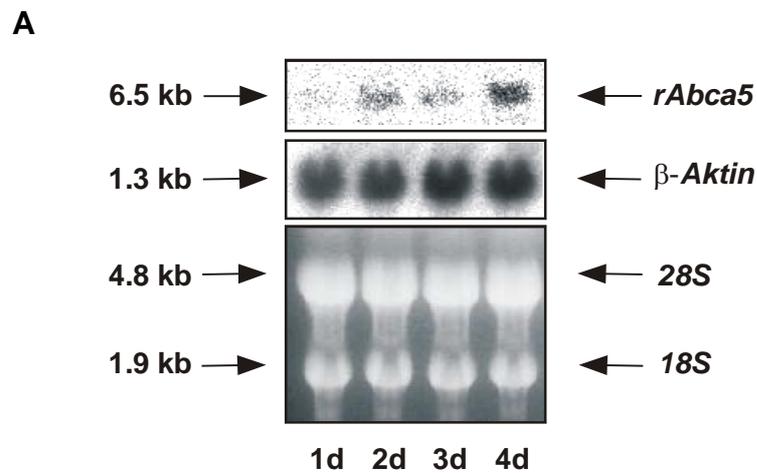


Abb. 3.17 Zeitabhängige Hochregulation der *rAbca5*-mRNA Expression unter Kontrollbedingungen. Primäre Hepatozyten der Ratte wurden für vier Tage unter Kontrollbedingungen kultiviert.

A Dargestellt ist ein repräsentativer Northern Blot. Pro Probe wurden 25 μ g Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und *rAbca5*-mRNA mittels einer

genspezifischen Oligonukleotidsonde (RR13, → 2.1.7.6.4) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde der Blot mit einer β -Aktin-genspezifischen Sonde rehybridisiert.

B Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der densitometrischen Auswertungen \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. Die *rAbca5*-mRNA Expression nach 4d wurde gleich 100% gesetzt. Signifikanzniveau: *, $p < 0.05$, t-Test für ungepaarte Werte.

3.6 Quantitative Analyse der Expression von *rAbca5* V+16

Das Auftreten von alternativen mRNA-Transkripten ist für viele Genfamilien ein häufiges Phänomen, und es erfordert weitere Untersuchungen, um die physiologische Relevanz eines alternativen Transkripts zu bewerten. Aus diesem Grund wurde die Häufigkeit der *rAbca5* V+16-mRNA (SV) im Verhältnis zur *rAbca5*-mRNA (VT) in SER-W3 Zellen, frisch isolierten Hepatozyten und 9 verschiedenen Organen der Ratte mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

Mittels einer 5-stufigen Standardkurve ($717\text{--}4.48 \times 10^5$ Moleküle/10 μl DNA, → 2.2.6.4) für je ein Referenzplasmid des Volltransporters (VT) und der Splicevariante (SV) wurde bestätigt, daß die PCR-Experimente für beide Amplifikate unter vergleichbaren kinetischen Bedingungen verliefen (vergleichbare Standardkurve, ohne Abb.). Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde daher die Standardkurve für eines der beiden Referenzplasmide (VT) bestimmt, um die absolute Menge an Transkripten in den Proben zu berechnen (Abb. 3.18).

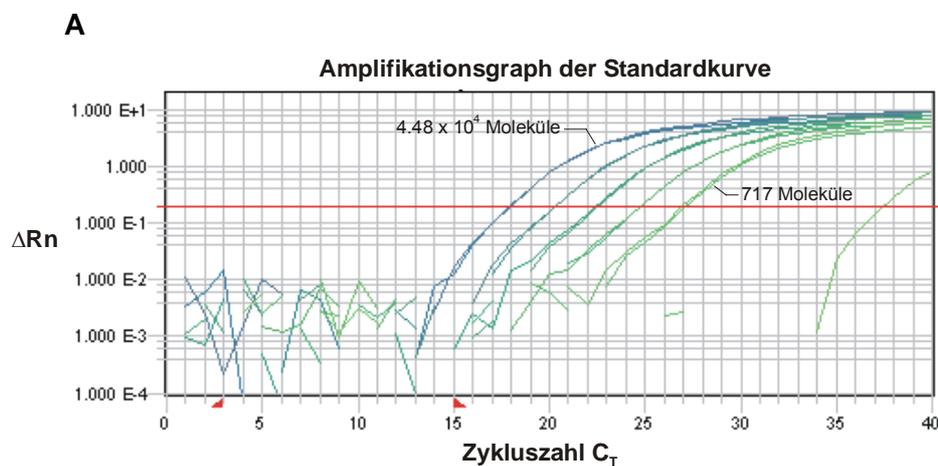


Abb. 3.18A **Amplifikationsgraph der Standardkurve für das Referenzplasmid VT.** Der Graph zeigt eine Auftragung des Anstiegs des normalisierten Reportersignals (ΔR_n) vs. die Amplifikationskurven der einzelnen Standardlösungen mit bekannter cDNA-Molekülzahl (717, 3584, 17920, 8.96×10^4 und 4.48×10^5 Moleküle). Die Abbildung wurde der Analysesoftware SDS 2.1 entnommen.

Je mehr cDNA-Moleküle als Matrize in der PCR-Reaktion enthalten waren, desto schneller wurde ein Fluoreszenzsignal detektiert, das sich vom Reaktionshintergrund abhob. Der

Threshold (waagerechte rote Linie), an dem der C_T -Wert abgelesen wurde, befand sich im Bereich der exponentiellen Reaktionsphase, die weitgehend frei von störenden Nebenreaktionen war.

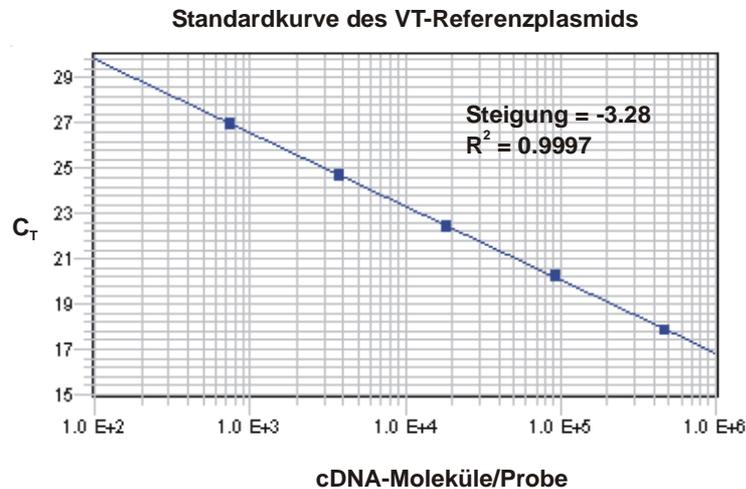
B

Abb. 3.18B Aus dem Amplifikationsgraphen errechnete Standardkurve für das VT-Referenzplasmid. Gezeigt ist die Auftragung der abgelesenen C_T -Werte (Zykluszahl, an der das Reportersignal sich vom Reaktionshintergrund abhebt) vs. die eingesetzten cDNA-Moleküle der Standardlösungen. Alle Meßwerte wurden durch eine Doppelbestimmung erhalten und als Mittelwerte dargestellt.

Die errechnete Standardkurve für das VT-Referenzplasmid verdeutlicht, daß die C_T -Werte mit sinkender Molekülzahl der cDNA-Matrizenlösung anstiegen, um ein vergleichbares Reportersignal zu produzieren (negative Steigung). Der hohe Korrelationskoeffizient R^2 zeigt die gute Reproduzierbarkeit der in Doppelbestimmung erhaltenen Datenpunkte.

Probe	Anzahl der cDNA- Transkripte	Anzahl der 18S- Transkripte	Anzahl der Transkripte/ 10^5 18S Moleküle	% SV
Gehirn_SV	2881.3	421168	684	2.6
Gehirn_VT	110270	421168	26182	
Hepatos_SV	1390.8	518862	268	3.8
Hepatos_VT	36830	518862	7098	
Herz_SV	0	629	0	0
Herz_VT	574.59	629	91329	
Leber_SV	366.25	358555	102	3.6
Leber_VT	10071	358555	2809	
Lunge_SV	12912	1074598	1202	6.0
Lunge_VT	214240	1074598	19937	

Milz_SV	449.60	168919	266	9.9
Milz_VT	4529.4	168919	2681	
Muskel_SV	704.01	243367	289	4.5
Muskel_VT	15676	243367	6442	
Niere_SV	656.99	134298	489	4.6
Niere_VT	14265	134298	10622	
Pankreas_SV	149.84	500800	30	11.2
Pankreas_VT	1339.6	500800	267	
Testis_SV	11517	2022700	569	3.4
Testis_VT	334160	2022700	16520	
SER-W3_SV	2954.8	819420	360.60	10.2
SER-W3_VT	28916	819420	3528.8	

Tabelle 3.5 Quantifizierung der erfaßten cDNA-Transkripte für *rAbca5*, *rAbca5 V+16* und *18S*-RNA in 9 verschiedenen Organen der Ratte, frisch isolierten Hepatozyten und SER-W3 Zellen. Mittels der Standardkurve (→ Abb. 3.18) wurden die absoluten Molekülnzahlen/Probe (in 40 ng cDNA) bestimmt und daraus der relative Gehalt des Splicevarianten-Transkripts (SV) in bezug auf den *rAbca5*-mRNA-Gehalt abgeleitet. Als interner Standard wurde der *18S*-RNA-Gehalt aller Proben bestimmt und auf ein *18S*-Standardplasmid (zur Verfügung gestellt von Uta Ferch, Abt. Humangenetik Göttingen) bezogen.

Die relativen Anteile der cDNA-Transkripte der Splicevariante *rAbca5 V+16*-mRNA in bezug auf die cDNA-Transkripte der *rAbca5*-mRNA schwankten zwischen 2.6% im Gehirn der Ratte und 11% im Pankreas. Die mRNA-Proben aus dem Herz der Ratte zeigten keinerlei Expression der Splicevariante bei gleichzeitig niedrigem *18S* RNA-Gehalt. Leber und frisch isolierte Hepatozyten hatten mit 3.6% und 3.8% eine annähernd gleiche Expression der Splicevariante wie der Testis der Ratte mit 3.4%. In der Sertolizelllinie SER-W3 wurden ein 10.2%-iger Anteil der Splicevariante in Bezug auf die mRNA des Volltransporters gemessen und damit ein mit dem Pankreas und der Milz (9.9%) vergleichbarer Wert. Mittlere Anteile der Splicevariante wurden in Niere (4.6%), Muskel (4.5%) und Lunge (6.0%) detektiert.

3.7 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation

Die Versuche zur subzellulären Lokalisation des *rAbca5*-Proteins und der Splicevariante *rAbca5 V+16* wurden in transient transfizierten Kulturen von drei verschiedenen Zelllinien auf der Basis einer Überexpression von Epitop-getaggtten Fusionsproteinen durchgeführt (→ 2.2.12f). Die SER-W3-Linie stammte aus Sertolizellen einer 17-Tage-alten Ratte und stellte ein homologes Expressionssystem mit einer endogenen *rAbca5*-Expression dar. Als heterologe Zellsysteme wurden die humane HEK 293-Linie aus Nierenepithelzellen und die

humane Kolonkarzinom-Linie Caco-2 verwendet. Beide Zelllinien wiesen eine endogene Expression des humanen *ABCA5* auf.

3.7.1 Generierung von V5-Expressionsklonen für rAbca5 und rAbca5 V+16

Für die Herstellung der Expressionplasmide wurden die kodierenden Sequenzen für rAbca5 und rAbca5 V+16 mittels PCR aus Gesamt-RNA des Testis der Ratte amplifiziert (→ 2.2.6.3). Zur Reduktion von Taq-Polymerase-bedingten Punktmutationen wurde eine Polymerasemischung mit Korrektur-Aktivität benutzt (Expand Long Template System aus Pfu oder Pwo + Taq-Polymerase) und die Zahl der PCR-Zyklen auf 10 begrenzt. Für nachfolgende Ligationsreaktionen wurden für das *rAbca5*-cDNA-Amplifikat 30 PCR-Ansätze auf 4 µl konzentriert.

3.7.1.1 Herstellung von Konstrukten mit V5-Epitop

Der pcDNA3.1/V5-His TOPO Expressions-Vektor (Invitrogen) erlaubte die direkte Ligation der obigen PCR-Produkte nach der TOPO-Methode (→ 2.2.5.1). Nach Transformation in elektrokompente *E. coli* (→ 2.2.5.4) und Restriktionsanalyse der Kolonien wurden Klone mit intakten Inserts zwecks detaillierter Sequenzüberprüfung vollständig sequenziert. Sequenzdateien wurden mit den PC-Softwareprogrammen Chromas (Technelysium), Staden Package und ClustalW (EBI) ausgewertet. Um verlässliche Ergebnisse über die subzelluläre Lokalisation zu erhalten, konnten nur fehlerfreie Expressionsklone verwendet werden, deren rAbca5-cDNA im Plasmid zur nativen rAbca5-Aminosäuresequenz im exprimierten Fusionsprotein führen würden. Von 54 sequenzierten rAbca5-V5-Klonen wurde ein fehlerfreier Klon detektiert. Für rAbca5 V+16 wurde auf dem gleichen Weg ein korrekter Expressionsklon rAbca5 V+16-V5 gewonnen. Das *Abca*-Gen stand in diesem Vektor unter Kontrolle des humanen Cytomegalie Virus-Promotors (CMV). Im Anschluß an den C-Terminus des ligierten Inserts (rAbca5, rAbca5 V+16) befand sich eine Linkerregion von 22 Aminosäuren, an die sich das V5-Epitop (14 Aminosäuren), und nach einem Arg-Thr-Gly-Linker die Polyhistidin-Region mit 6 Histidin-Substituenten anschlossen.

	rAbca5 (VT)	rAbca5 V+16 (SV)
cdNA-Amplifikat	4940 bp	2789 bp
Primer	RF3, RR2	RF3, KRSV R1
Resultierendes Peptid	1642 AS, ca. 180 kDa	925 AS, 102 kDa
V5-Konstrukt	10463 bp	8312 bp
V5-Fusionsprotein	1678 AS, 185 kDa	961 AS, 107 kDa

Tabelle 3.6 V5-Expressionplasmide für rAbca5 und rAbca5 V+16. Diese Tabelle faßt die Herstellung der V5-Expressionskonstrukte für rAbca5 und rAbca V+16 zusammen. VT = Volltransporter, SV = Splicevariante.

3.7.1.2 Überexpression der V5-Konstrukte

Nach Transfektion von VT-V5 und SV-V5 in Caco-2- und SER-W3-Zellen wurden die Zellen nach 48 h geerntet und die Zellfraktionen im Western Blot untersucht. Der Nachweis des entsprechenden Fusionsproteins sollte mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop erfolgen. Weder für VT-V5 noch für SV-V5 konnten spezifische Proteinbanden detektiert werden.

3.7.2 Herstellung von Konstrukten mit EGFP-Epitop

Um einen direkten Nachweis des exprimierten Fusionsproteins in der Zellkultur zu ermöglichen, wurden für rAbca5 und rAbca5 V+16 Konstrukte mit einem EGFP-Epitop-Tag generiert. Dazu wurde der pEGFP-N1-Vektor (BD Biosciences) verwendet. Aus VT-V5 und SV-V5 wurden durch präparative Restriktion mit den Enzymen *SacI* und *SacII* das jeweilige Insert isoliert und in den pEGFP-N1-Vektor ligiert. Nach Transformation in elektrokompente *E. coli* (→ 2.2.5.4) und Restriktionsanalyse der Kolonien wurden je ein Klon für rAbca5-EGFP und rAbca5 V+16-EGFP ausgewählt und beide zur Überprüfung des Inserts sequenziert. Die Abca-Gene *rAbca5* und *rAbca5 V+20* der Ratte standen in diesem Vektor unter der Kontrolle des humanen Cytomegalie Virus-Promotors (CMV). An den C-Terminus des jeweiligen Inserts schloß sich eine Linkerregion von 28 Aminosäuren und darauf das EGFP-Epitop (239 Aminosäuren) an.

	rAbca5 (VT)	rAbca5 V+16 (SV)
cDNA-Insert aus V5-Vektor	5033 bp	2882 bp
EGFP-Konstrukt	9734 bp	7583 bp
EGFP-Fusionsprotein	1909, 215 kDa	1192 AS, 135 kDa

Tabelle 3.7 EGFP-Expressionsplasmide für rAbca5 und rAbca5 V+16. Diese Tabelle faßt die Herstellung der EGFP-Expressionskonstrukte für rAbca5 und rAbca V+16 zusammen. VT = Volltransporter, SV = Splicevariante.

3.7.3 Expression der EGFP-Konstrukte

Die transienten Transfektionen der EGFP-Expressionsplasmide VT-EGFP und SV-EGFP wurden in Caco-2-, SER-W3- und HEK293-Zellen durchgeführt und nach 24 h, 48 h und 72 h fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei erwies sich die Expression der EGFP-Konstrukte in den SER-W3-Zellen als zu gering, um eine Detektion der Fusionsproteine zu ermöglichen. Im weiteren Verlauf der Transfektionsexperimente wurden daher ausschließlich HEK293-Zellen und Caco-2-Zellen verwendet.

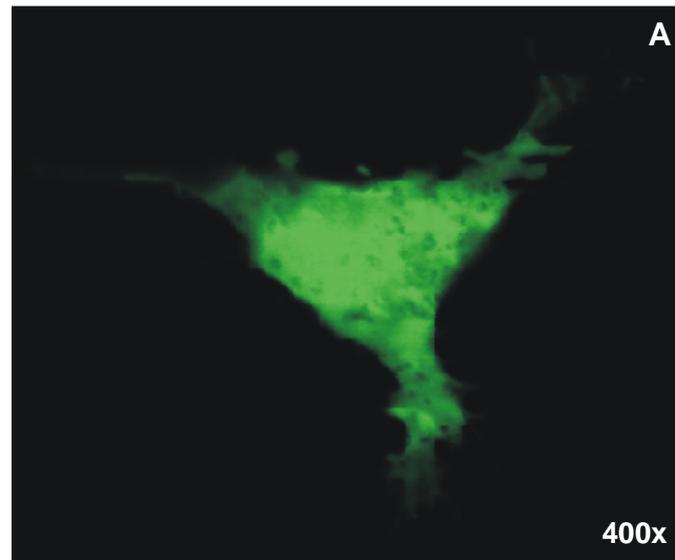


Abb. 3.19A Expression der EGFP-Kontrollplasmids in transient transfizierten HEK293-Zellen (400x). EGFP verteilt sich in der gesamten Zelle inklusive Zellkern. Die Zellen wurden in einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet und digital fotografiert (Leica Irbe).

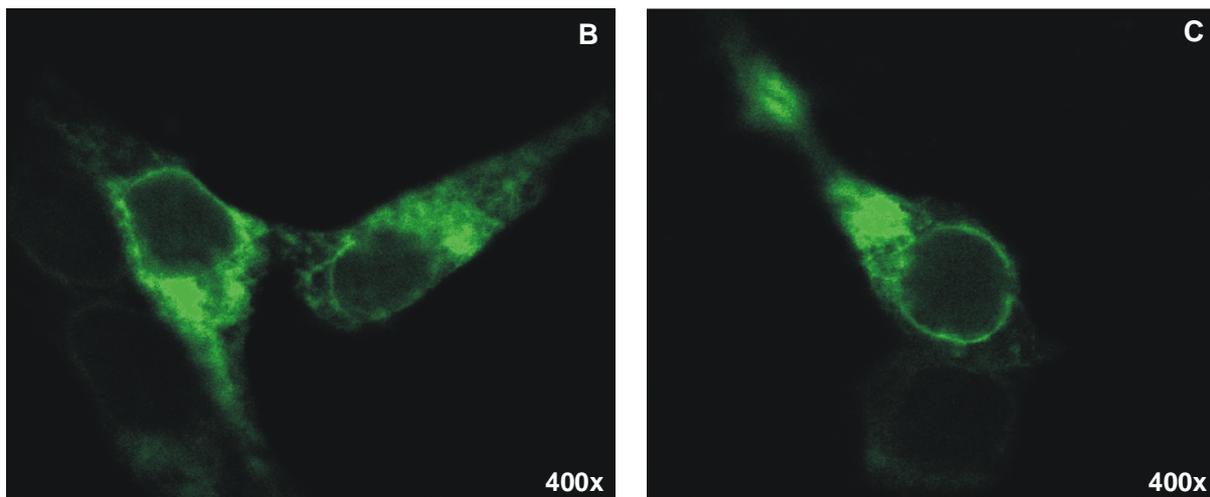


Abb. 3.19B,C Expression der EGFP-Fusionsplasmide in transient transfizierten HEK293-Zellen (400x). Sowohl VT-EGFP als auch SV-EGFP weisen eine intrazelluläre Verteilung auf. Die Zellen wurden in einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet und digital fotografiert (Leica Irbe).

24 h nach der Transfektion wurde eine maximale Expression der EGFP-Konstrukte beobachtet, die in den Kontrolltransfektionen (EGFP) nach visueller Beurteilung eine Effizienz von ca. 30%, in den Transfektionen für VT-EGFP und SV-EGFP jedoch nur eine Effizienz von < 5% aufwies. Das ca. 30 kDa-große EGFP-Protein verteilte sich im gesamten Zytoplasma der HEK293-Zellen (Abb. 3.19 A). Beide Fusionsproteine wiesen eine ähnliche, um den Zellkern zentrierte Verteilung auf (Abb.3.19 B-C). Auch in Teilen des Zytoplasmas in

Kernnähe war eine starke Expression zu beobachten. Es wurden keine Hinweise auf eine Lokalisierung von rAbca5-EGFP und rAbca5 V+16 in der Zytoplasmamembran gefunden.

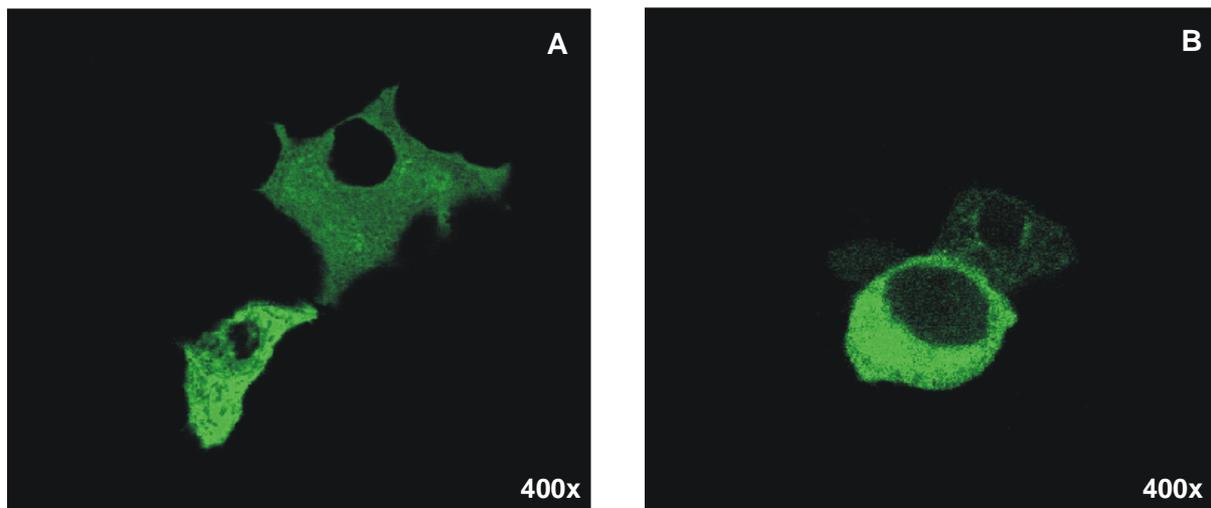


Abb. 3.20 Expression der EGFP-Konstrukte in transient transfizierten Caco-2-Zellen.

A Das EGFP-Kontrollplasmid verteilt sich im gesamten Zytoplasma, nicht jedoch im Zellkern.

B Das Fusionsprotein VT-EGFP ist in einer Kappe rund um den Zellkern erkennbar.

In den Caco-2-Zellen wurde das Expressionsmaximum 24 h nach der Transfektion erreicht und war für alle Konstrukte deutlich geringer als in den HEK293-Zellen. Das Expressionskonstrukt der Splicevariante rAbca5 V+16 konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden. EGFP verteilte sich im Zytoplasma, ohne jedoch den Kern zu penetrieren (Abb. 3.20 A). Das Fusionsprotein rAbca5-EGFP verteilte sich in einer Kappe rund um den Zellkern (Abb. 3.20 B). Auch in den Caco-2 Zellen wurden keine Hinweise auf eine Lokalisierung von rAbca5-EGFP und rAbca5 V+16 in der Zytoplasmamembran gefunden.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit basiert auf einem experimentellen Ansatz zur Isolierung eines neuen ABCA-Gens und nutzte die in wachsendem Maß zur Verfügung stehenden Sequenzen aus Gendatenbanken vor allem zu vergleichenden Analysen mit den experimentell erzeugten Daten. Auf diese Weise sollten die neu identifizierten Gene *hABCA5* und *rAbca5* in einem möglichst physiologischen Kontext erschlossen werden, um geeignete Voraussetzungen für spätere funktionelle Untersuchungen zu schaffen.

Seit Beginn dieses Projekts wurden neben ABCA5 acht weitere der bisher bekannten 12 humanen Gene der ABCA-Subfamilie identifiziert (KAMINSKI et al. 2001, DEAN et al. 2001, ANNILO et al. 2002, TSURUOKA et al. 2002, PIEHLER et al. 2002, PRADES et al. 2002, WENZEL et al. 2003). Diese Entwicklung wurde durch den Fortschritt des Humangenomprojekts entscheidend beinflusst und erleichterte die Vorhersage kodierender Sequenzen auf Grundlage des Vergleichs verschiedener öffentlicher (EMBL, Genbank) und privater (Celera) Datenbanken (*in silico* Klonierung). Im Verlauf der Arbeiten wurde wiederholt festgestellt, daß experimentell erhobene Daten aus physiologischen Systemen entscheidend zu einem besseren Verständnis des neu identifizierten Gens beitragen, das allein mit Datenbank-recherchen nicht erreicht werden kann.

4.1 Screening von Testis-RNA mittels degenerierter RT-PCR (Vorarbeiten)

Die hier von HIRSCH-ERNST et al. (1998) verwendete Strategie stellte eine Variante der RT-PCR Methode nach LEIGHTON et al. (1995) dar, die den hohen Konservierungsgrad der ATP-Bindungskassetten zwischen den ABC-Genen ausnutzte (Abb. 4.1). Die degenerierten PCR-Primer (S1.for, S2.rev → 2.1.7.6.6) entsprachen den am stärksten konservierten Sequenzmotiven, Walker A bzw. Walker B und bestanden aus statistischen Desoxy-Nukleotid-Mischungen, um eine Vielzahl von Amplifikaten zu generieren.

```

ABCA9      TALLGHSGAGKTTLLNLSGLSVPTSGSVTVYNHTLSRMADIENISKFTGFQSPQSNVQ 570
ABCA10     TAILGHNGAGKSTLLNLSGLSVSTEGSATIYNTQLSEITDMEEIRKNIGFCQFNFQ 580
ABCA6      TAILGHSAGKSSLLNLSGLSVPTSGSVTIYNKNLSEMQLDLEIRKITGVCPQFNVQ 567
ABCA5     TALLGHSGTGKSTLMNILCGLCPPSDGFASIYGHRVSEIDEMFEARKMIGICPQLDIH 567
AJ275973.1 -----SGCGKSTLMNILCGLCPPSDGFASIYGHRVSEIDEMFEARKMIGICPQLDIH 52
          ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * * *

```

Walker A

```

ABCA9      FGFLTVKENLRLFAKIKGILPHEVEKEVQRVVQELEMENIQDILAQNLSSGGQNRKLT 628
ABCA10     FDFLTVRENLRVFAKIKGIDQPKEVEQEVKRIIMELDMQSIQIIAKKLSGGQKRKLT 638
ABCA6      FDILTVKENLSLFAKIKGIHLKEVEQEVQRILLELDMQNIQDNLAKHLSEGQKRKLT 625
ABCA5     FDVLTVEENLSILASIKGIPANNIIQEVQKVLDDLDMQTIKDNQAKKLSGGQKRKLS 625
AJ275973.1 FDVLTVEENLSILASIKGIPANNIIQEVQKVLDDLDMQTIKDNQAKKLSGGQKRKLS 110
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

ABCA9	GIAILGDPQV LLLDEPTAGLD PLSRHRIWNLLKEGKSDRVILF	671
ABCA10	GIAILGDPQV LLLDEPTAGLD PF SRHRVWSSLKEHKVDRILIF	681
ABCA6	GITILGDPQI LLLDEPTTGLD PF SRDQVWSSLRERRADHVILF	668
ABCA5	GIAVLGNPKI LLLDEPTAGMD PCSRHIVWNLLKYRKANRVTVF	668
AJ275973.1	GIAVLGNPKI LLLDEATSAL	130
	** * * * * * * * * * * * * * *	
	Walker B	

Abb. 4.1 Sequenzgegenüberstellung der 1. ATP-Bindungskassette von 4 ABCA-Transportern sowie dem aus Testis-RNA mittels degenerierter RT-PCR isolierten ABCA5-Fragment AJ275973.1. Die konservierten Walker Motive A und B sind fett markiert, der Bereich der degenerierten Primer wurde zusätzlich umrahmt. ABCA 6, 9 und 10 waren zum Zeitpunkt dieser Arbeiten nicht bekannt.

Aus humaner Testis-RNA wurde neben diversen bekannten ABC-Gen-Fragmenten ein neues cDNA-Fragment (392 bp) isoliert, das einem neuen ABCA-Gen entsprach (AJ275973.1). Dieses Fragment wies mit den bereits vollständig charakterisierten ABCA-Transportern Sequenzhomologien von 39% (ABCA1) und 36% (ABCA4) auf.

4.2 ABCA5 des Menschen und *Abca5* der Ratte

4.2.1 Zur Struktur des ABCA5-Gens des Menschen

Für das ABCA5-Gen des Menschen verzeichnen die Gendatenbanken aktuell zwei vollständige mRNA-Sequenzen (NM_018672 und NM_172232). NM_018672 (7044 bp) stellt das größte Transkript dar und unterscheidet sich von NM_172232 (5939 bp) in der Länge und Zusammensetzung der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR). Die im Rahmen dieser Arbeit isolierte ABCA5-cDNA-Sequenz (5096 bp, AJ275973.3) ist identisch mit NM_172232, endet jedoch 65 bp vor dem Translationsstart und 102 bp nach dem Translationsstop.

Das ABCA-Gen umfaßt ohne regulatorischen Bereich eine genomische Region von ca. 80 kb. Dies entspricht den genomischen Größen der am nächsten verwandten ABCA-Gene ABCA10 (97 kb), ABCA9 (85 kb), ABCA8 (74 kb) und ABCA6 (62 kb) des ABCA-Clusters. Von den 39 Exons kodieren 38 für den offenen Leserahmen von 4929 bp. Exon 1 wird durch ein Insert von 12.6 kb Länge von Exon 2 getrennt und besteht aus 100 bp, von denen in den vorliegenden Experimenten 52 bp mittels RACE-PCR erfaßt wurden. Exon 2 enthält das mit dem Konsensusmotiv von KOZAK (1986) kompatible Signal AACATGT für den putativen Translationsstart. Die 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) der beiden ABCA5-mRNA Transkripte (NM_018672 und NM_172232) sind identisch und umfassen jeweils 897 b. Eine Analyse der 3'-UTR nach BEAUDOING et al. (2000) ergab 11 putative Polyadenylierungssignale (Poly-AS), wovon das am stärksten in natürlichen mRNA-Molekülen konservierte Poly-AS-Hexamer AATAAA dreimal vorkam: 170 bp, 375 bp und 867 bp abwärts des Stop-Signals. Das letzte Poly-AS befindet sich damit -15 nt aufwärts des Transkriptendes. Die 3'-

UTR der von uns isolierten cDNA (AJ275973.3) endet 36 bp nach einem möglichen Poly-AS TTTAAA, das von BEAUDOING et al mit einer Häufigkeit von 1.2% detektiert wurde. Dieser Befund und die Präsenz weiterer putativer Poly-AS in der 3'-UTR des *ABCA5*-Gens sprechen für die Benutzung diverser Poly-AS bei der mRNA-Prozessierung und/oder regulatorische Funktionen dieser Signale.

4.2.2 Das *ABCA5*-Gen ist Bestandteil eines *ABCA*-Genclusters

Das *ABCA5*-Gen ist auf Chromosom 17q24.3 lokalisiert und ist Bestandteil eines *ABCA*-Genclusters (ARNOULD et al. 2001) in der genomischen Region 17q24.2–3. Der Cluster besteht aus fünf Mitgliedern, *ABCA5*, 6, 8, 9 und *ABCA10*, und stellt DEAN et al. (2001) zufolge eine phylogenetisch distinkte Subgruppe innerhalb der *ABCA*-Subfamilie dar (Abb. 4.2), die sich auch im Konservierungsgrad der Intron-Exon-Übergänge äußert. Die *ABCA*-Gene des Clusters bestehen im Gegensatz zu den übrigen *ABCA*-Genen aus 38 kodierenden Exons, während die auf 6 verschiedene Chromosomen verteilten *ABCA*-Gene *ABCA1* (9q22-q31), *ABCA2* (9q34), *ABCA3* (16p13.3), *ABCA4* (1p22), *ABCA7* (19p13.3), *ABCA12* (2q35) und *ABCA13* (7p11-q11) zwischen 50 (*ABCA4*) und 62 (*ABCA13*) Exons besitzen. Es wird angenommen, daß alle *ABCA*-Gene des Clusters durch Genduplikation von einem Eltern-Gen entstanden sind. *ABCA5*-orthologe Gene wurden bisher in Ratte und Maus charakterisiert, *ABCA5*-ähnliche Gene wurden auch im japanischen Kugelfisch *fugu rubripe* (ANNILO et al. 2003) und im Genom der Anophelesmücke *Anopheles gambiae str. PEST* (THE ANOPHELES GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, Genbank XM_311531) detektiert, so daß *ABCA5* das Eltern-Gen des Clusters auf Chromosom 17 sein könnte.

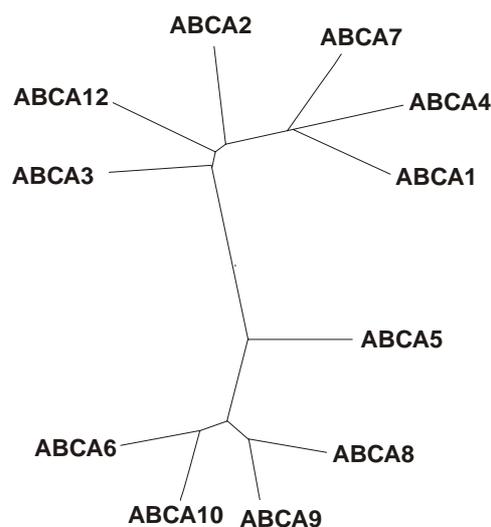


Abb. 4.2 Phylogenetische Analyse der *ABCA*-Gene. Die Abbildung wurde nach DEAN et al. (2001) angefertigt und zeigt das Ergebnis eines Sequenzvergleichs der *ABCA*-

Gene mit dem Programm PILEUP auf Basis der *neighbor-joining method* nach SAITOU et al. (1987).

4.2.3 Zur Struktur des *Abca5*-Gens der Ratte

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierte cDNA für das *Abca5*-Gen der Ratte umfaßt 5170 bp und stellt aktuell das einzig bekannte, für das vollständige *rAbca5*-Gen kodierende Transkript dar (AJ426052 = NM_173307). Über den kodierenden Bereich von 4929 Nukleotiden (nt) weist es eine Sequenzhomologie mit dem *ABCA5*-Gen des Menschen von 86% auf, die auf Aminosäureebene 90% beträgt. Die 3'-UTR besteht aus 206 nt und zeigt zum entsprechenden Bereich der 3'-UTR von *ABCA5* eine Ähnlichkeit von 59%. Die 3'-UTR endet 13 nt abwärts eines zwischen beiden Spezies konservierten Poly-AS AATAAA (→ 4.2.1), das 188 nt nach dem Translationsstop beginnt. Die 3'-UTR enthält zusätzlich eine mögliche Poly-AS-Variante TTTAAA 81 nt nach dem Translationsstop, das eine Entsprechung zu einem Signal gleicher Sequenz 62 nt nach dem Stop-Signal im humanen *ABCA5*-Gen darstellen könnte.

Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) des charakterisierten Gens endet bereits –35 nt vor dem AACATGG-Signal für den putativen Translationsstart, was einen experimentell bedingten Abbruch der reversen Transkription von der mRNA-Matrize vermuten ließ und durch die kürzlich im Rahmen einer Datenbankrecherche gefundenen cDNA-Sequenz, die vermutlich einen Teil der 5'-UTR darstellt, bestätigt werden konnte (→ 3.2.3). Das *rAbca5*-Gen erstreckt sich über einen genomischen Bereich von ca. 68 kb und gliedert sich wie *ABCA5* des Menschen in 38 kodierende Exons, von denen 23 bezüglich der Exongröße zwischen den Spezies Mensch und Ratte konserviert sind.

Das *Abca5*-Gen der Ratte ist eins von bisher fünf charakterisierten *rAbca*-Genen. Untersuchungen von ANNILO et al. (2003) über *Abca*-Gene der Maus lassen vermuten, daß *rAbca5* ebenso wie *hABCA5* und das *Abca5*-Gen der Maus Teil eines Genclusters ist, das sich für die Ratte auf Chromosom 10 zu befinden scheint.

4.2.4 Zur Struktur der Proteine *hABCA5* und *rAbca5*

Die *ABCA*-Gene *hABCA5* und *rAbca5* besitzen einen identischen offenen Leserahmen von 4929 bp (inklusive Stopkodon). Daraus resultieren zwei Polypeptide von 1642 Aminosäuren mit einer zu 90% identischen Primärstruktur, in der sich nur 150 von 1642 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Beide Proteine bestehen aus zwei Membrandomänen (MD) reich an unpolaren Aminosäuren und aus zwei hydrophilen, im Zytoplasma gelegenen Nukleotidbindungsregionen (NBR), den ATP-Bindungskassetten. Sie weisen damit die Struktur eines typischen ABC-Volltransporters auf (MD–NBR–MD–NBR). Die erste Membrandomäne beginnt nach einem kurzen N-Terminus (31 AS) und erstreckt sich über etwa 380 Aminosäuren, die zu 88% zwischen Ratte und Mensch konserviert ist. Die zweite

Membrandomäne ist mit etwa 362 Aminosäuren etwas kürzer und zwischen den beiden Spezies zu 86% identisch. Der bereits hier zwischen den orthologen Proteinen zweier Organismen erkennbare Trend zur größeren Variabilität der Membrandomänen im Vergleich zur Gesamthomologie ist zwischen verschiedenen ABC-Transportern wesentlich stärker ausgeprägt und eine strukturelle Voraussetzung für die Ausbildung einer Substratspezifität. Die jeweils einer Membrandomäne folgenden Nukleotidbindungsregionen in hABCA5 und rAbca5 liegen in einem hydrophilen Bereich von ca. 450 Aminosäuren (1. NBR) bzw. 417 Aminosäuren (2. NBR). Dabei ist die erste NBR mit 93% stärker konserviert als die zweite NBR (91%). Die charakteristischen Sequenzmotive beider ATP-Bindungskassetten Walker A (AS 514–522, GHSGTGKST, AS 633–641, GPNGAGKST), die Signatursequenz (AS 615–619, LSGGQ) und die Walker B Motive (AS 636–647, LLLDEPTAGMDP, AS 1455–1465 LLDEPSTGMDP) sind vollständig zwischen den Spezies Ratte und Mensch konserviert. Die Signatursequenz kommt wie in allen humanen ABCA-Proteinen des ABCA-Subclusters in der 2. NBR nur noch in degenerierter Form (AS 1437–1140, LPAGI) vor, während in den übrigen ABCA-Transportern zumindest das Kernmotiv SGG mit dem kürzlich als für die ATP-Prozessierung kritisch erkannten Serin-Substituent erhalten ist (HOPFNER et al. 2003, MONCALIAN et al. 2004). Das Phänomen einer strukturellen Asymmetrie der Signaturmotive in einem ABC-Volltransporter ist bereits von GAUDET et al. (2001) für das aus den beiden ABCB-Halbtransportern TAP1 und TAP2 gebildete TAP-Protein beschrieben worden und kann in der Primärsequenz zahlreicher ABC-Transporter verschiedener Organismen detektiert werden, ohne daß funktionelle Auswirkungen bereits bekannt wären (TAKADA et al. 1998, HRYCYNA et al. 1999, PROFF et al. 2001).

Die Existenz zweier Nukleotidbindungsregionen wurde lange zum Anlaß genommen, über eine mögliche Abstufung bezüglich ihrer funktionellen Bedeutung bei der ATP-Hydrolyse zu spekulieren. Inzwischen gilt es durch Strukturaufklärung bakterieller ABC-Transporter (Hopfner et al. 2000, CHANG et al. 2001, 2003 und LOCHER et al. 2002) jedoch als gesichert, daß ein ATP-Molekül im substrataktivierten Zustand an der Grenzfläche eines Dimers aus der Signatursequenz der einen NBR mit dem sogenannten P-Loop (Walker A Motiv) der anderen NBR gebunden ist. In Abwesenheit von ATP scheint die räumliche Nähe der Nukleotidbindungsregionen merklich reduziert, womit die Hypothese der ATP-abhängigen Dimerisierung der NB-Regionen eine Erklärung dafür bietet, daß am Ende der Strukturaufklärung isoliert kristallisierter ATP-Bindungskassetten (d.h. in Abwesenheit von ATP) meistens monomer auftretende ABC-Domänen standen (LOCHER et al. 2004). Eine ebenso essentielle Kopplung wird zwischen der Bindung des Transportsubstrats im Bereich der Membrandomänen und der durch Konformationsänderungen vermittelten ATP-Bindung und -Hydrolyse vermutet. An diesen Prozessen scheinen auch konservierte Elemente der Membrandomänen (L-Loop) und weitere Motive der Nukleotidbindungsregionen (z.B. Q-Loop, AS 564–572, 1382–1390) aktiv beteiligt zu sein (JONES et al. 2002).

Auf Grundlage der Analyse von hydrophoben Regionen (\rightarrow 3.2.6) kann ein topologisches Modell für hABCA5 und rAbca5 erstellt werden, das der intrazellulären Lokalisation der Nukleotidbindungsregionen und der Verankerung der Membrandomänen in einer zellulären Membran Rechnung trägt, ohne die räumliche Anordnung der Proteindomänen in einem funktionsfähigen Transporter widerspiegeln zu können. Die genaue Anzahl der die Membran kreuzenden α -helikalen Segmente läßt sich dabei nicht vorhersagen, sondern bedarf einer strukturellen Aufklärung durch kristallographische Verfahren, die aufgrund der Proteingröße der ABC-Proteine und der hydrophoben Natur der Membrandomänen bisher nur limitiert angewandt werden konnten.

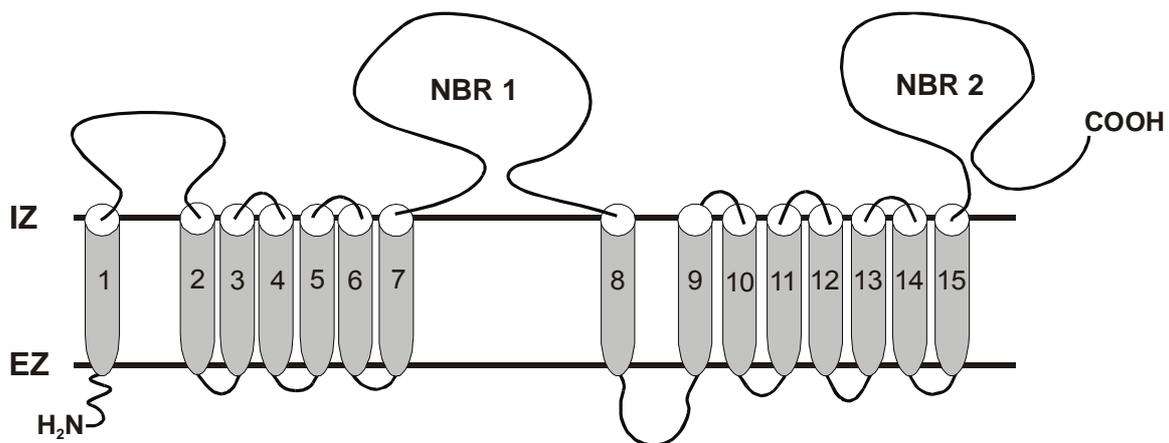


Abb. 4.3 Zweidimensionales topologisches Modell des hABCA5/rAbca5-Proteins. Das Polypeptid besteht aus 2 Membrandomänen und 2 Nukleotidbindungsregionen (NBR), die auf cytoplasmatischen Membranseite liegen. Die Membrandomänen bestehen aus 7 bzw. 8 Membransegmenten (MS) und enthalten zwei größere Loops zwischen MS 1 und MS 2 (127 AS, intrazellulär) und MS 8 und MS 9 (82 AS, extrazellulär). EZ = Extrazellulärraum, IZ = Intrazellulärraum.

4.2.5 Zur Struktur der Splicevariantengene *ABCA5 V20+16* und *rAbca5 V+16*

Beide Gene unterscheiden sich durch eine 16 nt-Insertion am 3'-Ende des Exon 20 (\rightarrow 3.2.3, 3.2.5), die durch eine Verschiebung des offenen Leserahmens zu einem vorzeitigen Translationsende nach 925 Aminosäuren führt. Im *ABCA5 V20+16*-Gen stammt diese Insertion aus den ersten 16 nt des 2669 nt-langen Introns zwischen den Exons 20 und 21, das die klassischen Intron-Exon-Grenzen aufweist (5'-GT..Intronsequenz..AG-3'). In *rAbca5 V+16* ist dieses Exon 2050 nt lang und enthält die identischen konservierten Intron-Exon-Grenzen. Die Insertion in der Splicevariante der Ratte ist bis auf einen Austausch eines Nukleotids (T \rightarrow C) identisch mit der entsprechenden Insertion im humanen Gen der *ABCA5*-Splicevariante. Die Konservierung dieses alternativen Spliceprodukts spricht gegen eine zufällige Existenz dieses mRNA-Transkripts und für eine funktionelle Bedeutung dieser Splicevariante

in den *ABCA5/Abca5*-Genen beider Spezies. Im Rahmen der Sequenzanalyse wurde für *rAbca5 V+16* ein cDNA-Klon identifiziert, der die Länge des gesamten kodierenden Bereichs des *rAbca5*-Haupttranskripts mit einer bis auf die Insertionsstelle identischen Intron-Exonstruktur umfaßt. Für die humane Splicevariante wurde anhand von RT-PCR-Versuchen gezeigt, daß ein ähnlich langes kontinuierliches cDNA-Transkript vorlag, so daß die Existenz einer vollständigen mRNA für die konservierte Splicevariante angenommen werden kann.

4.2.6 Zur Struktur der putativen Proteine hABCA5 V20+16 und rAbca5 V+16

Die putativen Polypeptide der Splicevarianten hABCA5 V20+16 und rAbca5 V+16 enden jeweils nach 925 Aminosäuren. Dies entspräche der Größe eines typischen ABC-Halbtransporters mit einer Membrandomäne und einer nachfolgenden Nukleotidbindungsregion mit den für die Volltransporter bereits beschriebenen Sequenzmotiven (→ 4.2.6, Abb. 4.4).

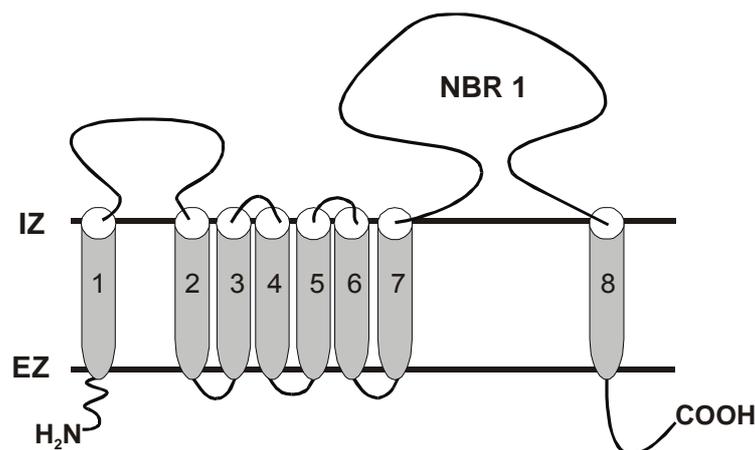


Abb. 4.4 Zweidimensionales topologisches Modell eines putativen Proteins hABCA5 V20+16/rAbca5 V+16. Das Polypeptid entspricht der ersten Hälfte des Volltransporterproteins (→ Abb. 4.3) mit einem zusätzlich vorhergesagten Membransegment (MS 8) nach der Nukleotidbindungsregion (NBR). EZ = Extrazellulärraum, IZ = Intrazellulärraum.

Es ist bekannt, daß die Stabilität membranständiger α -helikaler Strukturen durch die Anwesenheit benachbarter α -Helices positiv beeinflusst wird. Die tatsächliche Existenz des vorhergesagten 8. Membransegments bedarf daher einer experimentellen Bestätigung ebenso wie die physiologische Stabilität und Funktion eines putativen Splicevariantenproteins, das als Halbtransporter, ausgehend vom aktuellen Verständnis von ABC-Transportern, einen Dimerisierungspartner benötigt, um funktionelle Aktivität zu erlangen.

Untersuchungen von WELLINGTON et al. (2002) zur Bedeutung von natürlich vorkommenden Mutationen des *ABCA1*-Gens ergaben eine deutliche Suppression des durch Oxysterole induzierten nativen ABCA1-Proteins auch in heterozygoten Individuen, wenn die Mutation zur Co-Expression einer verkürzten ABCA1-Variante führte. Es konnte gezeigt werden, daß dieser regulatorische Effekt nicht auf mRNA-Ebene, sondern auf Proteinebene stattfand, wobei offen blieb, ob die reprimierten ABCA1-Spiegel die Folge einer verminderten Proteinsynthese oder einer vorzeitigen Proteindegradation waren. Der bemerkenswerte regulatorische Effekt der verkürzten ABCA1-Varianten verdeutlicht die Relevanz der für viele Proteine bekannten Varianten, ohne daß zwingend ein offensichtlicher Phänotyp zugeordnet werden kann.

4.3 Gewebeverteilung von *hABCA5* und *rAbca5*

Die gewebespezifische mRNA-Expression für *hABCA5* und *rAbca5* wurde mittels der Northern-Blot-Methode untersucht und ergab eine für bestimmte Gewebe variierende Verteilung. Für die Expressionsanalyse des humanen *ABCA5*-Gens wurde ein kommerzieller Northern Blot mit RNA aus verschiedenen humanen Organen diverser humaner Spender verwendet, der auf den β -Aktin Gehalt der einzelnen Organproben normalisiert war (\rightarrow Abb. 3.8). Die höchste Expression wurde im Skelettmuskel detektiert, niedrige Expressionsniveaus konnten in Niere, Leber und Plazenta gezeigt werden. Aus früheren Experimenten war bereits die starke Expression der *hABCA5*-mRNA im Testis bekannt, die hier nicht nochmals untersucht wurde.

Für die Expressionsanalyse des *rAbca5*-Gens der Ratte wurde ein Blot aus gleichen Mengen Gesamt-RNA (25 μ g) hergestellt, die aus frisch isolierten Organen eines einzelnen Individuums stammten. Die Kontrollhybridisierung (\rightarrow Abb. 3.9) zeigt den deutlich zwischen verschiedenen Organproben variierenden β -Aktin Gehalt und limitiert damit die quantitative Vergleichbarkeit mit den humanen Organproben, deren inhomogene Herkunft aus verschiedenen Individuen eine geringere Aussagekraft haben als die selbst gewonnenen RNA-Proben der Ratte. Eine dominante Expression des *rAbca5*-Gens der Ratte wurde im Testis festgestellt und bestätigt die Ergebnisse für *hABCA5*. Für die Expression der höhermolekularen *rAbca5*-mRNA Spezies in Testis, Lunge und Gehirn konnte im humanen Organ-System keine Entsprechung detektiert werden. Ein vergleichbares Signal wurde jedoch im Rahmen früherer Experimente in der RNA verschiedener Neuroblastomzelllinien und Caco-2-Zellen gefunden, das auf die Präsenz mehrerer mRNA-Spezies in humanen Geweben und Geweben der Ratte hinweist.

Im Rahmen der quantitativen mRNA-Analyse der Splicevariante *rAbca5 V+16* in Geweben der Ratte mittels *real-time quantitative* PCR (\rightarrow 3.6) wurde auch die Expression der *rAbca5*-mRNA Spezies in 9 Rattenorganen und einer Sertolizelllinie (SER-W3) untersucht. Bezogen auf bekannte Mengen eines Referenzplasmids wurden in allen Geweben *rAbca5*-mRNA Transkripte detektiert, wobei die Expressionswerte in schwach exprimierenden Organen wie

dem Herz und in expressionsstarken Gewebe wie Testis, Lunge und Gehirn um drei Größenordnungen (Faktor 1000) divergierten. Der Gehalt an *rAbca5*-mRNA in der Sertolizelllinie betrug ca. 10% der Testisexpression und war damit auf vergleichbarem Niveau wie in isolierten Hepatozyten. Diese Ergebnisse bestätigen die mittels Northern- Blot-Untersuchungen ermittelten dominanten Expressionssignale und validieren die mittels unterschiedlicher Analyseverfahren gewonnenen Daten trotz der sehr unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verwendeten Methoden

Das von ANNILO et al. (2003) publizierte Expressionsprofil des *Abca5*-Gens der Maus spricht für eine Konservierung der starken Expression im Testis zwischen den Spezies: in den mittels quantitativer RT-PCR analysierten Proben (Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Testis, 4 Embryoentwicklungsstadien) betrug die Expression im Testis der Maus ein vielfaches der übrigen untersuchten Proben.

4.4 Zellspezifische Verteilung des *rAbca5*-Gens der Ratte

4.4.1 *rAbca5*-mRNA Expression im Testis

Die Expression der *rAbca5*-mRNA im Testis war am stärksten in den interstitiellen Leydigzellen ausgeprägt, die teilweise als Zellcluster auftraten (→ 3.4.3). In Leydigzellen wird unter dem Stimulus des von der Hypophyse gebildeten luteinisierenden Hormons (LH) Testosteron gebildet. Das androgene Sexualsteroid stimuliert seinerseits die Samenbildung in Sertolizellen, fördert die Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale und stimuliert die Talgdrüsenfunktion. Aufgrund der hydrophoben Natur des Steroidgerüsts erfolgt der Testosterontransport im Blut in Proteinkomplexen mit Albumin, dem Glykoprotein Sexualsteroidhormon-bindenden Globulin (SHBG) und in Sertolizellen mit dem SHBG-ähnlichen Androgen-bindenden Protein (ABP). ABC-Transporter sind darauf spezialisiert, Moleküle durch Membranen zu schleusen, die über Diffusionsmechanismen diese Barrieren nicht überwinden können. Von Steroiden wurde lange angenommen, sie könnten Membranen aufgrund ihrer hydrophoben Grundstruktur durch Diffusion durchqueren. Der Nachweis von SHBG-Bindungsstellen auf der Plasmamembran verschiedener Zelltypen durch ROSNER et al. (1992) legt jedoch einen komplexeren Transportmechanismus nahe, an dem *rAbca5* möglicherweise beteiligt sein könnte. Die Relevanz von ABCA-Transportern im Testis, insbesondere den Sertoli- und Leydigzellen wurde unlängst von Selva et al. (2004) beschrieben, die für ABCA1 eine Relevanz im interzellulären Steroidtransport postulieren.

4.4.2 *rAbca5*-mRNA Expression in der Epididymis

Der Nebenhoden (Epididymis) dient als Speicher für die in den Tubuli seminiferi des Testis gereiften Spermatozoen. Die *rAbca5*-mRNA Expression verteilte sich im gesamten Zylinder-

epithel mit seinen länglichen Mikrovilli, die als Stütz- und Nährzellen der Spermatozoen ähnlich den Sertolizellen im Testis gelten. In den Mikrovilli laufen eine Vielzahl von Transportvorgängen (Import und Export einer Vielzahl von Substraten zur Versorgung der Spermatozoen) ab, so daß eine Rolle von *rAbca5* als Vermittler einer Transportaktivität innerhalb dieser Kaskade angenommen werden könnte.

4.5 Quantitative Analyse der Expression von *rAbca5 V+16*

Die Bedeutung der vielfach auftretenden alternativen mRNA-Spliceprodukte ist für viele Gene ungeklärt. Um die quantitative Relevanz der konserviert in Ratte und Mensch gleichermaßen auftretenden Splicevariante zu bewerten, wurde mittels *real-time quantitative PCR* (RTQ-PCR) der Anteil an *rAbca5 V+16*-mRNA relativ zur *rAbca5*-mRNA in neun verschiedenen Organen der Ratte, isolierten Hepatozyten und einer Sertolizelllinie (SER-W3) bestimmt. Außer im Herz konnten Splicevariantentranskripte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden, wobei die relativen Anteile zwischen 2.6% im Gehirn und 11.2% im Pankreas schwankten. Die Abwesenheit von Transkripten der Splicevariante im Herz geht einher mit einer insgesamt geringen *rAbca5*-mRNA und 18S-RNA-Expression in diesem Gewebe und deutet darauf hin, daß mit dieser Probe aus nicht geklärten Gründen am Rand der Nachweisgrenze gearbeitet wurde (Degradation, keine Expression in diesem Gewebe). Alle übrigen Proben zeigen eine signifikante *rAbca5 V+16*-mRNA Expression, womit die Hypothese einer funktionellen Bedeutung der Splicevariante weiter unterstützt wird, welche Gegenstand weiterer Untersuchungen sein wird. Das ursprünglich angestrebte Normalisierungsverfahren auf den 18S-RNA-Gehalt der Proben wurde aufgrund organabhängig stark schwankender 18S-Werte nicht angewendet, was die Aussagekraft der durchgeführten Messungen nicht vermindert, da die Bestimmung der cDNA-Transkripte für Haupttranskript und Splicevariante an cDNA gleichen Ursprungs vorgenommen wurde. Untersuchungen von Vandesompele (2002), Bustin (2002) and Lossos (2003) diskutieren Verfahren zur Normalisierung diverser RTQ-Daten und bestätigen die im Verlauf der eigenen Experimente gewonnene Einsicht, daß die Berücksichtigung der Expression nur *eines house-keeping genes* zu einer signifikanten Verfälschung der Meßdaten führen muß. Es wird vorgeschlagen, entweder geometrische Mittelwerte mehrerer *house-keeping genes* zu verwenden und/oder die eingesetzte RNA-Menge so genau wie möglich zu bestimmen.

4.6 Einfluß der Kulturbedingungen auf die *rAbca5*-mRNA Expression in Kulturen primärer Hepatozyten der Ratte

Primär kultivierte Hepatozyten der Ratte zeigten unter Standardkulturbedingungen (8.8×10^4 Zellen/cm², unbeschichtete Polystyrolmatrix, serumfreies MX-83 Medium mit 1 µM Rinderinsulin und 20 µM Hydrocortisonhemisuccinat) eine zeitabhängige, intrinsische Steigerung der *rAbca5*-mRNA (→ 3.5.4). Eine ähnliche Induktion wurde von HIRSCH-ERNST et al. (1995)

im gleichen Zellkulturmodell für das *multidrug resistance* Gen der Ratte *mdr1b* beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, daß diese Induktion nicht auf einer generellen Steigerung der Transkriptionsrate in primär kultivierten Rattenhepatozyten beruhte, sondern charakteristisch für das *mdr1b*-Gen war. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Kontrollhybridisierungen mit sogenannten *house-keeping genes* (β -Aktin, GAPDH) durchgeführt, die durch eine stabile Expression über mehrere Tage belegten, daß die zeitabhängige Induktion des *rAbca5*-mRNA ein genspezifisches Phänomen darstellte. Die Vermittler der Hochregulation sind derzeit noch nicht geklärt. Vorläufige Untersuchungen mit bekannten *mdr1b*-regulierenden Streßfaktoren (ZIEMANN et al. 1999) wie reaktiven Sauerstoffspezies, Cytokinen und Prostaglandinen zeigten auf die *rAbca5*-mRNA-Expression keine deutliche Wirkung.

4.7 Einfluß von LXR-Liganden auf die *rAbca5*-mRNA-Expression in Kulturen primärer Hepatozyten der Ratte

4.7.1 Induktion der *rAbca5*-mRNA-Expression mit 22-*R*-Hydroxycholesterol

Die Oxysterol-induzierte Aktivität der Liver X Rezeptoren ist für die Hochregulation diverser Gene der hepatischen und extrahepatischen Cholesterolumöostase verantwortlich, darunter auch das am reversen Cholesteroltransport beteiligte ABCA1. Um eine mögliche Rolle des *rAbca5*-Gens im hepatischen Lipidstoffwechsel zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten der Ratte mit verschiedenen endogenen Oxysterolen behandelt und die mRNA-Expression mittels Northern Blot untersucht. Bezogen auf die ethanolhaltige Kontrollprobe war nach vier Tagen in Gegenwart von 10 μ M 22-*R*-Hydroxycholesterol eine um 40% gesteigerte *rAbca5*-mRNA Expression, bei doppelter Konzentration eine um 70% erhöhte *rAbca5*-mRNA Expression festzustellen (\rightarrow 3.5.1). Es bleibt festzuhalten, daß eine deutliche Induktion der *rAbca5*-mRNA beobachtet wurde, die jedoch hinter für ABCA1 gemessenen Induktionswerten in humanen Hepatozyten zurückblieb (5-fache Induktion nach 30 h bei 15 μ M 22-*R*-Hydroxycholesterol mittels quantitativer RT-PCR, MENKE et al. 2002). Dies läßt sich möglicherweise mit speziesabhängigen Unterschieden in der LXR-regulierten Genaktivierung erklären, die z.B. für das Enzym Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7a) von MENKE et al. (2002) beschrieben wurden und eine variierende Ansprechbarkeit der *nuclear-hormone*-Rezeptoren postulieren.

4.7.2 Induktion der *rAbca5*-mRNA mit 22-*R*-Hydroxycholesterol und 9-*cis*-Retinsäure

Die Inkubation primärer Hepatozyten der Ratte mit je einem Antagonisten für den Liver X Rezeptor (LXR) und den Retinoid X Rezeptor (RXR) zeigt keine eindeutigen Ergebnisse. Starke vom individuellen Versuchstier abhängige Schwankungen in der Hochregulation der ethanolhaltigen Kontrolle führten zu einer Repression der *rAbca5*-mRNA Expression unter Einwirkung von 1 μ M 9-*cis*-Retinsäure und 10 μ M bzw. 20 μ M 22-*R*-Hydroxycholesterol. Eine

Verzehnfachung der eingesetzten Menge an 9-*cis*-Retinsäure zeigte keine signifikante Veränderung, so daß die Hypothese einer transkriptionellen LXR/RXR-Genaktivierung für *rAbca5* durch diese Versuche nicht bestätigt werden konnte. Vielmehr scheint die unter Inkubation mit 22-*R*-Hydroxycholesterol gezeigte Induktion der *rAbca5*-mRNA Expression durch 9-*cis*-Retinsäure gehemmt zu werden, was auf eine konkurrierende Interaktion des RXR-Liganden mit anderen Transkriptionsfaktoren schließen läßt und nur durch weitere Experimente bestätigt werden könnte.

4.7.3 Induktion der *rAbca5*-mRNA mit *Acetyl-podocarpic Dimer (APD)*

Für diesen synthetischen Agonisten beider LXRs (α und β) konnte von SPARROW et al. (2002) in Induktionsstudien mit primären Hepatozyten des Menschen nach 24 h mittels quantitativer RT-PCR eine ca. 5-fache Induktion der *ABCA1*-mRNA gezeigt werden (100 nM APD). Vergleicht man diese Experimente mit der in der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung zur Induktion von *ABCA1* im identischen Zellsystem durch 22-*R*-Hydroxycholesterol (\rightarrow 4.5.1), scheint der synthetische LXR-Agonist APD eine um den Faktor 150 höhere Potenz als 22-*R*-Hydroxycholesterol zu besitzen.

Nach 4-tägiger Inkubation der primären Hepatozyten der Ratte mit 100 nM APD war, bezogen auf die DMSO-haltige Kontrollprobe, eine 3-fache Induktion durch den synthetischen LXR-Agonisten mittels Northern-Blot-Analysen zu beobachten. Vergleicht man diese Induktion mit der ca. 1.5-fachen Expressionssteigerung nach 4-tägiger Inkubation mit 10 μ M 22-*R*-Hydroxycholesterol ist auch in Bezug auf die *rAbca5*-mRNA Expression eine 200-fach höhere Induktionspotenz durch APD festzustellen, die einer erneuten experimentellen Reproduktion bedarf.

Aus den Induktionsergebnissen für 22-*R*-Hydroxycholesterol und den synthetischen LXR-Agonisten APD läßt sich eine Regulation der *rAbca5*-mRNA Transkription über den LXR-Rezeptor vermuten. Weitere Untersuchungen stehen noch aus, um die Rolle des RXR-Liganden 9-*cis*-Retinsäure aufzuklären.

4.8 Subzelluläre Lokalisation von *rAbca5* und *rAbca5 V+16* in Zelllinien

Die Expression von EGFP-getaggten Fusionsproteinen für *rAbca5* und *rAbca5 V+16* zeigte ähnliche Expressionsmuster in beiden untersuchten Zelllinien HEK 293 und Caco-2. Die tatsächliche Expression des verkürzten *rAbca5*-Proteins in einem Zellsystem untermauert die physiologische Relevanz dieses alternativen Spliceprodukts und gibt Anlaß zu weiteren funktionellen Untersuchungen. Die ausschließlich intrazelluläre Lokalisierung beider Konstrukte in Kernnähe und Teilen des Zytoplasmas schließt eine Verteilung in der

Zytoplasmamembran ähnlich ABCA1 aus. Möglicherweise ist ABCA5 und die untersuchte Splicevariante im Bereich des Golgi-Apparates oder des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Für detaillierte Aufklärung der subzellulären Verteilung der Fusionskonstrukte ist es nötig, eine Co-Expression der Fusionsproteine mit verschiedenen Organellmarkern vorzunehmen, um Zellkompartimente genau zu definieren und eine Zuordnung der exprimierten Fusionsproteine für rAbca5 und rAbca5 V+16 zu ermöglichen.

4.9 Weiterführende Arbeiten

Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen vielfältige Möglichkeiten für weitere Forschungsarbeiten. Ein bedeutender Schritt wird die detaillierte Aufklärung der subzellulären Verteilung des rAbca5-Proteins und des verkürzten Proteins rAbca5 V+16 sein, um weitere Hinweise hinsichtlich der Proteinfunktion zu erhalten. Die Lokalisationsdaten sind die Basis für Transportversuche mit verschiedenen Substraten in einem rAbca5-überexprimierenden Zellsystem. Dazu gehört auch die Visualisierung des Proteins im Western Blot, die Aufschluß über posttranslationale Modifikationen geben könnte und damit weitere Hinweise zur subzellulären Lokalisation liefern könnte.

Die Ergebnisse zur Induktion des *rAbca5*-Gens durch Oxysterole oder andere LXR-Agonisten sind vorläufig, und weitere Versuche mit anderen Effektoren, z.B. Gonadotropinen (LH, FSH) sind notwendig, um z.B. eine mögliche regulierende Funktion der Splicevariante ähnlich der der verkürzten ABCA1-Varianten zu untersuchen. Im Zusammenhang damit wäre auch eine gezielte Promotoranalyse interessant, um funktionell relevante Promotorelemente aufzufinden.

Die dominante Expression des *rAbca5*-Gens im Testis und der Epididymis und besonders in den Leydigzellen sollte Anlaß sein, die entwicklungsgenetische Relevanz der *rAbca5*-mRNA Expression näher zu untersuchen. Derzeit werden Maus-RNAs verschiedener Testis-Entwicklungsstadien und daraus generierte Mutanten in Bezug auf ihre Expression des *rAbca5*-Gens untersucht. Diese Experimente könnten genauere Hinweise auf die funktionelle Bedeutung des *rAbca5*-Gens zulassen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Aus Gesamt-RNA der humanen Hepatomzelllinie HepG2 wurde mit *ABCA5* ein neues Mitglied der ABCA-Subfamilie aus der Superfamilie der ABC-Proteine isoliert. Dazu wurde ein vorher in dieser Arbeitsgruppe identifiziertes Genfragment (AJ275973.1) von 392 bp Länge mittels einer kombinierten Strategie aus RACE-PCR, Klonierungen und Sequenzierung der isolierten Genfragmente vervollständigt. Das *ABCA5*-Gen umfaßt einen offenen Leserahmen von 4926 bp und kodiert für ein Protein der Länge von 1642 Aminosäuren. Die mittels Computermodellen vorhergesagte Proteintopologie ergibt die für ABC-Transporter typische Struktur eines Volltransporters mit zwei Membrandomänen und zwei Nukleotidbindungsregionen (ABC-Kassetten). Anhand von Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß das humane *ABCA5*-Gen am stärksten im Skelettmuskel, der Niere, Leber und der Plazenta exprimiert wird. Es wurde ein Produkt eines alternativen Splicevorgangs isoliert und charakterisiert, das sich durch eine 16 bp-Insertion am 3'-Terminus des Exon 20 unterscheidet (*ABCA5 V20+16*). Diese Insertion verursacht eine Verschiebung des offenen Leserahmens und infolge den Translationsabbruch nach 925 Aminosäuren. Die putative Struktur von *ABCA5 V20+16* entspräche der eines ABC-Halbtransporters mit einer Membrandomäne und einer Nukleotidbindungsregion.

Aus Gesamt-RNA des Testis der Ratte (Wistar) wurde das vermutlich orthologe Gen *Abca5* mittels einer ähnlichen experimentellen Strategie isoliert und charakterisiert. Das *Abca5*-Gen der Ratte (*rAbca5*) besitzt einen identischen offenen Leserahmen von 4926 bp und zeigt eine Sequenzidentität zum humanen *ABCA5*-Gen von 90% auf Basis der Aminosäureabfolge. Das mittels Northern-Blot-Analysen bestimmte mRNA-Expressionsprofil für *rAbca5* zeigt eine dominante Expression im Testis und hohe Expressionsniveaus in Lunge und Gehirn. Die *rAbca5*-mRNA Expression in Testis und Epididymis (Nebenhoden) wurde mithilfe von *in situ* Hybridisierungen mit DIG-markierten cRNA-Sonden eingehender betrachtet und zeigte Signale in Leydigzellen und in der Basalschicht der Tubuli seminiferi (Testis) sowie in Fibroblasten (interstitieller Raum) und im Tubulusepithel des Nebenhodens.

Auch für *rAbca5* wurde eine Splicevariante *rAbca5 V+16* isoliert, die eine bis auf einen Substituenten identische 16 bp-Insertion am 3'-Terminus des Exon 20 enthält und die Relevanz dieser Splicevariante in beiden Spezies unterstreicht. Die Häufigkeit der Splicevariante *rAbca5 V+16* im Verhältnis zum vollständigen *rAbca5*-Gen wurde in verschiedenen Geweben der Ratte und einer Zelllinie mittels quantitativer RT-PCR evaluiert und ergab prozentuale mRNA-Anteile der Splicevariante bis zu 11%.

Die Regulationsstudien in Kulturen primärer Hepatozyten der Ratte haben gezeigt, daß das *rAbca*-Gen offenbar keine statische Expression aufweist, sondern durch verschiedene Faktoren, z.B. durch die Kulturdauer und LXR-Aktivatoren, beeinflusst wird.

Zur Klärung der subzellulären Lokalisation des Abca5-Transporters der Ratte wurden das vollständige Gen und die Splicevariante in Expressionsvektoren mit Epitop-Tag (V5, EGFP) eingebracht und als Fusionsproteine in verschiedenen Zellsystemen exprimiert. Die EGFP-Fusionsproteine für den Volltransporter (rAbca5) und die Splicevariante (rAbca5 V+16) wurden in HEK293- und Caco-2-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Die Lokalisation beschränkt sich für beide Konstrukte auf intrazelluläre Kompartimente in Kernnähe und soll mittels Kollokalisationsstudien mit verschiedenen Organellmarkern als Basis einer zukünftigen funktionellen Charakterisierung weiter differenziert werden.

Für andere ABCA-Vertreter wurde eine Bedeutung als Phospholipidtransporter (ABCA1 als Flippase) zur Vermittlung des Cholesterol- und Steroidtransports gezeigt bzw. postuliert (ABCA2 und ABCA3). ABCA2 und ABCA3 weisen anders als ABCA1 beide eine intrazelluläre Verteilung auf, in die sich ABCA5 bzw. rAbca5 damit einreihen würden. Die dominante Expression im Testis stellt eine wichtige Voraussetzung für weitere funktionelle Untersuchungen dar, da außer ABCA1 keine weiteren ABCA-Vertreter eine starke Expression in diesem Zellsystem aufweisen. Der Beweis der Hypothese (oder ihre Widerlegung) einer für mehrere ABCA-Vertreter spezifischen Flippasefunktion im komplexen Bereich des Lipidtransports stellt eine aufregende Fragestellung für zukünftige Arbeiten an diesem neuen ABCA-Transporter dar.

6 Literaturverzeichnis

S. ABE-DOHMAE, Y. IKEDA, M. MATSUO, M. HAYASHI, K. OKUHIRA, K. UEDA, S. YOKOYAMA, Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 604–611.

D.P. ADEN, A. FOGEL, S. PLOTKIN, I. DAMJANOV, B.B. KNOWLES, Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, *Nature* 282 (1979) 615–616.

R. ALLIKMETS, B. GERRARD, A. HUTCHINSON, M. DEAN, Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1649–1655.

R. ALLIKMETS, N. SINGH, H. SUN, N.F. SHROYER, A. HUTCHINSON, A. CHIDAMBARAM, B. GERRARD, L. BAIRD, D. STAUFFER, A. PEIFFER, A. RATTNER, P. SMALLWOOD, Y. LI, K.L. ANDERSON, R.A. LEWIS, J. NATHANS, M. LEPPERT, M. DEAN, J.R. LUPSKI, A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy, *Nat. Genet.* 15 (1997) 236–246.

R. ALLIKMETS, W.H. RASKIND, A. HUTCHINSON, N.D. SCHUECK, M. DEAN, D.M. KOELLER, Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A), *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 743–749.

S.F. ALTSCHUL, E.V. KOONIN, Iterated profile searches with PSI-BLAST - a tool for discovery in protein databases, *Trends Biochem Sci.* 23 (1998) 444–447.

C. ANJARD, W.F. LOOMIS, DICTYOSTELIUM SEQUENCING CONSORTIUM, Evolutionary analyses of ABC transporters of *Dictyostelium discoideum*, *Eukaryot. Cell.* 1 (2002) 643–652.

T. ANNILO, S. SHULENIN, Z.Q. CHEN, I. ARNOULD, C. PRADES, C. LEMOINE, C. MAINTOUX-LAROIS, C. DEVAUD, M. DEAN, P. DENEFFLE, M. ROSIER, Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34, *Cytogenet Genome Res.* 98 (2002) 169–176.

T. ANNILO, C. ZHANG-QUN, S. SHULENIN, M. DEAN, Evolutionary analysis of a cluster of ATP-binding cassette (ABC) genes, *Mamm. Gen.* 14 (2003) 7–20.

- J. AUBRECHT, G.F. KAHL, M.W. HÖHNE**, Regulation of fibronectin mRNA expression in primary rat hepatocytes in response to EGF and phenobarbital, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 (1993) 1023–1028.
- J. AUBRECHT, K.I. HIRSCH-ERNST, V. BECKER-RABBENSTEIN, G.F. KAHL, H. TANIGUCHI, M.W. HÖHNE**, Induction of cytochrome P-450 2B1-related mouse cytochrome P-450 and regulation of its expression by epidermal growth factor/ transforming growth factor α in primary rat hepatocyte cultures, *Biochem. Pharmacol.* 50 (1996) 781–785.
- S.M. AZARIAN, G.H. TRAVIS**, The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR), *FEBS Lett.* 409 (1997) 247–252.
- A. BACHER, K. GRIEBL, S. MACKAMUL, R. MITREITER, H. MUCKTER, Y. BEN-SHAUL**, Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines, *Exp. Cell Res.* 200 (1992) 97–104.
- S.A. BARROS, R.W. TENNANT, R.E. CANNON**, Molecular structure and characterization of a novel murine ABC transporter, *Abca13*, *Gene* 307 (2003) 191–200.
- E. BEAUDOING, S. FREIER, J. R. WYATT, J.M. CLAVERIE, D. GAUTHERET**, Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes, *Genome Res.* 10 (2000) 1001–1010.
- S. BEKRI, G. KISPAL, H. LANGE, E. FITZSIMONS, J. TOLMIE, R. LILL, D.F. BISHOP**, Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation, *Blood.* 96 (2000) 3256–3264.
- M.N. BERRY, D.S. FRIEND**, High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell. Biol.* 43 (1969) 506–520.
- C. BISBAL, C. MARTINAND, M. SILHOL, B. LEBLEU, T. SALEHZADA**, Cloning and characterization of a Rnase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 13308–13317.
- H.C. BIRNBOIM, J. DOLY**, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acid Res.* (1979) 7 1513–1523.
- C. BROCCARDO, M.-F. LUCIANI, G. CHIMINI**, The ABCA subclass of mammalian transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (1999) 395–404.

S.A. BUSTIN, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *J. Mol. Endocrinol.* 29 (2002), 23–29.

M.G. CLAROS, G. VON HEIJNE, TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS* 10 (1994) 685–686.

G. CHANG, C.B. ROTH, Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters, *Science*. 293 (2001) 1793–1800.

G. CHANG, Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation, *J. Mol. Biol.* 330 (2003) 419–430.

P. CHOMCZYNSKI, N. SACCHI, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.

E. DASSA, P. BOUIGE, The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms, *Res. Microbiol.* 152 (2001) 211–229.

M. DEAN, A. RZHETSKY, R. ALLIKMETS, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Res.* 11 (2001) 1156–1166.

M. DEAN, Y. HAMON, G. CHIMINI, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *J. Lip. Res.* 42 (2001) 1007–1017.

M. DEAN, The human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily, Online Book (2002) National Library of Medicine, Bethesda, USA.

H. DE LA SALLE, D. HANAU, D. FRICKER, A. URLACHER, A. KELLY, J. SALAMERO, S.H. POWIS, L. DONATO, H. BAUSINGER, M. LAFORET, Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency, *Science*. 265 (1994) 237–241.

H. DE LA SALLE, J. ZIMMER, D. FRICKER, C. ANGENIEUX, J.P. CAZENAVE, M. OKUBO, H. MAEDA, A. PLEBANI, M.M. TONGIO, A. DORMOY, D. HANAU, HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1, *J Clin Invest.* 103 (1999) Mar; R9–R13.

A. DODD, S.A. ROWLAND, S.L. HAWKES, M.A. KENNEDY, D.R. LOVE, Mutations in the adrenoleukodystrophy gene, *Hum. Mutat.* 9 (1997) 500–511.

L.A. DOYLE, W. YANG, L.V. ABRUZZO, T. KROGMANN, Y. GAO, A.K. RISHI, D.D. ROSS, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *PNAS* 95 (1998) 15665–15670.

P.A. EDWARDS, M.A. KENNEDY, P.A. MAK, LXRs; Oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis, *Vasc. Pharmacol.* 38 (2002) 249–256.

D. FITZPATRICK, W Rat pituitary adult female Wistar rat average insert size 2.1, Genbank Accession number CB808508, 2003.

D.R. FLOWER, The lipocalin protein family: structure and function, *Biochem. J.* 318 (1996) 1–14.

J. FOGH, W.C. WRIGHT, AND J.D. LOVELESS, Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors, *J. Natl. Cancer Inst.* 58 (1977) 209–14.

M.A. FROHMAN, On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends), *Genome Res.* (1994) 40–58.

R. GAUDET, D.C. WILEY, Structure fo the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing, *EMBO* 20 (2001) 4964–4972.

C.J. GLOECKNER, P.U. MAYERHOFER, P. LANDGRAF, A.C. MUNTAU, A. HOLZINGER, J.K. GERBER, S. KAMMERER, J. ADAMSKI, A.A. ROSCHER, Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 (2000) 144–150.

G.A. GRAF, L. YU, W.P. LI, R. GERARD, P.L. TUMA, J.C. COHEN, H.H. HOBBS, ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 48275–48282.

F.L. GRAHAM, J. SMILEY, W.C. RUSSELL, R. NAIRN, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J. Gen. Virol.*, Jul 36 (1977) 59–74.

Y. HAMON, C. BROCCARDO, O. CHAMBENOIT, M.F. LUCIANI, F. TOTI, S. CHASLIN, J.M. FREYSSINET, P.F. DEVAUX, J. MCNEISH, D. MARGUET, G. CHIMINI, ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine, *Nat. Cell. Biol.* 2 (2000) 399–406.

- Y. HAMON, O. CHAMBENOIT, G. CHIMINI**, ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1585 (2002) 64–71.
- G. VON HEIJNE**, Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the 'Positive Inside' Rule, *J. Mol. Biol.* 225 (1992) 487–494.
- C.F. HIGGINS, I.D. HILES, G.P. SALMOND, D.R. GILL, J.A. DOWNIE, I.J. EVANS, I.B. HOLLAND, L. GRAY, S.D. BUCKEL, A.W. BELL, M.A. HERMODSON**, A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria, *Nature* 323 (1986) 448–450.
- K.I. HIRSCH-ERNST, C. ZIEMANN, C. SCHMITZ-SALUE, H. FOTH, G.F. KAHL**, Modulation of P-glycoprotein and mdr1b mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215 (1995) 179–185.
- K.I. HIRSCH-ERNST, S. GAINI-RAHIMI, B.-P. ERNST, C. SCHMITZ-SALUE, S. BLUME, G.F. KAHL**, Molecular cDNA cloning and tissue distribution of mRNA encoding a novel ATP-binding cassette (ABC) half-transporter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998) 151–155.
- K.I. HIRSCH-ERNST, A. SCHÄFER, B.P. ERNST**, Identification of novel human ATP-binding cassette genes expressed in testis by degenerate RT-PCR, direct submission to Genbank (2000) AJ275973.
- B. HOFFMANN, A. PIASECKI, D. PAUL**, Proliferaton of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture, *J. Cell. Physiol.* (1989)139 654–662.
- P.M. HOLLAND, R.D. ABRAMSON, R. WATSON, D.H. GELFAND**, Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5'→3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, *PNAS*, 88 (1991) 7276–7280.
- K.P. HOPFNER, A. KARCHER, D.S. SHIN, L. CRAIG, L.M. ARTHUR, J.P. CARNEY, J.A. TAINER**, Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily, *Cell.* 101 (2000) 789–800.
- K.-P. HOPFNER, J.A. TRAINER**, Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high resolution structures, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 249–255.
- C.A. HRYCYNIA, M. RAMACHANDRA, U.A. GERMANN, P.W. CHENG, I. PASTAN, M.M. GOTTESMAN**, Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric, *Biochemistry* 38 (1999) 13887–13899.

S.C. HYDE, P. EMSLEY, M.J. HARTSHORN, M.M. MIMMACK, U. GILEADI, S.R. PEARCE, M.P. GALLAGHER, D.R. GILL, R.E. HUBBARD, C.F. HIGGINS, Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, *Nature* 346 (1990) 362–365.

N. INAGAKI, T. GONOI, J.P. CLEMENT, N. NAMBA, J. INAZAWA, G. GONZALEZ, L. AGUILAR-BRYAN, S. SEINO, J. BRYAN, Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor, *Science* 270 (1995) 1166–1170.

N. INAGAKI, T. GONOI, J.P. CLEMENT, C.Z. WANG, L. AGUILAR-BRYAN, J. BRYAN, S. SEINO, A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels, *Neuron* 16 (1996) 1011–1017.

P.M. JONES, A.M. GEORGE, Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit, *PNAS* 20 (2002) 12639–12644.

J.W. JONKER, M. BUITELAAR, E. WAGENAAR, M.A. VAN DER VALK, G.L. SCHEFFER, R.J. SCHEPER, T. PLOSCH, F. KUIPERS, R.P. ELFERINK, H. ROSING, J.H. BEIJNEN, A.H. SCHINKEL, The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria, *PNAS* 99 (2002) 15649–15654.

W.E. KAMINSKI, A. PIEHLER, K. PULLMANN, M. PORSCHE-OZCUREMEZ, C. DUONG, G.M. BARED, C. BÜCHLER, G. SCHMITZ, Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages, *Biophys. Res. Commun.* 281 (2001) 249–258.

W.E. KAMINSKI, E. ORSO, W. DIEDERICH, J. KLUCKEN, W. DROBNIK, G. SCHMITZ, Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (2000) 532–538.

M.A. KENNEDY, A. VENKATESWARAN, P.T. TARR, I. XENARIOS, J. KUDOH, N. SHIMIZU, P.A. EDWARDS, Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39438–39447.

J. KLUCKEN, C. BÜCHLER, E. ORSO, W.E. KAMINSKI, M. PORSCHE-OZCUREMEZ, G. LIEBISCH, M. KAPINSKY, W. DIEDERICH, W. DROBNIK, M. DEAN, R. ALLIKMETS, G. SCHMITZ, ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport, *PNAS* 97(2000) 817–822.

B.B. KNOWLES, C.C. HOWE, AND D.P. ADEN, Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science* 209 (1980) 497–499.

M. KOZAK, Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, *Cell* 44 (1986) 283–292.

A. KROGH, B. LARSSON, G. VON HEIJNE, AND E.L.L. SONNHAMMER, Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes, *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 567–580.

J. KYHSE-ANDERSEN, Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* 10 (1984) 203–209.

U.K. LAEMMLI, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680–685.

M.H. LEE, K. LU, S. HAZARD, H. YU, S. SHULENIN, H. HIDAKA, H. KOJIMA, R. ALLIKMETS, N. SAKUMA, R. PEGORARO, A.K. SRIVASTAVA, G. SALEN, M. DEAN, S.B. PATEL, Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption, *Nat. Genet.* 27 (2001) 79–83.

C. LEFEVRE, S. AUDEBERT, F. JOBARD, B. BOUADJAR, H. LAKHDAR, O. BOUGHDENE-STAMBOULI, C. BLANCHET-BARDON, R. HEILIG, M. FOGGIO, J. WEISSENBACH, M. LATHROP, J.F. PRUD'HOMME, J. FISCHER, Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 2369–2378.

J. LEIGHTON, G. SCHATZ, An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast, *EMBO J.* 14 (1995) 188–195.

L.X. LIU, K. JANVIER, V. BERTEAUX-LECELLIER, N. CARTIER, R. BENAROUS, P. AUBOURG, Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32738–32743.

K.J. LIVAK, S.J. FLOOD, J. MARMARO, W. GIUSTI, AND K. DEETZ, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *Genome Res.* 4 (1995) 357–362.

K.P. LOCHER, A.T. LEE, D.C. REES, The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism, *Science*. 296 (2002) 1091–1098.

K.P. LOCHER, E. BORTHS, ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF, *FEBS Lett.* 564 (2004) 264–268.

I.S. LOSSOS, D.K. CZERWINSKI, M.A. WECHSER, R. LEVY, Optimization of quantitative real-time RT-PCR data parameters for the study of lymphoid malignancies, *Leukemia*, 17 (2003) 789–795.

O.H. LOWRY, N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.

M.F. LUCIANI, F. DENIZOT, S. SAVARY S, M.G. MATTEI, G. CHIMINI, Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9, *Genomics* 21 (1994) 150–159.

N.L. MATA, R.T. TZEKOV, X. LIU, J. WENG, D.G. BIRCH, G.H. TRAVIS, Delayed dark-adaptation and lipofuscin accumulation in *abcr*^{+/-} mice: implications for involvement of ABCR in age-related macular degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Jul;42(8):1685–1690.

K.L. MEALEY, S.A. BENTJEN, J.M. GAY, G.H. CANTOR, Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene, *Pharmacogenetics* 11 (2001) 727–733.

J.G. MENKE, K.L. MACNAUL, N.S. HAYES, J. BAFFIC, Y.S. CHAO, A. ELBRECHT, L.J. KELLY, M.H. LAM, A. SCHMIDT, S. SAHOO, J. WANG, S.D. WRIGHT, P. XIN, G. ZHOU, D.E. MOLLER, C.P. SPARROW, A novel liver X receptor agonist establishes species differences in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a), *Endocrinology* 143 (2002) 2548–2558.

N. Mitsuhashi, T. Miki, H. Senbongi, N. Yokoi, H. Yano, M. Miyazaki, N. Nakajima, T. Iwanaga, Y. Yokoyama, T. Shibata, S. Seino, MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17536–17540.

G. MONCALIAN, B. LENGSELD, V. BHASKARA, K.P. HOPFNER, A. KARCHER, E. ALDEN, J.A. TAINER, T.T. PAULL, The rad50 signature motif: essential to ATP binding and biological function, *J. Mol. Biol.* 335 (2004) 937–951.

T. NAGASE, K. ISHIKAWA, M. SUYAMA, R. KIKUNO, M. HIROSAWA, N. MIYAJIMA, A. TANAKA, H. KOTANI, N. NOMURA, O. OHARA, Prediction of the coding sequences of unidentified human

genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro, *DNA Res.* 5 (1998) 355–364.

T. NAGASE, R. KIKUNO, O. OHARA, Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXI. The complete sequences of 60 new cDNA clones from brain which code for large proteins, *DNA Res.* 8 (2001) 179–187.

K. NAKAI, AND M. KANEHISA, A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells, *Genomics* 14 (1992) 897–911.

M. ORAM, R.M. LAWN, ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 1173–1179.

C. OWNBY, Oklahoma State University, College of Veterinary Medicine,
http://www.cvm.okstate.edu/instruction/mm_curr/histology/HistologyReference/

M.R. PICCIOTTO, J.A. COHN, G. BERTUZZI, P. GREENGARD, A.C. NAIRN, Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J Biol Chem.* 267 (1992) 12742–12752.

A. PIEHLER, W.E. KAMINSKI, J.J. WENZEL, T. LANGMANN, G. SCHMITZ, Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002) 408–416.

F. POGNAN, M.T. MASSON, F. LAGELLE, C. CHARUEL, Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell, *Cell. Biol. Toxicol.* 13 (1997) 453–463.

C. PRADES, I. ARNOULD, T. ANNILO, S. SHULENIN, Z.Q. CHEN, L. OROSCO, M. TRIUNFOL, C. DEVAUD, C. MAINTOUX-LAROIS, C. LAFARGUE, C. LEMOINE, P. DENEFLÉ, M. ROSIER, M. DEAN, The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon, *Cytogenet Genome Res.* 98 (2002) 160–168.

C. PROFF, R. KOLLING, Functional asymmetry of the two nucleotide binding domains in the ABC transporter Ste6, *Mol. Gen. Genet.* 264 (2001) 883–893.

C.R. PULLINGER, H. HAKAMATA, P.N. DUCHATEAU, C. ENG, B.E. AOUIZERAT, M.H. CHO, C.J. FIELDING, J.P. KANE, Analysis of hABC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 (2000) 451–455.

P.M. QUINTON, Physiological Basis of Cystic Fibrosis: A Historical Perspective, *Physiol. Rev.* 79 (1999) 3–22.

J.J. REPA, S.D. TURLEY, J.A. LOBACCARO, J. MEDINA, L. LI, K. LUSTIG, B. SHAN, R.A. HEYMAN, J.M. DIETSCHY, D.J. MANGELSDORF, Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers, *Science*. 289 (2000) 1524–1529.

W. ROSNER, D.J. HRYB, M.S. KHAN, A.M. NAKHLA, N.A. ROMAS, Sex hormone-binding globulin. Binding to cell membranes and generation of a second messenger, *J. Androl.* 13 (1992) 101–106.

M. ROUSSET, The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation, *Biochimie* 68 (1986) 1035–1040.

N. SAITOU, M. NEI, The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.

J. SAMBROOK, E.F. FRITSCH, T. MANIATIS, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

F. SANGER, S. NICKLEN, A.R. COULSON, DNA sequencing with the chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977) 5463–5467.

S. SANTAMARINA-FOJO, A.T. REMALEY, E.B. NEUFELD, H.B. BREWER, Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter, *J. Lipid Res.* 42 (2001) 1339–1345.

A.H. SCHINKEL, J.J. SMIT, O. VAN TELLINGEN, J.H. BEINJEN, E. WAGENAAR, L. VAN DEEMTER, C.A. MOL, M.A. VAN DER VALK, E.C. ROBANUS-MANDAAG, H.P. TE RIELE, Disruption of the mouse *mdr1a*- P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increase sensitivity to drugs, *Cell* 77 (1994) 491–502.

A.H. SCHINKEL, U. MAYER, E. WAGENAAR, C.A. MOL, L. VAN DEEMTER, J.J. SMIT, M.A. VAN DER VALK, A.C. VOORDOUW, H. SPITS, O. VAN TELLINGEN, J.M. ZIJLMANS, W.E. FIBBE, P. BORST, Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins, *PNAS* 94 (1997) 4028–4033.

G. SCHMITZ, W.E. KAMINSKI, ABC transporters and cholesterol metabolism, *Frontiers in bioscience* 6(2001) 505–515.

J.D. SCHUETZ, M.C. CONNELLY, D. SUN, S.G. OAIBIR, P.M. FLYNN, R.V. INIVAS, A. KUMAR, A. FRIDLAND, MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs, *Nat. Med.* 5 (1999) 1048–1051.

P.O. SEGLEN, Preparation of isolated rat liver cells in *Methods in Cell Biology*, vol 13 (1976) (Prescott DM Ed) Academic Press, N.Y., 29–33.

D.M. SELVA, V. HIRSCH-REINSHAGEN, B. BURGESS, S. ZHOU, J. CHAN, S. MCISAAC, M.R. HAYDEN, G.L. HAMMOND, A.W. VOGL, C.L. WELLINGTON, The ATP-binding cassette transporter ABCA1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility, *J Lipid Res.* 2004 Mar 16 [Epub ahead of print].

J.A. SIMPSON, D.R. YVER, P.J. HISSIN, L.J. WARDZALA, E. KARNIELI, L.B. SALENS, S.W. CUSHMAN, Insulin stimulated translocation of glucose transporters in the isolated rat adipose cells: characterization of subcellular fractions, *Biochem. Biophys. Acta* 763 (1983) 393–407.

S. SHULENIN, L.M. NOGEE, T. ANNILO, S.E. WERT, J.A. WHITSETT, M. DEAN, ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 1296–1303.

J.D. SMITH, G. FREEMAN, M. VOGT, R. DULBECCO, The nucleic acid of polyoma virus, *J. Biol. Chem.* (1960) 264 12053–12062.

J.J. SMIT, A.H. SCHINKEL, R.P. OUDE ELFERINK, A.K. GROEN, E. WAGENAAR, L. VAN DEEMTER, C.A. MOL, R. OTTENHOFF, N.M. VAN DER LUGT, M.A. VAN ROON, Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease, *Cell.* 75 (1993) 451–462.

S.S. STRAUTNIEKS, L.N. BULL, A.S. KNISELY, S.A. KOCOSHIS, N. DAHL, H. ARNELL, E. SOKAL, K. DAHAN, S. CHILDS, V. LING, M.S. TANNER, A.F. KAGALWALLA, A. NEMETH, J. PAWLOWSKA, A. BAKER, G. MIELI-VERGANI, N.B. FREIMER, R.M. GARDINER, R.J. THOMPSON, A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis, *Nat. Genet.* 20 (1998) 233–238.

E.M. SOUTHERN, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503–517.

C.P. SPARROW, J. BAFFIC, M.H. LAM, E.G. LUND, A.D. ADAMS, X. FU, N. HAYES, A.B. JONES, K.L. MACNAUL, J. ONDEYKA, S. SINGH, J. WANG, G. ZHOU, D.E. MOLLER, S.D. WRIGHT, J.G.

MENKE, A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1 mRNA and stimulating cholesterol efflux, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10021–10027.

T. SPIES, M. BRESNAHAN, S. BAHAM, D. ARNOLD, G. BLANCK, E. MELLINS, D. PIOUS, R. DEMARS, A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway, *Nature* 348 (1990) 744–747.

M. SUZUKI, H. SUZUKI, Y. SUGIMOTO, Y. SUGIYAMA, ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22644–22649.

Y. Takada, K. Yamada, Y. Taguchi, K. Kino, M. Matsuo, S.J. Tucker, T. Komano, T. Amachi, K. Ueda, Non-equivalent cooperation between the two nucleotide-binding folds of P-glycoprotein, *Biochim Biophys Acta* 1373 (1998) 131–136.

S. TSURUOKA, K. ISHIBASHI, H. YAMAMOTO, M. WAKAUMI, M. SUZUKI, G.J. SCHWARTZ, M. IMAI, A. FUJIMURA, Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter, *Biochem Biophys Res Commun.* 298 (2002) 41–45.

O. TURRIZIANI, J.D. SCHUETZ, F. FOCHER, C. SCAGNOLARI, J. SAMPATH, M. ADACHI, F. BAMBACIONI, E. RIVA, G. ANTONELLI, Impaired 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine accumulation in T-lymphoblastoid cells as a mechanism of acquired resistance independent of multidrug resistant protein 4 with a possible role for ATP-binding cassette C11, *Biochem. J.* 368 (2002) 325–332.

J.K. TYZACK, X. WANG, G.J. BELSHAM, C.G. PROUD, ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 34131–34139.

J. VANDESOMPELE, K. DE PRETER, F. PATTYN, B. POPPE, N. VAN ROY, A. DE PAEPE, F. SPELEMAN, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol* 3(7) 2002 RESEARCH0034.

A. VENKATESWARAN, B.A. LAFFITTE, S.B. JOSEPH, P.A. MAK, D.C. WILPITZ, P.A. EDWARDS, P. TONTONOZ, Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha, *PNAS* 97 (2000) 12097–12102.

B. Vulevic, Z. Chen, J.T. Boyd, W. Davis, E.S. Walsh, M.G. Belinsky, K.D. Tew, Cloning and characterization of human adenosine 5'-triphosphate-binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2), *Cancer Res.* 61 (2001) 3339–3347.

J.E. WALKER, M. SARASTE, M.J. RUNSWICK, N.J. GAY, 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 (1982) 945–951.

N. WANG, D.L. SILVER, P. COSTET, A.R. TALL, Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33053–33058.

C.L. WELLINGTON, Y.Z. YANG, S. ZHOU, S.M. CLEE, B. TAN, K. HIRANO, K. ZWARTS, A. KWOK, A. GELFER, M. MARCIL, S. NEWMAN, K. ROOMP, R. SINGARAJA, J. COLLINS, L.H. ZHANG, A.K. GROEN, K. HOVINGH, A. BROWNLIE, S. TAFURI, J. GENEST, J.J. KASTELEIN, M.R. HAYDEN, Truncation mutations in ABCA1 suppress normal upregulation of full-length ABCA1 by 9-cis-retinoic acid and 22-R-hydroxycholesterol, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 1939–1949.

J. WENG, N.L. MATA, S.M. AZARIAN, R.T. TZEKOV, D.G. BIRCH, G.H. TRAVIS, Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in *Abcr* knockout mice, *Cell* 98 (1999) 13–23.

J.J. WENZEL, W.E. KAMINSKI, A. PIEHLER, S. HEIMERL, T. LANGMANN, G. SCHMITZ, ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306 (2003) 1089–1098.

J. WIJNHOLDS, C.A. MOL, L. VAN DEEMTER, M. DE HAAS, G.L. SCEFFER, F. BAAS, J.H. BEIJNEN, R.J. SCHEPER, S. HATSE, E. DE CLERCQ, Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs, *PNAS* 97 (2000) 7476–7481.

J. XIE, L.M. ADAMS, J. ZHAO, T.A. GERKEN, P.B. DAVIS, J. MA, A short segment of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contains channel stimulatory and inhibitory activities that are separable by sequence modification, *J Biol Chem.* 277 (2002) 23019–23027.

H. YABUUCHI, H. SHIMIZU, S. TAKAYANAGI, T. ISHIKAWA, Multiple splicing variants of two new human ATP-binding cassette transporters, ABCC11 and ABCC12, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 933–939.

H. YABUUCHI, S. TAKAYANAGI, K. YOSHINAGA, N. TANIGUCHI, H. ABURATANI, T. ISHIKAWA, ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 299 (2002) 410–417.

G. YAMANO, H. FUNAHASHI, O. KAWANAMI, L.X. ZHAO, N. BAN, Y. UCHIDA, T. MOROHOSHI, J. OGAWA, S. SHIODA, N. INAGAKI, ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells, *FEBS Lett.* 508 (2001) 221–225.

C. ZIEMANN, A. BÜRKLE, G.F. KAHL, K.I. HIRSCH-ERNST, Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures, *Carcinogenesis* 20 (1999) 407–414.

Danksagungen

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele hilfsbereite Freunde, Kollegen und Mitmenschen entscheidend beigetragen. Ihnen allen möchte ich hiermit herzlich danken, und ich bitte vorab um Verzeihung, falls ich in der Hektik jemanden vergessen sollte zu erwähnen.

Der gesamten Abteilung Toxikologie bin ich dankbar für die freundliche Aufnahme im Oktober 2000 sowie für die schnelle Einarbeitung und gute Zusammenarbeit. Ich habe mich von Anfang an bei den Toxikologen sehr wohlfühlt. Mein besonderer Dank gilt dabei Anne Heder, Christina Ziemann und Hartmut Neurath für viele gute Diskussionen und Bewältigung der obligatorischen Frustphasen, ebenso Bernd Peter-Ernst (BPE) und Daniel Bauer für wertvolle PCR- und Klonierungstips, viele Sequenzierungen und Hilfestellungen im ersten Jahr dieser Arbeit. Ein lieber Dank gilt natürlich Sonja Blume u.a. für viele Northern Blots, Christoph Schmitz-Salue für Western Blots, zahlreiche Hepatozytenpräparationen (und vieles mehr), Gudrun Rüdell für ihre sorgfältigen Protokolle, Anke Gregus für Maxipreps, Lösungen und für 1617 abgetippte Aminosäuren des ABCA6-Transporters!, Bärbel Förster für ihre Fähigkeit, den Laden zusammenzuhalten, ohne ein großes Aufsehen darüber zu verursachen und auch dem akademischen Nachwuchs Christian Lass und Ana Jakimenko für gute Gesellschaft und besonders Ana für Hilfe in der heißen Phase der letzten Monate.

Der Abteilung Klinische Pharmakologie von Herrn Professor Brockmöller danke ich für die Mitnutzung des Sequenzierers, des Taqmancyclers und für manchen Farbausdruck auf dem Deskjet 1220C. Meiner Freundin und Laborkollegin Cornelia Meineke bin ich sehr dankbar für die Idee und Konzeption der Versuche zur quantitativen Bestimmung der Splicevariante, für eine tolle Zusammenarbeit bei Zellkultur, Sequenzierungen, Klonierungen etc. sowie für viele Kaffee-Denk-Pausen im Labor und anderswo. Ein großer Dank gilt auch ihrem Kollegen Mladen Tsvetkov für seine unschätzbare Hilfe bei den letzten Klonierungen und viele gute wissenschaftliche Ideen. Danke auch an Karoline Jobst und alle anderen Laborinsassen der klinischen Pharmakologie. Frau Uta Ferch (Abt. Humangenetik) danke ich für die Bereitstellung des 18S-Referenzplasmids. Vielen Dank auch an Frau Oesch und Frau Antoniou-Lipfert für die Bereitstellung der Sertolizelllinie SER-W3.

Für die freundliche Aufnahme und zahlreiche Hilfestellungen möchte ich mich bei der Abteilung Pathologie, insbesondere bei Peter Middel, Steffi Zieschkau, Nicole Putzer, Anja Heintze, Swantje Wehn, Olga Walter und Anke Klages bedanken. Ohne Eure Hilfe hätte ich die schönen Bilder zur *in situ* Hybridisierung und zur subzellulären Lokalisation nicht in diese Arbeit aufnehmen können.

Unserem Systemadministrator Bernd Gumpel danke ich sehr für seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Computerproblemen und die Vermeidung von Viruspannen beim Verfassen dieser Arbeit. Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Anne Heder, Cornelia Meineke, Vera Ritz, meiner Chefin Karen Hirsch-Ernst und bei meinem lieben Mann Sven herzlich bedanken.

Außerhalb des Instituts danke ich allen, die dafür sorgten, daß sich mein Leben in den vergangenen 3 ¼ Jahren nicht nur ums Labor drehte, unseren Freunden aus fern und nah und besonders natürlich meiner lieben Familie, Sven und unserer Tochter Tabea, die mir jeden Tag zeigt, welche Dinge im Leben wirklich wichtig sind. Der größte Dank geht an meine Eltern, auch wenn mein Vater die Abgabe dieser Arbeit nicht mehr miterleben kann, an meine Schwiegermutter Magdalena, unsere beiden Familien und vor allem an Sven, der mich mit seiner Liebe, Geduld und viel Zeit immer vorbehaltlos unterstützt hat.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Frauke Petry, geb. Marquardt

Geboren am 01.06.1975 in Dresden

Staatsangehörigkeit: Deutschland

Verheiratet mit Sven Petry, Theologe

Eine Tochter, Tabea, geboren am 05.01.2002

AUSBILDUNG

06/1995	Abitur am Städtischen Gymnasium Bergkamen, Note: 1,1
09/1995 bis 06/1998	Studium der Chemie an der University of Reading, Großbritannien
06/1998	Abschluss: Bachelor of Science (Honours), First Class Degree BACHELOR THESIS: Exploitation of chemical pre-disposition in synthesis: An Approach to Manzamenone K, Supervisor Dr. R.C. Whitehead
09/1998 bis 06/2000	Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen
06/2000	Abschluss: Diplom-Chemikerin, Note: Sehr gut Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. de Meijere Institut für Organische Chemie, Georg-August-Universität Göttingen THEMA: Ein neuer Zugang zu funktionalisierten Carbobicyclen – Intermolekulare Stille-Heck-Kreuzkupplungen mit nachfolgender 6π -Elektrocyclisierung
10/2000 bis 03/2004	Promotion am Lehrstuhl Toxikologie im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Dr. G.F. Kahl und PD Dr. K.I. Hirsch-Ernst THEMA: Charakterisierung eines neuen <i>ATP-binding cassette</i> Transporters aus der ABCA-Subfamilie
06/2004	Rigorosum und Abschluß der Promotion mit der Note: Magna cum laude

STIPENDIEN

01/1996 bis 06/2000	Studienstiftung des Deutschen Volkes
07/2001 bis 03/2004	Promotionsförderung der Studienstiftung des Deutschen Volkes

BERUFSERFAHRUNG

1996	Werkstudentin bei der Bayer AG in Leverkusen, Bereich Umweltschutz
1997 und 1998	Werkstudentin bei der Schering AG (Bergkamen), Bereich Verfahrensoptimierung
10/2000 bis 03/2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Seit 04/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Göttingen, 03.09.2004